HAL
open science

Système de biopuces à imagerie plasmonique polarimétrique pour la caractérisation dynamique de l'anisotropie de films nano-fonctionnalisés et nano-structurés

Aurélien Duval

To cite this version:

Aurélien Duval. Système de biopuces à imagerie plasmonique polarimétrique pour la caractérisation dynamique de l'anisotropie de films nano-fonctionnalisés et nano-structurés. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : . tel-00426690

HAL Id: tel-00426690

https://pastel.hal.science/tel-00426690v1

Submitted on 27 Oct 2009

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.

Université Paris Sud – Orsay
UFR Sciences

École doctorale STITS

Système de biopuces à imagerie plasmonique polarimétrique pour la caractérisation dynamique de l'anisotropie de films nano-fonctionnalisés et nano-structurés

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 27 juillet 2009

pour l'obtention du grade de

Docteur en sciences de l'université Paris Sud – Orsay

par

Aurélien Duval

Composition du jury

Rapporteurs :	Paul Charette Malcolm Buckle
Examinateurs :	Roberto Calemczuk Marie-Pierre Fontaine-Aupart
Directeur de thèse :	Michael Canva

Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School – UMR 8501

Mis en page avec la classe thloria.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Pierre Chavel, directeur du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique (LCFIO) pour m'avoir accueilli durant ces quatre années de thèse, à Orsay puis à Palaiseau.

Je remercie très sincèrement les membres du jury pour avoir accepté de relire ce manuscrit tout en apportant leurs remarques et questions pertinentes.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Michael Canva, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe, Matériaux, Composants et Systèmes pour la Biophotonique (Macsybio). Un grand merci également à Julien Moreau pour m'avoir régulièrement conseillé.

Cette thèse n'aurait jamais pu aboutir sans l'ensemble de l'équipe Macsybio, chacun ayant apporté une contribution précieuse à ce travail. Merci à Gisèle Roger pour m'avoir tant appris du point de vue optique et pour sa patience et sa gentillesse. Merci à Alain Bellemain pour les très nombreux coups de main sur la manip, les discussions et la bonne humeur autour d'un café. Le banc n'aurait pas pu voir le jour sans le travail d'Alain Aide sur la mécanique, je lui en suis donc très reconnaissant. Merci également aux membres non-permanents de l'équipe, que j'ai toujours côtoyé avec plaisir, et qui ont tous apporté une contribution à ce travail. Je tiens à remercier particulièrement Jolanda Spadavecchia, la reine des tiramisu et de la chimie de surface, à qui je dois une éternelle reconnaissance ; Mohamed Nakkach, dit « le chef »pour sa bonne humeur permanente, ses chansons, ses blagues, sa gentillesse et ses conseils toujours avisés ; Jérôme Hottin, pour avoir eu la force et le courage de partager un bureau avec moi et pour son dynamisme ; Pierre Lecaruyer avec qui j'ai partagé de très bon moments au labo comme à la ville.

Ce travail a été réalisé grâce à de nombreuses collaborations, formelles et informelles, avec des chercheurs venants de plusieurs domaines. Ces collaborations m'ont permis d'aborder les problématiques de cette thèse avec un œil différent. Au sein de l'Institut d'Optique, je tiens à remercier Jean Taboury pour m'avoir permis d'effectuer des TP sur les biopuces, Philippe Lalanne pour l'aide qu'il m'a apporté dans la compréhension de la méthode rigoureuse des ondes couplées et pour son code de calcul, et Buntha Ea-Kim pour son aide précieuse dans la mise au point et le développement d'échantillons nanostructurés en salle blanche.

Dans le cadre du projet ANR « Nanobioforme » dans lequel ce travail s'inscrit largement, je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai pu partager des manips. Il s'agit, pour le Centre de Génétique Moléculaire d'Orsay d'Aude Laisné et de Denis Pompon ; pour l'Institut des Nanotechnologies de Lyon de Marie Trévisan, de Jean-Pierre Cloarec et d'Eliane Souteyrand ; pour l'Institut d'Electronique Fondamentale de Sylvain Held, de Philippe Gogol et de Bernard Bartenlian.

En parallèle de cette thèse, j'ai eu le plaisir de suivre la formation dispensée par l'Institut de Formation Supérieure Biomédicale de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif. Cette formation m'a permis de m'éloigner de ma thématique principale et de développer une approche plus médicale. Les cours ont également été le prétexte de rencontres enrichissantes. Je tiens donc à remercier Malcolm Buckle (mon tuteur), Claude Malvy, Luis Villanueva, Christine Ho, Liliane Massade, ainsi que les étudiants : Orestis, Matthias, Miriam, Stéphanie, Jessica, Julie, Guillaume, Marie, Perrine et tous les autres.

Enfin, la réussite d'une thèse passe avant tout par le soutien des amis et de la famille. De ce côté-ci, je peux sans prétention affirmer que j'ai reçu le meilleur soutien qui soit. Je remercie donc chaleureusement mes amis de Palaiseau que j'ai le plaisir de connaître pour certains depuis le collège : Mélanie, Matthieu, Aurélien, Stéphane, Olivier, Benjamin, Julien, Jean-Charles, Thomas et Peggy. A ceux-ci sont venus s'ajouter les parisiens que j'ai commencé à côtoyer un peu plus tard : Marion et Sylvain, François, Guillaume, Mathilde et François, Anne-Sophie et Alexandre. Mon détour par le Danemark a enrichi cette liste d'éléments indispensables : Stijn (but come on), Charles et Patrica, Julien et Florence, Gwenn , Maelle, Ashley, Alex, Nate, Katarina et Henrik, Mary, Zoe et Peter, Candice, Brieuc et Solveig, Eirik, Skee. Finalement, je peux citer quelques inclassables rencontrés parfois dans des circonstances mystérieuses : Pierre et Angéline, Peggy, Crash, Lison, Thomas, Olivier, Valentin. Les oubliés me pardonneront, je l'espère.

Pour finir, je remercie du fond du coeur ma famille pour son soutien sans faille et toi Flora pour tout le bonheur que tu m'apporte à chaque instant.

Pendant que je fêtais ici en France,
Un buisson trop haut et une route dangereuse
Ont fait basculer vos vies là bas au Canada.
À toi Pierre, qui n'est plus là,
À Angéline et Oscar,
Je dédie cette thèse.

Table des matières

Table des figures **xiii**

Liste des tableaux **xxv**

Introduction générale **1**

Chapitre 1
État de l'art **5**

Introduction 6
1.1 Biopuces à ADN par fluorescence 8
1.2 Les biopuces à résonance de plasmon de surface 11
1.2.1 Historique des biocapteurs à SPR 11
1.2.2 Principe de base 13
1.2.3 Relations de dispersion et couplage 15
1.2.3.1 Couplage par réseau 16
1.2.3.2 Couplage par prisme 18
1.2.4 Choix du métal 18
1.2.5 Grandeurs caractéristiques des plasmons de surface 21
1.2.6 Aspects multimodaux 23
1.2.6.1 Balayage angulaire 24
1.2.6.2 Balayage spectral 27
1.2.6.3 Nappes spectro-angulaires 30
1.2.6.4 Suivi dynamique d'interactions 32
1.2.7 Imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) 33
1.3 Techniques de mesure de l'anisotropie de systèmes biologiques 35
1.3.1 L'anisotropie optique 35
1.3.2 Mesures ellipsométriques 36

1.3.3 Microscopie en lumière polarisée 38
1.3.4 Mesure de l'anisotropie de fluorescence 40
Conclusion 42

Chapitre 2
L'imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface

Introduction 46
2.1 Réflectivité d'un assemblage de couches isotropes 48
2.1.1 Modèle de Rouard étendu 48
2.1.2 Configuration de Kretschmann 51
2.1.3 Validité du modèle 52
2.2 Généralisation au cas anisotrope 54
2.2.1 Indices effectifs dans un milieu uniaxe 55
2.2.1.1 Variations angulaires zénithales (θ) : 57
2.2.1.2 Variations angulaires azimutales (ϕ) : 57
2.2.2 Anisotropie d'une monocouche d'ADN 58
2.2.3 Calcul de réflectivité différentielle 60
2.3 Montage expérimental 61
2.3.1 Source lumineuse 63
2.3.2 Système de collimation et de polarisation 64
2.3.3 Miroir motorisé et système afocal 65
2.3.4 Pyramide 66
2.3.4.1 Déformations induites par la pyramide 67
2.3.5 Caméra CCD 68
2.3.6 Système de fluidique 68
2.3.7 Logiciel de pilotage 70
2.3.8 Illumination des deux bras 71
2.3.9 Synchronisation temporelle des caméras 72
2.3.10 Châssis mécanique 74
2.4 Validation du système 76
2.4.1 Rapport signal à bruit 76
2.4.2 Linéarité de la réponse 79
Conclusion 81

Chapitre 3
SPRI polarimétrique pour l'étude de systèmes biologiques

Introduction 84
3.1 Protocole type de capture d'un signal anisotrope 85
3.1.1 Détermination d'un angle optimal 85
3.1.2 Capture dynamique des images 88
3.1.3 Recalage des images 91
3.1.4 Traitement des données 92
3.1.4.1 Normalisation intra-axe 94
3.1.4.2 Correction inter-axes 95
3.2 Anisotropie induite par un flux orienté 99
3.2.1 Principe des PDNA 99
3.2.2 Structuration de l'échantillon 101
3.2.3 Mesure de l'anisotropie par P-SPRI 102
3.3 Anisotropie de systèmes biologiques sous champ électrique 106
3.3.1 Montage électrique 107
3.3.2 Dépôt de l'hémimembrane 108
3.3.3 Impulsions électriques 110
3.3.4 Discussion 113
3.4 Filaments orientés sous champs magnétique 115
3.4.1 Substrats structurés 115
3.4.2 Fonctionnalisation chimique de la surface et greffage des billes . . . 116
3.4.3 Caractérisation optique 117
3.4.4 Mesure de l'anisotropie par P-SPRI 118
3.4.5 Discussion des résultats 122
Conclusion 126

Chapitre 4
Micro– et nano–structuration anisotrope de substrats

Introduction 128
4.1 Modélisation de réseaux métalliques par la méthode modale de Fourier . . 129
4.1.1 Méthode modale de Fourier 130
4.1.2 Étude de réseaux métalliques 1D : or structuré sur verre 133
4.1.2.1 Couche métallique uniforme 135

4.1.2.2 Structures métalliques sur verre 136
4.2 Dépôts de couches minces métalliques 140
4.2.1 Évaporation sous vide 141
4.2.2 Pulvérisation cathodique 143
4.2.3 Mesures d'épaisseur des dépôts 145
4.2.3.1 Échantillons obtenus par évaporation sous vide 147
4.2.3.2 Échantillons obtenus par pulvérisation cathodique 148
4.2.4 Mesures de résistivité des couches d'or 149
4.3 Structuration par photolithographie UV 152
4.3.1 Définition des motifs à réaliser 152
4.3.2 Procédure de structuration par photolithographie UV 154
4.3.3 Caractérisation par SPRI 155
4.4 Structuration par lithographie à faisceau d'électrons focalisé 158
4.4.1 Principe de la lithographie à faisceau d'électron focalisé 159
4.4.2 Définition des motifs à réaliser 161
4.4.3 Procédé de fabrication 161
4.4.4 Caractérisation par SPRI 165
Conclusion 167

Conclusion et perspectives **169**

Annexes **175**

Annexe A
Equations de Maxwell à l'interface d'un métal et d'un dielectrique **175**

Annexe B
Indice de réfraction de l'or **179**

Annexe C
Modélisation de la fonction dielectrique des métaux **181**

Annexe D
Algorithme de recalage des images **193**

Annexe E
Glossaire **199**

Bibliographie **203**

Table des figures

1 Illustration du principe de fonctionnement d'une biopuce. Les sondes sont immobilisées sur la surface de la biopuce par le biais d'une chimie de surface spécialisée. Les cibles circulantes entrent en contact avec les sondes et le transducteur transforme le signal chimique en signal informatique. 6

2 (a) Illustration du principe de fonctionnement d'une biopuce à ADN. L'ARNm est extrait du milieu cellulaire à analyser puis marqué par fluorescence avant d'être déposé sur la biopuce précédemment fonctionnalisée par les sondes (illustration de W. Lin [1]). (b) Image du niveau d'expression de 45 gènes d'une plante : l'*arabidopsis* (première publication de l'analyse d'un génome complet en 1995 [2]) 9

3 Une des biopuces les plus récentes : *Genechip* de Affymetrix. Les zones d'interaction ont une surface de 20x20µm, soit plus de 250000 zones/cm^2 [3]. Les sondes sont directement synthétisées *in-situ* 10

4 Nombre de publications par année (entre 1982 et 2008) dont les mots clés contiennent « surface plasmon resonance » ou « plasmonic(s) ». (Bleu) Résultats pour l'interrogation de la base ISI Web of Knowledge (incluant les proceedings de conférences). (Vert) Résultats pour la base Medline, plus orientée biomédical et donc plus en aval dans les applications. 12

5 Caractéristiques d'un plasmon de surface se propageant sur une distance L à l'interface entre un métal et un diélectrique. La pénétration du champ évanescent est l_d dans le diélectrique et l_m dans le métal. Le vecteur $\vec{E}$ représente la direction du champ électrique de l'onde incidente, le vecteur $\vec{H}$ la direction du champ magnétique. λ_0 est la longueur d'onde dans le vide de l'onde incidente et θ_i est l'angle d'incidence. Les matériaux ont pour constante diélectrique ε_i (milieu d'incidence), ε_m (métal) et ε_d (diélelectrique). La couche de métal a pour épaisseur e_m. 14

6 Relations de dispersion : (plein) d'un plasmon de surface ; (pointillés) d'un onde plane se propageant dans l'air. 16

7 Couplage par réseau d'un plasmon de surface de vecteur d'onde k avec une onde incidente dans le vide, formant un angle θ_i avec la normale à la couche de métal. La réseau présente une période a, une épaisseur e_r et une fonction diélectrique ε_r. La couche de métal possède une fonction diélectrique ε_m et une épaisseur e_u. Les ordres de diffractions -1, 0 et +1 sont représentés en rouge. 17

8 Relations de dispersion de plasmons de surface générés par un couplage par réseau de période Λ. 17

9 Couplage d'une onde incidente d'angle θ_i avec la normale à la couche avec un plasmon de surface en utilisant la configuration de Kretschmann. Le milieu diélectrique à pour indice n_d et le verre possède un indice $n_i > n_d$. . 19

10 Relations de dispersion : (plein) d'un plasmon de surface ; (pointillés) d'une onde plane se propageant dans un verre d'indice n_i. 19

11 Grandeurs caractéristiques d'un plasmon de surface. Profondeurs de pénétration : (a) dans le milieu diélectrique. (b) dans le métal. (c) Longueur de propagation latérale. (rouge) le milieu ambiant est de l'air ($n_d = 1$). (bleu) le milieu ambiant est de l'eau ($n_d \approx 1,331$ à $\lambda = 670$ nm). La ligne pointillée représente $\lambda = 670$ nm.Les grandeurs sont prises pour une diminution de $1/e$ du champ électrique. 22

12 Montage mono-capteur en balayage angulaire. Le prisme est situé au centre de la platine de rotation et est surmonté d'une couche de métal sur laquelle repose la cellule d'interaction. Un laser Hélium-Néon émet un faisceau monochromatique à 632,8 nm. Une lame séparatrice permet d'obtenir un faisceau de mesure (collecté par la photodiode MES) et un faisceau de référence (collecté par la photodiode REF). Le faisceau de mesure est polarisé TM avant se réfracter à la base du prisme. 25

13 Réflectivité angulaire d'un montage mono-capteur SF10 / Cr (2 nm) / Au (48 nm) / diélectrique ($n_d = 1,33$) simulé. (a) pour une différence d'indice de $\Delta n = 10^{-2}$ RIU (à partir de $n_d = 1,33$). (b) pour un dépôt de 10 nm de matériau d'indice $n = 1,48$. Les inserts représentent les variations de réflectivité induites par le passage de la courbe bleue à la courbe rouge. . . 26

14 Montage mono-capteur à balayage spectral. Une source de lumière blanche est collimatée puis polarisée TM. Le faisceau, d'angle d'incidence θ_i avec la normale à la couche de métal, est réfracté à travers un prisme pour se réfléchir sur sa base. Le faisceau réfléchi est collecté à travers un lentille par un spectromètre. 28

15 Réflectivité spectrale d'un montage mono-capteur SF10 / Cr (2 nm) / Au (48 nm) / diélectrique ($n_d = 1,33$) simulé. (a) pour une différence d'indice de $\Delta n = 10^{-2}$ RIU (à partir de $n_d = 1,33$). (b) pour un dépôt de 10 nm de matériau d'indice $n = 1,48$. Les inserts représentent les variations de réflectivité induites par le passage de la courbe bleue à la courbe rouge. . . 28

16 Rapport des sensibilités angulaires et spectrales (S_θ/S_λ) exprimé en $^\circ$ / nm en fonction de la longueur d'onde, pour des différents indices de réfraction n_d. (noir) $n_d = 1,33$, (bleu) $n_d = 1,34$, (rouge) $n_d = 1,35$ 30

17 Montage à balayage spectro-angulaire. Une source de lumière blanche est utilisée en entrée d'un monochromateur. Celui-ci permet de sélectionner, à l'aide d'un réseau de diffraction motorisé, la longueur d'onde de travail. Le faisceau quasi-monochromatique sortant est ensuite collimaté, puis polarisé TM, avant de se réfléchir sur un miroir motorisé. Le faisceau pénètre un premier système afocal avant de venir se réfléchir sur la surface de métal à travers un prisme. Après réflexion, un second afocal permet d'imager la surface sur un détecteur. 31
18 (a) Nappe spectro-angulaire d'un système prisme/Cr/Au/eau. (b) Coupes angulaires à différentes longueurs d'onde. 32
19 Évolution temporelle de la réflectivité ΔR d'un biocapteur à SPR lors de l'adsorption sélective d'une biomolécule sur la surface fonctionnalisée. . . . 33
20 (gauche) Image de variations de réflectivité (fausses couleurs) obtenue avec une biopuce à SPRI, pour des interactions ADN : ADN (oligonucléotides). (droite) Évolution temporelle de la réflectivité de deux plots (encadrés en rouge sur l'image de gauche) lors d'une phase d'injection de séquence de calibration (commune aux deux plots) suivie d'une phase d'injection d'un oligonucléotide parfaitement complémentaire à l'un des deux plots (courbe rouge) et partiellement complémentaire à l'autre plot (coube bleue). 34
21 Ellipsoïde des indices (a) d'un matériau uniaxe positif (b) d'un uniaxe négatif. 36
22 Principe de fonctionnement d'un ellipsomètre. (a) Une onde polarisée linéairement d'angle ϕ_0 va subir une réflexion spéculaire sur l'échantillon. Après réflexion, la polarisation de l'onde devient elliptique (d'angle Ψ) et subit un déphasage Δ. (b) Détail de la polarisation elliptique obtenue. . . . 37
23 Principe de fonctionnement d'un microscope en lumière polarisée [4]. . . . 38
24 (a) Observation au microscope à lumière polarisée d'un gel d'ADN de sperme de saumon. (b) Diagramme des biréfringence de Michel-Lévy [5] . . 39
25 Principe de la mesure de l'anisotropie de fluorescence. Une source de lumière monochromatique est polarisée linéairement avant d'illuminer un échantillon contenant des fluorophores. La fluorescence émise est collectée par un photodiode devant laquelle est positionné un polariseur sélectionnant les composantes $I_\perp$ ou $I_{//}$ du champ émis. 40
26 (a) Pyramide sur laquelle repose la biopuce et la couche de molécules anisotropes. Les molécules sont orientées dans la demi-sphère supérieure au dessus de la couche de métal, en formant un angle azimutal ϕ et zénithal ϕ. Deux faisceaux polarisés TM se réfléchissent orthogonalement sur la couche d'or. La configuration de Kretschmann est utilisée, avec une pyramide au lieu d'un prisme. (b) photographie du prisme de verre. 47
27 Représentation d'un multicouche dans la configuration de Kretschmann. L'onde plane incidente par le bas forme un angle θ_0 avec la normale au multicouche. Le franchissement de chaque interface donne lieu à une réflexion partielle et une transmission réfractée. Chaque couche k possède un indice de réfraction (n_k, k_k) ($k = 0$ pour les diélectriques) et une épaisseur e_k. Le prisme et le milieu ambiant ont des épaisseurs infinies. 48

28 réflexions et transmissions partielles d'une onde traversant une couche. . . 50
29 Configuration de Kretschmann. L'onde plane incidente possède un angle de rasance externe θ_{ext} . . . 51
30 Comparaison entre la mesure expérimentale d'un plasmon angulaire et le modèle de Rouard étendu. . . . 53
31 Ellipsoïde des indices d'un matériau uniaxe. . . . 56
32 (a) Une molécule d'ADN schématisée en un empilement de « pièces ». (b) ADN disposé en monocouche et orienté dans le repère sphérique (r, θ, ϕ) . 58
33 Anisotropie effective $\Delta N = N_x - N_y$ pour une monocouche d'ADN orienté en fonction de l'angle zénithal θ et de l'angle azimutal ϕ. Pas du calcul : 0,5°(θ, ϕ) . . . 59
34 Différence de réflectivité $\Delta R = R_x - R_y$ correspondante à une monocouche d'ADN orienté de 1 nm d'épaisseur. Pas du calcul : 0,5°(θ, ϕ), 2°(calcul de l'angle de travail pour la variation de réflectivité) . . . 61
35 Détails d'un des deux bras du montage de P-SPRI. . . . 62
36 Spectre d'émission de la source LED utilisée dans le montage P-SPRI (rouge) mesuré par un spectromètre. . . . 64
37 Système de collimation et de polarisation du faisceau. . . . 65
38 Chemin optique à travers le système afocal et la pyramide. . . . 65
39 Pyramide enchâssée dans sa monture, sur laquelle est positionnée une lamelle structurée. . . . 66
40 carré d'or d'1 mm de côté imagé par le système de P-SPRI. (a) axe 1, (b) axe 2. . . . 67
41 Cellule d'interaction hexagonale vue de face et de côté. . . . 69
42 Vue schématique du circuit de fluidique. . . . 70
43 Logiciel de pilotage du banc de P-SPRI (ici, mesure en temps-réel de la réflectivité). . . . 71
44 Platine de couplage entre la LED et la fibre optique d'entrée du coupleur. Les degrés de liberté de la platine sont indiqués. . . . 72
45 Banc expérimental vu de dessus. Le contrôle des moteurs n'est pas indiqué pour plus de clarté du schéma. . . . 73
46 Photographie du banc de P-SPRI, les deux caméras sont visibles en bleu, la cellule d'interaction en blanc (haut de l'image). La pyramide est disposée au centre de la colonne. . . . 74
47 Simulation de la réflectivité TM d'une lame d'or montée sur le banc de P-SPRI. (a) Réflectivité or / milieu ambiant en fonction de l'indice de réfraction du milieu ambiant (massif) et de l'angle d'incidence. La plage angulaire du banc de P-SPRI et la gamme d'indices de réfraction atteignables (flanc de résonance) sont indiqués en rouge. (b) Réflectivité or/ diélectrique ($n = 1,48$) / milieu ambiant ($n = 1,33$) en fonction de l'épaisseur du diélectrique et de l'angle d'incidence. Le pas de calcul est de (a) $1\times^{-3}$ (indice) et 0,1°(b) 0,25 nm (épaisseur) et 0,1°. . . . 75
48 Rapport signal à bruit du montage de P-SPRI . . . 77

49 Variations de réflectivité induites par l'injection successive de mélanges eau / glycérol de concentration croissante en fonction de la concentration de glycérol et de l'indice de réfraction du mélange. les barres d'erreur verticales représentent la dispersion des valeurs sur les 9 carrés d'or utilisés (écart-type). La barre d'erreur horizontale représente l'erreur de mesure au réfractomètre d'Abbe ($\pm 5 \times 10^{-4}$) 79

50 Exemple d'utilisation du programme Igor pour la sélection d'une grille de points. 86

51 Simulation illustrant le principe de calcul de la normalisation TM/TE pour un système à SF11/or/eau à 670 nm. (rouge) courbe de réflectivité angulaire en polarisation TM. (bleu) courbe de réflectivité angulaire en polarisation TE. (noir pointillés) courbe normalisée TM/TE. (noir) courbe normalisée TM/TE et corrigée des transmittances des faces d'entrée et de sortie de la pyramide (SF11). 87

52 Exemples de courbes expérimentales extraites par notre programme à partir des points indiqués par la figure 50. En haut, axe 1. En bas, axe 2. A gauche, réflectivité angulaire normalisée TM/TE (en %). A droite, pente de réflectivité angulaire correspondante (en %/°. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type (spatial) des points. Les minima de réflectivité et les maxima de pente de réflectivité sont marqués par une flèche. 89

53 (haut) Courbes de variations de réflectivité dynamique de sauts de glycérol 0,5 et 1%. (bas) Valeur du plateau de saut d'indice 0,5% de glycérol, pour les 9 points indiqués dans la figure 50. (gauche) axe 1, (droite) axe 2. . . . 90

54 Différence de réflectivité entre les deux axes avant correction par saut d'indice. 94

55 (noir) Histogrammes de variations de réflectivité avec un pas de 0,1%, (rouge) ajustement par une Gaussienne.(a) Axe 1, (b) axe 2. 95

56 Courbes de variations de réflectivité dynamique de sauts de glycérol 0,5 et 1% après normalisation intra-axe. (a) Axe 1, (b) axe 2. 96

57 Courbes de variations de réflectivité dynamique d'un saut de glycérol 0,5% après correction inter-axes, (a) axe 1, (b) axe 2. (c) courbe de différence de réflectivité résultant de la soustraction de l'axe 2 à l'axe 1. 98

58 Structure d'un PDNA. (haut) oligonucléotide simple-brin. (milieu) protéine B5 modifiée et ses liaisons. (bas) hémimembrane de phospholipides Ni-DOGS ancrée sur une SAM déposée sur l'or. Image issue de [6] 100

59 Polymérisation de PDNAs pour former des objets flottants à fort facteur de forme. (haut gauche) dimérisation de PDNAs (AA') et (BB') grâce à un oligonucléotide de liaison (complémentaire A' - complémentaire B). (haut droite) formation d'un trimère par le même mécanisme. (bas) vue « de profil » d'un objet flottant sur la membrane. Les liaisons supplémentaires de la protéine peuvent être utilisées pour créer un terminaison latérale. Image issue de [6] 100

60 (a) Dispositif de gravure utilisé. Au centre est disposée la lame d'or, surmontée de l'aiguille de gravure. (b) Réseau interdigité d'électrodes obtenu grâce au dispositif de gravure, la distance entre deux traits est ici inférieure à 500µm. 101
61 (a) Réseau de 4 électrodes interdigitées. Les zones isolées sont représentées en noir. (b) Image de référence plasmon recalée. Les zones de mesure bleues sont disposées orthogonalement aux flux, les zones rouges sont disposées parallèlement au flux. Les zones noires sont utilisées comme référence. . . . 102
62 Cartographie de la variation de réflectivité induite par la fusion de l'hémimembrane supportée. L'échelle de couleurs (en bas à gauche) est en %. Le bleu représente les valeurs les plus négatives (jusqu'à -1,2%), le violet les valeurs proches de la moyenne de prise (environ 2%), et le rouge les valeurs les plus positives (jusqu'à +5,3%). 104
63 Diagramme temporel de différence de réflectivité lors des l'arrêts et des périodes de fonctionnement de la pompe. La ligne verte indique l'image de référence des courbes. Les courbes bleues indiquent les zones de mesure disposées orthogonalement au flux. Les courbes rouges indiquent les zones de mesure disposées parallèlement au flux. 104
64 (a) Matrice de 8 électrodes gravées sur la lame d'or. la SAM de l'électrode G a été désorbée électriquement de manière réductive. (b) Image de référence plasmon recalée. Les groupes de couleur représentent des zones de mesure appartenant à la même électrode. 106
65 Montage électronique à 3 électrodes utilisé dans l'expérience pour appliquer un champ électrique sur la puce. (puce) E_1 et E_2 sont les électrodes entre lesquelles le potentiel V est appliqué. REF est l'électrode de référence. (potentiostat) W est la sortie pour l'électrode de travail (masse virtuelle), CE (sortie de contre-électrode) et REF (référence) sot reliées ensemble. AUX indique la sortie du potentiostat. Les voies de l'oscilloscope sont symbolisées par leur numéro. 107
66 Cycle de rampes de tension (-0,75 V à + 0.75 V) appliqué à la puce, entre les électrodes B et D, et observé à l'oscilloscope. (bleu) tension de consigne, (rose) voie 1, (jaune) voie 2. Les tensions ont été lissées par filtrage des hautes fréquences (transformées de Fourier). 108
67 Cartographie de la variation de réflectivité induite par le dépôt de l'hémimembrane lipidique. L'échelle (en bas à gauche) est en %. (bleu) faible variations (minimum 0 ;8%), (violet) variations moyenne (environ 1,4%), (rouge) forte variations 109
68 (a) Différence de réflectivité résultante d'une série d'impulsions électriques carrées envoyées entre les électrodes B et D de la puce. Le chronogramme (en bas du graphique) représente la consigne de tension donnée au potentiostat. Légende des courbes : (rouge) Électrode D, (bleu) électrode B, (noir) électrodes A,C,E et F. (b) Suivi à l'oscilloscope de la tension pour les 3 premières impulsions carrées. (bleu) tension de consigne, (rose) voie 1, (jaune) voie 2. Les tensions ont été lissées par filtrage des hautes fréquences (transformées de Fourier). 111

69 Différence de réflectivité, mesurée pour chaque électrode de la puce, résultante d'une série d'impulsion électriques carrés de durée variable. La tension est établie entre les électrodes E et F de la puce. Le chronogramme (en bas du graphique) représente la consigne de tension donnée au potentiostat. Légende des courbes : (orange) électrode A, (rouge) électrode C, (vert) électrode E, (bleu) électrode F. Les données de SPR sont non filtrées. 113

70 Différence de réflectivité, mesurée pour chaque électrode de la puce, résultante d'une série d'impulsion électriques carrés de durée variable. La tension est établie entre les électrodes F et C de la puce. Le chronogramme (en bas du graphique) représente la consigne de tension donnée au potentiostat. Légende des courbes : (orange) électrode A, (rouge) électrode C, (vert) électrode E, (bleu) électrode F. Les données de SPR sont non filtrées 114

71 Motif utilisé pour les expériences sur des billes magnétiques 116

72 (a) Bille magnétique comprenant un cœur ferreux et une surcouche de polymères. (b) Billes polymérisées sous aimant (les lignes de champs sont représentées par des pointillés rouges). 117

73 Filaments de billes orientés observés sous loupe binoculaire à deux grossissements différents. (a) Avant rinçage, les filaments apparaissent sur toute la surface. Les zones claires appartiennent aux carrés recouverts d'or, tandis que les zones appartiennent au substrat de verre. L'aspect désordonné de la couche provient du fait que l'observation est faite à travers toute l'épaisseur de la chambre, on observe donc filaments en solution et les filaments greffés. (b) Après rinçage, et à un grossissement plus important, seuls les filaments greffés restent visibles. La trace blanche est l'entrée de la chambre *Coverwell*, et n'a pas d'intérêt pour l'observation. 118

74 Positions de l'aimant autour de l'échantillon. « BM » indique la position des billes magnétiques, « cam1 » (resp. « cam2 ») représente la position de la caméra de l'axe 1 (resp. axe 2). Le châssis métallique est représenté en gris, autour de l'échantillon. 120

75 Positions des points sur la lamelle utilisée dans l'expérience. 121

76 Position *a1* de l'aimant et son placement autour de l'échantillon (positions *pos1*, *pos2* et *pos0*). Le pôle nord est situé sur une grande face (indiqué par la lettre N). 122

77 (haut) Mesure de l'anisotropie de filaments par P-SPRI pour l'orientation *a1* de l'aimant. La ligne verte indique la référence temporelle des mesures. La courbe bleue correspond au point 1 (sans filaments), la courbe rouge au point 23 (contenant les filaments). Les courbes épaisses sont un lissage LOWESS 16 points des données brutes (marqueurs). (bas) Chronogramme des images observées au microscope correspondantes. 123

78 Simulation de la variation de réflectivité induite par le dépôt de billes de PMMA sur la surface d'or. Le calcul utilise une couche équivalente de 10 nm d'épaisseur, d'indice effectif calculé par la relation de Lorentz-Lorenz. (rouge) billes de 200 nm de diamètre. (noir) billes d'1µm de diamètre. . . . 124

79 Illustration schématique d'un réseau de pistes d'or sur un substrat de verre. Un plasmon de surface se propageant le long des pistes (faisceau 1) se comporterait comme si le milieu était uniforme. Un plasmon de surface se propageant orthogonalement au réseau (faisceau 2) subirait une modulation périodique. 129

80 Géométrie d'un réseau lamellaire périodique de période Λ et d'épaisseur d. La largeur des motifs (ou îlots) est déterminée par le taux de remplissage f. La région III peut-être décomposée en un nombre quelconque de sous-régions d'épaisseur variable. L'onde plane, d'incidence oblique (angle θ par rapport à la normale) est diffractée et transmise par le réseau. La méthode consiste à calculer les énergies relatives des ondes transmises et diffractées par rapport à l'onde incidente. 130

81 (a) Cellule élémentaire de calcul représentant une période Λ du réseau. L'onde plane (de longueur d'onde λ) polarisée TM est incidente au réseau suivant un angle θ dans le milieu du substrat n_s. Le réseau est caractérisé par une piste métallique (d'indice n_m) de largeur $f\Lambda$ et d'épaisseur d, centré sur l'axe de symétrie $x = 0$. La piste est recouverte d'une couche de diélectrique (n_d) d'épaisseur w afin de simuler l'effet d'un dépôt sur la structure. Le milieu ambiant est caractérisé par un indice n_a. (b) jeu de paramètres utilisés dans la simulation. 134

82 (a) Réflectance TM spectro-angulaire et (b) variation de réflectivité $\Delta R/\Delta e$ induite par le dépôt de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$), sur une couche d'or uniforme de $d = 50$ nm d'épaisseur. Le milieu ambiant est l'eau ($n_a = 1,330$). Les valeurs sont données pour un substrat BK7. Le pas de calcul est 0,25° et 5 nm. 135

83 Longueur d'onde du plasmon de surface λ_{pl} en fonction de la longuer d'onde d'excitation λ_0 pour les indices de réfraction du mileu ambiant suivants : (noir) 1,33, (bleu) 1,4, (vert) 1,5 et (rouge) 1,6. 136

84 Calcul par la méthode modale de Fourier de la réflectance TM de réseaux or ($d = 50$ nm) / eau ($n_a = 1,330$) sur substrats BK7, pour 6 pas de réseau $\Lambda = 200$, 400, 600 ,800, 1000, et 2000 nm, et un taux de remplissage $f = 50\%$. Le pas de calcul est de 1° et 2nm. 137

85 Variation de réflectivité induite par l'ajout d'1 nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) à un réseau BK7 / or / eau. Le calcul est effectué pour les 6 pas de réseau précédents. L'échelle des couleurs $\Delta R/\Delta e$ est donnée en % / nm. Le pas de calcul est de 1° et 2nm. 138

86 Variation de réflectivité TM à 670 nm résultante du dépôt d'une couche d'1 nm de diélectrique ($n = 1,48$) en fonction de l'épaisseur d'or et de l'angle d'incidence, pour un système SF11 / chrome (2 nm) / or / diélectrique / eau ($n = 1,33$). Le point optimum (indiqué par des lignes pointillées blanches) se situe à $58,0$ nm et $55,41°$. Le calcul a été effectué pour 1024×1024 points. 141

87 Principe d'un bâti de dépôt de couches minces par évaporation sous vide. Ici, la technique de chauffage par effet Joule est utilisée. L'épaisseur du dépôt est contrôlé par une boucle d'asservissement. Une microbalance a quartz est positionnée à proximité de l'échantillon. La variation de fréquence du quartz donne l'ordre de positionner un coupe-faisceau lorsque l'épaisseur de dépôt de consigne est atteint. 142

88 Principe de fonctionnement d'un dépôt par pulvérisation cathodique. Le matériau à déposer (cible) recouvre la cathode, le substrat est disposé directement en face de l'électrode. (1) Un gaz d'argon est injecté dans la chambre et la cathode est mise sous tension. (2) les électrons libres présents dans l'enceinte sont naturellement repoussés par la cathode, entrant en collision avec les atomes d'argon. Il résulte des ions Ar^+, formant un plasma autour de l"électrode. (3) Les ions sont attirés par la cathode, et entrent en collision avec les atomes de la cible. (4) Les atomes de la cible ainsi éjectés sont pulvérisés sur le substrat. 144

89 Courbes de réflectivité TM angulaire expérimentale (rouge) et théorique (bleu) obtenue pour des couches de métal déposées par évaporation sous vide. (a) Dépôt Ti/Au réalisé par l'*IEF*. (b) Dépôt de référence Cr/Au, réalisé par *Schott*. 147

90 Courbes de réflectivité TM angulaire expérimentale (rouge) et théorique (bleu) obtenue pour des couches de métal Ti/Au déposées par pulvérisation cathodique. 148

91 Principe de la mesure de la résisitivité d'une couche mince métallique d'épaisseur e. Quatre électrodes, séparées par une distance s, sont mises au contact avec la surface du métal. Un courant I circule entre les électrodes extérieures (rouge). La tension aux borne des électrodes intérieures (bleu) est mesurée. 149

92 Géométrie du motif or /verre déposé par photolithographie UV. (a) Matrice de zones de pas différent 1, 2 et 5 µm. (b) Détail d'une zone de pas Λ. Les réseaux sont séparés par un espace de 200 µm et sont orientés orthogonalement par paire diagonale. Chaque réseau couvre une surface d'1 mm par 1 mm. 153

93 Procédure de photolithographie UV par lift-off. (1) spin-coating, (2) couche de résine uniforme, (3) insolation UV, (4) monomérisation de la résine, (5) développement, (6) dépôt métallique, (7) lift-off. 154

94 Exemples de réseaux observés en SPRI (réflectivité normalisée TM/TE). La direction du vecteur d'onde du plasmon de surface est indiquée par la flèche bleue. La barre rouge indique l'échelle. Les deux réseaux du haut ont une période de 5 µm, et les deux réseaux du bas de l'image ont une période de 2µm. Les réseaux à gauche de l'image sont orientés horizontalement, tandis que les réseaux à droite de l'image sont orientés verticalement. Finalement, les lignes a, b, c, d (vert) indiquent les coupes détaillées dans la figure 95 . 156

95 Coupes orthogonales aux réseaux, représentant le profil de réflectivité TM /TE de différents réseaux de l'image SPR de la figure 94. (a) et (b) : réseaux 5 µm ; (c) et (d) : réseaux 2 µm. (a) et (c) : plasmon orthogonal au réseau ; (b) et (d) : plasmon parallèle au réseau. 157

96 Illustration du fonctionnement de la colonne d'un système EBL. La source (en haut) émet un faisceau d'électrons qui est focalisé sur le l'échantillon par le jeu d'un ensemble de lentilles. Ce dernier se déplace grâce au mouvement d'une platine de translation X-Y. l'écriture continue est assurée grâce à l'effaceur de faisceau (beam blanker), qui défléchi les électrons entre chaque point. 159

97 Simulation Monte-Carlo (500 électrons) de la trajectoire d'un faisceau d'électrons à 80 keV à travers la résine électrosensible (PMMA), la couche d'or et le substrat de verre. 161

98 Géométrie des réseaux fabriqués par lithographie électronique. (a) Matrice de 64 zones carrées de 1 mm de côté. Chaque zone est caractérisée par un réseau possédant un pas et une orientation propre formant un code. Les carrés noirs sont les références sans motif, pour mesurer le plasmon sur de l'or uniforme. (b) détail d'un réseau. la zone structurée correspond à une surface de 600 µm par 600 µm. 162

99 Procédé de fabrication de motifs or / verre par lithographie à faisceau d'électrons focalisé.(1) échantillon uniforme, (2) spin-coating de la résine, (3) sensibilisation de la résine par faisceau d'électron, (4) développement, (5) gravure ionique (IBE), (6) échantillon structuré recouvert de résine. (7) échantillon final. 163

100 Images caractéristiques de l'échantillon nanostructuré obtenu. (a) image MEB d'un réseau 800 nm (10 kV, ×10000). (b) détail du réseau (10 kV, ×60000). (c) Image en microscopie optique d'un motif avant gravure ionique. (d) Image en microscopie optique du bord d'un motif après gravure, illustrant le sous-développement de l'échantillon. 164

101 Courbes de réflectivité spectrale normalisées TM/TE d'un motif Au / BK7 800 nm (f = 50%) à 18° d'incidence externe. Le milieu ambiant est de l'eau. (a) (rouge) le plasmon se propage parallèlement aux pistes de métal, (bleu) courbe de référence expérimental sur de l'or uniforme. (b) (rouge) Le plasmon se propage orthogonalement aux pistes, (noir) simulation par la méthode modale de Fourier de la propagation orthogonale aux pistes. Le pas de calcul et de mesure est de 10 nm. (courbes expérimentales) La largeur spectrale de la source est de 15 nm. 166

1 Propagation d'une onde à l'interface entre un métal et un diélectrique. . . 176

2 Modèle de Drude des métaux : les électrons de conduction sont totalement déconnectés de leur noyau atomique et sont libres de se déplacer dans le réseau cristallin constitué par les cations métalliques. 183

3 Représentation schématique du modèle de Lorentz-Drude. 186

4 Comparaison entre la fonction diélectrique de l'or calculée avec les modèles de Drude, Lorentz-Drude, et Brendel-Bormann d'une part, et des données expérimentales d'autre part. (a) opposé de la partie réelle. (b) Partie imaginaire. Les lignes pointillées verticales représentent la plage spectrale utilisée par les bancs de SPR décrits dans cette thèse. 191

5 Principe de la création de régions d'intérêt pour deux images. 195

6 Algorithme de recalage spatial. 196

Liste des tableaux

1 Paramètres des matériaux utilisés dans les simulations de SPR. 20

2 Longueurs caractéristiques de pénétration et de propagation des plasmons de surface à 670 nm pour un milieu ambiant d'air ($n_d = 1$) ou d'eau ($n_d \approx 1,331$). Les grandeurs sont prises pour une diminution de $1/e$ du champ électrique. 22

3 Sensibilité et résolution angulaire théoriques pour un diélectrique à 1,33 RIU 27

4 Sensibilité et résolution spectrale théoriques pour un diélectrique à 1,33 RIU 29

5 Paramètres de calcul ajustés pour l'or et le chrome. 53

6 Indices de réfraction de l'ADN en monocouche. 59

7 Sensibilité maximale en réflectivité du système de P-SPRI pour deux épaisseurs d'ADN. 62

8 Caractéristiques techniques de la caméra CCD Pixelfly QE (données constructeur). 68

9 Rapport signal à bruit et bruit par pixel du système de P-SPRI. 78

10 Sensibilité maximale et seuil de détection en réflectivité anisotrope du système de P-SPRI. 78

11 Caractéristiques du banc de P-SPRI. 82

12 Variation de réflectivité maximale induite par le dépôt de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) sur une couche d'or structurée (de pas Λ, $f = 50\%$) d'épaisseur $d = 50$ nm . Le milieu ambiant est l'eau ($n_a = 1,330$). Les valeurs sont données pour un substrat de BK7. 139

13 Variation de réflectivité maximale par unité de surface induite par le dépôt de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) sur une couche d'or structurée (pas Λ et $f = 50\%$) de $d = 50$ nm d'épaisseur. Le milieu ambiant est l'eau ($n_a = 1,330$). Les valeurs sont données pour un substrat de BK7. La surface de référence est un carré de 2µm de côté. 139

14 Paramètres initiaux utilisés pour le calcul de l'épaisseur des couches de métal déposées et caractérisées par SPR monocapteur angulaire à 632,8 nm. 146

15 Epaisseurs, mesurées par SPR, et résistivité de couches minces d'or pour différents paramètres de dépôt et combinaisons de métaux Ti/Au et Cr/Au. Les épaisseurs dont la valeur est indéterminée (–) n'ont pas pû être mesurée par SPR (plasmon trop loin du modèle, pas de convergence). Les résisitivités dont la valeur est indéterminée (–) n'ont pû être calculées, car l'épaisseur n'est pas déterminée. L'échantillon n° 4 est un dépôt par évaporation de référence (*Schott*). 151
16 Résistivité / carré d'une lame d'or de référence Schott SF10. La valeur donnée correspond à la moyenne de trois mesures. celle-ci s'effectue au centre (C), dans le coin nord-ouest (NO), nord-est (NE), sud-ouest (SO) et sud-est (SE) de la lame. 152

1 Indices de réfraction de l'or mesurés expérimentalement par M. Ordal *et al.* et E. Palik *et al.*. Données tabulées à partir de la page web *http ://www.luxpop.com/*, entre 0,5 eV et 5 eV 180

2 Paramètres du modèle de Drude pour une sélection de métaux 185
3 Paramètres du modèle de Lorentz-Drude pour une sélection de métaux . . 187
4 Paramètres du modèle de Brendel-Bormann pour une sélection de métaux. 189

Introduction générale

La **biophotonique** est une discipline scientifique relativement nouvelle, se situant à l'interface entre l'optique–photonique, la chimie, les sciences de la vie et la médecine. Elle propose tout simplement de révolutionner notre approche au vivant, au diagnostic et au soin en utilisant les instruments issus de la photonique. Ainsi, la biophotonique a permis de grandes avancées dans le domaine du diagnostic génétique et de la protéomique en laboratoire, avec l'avènement des biopuces à fluorescence par exemple. La mise au point de nouvelles techniques de microscopie a aidé les chercheurs à mieux comprendre les mécanismes de la cellule. Le suivi des processus cellulaires, extrêmement complexes, a été facilité grâce à l'invention des quantum dots et des techniques d'immobilisation et de détection en surface. Parallèlement, un champ totalement nouveau de la médecine, que l'on pourrait nommer « médecine personnalisée » a vu le jour, dont deux exemples sont les méthodes de criblage haut- débit en génétique et protéomique et les progrès enregistrés dans le domaine des nanoparticules et leur utilisation comme vecteurs de thérapies.

La biophotonique a été définie de manière consensuelle dans le « livre blanc » de la biophotonique réalisé en 2003 par *Optics Valley* et la *Genopole* d'Evry [7] :

> « *La biophotonique est l'application de l'optique-photonique dans le domaine spectral allant des micro-ondes à l'ultraviolet, voire aux rayons X, pour l'analyse ou la modification d'objets biologiques par nature complexes.* »

Cette définition est très large, et recouvre un domaine pluridisciplinaire nécessitant l'intervention de physiciens, de chimistes, de biologistes et de médecins. Cette pluridisciplinarité est la pièce centrale de la problématique de la biophotonique, et le développement d'outils et de concepts nouveaux passe par la mise en adéquation des besoins et des attentes des médecins et des biologistes avec les solutions apportées par les physiciens et les chimistes.

C'est également l'aspect pluridisciplinaire de la biophotonique qui a freiné son développement et sa visibilité aux yeux du grand public, en Europe notamment. La nécessité de faire cohabiter dans un même lieu les spécialistes de différents domaines fait qu'il n'existe que très peu de centres spécialisés en biophotonique en Europe, et le paysage est de fait très segmenté. Des initiatives nationales ou européennes récentes, comme le réseau d'excellence financé par la commission européenne *Photonics4Life* [8], tentent désormais de « combler le fossé » existant entre la recherche en biophotonique et son application plus large, en matière de santé par exemple.

Le domaine des biocapteurs représente bien l'aspect fortement pluridisciplinaire de la biophotonique. Ce sont des systèmes permettant au sein d'un seul appareil de mesure, de convertir un phénomène biologique en un signal électrique. Le signal biologique est capturé grâce à un récepteur biochimique immobilisé sur une surface fonctionnalisée, dont la nature est dépendante du phénomène à observer. Par exemple, il peut s'agir d'enzymes,

d'antigènes, de protéines, de fragments d'ADN etc. L'association de l'**analyte** au récepteur est transformée en signal électrique par le biais d'un mécanisme de transduction, comme les méthodes électrochimiques [9], ampérométriques [10], piézoélectriques (microbalances à quartz [11]), ou optiques. Seuls les systèmes à transduction optique entrent dans le cadre d'étude de la biophotonique. Plus précisément, notre travail portera sur les systèmes à résonance de plasmon de surface, qui permettent une transduction directe, c'est à dire sans utiliser de marqueur – fluorescent ou autre.

Les biocapteurs à résonance de plasmon de surface (**SPR** pour surface plasmon resonance) se sont fortement développés ces dix dernières années, et deux branches principales de capteurs, basées sur leurs applications, peuvent être délimitées [12]. Les biocapteurs à SPR « de terrain » sont spécifiques à une application donnée et facilement transportable, comme par exemple les biocapteurs à fibre optique [13, 14]. En revanche, les biocapteurs à SPR « de laboratoire » sont plus encombrants, mais aussi plus versatiles. On parle alors généralement plus volontiers de systèmes de biopuces ou lecteurs de biopuces, où le système représente à la fois la surface sensible fonctionnalisée chimiquement et le système de transduction. Le terme « biopuce » indique également qu'il s'agit de systèmes multiplexés, c'est à dire capables de donner une information sur un ensemble d'interactions biochimiques en parallèle.

Un des aspects les plus intéressant des biopuces à SPR est leur caractère multidimensionnel [15]. Il est par exemple possible de suivre la dynamique d'interaction de plusieurs dizaines de protéines différentes en parallèle (imagerie), et de caractériser les propriétés spectrales de certains composés absorbant immobilisés en surface [16]. Il est également possible, au prix d'un balayage angulaire et spectral différentiel de la biopuce, de remonter à une information concernant la conformation moyenne des biomolécules immobilisées [17]. Néanmoins, l'information sur l'orientation des biomolécules est statique, et il n'est pas possible de suivre en temps-réel un changement de conformation des biomolécules.

Ajouter une nouvelle dimension aux systèmes de biopuces à imagerie par résonance de plasmon de surface, en y adjoignant la mesure dynamique de l'anisotropie résultante de l'orientation moyenne des édifices biomoléculaires à observer est l'objectif principal de notre travail, et sera l'objet principal du présent manuscrit.

La biopuce peut-être rendue anisotrope de plusieurs façons différentes. Il est possible de disposer des biomolécules anisotropes uniformément sur la surface, et d'observer l'alignement préférentiel moyen, ou paramètre d'ordre de celles-ci. Il est également possible de structurer la couche de biomolécules déposées de manière anisotrope. Une troisième solution consiste à structurer la puce elle-même de manière à alterner des bandes « ac-

tives »et des bandes « passives »chimiquement ou physiquement parlant, de manière à donner une réponse anisotrope au capteur. De plus, l'alternance de bandes actives et passives à des échelles nanométriques devrait contribuer à créer une exhaltation locale du champs évanescent.

Le second objectif de notre travail est d'étudier les possibilités en termes de structuration chimique et physique de la biopuce à des échelles micrométriques et nanométriques, et d'observer le comportement des plasmons de surface dans ce type de puces à haut facteur de forme.

Le présent manuscrit est articulé autour de quatre chapitres.

Le premier chapitre consiste en un état de l'art des techniques de biopuces à transduction optique centré sur deux principales techniques utilisées à l'heure actuelle : la fluorescence, et la résonance de plasmon de surface. Une partie du chapitre est consacrée aux techniques de mesure de l'anisotropie de systèmes biologiques.

Le second chapitre présente le développement numérique et expérimental d'un système de biopuces, basé sur l'imagerie par résonance de plasmon de surface, possédant les caractéristiques requises pour mesurer l'anisotropie d'un système biologique de manière dynamique. Les performances et la stabilité d'un tel système sont détaillées.

Le troisième chapitre quand à lui concerne les applications de l'utilisation d'un tel système. La méthodologie de mesure est tout d'abord illustrée. La première application concerne la détection de l'orientation de biomolécules dans un flux de liquide. Une seconde application s'intéressera à la mesure de l'anisotropie induite par un champ électrique dans une monocouche d'alkanethiols. Enfin, nous observerons l'effet d'un champ magnétique externe sur l'orientation de filaments de billes magnétiques microniques greffées sur la surface de la biopuce.

Le quatrième et dernier chapitre s'intéresse à la structuration des substrats. Après avoir modélisé une biopuce structurée dans son épaisseur, nous aborderons la problématique du dépôt de métal sur la surface de verre, afin de réaliser des échantillons possédant des structures microniques aussi bien que nanométriques. Ces structures seront caractérisées par imagerie à résonance de plasmon de surface multispectrale afin d'observer le comportement de propagation anisotrope des plasmons de surface.

Finalement, nous dresserons un bilan des points importants de ce travail, tout en proposant des perspectives d'amélioration futures.

1

État de l'art

Sommaire

Introduction **6**
1.1 Biopuces à ADN par fluorescence **8**
1.2 Les biopuces à résonance de plasmon de surface **11**
1.2.1 Historique des biocapteurs à SPR 11
1.2.2 Principe de base 13
1.2.3 Relations de dispersion et couplage 15
1.2.3.1 Couplage par réseau 16
1.2.3.2 Couplage par prisme 18
1.2.4 Choix du métal 18
1.2.5 Grandeurs caractéristiques des plasmons de surface 21
1.2.6 Aspects multimodaux 23
1.2.6.1 Balayage angulaire 24
1.2.6.2 Balayage spectral 27
1.2.6.3 Nappes spectro-angulaires 30
1.2.6.4 Suivi dynamique d'interactions 32
1.2.7 Imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) 33
1.3 Techniques de mesure de l'anisotropie de systèmes biologiques **35**
1.3.1 L'anisotropie optique 35
1.3.2 Mesures ellipsométriques 36
1.3.3 Microscopie en lumière polarisée 38
1.3.4 Mesure de l'anisotropie de fluorescence 40
Conclusion **42**

Introduction

L'analyse des interactions entre molécules d'origine biologique, tel l'**ADN** ou les protéines est depuis de nombreuses années un des champs de recherche les plus importants en biologie moléculaire. L'arrivée des biopuces a permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes à l'origine des mutations génétiques et des répercussions qu'elles ont sur le fonctionnement des protéines.

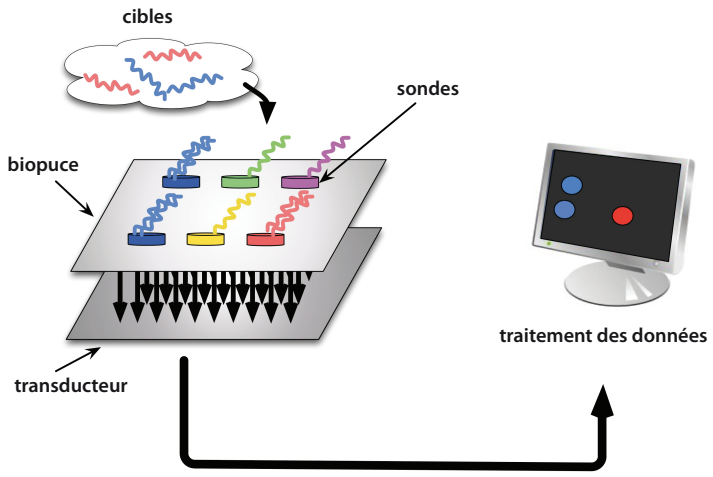


FIGURE 1 – Illustration du principe de fonctionnement d'une biopuce. Les sondes sont immobilisées sur la surface de la biopuce par le biais d'une chimie de surface spécialisée. Les cibles circulantes entrent en contact avec les sondes et le transducteur transforme le signal chimique en signal informatique.

Le terme biopuce désigne une surface de verre ou de métal sur laquelle sont fixées des molécules biologiques arrangées sous la forme d'une grille bidimensionnelle de plots. La biopuce est alors placée en contact avec une solution contenant les molécules à analyser (les **cibles**). Les molécules fixées sur la puce (les **sondes**) vont entrer en interaction plus ou moins fortement avec les molécules cibles présentes dans le milieu à analyser. Après rinçage, seuls les duplexes sonde - cible fortement accrochées entre eux vont rester sur la surface de la puce. La sélectivité de l'accrochage permet de discriminer les duplexes sonde - cible ayant une forte affinité entre-elles de ceux ayant une plus faible affinité. De cette façon et du fait de l'arrangement bidimensionnel de plots des sondes, nous pouvons observer l'affinité des cibles avec un ensemble de sondes différentes en parallèle. Ainsi, il est possible de tester chaque cible pour un ensemble de sondes différent, et remonter par

exemple à la cartographie du niveau d'expression d'un gène ou d'un ensemble de gènes ou au diagnostic d'un ensemble de mutations génétiques chez des patients.

La lecture des informations contenues sur la biopuce passe par la mise en place d'un système de transduction entre le signal chimique d'interaction et les données informatiques générées (voir figure 1).

Il existe plusieurs mécanismes de transduction différents pour convertir le signal chimique généré par la biopuce. Dans ce chapitre, nous allons passer en revue deux principaux types de mécanismes de transduction optique : la fluorescence et la résonance de plasmon de surface. Pour les biopuces à fluorescence, la lecture du niveau de fluorescence des marqueurs fixés sur l'ADN permet de déterminer la concentration de marqueurs par plot de sonde, et donc remonter au niveau d'expression d'un ensemble de gènes par exemple. Pour les biopuces à résonance de plasmon de surface, la variation de l'indice de réfraction ou l'absorption de biomolécules sur la surface de la puce entraine une variation de la réflectivité. Il s'agit donc d'une technique ne nécessitant pas l'usage de marqueurs.

La première partie de ce chapitre se veut une introduction générale aux deux types de biopuces présentées ici, avec un accent mis sur les biopuces à résonance de plasmon de surface, qui sont l'axe principal de notre travail. Le point de vue adopté ici est principalement celui du biophotonicien, et les notions développées ici ne feront que peu appel à des concepts de biologie moléculaire, et les applications biologiques ne seront que peu abordées ici.

Dans la section 1.1, nous verrons le fonctionnement d'une biopuce à fluorescence dans son application la plus répandue, à savoir la mesure du niveau d'expression de gènes. Nous étudierons les avantages de tels systèmes, en termes de de densité d'information et de débit notamment. Dans la section 1.2, nous verrons en détail le fonctionnement des biopuces à résonance de plasmon de surface, leurs grandeurs caractéristiques, leurs avantages et leurs limitations. Puis nous étudierons les aspects multimodaux inhérents à de tels systèmes, et les applications typiques des biopuces à SPR, notamment en termes d'imagerie dynamique multidimensionnelle.

Le but de notre travail étant d'étendre les systèmes de biopuces à résonance de plasmon de surface pour rendre possible la détection de l'anisotropie de matériaux biologiques, la seconde partie de ce chapitre est donc naturellement consacrée à l'étude des systèmes capables de mesurer l'anisotropie optique de matériaux.

La section 1.3 est consacrée tout d'abord à la définition de l'anisotropie optique, puis nous passerons en revue trois systèmes expérimentaux : deux sont purement dédiés à la caractérisation d'échantillons (l'ellipsométrie et la microscopie à polarisation), et le troisième présente une démarche similaire à celle entreprise dans notre travail, à savoir

étendre la mesure de fluorescence pour récolter une information sur l'anisotropie d'un échantillon.

1.1 Biopuces à ADN par fluorescence

Les micro-arrays [18], ou puces à ADN, font partie des biopuces les plus connues et les plus utilisées. Elles permettent d'analyser l'expression de milliers de gènes simultanément et à très haut débit. Ce type de système est utilisé pour le diagnostic génétique ou l'analyse du transcriptome.

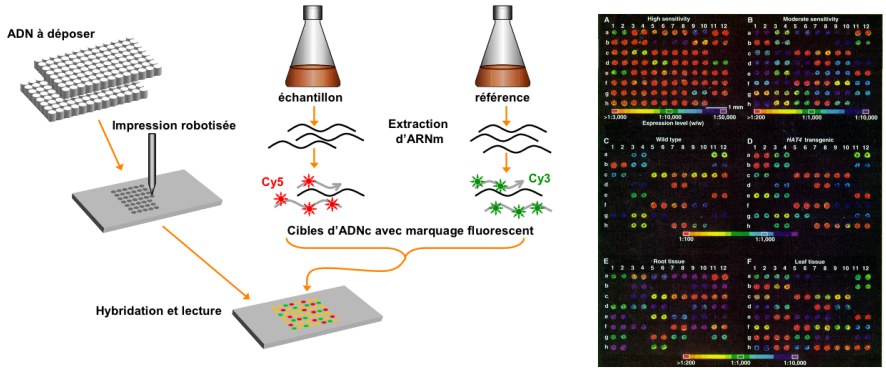
Le principe de fonctionnement des puces à ADN est relativement simple. Il est basé sur les mécanismes de transcriptase inverse des ARN (souvent appelé Reverse-Transcriptase ou **RT** en anglais). Une cellule vivante contient en permanence un ensemble de molécules d'ARN de différents types, dont les ARN messagers (**ARNm**). Ces ARNm sont le produit de la transcription dans le noyau de fragments d'ADN présents dans les gènes. Après maturation (permettant d'éliminer les introns par épissage), les ARNm « matures » migrent dans le cytoplasme où il sont traduits par les ribosomes, et donnent des protéines. L'idée est donc d'extraire les ARNm des cellules à étudier, puis d'effectuer une transcription inverse (RT), grâce à une enzyme spécialisée, en même temps qu'une amplification par réaction en chaîne de polymérase (Polymerase chain reaction, ou **PCR**). La méthode de transcription-amplification est donc nommée RT-PCR. Le produit final contient donc des fragments d'ADN complémentaires (nommés **ADNc**) au fragment de gène exprimé. La quantité de ADNc présente est donc directement proportionnelle à la quantité d'ARNm transcrite, et il devient donc possible de remonter au niveau d'expression des gènes de la cellule.

Néanmoins, les ADNc ne nous renseignent pas par eux mêmes sur le niveau d'activité d'un gène ou d'un ensemble de gènes en particulier. Pour cela, il est nécessaire de marquer les fragments d'intérêt et de les « retenir » afin d'effectuer un tri par rapport aux multiples fragments existants. L'aspect novateur des puces à ADN consiste donc en la méthode de caractérisation de ces niveaux d'expression. Les ADNc obtenus (les molécules cibles) vont être marqués avec un fluorophore, par exemple **Cy3** pour le contrôle et **Cy5** pour l'échantillon à analyser, puis mélangés ensemble en quantités égales. La solution sera ensuite mise en contact avec une puce à ADN.

Sur la puce sont déposés un ensemble de zones d'interaction, constituées de fragments d'ADN codants pour diverses protéines d'intérêt par exemple. Ces fragments d'ADN sondes sont disposés sur une lamelle de verre fonctionnalisée chimiquement. C'est l'interaction sonde-cible qui va permettre de cartographier le niveau d'expression d'un gène ou

d'une protéine. En effet, les ADNc obtenus vont parfaitement s'hybrider avec le fragment de gène déposé, alors qu'ils vont moins fortement s'hybrider aux autres fragments sondes. Après rinçage, seuls les brins parfaitement complémentaires resteront sur la surface de la puce.

Il est enfin possible de « lire » la puce en utilisant 2 lasers et un capteur CCD : un laser émettant dans le vert (à 540 nm) qui relèvera le niveau de fluorescence des ADNc contrôle, et un laser émettant dans le rouge (à 650nm) qui relèvera le niveau de fluorescence des ADNc de l'échantillon. En utilisant des algorithmes de recalage d'images, il est possible de superposer les 2 images, et ainsi obtenir une image à 2 couleurs, contenant des informations sur le niveau d'expression relatif du contrôle et de l'échantillon.



(a) (b)

FIGURE 2 – (a) Illustration du principe de fonctionnement d'une biopuce à ADN. L'ARNm est extrait du milieu cellulaire à analyser puis marqué par fluorescence avant d'être déposé sur la biopuce précédemment fonctionnalisée par les sondes (illustration de W. Lin [1]). (b) Image du niveau d'expression de 45 gènes d'une plante : l'*arabidopsis* (première publication de l'analyse d'un génome complet en 1995 [2])

Les systèmes de puces à ADN par fluorescence ont connus un développement très important depuis les premières membranes nylon héritées du Southern blot [19] dans les années 80 [20]. Tout d'abord, les membranes souples ont été délaissées pour des plaques de verre, permettant l'observation de la fluorescence à travers la puce. L'augmentation de la densité de zones d'interaction par unité de surface induit par le passage à un support solide a permis de passer de quelques dizaines de spots par cm^2 dans les années 1980, à plusieurs centaines de milliers de spots par cm^2 grâce à la synthèse *in-situ* de sondes [21, 22] (*Affymetrix* [23]), ou l'impression à jet d'encre [24] (*Agilent* [25] par exemple). Cette augmentation de densité s'accompagne inévitablement d'un accroissement exponentiel du volume de données à traiter et stocker. L'analyse d'un tel volume de données a donné lieu

à la mise au point de nouveaux algorithmes [26] et à l'utilisation de techniques issues de la bioinformatique [27].

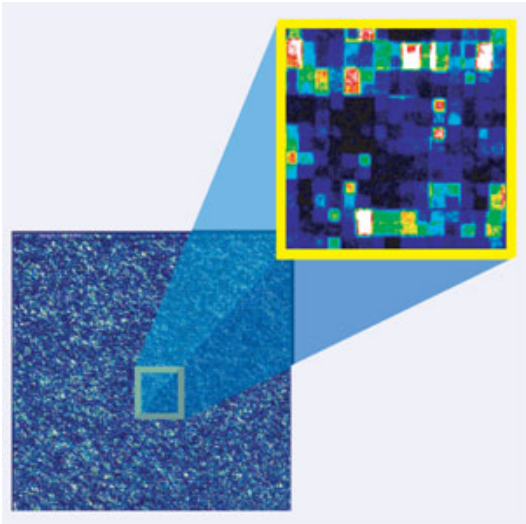


FIGURE 3 – Une des biopuces les plus récentes : *Genechip* de Affymetrix. Les zones d'interaction ont une surface de 20x20µm, soit plus de 250000 zones/cm^2 [3]. Les sondes sont directement synthétisées *in-situ*

Un des principaux freins à l'essor des méthodes basées sur les biopuces à ADN par fluorescence est son coût. Le coût de fabrication de la puce elle-même (environ 200€ pour pour l'achat d'une puce *Affymetrix* couvrant le génome humain), qui peut être utilisée pour mesurer les niveaux d'expression de plusieurs échantillons en parallèle, n'est pas le problème principal. Le coût de marquage est sans doute le plus important (de l'ordre de 200€), suivi du coût d'hybridation et de traitement des données (environ 150€) [28, 29]. De ce fait, il existe une forte réticence à systématiser l'utilisation de biopuces à fluorescence dans les hôpitaux, et celles-ci restent bien souvent cantonnées aux applications en recherche.

Bien que certains systèmes soient capables de travailler en temps-réel [30] (celui de *Genewave* [31] par exemple), la lecture des biopuces à fluorescence est dans la majorité des cas limitée par l'aspect statique de la mesure en *point-final*. En effet, il est nécessaire de faire interagir les molécules, puis de rincer la puce pour éliminer l'excès de cibles, avant de pouvoir la lire.

1.2 Les biopuces à résonance de plasmon de surface

Dans certains cas, il est important de pouvoir obtenir des informations sur l'interaction biologique au fur et à mesure qu'elle se produit, tout en étant capable de détecter des interactions ayant une faible affinité, comme par exemple les polymorphismes de nucléotide unique [32] (**SNP** pour Single Nucleotide Polymorphism) dans le cas d'interactions ADN : ADN. L'aspect temps-réel permet par exemple d'extraire les cinétiques d'interaction et par là les constantes d'affinité des molécules entre-elles (« force » de liaison entre deux molécules). C'est là qu'entrent en jeu les systèmes basés sur la résonance de plasmon de surface. En effet, ces systèmes de biopuces sont capables de détecter de manière dynamique les interactions prenant place à la surface de la puce. De plus, contrairement aux méthodes basées sur la fluorescence, ces systèmes fonctionnent sans marqueur. En simplifiant, on peut qualifier les systèmes à résonance de plasmon de surface de balances optiques : l'intensité du signal transduit dépend directement de la masse de matériau déposé en surface, à indice de réfraction constant (lorsque cet indice de réfraction présente un contraste d'indice avec le milieu ambiant). Ce sont également d'excellents systèmes de détection de l'indice de réfraction, car là encore l'intensité du signal transduit dépend directement de l'indice du réfraction du matériau déposé, à épaisseur constante. L'épaisseur et l'indice de réfraction étant deux grandeurs couplées dans un systèmes à résonance de plasmon de surface, nous verrons que ces systèmes fournissent des grandeurs relatives : une variation de l'indice de réfraction Δn associé à une variation de l'épaisseur Δe.

1.2.1 Historique des biocapteurs à SPR

En 1902, Wood observe de brusques changements d'intensité dans certaines parties du spectre d'une source de lumière de profil continu, réfléchi par un réseau métallique [33], se sont les fameuses « anomalies de Wood ». Un aspect frappant des expériences de Wood, est que ces changements ne se produisent que lorsque la lumière possède une polarisation transverse magnétique (**TM** ou polarisation p, c'est à dire que le champ électrique oscille dans le plan de la figure 5 du paragraphe 1.2.2). C'est plus tard, en 1941, que Fano [34] apporte un fondement théorique à ces expériences, en démontrant que les anomalies sont dues à des ondes quasi–stationnaires « roulant » le long du métal. En 1958, R. Ferrell [35] décrit théoriquement le phénomène de couplage entre une onde électromagnétique et les modes de surface entre un métal et un diélectrique. Ce n'est qu'en 1968 que A. Otto [36] propose une démonstration expérimentale du phénomène basé sur la réflexion totale atténuée (**ATR** ou Attenuated Total Reflection). Il utilise un prisme de diélectrique de haut indice pour augmenter le momentum de l'onde incidente, la réflexion ATR sur la base du

prisme crée alors une onde évanescente, qui excite à son tour la surface de métal, placée à une faible distance de la base du prisme. La même année, Kretschmann et Raether [37] proposent une configuration similaire, mais où le métal est directement déposé sur la base du prisme. C'est cette configuration qui sera et reste la plus utilisée dans toutes les applications de la résonance de plasmon de surface de part sa simplicité de mise en place notamment. Pendant une vingtaine d'années, la résonance de plasmon de surface restera une « curiosité » physique intéressante sur le plan théorique, mais peu utilisée dans la pratique.

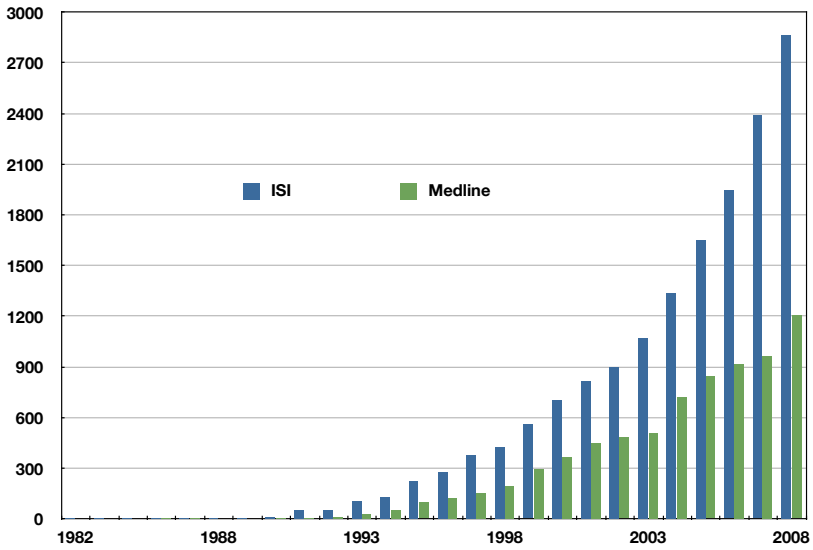


FIGURE 4 – Nombre de publications par année (entre 1982 et 2008) dont les mots clés contiennent « surface plasmon resonance » ou « plasmonic(s) ». (Bleu) Résultats pour l'interrogation de la base ISI Web of Knowledge (incluant les proceedings de conférences). (Vert) Résultats pour la base Medline, plus orientée biomédical et donc plus en aval dans les applications.

L'idée d'utiliser la résonance de plasmon de surface en tant que biocapteur ne sera développée qu'à partir de 1983, quand B. Liedberg, C. Nylander et I. Lundstrom [38] développent un système basé sur la configuration de Kretschmann pour détecter de faibles concentrations (quelques ppm) de gaz anesthésique. Ils réalisent également une expérience où des γ-globulines adsorbées sur la surface de métal par le biais d'une chimie de surface spécialisée sont mises en présence avec des anticorps anti γ-globulines. L'augmentation

d'épaisseur et le changement d'indice de réfraction à la surface résultant de la liaison antigène-anticorps donne lieu à un décalage de la courbe angulaire de résonance. Cet article donne le coup d'envoi de l'utilisation du phénomène de SPR pour le développement de biocapteurs [39].

A partir du début des années 1990, où les premiers systèmes commerciaux sont fabriqués (premier système Biacore en 1990 par exemple), le nombre de publications du domaine explose. La figure 4 illustre ce phénomène : d'une cinquantaine en 1990, à plus de 2800 publications en 2008 ! Toutes les recherches ne sont néanmoins pas orientées vers le développement de biocapteurs, et les applications de la résonance de plasmon de surface sont nombreuses : l'imagerie en dessous de la limite de diffraction [40], le développement de cristaux plasmoniques [41] pour le guidage adiabatique des ondes de surface, le développement de nouvelles techniques de lithographie optique [42], la fabrication de « nano-circuits » [43] intégrés, basés non pas sur l'électronique, mais sur la plasmonique, permettant à terme de réduire de plus d'un ordre de grandeur les tailles des circuits intégrés actuels, etc. Dans le reste du chapitre, nous nous concentrerons sur les aspects orientés « biopuces » de la résonance de plasmon de surface, et nous délaisserons toutes les autres applications précédemment citées.

1.2.2 Principe de base

Le phénomène de résonance de plasmon de surface apparaît lorsque une onde électromagnétique incidente à un métal fait entrer en oscillation collective (résonance) le plasma d'électrons libres du métal. Cette oscillation, appelée **plasmon**, est quantifiée par sa pulsation plasmon (ω_p), propre au métal. Un plasmon de surface quand à lui est crée lorsque l'oscillation des électrons se produit à l'interface entre une couche de métal ayant une constante diélectrique négative ($\varepsilon_m < 0$), et un diélectrique de constante diélectrique positive ($\varepsilon_d > 0$). Le phénomène de résonance de plasmon de surface consiste donc en une onde électromagnétique à décroissance exponentielle (evanescente) se propageant le long d'une interface métal-diélectrique. L'existence d'une telle onde est conditionnée par la continuité des équations de Maxwell à l'interface métal/diélectrique, comme décrit dans l'équation (1). La résonance a lieu lorsque l' égalité est respectée.

$$\begin{cases} k_{photon} & = & \frac{2\pi}{\lambda_0}\sqrt{\varepsilon_i}\sin(\theta_i) \\ k_{ps} & = & \frac{2\pi}{\lambda_0}\,\mathrm{Re}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m\varepsilon_d}{\varepsilon_m+\varepsilon_d}}\right) \end{cases} \tag{1}$$

Cette résonance est dépendante de conditions particulières de couplage : une polarisa-

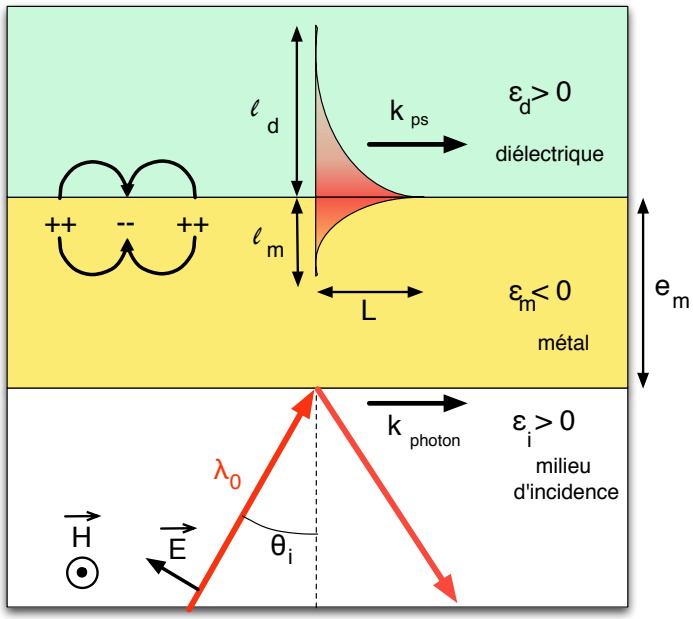


FIGURE 5 – Caractéristiques d'un plasmon de surface se propageant sur une distance L à l'interface entre un métal et un diélectrique. La pénétration du champ évanescent est l_d dans le diélectrique et l_m dans le métal. Le vecteur $\vec{E}$ représente la direction du champ électrique de l'onde incidente, le vecteur $\vec{H}$ la direction du champ magnétique. λ_0 est la longueur d'onde dans le vide de l'onde incidente et θ_i est l'angle d'incidence. Les matériaux ont pour constante diélectrique ε_i (milieu d'incidence), ε_m (métal) et ε_d (diélelectrique). La couche de métal a pour épaisseur e_m.

tion TM (transverse magnétique) de la lumière (voir annexe A) ainsi qu'un couple angle d'incidence (θ_i) et longueur d'onde (λ_0) particulier, comme illustré dans la figure 5.

La condition d'existence des plasmons de surface ($\varepsilon_m < 0$ et $\varepsilon_d > 0$) implique que le constante diélectrique du métal est complexe, c'est à dire que la couche de métal absorbe une partie de l'onde incidente. Ainsi, pour un système respectant l'égalité de l'équation (1), l'énergie incidente à la couche de métal sera partiellement transférée à la surface du métal sous forme de plasmon de surface, et la réflexion de l'onde sera atténuée. La résonance de plasmon de surface se manifeste donc par une diminution de la réflectivité de la couche de métal pour des angles d'incidence et des longueurs d'onde respectant l'équation de couplage (1). La propagation de l'onde évanescente, largement pénétrante dans le milieu diélectrique (comme nous le montrerons dans le paragraphe 1.2.5), est de fait très facilement perturbée par des variations de l'indice de réfraction du milieu ($n_d = \sqrt{\varepsilon_d}$). Ainsi, le dépôt d'une couche de matériau diélectrique sur la surface de métal entraine des modifications dans le couplage entre l'onde incidente et le plasmon de surface. Cette modification des conditions de couplage implique que la relation (1) n'est plus respectée.

Il y a donc un décalage de la longueur d'onde et / ou de l'angle de résonance pour lesquels la relation est vérifiée. La faible largeur de la résonance dans le domaine spectral ou angulaire par rapport à une réflexion total atténuée sur verre « classique » rend la résonance de plasmon de surface un outil idéal pour déterminer avec une très grande sensibilité de faibles variations d'indice de réfraction (de l'ordre 10^{-6} **RIU** pour Refractive Index Unit, ou unité d'indice de réfraction) et / ou de faibles variations d'épaisseur (inférieures à 1 nm) de la couche déposée.

Les biocapteurs à résonance de plasmon de surface permettent donc d'observer le dépôt de fines couches de matériau (par exemple de molécules d'intérêt biologique) sur la surface de métal. Ce dépôt peut correspondre à des mécanismes d'adsorption/désorption de molécules de manière aspécifique, mais peut également résulter de la liaison spécifique entre des molécules cibles circulantes et des molécules sondes fixées à la surface. Il est donc possible d'obtenir un système de biopuces ne nécessitant pas de marqueur, et pouvant fonctionner en temps réel.

1.2.3 Relations de dispersion et couplage

Afin de comprendre le mécanisme de couplage de l'onde incidente avec le mode de résonance de plasmon de surface, il est utile de tracer leur **relation de dispersion** (relation pulsation ω – vecteur d'onde k) respective. En utilisant la relation (1) et en posant $n_i = \sqrt{\varepsilon_i}$, ainsi que $2\pi/\lambda_0 = \omega/c$, il est possible d'écrire la relation de dispersion de l'onde incidente en $\omega = ck/(n_i \sin\theta_i)$. Cette relation est souvent nommée « ligne de lumière », car elle dénote la frontière entre les modes propagatifs et les modes où la propagation est impossible. On peut procéder de même pour la relation de dispersion du plasmon de surface $\omega = ck(\varepsilon_m\varepsilon_d/(\varepsilon_m + \varepsilon_d))^{-1/2}$.

Afin de mieux comprendre le comportement du métal, il est utile d'utiliser l'approximation des métaux parfaits (ou modèle de Drude, détaillé dans l'annexe C). Dans ce cas, la constante diélectrique du métal dans le visible est complexe ($\varepsilon_m = \varepsilon_m^{'} + i\varepsilon_m^{''}$), de partie réelle négative ($\varepsilon_m^{'} < 0$) et de partie imaginaire faible. Cette approximation implique donc pour la relation de dispersion des plasmons de surface que $\varepsilon_m^{'} < \varepsilon_d$.

De plus, le modèle de Drude définis la constante diélectrique comme une fonction de la pulsation : $\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega+i\omega_\tau)}$. Pour des valeurs de $k \longrightarrow \infty$, la courbe de dispersion des plasmons de surface tend donc vers une asymptote $\omega = \omega_p/\sqrt{\varepsilon_d + 1}$

Ainsi, une onde incidente dans l'air, de constante diélectrique $n_i = 1$, aura une ligne de lumière $\omega = ck/\sin\theta_i$, illustrée par une droite pointillée sur la figure 6. La courbe pleine, représentant la relation de dispersion du plasmon de surface, est toujours sous la

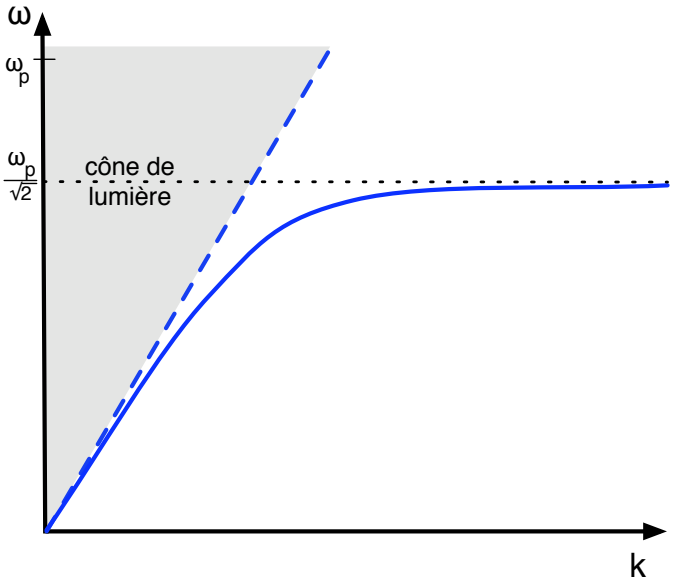


FIGURE 6 – Relations de dispersion : (plein) d'un plasmon de surface ; (pointillés) d'un onde plane se propageant dans l'air.

ligne de lumière, indiquant qu'aucun couplage n'est possible. En effet, dans l'air, $\varepsilon_d = 1$ et $\varepsilon_m < -1$ (dans le visible), ce qui implique que le vecteur d'onde du plasmon est toujours supérieur à la ligne de lumière : $k > \omega/c$.

Afin de pouvoir coupler l'onde incidente avec un mode de plasmon de surface, il devient nécessaire d'opter pour une stratégie visant à donner suffisamment de momentum aux photons incidents pour que la relation (1) soit vraie pour une gamme de longueur d'ondes d'intérêt. Deux principales méthodes sont utilisables : le couplage par réseau et le couplage par prisme,.

1.2.3.1 Couplage par réseau

Il est possible de coupler l'onde de plasmon de surface avec une onde incidente en utilisant un réseau de diffraction. L'onde incidente est alors diffractée par le réseau, qui formera autant de modes susceptibles d'exciter un plasmon de surface, comme illustré par la figure 7.

Les différents ordres de diffraction du réseau vont permettre à plusieurs vecteurs d'onde d'exister. Ils sont donnés par :

$$k_{photons} = \frac{\omega}{c} \sin \theta_i \pm n\Lambda, (n \text{ entier}) \tag{2}$$

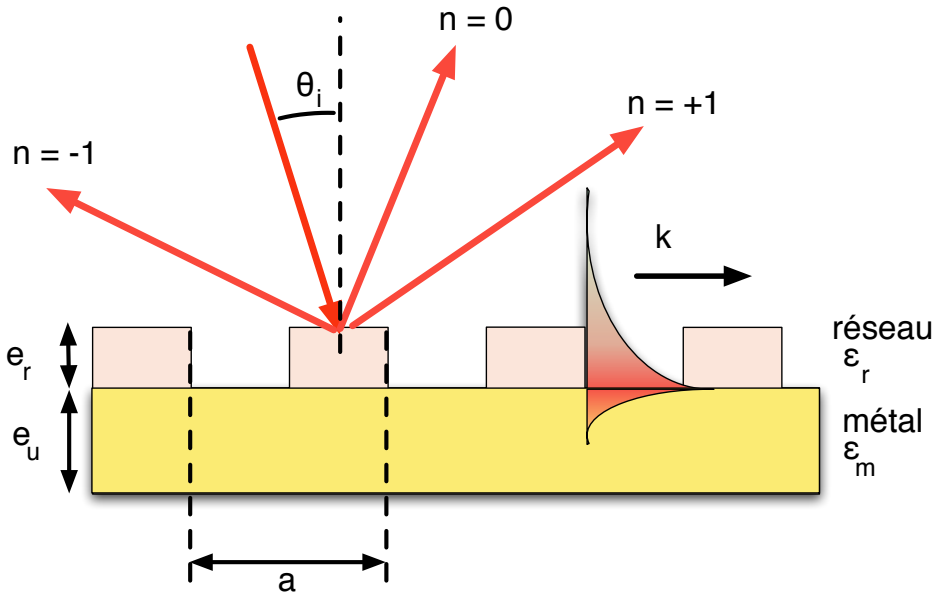


FIGURE 7 – Couplage par réseau d'un plasmon de surface de vecteur d'onde k avec une onde incidente dans le vide, formant un angle θ_i avec la normale à la couche de métal. La réseau présente une période a, une épaisseur e_r et une fonction diélectrique ε_r. La couche de métal possède une fonction diélectrique ε_m et une épaisseur e_u. Les ordres de diffractions -1, 0 et +1 sont représentés en rouge.

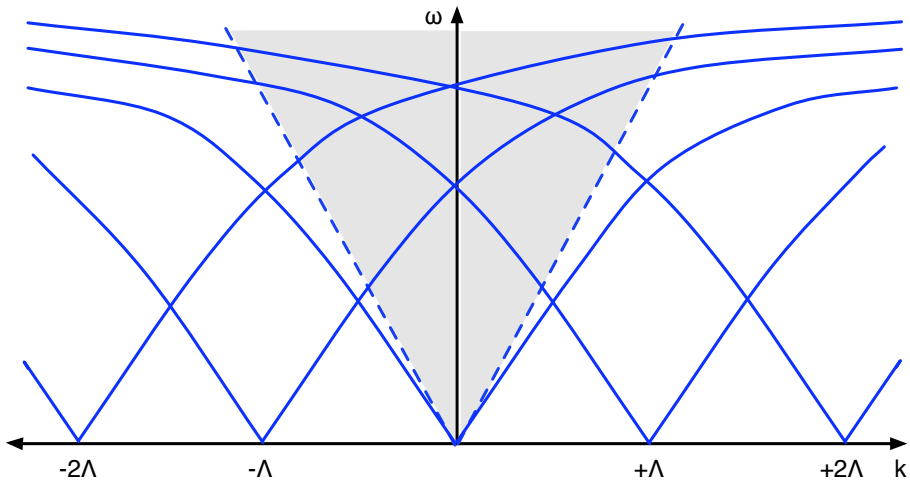


FIGURE 8 – Relations de dispersion de plasmons de surface générés par un couplage par réseau de période Λ.

Avec Λ le pas du réseau dans l'espace réciproque : $\Lambda = 2\pi/a$.

La relation de dispersion des photons incidents et des plasmons de surface est donc définie comme sur la figure 8. Il existe une symétrie autour de l'axe $k = 0$, et la courbe de dispersion des plasmons de surface subit une translation d'un vecteur $\pm n\Lambda$. Elle intercepte donc la ligne de lumière en en nombre de points discret, qui seront autant de résonances possibles pour le système.

1.2.3.2 Couplage par prisme

Afin d'augmenter le momentum des photons incident, il est également possible d'augmenter l'indice de réfraction du milieu d'incidence. La configuration de Kretschmann se base sur l'utilisation d'un prisme de verre de haut indice (généralement supérieur à 1.5) sur lequel est déposé la couche métallique (voir figure 9).

Le faisceau de lumière incidente subit une réflexion totale à la base du prisme, et c'est l'onde évanescente générée qui excite les électrons du métal. Le faisceau réfléchi sera atténué par l'absorption subie dans le métal (ATR).

Ainsi la pente de la ligne de lumière est multipliée par un facteur $1/n_i$, ce qui lui permet de venir intercepter la courbe de dispersion des plasmons, et un couplage devient possible. Nous nommerons k_{ps} le point d'intersection entre les deux courbes. Dans la figure 10, la ligne de lumière ainsi modifiée est indiquée en traits pointillés, et la courbe de dispersion des plasmons en traits pleins.

L'équation de couplage pour un système prisme-métal-diélectrique est donc donnée par l'équation suivante :

$$k_{photon} = k_{ps} \Leftrightarrow \frac{\omega}{c} n_i \sin\theta_i = \frac{\omega}{c} \operatorname{Re}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right) \tag{3}$$

Comme l'équation le montre bien, l'angle de résonance est sensible à l'indice de réfraction $n_d = \sqrt{\varepsilon_d}$ du milieu diélectrique situé l'autre côté de la couche de métal. Nous verrons dans le paragraphe 1.2.5 la profondeur de pénétration des ondes plasmon de surface générées ainsi.

1.2.4 Choix du métal

Il est utile à ce stade de comprendre l'intérêt du choix d'un métal pour satisfaire aux conditions de couplage. En effet, comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe 1.2.3, la fonction diélectrique d'un métal varie en fonction de la pulsation de l'onde incidente.

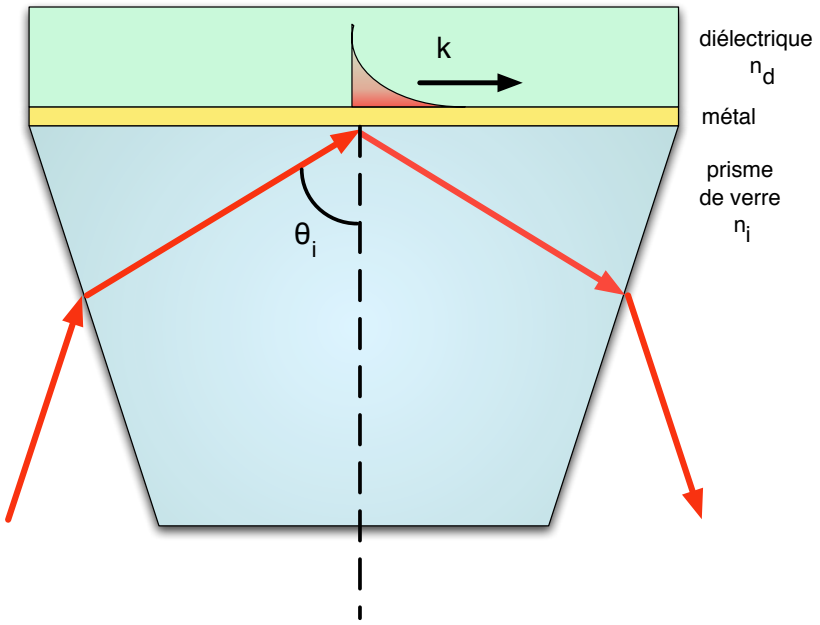


FIGURE 9 – Couplage d'une onde incidente d'angle θ_i avec la normale à la couche avec un plasmon de surface en utilisant la configuration de Kretschmann. Le milieu diélectrique à pour indice n_d et le verre possède un indice $n_i > n_d$.

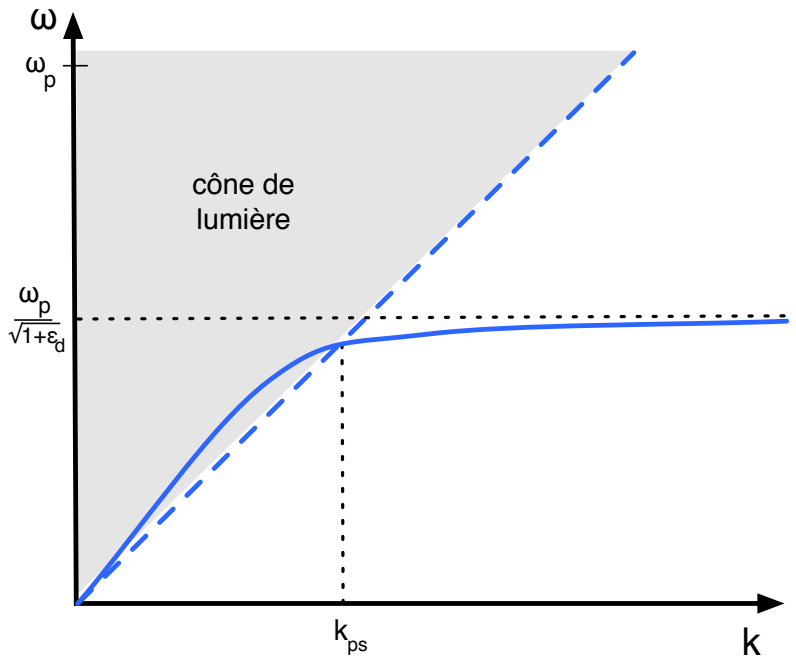


FIGURE 10 – Relations de dispersion : (plein) d'un plasmon de surface ; (pointillés) d'une onde plane se propageant dans un verre d'indice n_i.

De plus celle-ci est complexe : $\varepsilon_m(\omega) = \varepsilon_m^{'}(\omega) + i\varepsilon_m^{''}(\omega)$. Chaque métal aura donc une résonance plasmon spécifique à un couple longueur d'onde et angle d'incidence (λ, θ) particulier et des caractéristiques de dispersion propres qui vont influencer le couplage entre l'onde incidente et le plasmon de surface.

Notre travail consistant à la mise au point d'un système optique de SPR, nous ne pouvons utiliser que des métaux ayant des résonances plasmon dans le visible ou le proche infrarouge (entre 400 nm et 1200 nm environ). Cela laisse disponibles des métaux tels l'or, l'argent, le cuivre ou l'aluminium. De plus, le métal doit pouvoir rester stable durant des périodes prolongées, ce qui élimine d'emblée l'aluminium qui s'oxyde très rapidement à l'air libre en Al_2O_3. L'argent possède la résonance plasmon la plus étroite, et donc la meilleure sensibilité théorique [44], mais il subit le même type d'oxydation. Bien qu'il soit techniquement possible de réaliser des biopuces à bases de couches minces de ce métal en le protégeant immédiatement avec une couche de diélectrique [45], son utilisation reste complexe.

Parmi les métaux potentiels restant, notre choix se portera sur l'or. En effet, seul ce métal présente les caractéristiques de biocompatibilité et de stabilité inhérents à la mise au point d'une biopuce à SPR [46]. Afin d'assurer une liaison covalente entre le métal et le substrat de verre, nous devons également déposer une sous-couche « d'accroche » très fine de chrome (2 nm) ou de titane (5 nm).

Enfin, il est à noter que des systèmes hybrides, basés sur un multicouche chrome–argent–or permettent de bien meilleures performances en termes de sensibilité que des systèmes chrome–or [44, 47], néanmoins, ces multicouches sont plus complexes à réaliser. Une étude plus complète des caractéristiques de l'or est donnée dans l'annexe C.

Nous adopterons dans les simulations de ce chapitre et sauf indication contraire, les paramètres suivants pour une biopuce à résonance de plasmon de surface utilisant la configuration de Kretschmann et fonctionnant à 670 nm :

matériau	**indice**		**épaisseur (nm)**
	n	**k**	
SF11	1,775	0	∞
Cr	3,151	3,457	2
Au	0,174	3,603	48
eau	1,331	0	∞

Table 1 – Paramètres des matériaux utilisés dans les simulations de SPR.

Les indices des diélectriques sont calculés de la manière suivante : l'indice du verre est calculé à partir de l'équation de Sellmeier (voir [46], annexe 4) ; celui de l'eau est calculé à

20°C à partir du modèle de Schiebener *et al.* [48]. Les indices des métaux sont obtenus par interpolation à partir des données de la base SOPRA [49] pour le chrome ; et par calcul à partir du modèle théorique de Brendel-Bormann pour l'or (développé en annexe C).

1.2.5 Grandeurs caractéristiques des plasmons de surface

Comme nous l'avons vu précédemment, une onde de plasmon de surface générée à partir d'un couplage par prisme possède un vecteur d'onde parallèles à l'interface métal/diélectrique (k_{ps}). Comme $\varepsilon_m = \varepsilon_m^{'} + i\varepsilon_m^{''}$ est complexe, le vecteur d'onde est donc lui même complexe, et nous pouvons écrire :

$$k_{ps} = k_{ps}^{'} + ik_{ps}^{''} = \left[\frac{\omega}{c}\left(\frac{\varepsilon_m^{'}\varepsilon_d}{\varepsilon_m^{'} + \varepsilon_d}\right)^{1/2}\right] + i\left[\frac{\omega}{c}\left(\frac{\varepsilon_m^{'}\varepsilon_d}{\varepsilon_m^{'} + \varepsilon_d}\right)^{3/2}\frac{\varepsilon_m^{''}}{2(\varepsilon_m^{'})^2}\right] \tag{4}$$

L'onde est donc évanescente suivant z, et son extension spatiale peut être définie par son atténuation, à savoir la distance à laquelle l'intensité du champ diminue d'un facteur $1/e$. En suivant les notations de la figure 5, nous obtenons donc les longueurs de pénétration l_d dans le diélectrique et l_m dans le métal [46] :

$$l_d = \frac{\lambda_0}{2\pi}\sqrt{\frac{|\varepsilon_m^{'}| + \varepsilon_d}{\varepsilon_d^2}} \tag{5}$$

$$l_m = \frac{\lambda_0}{2\pi}\sqrt{\frac{|\varepsilon_m^{'}| + \varepsilon_d}{\varepsilon_m^2}} \tag{6}$$

Ces deux grandeurs sont tracées dans la figure 11-a et -b. Pour cet exemple nous avons choisi de tracer la profondeur de pénétration pour deux diélectriques différents : de l'eau à 20°C (courbe bleue), et de l'air (courbe rouge). Nous pouvons observer à partir de ces courbes que la profondeur de pénétration du plasmon de surface dans le diélectrique est de l'ordre de 300 nm (à $\lambda = 670$ nm), mais que cette pénétration est beaucoup plus faible dans le métal (de l'ordre de 30 nm). Le plasmon de surface reste donc très fortement confiné dans le diélectrique (environ 90%) où il sera sensible à toute perturbation se produisant dans les quelques dizaines de nanomètres au dessus de la surface .

La longueur de propagation latérale (suivant x) du plasmon de surface est, quand à

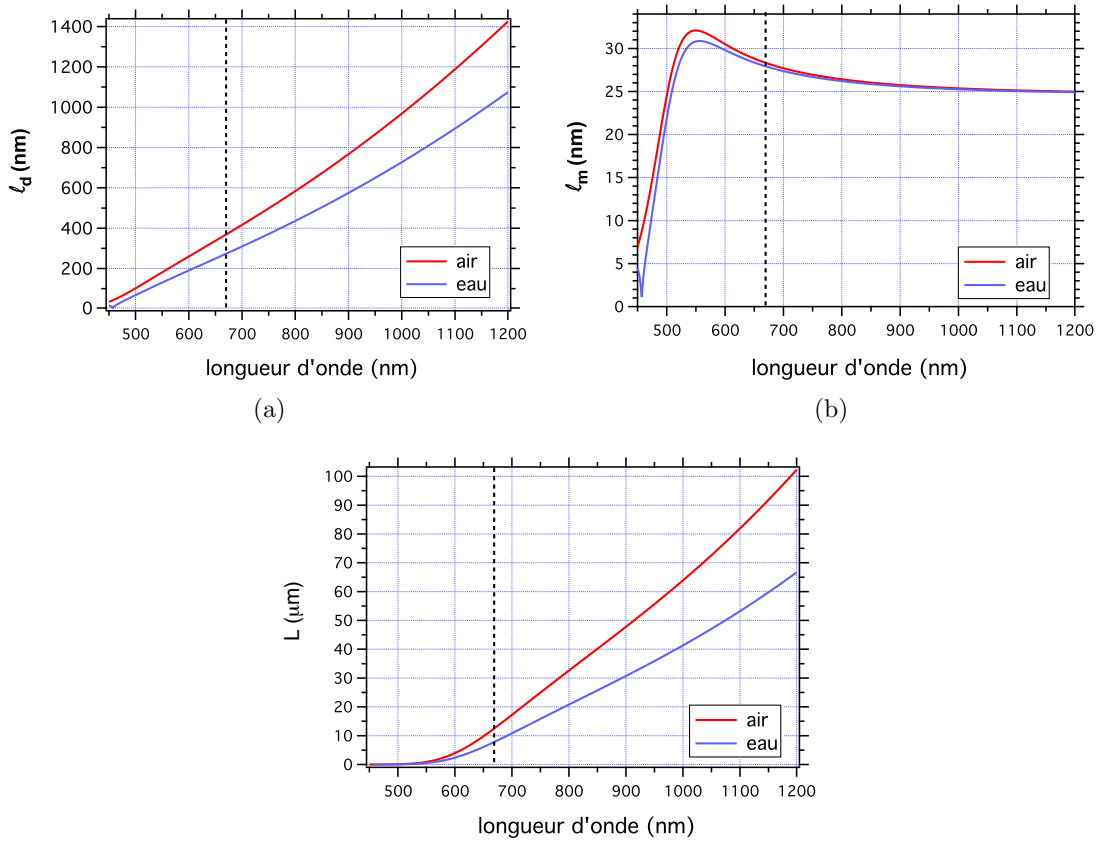


FIGURE 11 – Grandeurs caractéristiques d'un plasmon de surface. Profondeurs de pénétration : (a) dans le milieu diélectrique. (b) dans le métal. (c) Longueur de propagation latérale. (rouge) le milieu ambiant est de l'air ($n_d = 1$). (bleu) le milieu ambiant est de l'eau ($n_d \approx 1,331$ à $\lambda = 670$ nm). La ligne pointillée représente $\lambda = 670$ nm.Les grandeurs sont prises pour une diminution de $1/e$ du champ électrique.

diélectrique	**indice**	l_d **(nm)**	l_m **(nm)**	L **(nm)**
eau	1,331	273	28,4	7880
air	1,000	369	27,9	12630

TABLE 2 – Longueurs caractéristiques de pénétration et de propagation des plasmons de surface à 670 nm pour un milieu ambiant d'air ($n_d = 1$) ou d'eau ($n_d \approx 1,331$). Les grandeurs sont prises pour une diminution de $1/e$ du champ électrique.

elle, donnée par :

$$\mathrm{L} = \frac{1}{2k''_{ps}} = \left[\frac{\omega}{c}\left(\frac{\varepsilon'_m\varepsilon_d}{\varepsilon'_m+\varepsilon_d}\right)^{3/2}\frac{\varepsilon''_m}{2(\varepsilon'_m)^2}\right] \tag{7}$$

Similairement, nous pouvons tracer la longueur de propagation latérale du plasmon de surface en fonction de la longueur d'onde (voir figure 11 (c)). Pour résumer, la table 2 donne les valeurs des profondeurs de propagation, ainsi que la longueur de propagation latérale d'un plasmon de surface se propageant à l'interface d'une couche d'or et d'un diélectrique (air ou eau), pour la longueur d'onde de 670 nm.

1.2.6 Aspects multimodaux

En reprenant l'équation (1) donnée dans la section 1.2.2, et en supposant que ε_m et ε_d varient en fonction de la longueur d'onde du faisceau incident, on peut observer que l'équation de couplage est de fait non seulement sensible à des perturbations du milieu diélectrique ambiant près de la surface, mais également à l'angle d'incidence du faisceau (θ_i) et à sa longueur d'onde λ_0.

Au cours d'une expérience, ces perturbations peuvent provenir :

- d'une modification de l'épaisseur de matériau déposé Δe ;
- d'une modification de la concentration de produit X circulant dans le milieu ambiant Δ[X], créant un changement d'indice Δn_d ;
- le plus fréquemment, d'une combinaison des deux, à savoir de l'adsorption d'une épaisseur Δe supplémentaire de matériau présentant un contraste d'indice Δn avec le milieu ambiant.

Si nous fixons la longueur d'onde de travail λ_0, il est possible de balayer la biopuce à SPR angulairement et de mesurer la chute de réflectivité TM inhérente au couplage à cette longueur d'onde. De la même manière, il est possible de fixer l'angle d'incidence θ_i, et de balayer la biopuce en longueur d'onde pour observer une courbe similaire. Dans ce cas, la profondeur de pénétration du plasmon de surface sera également modifiée. En fixant la longueur d'onde d'incidence et l'angle d'incidence, il est possible de suivre temporellement les modifications du milieu diélectrique ambiant.

Un système de biocapteur à résonance de plasmon de surface à mono-capteur (c'est à dire ne mesurant qu'un seul point) est donc potentiellement capable de fournir des informations suivant 3 dimensions : angle d'incidence θ_i, longueur d'onde λ_0 et temps t. Ainsi, la réflectivité TM mesurée est un voxel tridimensionnel d'information : $\mathrm{R}(\theta_i, \lambda_0, t)$.

1.2.6.1 Balayage angulaire

En fixant la longueur d'onde du faisceau incident λ_0 et en balayant les angles d'incidence θ_i de manière à observer la résonance de plasmon de surface, nous pouvons obtenir un montage similaire à celui décrit par [38] et illustré par la figure 12. L'utilisation d'un laser Hélium-Néon permet d'obtenir un faisceau incident quasi-monochromatique à 632,8 nm. Le faisceau est polarisé TM avant de pénétrer le prisme de verre par une des faces, puis est ensuite réfléchi par la couche d'or avant de ressortir par l'autre face du prisme. L'intensité du faisceau est finalement mesuré par une photodiode de mesure (MES). Une photodiode de référence (REF) est utilisée pour normaliser l'intensité TM réfléchie par la biopuce. Ainsi, il est possible de mesurer la réflectivité TM de la biopuce. Le milieu diélectrique ambiant consiste en un liquide mis en contact avec la surface d'or par le biais d'une cellule d'interaction. Finalement, des platines de rotation assurent la rotation de l'ensemble biopuce–prisme d'une part, et de la photodiode de mesure d'autre part, le tout autour d'un axe commun. Afin de conserver l'alignement du faisceau réfléchi avec la photodiode, une rotation θ du prisme sera compensée par une rotation 2θ de la photodiode MES.

La figure 13-a présente le résultat d'un balayage angulaire simulé à la longueur d'onde d'un laser Hélium-Néon ($\lambda_0 = 632,8$ nm) avec un prisme en SF10, ayant pour angle au sommet 60°. Ces paramètres sont utilisés pour correspondre aux expériences décrites dans la section 4.2.3 du chapitre 4. Les deux courbes représentent la réflectivité TM pour deux indices de réfractions du milieu diélectrique ambiant : 1,33 RIU et 1,34 RIU. Elles présentent un décalage angulaire $\Delta\theta \approx 1.4^\circ$ correspondant au décalage du pic de résonance plasmon induit par le changement d'indice de 10^{-2} RIU du milieu diélectrique.

De la même façon, le dépôt de matériau sur le biocapteur va induire un décalage de l'angle de résonance plasmon. Dans la figure 13-b, ce décalage représente 2,16° pour le dépôt d'une couche de 10 nm de matériau ayant pour un indice 1,48 RIU (indice moyen généralement accepté pour des biomolécules disposées en monocouche sur la surface).

Sur cette figure sont aussi représentées les différences de réflectivité induite par le passage de la courbe bleue à la courbe rouge. Ainsi, une augmentation d'indice de 10^{-2} RIU va crée une différence de réflectivité maximale ΔR d'environ 35%. L'angle pour lequel la différence de réflectivité est maximale, que nous nommerons θ_w, coïncide avec le point où la dérivée de la réflectivité ($dR/d\theta$) est maximale [46]. Il est ainsi possible de calculer un angle de travail optimal, où la dynamique du signal sera la plus forte. Nous nous servirons de ce point, valable pour des valeurs de signal ΔR faibles (jusqu'à 20% environ)

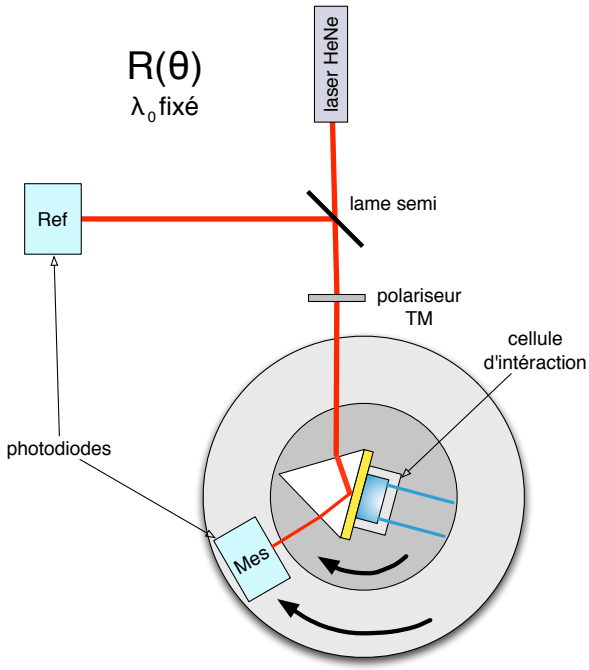


FIGURE 12 – Montage mono-capteur en balayage angulaire. Le prisme est situé au centre de la platine de rotation et est surmonté d'une couche de métal sur laquelle repose la cellule d'interaction. Un laser Hélium-Néon émet un faisceau monochromatique à 632,8 nm. Une lame séparatrice permet d'obtenir un faisceau de mesure (collecté par la photodiode MES) et un faisceau de référence (collecté par la photodiode REF). Le faisceau de mesure est polarisé TM avant se réfracter à la base du prisme.

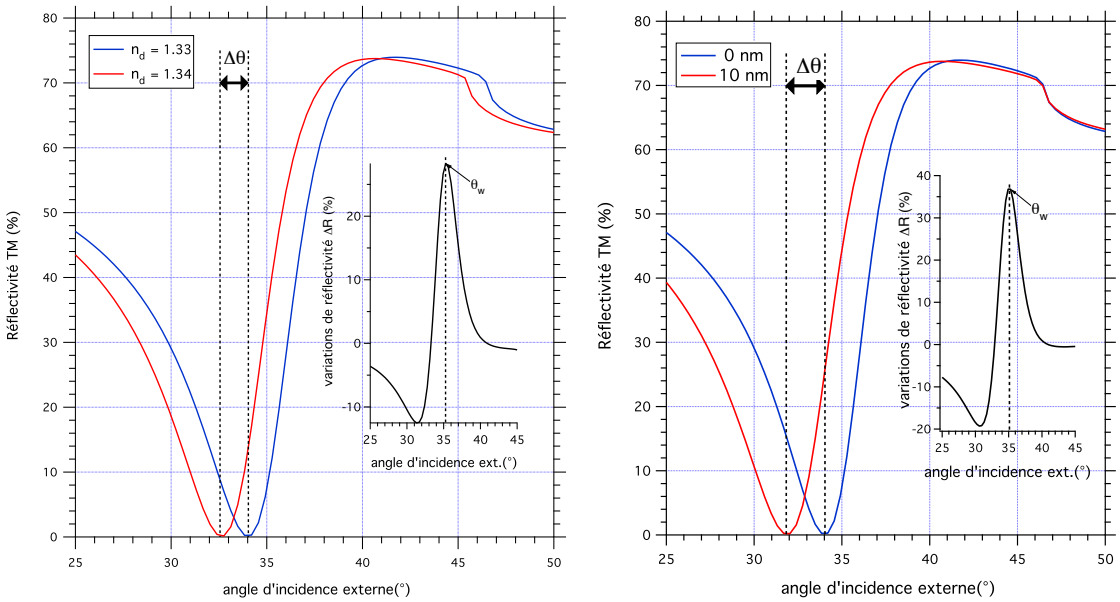
pour le suivi dynamique des interactions dans le paragraphe 1.2.6.4.

Ce système angulaire mono-capteur peut être utilisé pour déterminer l'épaisseur des couches de métal déposées. En effet, la courbe de résonance angulaire expérimentale peut être comparée au modèle, et un ajustement numérique sur les épaisseurs permet de déterminer celles-ci. Des exemples de telles mesures expérimentales sont donnés dans la section 4.2.3 du chapitre 4.

Sensibilité angulaire

Afin de pouvoir comparer les performances de systèmes basés sur le balayage angulaire, nous pouvons déterminer la sensibilité angulaire comme étant la dérivée par rapport à l'angle d'incidence du décalage de l'angle de résonance $\Delta\theta$. Elle se définit grâce à l'indice effectif du plasmon [46] :

$$N_{spr} = \mathrm{Re}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right) \tag{8}$$



(a) (b)

FIGURE 13 – Réflectivité angulaire d'un montage mono-capteur SF10 / Cr (2 nm) / Au (48 nm) / diélectrique ($n_d = 1,33$) simulé. (a) pour une différence d'indice de $\Delta n = 10^{-2}$ RIU (à partir de $n_d = 1,33$). (b) pour un dépôt de 10 nm de matériau d'indice $n = 1,48$. Les inserts représentent les variations de réflectivité induites par le passage de la courbe bleue à la courbe rouge.

La sensibilité angulaire en indice ($d\theta/dn_d$ à épaisseur fixée) est donc obtenue en dérivant la relation de couplage des plasmons de surface (1) par rapport à l'indice du diélectrique :

$$(\mathrm{S}_\theta)_{e\to\infty} = \frac{d\theta}{dn_d} = \frac{\mathrm{Re}\left[\left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_m+\varepsilon_d}\right)^{3/2}\right]}{\sqrt{\varepsilon_i + \mathrm{N}_{spr}^2}} \tag{9}$$

Nous obtenons facilement à partir de cette relation la résolution du système, c'est à dire la grandeur Δn_{min} détectable, en déterminant le pas angulaire minimal de l'appareil. Ainsi, un système mono-capteur utilisant des platines de rotation « classiques » aura un pas angulaire minimal de $10^{-2\circ}$.

Le tableau suivant synthétise les valeurs de sensibilité angulaire et de résolution pour un mono-capteur possédant un pas angulaire minimal de $10^{-2\circ}$, à différentes longueurs d'onde :

Nous pouvons observer que la sensibilité angulaire augmente pour les faibles longueurs d'onde. Les valeurs obtenues peuvent être considérées comme assez conservatives au regard

λ_0	$(S_\theta)_{e\to\infty}$	R_θ (pas min. 10^{-2°)
550 nm	$125,5\ ^\circ/\text{RIU}^{-1}$	$7,97 \times 10^{-5}$ RIU
638 nm	$80,8\ ^\circ/\text{RIU}^{-1}$	$1,24 \times 10^{-4}$ RIU
670 nm	$74,5\ ^\circ/\text{RIU}^{-1}$	$1,34 \times 10^{-4}$ RIU
900 nm	$61,9\ ^\circ/\text{RIU}^{-1}$	$1,62 \times 10^{-4}$ RIU

TABLE 3 – Sensibilité et résolution angulaire théoriques pour un diélectrique à 1,33 RIU

des données compilées par J. Homola *et al.* [50], où des résolutions de l'ordre de 5×10^{-7} sont trouvées à $n = 1,32$ pour des systèmes possédant un pas angulaire minimal de 10^{-4°. Le choix d'un pas limité de 10^{-2° est ici motivé par la présence d'un tel système dans le laboratoire. Certains systèmes peuvent atteindre des pas angulaires d'un à deux ordres de grandeurs [51] plus faibles pour des applications particulières.

1.2.6.2 Balayage spectral

En fixant l'angle d'incidence au prisme, il est possible de balayer spectralement la biopuce à SPR et observer la résonance spectrale de l'onde de plasmon de surface. Au prix d'une perte de résolution spectrale, il est possible d'utiliser un monochromateur réglable et une source de lumière blanche. Néanmoins, une technique plus simple est décrite dans la figure 14. Le montage consiste à utiliser une source de lumière blanche, collimatée par une lentille, puis polarisée TM. Le faisceau va donc traverser le prisme, se réfléchir sur la biopuce, pour finalement converger via une lentille dans un spectromètre. Il est ainsi possible d'observer le spectre d'absorption de la couche de métal en contact avec le milieu diélectrique ambiant. Une variante de ce système, permettant l'imagerie temps-réel du décalage spectral sans balayage a été mis au point par F. Bardin *et al.* [52].

De la même manière que nous avions tracé la courbe de réflectivité angulaire, nous pouvons tracer la courbe de réflectivité spectrale du système. La figure 17 donne le résultat d'une simulation effectuée à 36,4° d'incidence [53] aussi bien pour une variation d'indice que pour une variation d'épaisseur.

Un changement d'indice de 10^{-2} RIU va créer un décalage $\Delta\lambda$ de la courbe de résonance vers le rouge d'environ 30 nm (voir figure 17-a). En insert, nous pouvons également observer la variation de réflectivité TM engendrée par le changement d'indice. Similairement au balayage angulaire, il est possible de déterminer une longueur d'onde de travail λ_w optimale (qui est ici de 648 nm et engendre une variation de réflectivité de 38%). Le dépôt de 10 nm de matériau d'indice $n_d = 1,48$ va également créer un décalage de la résonance plasmon vers le rouge, cette fois-ci de près de 40 nm. Ce décalage peut se traduire

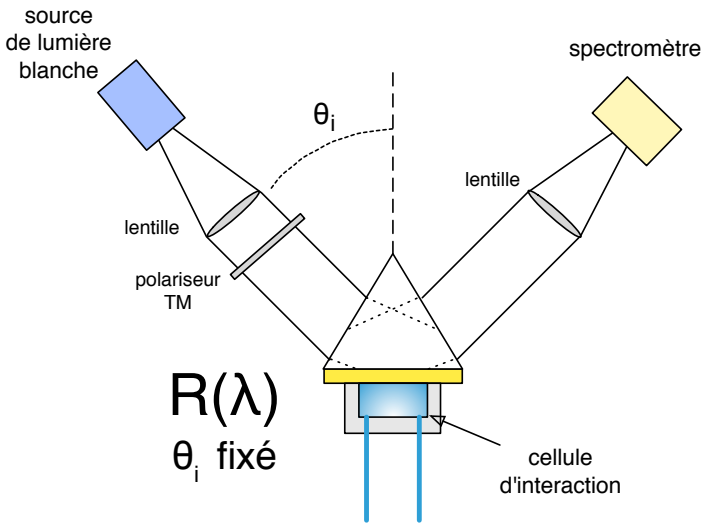
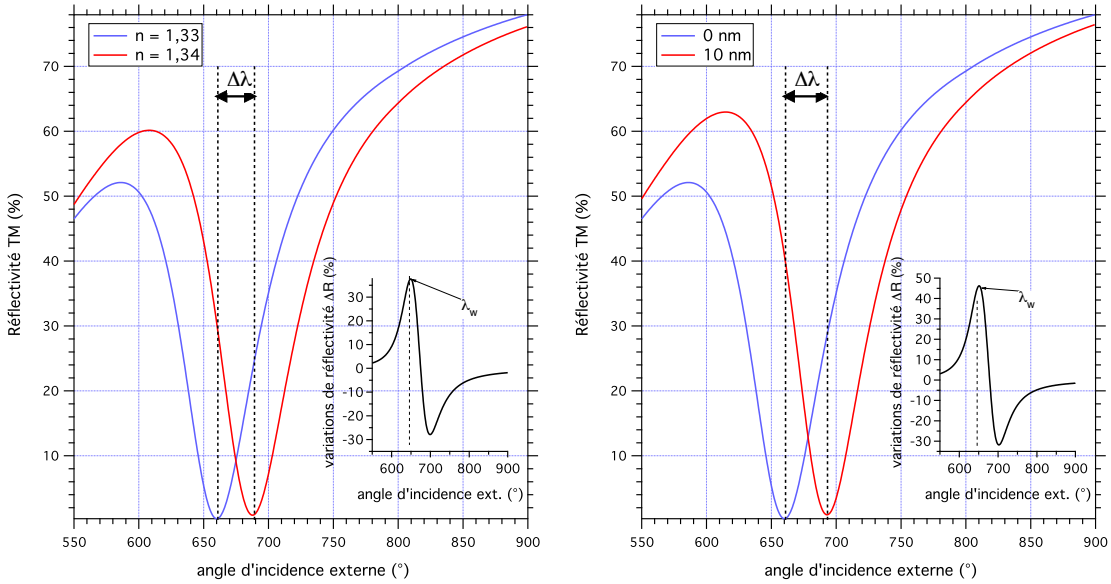


FIGURE 14 – Montage mono-capteur à balayage spectral. Une source de lumière blanche est collimatée puis polarisée TM. Le faisceau, d'angle d'incidence θ_i avec la normale à la couche de métal, est réfracté à travers un prisme pour se réfléchir sur sa base. Le faisceau réfléchi est collecté à travers un lentille par un spectromètre.



(a) (b)

FIGURE 15 – Réflectivité spectrale d'un montage mono-capteur SF10 / Cr (2 nm) / Au (48 nm) / diélectrique ($n_d = 1,33$) simulé. (a) pour une différence d'indice de $\Delta n = 10^{-2}$ RIU (à partir de $n_d = 1,33$). (b) pour un dépôt de 10 nm de matériau d'indice $n = 1,48$. Les inserts représentent les variations de réflectivité induites par le passage de la courbe bleue à la courbe rouge.

en une différence de réflectivité de 46% à la longueur d'onde de travail $\lambda_w = 651$ nm.

Les valeurs de λ_w, de $\Delta\lambda$ et de ΔR indiquées ici sont dépendantes du choix initial de l'angle d'incidence θ_i. Il est donc important de bien déterminer les angles et les longueurs d'onde de travail dans des plages où la sensibilité est maximale. Un balayage spectral positionné à un angle d'incidence quelconque résultera quasi-certainement en un biocapteur aux performances médiocres.

Sensibilité spectrale

Afin de caractériser les performances spectrales d'un tel système, nous pouvons définir la sensibilité spectrale S_λ en indice ($d\lambda/dn_d$ à épaisseur fixée) en dérivant l'équation (1) par rapport à la longueur d'onde [54] :

$$(S_\lambda)_{e\to\infty} = \frac{d\lambda}{dn_d} = \frac{\varepsilon_m^2}{\frac{n_d^3}{2}\left|\frac{d\varepsilon_m}{d\lambda}\right| + (\varepsilon_m + n_d^2)\varepsilon_m \frac{dn_i}{d\lambda}\frac{n_d}{n_i}} \tag{10}$$

Dans cette équation, le terme $d\varepsilon_m/d\lambda$ représente la dispersion chromatique du métal, et le terme $dn_i/d\lambda$ la dispersion chromatique du prisme.

La table suivante résume les valeurs de sensibilité et de résolution spectrales obtenues pour un système équipé d'un spectromètre ayant pour résolution 0.1 nm (facilement atteignable avec un bon spectromètre commercial), pour un diélectrique d'indice $n_d = 1,33$.

λ_0	S_λ	R_λ (résolution spectro. 0,1 nm)
550 nm	387 nm/RIU^{-1}	$2,58 \times 10^{-4}$ RIU
638 nm	1399 nm/RIU^{-1}	$7,15 \times 10^{-5}$ RIU
670 nm	1910 nm/RIU^{-1}	$5,24 \times 10^{-5}$ RIU
900 nm	7494 nm/RIU^{-1}	$1,33 \times 10^{-5}$ RIU

Table 4 – Sensibilité et résolution spectrale théoriques pour un diélectrique à 1,33 RIU

Nous pouvons observer que cette fois, la sensibilité croît avec la longueur d'onde. Le comportement de le sensibilité spectrale est à l'opposé de celui de la sensibilité angulaire. En traçant le rapport des sensibilités angulaires et spectrales (S_θ/S_λ) en fonction de la longueur d'onde, on peut observer le comportement de ces deux paramètres pris de concert (voir figure 16). L'asymptote verticale indique le domaine spectral où la sensibilité angulaire est le paramètre dominant ($\lambda < 630nm$). L'asymptote horizontale indique le domaine où la sensibilité spectrale est la plus importante ($\lambda > 700$ nm). Afin d'obtenir des performances correctes aussi bien angulairement que spectralement, il est donc intéressant de travailler avec des résonances se situant dans la plage des longueurs d'ondes situées entre

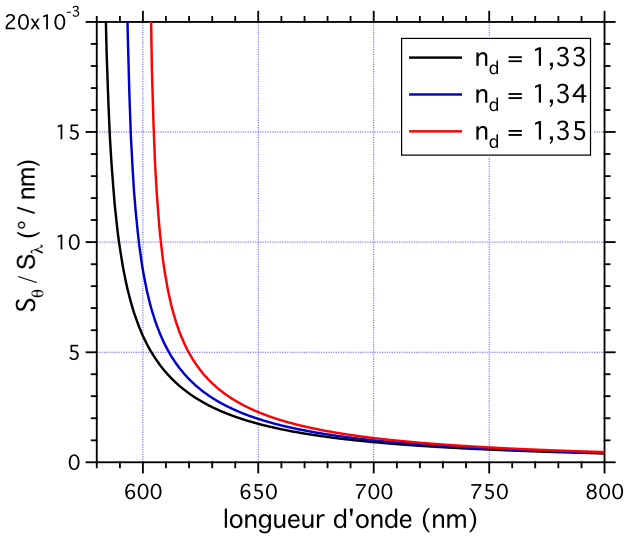


FIGURE 16 – Rapport des sensibilités angulaires et spectrales (S_θ/S_λ) exprimé en ° / nm en fonction de la longueur d'onde, pour des différents indices de réfraction n_d. (noir) $n_d = 1,33$, (bleu) $n_d = 1,34$, (rouge) $n_d = 1,35$

630 nm et 700 nm.

1.2.6.3 Nappes spectro-angulaires

Dans l'optique d'aider au choix d'un couple angle/longueur d'onde optimal pour un biocapteur à SPR, il peut être intéressant de combiner les deux types de balayage pour pouvoir caractériser un échantillon en une seule passe. Ainsi, au lieu d'une courbe de résonance plasmon, nous serions à même d'observer une nappe de résonance spectro-angulaire, formant une véritable cartographie de la réflectivité de la biopuce à SPR à plusieurs incidences et plusieurs longueurs d'onde. Ce type de système à été développé par M. Nakkach, F. Bardin *et al.* [53, 16].

Il s'agit d'un système combinant un balayage angulaire à l'aide d'un miroir motorisé et un balayage spectral à l'aide d'un monochromateur motorisé placé en sortie d'une source de lumière blanche. Pour chaque point de coordonnées (m, n) de la nappe, le miroir sera positionné à un angle θ_m et le réseau de diffraction du monochromateur sera positionné de telle façon que la lumière incidente au prisme aura une longueur d'onde λ_n.

La figure 18-a montre un exemple simulé d'une telle nappe spectro-angulaire pour un balayage de 0 à 90°et de 520 à 850 nm pour une configuration prisme / chrome / or / eau. Dans cet example, on voit clairement que plus la longueur d'onde est faible, plus le profil

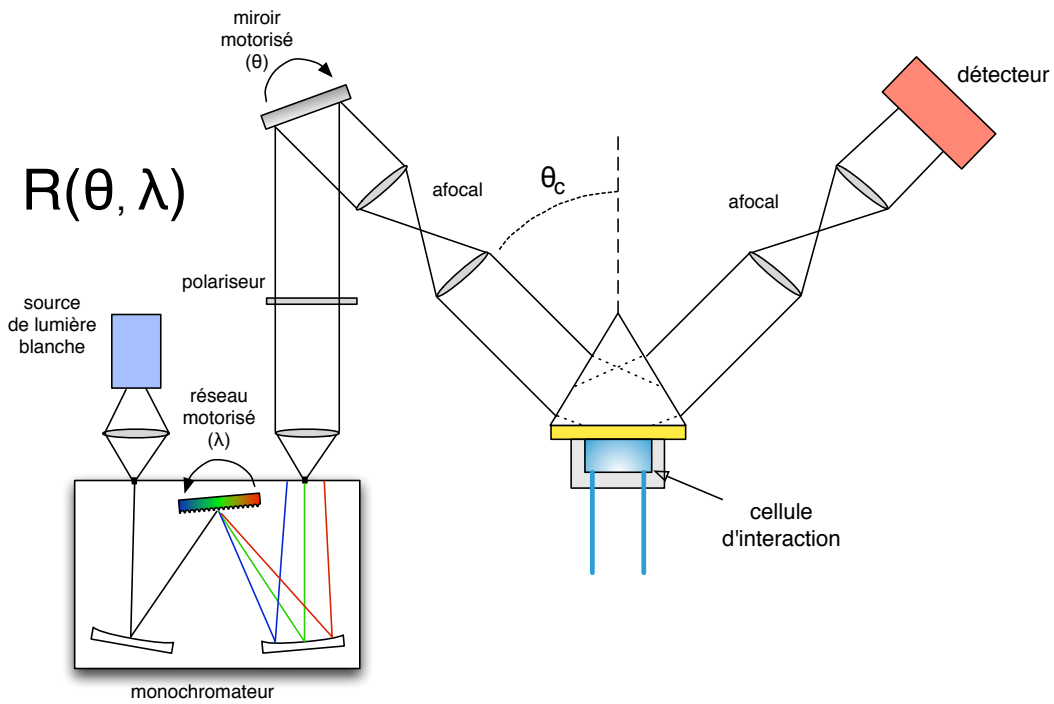
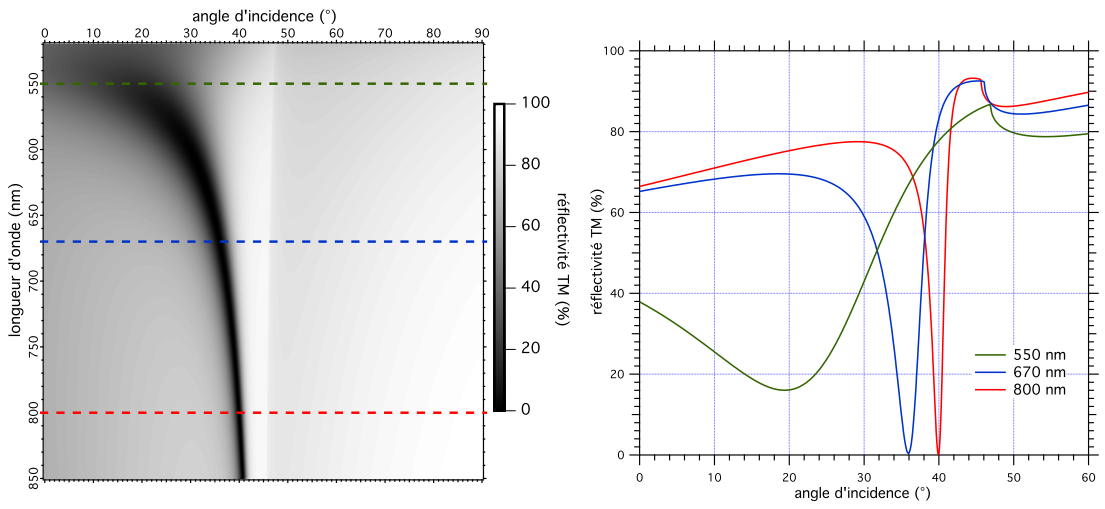


FIGURE 17 – Montage à balayage spectro-angulaire. Une source de lumière blanche est utilisée en entrée d'un monochromateur. Celui-ci permet de sélectionner, à l'aide d'un réseau de diffraction motorisé, la longueur d'onde de travail. Le faisceau quasi-monochromatique sortant est ensuite collimaté, puis polarisé TM, avant de se réfléchir sur un miroir motorisé. Le faisceau pénètre un premier système afocal avant de venir se réfléchir sur la surface de métal à travers un prisme. Après réflexion, un second afocal permet d'imager la surface sur un détecteur.

de résonance plasmon devient évasé. A l'opposé, plus la longueur d'onde est grande, plus le profil devient étroit. Cela indique que la pente de la courbe angulaire correspondante augmente avec la longueur d'onde, comme indiqué sur la figure 18-b pour trois longueurs d'onde : 550 nm (vert), 670 nm (bleu) et 800 nm (rouge). L'évasement de la courbe va avoir un impact sur la performance du biocapteur. A angle fixé θ_0 et à longueur d'onde fixée λ_0, le biocapteur ne mesure plus que des variations de réflectivité ΔR. Ainsi, si la courbe de réflectivité angulaire est étroite, la pente au point de fonctionnement optimal θ_w est importante et donc la sensibilité du capteur (ΔR) à une variation d'indice Δn et / ou une variation d'épaisseur Δe est accrue.

Dans le cadre de notre travail, nous utilisons une diode électroluminescente (DEL) émettant dans le rouge à 670 nm. Bien que cette longueur d'onde ne corresponde pas à la plus grande sensibilité en réflectivité atteignable, elle a été choisie pour des raisons pratiques (faisceau visible).



(a) (b)

FIGURE 18 – (a) Nappe spectro-angulaire d'un système prisme/Cr/Au/eau. (b) Coupes angulaires à différentes longueurs d'onde.

1.2.6.4 Suivi dynamique d'interactions

L'un des aspects les plus importants des biopuces à résonance de plasmon de surface est sans doute la possibilité de suivre de manière dynamique des interactions biomoléculaires de surface. En effet, à angle et longueur d'onde fixe, il est possible de se positionner à un point de fonctionnement (θ_m, λ_n) tel que le dépôt de matériau en surface ou le changement de l'indice de réfraction du milieu à analyser va créer une modification maximale de la réflectivité observée ΔR. Nous pouvons ainsi nous affranchir de tout balayage et de toute pièce mobile, et une capture en « temps-réel », c'est à dire au rythme de l'acquisition des données par le système, devient possible.

L'acquisition dynamique des données prend tout son sens lorsque le matériau à analyser est d'intérêt biologique. En effet, par des mécanismes d'adsorption / désorption sélective de biomolécules à la surface, par exemple l'accrochage ciblé de protéines ou l'hybridation de brins d'ADN avec leur complémentaire, il devient possible de mesurer de manière précise la quantité de molécules déposées par unité de surface, et donc leur taux de recouvrement. De plus, la cinétique des interactions en jeu peut renseigner le biologiste sur les constantes d'affinité des molécules entre-elles. En effet, en utilisant le modèle d'interaction suivant :

$$\mathrm{A} + \mathrm{B} \Leftrightarrow \mathrm{AB} \tag{11}$$

C'est à dire qu'un ligand A (de concentration [A]) se lie à un analyte B (de concentration [B]), pour former un duplexe AB (de concentration [AB]). La concentration du

produit résultant peut être déterminée à partir des constantes d'association et de dissociation k_{on} et k_{off} :

$$\frac{d[\mathrm{AB}]}{dt} = k_{on}[\mathrm{A}][\mathrm{B}] - k_{off}[\mathrm{AB}] \tag{12}$$

Il est possible de déterminer ces constantes [55] à partir des données expérimentales en procédant à un ajustement numérique exponentiel de la courbe d'évolution temporelle de la réflectivité $\Delta\mathrm{R}(t)$, comme indiqué dans la figure 19. En effet, tant que les interactions s'effectuent dans la zone de linéarité du capteur ($\Delta\mathrm{R} < 20\%$ environ), la variation de concentration du produit $\Delta[\mathrm{AB}]$ est directement proportionnelle à l'intensité de variation de réflectivité $\Delta\mathrm{R}$.

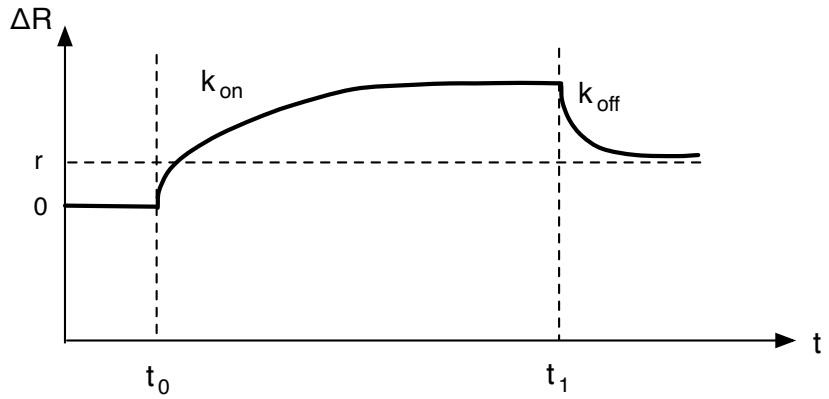


FIGURE 19 – Évolution temporelle de la réflectivité $\Delta\mathrm{R}$ d'un biocapteur à SPR lors de l'adsorption sélective d'une biomolécule sur la surface fonctionnalisée.

1.2.7 Imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI)

Bien qu'un système à mono-capteur fournisse un ensemble d'informations conséquent, comme nous l'avons vu, la limitation principale de tels système reste le multiplexage des données et par là l'augmentation de la densité d'informations par unité de surface. Ce concept est crucial pour des applications pratiques de la SPR, tels le diagnostic à grande échelle, ou la détection d'un grand nombre d'interactions différentes en simultané.

L'idée des systèmes basés sur l'imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) consiste à remplacer le détecteur par une caméra CCD capable d'imager l'ensemble de la surface de la biopuce. De cette manière, il est possible de multiplexer l'information contenue dans la réflectivité de la puce grâce à une matrice de zones d'interaction (ou « spots »). La biopuce ressemble donc à une biopuce à fluorescence telle que décrit dans la section 1.1.

Les principales différences résident dans la nature même de la lecture des informations. En effet, un plasmon de surface possède une longueur de propagation (comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2.5) difficilement compatible avec des densités rencontrées dans les systèmes commerciaux de type *Affymetrix*. En SPRI, il est possible d'atteindre à l'heure actuelle environ 1000 spots différents par cm^2 [56, 57], contre plusieurs centaines de milliers pour des biopuces à fluorescence. Néanmoins, l'ajout des dimensions évoquées ci-avant permettent d'ajouter à la mesure des informations dynamiques.

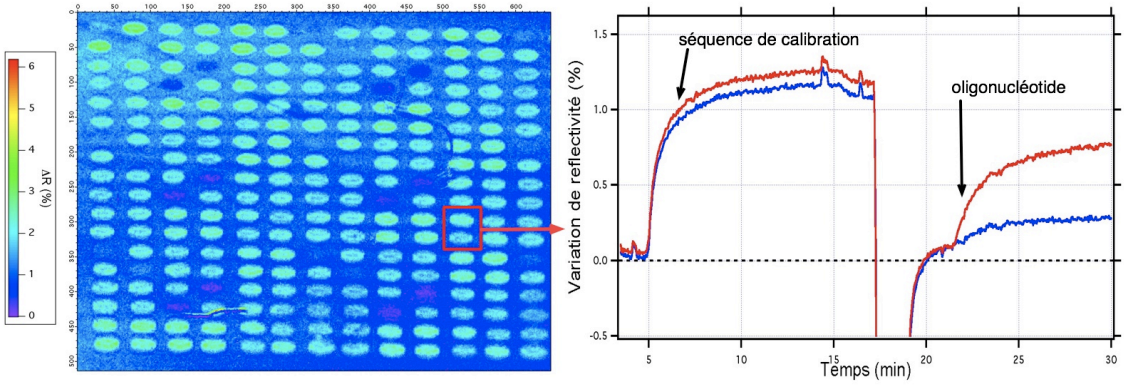


FIGURE 20 – (gauche) Image de variations de réflectivité (fausses couleurs) obtenue avec une biopuce à SPRI, pour des interactions ADN : ADN (oligonucléotides). (droite) Évolution temporelle de la réflectivité de deux plots (encadrés en rouge sur l'image de gauche) lors d'une phase d'injection de séquence de calibration (commune aux deux plots) suivie d'une phase d'injection d'un oligonucléotide parfaitement complémentaire à l'un des deux plots (courbe rouge) et partiellement complémentaire à l'autre plot (coube bleue).

Il n'est pas possible d'illuminer la biopuce à l'aide d'un laser, car cela rendrait difficile la résolution des images du fait de la présence de speckle. L'illumination se fait donc par le biais d'une LED possédant une largeur spectrale d'environ 20 nm. Couplé au fait qu'un prisme possède une dispersion chromatique non négligeable, la courbe de résonance angulaire ou spectrale d'un banc utilisant la SPRI sera moins profonde et possèdera un profil plus évasé que pour un banc monocapteur. Néanmoins, l'ajout des dimensions latérales (x,y) à celles déjà explorées par les différents systèmes de SPR présentés ici, à savoir (θ, λ, t) permet d'obtenir une gamme d'outils de caractérisation réellement versatile. L'objectif de notre travail est d'ajouter une dimension polarimétrique P à celles précédemment évoquées, pour finalement parvenir, à moyen terme, à un système complet capable d'adresser la réflectivité sous la forme d'un voxel 6D : R(x,y,t, θ, λ, P).

1.3 Techniques de mesure de l'anisotropie de systèmes biologiques

Dans cette section, nous étudierons plusieurs techniques, couramment utilisées pour déterminer l'anisotropie d'échantillons biologiques. Tout d'abord, nous définirons rapidement, d'un point de vue optique, cet que signifie le terme « anisotropie ». Ensuite, nous traiterons des deux techniques de caractérisation d'échantillons : l'ellipsométrie (paragraphe 1.3.2), et la microscopie à polarisation (paragraphe 1.3.3). Enfin, nous aborderons dans le paragraphe 1.3.4 une technique de mesure de l'anisotropie de fluorescence, dont la mesure est plus dynamique et applicable aux biopuces.

1.3.1 L'anisotropie optique

En optique, l'anisotropie ou biréfringence est la mesure de la différence d'indice de réfraction dans les différentes directions de l'espace. Les milieux anisotropes sont souvent des cristaux, possédants un ou plusieurs axes de croissance privilégiés.

Un rayon lumineux polarisé linéairement traversant un milieu biréfringent va subir une double réfraction. Ceci entraîne qu'il existe dans un tel milieu deux vitesses de phase, et donc deux indices dépendant de la direction de propagation. On peut définir l'axe optique (ou axe de vibration privilégiée) comme étant une direction de l'espace pour laquelle la propagation n'est possible que suivant une seule vitesse de phase (et donc un seul indice). Les matériaux biréfringents peuvent ainsi être classés par le nombre d'axes optiques qu'ils possèdent. Il possible de distinguer deux types de matériaux : les matériaux uniaxes, et les matériaux biaxes.

- Les matériaux uniaxes ne possèdent qu'un axe optique unique, ce qui entraine qu'ils possèdent deux indices de réfraction dits « ordinaire » (n_o ou dans certains cas $n_{//}$) et « extraordinaire » (n_e ou $n_\perp$). Ils peuvent être qualifiés de positifs (respectivement négatifs), suivant que l'anisotropie $\Delta n = n_e - n_o$ est positive (resp. négative).
- Les matériaux biaxes possèdent quand à eux deux axes optiques, et donc trois indices de réfraction n_a, n_b et n_c.

En se plaçant dans le repère tridimensionnel du matériau (x, y, z), il est possible de définir un triplet d'indices de réfraction (n_x, n_y, n_z) tel que :

$$\frac{x^2}{n_x^2} + \frac{y^2}{n_y^2} + \frac{z^2}{n_z^2} = 1 \tag{13}$$

Cela donne l'équation d'une ellipsoïde, que l'on appelle l'ellipsoïde des indices. La

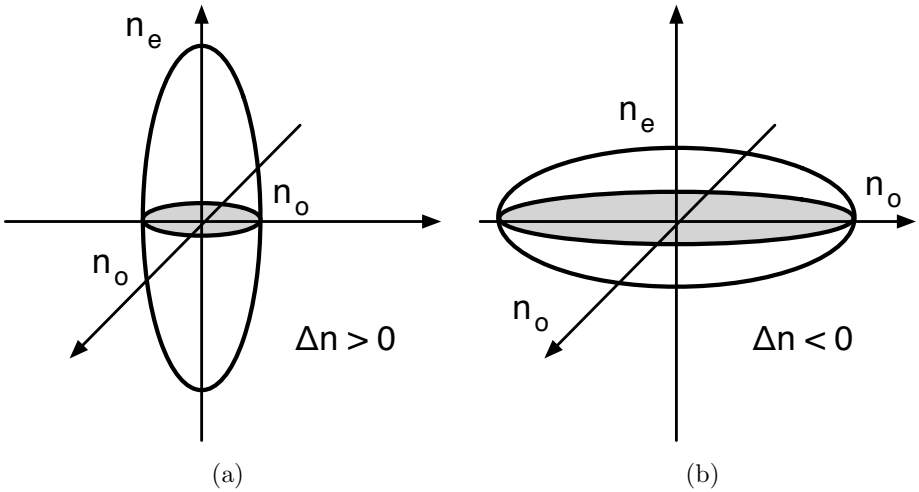


FIGURE 21 – Ellipsoïde des indices (a) d'un matériau uniaxe positif (b) d'un uniaxe négatif.

figure 21 donne l'ellipsoïde des indices pour un matériau uniaxe.

Les systèmes biologiques anisotropes étudiés dans ce travail sont le plus souvent uniaxes, tels des brins d'ADN par exemple. Localement, ils possèdent un axe extraordinaire le long de la double hélice, et un axe ordinaire perpendiculaire au brin.

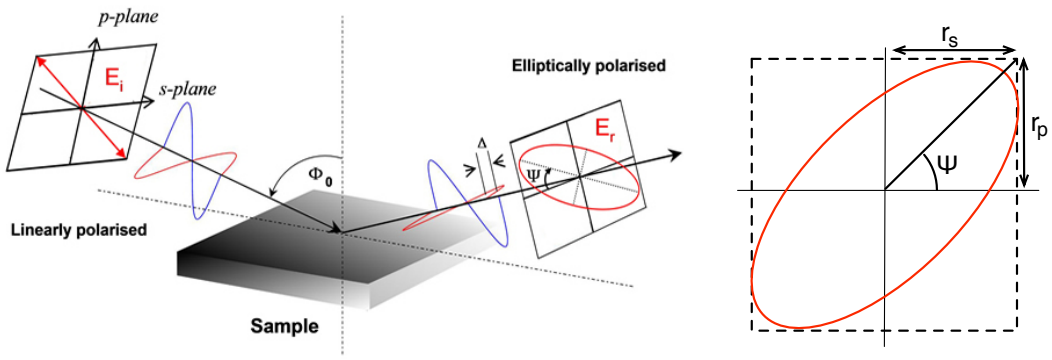
1.3.2 Mesures ellipsométriques

L'ellipsométrie est un technique de caractérisation de surfaces et de couches minces basée sur les propriétés du matériau à changer l'état de polarisation de la lumière après réflexion. En effet, une onde plane monochromatique polarisée linéairement va subir après réflexion sur un échantillon une rotation de la polarisation dépendante de l'épaisseur et de l'indice de réfraction de celui-ci.

Au niveau expérimental, le principe est d'utiliser un faisceau lumineux, polarisé linéairement par un polariseur, pour éclairer la surface à analyser. Après réflexion spéculaire, le faisceau va traverser un nouveau polariseur appelé analyseur, puis l'intensité lumineuse résultante est mesurée par un détecteur. Le champ électrique de l'onde incidente possède deux composantes E_p (le champ E oscille dans le plan d'incidence) et E_s (le champ E oscille orthogonalement au plan d'incidence). Le rapport des intensités des champs réfléchies (E_r) et incidentes (E_i) pour chaque composante du champ définit les coefficients de réflexion de l'échantillon r_p^* et r_s^*. Ces coefficients sont les coefficients de réflexion de Fresnel à la surface de l'échantillon, prenant en compte le déphasage dans le matériau. Ils sont donc complexes et définis par : $r_{p,s}^* = \mathrm{E}_{p,s}^r/\mathrm{E}_{p,s}^i = |r_{p,s}| \exp(j\delta_{p,s})$. On mesure alors

directement le rapport des deux coefficients :

$$\frac{r_p^*}{r_s^*} = \left|\frac{r_p}{r_s}\right| e^{j(\delta_p - \delta_s)} = \tan\Psi e^{j\Delta} \tag{14}$$



(a) (b)

FIGURE 22 – Principe de fonctionnement d'un ellipsomètre. (a) Une onde polarisée linéairement d'angle ϕ_0 va subir une réflexion spéculaire sur l'échantillon. Après réflexion, la polarisation de l'onde devient elliptique (d'angle Ψ) et subit un déphasage Δ. (b) Détail de la polarisation elliptique obtenue.

Le principe de la mesure est illustré dans la figure 22. Dans la pratique, il existe plusieurs types d'ellipsomètres. Pour le cas d'un éllipsomètre utilisant la méthode de zéro, couramment répandu, une lame $\lambda/4$ est insérée entre le polariseur et l'échantillon. l'analyseur est tourné jusqu'a obtenir une extinction du faisceau réfléchi. L'orientation de l'analyseur donne donc directement la valeur de Ψ, et l'orientation du polariseur donne la valeur de Δ. Les paramètres de l'échantillon sont ensuite déterminés par ajustement numérique d'un modèle de la réflexion de Fresnel à partir des valeurs de Δ et Ψ mesurées. Les informations obtenues dépendent des hypothèses faites sur le matériau (ou le multicouche). Par exemple dans le cas d'une monocouche, en connaissant l'épaisseur du substrat, on peut déterminer par le calcul les indices n et k du matériau. Il est possible de multiplier les mesures à des angles et des longueur d'ondes différentes pour obtenir plus d'information sur l'échantillon. Dans ce cas, un modèle matriciel basé sur les matrices de Mueller est utilisé pour l'extraction des paramètres. On parle dans ce cas d'éllipsométrie généralisée [58]. Il est par exemple possible grâce à des techniques d'ellipsométrie spectroscopique [59] de déterminer les paramètres d'un matériau uniaxe [60].

Les mesures ellipsométriques fournissent un ensemble de renseignements extrêmement précis et variés. Il est par exemple possible de déterminer la rugosité d'une surface, les

indices de réfraction et les épaisseurs d'un multicouche complet, pour des couches opaques ou transparentes ainsi que des métaux [61, 62]. Il est également possible (dans une certaine limite) de faire de l'imagerie ellipsométrique [63]. Cette versatilité en fait un instrument de choix pour la caractérisation de surfaces et de matériaux.

Malgré tous ces avantages, l'ellipsométrie reste une méthode très coûteuse à mettre en place. La précision des pièces optiques doit être excellente (polariseurs à forte extinction, choix d'une source non polarisée, spectromètre, collimation du faisceau etc.) car de cette précision dépend entièrement la qualité des mesures. De plus, un montage complexe de moteurs pas-à-pas et de bras mécaniques est à prévoir. Un autre désavantage de l'utilisation d'un éllipsomètre est que la méthode n'est pas dynamique. Le système doit faire un balayage en longueur d'onde et / ou en angle, puis un calcul avant de pouvoir donner une valeur.

1.3.3 Microscopie en lumière polarisée

La microscopie en lumière polarisée est une technique permettant de combiner la facilité d'utilisation d'un microscope en transmission classique à la variété d'informations ajoutée par l'observation en lumière polarisée. Les applications de ce type d'instrument sont diverses, bien qu'il soit fort répandu en cristallographie, minéralogie et pétrographie. Un microscope en lumière polarisée permet de distinguer par exemple les frontières de domaines de minéraux dans les roches, ou les axes de croissance de cristaux.

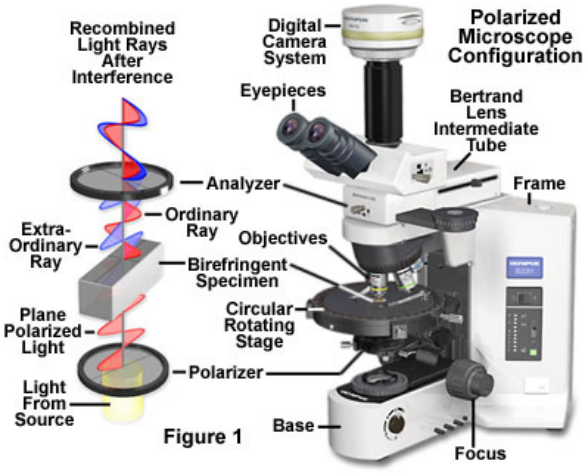
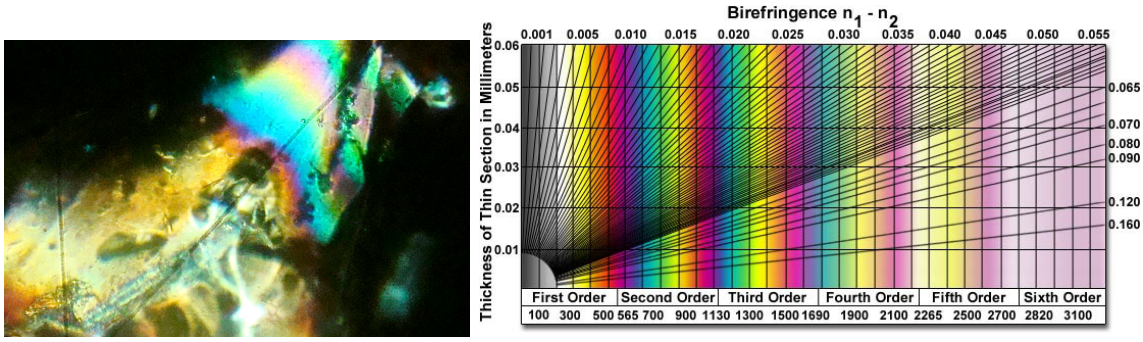


FIGURE 23 – Principe de fonctionnement d'un microscope en lumière polarisée [4].

Le principe de fonctionnement d'un microscope en lumière polarisée, illustré dans la figure 23, est simple. La lumière en provenance de la source est tout d'abord polarisée

linéairement à l'aide d'un polariseur. Le faisceau polarisé traverse ensuite l'échantillon fixé sur la platine du microscope. Si le matériau est biréfringent, la lumière transmise se décompose en une composante ordinaire et une composante extraordinaire. Un deuxième polariseur, l'analyseur, est positionné entre l'échantillon et l'oculaire, ne sélectionnant ainsi qu'une composante de la lumière transmise. En orientant l'analyseur de manière à obtenir l'extinction, il est possible de déterminer l'axe optique du matériau. En effectuant une rotation de la platine, et donc de l'échantillon, des figures d'interférence colorées peuvent être observées (voir la figure 24-a pour un exemple). Ces interférences sont dues à la différence de chemin optique existant entre les ondes ordinaires et les ondes extraordinaires, et donc à la biréfringence du matériau. Il est possible de déterminer la biréfringence en connaissant l'épaisseur de l'échantillon grâce au diagramme de Michel-Lévy (figure 24-b). En faisant correspondre verticalement la couleur observée dans le microscope avec la couleur d'ordre le plus grand dans le diagramme, et en suivant l'épaisseur horizontalement, on trouve une droite diagonale. Cette droite donne la biréfringence de l'objet. Il est possible d'augmenter le contraste des franges en insérant une lame à retard calibré entre l'échantillon et l'analyseur.



(a) (b)

FIGURE 24 – (a) Observation au microscope à lumière polarisée d'un gel d'ADN de sperme de saumon. (b) Diagramme des biréfringence de Michel-Lévy [5]

Bien que cette technique fournisse une information très riche sur l'objet à observer, celle-ci reste très dépendante de la qualité de l'observation réalisée par le microscopiste. De plus, les microscopes à polarisation possèdent une très faible résolution axiale. Malgré tout, ce type d'outil reste très intéressant pour le « prototypage » de substrats anisotropes. L'image de la figure 24-a montre par exemple un gel d'ADN de sperme de saumon orienté que nous avons préparé grâce à un protocole mis au point par J. Taboury [64]. On peut distinguer une zone ou la biréfringence de l'échantillon est nettement observable grâce à

ses franges d'interférence.

1.3.4 Mesure de l'anisotropie de fluorescence

Le principe de la technique de mesure de l'anisotropie de fluorescence est basé sur le fait que la fluorescence d'un échantillon excité par une onde plane polarisée linéairement présente la plupart du temps une émission polarisée. En effet, les fluorophores présents dans les molécules à étudier absorbent de manière préférentielle les photons excitateurs dont le champ électrique est aligné avec le moment dipolaire de la molécule, c'est le phénomène de photosélection. La probabilité d'excitation d'une molécule orientée aléatoirement dans un liquide est alors directement proportionnelle au cosinus carré de l'angle entre l'onde excitatrice et le moment dipolaire de la molécule. Les fluorophores excités vont se relaxer en émettant de la fluorescence également polarisée ou partiellement polarisée. Il est possible de construire un dispositif expérimental permettant de collecter la fluorescence polarisée émise par un échantillon éclairé par un laser polarisé (Figure 25).

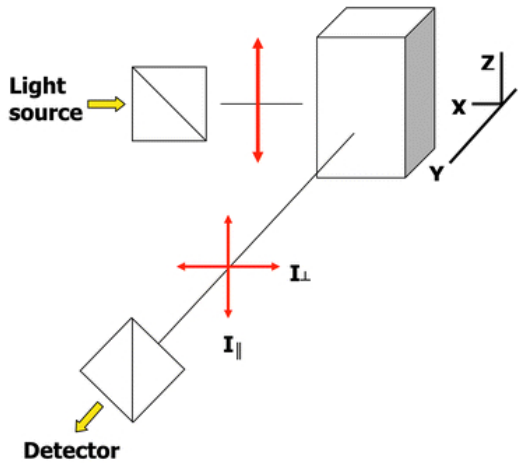


FIGURE 25 – Principe de la mesure de l'anisotropie de fluorescence. Une source de lumière monochromatique est polarisée linéairement avant d'illuminer un échantillon contenant des fluorophores. La fluorescence émise est collectée par un photodiode devant laquelle est positionné un polariseur sélectionnant les composantes $I_\perp$ ou $I_{//}$ du champ émis.

L'anisotropie de fluorescence r est définie par l'équation (15), où $I_{//}$ et $I_\perp$ sont les intensités de fluorescence perpendiculaires et parallèles au faisceau incident, détectées par une photodiode en sortie d'échantillon.

$$r = \frac{I_{//} - I_\perp}{I_{//} + 2I_\perp} \tag{15}$$

Il est également possible de mettre en relation l'anisotropie (statique) mesurée, avec des paramètres dynamiques de l'échantillon, tels que le temps de vie de fluorescence (équation (16)). Le temps de vie de fluorescence t de la molécule est alors calculé grâce au rapport de l'anisotropie mesurée à l'anisotropie maximale r_0 observable d'un part, et au temps de corrélation de rotation t_r de la molécule d'autre part.

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{t}{t_r} \tag{16}$$

Ce temps de corrélation de rotation est décrit dans l'équation (17), où η est la viscosité du milieu, V est le volume de l'échantillon, R la constante des gaz parfaits et T la température de l'échantillon en Kelvins.

$$t_r = \frac{\eta \mathrm{V}}{\mathrm{RT}} \tag{17}$$

La mesure d'anisotropie de fluorescence est donc riche en informations, non seulement sur l'état d'orientation des molécules présentes dans le milieu (paramètre d'ordre $< cos^2\theta > \propto r$), mais aussi sur la propension des molécules marquées à « bouger » librement. En effet, la présence d'autres molécules autour du fluorophore entraîne une diminution des degrés de la liberté de rotation, et donc une augmentation de l'anisotropie de fluorescence. Ce type de mesure est bien adapté à la fluorométrie, mais aussi à la microscopie confocale [65, 66]. Elle peut également être couplée à d'autres mesures comme par exemple le transfert résonant d'énergie de fluorescence (FRET) [67] ou la microscopie à deux photons [68]. Il est également à noter que l'anisotropie de fluorescence peut-être utilisée avantageusement pour augmenter le rapport signal à bruit des biopuces à fluorescence. En effet, la polarisation de molécules marquées d'oligodeoxynucléotides par exemple (voir la revue de Nasir *et al.* [69] pour d'autres exemples) va augmenter lors de l'hybridation sur la biopuce. Il n'est donc plus nécessaire de travailler sur les intensités de fluorescence relatives, car on peut directement exploiter l'anisotropie du plot pour s'affranchir des bruits de fond. Une autre méthode consiste à orienter le photodétecteur à un angle θ par rapport à la puce tel que la fluorescence détectée est maximale. Ce type de technique augmente de manière simple le rapport signal à bruit des biopuces à ADN par fluorescence « classiques » [70].

Ce type de technique est donc plus proche dans sa philosophie du système que nous voulons mettre en place, que les outils de caractérisation que nous avons vus précédemment. La mesure d'anisotropie de fluorescence utilise une méthode existante (la mesure de fluorescence) pour l'étendre en ajoutant des dimensions observables : la propension

des fluorophores à s'orienter dans le milieu suivant un axe particulier matérialisé par un paramètre d'ordre. Néanmoins, elle n'est pas applicable directement, car il est nécessaire d'équiper le système biologiques à observer de fluorophores, ce qui irait à l'encontre du but recherché dans notre travail.

Conclusion

A la lumière des éléments donnés dans ce chapitre, nous pouvons désormais mieux définir l'approche qui sera utilisée dans le développement expérimental.

Les systèmes de biopuces sont des outils très intéressants pour l'étude des processus biologiques et la génétique. Ils permettent, dans un encombrement réduit, de multiplexer l'information de telle façon qu'il devient possible d'étudier l'expression d'un génome ou d'un ensemble de protéines sur un seul et même échantillon. Cette parallélisation massive a permis d'effectuer d'importantes avancées dans les techniques de découverte de nouveaux gènes liés à des maladies génétiques [71].

Les systèmes de biopuces basés sur la lecture d'une intensité de fluorescence fournissent une information très dense, de par l'effort de miniaturisation entrepris et la sensibilité des détecteurs actuels. Néanmoins, la nécessité d'équiper les cibles de marqueurs fluorescents rend leur utilisation délicate et coûteuse.

Les systèmes de biopuces basés sur la résonance de plasmon de surface quand à eux, ne sont pas limités par le marquage. Ils permettent de détecter l'indice de réfraction couplé à l'épaisseur du milieu directement en contact avec la surface de la biopuce, et ce sur quelques centaines de nanomètres. Cette caractéristique les rends intéressants pour l'étude de systèmes biologiques de surfaces, telles que des protéines membranaires, jusqu'ici difficilement accessibles à la fluorescence. Ce gain dans le domaine axial se perd au niveau latéral, et la densité d'une biopuce à résonance de plasmon de surface est beaucoup plus faible que celle d'une biopuce à fluorescence. La résonance de plasmon de surface permet également d'adresser de multiples dimensions, comme le domaine spectral (il est possible de remonter indirectement au spectre d'absorption de couches nanométriques), ou bien le domaine temporel, avec des capacités de capture du signal en temps-réel.

Nous avons également passé en revue quelques systèmes de caractérisation d'échantillon anisotropes. L'ellipsomètre est un outil primordial en science des matériaux, mais l'aspect « point par point » de la mesure le rend difficilement utilisable pour des caractérisations dynamiques. La microscopie à lumière polarisée permet de déterminer de manière

simple et efficace la biréfringence d'un objet, mais la méthode est trop qualitative et réservée aux objets épais, ce qui n'est pas compatible avec l'observation de phénomènes liés à des surfaces.

Nous recherchons donc une solution plus proche dans la philosophie à la technique de mesure de l'anisotropie de fluorescence.

L'objectif est d'améliorer les dispositifs de mesures par résonance de plasmon de surface dont nous disposons, afin d'être capable de mesurer l'anisotropie de couches minces déposées à la surface du capteur. Le système serait donc capable de mesurer une réflectivité R(x,y,j, l, P), où P représente la dimension polarimétrique permettant de remonter à l'anisotropie du matériau, ou à un paramètre d'ordre quantifiant l'orientation de la couche. Cette technique devra se passer de marqueurs, et la mesure devra pouvoir s'effectuer en « temps-réel », c'est à dire à une cadence compatible avec la dynamique du phénomène à observer. La solution que nous avons développé est détaillée dans le chapitre suivant.

2

L'imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface

Sommaire

Introduction **46**
2.1 Réflectivité d'un assemblage de couches isotropes **48**
2.1.1 Modèle de Rouard étendu 48
2.1.2 Configuration de Kretschmann 51
2.1.3 Validité du modèle 52
2.2 Généralisation au cas anisotrope **54**
2.2.1 Indices effectifs dans un milieu uniaxe 55
2.2.1.1 Variations angulaires zénithales (θ) : 57
2.2.1.2 Variations angulaires azimutales (ϕ) : 57
2.2.2 Anisotropie d'une monocouche d'ADN 58
2.2.3 Calcul de réflectivité différentielle 60
2.3 Montage expérimental **61**
2.3.1 Source lumineuse 63
2.3.2 Système de collimation et de polarisation 64
2.3.3 Miroir motorisé et système afocal 65
2.3.4 Pyramide 66
2.3.4.1 Déformations induites par la pyramide 67
2.3.5 Caméra CCD 68
2.3.6 Système de fluidique 68
2.3.7 Logiciel de pilotage 70
2.3.8 Illumination des deux bras 71
2.3.9 Synchronisation temporelle des caméras 72
2.3.10 Châssis mécanique 74
2.4 Validation du système **76**
2.4.1 Rapport signal à bruit 76
2.4.2 Linéarité de la réponse 79
Conclusion **81**

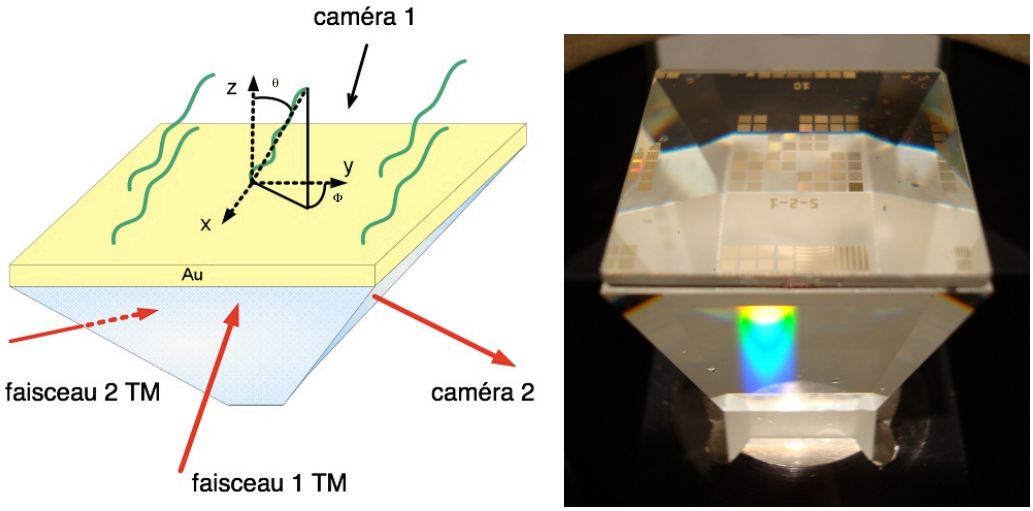
Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédant, l'imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) offre un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres systèmes de transduction. Un appareil basé sur la SPRI permet d'observer de manière dynamique et quantifiée l'interaction entre des molécules à la surface de la biopuce, et ce, sans l'utilisation de marqueurs. La mesure de l'anisotropie optique nous renseigne sur l'orientation moyenne d'un ensemble d'objets anisotropes de dimensions nanométriques, ou sur la capacité des molécules à osciller dans un plan de l'espace particulier. Cette information est capitale pour mieux comprendre la dynamique de membranes biologiques, ou de couches auto-assemblées complexes.

Ce chapitre présente le développement expérimental d'un système possédant la capacité à observer de manière dynamique l'anisotropie d'échantillons biologiques de tailles nanométriques. Il est basé sur l'imagerie par résonance de plasmon de surface. Cet appareil possède donc les avantages des systèmes à SPRI, tout en ajoutant la dimension polarimétrique à la mesure. Nous disposons donc d'une dimension supplémentaire pour caractériser la réflectivité de la biopuce. Celle-ci est représentée par le voxel d'information à 6 dimensions suivant : $\mathrm{R}\left(x, y, t, \theta, \lambda_0, \mathrm{P}\right)$. Les paramètres x et y sont les dimensions spatiales à la surface de la biopuce (imagerie), le temps t nous renseigne sur l'aspect dynamique de la mesure. L'angle θ permet de modifier les conditions de couplage, la longueur d'onde λ fait varier la profondeur de pénétration z des plasmons de surface tout modifiant également le couplage. La polarisation P, ou plutôt comme nous le verrons, la direction de propagation du faisceau TM incident, nous renseigne sur l'anisotropie de l'objet étudié.

Le système expérimental que nous avons développé se base essentiellement sur l'existant dans notre laboratoire, à savoir des systèmes d'imagerie par résonance de plasmon de surface basés sur la configuration de Kretschmann. L'idée est donc, en partant des systèmes existants tels que décrits dans le chapitre 1, et en apportant un minimum de modifications, d'obtenir un système complet capable de résoudre l'anisotropie d'un échantillon. L'astuce a donc été d'assembler deux bancs de SPRI autonomes, l'un étant orienté à 90° par rapport à l'autre, comme illustré dans la figure 26. En mesurant avec précision la différence de réflectivité entre les deux bancs de mesures, il est donc possible de remonter à l'anisotropie des molécules déposées sur la biopuce, et indirectement à l'orientation (ou au paramètre d'ordre) de la couche.

Afin de différentier notre système des appareils de SPRI « classiques », et bien marquer l'aspect anisotrope de la mesure, nous avons baptisé la méthode **P-SPRI**, pour Polarimetric Surface Plasmon Resonance Imaging. Des 6 dimensions illustrées ci-dessus, nous



(a) (b)

FIGURE 26 – (a) Pyramide sur laquelle repose la biopuce et la couche de molécules anisotropes. Les molécules sont orientées dans la demi-sphère supérieure au dessus de la couche de métal, en formant un angle azimutal ϕ et zénithal ϕ. Deux faisceaux polarisés TM se réfléchissent orthogonalement sur la couche d'or. La configuration de Kretschmann est utilisée, avec une pyramide au lieu d'un prisme. (b) photographie du prisme de verre.

éliminerons la longueur d'onde λ. En effet, un autre système basé sur la spectroscopie SPR a été développé dans le laboratoire par M. Nakkach, F. Bardin et P. Lecaruyer [53, 16], et une convergence des deux systèmes est prévue dans le futur.

La première moitié de ce chapitre est consacrée à la modélisation numérique de la P-SPRI. La section 2.1 sera dédiée à l'étude de la réflectivité d'un assemblage de couches d'épaisseurs nanométriques constitué de métaux et de diélectriques isotropes par une méthode analytique. Puis, nous généraliserons le modèle pour l'étendre au cas des diélectriques anisotropes dans la section 2.2. Dans cette section, nous déterminerons également les performances attendues d'un tel système pour détecter l'anisotropie d'une monocouche d'ADN orientée.

La seconde moitié de ce chapitre est dédiée à la mise au point expérimentale du système de P-SPRI développé durant notre travail. Les différents composants optiques et mécaniques sont détaillés dans la section 2.3, avec un focus porté sur les particularités de notre système. La section 2.4 quand à elle présente les performances réelles, la résolution et la stabilité d'un tel système pour le cas de la mesure d'échantillons isotropes. La mesure sur des échantillons anisotropes sera traitée en détail dans le chapitre 3.

2.1 Réflectivité d'un assemblage de couches isotropes

2.1.1 Modèle de Rouard étendu

L'étude de la réflectivité d'un système constitué d'un ensemble de couches parallèles est central au développement et à l'optimisation des performances de tout système basé sur la résonance de plasmon de surface. En effet, l'onde électromagnétique incidente doit traverser plusieurs interfaces successives, tout d'abord en tant qu'onde incidente, puis en tant qu'onde réfléchie. Une biopuce à SPR typique est de fait assimilable à un multicouche de matériaux diélectriques ou de métaux, tel que représenté dans la figure 27.

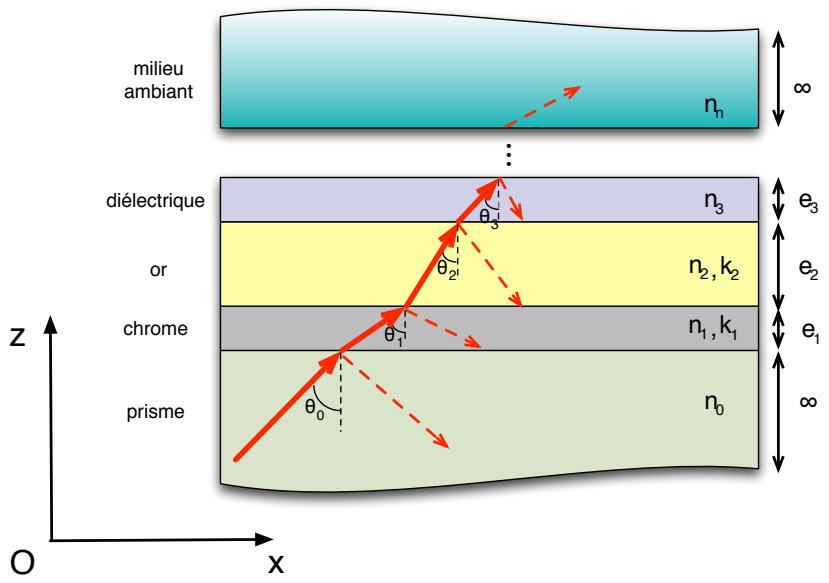


FIGURE 27 – Représentation d'un multicouche dans la configuration de Kretschmann. L'onde plane incidente par le bas forme un angle θ_0 avec la normale au multicouche. Le franchissement de chaque interface donne lieu à une réflexion partielle et une transmission réfractée. Chaque couche k possède un indice de réfraction (n_k, k_k) ($k = 0$ pour les diélectriques) et une épaisseur e_k. Le prisme et le milieu ambiant ont des épaisseurs infinies.

Dans un tel système à n couches, la couche k possède une épaisseur e_k et un indice n_k pour les diélectriques, ou un indice complexe $\tilde{n}_k = n_k + ik_k$ pour les métaux. La première (couche 0) et la dernière couche (couche n) possèdent toutes deux une épaisseur infinie, et l'on considère que les interfaces sont parfaitement parallèles entre-elles et alignées avec l'axe (Ox). Dans la configuration de Kretschmann, la première couche est constituée du prisme de verre sur lequel est déposée une couche d'accroche de chrome ou de titane, puis d'une couche d'or. Par auto-assemblage, il est possible de faire croître sur la couche d'or

des thiols par exemple, pour ensuite construire une « matrice » moléculaire capable de retenir sélectivement les molécules à analyser. Finalement le milieu ambiant est le tampon dans lequel circule les analytes.

Une onde électromagnétique incidente au multicouche se propage suivant un angle θ_0 avec la normale à l'interface entre la couche 0 et la couche 1. Une partie de l'onde sera réfractée dans la couche 1, et une partie sera réfléchie. La partie réfractée aura un angle d'incidence θ_1 avec l'interface entre la couche 1 et la couche 2, et ainsi de suite. A chaque traversée d'interface, une partie de l'onde est réfléchie, et une partie est transmise à la couche supérieure. Une fois arrivée dans la dernière couche, l'onde est finalement totalement absorbée dans le milieu d'épaisseur infinie.

En nous appuyant sur la relation de Snell-Descartes, il est possible de calculer l'angle d'incidence θ_k pour chaque couche k du système. Cette relation est également valable pour des couches absorbantes, et donc pour n_k complexe [47] :

$$n_0 \sin\theta_0 = n_1 \sin\theta_1 = \cdots = n_k \sin\theta_k \tag{18}$$

Soit $\theta_k = (n_0/n_k)\sin^{-1}\theta_0$.

Afin de calculer la réflectivité de l'ensemble du multicouche, nous devons au préalable calculer le coefficient de réflexion inhérent à chaque couche du système. Pour cela, nous pouvons nous baser sur la continuité des composantes tangentielles du champs électrique à l'interface entre deux couches. Pour chacune des polarisation TM (p) et TE (s) du champ, nous pouvons obtenir les coefficients de Fresnel en réflexion correspondant au passage entre la couche $k-1$ et la couche k :

$$r^s_{(k-1)-k} = \frac{n_{k-1}\cos\theta_{k-1} - n_k\cos\theta_k}{n_{k-1}\cos\theta_{k-1} + n_k\cos\theta_k} \tag{19}$$

$$r^p_{(k-1)-k} = \frac{n_{k-1}\cos\theta_k - n_k\cos\theta_{k-1}}{n_{k-1}\cos\theta_k + n_k\cos\theta_{k-1}} \tag{20}$$

De la même façon, les coefficients de Fresnel en transmission sont donnés par :

$$t^s_{(k-1)-k} = \frac{2n_{k-1}\cos\theta_{k-1}}{n_{k-1}\cos\theta_{k-1} + n_k\cos\theta_k} \tag{21}$$

$$t^p_{(k-1)-k} = \frac{2n_{k-1}\cos\theta_{k-1}}{n_{k-1}\cos\theta_k + n_k\cos\theta_{k-1}} \tag{22}$$

Une fois le coefficient en réflexion et en transmission calculé, nous pouvons procéder

à une sommation des réflexions et des transmissions pour déterminer la réflexion totale d'une couche à partir de toutes les couches supérieures. Cette méthode à été développée par Rouard [72] pour des matériaux diélectriques, puis fut explicitement étendue à des matériaux absorbants [47]. Pour illustrer notre propos, nous allons nous intéresser à la réflectivité d'un système à 3 couches, comme illustré dans la figure 28. La réflexion totale de la couche 2 est obtenue comme suit :

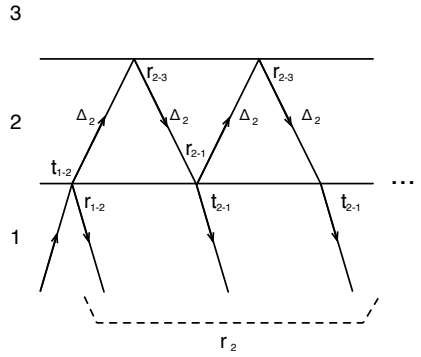


FIGURE 28 – réflexions et transmissions partielles d'une onde traversant une couche.

$$\begin{aligned} r_2 &= r_{1-2} \quad + t_{1-2}e^{-i\Delta_2}r_{2-3}e^{-i\Delta_2}t_{2-1} \\ &\qquad + t_{1-2}e^{-i\Delta_2}r_{2-3}e^{-i\Delta_2}r_{2-1}e^{-i\Delta_2}r_{2-3}e^{-i\Delta_2}t_{2-1} \\ &\qquad + \cdots \\ &= r_{1-2} \quad + \frac{t_{1-2}r_{2-3}t_{2-1}\exp(-2i\Delta_2)}{1-r_{2-1}r_{2-3}\exp(-2i\Delta_2)} \end{aligned} \tag{23}$$

Il est possible de simplifier cette expression en impliquant les réflexions des couches supérieures et en utilisant la relation $t_{1-2}t_{2-1} = 1 - r_{1-2}^2$. En généralisant, l'amplitude de la réflexion d'une couche k devient :

$$r_k = \frac{r_{(k-1)-k} \quad + \quad r_{k+1}\exp\left(-2i\Delta_k\right)}{1 \quad + \quad r_{(k-1)-k}\, r_{k+1}\, \exp\left(-2i\Delta_k\right)} \tag{24}$$

Dans cette équation, le facteur Δ_k correspond au changement de phase induit par la traversée de la couche k par l'onde électromagnétique, et on peut définir l'épaisseur de phase comme le chemin optique emprunté dans la couche. Elle est définie comme suit :

$$\Delta_k = \frac{2\pi}{\lambda_0} n_k e_k \cos\theta_k \tag{25}$$

Où e_k est l'épaisseur, θ_k l'angle d'incidence, et n_k l'indice de la couche k.

Il advient de l'équation (24) que le calcul de l'amplitude de réflexion d'une couche dépend de l'amplitude de réflexion de la couche supérieure. Il s'agit d'un calcul récursif, où l'on démarre par la couche la plus éloignée du substrat pour descendre de couche en couche, jusqu'à obtenir l'amplitude en réflexion de la première couche.

Finalement, la réflectance R du multicouche est calculée comme suit :

$$\mathrm{R} = (r_1)^2 = r_1 r_1^* \tag{26}$$

Ce calcul de la réflectance est valable quelle que soit la polarisation, à partir du moment ou le bon coefficient de Fresnel est choisi. De plus, il est valable pour un nombre quelconque de couches, d'indices réels ou complexes.

2.1.2 Configuration de Kretschmann

Jusqu'a présent, le milieu d'incidence était considéré comme étant le substrat de verre. Afin que ce modèle soit exploitable de manière pratique avec un système basé sur la configuration de Kretschmann (voir figure 29), il faut corriger les réflectances TM et TE par un facteur correspondant aux réflexions partielles sur les faces d'entrée et de sortie du prisme.

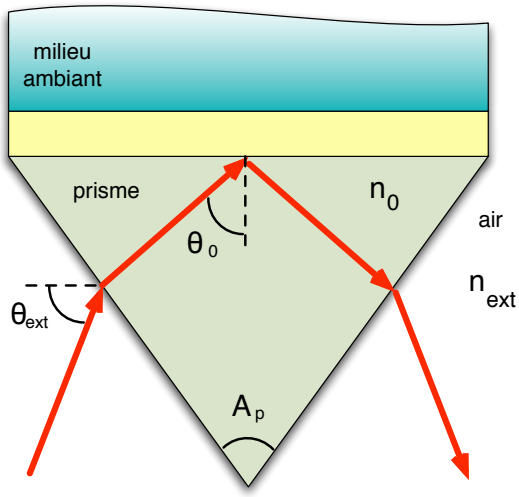


FIGURE 29 – Configuration de Kretschmann. L'onde plane incidente possède un angle de rasance externe θ_{ext}

Afin de rendre compte de l'angle d'incidence de la lumière à l'extérieur du prisme, nous utilisons l'angle externe rasant θ_{ext} (indiqué dans la figure 29). La conversion entre

l'angle externe rasant (en degrés) et l'angle interne au prisme (θ_0 en radians) s'obtient en considérant A_p l'angle au sommet du prisme (en radians) :

$$\theta_0 = \left(\frac{\pi - A_p}{2}\right) - \sin^{-1}\left(\frac{1}{n_0}\sin\left(\theta_{ext} \times \frac{\pi}{180} - \frac{A_p}{2}\right)\right) \tag{27}$$

Dans les systèmes expérimentaux utilisés dans notre laboratoire, l'angle au sommet est généralement de 60° (prisme) ou 32° (pyramide). Ce dernier a été calculé dans la thèse d'E. Maillart [46] de manière à minimiser les aberrations chromatiques engendrées par l'imagerie à travers la pyramide.

Le facteur de correction est déterminé grâce aux coefficients de transmission de Fresnel des interfaces air/prisme et prisme/air. Pour chaque interface :

$$t_{prisme} = \begin{cases} 1 - \left(\frac{\cos\theta_0 - n_0\cos\theta_T}{\cos\theta_0 + n_0\cos\theta_T}\right)^2 & \text{, TE} \\ 1 - \left(\frac{\cos\theta_T - n_0\cos\theta_0}{\cos\theta_T + n_0\cos\theta_0}\right)^2 & \text{, TM} \end{cases} \tag{28}$$

Avec $\theta_T = \sin^{-1}\left(\frac{1}{n_0}\sin\theta_0\right)$.

La traversée des deux interfaces se calcule en passant la transmission d'une interface au carré. On obtient le coefficient de correction suivant :

$$C = (t_{prisme})^2 \tag{29}$$

Finalement, la réflectance totale peut être exprimée comme suit :

$$R' = R \times C \tag{30}$$

C'est cette réflectance R' qui est mesurée par un système à SPR. Nous avons développé dans le cadre de notre travail, et sur la base des travaux de P. Lecaruyer [47], un programme basé sur **Igor Pro** capable de calculer la réflectance TE et TM de multicouches quelconques. Ce programme est à l'origine des simulations présentées tout au long du chapitre 1.

2.1.3 Validité du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle exposé précédemment, nous avons effectué un balayage angulaire à l'aide du montage monocapteur décrit dans la section 1.2.6.1 sur une lame d'or de référence. Cette lame est constituée d'une première couche de verre BK7 ($n \approx 1,515$), puis d'une couche de chrome (1 nm), et enfin d'une couche d'or de 50 nm. Ces épaisseurs sont les consignes de dépôt données au fournisseur (**Schott**). La lame

est placée sur un prisme de BK7 (d'angle au sommet 60°) à l'aide d'une goutte d'huile d'indice, puis recouverte d'une cuve de fluidique remplie d'eau ($n \approx 1,332$). La longueur d'onde d'illumination est celle du laser Hélium-Néon, soit $632,8$ nm. Nous avons réalisé un balayage simulé identique, grâce au programme développé dans le cadre de cette thèse, en utilisant les valeurs d'indices de réfraction de l'or et du chrome telles qu'indiquées dans la table 5.

n Cr	**k Cr**	**épaisseur Cr (nm)**	**n Au**	**k Au**	**épaisseur Au (nm)**
3,1	3,3	1,1	0,22	3,51	47,8

TABLE 5 – Paramètres de calcul ajustés pour l'or et le chrome.

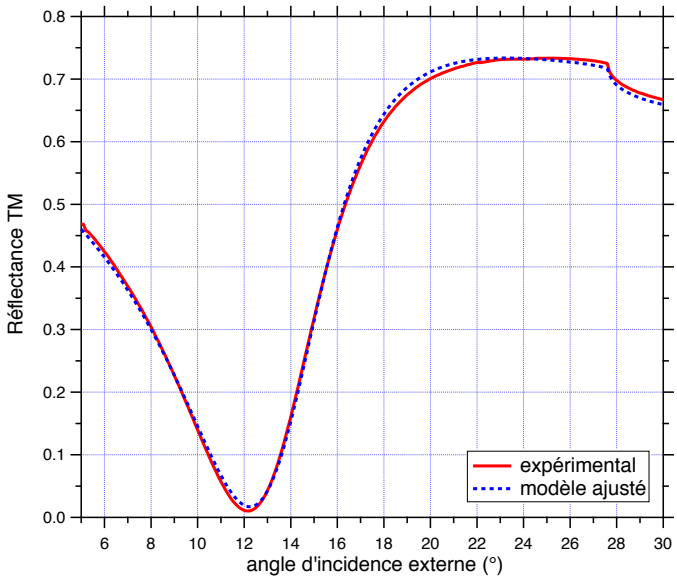


FIGURE 30 – Comparaison entre la mesure expérimentale d'un plasmon angulaire et le modèle de Rouard étendu.

Les résultats de la comparaison entre le modèle et les données expérimentales sont illustrés dans la figure 30. Les épaisseurs et l'indice de l'or ont été obtenues par ajustement numérique du modèle sur les données. Nous observons un très bon accord entre les consignes d'épaisseur données au constructeur et les valeurs obtenues par ajustement du modèle. L'indice de réfraction et l'épaisseur sont deux grandeurs couplées, il est donc important d'ajuster en deux passes : la première passe détermine de manière assez grossière les épaisseurs d'or et de chrome en conservant les indices des métaux fixes ; la seconde passe calcule de manière plus fine les épaisseurs, en ajustant également l'indice de l'or.

La possibilité de calculer les épaisseurs à partir du modèle théorique illustre le fait que le modèle de Rouard étendu est bien adapté pour simuler la résonance plasmon d'un système multicouche tel qu'une lame d'or et ce malgré le couplage indice de réfraction / épaisseur.

2.2 Généralisation au cas anisotrope

Notre système expérimental doit être capable de caractériser de manière dynamique l'anisotropie d'un échantillon biologique. Afin de déterminer les caractéristiques d'un tel système, il est important de pouvoir simuler un tel échantillon. Le modèle de Rouard étendu tel que présenté ne peut s'appliquer directement au cas anisotrope. En effet, dans le modèle de Rouard étendu, il n'existe qu'une seule réfraction et une seule réflexion pour un rayon incident à une interface. Pour traiter le cas où le matériau est biréfringent, il faudrait déterminer le vecteur d'onde de deux rayons transmis et deux rayons réfléchis. Le calcul analytique, bien que possible, risque d'être assez lourd.

Une méthode basée sur des matrices 4×4, a été développée par F. Abelès [73] pour le cas isotrope, reprise et étendue aux couches anisotropes et électro-optiques par P. Yeh [74, 75]. Le principe est qu'une couche d'un matériau quelconque peut être caractérisé par un tenseur de constantes diélectriques $\boldsymbol{\varepsilon_{mat}}$, une matrice caractéristique $\boldsymbol{\Delta}$, et une matrice de propagation $\mathbf{P}$.

La constante diélectrique du matériau est, dans le cas d'un matériau non magnétique, un tenseur de rang 2. La matrice caractéristique de la couche est définie par la conservation des composantes tangentielles des champs aux interfaces, et la matrice de propagation est une matrice diagonale contenant le déphasage subit en traversant la couche. La fonction de transfert $\mathbf{T}$ du multicouche, à savoir la matrice équivalente à l'ensemble du système décrivant la propagation d'un onde plane est définie comme suit :

$$\mathbf{T} = \prod_{k=0}^{n} \boldsymbol{\Delta}^{-1}(k-1) \times \boldsymbol{\Delta}(k) \times \mathbf{P}(k) \tag{31}$$

La sommation des ondes partielles réfléchies et transmises dans la méthode de Rouard étendue est donc remplacée par un produit de matrices. La difficulté ici est de correctement définir la matrice $\boldsymbol{\Delta}$ pour chaque couche. Cette matrice prend généralement la forme d'une matrice 4×4 [76], car décrivant deux ondes réfractées et deux ondes transmises. Il est à noter qu'il est possible d'utiliser des matrices 2×2, mais au prix d'une complexité plus grande des expressions [77].

De tels algorithmes, quoique très puissants car très généraux, sont aussi complexes à implémenter et sortiraient du cadre de notre travail. La méthode de Yeh pose également

de nombreux problèmes pratiques, car les matrices deviennent singulières si l'une des couches est isotrope [78]. Dans un grand nombre de cas, le problème se simplifie d'une façon ou d'une autre. Par exemple, si le milieu d'incidence est isotrope, les expressions se simplifient grandement, et il est possible de revenir à un traitement analytique de la réflectance [79]. Dans de nombreux cas, notamment celui des couches minces d'origine biologique, le système anisotrope à étudier est uniaxe. Dans ce cas, il devient possible de projeter le vecteur d'onde suivant ses composantes ordinaire (k_o) et extraordinaire (k_e), rendant possible une approche analytique [80]. Il est également possible dans ce cas d'utiliser la méthode matricielle, mais en découplant les polarisations [81].

Pour modéliser la mesure du système de P-SPRI, il n'est en fait pas nécessaire de passer par le calcul de la réflectivité d'un multicouche anisotrope. Le fait que le système fasse deux mesures distinctes, suivant deux axes orthogonaux, couplé au fait que la couche anisotrope soit dans nos mesures la dernière couche de la pile, simplifient notre problème. Nous pouvons nous contenter de calculer l'indice effectif isotrope mesuré par chaque bras de SPRI, à savoir l'indice de réfraction tel que « vu » par le plasmon de surface se propageant dans une direction ou l'autre de la surface. la différence des deux indices effectifs donne alors une mesure de l'anisotropie de la couche.

Nous allons donc calculer les indices effectifs d'un matériau uniaxe dans la section suivante.

2.2.1 Indices effectifs dans un milieu uniaxe

Un matériau uniaxe possède deux indices de réfraction, dits ordinaire ($n_o = \sqrt{\varepsilon_o}$) et extraordinaire ($n_e = \sqrt{\varepsilon_e}$). L'ellipsoïde des indices résultante, orientée de manière quelconque par rapport au plan (xy) défini par le multicouche dans le repère du laboratoire (x, y, z), est illustrée dans la figure 31.

Dans le système de coordonnées sphériques (ρ, θ, ϕ), l'indice extraordinaire est aligné avec l'axe ρ, et le tenseur des permittivités diélectriques $\boldsymbol{\varepsilon_{mat}}$ est diagonal :

$$\boldsymbol{\varepsilon_{mat}} = \begin{bmatrix} \varepsilon_e & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_o & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_o \end{bmatrix}_{(\rho,\theta,\phi)} \tag{32}$$

Nous devons passer du système de coordonnées sphériques, au système de coordonnées cartésiennes du multicouche, afin de pouvoir exprimer les constantes diélectriques du

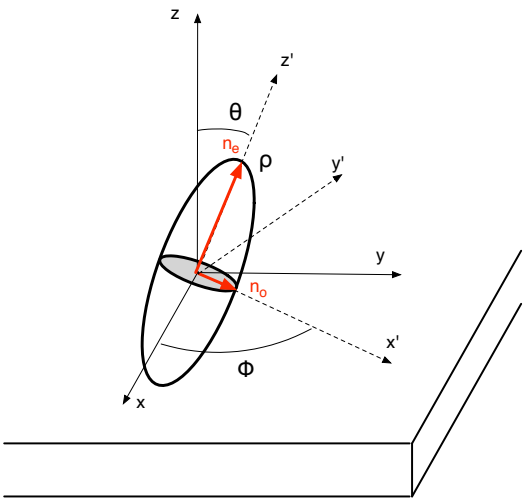


FIGURE 31 – Ellipsoïde des indices d'un matériau uniaxe.

matériau en fonction des angles θ et ϕ. Le passage s'effectue grâce à la relation suivante :

$$\boldsymbol{\varepsilon_{mat}}_{(x,y,z)} = \mathbf{T}\boldsymbol{\varepsilon_{mat}}_{(\rho,\theta,\phi)}\mathbf{T}^{-1} \tag{33}$$

Avec $\mathbf{T}$, la matrice de passage entre les coordonnées sphériques (ρ, θ, ϕ) et cartésiennes (x, y, z) :

$$\mathbf{T} = \begin{bmatrix} \sin\theta\cos\phi & \cos\theta\cos\phi & -\sin\phi \\ \sin\theta\sin\phi & \cos\theta\sin\phi & \cos\phi \\ \cos\theta & -\sin\theta & 0 \end{bmatrix} \tag{34}$$

On obtient $\boldsymbol{\varepsilon_{mat}}$ exprimé dans le repère du laboratoire (x, y, z) :

$$\boldsymbol{\varepsilon_{mat}}_{(x,y,z)} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{xx} & \varepsilon_{xy} & \varepsilon_{xz} \\ \varepsilon_{yx} & \varepsilon_{yy} & \varepsilon_{yz} \\ \varepsilon_{zx} & \varepsilon_{zy} & \varepsilon_{zz} \end{bmatrix} \tag{35}$$

Nous ne retiendrons que les valeurs des éléments diagonaux pour le calcul, soit :

$$\begin{cases} \varepsilon_{xx} = \left(\cos^2\phi\sin^2\theta\right)\varepsilon_e + \left(\cos^2\theta + \sin^2\theta\sin^2\phi\right)\varepsilon_o \\ \varepsilon_{yy} = \left(\sin^2\theta\sin^2\phi\right)\varepsilon_e + \left(\cos^2\theta + \cos^2\phi\sin^2\theta\right)\varepsilon_o \\ \varepsilon_{zz} = \cos^2\theta\,\varepsilon_e + \sin^2\theta\,\varepsilon_o \end{cases} \tag{36}$$

Les indices effectifs $\mathrm{N}_x = \sqrt{\varepsilon_{xx}}$ et $\mathrm{N}_y = \sqrt{\varepsilon_{yy}}$ vont nous permettre de calculer l'anisotropie effective, telle que mesurée par l'appareil de P-SPRI. Celui-ci mesure la réflectivité de la surface, suivant les axes x et y. Cette réflectivité est proportionnelle à l'indice effectif dans la direction de propagation du plasmon, comme donné par les équations de Fresnel

du paragraphe 2.1. On obtient donc la relation :

$$\begin{cases} \mathrm{R}_x & \propto \mathrm{N}_x \\ \mathrm{R}_y & \propto \mathrm{N}_y \\ \Delta\mathrm{R} & = \mathrm{R}_x - \mathrm{R}_y \quad \propto \Delta\mathrm{N} = \mathrm{N}_x - \mathrm{N}_y \end{cases} \tag{37}$$

Ainsi, l'anisotropie effective est donnée par :

$$\Delta\mathrm{N} = \sqrt{\varepsilon_{xx}} - \sqrt{\varepsilon_{yy}} \tag{38}$$

2.2.1.1 Variations angulaires zénithales (θ) :

Pour les valeurs extrêmes d'excursion angulaire, nous obtenons :

- Pour $\theta = 0$, $\Delta\mathrm{N} = 0$;
- Pour $\theta = \pi/2$ et $\phi = 0$, $\Delta\mathrm{N} = n_e - n_o$;
- Pour $\theta = \pi/2$ et $\phi = \pi/2$, $\Delta\mathrm{N} = n_o - n_e$.

Dans le cas d'une faible variation angulaire par rapport à la normale à la couche ($\theta = 0$), il est aisé de d'exprimer l'anisotropie effective en fonction de l'angle θ grâce à un développement limité d'ordre 2 autour de 0 de $\Delta\mathrm{N}$:

$$\Delta\mathrm{N}_{(\theta\approx 0)} \approx \cos 2\phi \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_o)}{2n_o}\theta^2 + \mathrm{O}\left(\theta^3\right) \tag{39}$$

Cette expression nous indique que, pour de faibles variations de l'angle θ autour de la normale au plan, l'anisotropie effective est directement proportionnelle au carré de l'angle.

2.2.1.2 Variations angulaires azimutales (ϕ) :

Pour de faibles variations angulaires par rapport à l'axe x ($\phi = 0$), le développement limité est moins simple, aussi nous nous limiterons à l'ordre 1 :

$$\Delta\mathrm{N}_{(\phi\approx 0)} \approx \sqrt{\varepsilon_e \sin^2\theta + \varepsilon_o \cos^2\theta} - n_o + \mathrm{O}\left(\theta^2\right) \tag{40}$$

Afin d'apporter une dimension plus concrète à notre calcul, nous allons partir du principe que l'échantillon à mesurer est constitué d'une monocouche d'ADN orientée dans une direction de l'espace. Commençons tout d'abord pas déterminer les indices de réfraction de cette monocouche.

2.2.2 Anisotropie d'une monocouche d'ADN

La molécule d'ADN, comme tout polymère, possède une anisotropie intrinsèque assez importante. En effet, et en simplifiant à l'extrême, on peut considérer une molécule d'ADN comme une « pile de pièces » (voir figure 32-a), chaque pièce (ou paire de bases) faisant 3,4 Å d'épaisseur et environ 2,3 nm de diamètre. L'empilement des bases les unes sur les autres se fait grâce à l'alignement des cycles aromatiques présents dans chaque base. Dans ce cas la circulation de charges électroniques (électrons π) le long de l'axe z' assure une bonne stabilité thermodynamique de l'ensemble.

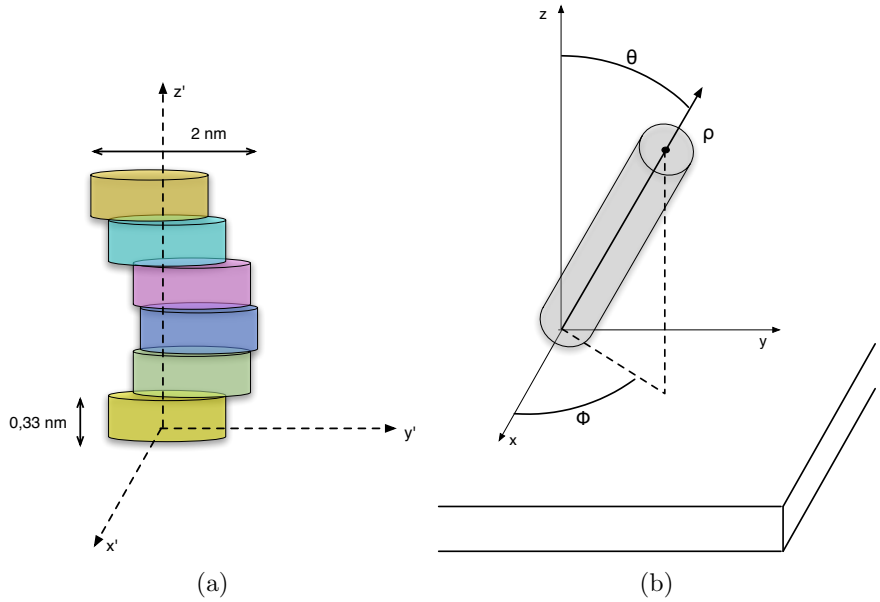


FIGURE 32 – (a) Une molécule d'ADN schématisée en un empilement de « pièces ». (b) ADN disposé en monocouche et orienté dans le repère sphérique (r, θ, ϕ)

C'est cet empilement particulier qui donne une anisotropie à la molécule. La polarisabilité électromagnétique est différente suivant que le champ électrique appliqué est parallèle à la molécule (axe z'), ou perpendiculaire à celle-ci (axes x' et y'). Cette différence implique qu'un matériau constitué principalement d'ADN orienté dans la même direction possède deux constantes diélectriques. Il s'agit donc d'un matériau uniaxe. Nous nommerons $\varepsilon_{//}$ (ou ε_e) la constante diélectrique alignée avec le grand axe de la molécule (axe z' dans notre exemple), et $\varepsilon_\perp$ (ou ε_o) la constante diélectrique perpendiculaire au grand grand axe (axes x' et y').

Il existe peu d'études portant sur l'anisotropie d'une monocouche d'ADN dans le visible, l'essentiel des appareils actuels utilisant l'absorption de l'ADN dans l'UV. Aussi,

il est difficile de trouver plusieurs sources de données pour déterminer n_e et n_o. Nous nous baserons donc sur les valeurs déterminées numériquement à 633 nm par R. Oldenbourg *et al.* [82]. Nous pouvons supposer que ces valeurs restent approximativement constantes dans le visible, car S. Elhadj *et al.* [83] ont mesuré une valeur de l'indice de réfraction « moyen » de l'ADN par ellipsométrie, qui est constant entre 400 nm et 700 nm environ. Les valeurs sont indiquées dans la table 6.

	n_{iso}	$n_{//}$	$n_{\perp}$	Δn
ADN simple brin	1,456	–	–	–
ADN double brin	1,530	1,507	1,627	-0,12

TABLE 6 – Indices de réfraction de l'ADN en monocouche.

Ces valeurs restent valables tant que la longueur de l'ADN ne dépasse pas 50 à 70 nucléotides. Au delà, l'approximation « pile de pièces » n'est plus valable du fait de l'apparition de structures secondaires à certains points de la chaîne. Dans la réalité, les applications de biopuces généralement répandues n'utilisent que des sondes possédant 20 à 30 nucléotides de long au maximum. L'approximation est donc largement valable dans la majorité des cas.

La figure 33 indique l'anisotropie effective calculée à partir des indices de réfraction effectifs N_x et N_y, et ce pour une plage angulaire de θ et ϕ de 90°.

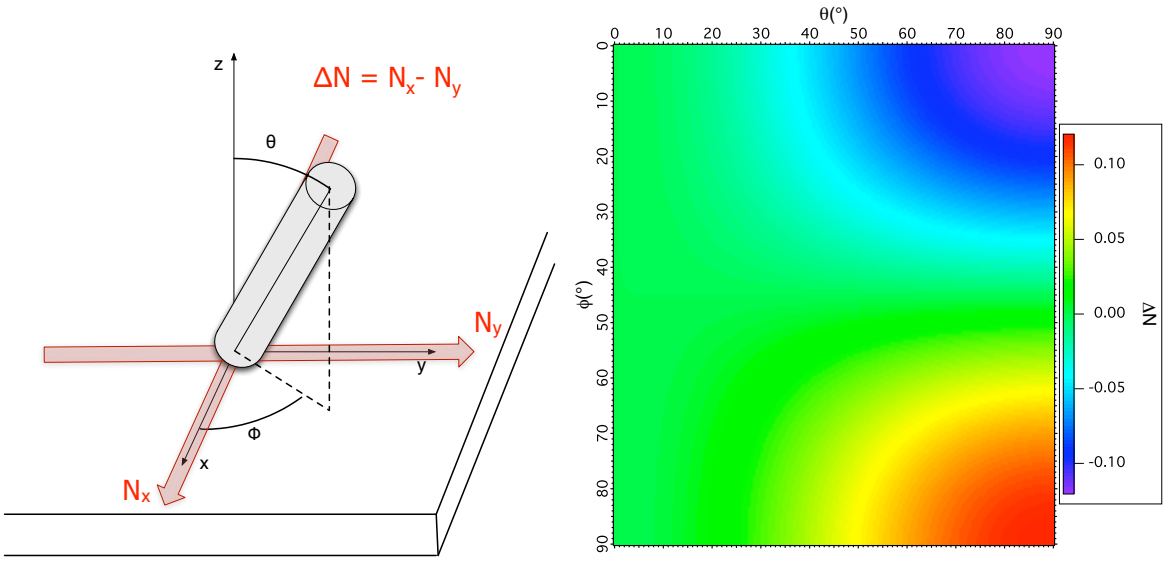


FIGURE 33 – Anisotropie effective $\Delta N = N_x - N_y$ pour une monocouche d'ADN orienté en fonction de l'angle zénithal θ et de l'angle azimutal ϕ. Pas du calcul : 0,5°(θ, ϕ)

L'anisotropie importante obtenue (de $-0,1$ à $+0,1$ environ) tiens au très fort contraste d'indice de la molécule d'ADN. Dans la réalité, cette valeur sera plus faible, car le taux de couverture d'ADN sur une surface n'est jamais de 100%. Il serait donc intéressant de comparer ces résultats avec des échantillons réels, et d'ajuster en fonction du taux de couverture. De plus, les molécules d'ADN ne sont pas toutes parfaitement alignées les unes par rapport aux autres, il existe un désordre, matérialisé par un paramètre d'ordre, qui diminue d'autant l'anisotropie de la couche.

2.2.3 Calcul de réflectivité différentielle

Les indices N_x et N_y peuvent ensuite être utilisés pour calculer la différence de réflectivité entre les deux bras du système de P-SPRI. Une première courbe de référence est calculée à $\theta = 0$ et $\phi = 0$, la réflectivité à l'angle de travail est extraite de cette courbe, puis on reproduit le calcul pour toutes les combinaisons d'angles, en soustrayant la réflectivité à l'angle de travail obtenue pour le point (θ, ϕ) à celle de référence. On obtient ainsi une nappe de réflectivité pour chaque bras du système. Finalement, les deux nappes sont soustraites entre-elles, pour obtenir la différence de réflectivité $\Delta\mathrm{R} = \mathrm{R}_x - \mathrm{R}_y$, mesurant l'anisotropie de la couche d'ADN. Les résultats sont donnés dans la figure 34.

Au regard de ces résultats, on peut dire que le système de P-SPRI est potentiellement capable de suivre l'anisotropie d'une monocouche d'ADN grâce à l'utilisation de deux bras de SPRI disposés orthogonalement. En effet, la résolution classiguement admise pour un système de SPRI classique est de l'ordre de 10^{-2}%, des différences d'orientation moyenne de quelques degrés sont donc théoriquement atteignables. Il reste néanmoins à déterminer les performances d'un tel capteur avec des anisotropies beaucoup plus faibles.

Nous pouvons déterminer les performances en divisant le graphique 34 par le graphique 33, c'est à dire en calculant la sensibilité en réflectivité ($\Delta\mathrm{R}/\Delta n$) de notre système simulé. La table 7 présente un résumé des sensibilités en réflectivités du système aux principales longueurs d'ondes. Il présente également un second calcul, ramené à une couche d'un nm d'épaisseur.

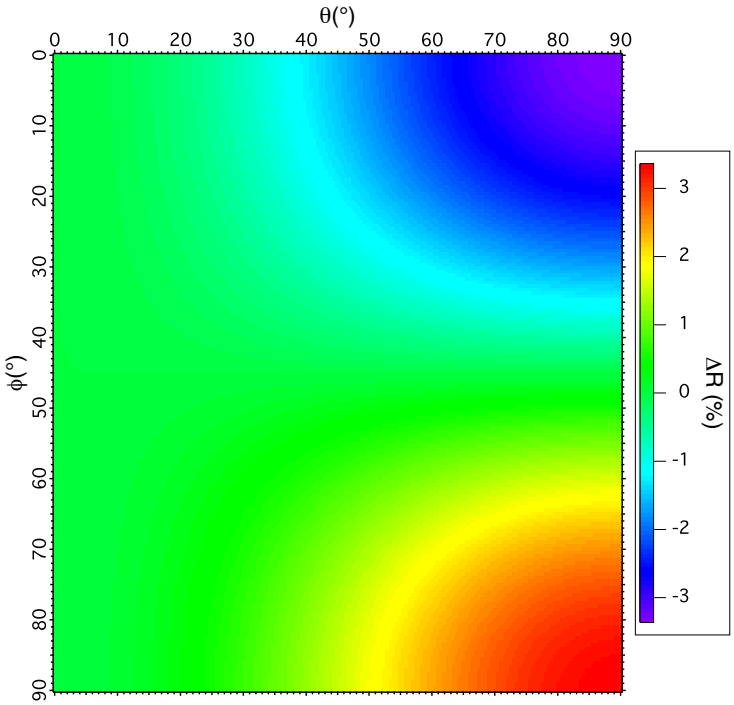


FIGURE 34 – Différence de réflectivité $\Delta R = R_x - R_y$ correspondante à une monocouche d'ADN orienté de 1 nm d'épaisseur. Pas du calcul : 0,5°(θ, ϕ), 2°(calcul de l'angle de travail pour la variation de réflectivité)

2.3 Montage expérimental

Comme nous l'avons vu en introduction de ce chapitre, le banc de P-SPRI développé dans le cadre de ce travail s'appuie en grande partie sur des composants et des techniques déjà utilisées dans notre laboratoire pour d'autres bancs de SPRI. Le montage de P-SPRI se base sur l'utilisation de deux bras de SPRI indépendants et pouvant fonctionner de manière totalement autonomes. Cela nous permet de nous affranchir d'un maximum de développement spécifiques au banc, notamment en ce qui concerne le logiciel de contrôle **Labview** du système, qui reste identique sur tous les bancs expérimentaux de notre laboratoire. L'utilisation de composants génériques permet également d'équilibrer les performances des différents bancs expérimentaux.

Notre système étant constitué de deux bras de SPRI disposés orthogonalement le long des axes x et y (voir la figure 26), nous allons commencer par décrire les principaux composants constituant un des bras, tels que décrits par la figure 35. Nous commencerons par indiquer les caractéristiques de la source de lumière (paragraphe 2.3.1), puis le système de collimation et de polarisation du faisceau (paragraphe 2.3.2). Le faisceau ainsi généré

λ_0	S_R (1 nm)	S_R (10 nm)
500 nm	2,2 %/RIU^{-1}	19,0 %/RIU^{-1}
600 nm	19,95 %/RIU^{-1}	166,1 %/RIU^{-1}
638 nm	28,41 %/RIU^{-1}	220,6 %/RIU^{-1}
670 nm	33,67 %/RIU^{-1}	271,5 %/RIU^{-1}
900 nm	35,78 %/RIU^{-1}	308,9 %/RIU^{-1}

TABLE 7 – Sensibilité maximale en réflectivité du système de P-SPRI pour deux épaisseurs d'ADN.

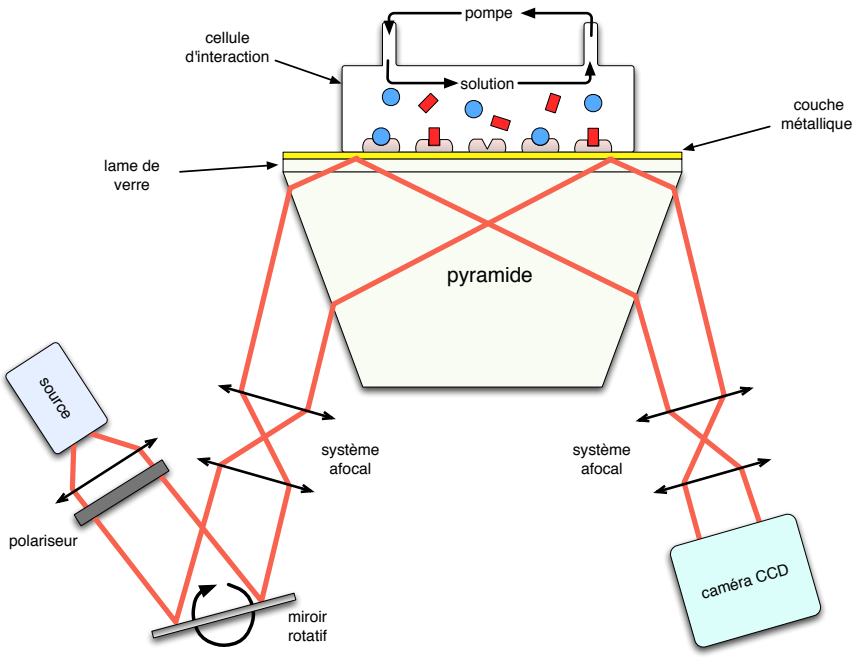


FIGURE 35 – Détails d'un des deux bras du montage de P-SPRI.

va se réfléchir sur un miroir motorisé et contrôlé par logiciel, puis traverser un système afocal, permettant ainsi d'orienter le faisceau à un angle d'incidence précis au centre de la pyramide (paragraphe 2.3.3). Le faisceau va ensuite se réfléchir sur la base d'une pyramide de verre spécialement fabriquée pour ce banc (paragraphe 2.3.4). Finalement, le faisceau réfléchi par réflexion totale atténuée (ATR) va traverser un second afocal pour permettre à la surface de la biopuce d'être imagée par une caméra CCD. Nous décrirons les caractéristiques de la caméra dans le paragraphe 2.3.5. La circulation des analytes est assurée par une cellule d'interaction positionnée sur la lame d'or et par une pompe péristaltique, nous décrirons rapidement leur fonctionnement dans le paragraphe 2.3.6. Le logiciel de pilotage du banc et de capture des données sera rapidement évoqué dans le paragraphe 2.3.7.

Finalement, nous étudierons certaines spécificités du banc de P-SPRI. L'illumination

doit être la plus proche possible en termes d'intensité sur les deux bras, c'est pourquoi nous avons mis en place un coupleur par fibre optique « 1 vers 2 » afin de distribuer la lumière d'une LED vers les deux bras (paragraphe 2.3.8). Ainsi, les fluctuations lumineuses sont synchrones. Les caméras CCD des deux axes du système étant temporellement asynchrones, nous avons dû mettre en place une logique de synchronisation, qui sera abordé dans le paragraphe 2.3.9.

Le châssis mécanique a été conçu spécifiquement pour ce banc, et la géométrie utilisée n'autorise qu'une plage angulaire limitée. Nous indiquerons l'impact que cela implique sur la plage d'indices détectable dans le paragraphe 2.3.10.

2.3.1 Source lumineuse

La source lumineuse utilisée dans notre système est une diode électroluminescente (LED) émettant dans le rouge, à 670 nm. Le choix de cette longueur d'onde d'émission est guidé par un compromis à atteindre entre performances, et facilité de réglage et d'alignement. La sensibilité en réflectivité du système est croissante avec la longueur d'onde (voir table 7). Néanmoins, le gain en sensibilité devient marginal au delà de 700 nm environ. Afin de pouvoir facilement visualiser le faisceau, une valeur de 670 nm (donc dans le visible) a été choisie. De plus, la longueur de propagation du plasmon de surface (7,88 μm) à cette longueur d'onde est parfaitement compatible avec la résolution latérale de notre système d'imagerie

Contrairement à un laser, qui possède une largeur spectrale très faible, une diode électroluminescente possède une largeur à mi-hauteur assez importante. Il ne s'agit donc plus d'illumination cohérente. Le choix d'une diode possède des avantages, comme l'élimination de speckle, qui pourrait interférer avec une bonne qualité d'image. Ce choix à également un inconvénient, qui est dû au fait que la réflectivité obtenue par un tel système est convoluée à la largeur spectrale de la source. La réflectivité obtenue n'est donc pas le résultat de l'excitation du plasmon de surface à une seule longueur d'onde, mais par un intervalle de longueurs d'onde. Ce phénomène va donc diminuer la dynamique de notre système, ce qui explique que des bancs monocapteurs peuvent atteindre des minima de réflectivité à la résonance de plasmon de surface de 1 ou 2%, alors que des systèmes d'imagerie atteignent rarement moins de 10% .

Le spectre d'émission de la diode utilisée dans notre montage est indiqué dans la figure 36, comparé à celui du laser Hélium-Néon utilisé dans le montage monocapteur. Le profil d'émission est bien centré à 670 nm, et la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la diode est d'environ 25 nm.

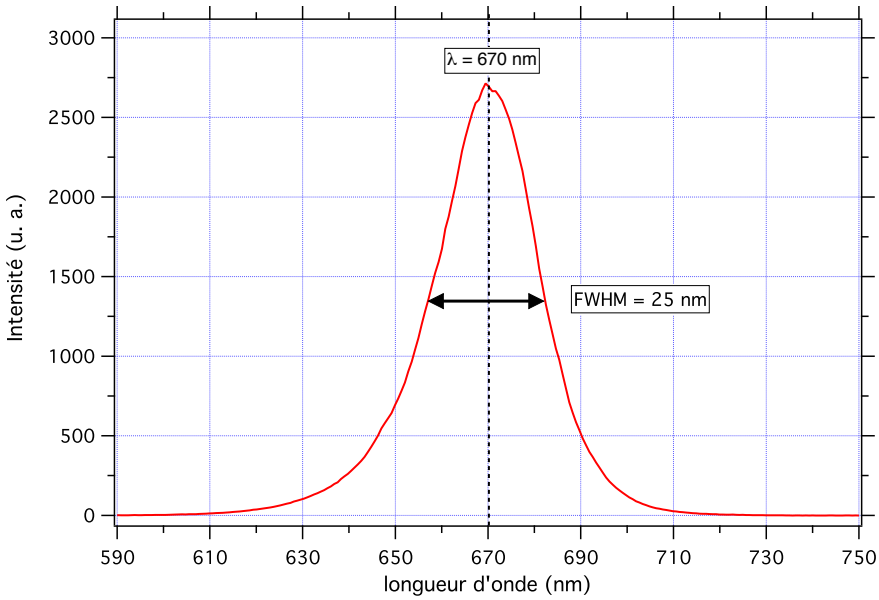


FIGURE 36 – Spectre d'émission de la source LED utilisée dans le montage P-SPRI (rouge) mesuré par un spectromètre.

Du point de vue dynamique, la diode atteint un régime d'émission stable (en courant) au bout de 25 à 30 min après allumage. Il faut donc prévoir d'allumer la diode en avance avant toute expérience.

2.3.2 Système de collimation et de polarisation

Le système de collimation permet de compenser la divergence du faisceau généré par la source de lumière, pour obtenir en sortie un faisceau parfaitement parallèle. Il est important d'avoir un faisceau correctement collimaté pour éviter d'attaquer la pyramide avec une dispersion angulaire trop importante, car il en résulterait une diminution importante de la sensibilité du banc. Le système de collimation est composé d'un ménisque convergent (F = 116.2 mm) et d'un doublet achromatique (F = 80 mm) (voir figure 37). L'ensemble est maintenu en place dans un tube de 18 mm de diamètre, soit le diamètre du faisceau en sortie.

En sortie de collimateur, le faisceau parallèle est polarisé linéairement grâce à un polariseur rotatif. C'est ce polariseur qui va permettre de sélectionner les polarisation TE ou TM du champs électromagnétique incident à la lame d'or. La rotation du polariseur se fait de manière manuelle, mais il existe au sein de notre laboratoire un système comportant des polariseurs commandés informatiquement. Une future évolution du banc comportera

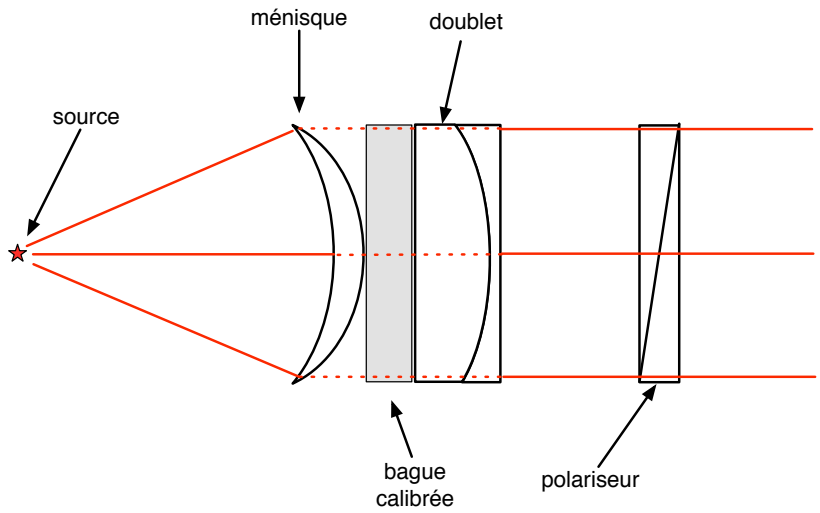


FIGURE 37 – Système de collimation et de polarisation du faisceau.

de tels polariseurs.

2.3.3 Miroir motorisé et système afocal

Le faisceau collimaté et polarisé en TE ou TM va ensuite être réfléchi par le miroir avant d'entrer dans un système afocal. Le but de cet afocal est de pouvoir conjuguer le plan du miroir avec le plan de la puce d'un part et le plan de la puce avec le plan de la caméra d'autre part.

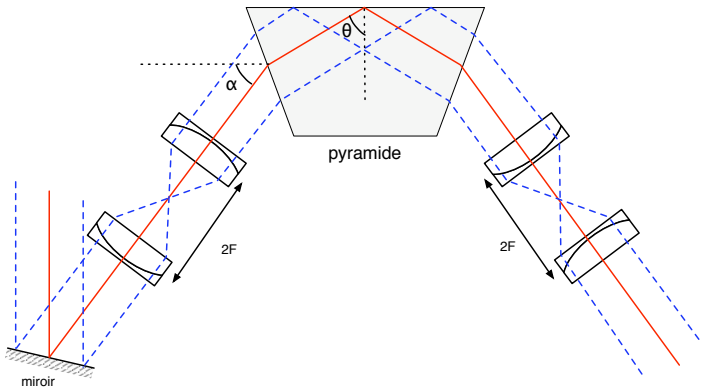


FIGURE 38 – Chemin optique à travers le système afocal et la pyramide.

L'afocal est composé de deux doublets achromatiques (F = 60 mm), disposés de manière à ce que le foyer soit situé à égale distance des deux doublets. De cette manière, un faisceau collimaté en entrée ressort collimaté, avec un angle α entre le plan horizontal et

l'axe optique de l'afocal (voir figure 38). Ces deux systèmes ont un grossissement de 1, et le diamètre des optiques est de 1 " soit $25,4$ mm.

La rotation du miroir permet donc de faire un balayage angulaire θ autour de la normale à la lame d'or. Du fait du diamètre des doublets, le balayage angulaire se trouve limité par l'ouverture numérique de la lentille. Dans notre cas (focale F = 60 mm et diamètre utile $D = 0,9 \times 25,4$ mm), l'ouverture numérique vaut $NA = D/2F = 0,19$. Il est donc possible de couvrir au maximum un angle de $\pm 11^\circ$ autour de l'axe optique (ligne rouge sur le schéma). Dans la pratique, cette valeur est fortement réduite, et le balayage atteignable avec le système est plutôt de l'ordre de $\pm 5^\circ$. Cela est dû au fait que nous imageons l'ensemble du faisceau et non pas le centre uniquement. Celui-ci change de forme pour se refermer en approchant des bords des lentilles, ce qui n'est pas souhaitable. Nous verrons plus loin qu'il est possible de changer l'angle central α mécaniquement, ce qui permet d'étendre quelque peu la plage angulaire atteignable.

Le miroir est contrôlé grâce à un moteur pas à pas de très haute résolution (512000 micro-pas sur 360°), permettant un positionnement théorique inférieur à la seconde d'arc. Il est piloté pas une interface Labview, intégrée à notre logiciel de contrôle du banc. Le miroir de chaque bras du système de P-SPRI est contrôlé indépendamment par son propre boîtier et son propre ordinateur, ce qui permet plus de souplesse d'utilisation.

2.3.4 Pyramide

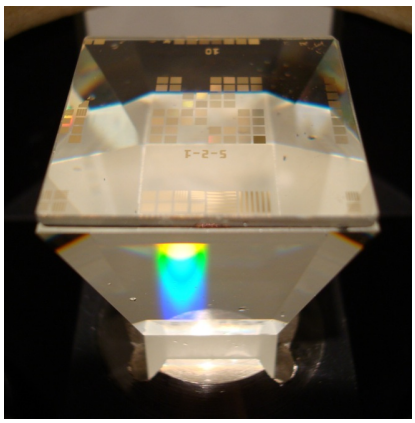


FIGURE 39 – Pyramide enchâssée dans sa monture, sur laquelle est positionnée une lamelle structurée.

Le faisceau parvient ensuite à la pyramide, à travers laquelle il est réfracté pour atteindre le centre de sa base et la lame d'or. Il s'agit d'une pyramide tronquée reposant

sur un cube de verre (voir figure 39) polie et assemblée spécialement pour ce banc. Un jeu de pyramide a été fabriqué par l'atelier d'optique de *l'Institut d'Optique Graduate School* et un autre par *Melles Griot*. L'utilisation d'une pyramide permet donc à deux faisceaux orthogonaux (sur la photo, un faisceau suivant l'axe vertical, un autre suivant l'axe horizontal) de se croiser au centre de la puce. Elle est composée de verre SF11 ($n \approx 1,775$ à 670 nm), et l'angle au sommet est de 32°. Cette valeur d'angle a été calculée par E. Maillart dans sa thèse [46] pour minimiser la dispersion chromatique induite par l'imagerie à travers la pyramide.

2.3.4.1 Déformations induites par la pyramide

Le passage à travers la pyramide implique les images formées vont subir une déformation dans une direction de l'espace. Cela implique que les pixels capturés par la caméra ne sont pas carrés, mais rectangulaires. Cette déformation est visible dans la figure 40, où un même carré d'or d'1 mm de côté est imagé par l'axe 1 (a), et par l'axe 2 (b).

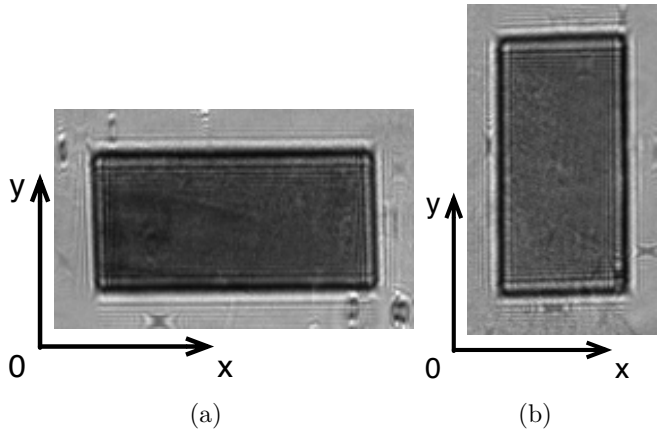


FIGURE 40 – carré d'or d'1 mm de côté imagé par le système de P-SPRI. (a) axe 1, (b) axe 2.

La déformation dépend bien sûr de l'angle d'incidence de la lumière, mais une bonne approximation au premier ordre consiste à considérer que les images de l'axe 1 sont compressées le long de l'axe y d'un facteur 2, et que les images de l'axe 2 sont compressées le long de l'axe x d'un facteur 2. Il est possible de désanamorphoser les images de manière plus fine, en tenant compte des différents angles d'incidence, il devient nécessaire de faire un recalage image par image non-linéaire, ce qui coûte en termes de temps de calcul.

2.3.5 Caméra CCD

L'image obtenue pour chaque axe en réflectivité TM est finalement imagée par une caméra CCD. Les caméras CCD utilisées sont identiques, et sont des caméras 12 bits **Cooke Pixelfly QE**. Leurs caractéristiques techniques sont détaillées dans la table 8.

Ces caméras ont une bonne qualité en termes de capacité des puits et de bruit de lecture par rapport à leur encombrement très faible et l'absence de refroidissement actif (qui est compensé au niveau logiciel sur la carte d'acquisition). Il est possible d'acquérir les images avec une cadence allant jusqu'a plusieurs images par seconde en plein résolution, ce qui est crucial pour l'acquisition des données en temps réel, où l'on moyenne 16 images 12 bits pour créer une image « 16 bits ». Nous sommes ainsi capables d'obtenir avec le programme Labview de capture des données du banc une cadence d'environ 1 image « 16 bits » toutes les 3 secondes, ce qui est largement suffisant pour bon nombres d'applications.

résolution	1392×1024
taille des pixels	$6,45 \times 6,45\,\mu\text{m}$
efficacité quantique	62% @ 500 nm ($\approx$ 30% @ 670 nm)
capacité des puits	18000 e^-
bruit de lecture	7 $e^- rms$

TABLE 8 – Caractéristiques techniques de la caméra CCD Pixelfly QE (données constructeur).

Nous verrons dans la section 2.4.1 que les différents bruits thermiques et électroniques de la caméra peuvent être négligés, et que la mesure du niveau de réflectivité n'est limitée que par le bruit de photon du système.

La taille des pixels indiquée par le constructeur n'est pas représentative des dimensions des objets imagés à travers la pyramide et les optiques. Le grossissement du système d'imagerie n'est pas précisément 1, et il est donc possible d'observer une taille des pixels quelque peu différente de celle indiquée. Par calculer la taille réelle des pixels, nous avons imagé un carré d'or d'1 mm de côté (déposé par lithographie optique, donc en supposant que les dimensions du carré soient suffisamment précises) à travers le système. La valeur mesurée, après désanamorphose est proche de $8,2 \times 8,2\,\mu\text{m}$ par pixel (incluant l'espace entre deux pixels sur la caméra).

2.3.6 Système de fluidique

Le système de fluidique est un élément primordial, permettant la bonne circulation des analytes dans la solution tampon en contact avec la surface de la biopuce. Elle est

composée de deux éléments : la cellule de fluidique elle-même, et le circuit permettant d'acheminer les produits dans la cellule.

Il existe deux principaux types de cellules dans notre laboratoire. Les cellules hexagonales en téflon sont les plus anciennes et ont été utilisées dans les principales expériences de ce travail. Un autre type de cellule circulaire en métal est utilisé sur d'autres bancs de SPRI.

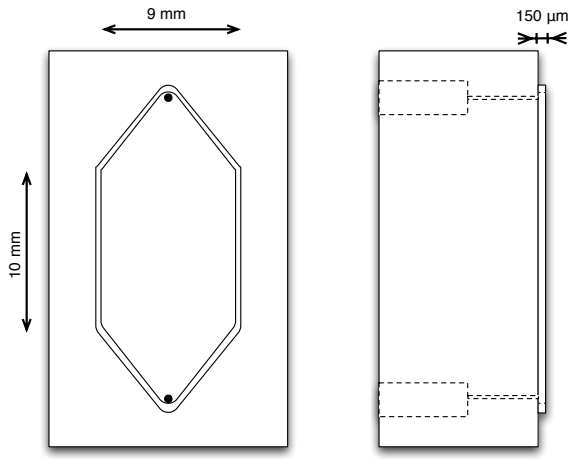


FIGURE 41 – Cellule d'interaction hexagonale vue de face et de côté.

La figure 41 illustre la géométrie d'une cellule hexagonale. Un bloc de téflon sert de support à la cuve. Les parois de celle-ci, d'une hauteur d'environ 150 µm, sont directement usinées dans le bloc. La cellule elle-même recouvre une surface d'environ 10×9 mm. Le liquide est acheminé par les canaux de fluidique percés dans le bloc, et reliés au reste du circuit par des tubes flexibles. La géométrie est choisie de manière à obtenir un flux de liquide le plus laminaire possible au centre de la cellule. L'étanchéité entre la surface de la biopuce et la cellule est assurée par pression mécanique. Une telle cellule possède un volume d'environ 15 µL.

Le second élément du système de fluidique consiste dans le circuit permettant d'acheminer le liquide et les analytes à l'intérieur de la cellule et de les faire ressortir. Le circuit consiste en un ensemble de tubes flexibles capillaires (diamètre 0,64 mm) de silicone, connectés d'un côté au tube contenant l'analyte, et de l'autre aux ports d'entrée et de sortie de la cellule de fluidique par le biais de tubes peek (plus rigides et plus fins) et d'adaptateurs. L'analyte est prélevé grâce à la rotation de la pompe péristaltique, entrainant le liquide dans le tube vers la cellule. Le liquide est ensuite évacué de la cellule par le second tube flexible puis rebouclé dans l'analyte (voir figure 42).

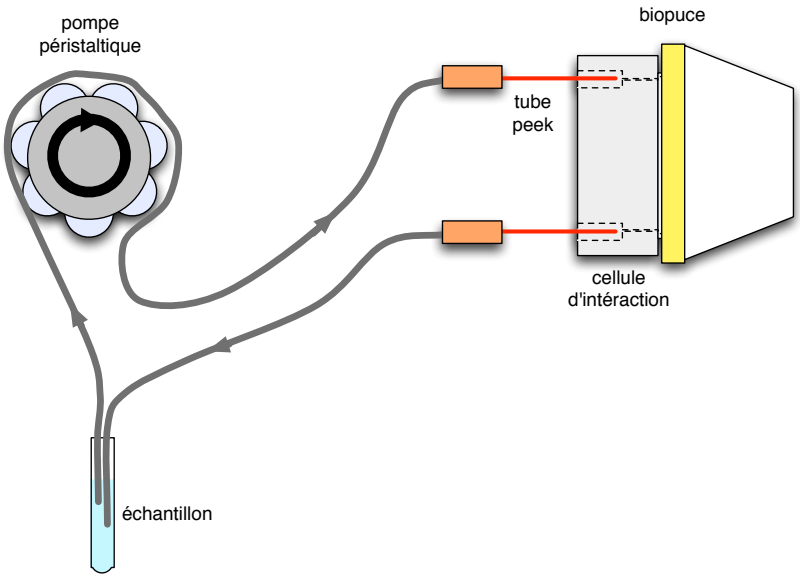


FIGURE 42 – Vue schématique du circuit de fluidique.

La pompe péristaltique permet un flux de liquide continu et sans à-coups dans la cellule. Le débit de celle-ci peut être réglé entre $0,5$ µL / min et plusieurs mL/min, une valeur usuelle dans nos expérience est d'environ 50 µL / min, débit permettant un remplissage de la cellule en moins de 30 sec.

2.3.7 Logiciel de pilotage

Pour chaque axe du système, le miroir ainsi que la caméra sont pilotés informatiquement. Comme nous avons opté pour un contrôle de chaque axe de manière autonome, nous disposons donc de deux ordinateurs et pilotage du banc. Le logiciel permettant de contrôler le miroir et la caméra est générique pour tous les bancs utilisés dans notre laboratoire, seules certains paramètres spécifiques, comme les angles centraux des miroirs, ou la synchronisation (voir paragraphe 2.3.9) ont été ajouté au programme. Le logiciel a été développé sous Labview par A. Bellemain et F. Bardin. Il permet d'effectuer aussi bien un balayage angulaire pour déterminer l'angle de travail, que des acquisitions temps réel des données à angle fixe.

Il permet un certain nombre de traitements en direct, comme la normalisation des images en TM/TE ou l'affichage d'images de différence par rapport à une image de référence. Il permet également d'observer les courbes de réflectivité en direct de certains points sélectionnés au préalable sur l'image. La figure 43 est une capture d'écran de l'interface graphique du logiciel.

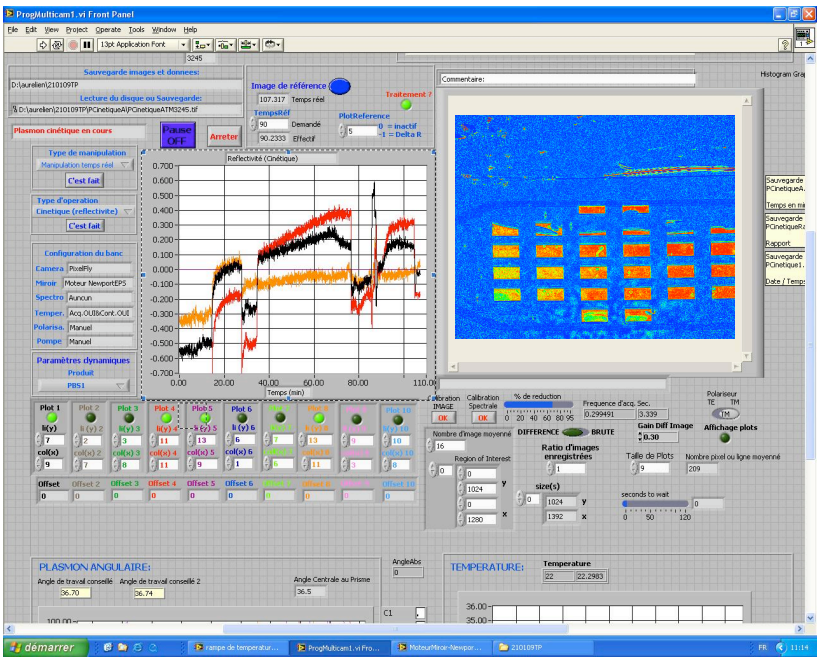


FIGURE 43 – Logiciel de pilotage du banc de P-SPRI (ici, mesure en temps-réel de la réflectivité).

Pour notre système, ce logiciel est trop simplifié. En effet, les images ne sont pas redressées, et le programme n'effectue pas de corrections par saut d'indice. Dans l'idéal, un troisième ordinateur serait nécessaire pour récupérer en temps-réel les images générées par les deux autres, plus les traiter, et enfin afficher l'anisotropie en temps-réel. Nous avons effectué quelques tests non concluants, car le volume de données à traiter et à transférer (2 images de 3 Mo toutes les 3 sec. environ) est trop important. Nous avons donc développé un outil de post-traitement des données, qui sera détaillé dans le chapitre 3.

2.3.8 Illumination des deux bras

L'utilisation de deux bras de SPRI identiques nous force à vouloir obtenir un faisceau incident indique dans les deux bras. Cela implique que les fluctuations d'intensité soient corrélées temporellement pour éviter de voir apparaître des artefacts de mesure. A l'origine, le châssis mécanique du banc avait été conçu pour recevoir deux sources de lumière indépendantes à LED. Une photodiode devait venir s'insérer dans le tube de collimation pour mesurer le flux de photon en temps réel, et permettre ainsi de compenser *a posteriori* un déséquilibre d'intensité.

Cette idée a dû être abandonnée car l'insertion de la photodiode dans le tube de collimation posait problème et insérer une lame semi-réfléchissante dans le tube était

techniquement trop complexe.

Nous avons donc opté pour une autre solution, qui consiste à utiliser un coupleur fibré « 1 vers 2 » équilibré, c'est à dire fournissant 50% de la lumière à chaque bras. Le coupleur que nous avons retenu est un coupleur multimode produit par **Sedi Fibres**, basé sur des fibres polymères (montures SMA) ayant un cœur de 200 µm de diamètre. Compte-tenu de l'ouverture numérique de la fibre (NA $= 0,37$), nous obtenons un volume modal (nombre de modes acceptables par la fibre) M $>$ 60000. Ce type de fibre est donc amplement suffisant pour une propagation multimode uniforme et une insensibilité aux fluctuations extérieures. Les pertes d'insertion des deux sorties de la fibre sont de $3,9$ dB et $3,7$ dB, ce qui est suffisamment équilibré au regard des applications. Le couplage entre la source de lumière LED et l'entrée du coupleur se fait à l'aide d'une platine de couplage consistant en un objectif de microscope (grossissement $\times 20$, NA $= 0,40$) et d'un trou agissant comme filtre spatial, comme illustré sur la figure 44.

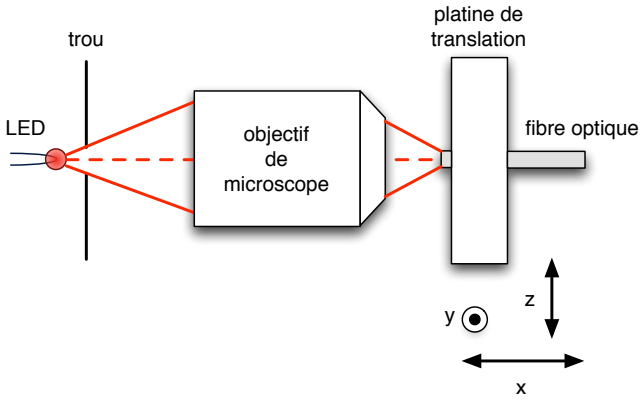


FIGURE 44 – Platine de couplage entre la LED et la fibre optique d'entrée du coupleur. Les degrés de liberté de la platine sont indiqués.

2.3.9 Synchronisation temporelle des caméras

Les deux bras de SPRI de notre système étant totalement autonomes, ils possèdent chacun leur propre ordinateur dédié au contrôle du moteur, à la capture des images et à la présentation des données. Les deux voies sont donc totalement asynchrones. Lors de la capture de données en temps-réel, il se peut qu'un décalage entre les deux caméras existent. Plus problématique, de par la conception du logiciel de contrôle des caméras, la capture se fait « le plus vite possible », c'est à dire que la cadence de capture des images est dépendante de la vitesse avec laquelle l'ordinateur est capable de traiter et stocker les images. Il en résulte un décalage temporel totalement arbitraire entre les deux ordinateurs,

rendant l'exploitation des données plus difficile (utilisation d'informations d'horodatage sur chaque image).

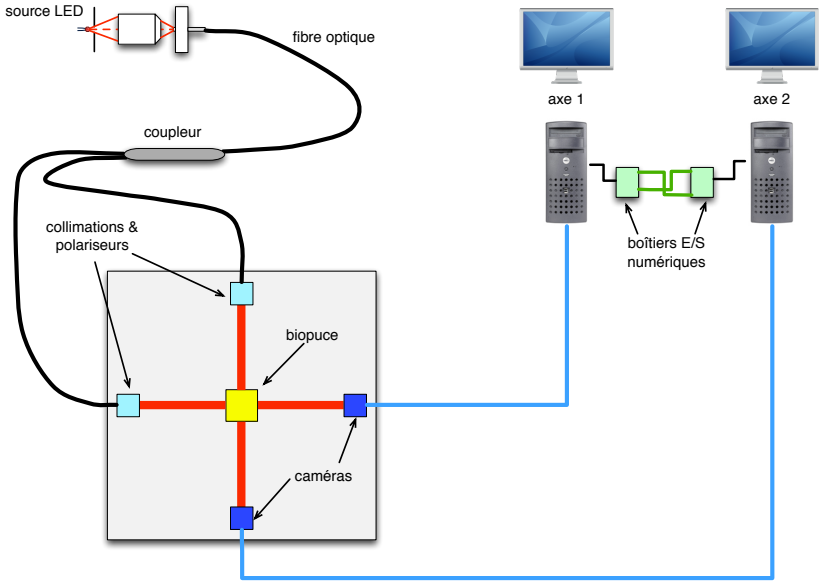


FIGURE 45 – Banc expérimental vu de dessus. Le contrôle des moteurs n'est pas indiqué pour plus de clarté du schéma.

Afin de corriger ce problème, il est possible d'effectuer une synchronisation physique des caméras en utilisant les ports « trigger » des cartes d'acquisition. Cette solution aurait demandé l'utilisation d'un boîtier spécialisé pour délivrer le signal d'horloge, et d'un ordinateur « maître »envoyant les signaux de lancement et d'arrêt des acquisitions. Nous avons préféré opter pour une solution plus simple et suffisamment précise dans notre cas, qui est de synchroniser les ordinateur eux-même. Chaque ordinateur dispose d'un boîtier d'entrées / sorties numériques, dont deux lignes logiques sont câblées. L'ordinateur 1 écoute sur la ligne 1 et émet sur la ligne 2, tandis que l'ordinateur 2 écoute sur la ligne 2 et émet sur la ligne 1. Un schémas de principe est donné dans la figure 45.

Grâce à ce câblage, lorsque le logiciel de contrôle d'un des ordinateur lance une acquisition caméra, il vérifie d'abord la présente d'un bit « haut » sur la ligne qu'il écoute, afin de déterminer si l'autre ordinateur est également prêt à lancer une acquisition. Si le bit est « bas », alors l'ordinateur attends un intervalle de temps avant de revérifier la ligne. Ce système permet de s'assurer que les deux ordinateurs lancent les captures d'images au même moment. Les captures elles-mêmes ne sont pas synchronisées entre-elles, mais comme nous travaillons sur des images moyennées, la précision obtenue est largement suffisante (inférieur à 1 image de décalage, soit environ 3 sec pour 16 images moyennées).

2.3.10 Châssis mécanique

Le châssis mécanique permet de maintenir en position tous les éléments d'optique, les caméras et les miroirs. Sa conception en 3 dimensions (voir figure 46-a), ne permet pas d'obtenir tous les degrés de libertés du montage d'optique horizontal classique. Les réglages possibles sont donc forcément limités : mise au point des caméras le long de leur axe, montée ou descente de la colonne centrale (centrage de la pyramide par rapport aux faisceau), et réglage de l'orientation des miroirs. De par son encombrement réduit (environ $60 \times 60 \times 60$ cm d'encombrement), le châssis est idéal pour permettre le transport du banc sans avoir à réaligner les optiques.

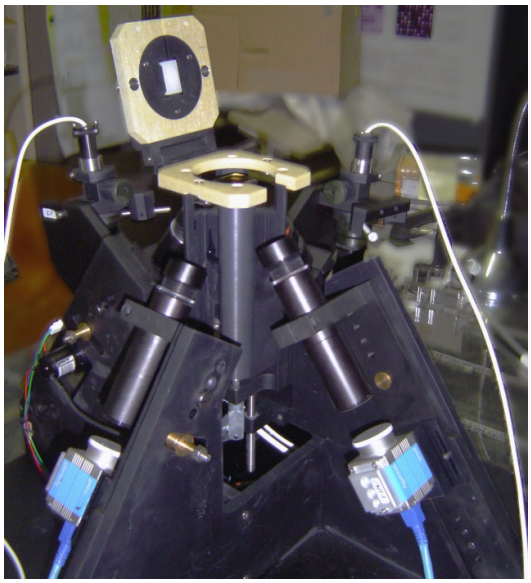
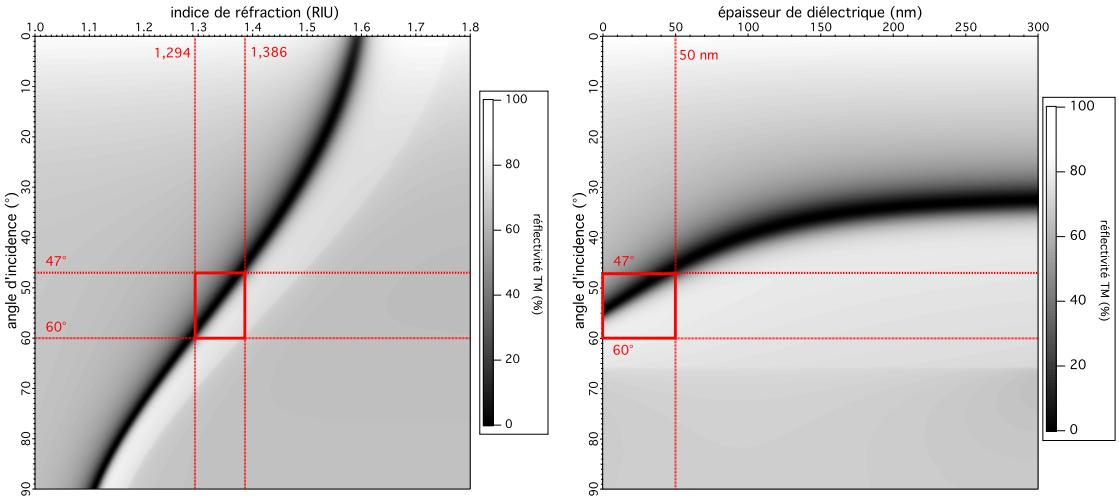


FIGURE 46 – Photographie du banc de P-SPRI, les deux caméras sont visibles en bleu, la cellule d'interaction en blanc (haut de l'image). La pyramide est disposée au centre de la colonne.

L'axe central optique, matérialisé par l'axe des lentilles du système afocal, forme un angle α avec l'horizontale. Cet angle est modifiable par le jeu de vis de positionnement usinées dans le châssis. Il est ainsi possible de donner à α 4 valeurs : 52°, 53°, 54°, et 55°. Ces angles représentent l'angle central du balayage angulaire effectué par le miroir. Il est donc possible de travailler sur une plage angulaire plus large que le simple balayage du miroir, soit un intervalle de 47° à 60°.

Cet intervalle angulaire limité a bien sûr un impact sur les possibilités de mesure de réflectivité plasmon $R(\theta)$. La figure 47-a donne une simulation de la réflectivité TM d'une biopuce simple SF11 / Cr / Au / milieu ambiant à 670 nm pour différents angles



(a) (b)

FIGURE 47 – Simulation de la réflectivité TM d'une lame d'or montée sur le banc de P-SPRI. (a) Réflectivité or / milieu ambiant en fonction de l'indice de réfraction du milieu ambiant (massif) et de l'angle d'incidence. La plage angulaire du banc de P-SPRI et la gamme d'indices de réfraction atteignables (flanc de résonance) sont indiqués en rouge. (b) Réflectivité or/ diélectrique ($n = 1,48$) / milieu ambiant ($n = 1,33$) en fonction de l'épaisseur du diélectrique et de l'angle d'incidence. Le pas de calcul est de (a) $1\times^{-3}$ (indice) et 0,1°(b) 0,25 nm (épaisseur) et 0,1°.

d'incidence et indices de réfraction du milieu ambiant. Nous observons que l'intervalle angulaire indiqué ci-dessus nous permet de travailler avec des indices de milieu ambiant allant de 1,294 RIU à 1,386 RIU (mileu massif).

En procédant de manière similaire, nous avons tracé dans la figure 47-b la réflectivité TM d'une biopuce SF11 / Cr / Au / diélectrique ($n = 1,48$) / milieu ambiant ($n = 1,33$) à 670 nm pour différents angles d'incidence. cette fois-ci nous avons fait varier l'épaisseur de diélectrique afin d'observer l'épaisseur maximale pour laquelle notre banc serait fonctionnel. Nous observons qu'il est possible de travailler avec des matériaux déposés sur la surface d'or possédant des épaisseurs inférieures à 50 nm.

Cette limitation de notre système implique qu'il n'est pas possible de valider le banc avec des échantillons anisotropes « classiques », tels que des lames polarisées, ou des cristaux liquides. Ceux-ci possèdent un indice de réfraction trop éloigné de la plage acceptable par le banc. Dans la suite de ce chapitre, nous allons donc valider le système en termes de bruit et de linéarité. La validation anisotrope sera détaillée dans le chapitre 3.

2.4 Validation du système

Notre système étant développé, il est important de pouvoir en déterminer les performances. Nous avons donc réalisé une série d'expériences destinées à mesurer dans un premier temps le rapport signal à bruit (Signal to Noise Ratio) de chaque bras du système. Comme nous l'avons indiqué précédemment, les caméras capturent une série d'image, qui seront ensuite moyennées. Cette moyenne correspond à un point de données sur la courbe de réflectivité temporelle. Le nombre d'images moyennées va donc avoir un impact sur le bruit de fond des images, et donc sur le rapport signal à bruit. De plus, si le système est optimisé, le rapport signal à bruit doit suivre la courbe du bruit de photon, qui est le bruit minimal du système. Nous verrons dans le paragraphe 2.4.1 le SNR du montage de P-SPRI.

La linéarité du banc est déterminée par la réponse de chaque bras à un saut d'indice calibré. Cette expérience est décrite dans le paragraphe 2.4.2.

Pour ces deux expériences, nous avons effectué la mesure sur un ensemble de carrés d'or d'1 mm de côté (les substrats sont décrits dans la section 3.4.1). Afin d'obtenir de meilleures performances, les substrats ont été nettoyés durant 10 min à 80° C dans une solution composée d'1/3 H_2O_2 et de 2/3 d'eau dé-ionisée, puis immergés dans de l'éthanol pendant 10 min, et enfin rincés à l'eau dé-ionisée et séché à l'air comprimé.

2.4.1 Rapport signal à bruit

Pour la mesure du rapport signal à bruit, la cellule de fluidique est remplie d'eau dé-ionisée, puis mise en circulation à une vitesse constante d'environ 35µL / min. La circulation de liquide nous permet de nous approcher de conditions expérimentales usuelles. Le temps d'intégration de base des deux caméras est fixé à 65 ms. L'angle de travail a été fixé à l'angle de pente maximale, soit environ 30% / °. Ces deux valeurs correspondent à une réflectivité normalisée TM / TE sur la puce d'environ 66%. Une série de mesures temporelles (100 points) a été réalisée pour 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64 images moyennées par point de données. Soit des temps d'intégration correspondants allant de 65 ms à plus de 4 secondes par point. Pour chaque valeur de temps d'intégration, un ensemble de 9 pixels individuels ont été choisi aléatoirement au sein d'un carré d'or, puis échantillonnés. La moyenne et l'écart-type de ces mesures est donné dans la figure 48, pour chaque axe du système.

Les résultats montrent clairement que les deux axes se comportent de manière très similaire quelque soit la durée d'accumulation. Le rapport signal à bruit augmente pro-

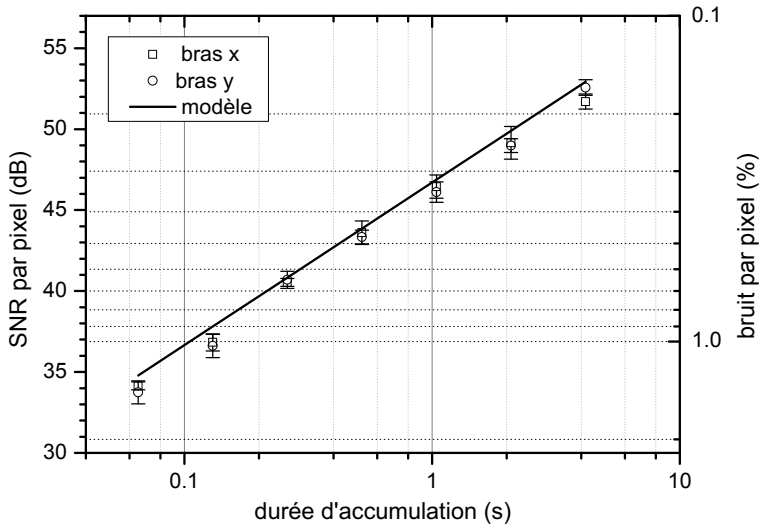


FIGURE 48 – Rapport signal à bruit du montage de P-SPRI

gressivement avec le temps d'accumulation, passant de 34 dB environ pour une image unique, à plus de 52 dB pour une accumulation de 64 images. Ces valeurs correspondent à un bruit de fond par pixel allant de plus de 1,3 % à 0,17% environ.

Afin de déterminer si le comportement du banc de P-SPRI était dû à des bruits d'appareillage ou directement au bruit de photon, nous avons calculé le bruit de photon théorique correspondant, calculé comme suit :

$$\mathrm{SNR}_{photon} = 10\log\left(\sqrt{\frac{\mathrm{S}}{2}} \times \sqrt{\frac{\mathrm{N}f}{2^{16}}}\right) \tag{41}$$

Le premier terme de l'équation définit le bruit de photon, qui a une variation en racine de 2 par rapport au signal S. Le second terme est dépendant des paramètres de la mesure, à savoir le nombre d'acquisitions N, le nombre d'électrons par puit (18000 dans notre cas) et le nombre de bits de la mesure (la capture des images 12 bits génère des images 16 bits en sortie de logiciel). Le SNR correspondant au bruit de pixel correspond au tracé plein de la figure.

On observe un très bon accord entre les points mesurés et la courbe de bruit de photon. Cela indique que notre système n'est limité que par le bruit de photon. Ce bruit étant lié à la nature quantique de la lumière, il n'est pas possible de le réduire. Nous pouvons donc considérer toutes les autres sources de bruit comme négligeables devant le bruit de photon.

N	**durée d'accumulation**	**SNR (dB)**	**bruit (% / px)**
1	65 ms	34,1	1,30
2	130 ms	36,8	0,95
4	260 ms	40,5	0,62
8	520 ms	43,6	0,44
16	**1,04 s**	**46,4**	**0,31**
32	2,08 s	49,2	0,23
64	4,16 ms	51,7	0,17

TABLE 9 – Rapport signal à bruit et bruit par pixel du système de P-SPRI.

Cette expérience nous permet également de déterminer une durée d'accumulation (ou un nombre d'images moyennées) « acceptable ». 64 images étant une valeur trop grande, car générant un point en 4 secondes. Nous avons choisi pour l'ensemble de nos expérience une valeur de 16 images moyennées. Cette valeur nous permet d'obtenir un point en 1 seconde environ (3 secondes après traitement informatique et transfert des images sur disque dur), ce qui est largement suffisant pour observer des signaux évoluant sur plusieurs minutes. Cette valeur nous donne un SNR d'environ 46 dB, soit un bruit d'environ 0,3 % par pixel.

La table 9 donne une synthèse des rapports signal à bruit et des bruits de lecture pour les différentes durées d'accumulation. Il est à noter que le bruit donné dans ce tableau correspond à un pixel unique. Les points que nous manipulons sont très généralement des moyennages spatiaux d'un ensemble de pixels, le bruit d'un point est largement inférieur au bruit d'un pixel. Par exemple, pour un moyennage spatial de 50×50 pixels (soit un carré de $425 \times 425\,\mu$m de côté), le bruit est inférieur à 0,01 %.

Nous pouvons désormais calculer le seuil de détection théorique du montage, calculée à partir de la sensibilité (voir section 2.2.3). Pour un diélectrique de 10 nm d'épaisseur et à 670 nm, la sensibilité théorique maximale en réflectivité anisotrope est de $271,5\%/$RIU. Si nous prenons comme bruit la valeur de 0,01 %, le seuil de détection du montage est de $3,7 \times 10^{-5}$ RIU. En procédant de même pour la sensibilité à 1 nm, on obtient le tableau suivant (table 10) :

épaisseur	sensibilité (anisotrope)	seuil de détection (anisotrope)
1 nm	$33,67\%/\text{RIU}^{-1}$	3×10^{-4}RIU
10 nm	$271,5\%/\text{RIU}^{-1}$	$3,7 \times 10^{-5}$RIU

TABLE 10 – Sensibilité maximale et seuil de détection en réflectivité anisotrope du système de P-SPRI.

2.4.2 Linéarité de la réponse

La linéarité du banc est également un test important, car la variation de réflectivité ΔR de chaque axe doit être proportionnel à la variation d'indice de réfraction Δn du produit injecté dans la cellule. Pour les mesures dynamiques, nous nous positionnons à angle fixe dans la zone de linéarité de la courbe plasmon angulaire. Cette zone de linéarité est réduite, ce qui implique que le système ne sera plus linéaire après un certain seuil ΔR_{max}. L'expérience présentée dans ce paragraphe est vouée à déterminer cette valeur de seuil.

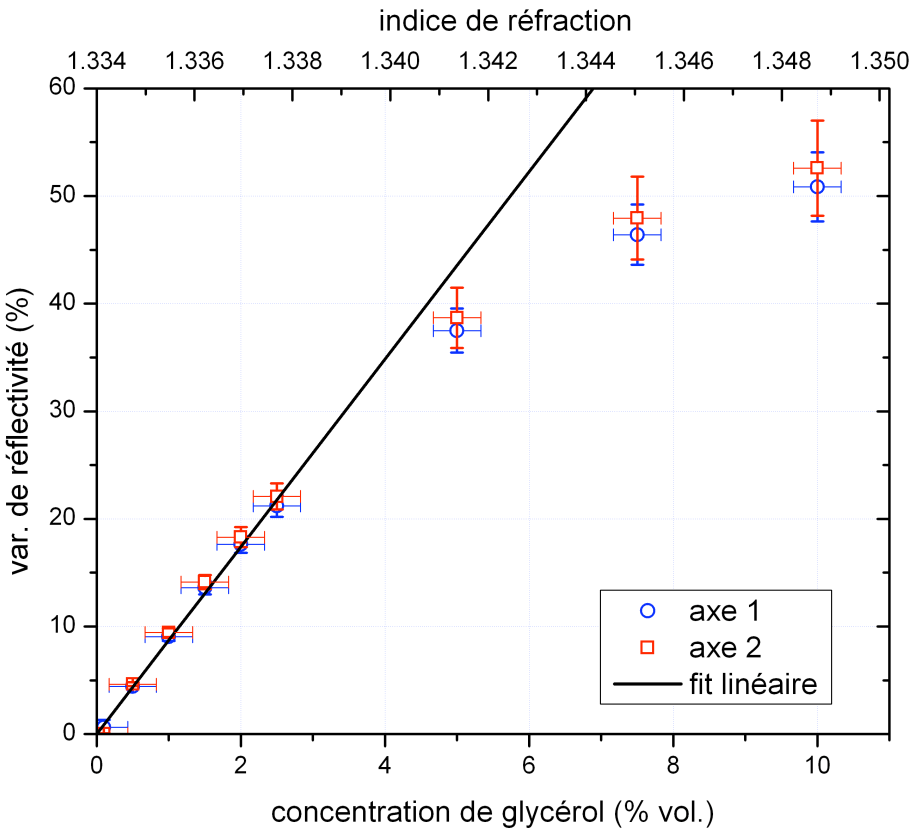


FIGURE 49 – Variations de réflectivité induites par l'injection successive de mélanges eau / glycérol de concentration croissante en fonction de la concentration de glycérol et de l'indice de réfraction du mélange. les barres d'erreur verticales représentent la dispersion des valeurs sur les 9 carrés d'or utilisés (écart-type). La barre d'erreur horizontale représente l'erreur de mesure au réfractomètre d'Abbe ($\pm 5 \times 10^{-4}$)

En utilisant un substrat identique à l'expérience précédente, nous avons réalisé une

mesure dynamique de la réflectivité de 9 carrés d'or en simultané. Chaque point expérimental résulte d'un moyennage temporel de 16 images, et d'un moyennage spatial de 25×25 pixels. L'angle de travail chaque axe a été fixé au maximum de la dérivée de la courbe de plasmon angulaire, soit pour l'axe 1, à 32,8% /$^\circ$ et pour l'axe 2, à 31,3 % / $^\circ$ en moyenne.

Nous avons préparé un ensemble d'échantillons contenant un mélange d'eau dé-ionisée et d'une concentration croissante de glycérol en solution. Nous avons ainsi préparé des solutions à 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 5%, 7,5% et 10% de glycérol, que nous avons injecté successivement dans la cellule d'interaction. Nous avons finalement calculé la moyenne et l'écart-type des 9 points pour chaque palier de réflectivité, et ce pour les deux axes. Les résultats sont donnés dans la figure 49. Les indices de réfraction des échantillons ont été vérifié par mesure au réfractomètre d'Abbe, mais elles ne sont indiqués ici qu'a titre indicatif, la résolution de l'appareil utilisé étant assez faible (environ 5×10^{-4}).

Ces résultats illustrent que le système est parfaitement linéaire pour des concentrations de glycérol ne dépassant pas 2,5%. Au delà, la courbe s'infléchie, et il n'est plus possible de se fier aux variations de réflectivité données par l'appareil. En termes d'indices de réfraction, cela signifie que l'on peut mesurer des différences d'indice de réfraction allant jusqu'à $\Delta n_{max} = 5 \times 10^{-3}$, soit une valeur seuil de variation de réflectivité d'environ $\Delta \mathrm{R}_{max} = 30\%$.

Conclusion

Ce chapitre nous a permis d'élaborer les bases théoriques et de mettre en œuvre un système expérimental basé sur la résonance de plasmon de surface polarimétrique.

Nous avons tout d'abord décrit l'implémentation d'un modèle numérique décrivant la réflectivité d'un multicouche comportant des diélectriques et des métaux, connu sous le nom de modèle Rouard étendu. L'étude des indices effectifs d'un milieu uniaxe nous a permis de nous affranchir de l'implémentation d'un modèle matriciel anisotrope. nous avons ainsi été à même d'utiliser le modèle de Rouard étendu pour simuler le comportement d'un capteur basé sur la résonance de plasmon de surface suivant deux direction orthogonales de l'espace, mesurant chacun indirectement des variations d'indice effectif dans sa propre direction. Nous avons enfin appliqué le modèle à la mesure de l'anisotropie d'une monocouche d'ADN orienté. Nous avons calculé qu'un capteur basé sur le principe développé ici obtiendrait une sensibilité théorique en réflectivité anisotrope d'environ 34% / RIU pour une couche de d'1 nm d'épaisseur.

La seconde partie de ce chapitre a été consacré à la mise en œuvre expérimentale du capteur de P-SPRI. Le système, basé sur un ensemble d'éléments répandus dans notre laboratoire, présente des caractéristiques similaires aux biocapteurs à SPRI précédemment développés au sein de notre équipe. Les différences résident principalement dans l'utilisation d'une source fibrée et d'un coupleur pour illuminer le montage, et dans une pyramide de verre haut indice spécialement conçue pour notre application. De par certaines particularités liées au chassis mécanique, le capteur n'est capable de travailler que dans une plage restreinte d'indices de réfraction, à savoir de 1,29 à 1, 39 RIU environ sur du matériau massif. Cela se traduit pour la possibilité de caractériser des couches de diélectriques d'épaisseur inférieure à 50 nm déposées sur la surface de métal, lorsque le milieu ambiant est de l'eau. De ce fait, il n'a pas été possible de valider le système de manière simple à l'aide de lames polarisées par exemple. En effet, le banc de P-SPRI a été spécifiquement conçu pour observer des films anisotropes d'épaisseur nanométrique immergés dans un tampon (cellule d'interaction).

Les problèmes de synchronisation des deux axes ont été adressés par un contrôle logique, et la majorité des traitements à effectuer sur les données se font par post-traitement. L'algorithme de traitement sera d'ailleurs l'objet de la première partie du chapitre 3.

Afin de vérifier que le système construit se comporte bien conformément aux attentes, nous avons déterminé le rapport signal à bruit du montage (SNR) pour différents moyennages temporels d'images. Le SNR n'est limité que par le bruit de photon, il n'y a donc pas d'optimisation supplémentaire possible pour augmenter ce rapport. Nous avons pu

longueur d'onde de travail	670 nm
plage angulaire	47° à 60°
plage d'indices de réfraction (massif)	1,294 à 1,386
Épaisseur de matériau maximale ($n = 1,48$)	50 nm
anisotropie Δn_{min} mesurable (1 nm)	3×10^{-4} RIU
saut d'indice Δn_{max} mesurable	5×10^{-3} RIU
bruit de mesure	10^{-2}% (50 × 50 px.) / 0,31% / px.
SNR	46,4 dB (16 images)

TABLE 11 – Caractéristiques du banc de P-SPRI.

déterminer qu'un moyennage sur 16 images était suffisant pour un grand nombre d'applications. Ce moyennage permet d'obtenir un bruit de 0,3% par pixel, soit un bruit inférieur à 0,01% pour un échantillonnage sur un carré de 50 × 50 pixels. A partir de cette valeur de bruit, nous avons pu déterminer que le montage possède une un seuil de détection théorique pour un signal anisotrope de $\Delta n_{min} = 3 \times 10^{-4}$ RIU pour 1 nm de matériau déposé.

Finalement, nous avons mesuré la linéarité de notre capteur en réponse à un incrément d'indice de réfraction, et nous avons obtenu la différence d'indice de réfraction maximale mesurable, à savoir $\Delta n_{max} = 5 \times 10^{-3}$.

La table 11 résume les caractéristiques du système de P-SPRI que nous avons réalisé.

3

SPRI polarimétrique pour l'étude de systèmes biologiques

Sommaire

Introduction **84**

3.1 Protocole type de capture d'un signal anisotrope **85**

3.1.1 Détermination d'un angle optimal 85

3.1.2 Capture dynamique des images 88

3.1.3 Recalage des images 91

3.1.4 Traitement des données 92

3.1.4.1 Normalisation intra-axe 94

3.1.4.2 Correction inter-axes 95

3.2 Anisotropie induite par un flux orienté **99**

3.2.1 Principe des PDNA 99

3.2.2 Structuration de l'échantillon 101

3.2.3 Mesure de l'anisotropie par P-SPRI 102

3.3 Anisotropie de systèmes biologiques sous champ électrique . **106**

3.3.1 Montage électrique 107

3.3.2 Dépôt de l'hémimembrane 108

3.3.3 Impulsions électriques 110

3.3.4 Discussion 113

3.4 Filaments orientés sous champs magnétique **115**

3.4.1 Substrats structurés 115

3.4.2 Fonctionnalisation chimique de la surface et greffage des billes . 116

3.4.3 Caractérisation optique 117

3.4.4 Mesure de l'anisotropie par P-SPRI 118

3.4.5 Discussion des résultats 122

Conclusion **126**

Introduction

Ce chapitre présente diverses applications de l'utilisation du banc de P-SPRI développé dans le cadre de notre travail. Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent, l'observation d'édifices anisotropes n'est ici possible que lorsque les indices en jeu sont proches d'indices d'objets biologiques, sur des épaisseurs allant jusqu'a quelques centaines de nanomètres. La validation du système n'a donc pas été possible en utilisant simplement des matériaux tels que des lames de polariseurs par exemple ou des cristaux liquides, dont les indices restent inaccessibles pour notre banc. Nous avons donc dû élaborer des matériaux anisotropes dont les indices restent dans la plage accessible par notre appareil, à savoir $1,29$ RIU à $1,39$ RIU environ pour un milieu massif (voir section 2.3.10). Cette limitation rends néanmoins accessible tous les matériaux d'épaisseurs nanométrique déposés sur la surface d'or, et plongé dans un milieu aqueux dont l'indice est proche de celui de l'eau.

Dans la première partie (section 3.1) de ce chapitre, nous développerons le protocole de capture et d'analyse du signal anisotrope. Le système expérimental étant composé de deux bras de SPRI distincts utilisant les mêmes matériels et logiciels, il est nécessaire d'ajouter à la capture des données une étape de traitement *a posteriori*. Les étapes de capture et les algorithmes de traitement seront illustrés à partir du jeu de données utilisé pour déterminer la linéarité de la réponse du banc à un saut d'indice isotrope dans le paragraphe 2.4.2.

La suite du chapitre est dédiée à l'étude de trois applications du banc de P-SPRI, qui sont autant de validations expérimentales de la mesure d'un signal anisotrope issu de matériaux d'épaisseur nanométrique. La première expérience concerne l'orientation, induite par un flux de liquide, d'une monocouche autoassemblée (self assembled monolayer ou **SAM**) d'alkylthiols (section 3.2). Ces premiers résultats nous ont permis de mettre en place une stratégie plus élaborée de capture de signal anisotrope. En utilisant les propriétés isolantes des monocouches autoassemblées, et en appliquant un champ électrique sur l'échantillon, il est possible de structurer spatialement la biopuce de manière anisotrope. Nous donnerons dans la section 3.3 les premiers résultats obtenus sur une SAM se structurant de manière anisotrope sous l'effet du champ électrique. Finalement, nous montrerons qu'il est également possible d'obtenir une anisotropie en orientant, sous l'effet d'un champ magnétique, des filaments de billes magnétiques de tailles microniques (section 3.4).

3.1 Protocole type de capture d'un signal anisotrope

Le montage dédié à la caractérisation de l'anisotropie par imagerie polarimétrique de résonance de plasmon de surface (**P-SPRI**) étant constitué de deux axes distincts, et donc de deux montages de SPRI « classiques » séparés, la capture de données anisotropes passe par un ensemble d'étapes visant à équilibrer le signal entre les deux axes. En effet, une différence de sensibilité ($\Delta R/\Delta n$) entre les deux axes, issue des conditions de mesure, peut créer une anisotropie artefactuelle. Le but de l'équilibrage est de replacer ce décalage instrumental à zéro. Sur le principe, il est donc nécessaire de déterminer un angle de travail optimal pour les deux axes (voir la section 3.1.1). Lors de la capture d'images en temps-réel, les différences de pente résiduelles peuvent être à leur tour compensées par l'utilisation d'un saut d'indice isotrope (voir la section 3.1.2). Finalement, le fait que notre système capture des images implique que la comparaison entre les deux axes $\Delta R = \Delta R_1 - \Delta R_2$ se fasse pixel à pixel. Les erreurs d'alignement optiques et mécaniques peuvent alors être corrigées par l'utilisation d'un algorithme de recalage d'images (voir la section 3.1.3) qui déterminera un vecteur de décalage entre les deux images. Ce vecteur sera ensuite appliqué aux données post-traitées (section 3.1.4).

Pour résumer, nous pouvons dire qu'une expérience de mesure de l'anisotropie d'un échantillon se déroule en 5 étapes :

1. Détermination d'un angle optimal ;
2. A angle fixé, détermination de la sensibilité $\Delta R_i/\Delta n$ pour les deux axes en chaque point i de la puce (saut d'indice) ;
3. Mesure en temps-réel du signal sur chaque axe ;
4. Détermination d'un vecteur de recalage ;
5. Post-traitement des données recalées et mesure de l'anisotropie normalisée en réflectivité $\Delta R = \Delta R_1 - \Delta R_2$ en chaque point de la puce.

3.1.1 Détermination d'un angle optimal

La détermination d'un angle de travail optimal pour chaque axe passe par la mesure de la courbe de réflectivité angulaire de la puce sur les deux axes en parallèle. Un balayage angulaire est donc effectué sur chacun des axes avec le programme Labview. Afin d'éviter des problèmes d'interprétation des valeurs liés à une grille mal positionnée, chaque jeu d'images est ensuite traité manuellement grâce au programme *Igor Pro* d'analyse développé dans le cadre de notre travail.

Une image de référence est tout d'abord choisie parmi la pile d'images obtenue après le balayage angulaire, généralement la référence est choisie près de l'angle de réflectivité minimale θ_{min} de manière manuelle. Le programme propose ensuite d'entrer manuellement des points de mesure ou de superposer une grille à l'image (voir la figure 50).

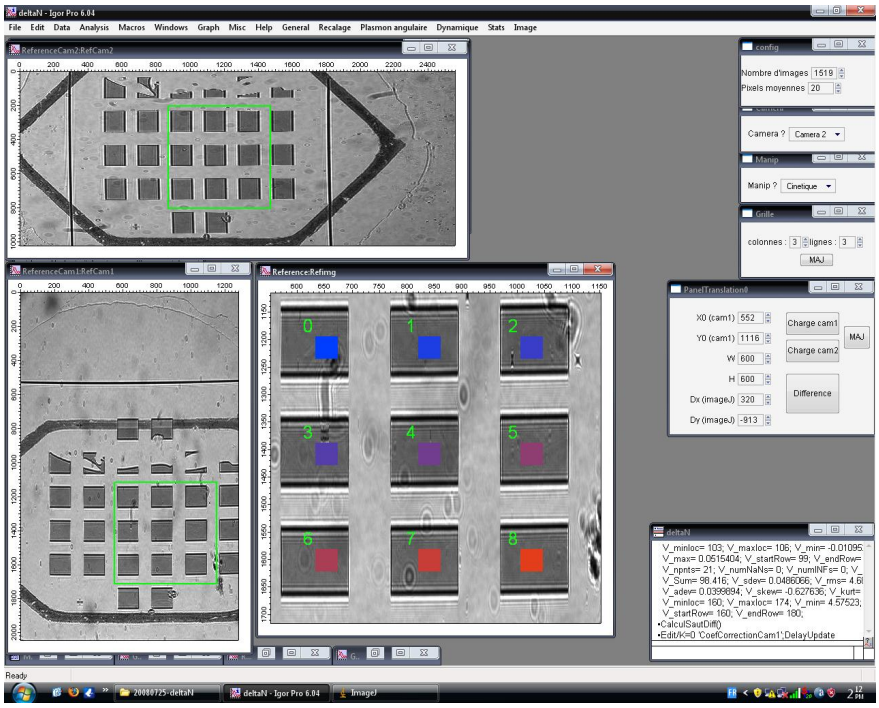


FIGURE 50 – Exemple d'utilisation du programme Igor pour la sélection d'une grille de points.

La surface des points correspond au moyennage spatial sur lequel la mesure va s'effectuer. Dans notre exemple, le moyennage se fait sur une surface carrée de 40×40 pixels, soit environ $0,34 \times 0,34$ mm par point.

Une fois les points correctement positionnés, le calcul des courbes de réflectivité est lancé pour chaque axe. Pour chaque angle θ_k, le programme charge les images TE_k et TM_k correspondantes, ainsi que l'image de référence de bruit de fond DARK. Il effectue ensuite l'opération suivante pour chaque point i :

$$< \mathrm{R}_k(i) >= \frac{< \mathrm{TM}_k(i) > - < \mathrm{DARK}(i) >}{< \mathrm{TE}_k(i) > - < \mathrm{DARK}(i) >} \times \frac{\mathrm{T}^s_{pyramide}(\theta_k)}{\mathrm{T}^p_{pyramide}(\theta_k)} \tag{42}$$

Le coefficient multiplicateur à droite de l'équation correspond au ratio des transmittances des polarisations s (TE) et p (TM) des faces d'entrée et de sortie de la pyramide, qui varie en fonction de l'angle d'incidence. Ainsi, $< \mathrm{R}_k(i) >$ ne dépasse jamais 1. Ce

coefficient est donné par :

$$\mathrm{T}^s_{pyramide}(\theta_k) = \left(\mathrm{T}^s_{face}(\theta_k)\right)^2 = \left(1 - \frac{n_1 \cos\theta_k - n_2 \cos\theta_\mathrm{T}}{n_1 \cos\theta_k + n_2 \cos\theta_\mathrm{T}}\right)^2 \tag{43}$$

$$\mathrm{T}^p_{pyramide}(\theta_k) = \left(\mathrm{T}^p_{face}(\theta_k)\right)^2 = \left(1 - \frac{n_1 \cos\theta_\mathrm{T} - n_2 \cos\theta_k}{n_1 \cos\theta_\mathrm{T} + n_2 \cos\theta_k}\right)^2 \tag{44}$$

$$\theta_\mathrm{T} = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2}\sin\theta_k\right) \tag{45}$$

Le passage au carré des transmittances des faces est justifié par le fait que le faisceau doit traverser deux interfaces symétriques, une entrante, et une sortante. Dans notre système expérimental, $n_1 = 1$ (air) et n_2 est l'indice du verre utilisé (SF11) à la longueur d'onde de travail, soit environ $1,775$ RIU. Un exemple de simulation des courbes angulaires TM, TE et normalisée TM/TE est donné dans la figure 51.

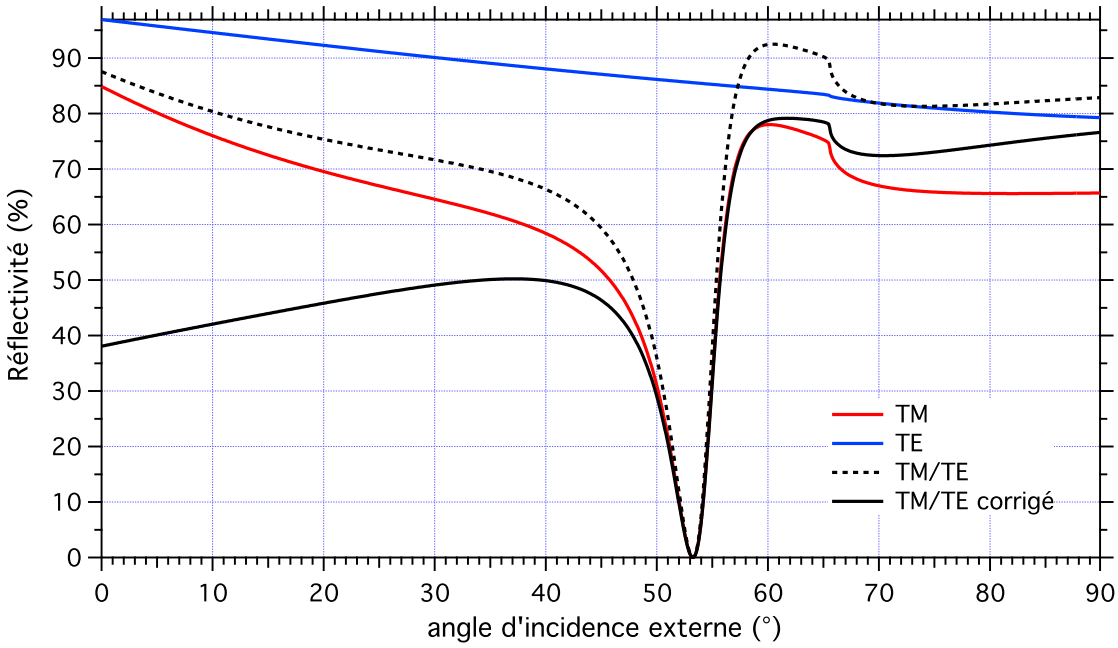


FIGURE 51 – Simulation illustrant le principe de calcul de la normalisation TM/TE pour un système à SF11/or/eau à 670 nm. (rouge) courbe de réflectivité angulaire en polarisation TM. (bleu) courbe de réflectivité angulaire en polarisation TE. (noir pointillés) courbe normalisée TM/TE. (noir) courbe normalisée TM/TE et corrigée des transmittances des faces d'entrée et de sortie de la pyramide (SF11).

Ce calcul étant effectué pour chaque axe, il est important de bien pouvoir sélectionner les mêmes points sur les deux images. Cela peut se faire manuellement, avec dans ce cas un

moyennage spatial important, diminuant d'autant l'impact d'une erreur de recalage des points. L'utilisation de repères spatiaux, comme des carrés d'or sur un substrat de verre, tels ceux de la figure 50 sur lesquels le moyennage se fera est, dans ce cas, fort utile. Il est également possible d'utiliser le vecteur de recalage calculé par l'algorithme décrit dans le paragraphe 3.1.3, bien que ce cas de figure soit rarement envisageable, car il nécessite la connaissance *a priori* de l'angle de travail des deux axes pour fonctionner correctement.

Après calcul, nous obtenons la courbe de réflectivité angulaire des points précédemment indiqués, ainsi que la pente $\Delta R/\Delta\theta$, dérivée de la réflectivité par rapport à l'angle. Un exemple de courbes obtenues est donné par la figure 52. L'angle de travail pour les deux axes va donc pouvoir être déterminé. Il s'agit de l'angle où la pente est maximale, c'est à dire l'angle correspondant au maximum de la dérivée. Dans notre exemple, les deux courbes semblent décalées de $0,3^\circ$ environ, avec pour l'axe 1 un minimum de réflectivité atteint à $54,3^\circ$, et pour l'axe 2 un minimum atteint à $54,0^\circ$. Dans ces conditions, l'angle de travail de l'axe 1 se situera à $55,3^\circ$, et celui de l'axe 2 à $55,0^\circ$. Ce décalage angulaire est dû à des imprécisions dans le réglage des miroirs et dans la mesure (un balayage angulaire usuel atteint une résolution de 3 points / $^\circ$) et n'impacte pas sur les captures de données dynamiques. Dans notre exemple, la différence de pente résultante est d'environ 1% (de $40,6\%/^\circ$ à $41,6\%/^\circ$ sur la courbe moyenne). Cette différente peut-être efficacement compensée une correction avec un saut d'indice isotrope, comme nous le verrons dans la section 3.1.2.

3.1.2 Capture dynamique des images

Une fois le balayage angulaire effectué, la mesure en dynamique peut avoir lieu. Tout d'abord, les miroirs sont positionnés à l'angle optimal calculé par le programme pour chaque axe. Une fois la mesure dynamique lancée, nous pouvons mesurer un saut d'indice isotrope afin de corriger les différences de pente de réflectivité d'une part, et d'atténuer les hétérogénéités de surface d'autre part. Pour ce faire, il faut injecter durant l'expérience un tampon légèrement plus concentré en sels que le tampon circulant usuel. Pour un tampon de PBS 1X par exemple, il est commun d'utiliser du PBS 1,25X pour réaliser un saut d'indice isotrope d'environ 5×10^{-4} RIU, soit une variation de réflectivité d'environ 1%.

Il est possible d'obtenir des résultats similaires en partant d'eau déionisée, puis en injectant un mélange eau/glycérol de concentration fixée (comme pour l'expérience décrite dans la section 2.4.2). Ce mélange a l'avantage de ne pas laisser de dépôt de sel sur les lames ou dans les tubes de fluidique, permettant de conserver plus longtemps une même

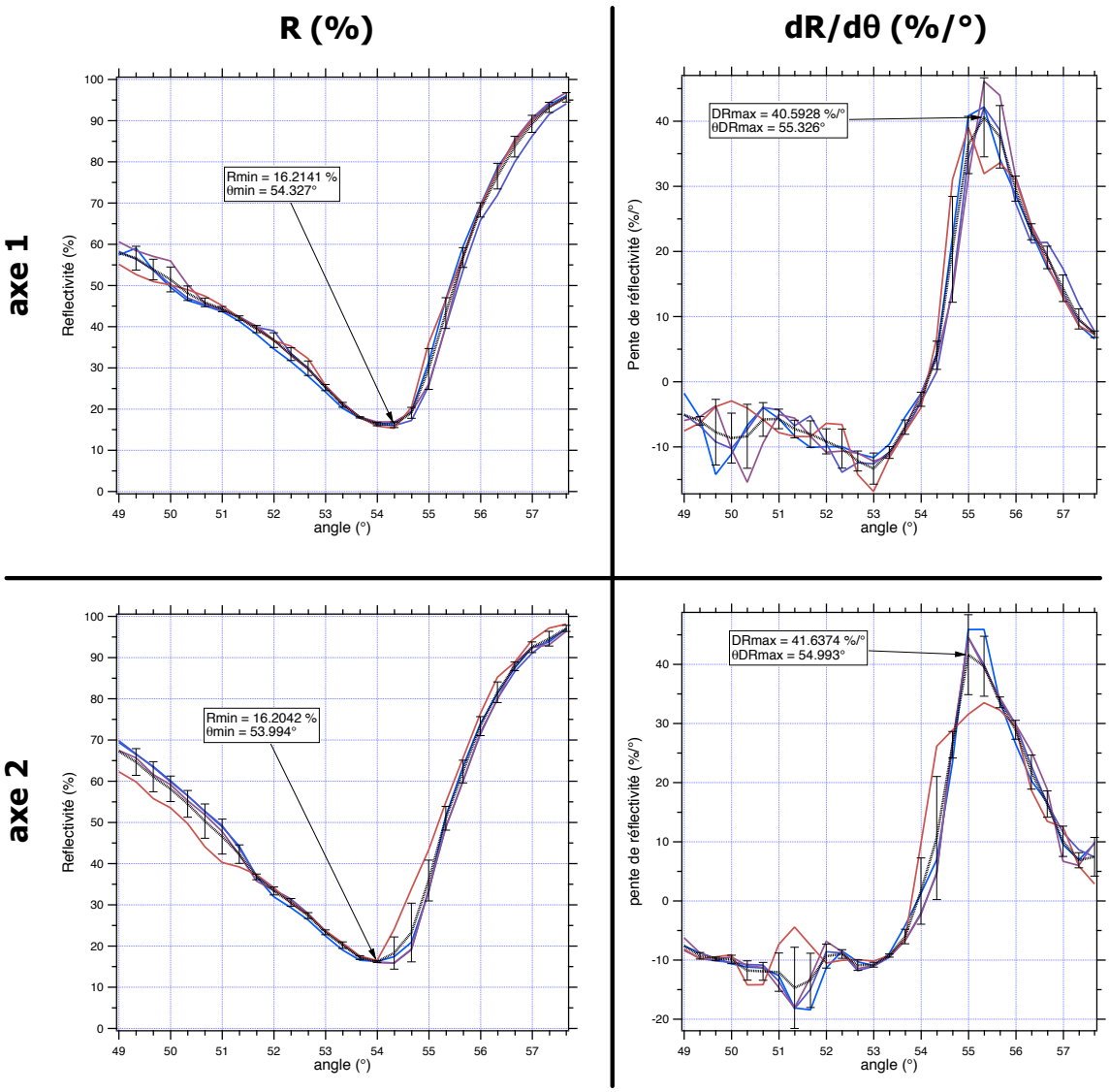


FIGURE 52 – Exemples de courbes expérimentales extraites par notre programme à partir des points indiqués par la figure 50. En haut, axe 1. En bas, axe 2. A gauche, réflectivité angulaire normalisée TM/TE (en %). A droite, pente de réflectivité angulaire correspondante (en %/°. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type (spatial) des points. Les minima de réflectivité et les maxima de pente de réflectivité sont marqués par une flèche.

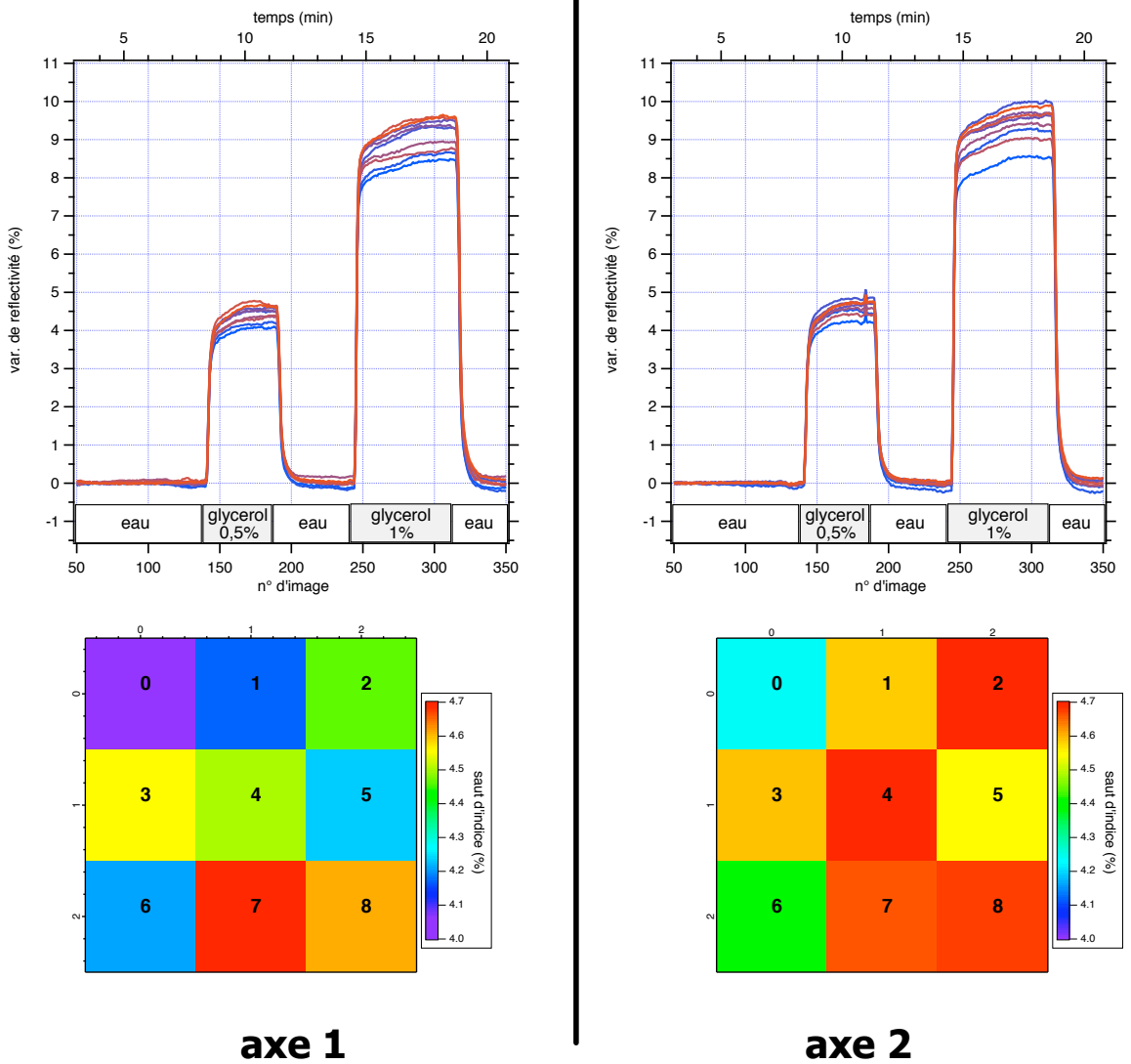


FIGURE 53 – (haut) Courbes de variations de réflectivité dynamique de sauts de glycérol 0,5 et 1%. (bas) Valeur du plateau de saut d'indice 0,5% de glycérol, pour les 9 points indiqués dans la figure 50. (gauche) axe 1, (droite) axe 2.

lame de référence. Dans l'exemple qui suit, nous utiliserons un mélange eau – 0,5% de glycérol, puis eau – 1% de glycérol. Les résultats sont présentés dans la figure 53. Nous observons que les saut d'indice présentent une dispersion des valeurs assez important.

Cette dispersion est dû à la coexistence de deux dispersions. Sur chaque voie, il existe une **dispersion intra-axe**, c'est à dire que la valeur du saut est différent d'un point de la puce à l'autre. Cette dispersion peut s'expliquer par des hétérogénéités de la surface d'or, ayant pour cause soit le dépôt de polluants ou de substances organiques, soit des

défaut d'épaisseur de la couche d'or. De même il existe également, et de manière indépendante, une **dispersion inter-axes**, c'est à dire dépendante des conditions de couplage de l'onde plasmon particulières à chaque axe. Les différences de pente de la courbe plasmon angulaire peuvent être responsable de cette dispersion.

Nous verrons dans la section 3.1.4 dédiée au traitement des données, qu'il est possible d'utiliser les informations de dispersion intra- et inter- axes pour normaliser et corriger le signal. Ainsi, un signal isotrope ne générera pas de réponse « anisotrope ». Néanmoins, ces corrections passent par une étape de recalage des images capturées.

3.1.3 Recalage des images

Le recalage des images consiste à superposer les images venant des deux caméras. Une des images est prise comme référence, tandis que l'autre (l'image de mesure) est modifiée géométriquement pour s'aligner à la référence. La grande majorité des algorithmes de recalage fonctionnent suivant un principe général [84] similaire. Tout d'abord, un ou plusieurs motifs sont déterminés sur l'image de référence. Ceux-ci doivent correspondre à des objets facilement identifiables sur l'image. Ces motifs peuvent être représentés par un point caractéristique, comme leur centre de gravité par exemple, et la détection peut se faire de manière manuelle ou automatique. Ensuite, les motifs définis sont recherchés sur l'image de mesure de manière automatique ou manuelle, et les paramètres d'une fonction de transformation (passage de l'image de référence à l'image de mesure) est déterminée. Finalement, la transformation de l'image de mesure est effectuée en suivant la fonction de transformation.

Deux grandes familles d'algorithmes peuvent être distinguées : ceux basés sur un calcul de corrélation et ceux basés sur la recherche de similitudes de motifs. Les algorithmes basés sur le calcul de la corrélation des deux images n'utilisent pas de motif pour fonctionner. La comparaison se fait sur une région d'intérêt de l'image de référence, et un score de corrélation croisée est calculé entre les deux images. En déplaçant l'image de mesure suivant un vecteur de translation (et éventuellement une rotation), l'algorithme cherche à maximiser le score de corrélation croisée. Lorsque le score est maximal, les deux images sont alignées. Cette méthode peut être accélérée par l'utilisation de transformées de Fourier. Il est ainsi possible de calculer les corrélations dans le domaine fréquentiel plutôt que spatial [85].

D'un autre côté, les algorithmes basés sur la recherche de motifs sont plus nombreux. Citons parmi eux les algorithmes basés sur une approche pyramidale [86] et un calcul d'ondelettes, c'est à dire en partant d'une image très grossière, puis en raffinant au fur

et à mesure à la recherche de motifs communs. Une fois une précision sous-pixel obtenue, une transformation affine est appliquée sur l'image de mesure.

Dans notre travail, nous avons abordé plusieurs algorithmes afin de résoudre le problème posé par le recalage des images. Nous avons tout d'abord utilisé le module de traitement d'images *Vision* pour *NI Labview*, qui fournit une interface graphique simple pour réaliser ce type d'opération. En utilisant des lames structurées sous forme de carrés d'or d'1 mm de côté (voir paragraphe 3.4.1), il est possible de définir un ensemble de points de repaire (un pour chaque angle d'un carré) pour chaque image, et ainsi définir une matrice de déformation à appliquer à l'image. Le problème de cette approche est qu'elle implique un grand nombre de manipulations manuelles (environ une vingtaine de points à pointer sur chaque image), pour une précision limitée à celle du pointage des points. De plus, le surcout en termes de traitement est relativement important (chaque image doit être lue, transformée puis écrite sur le disque). Un autre algorithme a été implémenté sous *Igor Pro*, faisant appel à un seuillage automatique sur les carrés d'or. Le programme effectue une segmentation sur l'image seuillée, et regroupe les formes obtenues suivant leur aire et leur « rectangularité ». Il est ainsi possible de sélectionner les carrés similaires d'une image à l'autre, et de faire une mesure de réflectivité moyenne sur l'aire du carré. Le problème provient cette fois-ci de la qualité du seuillage. Il est difficile d'obtenir de manière automatique un seuillage permettant de segmenter correctement l'image. En lançant l'algorithme plusieurs fois sur les mêmes données, des résultats différents étaient obtenus.

Nous avons donc choisi de traiter le problème de manière différente, à savoir en procédant à un recalage semi-automatique. Nous avons utilisé un algorithme basé sur un calcul de corrélations, mais utilisant le domaine fréquentiel plutôt que spatial. L'algorithme utilisé est décrit de manière plus détaillée en annexe D. L'utilisateur doit pointer à la souris lui même un point de repère sur chaque image, puis le programme calcule un vecteur de translation entre l'image de référence et l'image de mesure. Bien que ce type d'algorithme soit moins précis que ceux basés sur la reconnaissance de motifs, l'utilisation de transformées de Fourier permet de « filtrer »les images, et améliorer ainsi la qualité du recalage.

3.1.4 Traitement des données

L'étape de traitement des données permet de corriger et normaliser le signal donné par chaque axe. Comme nous l'avons vu, les variations de réflectivité peuvent présenter des dispersions dues aux hétérogénéités de la puce (dispersion intra-axe) ou aux différences

de pente de courbe plasmon angulaire (dispersion inter-axes). Le traitement des données *a posteriori* permet de corriger ces biais et de normaliser les données de telle façon qu'un signal isotrope ne sera pas lu comme anisotrope. Le programme de traitement des données cinétiques développé sous **Igor pro** dans le cadre de notre travail intervient après capture des données et calcul d'un vecteur de recalage. La première étape consiste à indiquer au programme, par le biais d'une interface graphique, les valeurs de région d'intérêt (coordonnées du coin supérieur gauche sur l'axe 1, largeur et hauteur de la région) sur les images désanamorphosées, ainsi que le vecteur de recalage calculé par le programme **ImageJ** décrit précédemment. L'utilisateur a la possibilité d'ajouter les paramètres et d'observer le résultat directement à l'écran par le biais d'une image de différence des deux axes. L'extraction des données à partir des images se fait pour chaque axe, de manière très similaire à l'équation (42) de la section 3.1.1, la différence résidant ici dans le fait qu'une seule image TE n'existe pour l'ensemble des images TM. De même, la correction de transmittance des faces de la pyramide se fait pour l'angle de travail θ_w :

$$< \mathrm{R}_k(i) >= \frac{< \mathrm{TM}_k(i) > - < \mathrm{DARK}(i) >}{< \mathrm{TE}(i) > - < \mathrm{DARK}(i) >} \times \frac{\mathrm{T}^s_{pyramide}(\theta_w)}{\mathrm{T}^p_{pyramide}(\theta_w)} \tag{46}$$

Cette étape d'extraction des données à partir des images permet d'obtenir des courbes de variation de réflectivité similaires à celles de la figure 53, après sélection d'une référence temporelle. Les variations de réflectivité sont donc toutes calculées à partir de cette référence.

Si nous tentions de déterminer directement l'anisotropie en soustrayant le niveau de variations de réflectivité de l'axe 1 à celui de l'axe 2, nous entrerions dans le cas de figure décrit précédemment d'anisotropie artefactuelle. C'est à dire qu'il existerait une différence de réflectivité entre les deux axes, en l'absence de signal réellement anisotrope. Dans notre exemple, où nous effectuons un saut de concentration de glycérol, soit une saut d'indice par définition isotrope, nous obtiendrions une différence de réflectivité entre les deux axes semblable à celui de la figure 54.

Il est clair qu'un système fournissant ce type de résultat n'est pas acceptable, il est donc nécessaire de corriger les valeurs, tout d'abord en procédant à une normalisation intra-axe de manière à harmoniser la réponse de la surface à un saut d'indice, puis à une correction inter-axes, de manière à équilibrer le signal entre les deux axes.

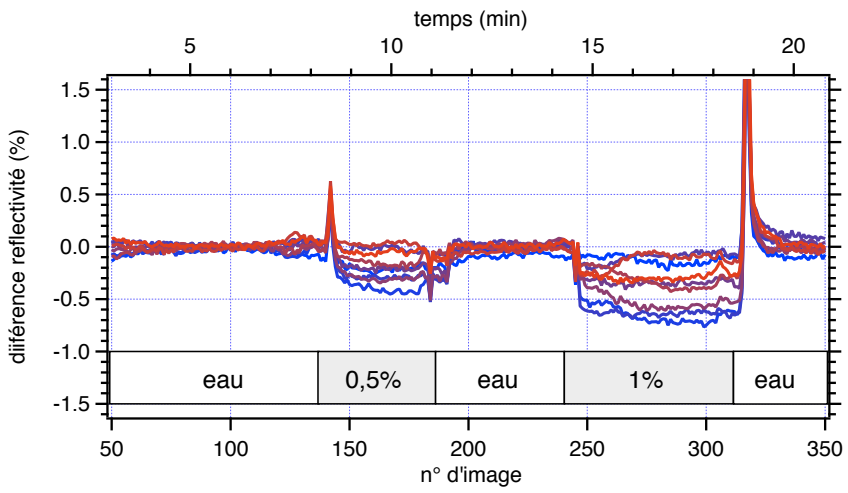


FIGURE 54 – Différence de réflectivité entre les deux axes avant correction par saut d'indice.

3.1.4.1 Normalisation intra-axe

Le but de la normalisation de la réponse de la puce à un saut d'indice pour chaque axe, ou normalisation de la dispersion intra-axe est de permettre de corriger les hétérogénéités dues par exemple à la chimie de surface, ou à des défauts d'épaisseur de métal, de rugosité ou encore d'accumulation de matériau à certains endroits. Cette dispersion est responsable des différences de signal observées au sein d'un même axe sur les cartes de la figure 53 (b) et (c). Afin de normaliser le signal, il est possible de procéder de deux manières. La manière la plus intuitive consiste simplement à calculer la moyenne $\langle \Delta \mathrm{R} \rangle$ des sauts d'indice $\Delta \mathrm{R}_i$ sur l'ensemble des points de la puce, puis à normaliser le niveau de réflectivité en chaque point R_i par cette moyenne :

$$\mathrm{R}_i^{intra.} = \mathrm{R}_i \left| \frac{\langle \Delta \mathrm{R} \rangle_k \, (\Delta \mathrm{R}_i)}{(\Delta \mathrm{R}_i)^2} \right| \quad , \quad k = \{1, 2\} \tag{47}$$

La distribution des valeurs des points sur l'ensemble de la puce prend de manière générale une forme de gaussienne. La normalisation par la moyenne n'est donc valide que lorsque le nombre de points à traiter est faible, de l'ordre de quelques dizaines de points au maximum. Au delà, la différence entre le maximum d'un ajustement par une gaussienne et la moyenne arithmétique devient non négligeable. Le facteur de correction à utiliser est donc le maximum de cette gaussienne. C'est cette méthode qui a été implémentée par J. Hottin dans le cadre de son travail de thèse dans notre laboratoire. Le principe consiste donc à tracer un histogramme de tous les sauts d'indice sur la puce, puis à réaliser un ajustement gaussien de la distribution obtenue. Le maximum de cette courbe donnera le

facteur de correction C_k à appliquer, et la formule de calcul devient :

$$R_i^{intra.} = R_i \left| \frac{C_k(\Delta R_i)}{(\Delta R_i)^2} \right| \quad , \quad k = \{1, 2\} \tag{48}$$

La figure 55 présente un exemple d'utilisation de la normalisation par Gaussienne. Le cas présenté ici est assez simpliste, car il n'utilise qu'une matrice de neuf points. La valeur de correction de saut d'indice obtenue est ici de $4,4\%$ pour l'axe 1 et $4,6\%$ pour l'axe 2 (contre $4,39\%$ et $4,57\%$ en utilisant une moyenne). La différence est due ici à l'utilisation d'un pas de $0,1\%$ pour le tracé de l'histogramme. Avec des séries de points beaucoup plus importantes, il est possible d'utiliser un pas de l'ordre de $0,02\%$ sans perdre la distribution Gaussienne des données, et par la même de gagner en précision.

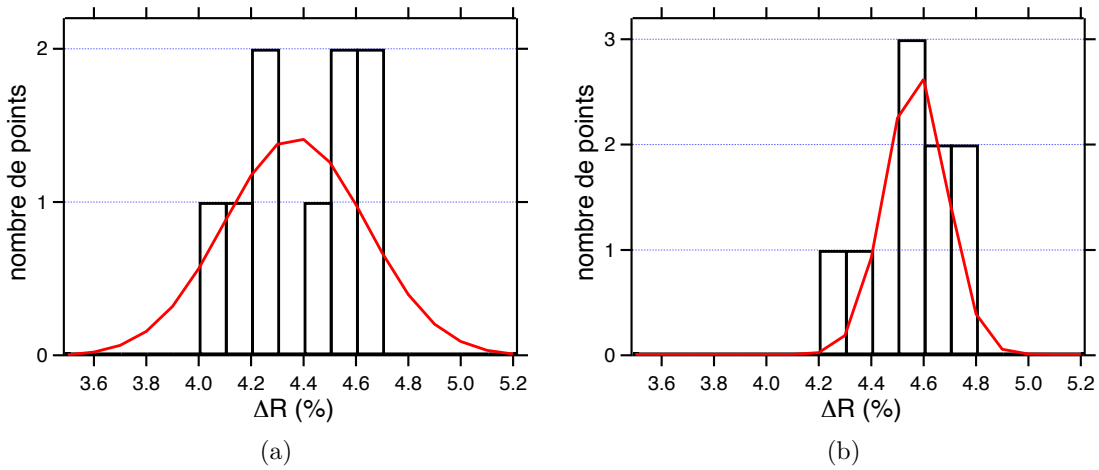
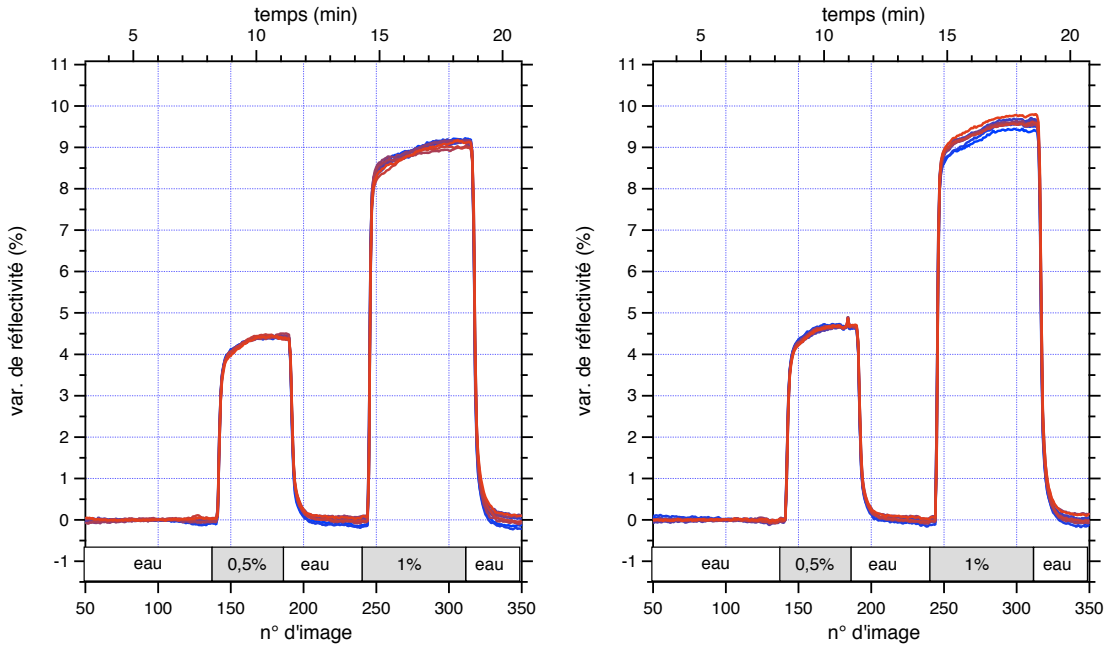


FIGURE 55 – (noir) Histogrammes de variations de réflectivité avec un pas de 0,1%, (rouge) ajustement par une Gaussienne.(a) Axe 1, (b) axe 2.

La figure 56 présente les courbes de variations de réflectivité obtenues après normalisation des sauts d'indice par des Gaussiennes. On observe que la dispersion des points est beaucoup plus faible au sein de chaque axe par rapport aux sauts de la figure 53. Il reste néanmoins un écart de niveaux de réflectivité entre les deux axes, que nous allons corriger.

3.1.4.2 Correction inter-axes

La correction des signaux entre l'axe 1 et l'axe 2 intervient après la normalisation des données sur chaque axe. Il s'agit simplement, pour chaque axe, de corriger par la moyenne



(a) (b)

FIGURE 56 – Courbes de variations de réflectivité dynamique de sauts de glycérol 0,5 et 1% après normalisation intra-axe. (a) Axe 1, (b) axe 2.

$\langle C \rangle$ des deux coefficients de normalisation C_1 et C_2 obtenus précédemment, la réflectivité normalisée $R_i^{intra.}$ en chaque point de la puce.

$$R_i^{inter.} = R_i^{intra.} \left| \frac{\langle C \rangle \, C_k}{(C_k)^2} \right| \quad , \quad k = \{1, 2\} \tag{49}$$

Cette dernière étape permet d'effectuer la soustraction des signaux de l'axe 1 par ceux de l'axe 2. Le résultat d'une telle opération est donné dans la figure 57. Les signaux corrigés de chaque axe sont représentés sur les sous-figures (a) et (b), la sous-figure (c) illustre les courbes de différences typiques obtenues lors d'un saut d'indice isotrope (glycérol 0,5%). Il est important d'observer que lors du passage d'un tampon à un autre (dans notre exemple : passage d'eau à du glycérol 0,5%), la dynamique des courbes est telle que la correction n'est plus parfaite, il apparait donc transitoirement un signal anisotrope. Ce signal, purement artéfactuel, doit également être éliminé des résultats. C'est pourquoi sur les courbes de la figure 57, nous isolons une zone temporelle transitoire. Cette zone n'est pas prise en compte dans l'interprétation des données.

La mesure d'anisotropie, obtenue après toutes les corrections évoquées ci-dessus en dehors des zones de transition correspond donc à la différence nette de réponse SPR en

réflectivité (ΔR) entre l'axe 1 et l'axe 2 du système. On peut donc écrire $\Delta n \propto \Delta \mathrm{R}_1 - \Delta \mathrm{R}_2$. La suite de ce chapitre propose, au travers de trois exemple, de mesurer l'anisotropie de signal en réflectivité dynamique de systèmes issus de la biologie.

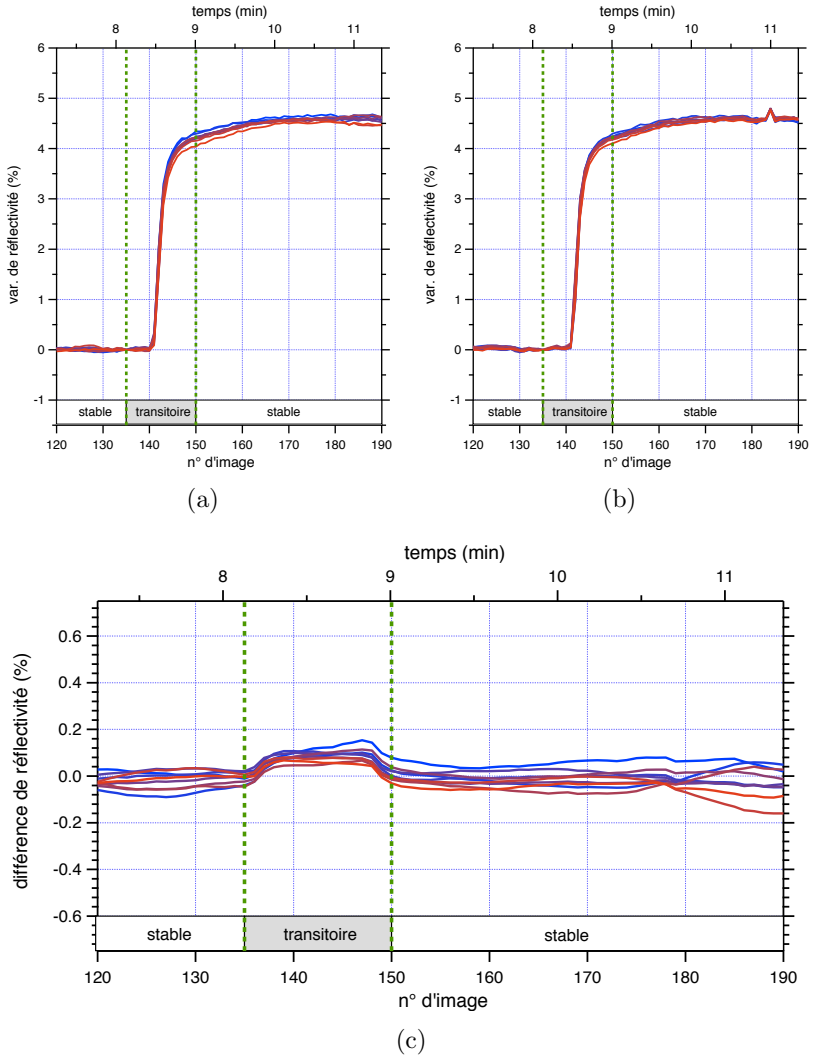


FIGURE 57 – Courbes de variations de réflectivité dynamique d'un saut de glycérol 0,5% après correction inter-axes, (a) axe 1, (b) axe 2. (c) courbe de différence de réflectivité résultant de la soustraction de l'axe 2 à l'axe 1.

3.2 Anisotropie induite par un flux orienté

L'expérience décrites dans cette section a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec D. Pompon et A. Laisné, du Centre de Génétique Moléculaire de Gif sur Yvette. Le principe est d'observer l'impact du flux de liquide engendré par le système de fluidique sur l'anisotropie de système biologiques disposés en surface de la biopuce. En effet, le flux de liquide est anisotrope dans la cellule d'interaction, il en résulterait un « peignage » hydrodynamique des biomolécules. Ce peignage engendrerait alors une différence de réflectivité entre les deux bras du système de P-SPRI. Initialement l'idée était de pouvoir disposer d'objets flottants sur une hémimembrane de phospholipides dont la hauteur était fixée (z) et dont l'orientation pouvait être contrôlée de manière électrique ou fluidique. D. Pompon et A. Laisné ont élaboré une chimie de surface reposant sur la construction de ces assemblages nommés PDNA sur une biopuce à résonance de plasmon de surface. La construction repose sur 4 étapes successives :

1. Préalablement à l'expérience, mise en place d'une couche autoassemblée d'alkanethiols sur la surface d'or ;
2. Durant l'expérience en cinétique, fusion de phospholipides sur la SAM pour créer une hémimembrane ;
3. Injection de PDNA dans la cellule et ancrage sur l'hémimembrane ;
4. polymérisation des PDNA latéralement (x,y).

La complexité d'une telle opération fait qu'il est très difficile de traiter ces 4 étapes au cours d'une seule expérience. Nous avons donc choisi de nous limiter dans la suite aux seules étapes 1 et 2.

3.2.1 Principe des PDNA

Les PDNA (pour « protein-DNA complex ») sont des structures constituées par une protéine modifiée issue du cytochrome B5 liée à un oligonucléotide simple brin de courte longueur et ancré (de manière réversible) à des de phospholipides modifiés (Ni-DOGS) [87, 6]. Les phospholipides eux-même sont fusionnés sous la forme d'une hémimembrane au dessus d'une monocouche d'alkanethiols (octadecylthiols) déposées sur la surface d'or (voir la figure 58).

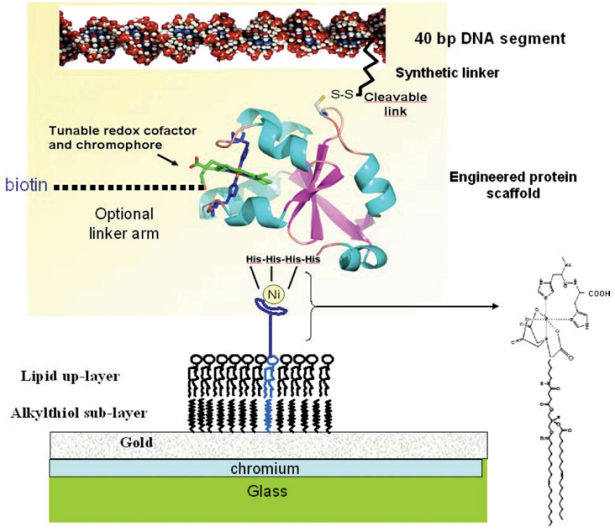


FIGURE 58 – Structure d'un PDNA. (haut) oligonucléotide simple-brin. (milieu) protéine B5 modifiée et ses liaisons. (bas) hémimembrane de phospholipides Ni-DOGS ancrée sur une SAM déposée sur l'or. Image issue de [6]

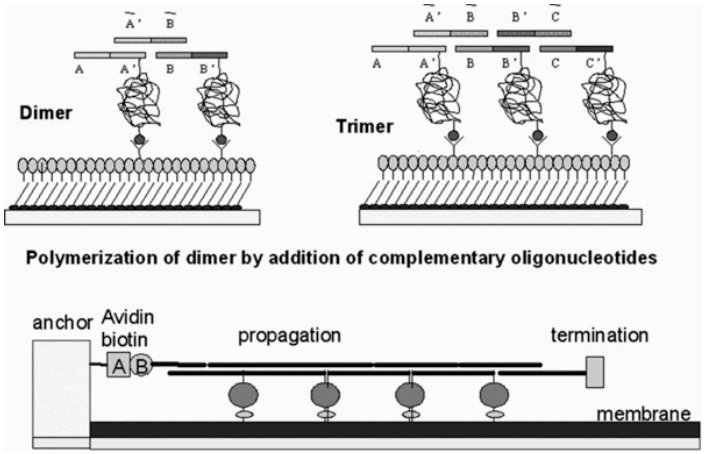


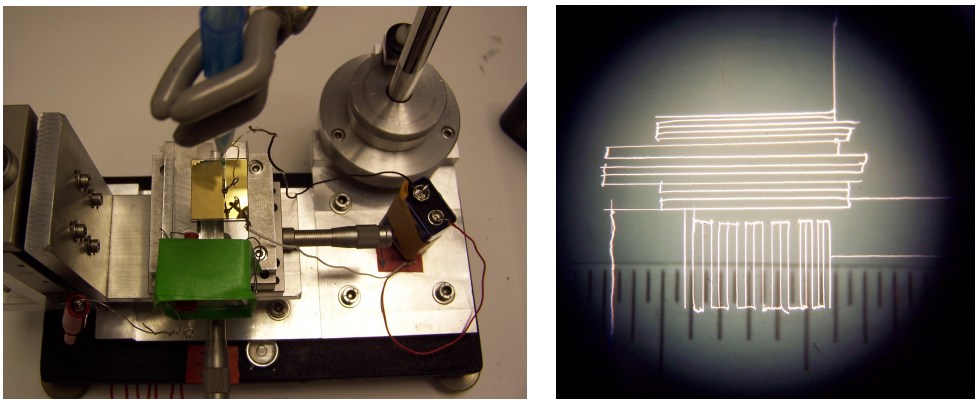
FIGURE 59 – Polymérisation de PDNAs pour former des objets flottants à fort facteur de forme. (haut gauche) dimérisation de PDNAs (AA') et (BB') grâce à un oligonucléotide de liaison (complémentaire A' - complémentaire B). (haut droite) formation d'un trimère par le même mécanisme. (bas) vue « de profil » d'un objet flottant sur la membrane. Les liaisons supplémentaires de la protéine peuvent être utilisées pour créer un terminaison latérale. Image issue de [6]

L'idée est d'utiliser les protéines comme supports de « briques moléculaires » constituées par les brins d'ADN. En choisissant la séquence de bases des oligonucléotides, il est possible de créer des structures « flottantes » de longueur prédéterminée (voir la figure 59 pour plus de détails).

3.2.2 Structuration de l'échantillon

L'objectif principal de notre expérience était de déterminer l'anisotropie induite par un champ électrique dans des objets tels que les PDNA décrits précédemment. L'hypothèse était alors que l'effet d'un champ électrique sur une molécule chargée, telle de l'ADN, serait supérieur (et plus facilement contrôlable) à celui obtenu par l'orientation des brins et leur hybridation sous flux de liquide.

D. Pompon et A. Laisné ont donc élaboré un système élégant et simple permettant de graver des électrodes directement à travers la couche d'or des biopuces (voir figure 60). Il s'agit tout simplement de graver les lames d'or de manière manuelle, à l'aide d'une aiguille reliée à un générateur de courant (une pile 9V). Au contact entre l'aiguille et la lame d'or (reliée à un pôle de la pile), la surface de contact est suffisamment faible, et le courant suffisamment élevé, pour générer un plasma. Celui-ci permet d'évaporer localement l'or et la sous-couche de chrome du substrat pour ne conserver que le verre. En déplaçant l'aiguille grâce à une platine de translation, il est possible de créer des électrodes directement sur l'or.

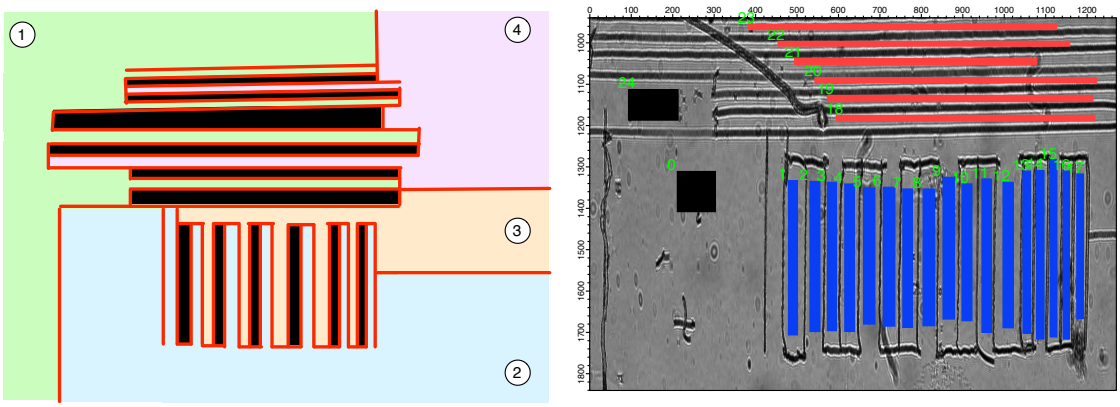


(a) (b)

FIGURE 60 – (a) Dispositif de gravure utilisé. Au centre est disposée la lame d'or, surmontée de l'aiguille de gravure. (b) Réseau interdigité d'électrodes obtenu grâce au dispositif de gravure, la distance entre deux traits est ici inférieure à 500µm.

Pour cette expérience, un réseau interdigité à 4 électrodes a été réalisée suivant deux

direction orthogonales de l'espace (voir figure 61-a). Une série d'électrodes est disposée parallèlement au flux (les électrodes horizontales sur l'image). L'autre série est disposée perpendiculairement au flux (les électrodes verticales). Les électrodes sont interdigitées de manière à obtenir un ensemble de zones isolées entre des électrodes de polarités opposées.



(a) (b)

FIGURE 61 – (a) Réseau de 4 électrodes interdigitées. Les zones isolées sont représentées en noir. (b) Image de référence plasmon recalée. Les zones de mesure bleues sont disposées orthogonalement aux flux, les zones rouges sont disposées parallèlement au flux. Les zones noires sont utilisées comme référence.

3.2.3 Mesure de l'anisotropie par P-SPRI

La figure 61-b donne la disposition des zones de mesure en réflectivité. Chaque zone est choisie de manière à avoir une surface sensiblement équivalente (soit environ 0,6 mm^2) et rendre possible une comparaison zone à zone. Nous avons remarqué durant de précédentes expérience que les ions chlorure des solutions tampons basées sur du PBS corrodaient l'or durant les phases où un champ électrique était appliqué. Le tampon utilisé dans la majeure partie de l'expérience a donc été remplacé par du TRIS-formate (TRIS est l'abréviation de 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol). Ce tampon est obtenu en diluant du TRIS-base à 25 mM dans de l'eau déionisée, puis en tamponnant à pH 7,5 la solution par de l'acide formique.

Le substrat, préalablement recouvert d'une couche autoassemblée d'alkanethiols (octadecylthiols), est placé sur la pyramide et un balayage angulaire est effectué en tampon circulant (45 µL / min) de TRIS-formate pour déterminer l'angle de travail. Un saut d'indice est effectué pour normaliser et corriger les données. Il est à noter qu'un résultat sensiblement équivalent a été obtenu par D. Pompon et A. Laisné en utilisant la méthode

des moindres carrés sur la ligne de base temporelle de l'expérience. La correction par le saut d'indice est donc efficace pour ce type de mesure.

L'anisotropie d'une bicouche lipidique a déjà été étudiée par Z. Salamon *et al.* [88, 89, 90] grâce à une technique de spectroscopie SPR. Néanmoins, notre approche permet d'effectuer une mesure de l'état de l'hémimembrane en temps-réel, et sa réponse dynamique à une modification du flux de liquide.

Les résultats que nous présentons ici ont été traitées par le programme décrit dans la section 3.1.4. Un premier test avec champ électrique est effectué au tout début de l'expérience. Les électrodes 1 et 2 sont câblées ensemble sur la sortie « A » d'un potentiostat, et les électrodes 3 et 4 sont câblés à la sortie « B ». Nous utilisons les termes A et B ici car nous utilisons le potentiostat comme source de tension uniquement, il n'y a donc pas d'électrode de travail ou de contre-électrode. Un balayage en tension est effectué entre -1,5 V et + 1,5 V, à la vitesse de 50 mV / sec.

L'hémimembrane supportée est ensuite fusionnée sur la SAM. Cette étape est réalisée directement en tampon PBS (Phosphate Buffered Saline, solution tampon contenant 0,17 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 et 1,8 mM KH_2PO_4) circulant grâce à l'utilisation vésicules de phospholipides, extrudées à 100 nm par passage à travers une membrane poreuse. Ces vésicules vont se déposer sur la surface de la SAM, puis fusionner en une hémimembrane supportée. Une fois que la SAM est totalement recouverte (le signal de réflectivité présente un plateau), de l'eau déionisée est injectée pour détruire par pression osmotique les vésicules résiduelles. Un second balayage en tension est effectué après la fusion des vésicules.

La figure 62 donne une cartographie de la variation de réflectivité induite par le dépôt de l'hémimembrane supportée sur la biopuce. Cette variation de réflectivité est directement corrélée à l'épaisseur de dépôt, il est donc possible de différencier les zones où la membrane a fusionné de manière uniforme des zones où des portions de membranes se sont « empilées ». On peut observer qu'il existe une forte disparité d'épaisseur entre les différents types d'électrodes. Il semble clair que les cycles de tension ont eu un impact sur la fusion de la membrane. Les zones isolées semblent avoir une épaisseur plus importante, alors que les zones appartenant à une électrode ouverte ont une réponse moins forte, voir négative (indiquant une possible désorption). En l'absence d'autres éléments, il est difficile de connaître précisément la nature de la modification apportée par le champ électrique.

Après la construction de l'hémimembrane supportée, l'échantillon est laissé en tampon circulant de TRIS-formate pendant quelques minutes. La pompe est ensuite arrêtée durant quelques secondes pour remplacer le tampon par une solution contenant des PDNA (ceux-

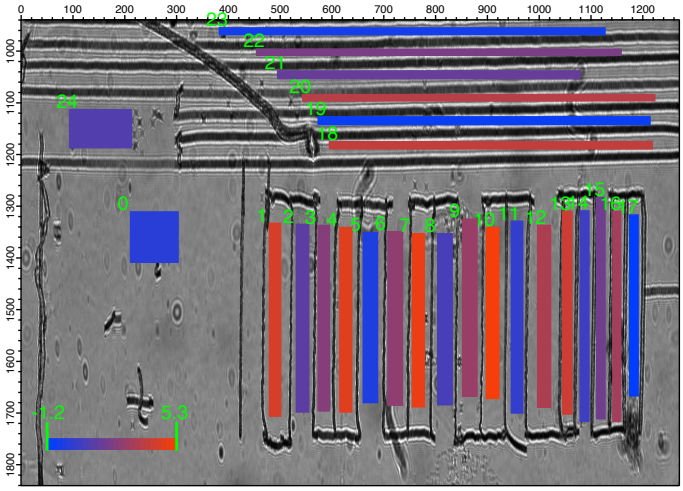


FIGURE 62 – Cartographie de la variation de réflectivité induite par la fusion de l'hémi-membrane supportée. L'échelle de couleurs (en bas à gauche) est en %. Le bleu représente les valeurs les plus négatives (jusqu'à -1,2%), le violet les valeurs proches de la moyenne de prise (environ 2%), et le rouge les valeurs les plus positives (jusqu'à +5,3%).

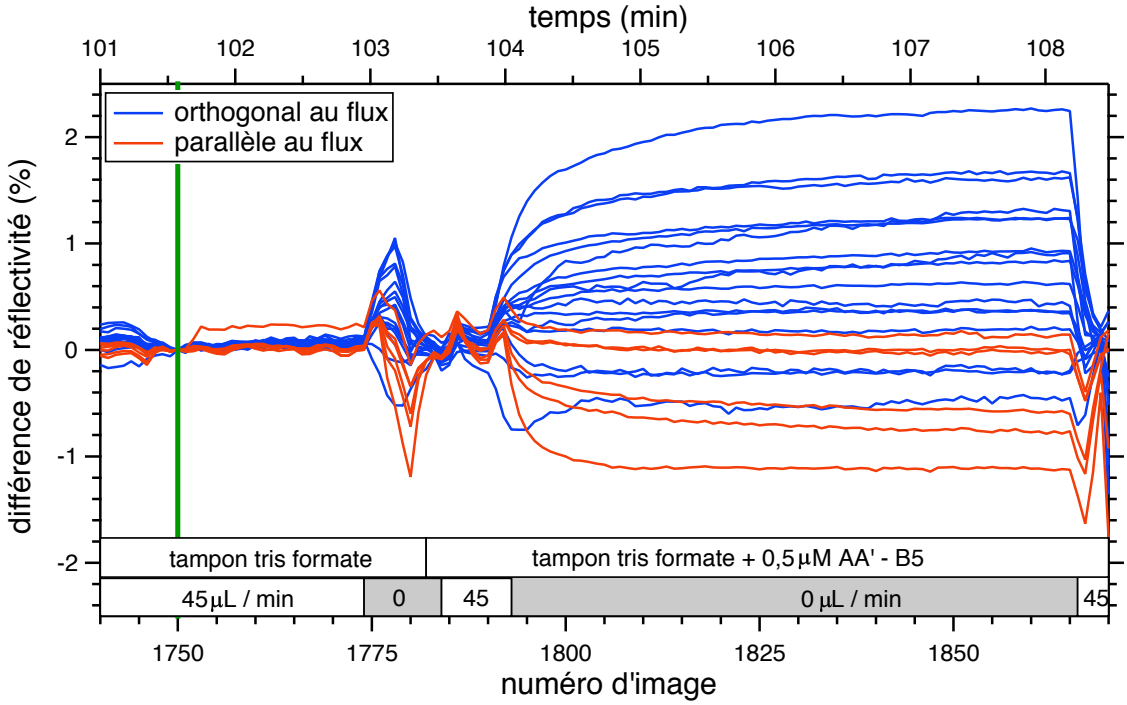


FIGURE 63 – Diagramme temporel de différence de réflectivité lors des l'arrêts et des périodes de fonctionnement de la pompe. La ligne verte indique l'image de référence des courbes. Les courbes bleues indiquent les zones de mesure disposées orthogonalement au flux. Les courbes rouges indiquent les zones de mesure disposées parallèlement au flux.

ci ne jouent aucun rôle dans le phénomène observé). Après environ 1 minute de circulation, la pompe est de nouveau arrêtée. Le chronogramme est présenté dans la figure 63, ainsi que les courbes de réflectivité différentielle résultantes de la soustraction du signal normalisé et corrigé des deux axes.

Nous pouvons observer une anisotropie assez importante (environ 1% en moyenne) durant les périodes de coupure de la pompe. Cela semble indiquer qu'il existe un phénomène de relaxation apparaissant lorsque le flux de liquide est nul. Le phénomène semble lié à une orientation générale que prendrait la SAM ou l'hémimembrane sous l'effet du flux, et dont la relaxation nous apparaîtrait au moment où le flux est coupé. On observerait donc ici de manière dynamique le retour d'un état anisotrope à état isotrope du matériau déposé en surface sur une épaisseur de quelques dizaines de nanomètres au maximum.

Il serait utile, afin de mieux comprendre le phénomène, d'effectuer d'autres mesures similaires à différentes étapes de la chimie de surface. De plus, la caractérisation d'un tel échantillon en AFM permettrait de déterminer la structure des électrodes de manière certaine, et peut-être d'observer une nano-structuration de la SAM aux endroit où un champ électrique a été présent. Malgré toutes ces inconnues, nous avons pu établir de manière certaine un comportement anisotrope de notre échantillon lors d'un changement de régime du flux de liquide.

3.3 Anisotropie de systèmes biologiques sous champ électrique

L'expérience présentée ici s'appuie sur les même principes de fonctionnement que pour la section précédente. Cette fois-ci, une matrice de 8 électrodes a été définie à la place d'un réseau interdigité (voir figure 64). L'idée est de pouvoir faire fonctionner les électrodes par paires, orientant le champ électrique dans un sens ou dans l'autre de la puce. De cette façon, nous pouvons étudier directement l'impact du champ électrique sur l'anisotropie des couches biologiques déposées.

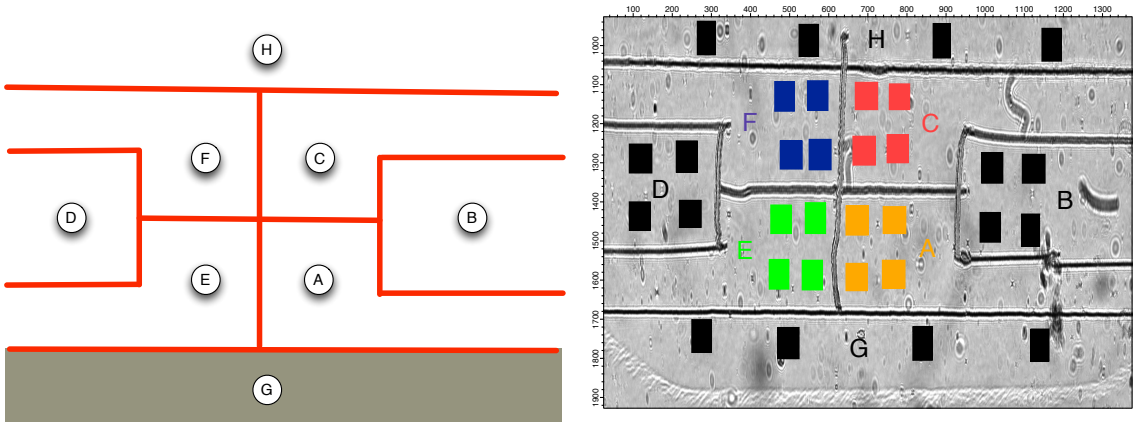


FIGURE 64 – (a) Matrice de 8 électrodes gravées sur la lame d'or. la SAM de l'électrode G a été désorbée électriquement de manière réductive. (b) Image de référence plasmon recalée. Les groupes de couleur représentent des zones de mesure appartenant à la même électrode.

Avant l'expérience, une couche autoassemblée d'alkanethiols (octadecylthiols) a été formée sur l'ensemble de la puce. De cette manière, une couche uniforme isolante [91] recouvre la surface. L'électrode G a été désorbée électriquement de manière réductive, afin à servir d'électrode de référence. Le montage illustré par la figure 65 permet d'effectuer des mesures électrochimiques sur la lame durant l'expérience en P-SPRI.

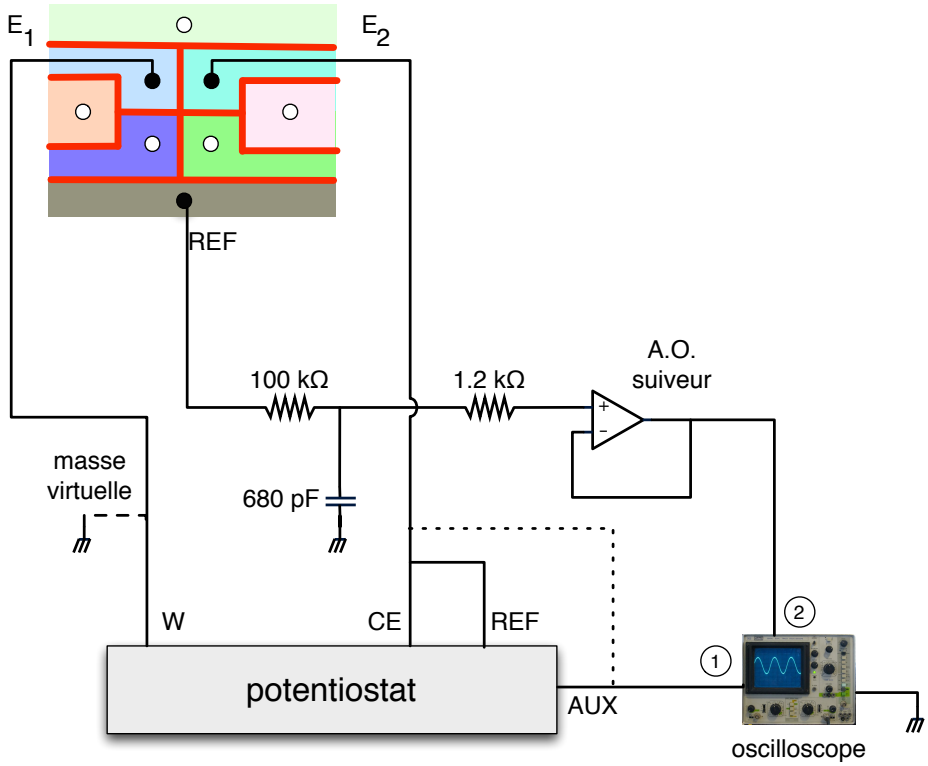


FIGURE 65 – Montage électronique à 3 électrodes utilisé dans l'expérience pour appliquer un champ électrique sur la puce. (puce) E_1 et E_2 sont les électrodes entre lesquelles le potentiel V est appliqué. REF est l'électrode de référence. (potentiostat) W est la sortie pour l'électrode de travail (masse virtuelle), CE (sortie de contre-électrode) et REF (référence) sot reliées ensemble. AUX indique la sortie du potentiostat. Les voies de l'oscilloscope sont symbolisées par leur numéro.

3.3.1 Montage électrique

Le montage est différent d'un système de mesures électrochimiques classiques. Une différence de potentiel est imposée par le potentiostat sur la lame (entre les lignes E_1 et E_2). Le courant circulant dans la lame est mesuré en parallèle par celui-ci. L'oscilloscope est utilisé pour mesurer en parallèle la différence de potentiel entre E_1 et E_2 (sans référence de potentiel) sur la voie 1 et le potentiel d'une électrode par rapport à l'électrode de référence (voie 2). Un filtre passe-bas (RC) permet de filtrer le signal de l'électrode de référence et un amplificateur opérationnel haute impédance , monté en suiveur, est utilisé pour effectuer la mesure de tension à courant nul. Comme il n'existe pas de référence de potentiel au sens électrochimique sur ce montage, les valeurs sont mesurées par rapport à un couple d'oxydo-réduction de référence présent dans la solution tampon : le couple $K_3F_e(CN)_6$ / $K_4F_e(CN)_6$ (ferricyanure / ferrocyanure de potassium, abrégé par le suite en

FCN). L'analyse électrochimique de cette expérience sortirait du cadre de notre travail, aussi nous nous concentrerons sur les résultats obtenus en anisotropie SPR.

Nous avons pu déterminer que la cellule répondait de la manière attendue à une consigne de tension en appliquant des cycles de rampes de tension (de -0,75 V à +0,75 V) sur les électrodes B et D de la puce dans une tampon de TRIS-formate circulant. La tension mesurée sur les voies de l'oscilloscope est enregistrée. Les résultat de cette mesure sont donnés dans la figure 66. On observe un décalage DC entre la tension de consigne et les tensions observées. Ce décalage est dû à l'absence de référence de potentiel physique. Temporellement, les signaux suivent très bien la consigne, le système permet donc créer un champ électrique en surface des électrodes de la puce.

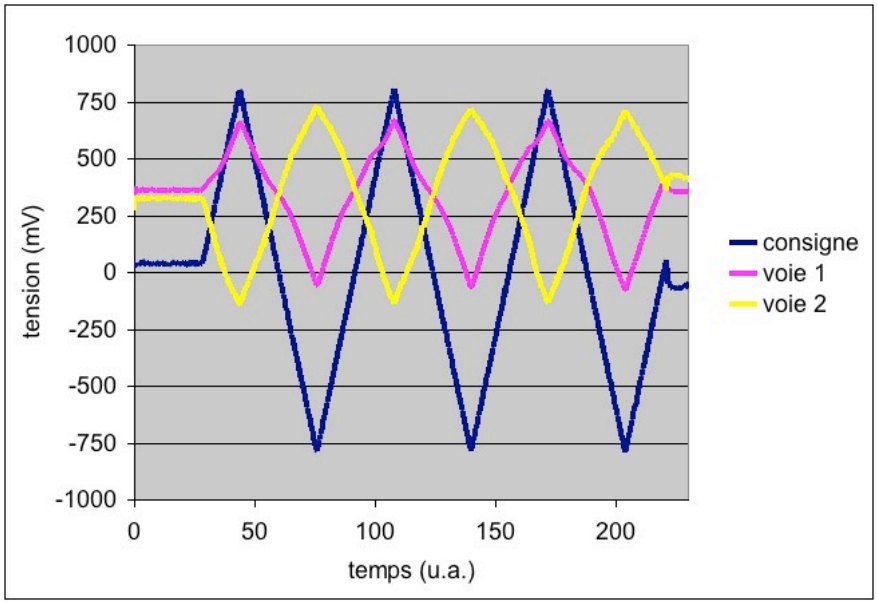


FIGURE 66 – Cycle de rampes de tension (-0,75 V à + 0.75 V) appliqué à la puce, entre les électrodes B et D, et observé à l'oscilloscope. (bleu) tension de consigne, (rose) voie 1, (jaune) voie 2. Les tensions ont été lissées par filtrage des hautes fréquences (transformées de Fourier).

3.3.2 Dépôt de l'hémimembrane

La construction de l'hémimembrane supportée suit le même principe que précédemment. Des vésicules de phospholipides (1 mM), extrudées à un diamètre de 100 nm par passage à travers une membrane poreuse, sont déposées sur la SAM en tampon de PBS circulant. Après obtention d'une couverture uniforme (plateau de variations de réflectivité), les vésicules résiduelles sont éclatées grâce à la pression osmotique engendrée par

l'injection d'eau. Un saut d'indice isotrope est effectué avant et après la construction de la membrane afin de vérifier le bon déroulement de l'opération. Une cartographie du niveau de variations de réflectivité induite par le dépôt de la membrane est indiqué dans la figure 67. La membrane ainsi construite est hétérogène. La variation de réflectivité induite varie entre 0,8% et 3,6%, et ce quelle que soit l'électrode. Le dépôt semble aspécifique car l'électrode désorbée (en bas de l'image) réagit de la même manière que les autres électrodes, malgré une absence supposée de SAM. Il est probable que des vésicules se soient adsorbées de manière non spécifique sur l'or.

Cette hétérogénéité de dépôt est sans doute liée aux conditions expérimentales particulières, où un grand nombre de paramètres doivent être contrôlés en parallèle (chimie de surface, électrochimie, optique, banc polarimétrique, température du laboratoire et des appareils etc.). Des mesures, réalisées par D. Pompon et A. Laisné, ont montré que le taux de phospholipides Ni-DOGS était plus faible dans ces vésicules que pour les vésicules habituellement assemblées.

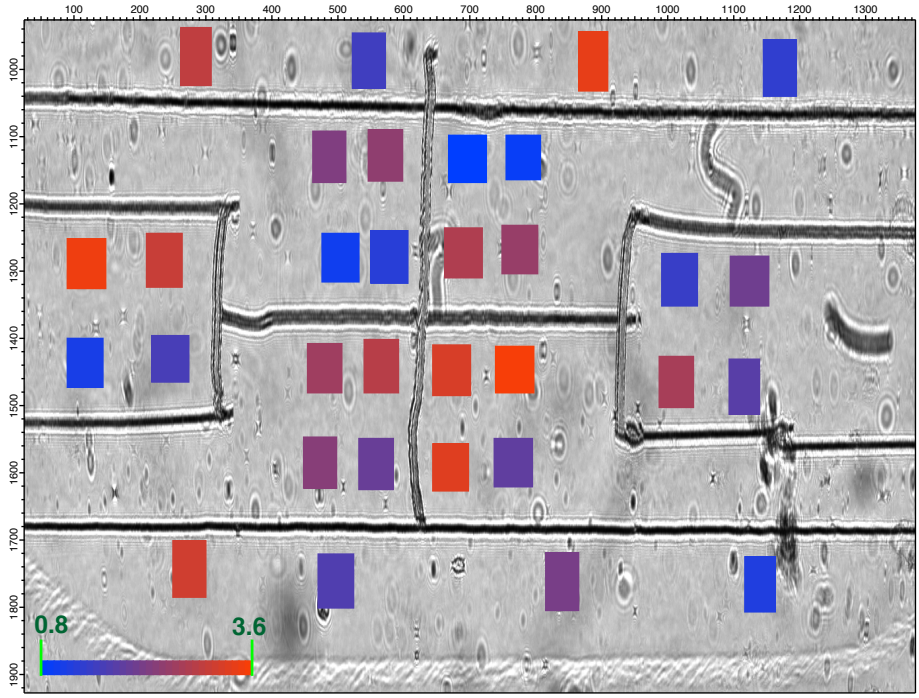


FIGURE 67 – Cartographie de la variation de réflectivité induite par le dépôt de l'hémimembrane lipidique. L'échelle (en bas à gauche) est en %. (bleu) faible variations (minimum 0 ;8%), (violet) variations moyenne (environ 1,4%), (rouge) forte variations

3.3.3 Impulsions électriques

Une fois l'hémimembrane fusionnée, une la configuration d'électrodes suivante est testée :

- l'électrode B est reliée à la ligne E_1 du montage électronique ;
- l'électrode D est reliée à la ligne E_2 ;
- l'électrode G est reliée à la ligne de référence (REF).

Une première série de mesures de voltampérométrie cyclique et de spectroscopie d'impédance sont effectuées avec cette configuration en tampon circulant TRIS-formate et FCN. Ensuite, un ensemble d'impulsions électriques en créneaux sont envoyées à la cellule. Ces impulsions possèdent une amplitude de -1,5 V à + 1,5 V (images 2500 à 2700). Le chronogramme des impulsions, et la réponse en termes de différence de réflectivité SPR, sont indiqués dans la figure 68-a. Cette première série donne un résultat anisotrope sur les électrodes B et D, mais isotrope sur toutes les autres électrodes. Un phénomène intéressant peut être observé : les électrodes sur lequel le potentiel est appliqué semblent posséder un « effet mémoire ». Les première impulsions ne donnent qu'une réponse très faible. Au delà d'un certain seuil, chaque nouvelle impulsion va augmenter la réponse globale de l'électrode, qui conservera son anisotropie, même après la fin de l'impulsion. Ainsi, chaque nouvelle impulsion augmente d'environ -0,2% l'anisotropie de l'électrode D et de manière beaucoup plus faible l'anisotropie de l'électrode B. Il est également possible d'observer un phénomène dynamique lors des période de charge de l'une ou l'autre électrode. Malheureusement, les impulsions sont ici trop courtes pour extrapoler une tendance.

Un suivi en parallèle du potentiel électrique de chaque électrode durant les phases d'impulsions a été effectué pour les trois première impulsion de cette série. La mesure à l'oscilloscope des potentiels correspondants est donnée dans la figure 68-b. La courbe bleue représente la consigne donnée au potentiostat, tandis que les courbes rose et jaune donnent la valeur du potentiel réel (par rapport au couple d'oxydo-réduction FCN) mesuré sur les électrodes B et D. Un filtrage par transformée de Fourier a été appliqué aux tensions mesurées. On observe assez nettement une relaxation survenant lors d'un changement de régime de chaque électrode. Un temps de relaxation d'environ 10 à 15 sec est mesurable a partir de ces données, qui semble correspondre à la dynamique de signal observée en SPR.

Afin de vérifier la réversibilité du phénomène, les électrodes sont alors reliées de manière différente :

- l'électrode F est reliée à la ligne E_1 du montage électronique ;
- l'électrode E est reliée à la ligne E_2 ;

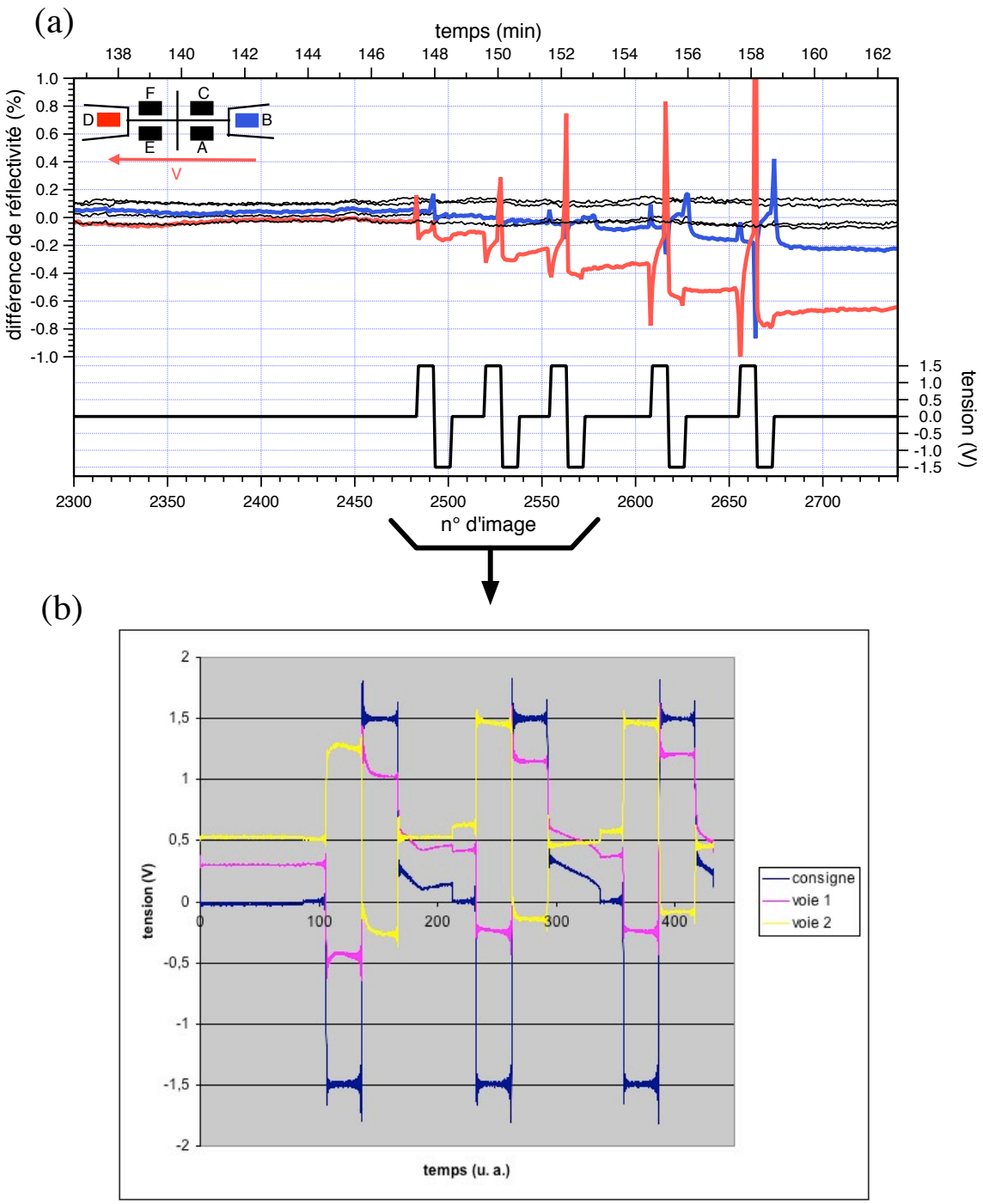


FIGURE 68 – (a) Différence de réflectivité résultante d'une série d'impulsions électriques carrées envoyées entre les électrodes B et D de la puce. Le chronogramme (en bas du graphique) représente la consigne de tension donnée au potentiostat. Légende des courbes : (rouge) Électrode D, (bleu) électrode B, (noir) électrodes A,C,E et F. (b) Suivi à l'oscilloscope de la tension pour les 3 premières impulsions carrées. (bleu) tension de consigne, (rose) voie 1, (jaune) voie 2. Les tensions ont été lissées par filtrage des hautes fréquences (transformées de Fourier).

– l'électrode G est reliée à la ligne de référence (REF).

On procède alors à une autre série d'impulsions de -1,5 V à +1,5 V en créneaux de durée variable, de la même manière que précédemment. Les résultats sont détaillés dans la figure 69. On observe là encore une anisotropie sur les électrodes E et F, alors que les autres électrodes restent isotropes. Les impulsions effectuées aux images 4450 et 4550 semblent indiquer que la durée des impulsions est également un facteur déterminant dans l'accentuation de l'anisotropie, car les amplitudes des signaux augmentent pour des impulsions plus longues. Pour chaque électrode reliée, on peut observer un cycle d'augmentation / diminution de l'anisotropie, correspondant aux périodes de charge de l'électrode. Les deux électrodes ont un comportement en opposition l'une par rapport à l'autre, c'est à dire que lorsque qu'une électrode réagit positivement, l'autre réagit négativement. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les cycles de polarisation / dépolarisation électrique des électrodes se traduisent en une structuration anisotrope de la surface de l'électrode. Chen *et al.* ont étudié dans un article récent [92] une bicouche déposée sur une SAM reposant sur de l'or Au(111) soumis à différentes tensions et températures. Il ont observé que l'angle formé par les chaînes de thiol avec la surface changeait en variant le potentiel. Ce changement est de l'ordre de 8° pour une variation de 1 V. Notre montage applique des tensions similaires, et il est possible de que la SAM subisse le même type de changement d'orientation. La membrane elle-même subit de nombreuse transformations, et il est difficile de tirer des conclusions définitives à ce stade.

Finalement, la dernière partie de l'expérience consiste à reproduire les impulsions avec une nouvelle configuration d'électrodes :

– l'électrode F est reliée à la ligne E_1 du montage électronique ;
– l'électrode C est reliée à la ligne E_2 ;
– l'électrode G est reliée à la ligne de référence (REF).

Les résultats sont représentés dans la figure 70. On observe également une anisotropie des électrodes, mais cette fois-ci les électrodes E et F conservent l'anisotropie acquise durant les impulsions précédentes. L'électrode C, jusque là parfaitement isotrope, acquiert une très forte anisotropie (jusqu'à -2%) en quelques impulsions. La durée des impulsions plus longue peut expliquer la rapidité du mise en place du phénomène. Durant les phases de charge des électrodes, on peut observer une dynamique similaire aux mesures précédentes, à savoir une réponse asymétrique d'une électrode à l'autre. Le phénomène est réversible dans la mesure où les courbes reviennent à la ligne de base entre deux impulsions, mais les électrodes conservent une anisotropie importante après l'impulsion.

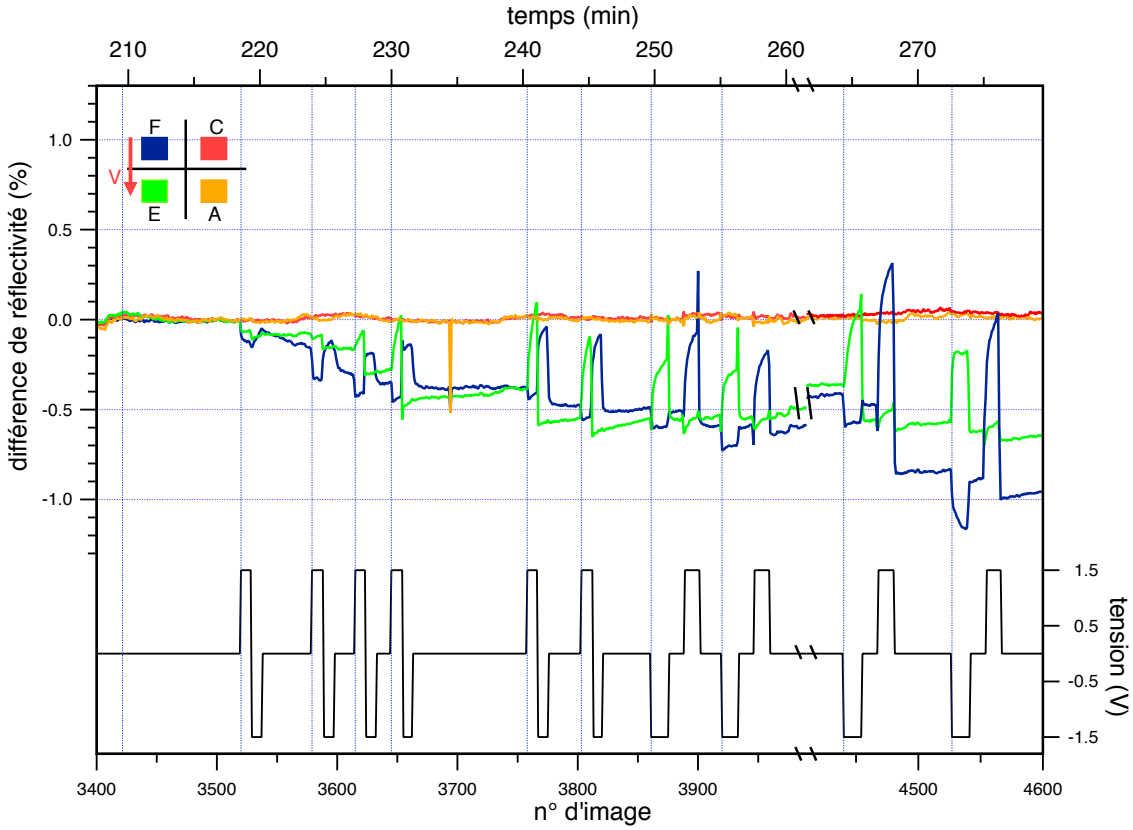


FIGURE 69 – Différence de réflectivité, mesurée pour chaque électrode de la puce, résultante d'une série d'impulsion électriques carrés de durée variable. La tension est établie entre les électrodes E et F de la puce. Le chronogramme (en bas du graphique) représente la consigne de tension donnée au potentiostat. Légende des courbes : (orange) électrode A, (rouge) électrode C, (vert) électrode E, (bleu) électrode F. Les données de SPR sont non filtrées.

3.3.4 Discussion

Il est utile à ce point de résumer les observations que nous avons pu tirer de cette expérience. Nous avons pu observer que la SAM, considérée comme un isolant [91], permettait à un champ électrique de s'établir lors des impulsions. Nous pouvons supposer que ce champ électrique n'est pas dû à l'oxydation de l'or lui-même [93], car nous avons pu observer la formation d'une membrane sur la puce. Il n'est en revanche pas impossible de supposer que la couche d'or subit une détérioration après plusieurs impulsions. Le signal anisotrope observé est réversible en dessous d'un seuil. Celui-ci peut dépendre du nombre d'impulsions, et de leur durée. Au delà de ce seuil, les modifications apportées sont irréversibles et l'anisotropie est conservée. Cette hystérésis de la couche peut s'interpréter comme une désorption partielle de la SAM ou de la membrane. En dessous du seuil, il

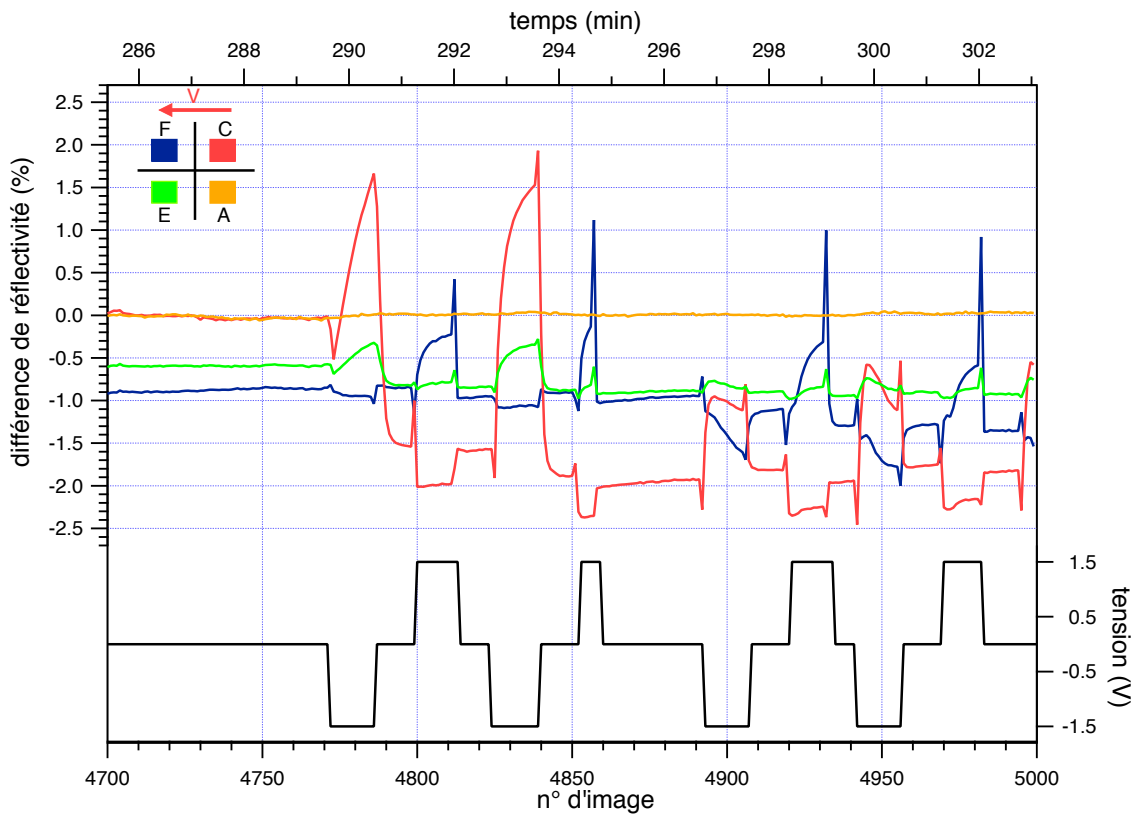


FIGURE 70 – Différence de réflectivité, mesurée pour chaque électrode de la puce, résultante d'une série d'impulsion électriques carrés de durée variable. La tension est établie entre les électrodes F et C de la puce. Le chronogramme (en bas du graphique) représente la consigne de tension donnée au potentiostat. Légende des courbes : (orange) électrode A, (rouge) électrode C, (vert) électrode E, (bleu) électrode F. Les données de SPR sont non filtrées

semble que les molécules changent d'orientation sous l'effet du champ électrique appliqué. Des mesures complémentaires seront nécessaires pour avancer plus d'hypothèses. Les caractéristiques capacitives de la SAM pourront être par exemple observées en voltamétrie cyclique et en spectroscopie d'impédance, et la structure de la couche observée en AFM.

Nous avons mis en évidence au cours de cette expérience un comportement anisotrope de la monocouche autoassemblée d'alkanethiols sous l'influence d'un champs électrique. En modifiant l'orientation du champ, le comportement a pu être reproduit, éliminant ainsi un possible artefact de mesure.

3.4 Filaments orientés sous champs magnétique

L'expérience présentée dans cette section a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec M. Trévisan, Y. Chevolot, J.P. Cloarec et E. Souteyrand de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL). Le principe de l'expérience est le suivant : une lame d'or est fonctionnalisée de manière à recevoir des billes de latex contenant des inclusions magnétiques. Ces billes sont polymérisées ensemble sous champ magnétique, ce qui permet de former des filaments de billes de plusieurs dizaines de microns de long, ancrés sur la surface d'or. Une fois la polymérisation terminée, les filaments sont caractérisés tout d'abord sous microscope optique, puis avec le banc de P-SPRI. Afin d'orienter les filaments dans une direction particulière, un aimant de forte puissance est positionné à proximité de la biopuce durant l'expérience. La position de l'aimant est modifiée de manière à faire « tourner » l'aimantation au niveau de la surface, et par conséquent à orienter les filaments attachés. Il devrait être possible d'observer un signal anisotrope résultant de la rotation d'un grand nombre de filaments sur la surface.

Nous développerons dans cette section principalement les résultats obtenus par le banc de P-SPRI, les résultats plus spécifiques à la chimie de surface et à la manipulation de billes magnétiques [94] sera présenté en détail par M. Trévisan dans le cadre de ses travaux de doctorat. Une revue des différentes applications des billes magnétiques est présentée dans [95].

Cette expérience est le résultat de quatre étapes successives. La première étape consiste à préparer des substrats d'or structurés. Ils sont ensuite fonctionnalisés chimiquement afin de recevoir les billes magnétiques, qui formeront des filaments. Enfin deux étapes de caractérisation ont été effectuées : la première optique, sous microscope, et la seconde avec le banc de P-SPRI.

3.4.1 Substrats structurés

Ces expériences ayant débuté avant la mise au point de l'algorithme de recalage décrit précédemment, il était nécessaire d'utiliser des substrats présentant une structure macroscopique visible à fort contraste, afin de repositionner correctement une image sur l'autre. Dans le cadre d'une collaboration avec S. Held, P. Gogol et B. Bartenlian de l'Institut d'Électronique Fondamentale d'Orsay, nous avons pu obtenir des lamelles de verre sur lesquelles était déposé un ensemble de carrés d'or d'1 mm de coté. Ces lamelles ont été obtenues par lithographie UV, dépôt d'or par évaporation thermique et lift-off à la centrale de technologie MINERVE, à partir de lames de verre SF11 polies par l'atelier d'optique de l'Institut d'Optique Graduate School. Les motifs obtenus sont présentés sur la figure 71.

Ces motifs ont également été utilisé dans de nombreuses expériences, comme par exemple les sauts d'indices de glycérol présentés plus haut.

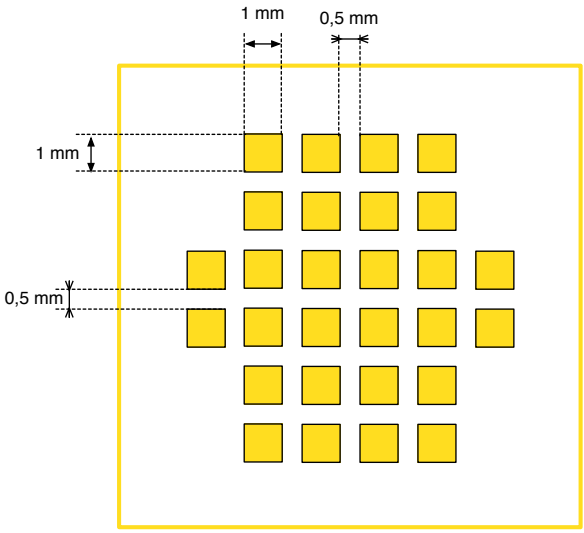


FIGURE 71 – Motif utilisé pour les expériences sur des billes magnétiques

3.4.2 Fonctionnalisation chimique de la surface et greffage des billes

Les lamelles structurées ainsi obtenues doivent être fonctionnalisées chimiquement afin de pouvoir :

- greffer de manière localisée et covalente les billes magnétiques sur les surfaces d'or ;
- éviter la physisorption de ces même billes sur le substrat (verre ou or).

La fonctionnalisation chimique est réalisée en deux étapes. La première étape a pour objet de générer des fonctions carboxyliques sur les surfaces d'or pour le greffage des filaments. Après nettoyage des substrats, ceux-ci sont immergés dans une solution alcoolique de contenant du 11-mercapto 1-undécanoïque acide. Avec le temps, ces molécules thiolées vont se déposer à la surface pour former une monocouche autoassemblée présentant des fonctions carboxyliques. Lors de la deuxième étape, des chaines de polyethylène glycol sont greffées à la surface du verre par réaction du 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane avec les silanols de surface.

Les billes utilisées dans cette expérience sont fournies par Sigma Aldrich et ont pour diamètre 1 µm. Elles possèdent un cœur composé d'oxyde de fer, entouré d'une couche de polymères comprenant des terminaisons carboxyle (voir la figure 72-a). Les réactions

de polymérisation et de greffage se font simultanément en exploitant les fonctions carboxyliques à la surface des billes et de l'or en présence d'une diamine. La première étape consiste à activer les acides carboxyliques présents à la surface de l'or et des billes en solution. Afin de limiter les phénomènes d'évaporation la réaction de polymérisation/greffage est réalisé en chambre *Coverwell*.

10 µL de la solution de billes activées en suspension (reconcentrées pour avoir une densité de filaments suffisante pour obtenir un signal en SPR) sont déposées sur le substrat. Une quantité suffisante pour remplir la chambre de SDS 0,1 % (m :m) et de solution de polymérisation (2 µL de Jeffamine 1 %) sont ajoutées. L'ensemble est laissé sous aimantation pendant une nuit dans une enceinte humide.

De cette manière, les billes vont immédiatement s'orienter en suivant les lignes de champ magnétique, puis, sous l'action de la solution de polymérisation, elles vont polymériser entre elles (voir la figure 72-b). Ainsi, nous obtenons des filaments de billes dont les dimensions peuvent atteindre une longueur de plusieurs dizaines de microns pour quelques microns de large.

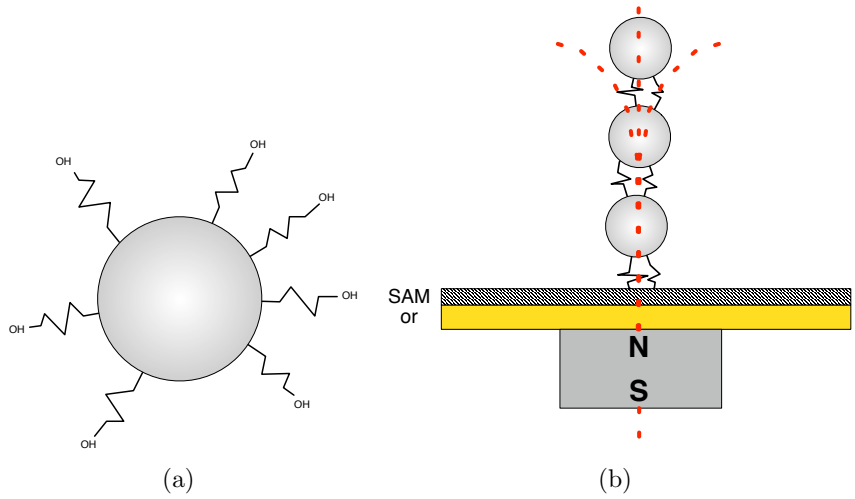


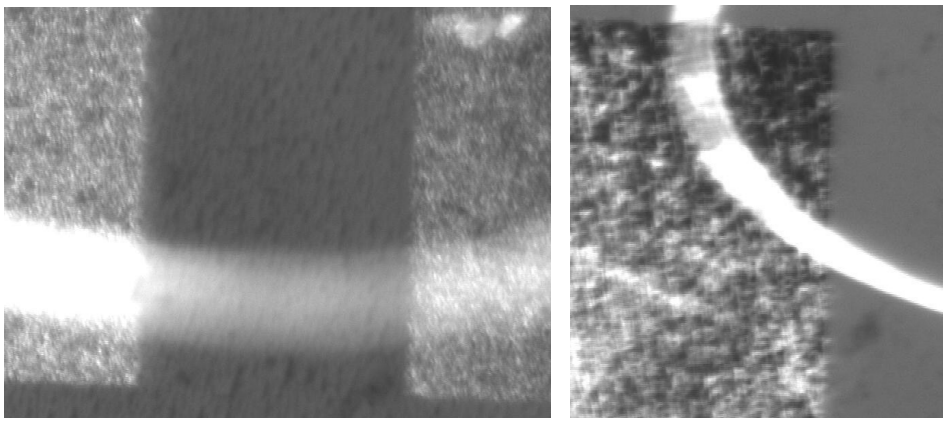
FIGURE 72 – (a) Bille magnétique comprenant un cœur ferreux et une surcouche de polymères. (b) Billes polymérisées sous aimant (les lignes de champs sont représentées par des pointillés rouges).

3.4.3 Caractérisation optique

Nous avons tout d'abord observé l'échantillon supportant les filaments sous microscope optique et loupe binoculaire. Les oculaires étant reliés à une caméra CCD, il a été possible

de capturer le mouvement des billes en temps-réel lors du déplacement de l'aimant. Nous avons ainsi reproduit les positions de l'aimant indiquées dans la figure 74 afin de faire une « répétition » de l'expérience qui aura lieu en P-SPRI. Des exemples d'images de filaments orientés sont données dans la figure 77, en même temps que les résultats de l'expérience en P-SPRI.

La figure 73 donne deux exemples de filaments observés à deux grossissements différents de la loupe binoculaire. On peut observer assez clairement les filaments individuels greffés sur la surface d'or fonctionnalisée. L'image 73-a est typique de ce qu'il est possible d'observer lorsqu'il reste des filaments en solution. Ceux-ci sont présents aussi bien sur l'or (zones claires) que sur le verre (zones sombres). Après rinçage, seuls les filaments greffés sur l'or restent visibles (image 73-b). Afin de réduire le bruit de lecture, nous avons donc procédé à un rinçage de la lame avant de l'observer en P-SPRI.



(a) (b)

FIGURE 73 – Filaments de billes orientés observés sous loupe binoculaire à deux grossissements différents. (a) Avant rinçage, les filaments apparaissent sur toute la surface. Les zones claires appartiennent aux carrés recouverts d'or, tandis que les zones appartiennent au substrat de verre. L'aspect désordonné de la couche provient du fait que l'observation est faite à travers toute l'épaisseur de la chambre, on observe donc filaments en solution et les filaments greffés. (b) Après rinçage, et à un grossissement plus important, seuls les filaments greffés restent visibles. La trace blanche est l'entrée de la chambre *Coverwell*, et n'a pas d'intérêt pour l'observation.

3.4.4 Mesure de l'anisotropie par P-SPRI

Afin de pouvoir observer les filaments de manière dynamique en fonction de la position de l'aimant, nous avons dû procéder à un certain nombre d'ajustements par rapport au

système de P-SPRI tel que présenté dans le chapitre 2.

Le majeur problème est ici de pouvoir obtenir une aimantation suffisante pour observer un changement de position des filaments. Les aimants utilisés ici sont certes puissants (barreaux néodyme/fer/bore développant environ 1T au contact), mais la décroissante rapide du champ magnétique en fonction de la distance fait que le champ disponible n'est que d'environ 0,2 à 0,3 T à 5 cm de distance. Il faut donc se rapprocher suffisamment de l'échantillon, sans toucher d'éléments optiques (pyramide ou lentilles). De plus, le champ magnétique risque d'être moins uniforme (présence d'une grande masse métallique à proximité, c'est à dire le banc en lui-même), et difficilement contrôlable (nécessité de trouver un système de positionnement précis et ayant une bonne répétabilité, sans transmettre de vibrations aux optiques). La solution que nous présentons ici est fonctionnelle, mais elle ne permet de résoudre tous les problèmes évoqués.

L'aimant est maintenu par un un bras mécanique quelques centimètres en dessous de la lamelle, ainsi les filaments auront tendance à se plaquer contre la surface et donc à augmenter le signal capturé. Trois positions autour de la lamelle sont fixées grâce à l'utilisation de bases « trait-point-plan », positionnant l'aimant à 5 cm du bord de la pyramide. Ces trois positions, nommées *pos1* pour un aimant le long de l'axe 1, *pos2* pour un aimant le long de l'axe 2 et *pos0* pour un aimant à 45, ainsi que l'échantillon et les systèmes optique et mécaniques sont représentés sur la figure 74. Nous pouvons voir que la position 0 (45°) est directement en face d'une pièce métallique du châssis du banc de P-SPRI, ce qui nous empêche de nous approcher plus de l'échantillon.

Une autre modification du banc est liée à la façon dont la chimie de surface est faite sur la lamelle. En effet, les billes magnétiques doivent rester en permanence immergée dans du tampon. Leur séchage impliquerait qu'elle ne seraient plus mobile à la surface. Nous devons donc utiliser une cuve plastique collée sur la lame, possédant un trou d'entrée et un trou de sortie de liquide. Cela implique que nous ne pouvons pas utiliser la partie haute du banc, à savoir la cuve de fluidique et la pompe péristaltique. De ce fait, il n'y a pas de pression exercée sur la lamelle et sur l'huile d'indice. Ceci pose des problèmes au niveau de la stabilité de la lame. En effet, la pression exercée par la cuve sert également à maintenir un bon positionnement axial de la lamelle par rapport aux faisceaux. Le système sera donc beaucoup plus sensible aux vibrations, ce qui risque de s'avérer problématique lors du positionnement du bras contenant l'aimant sur les bases.

Le protocole expérimental suivi est essentiellement celui décrit tout au long de ce chapitre. Néanmoins, il n'a pas été possible d'effectuer un saut d'indice isotrope. La lamelle utilisée ici avait déjà subit plusieurs manipulations (lavages etc.), il devenait plutôt hasar-

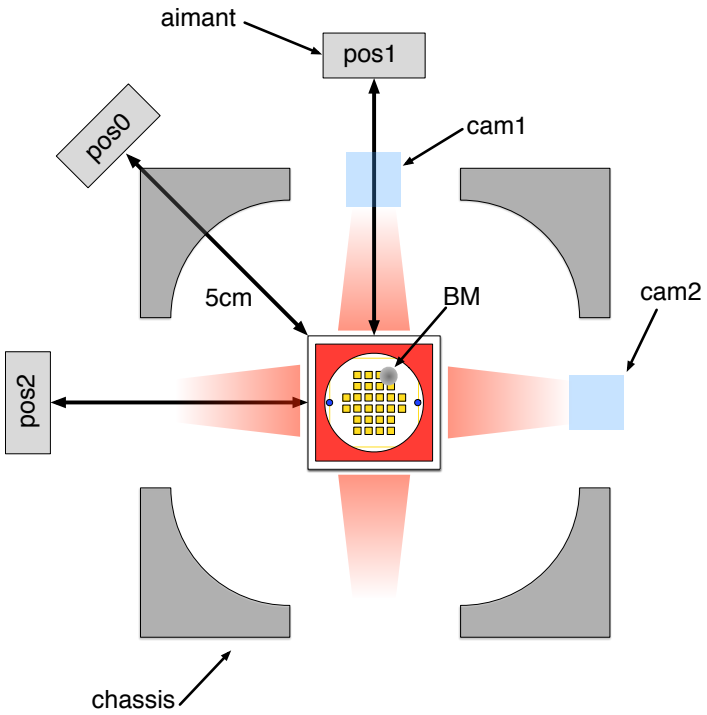


FIGURE 74 – Positions de l'aimant autour de l'échantillon. « BM » indique la position des billes magnétiques, « cam1 » (resp. « cam2 ») représente la position de la caméra de l'axe 1 (resp. axe 2). Le châssis métallique est représenté en gris, autour de l'échantillon.

deux de tenter un rinçage supplémentaire. Cette absence de correction par saut d'indice ne nous permettra donc pas d'obtenir des résultats quantitatifs précis. Cependant, au vu des imprécisions dues à la manipulation de l'aimant, des résultats qualitatifs devraient suffire à valider notre expérience.

La première étape consiste à positionner une grille de points sur une image de référence obtenue après balayage angulaire. La figure 75 indique le positionnement des points sur la lamelle. Afin de s'affranchir du bruit, particulièrement important du fait des vibrations, un moyennage spatial de 80×80 pixels (soit environ $0,6 \times 0,6$ mm) est utilisé.

Pour observer l'effet de l'aimant à diverses positions et dans diverses orientations sur les filaments, nous avons effectué un enchaînement dans le temps de positions *pos0* - *pos1* - *pos2*, le tout sous trois orientations différentes de l'aimant. Nous ne présenterons ici que les résultats concernant une orientation de l'aimant que nous avons nommée *a1*. Cette orientation, ainsi que la position de l'aimant dans l'espace durant l'expérience est indiquée dans la figure 76. Chaque position est conservée pendant environ 3 minutes, afin de laisser suffisamment d'images s'accumuler. Nous utilisons à cet effet un moyennage

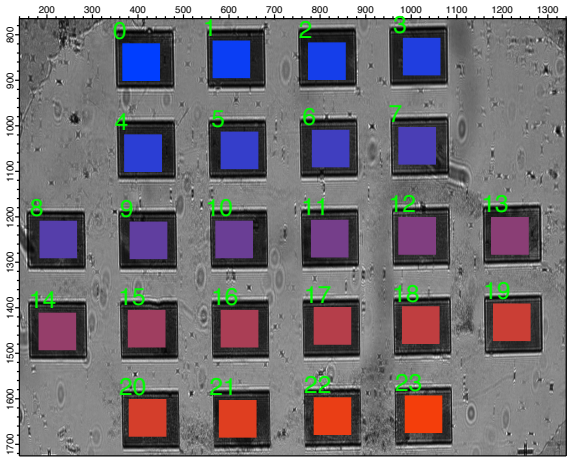


FIGURE 75 – Positions des points sur la lamelle utilisée dans l'expérience.

temporel de 32 images.

Les résultats de l'expérience sont indiqués dans la figure 77, pour l'orientation *a1* de l'aimant. C'est avec cette orientation que nous avons obtenu les meilleurs résultats. Nous nous plaçons tout d'abord en position *pos0* de l'aimant, soit à 45° entre l'axe 1 et l'axe 2, où nous prenons une référence temporelle. Nous déplaçons ensuite l'aimant en *pos1* soit 0° par rapport à l'axe 1, puis *pos2* soit 90° par rapport à l'axe 1. Comme le positionnement du bras sur les bases « trait-point-plan » est manuel, et que cela entraîne des vibrations, nous conservons une marge de transition (représentée par la lettre « T » sur le chronogrammes de la figure 77) à chaque passage d'une position à l'autre. La durée de cette transition est fixée à 4 images, soit environ 30 secondes, ce qui est amplement suffisant pour accomplir un déplacement de l'aimant et son positionnement correct. Le chronogramme (bas) de la figure illustre les orientations des filaments observées lors de l'exécution d'une séquence indique sous microscope optique.

Afin de pouvoir comparer les différents points, sans avoir recours à un saut d'indice isotrope permettant de normaliser le signal, nous considérons que les filaments sont restés groupés sur un seul carré, à savoir celui correspondant au point numéro 23 sur la figure 75. En effet, nous avons pu observer sous microscope que les filaments étaient majoritairement regroupés sur ce carrés après rinçage. Cette hypothèse posée, nous pouvons considérer les points à l'opposé du point 23 sur la puce comme suffisamment stables et ne contenant pas de filaments pour servir de référence. Nous avons donc soustrait à tout les signaux, celui du point 0. Pour indiquer le niveau de signal de cette référence et de ses voisins, nous avons indiqué sur la figure 77 par un trait bleu, le signal du point 1, normalisé par

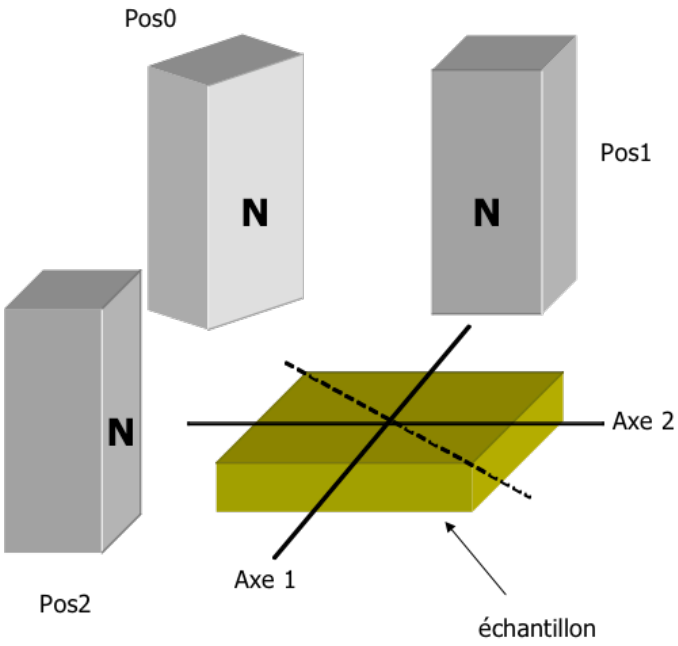


FIGURE 76 – Position *a1* de l'aimant et son placement autour de l'échantillon (positions *pos1*, *pos2* et *pos0*). Le pôle nord est situé sur une grande face (indiqué par la lettre N).

rapport à la référence. De la même manière, nous avons matérialisé le signal normalisé du point 23 par un trait rouge.

Le niveau des signaux durant cette expérience étant très faibles (de l'ordre de $10^{-1}\%$ pour un bruit d'environ $10^{-2}\%$), nous avons finalement procédé à un lissage par la méthode des moindres carrés à pondération locale (ou méthode de LOWESS pour Locally-Weighted Least Squares), avec une fenêtre glissante de 16 points. Les résultats lissés sont indiqués sur la figure par un trait plus épais.

3.4.5 Discussion des résultats

En observant les résultats obtenus par le banc de P-SPRI pour cette expérience, nous pouvons affirmer qu'il existe bien un signal anisotrope à l'endroit où se situent les filaments magnétiques. Les résultats les plus probants apparaissent ici lorsque l'aimant est orienté en position *a1*. On observe une brusque variation du signal sur le plot 23 après déplacement de l'aimant, passant d'environ $\Delta R = -0,01\%$ à 45° , à environ $\Delta R = -0,08\%$ à 0°. Le phénomène se reproduit dans l'autre sens entre 0° et 90° : de $\Delta R = -0,08\%$ à $\Delta R = -0,04\%$. Pour les autres orientations de l'aimant, des phénomènes similaires apparaissent, mais de manière moins nette. Néanmoins, il est toujours possible de corréler une variation

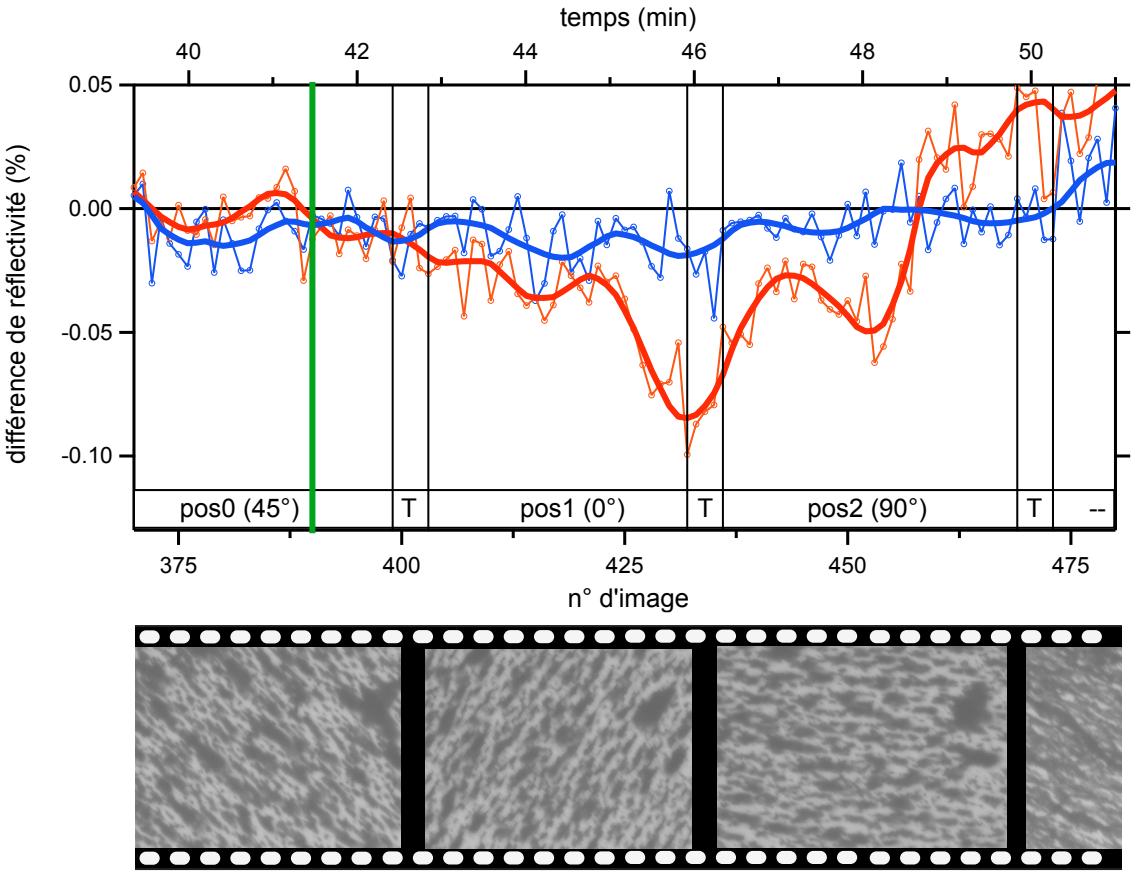


FIGURE 77 – (haut) Mesure de l'anisotropie de filaments par P-SPRI pour l'orientation *a1* de l'aimant. La ligne verte indique la référence temporelle des mesures. La courbe bleue correspond au point 1 (sans filaments), la courbe rouge au point 23 (contenant les filaments). Les courbes épaisses sont un lissage LOWESS 16 points des données brutes (marqueurs). (bas) Chronogramme des images observées au microscope correspondantes.

du signal brusque sur le point 23 avec un déplacement de l'aimant.

Cette expérience nous permet d'observer indirectement les perturbations induite par la présence de l'aimant d'un coté ou de l'autre de la lamelle sur un ensemble de filaments magnétiques ancrés à la surface d'or. Les imprécisions dans le positionnement mécanique de l'aimant, les vibrations induites par le déplacement ou la sensibilité aux lignes de champ sont sans doute responsables de beaucoup des oscillations observées au sein d'une même plage temporelle.

Les signaux très faibles observés doivent pouvoir s'expliquer par le fait que les plasmons de surface ne pénètrent que sur une profondeur assez faible dans le milieu constitué par la SAM et les filaments magnétiques. Sur notre banc, l'intensité du champ évanescent atteint

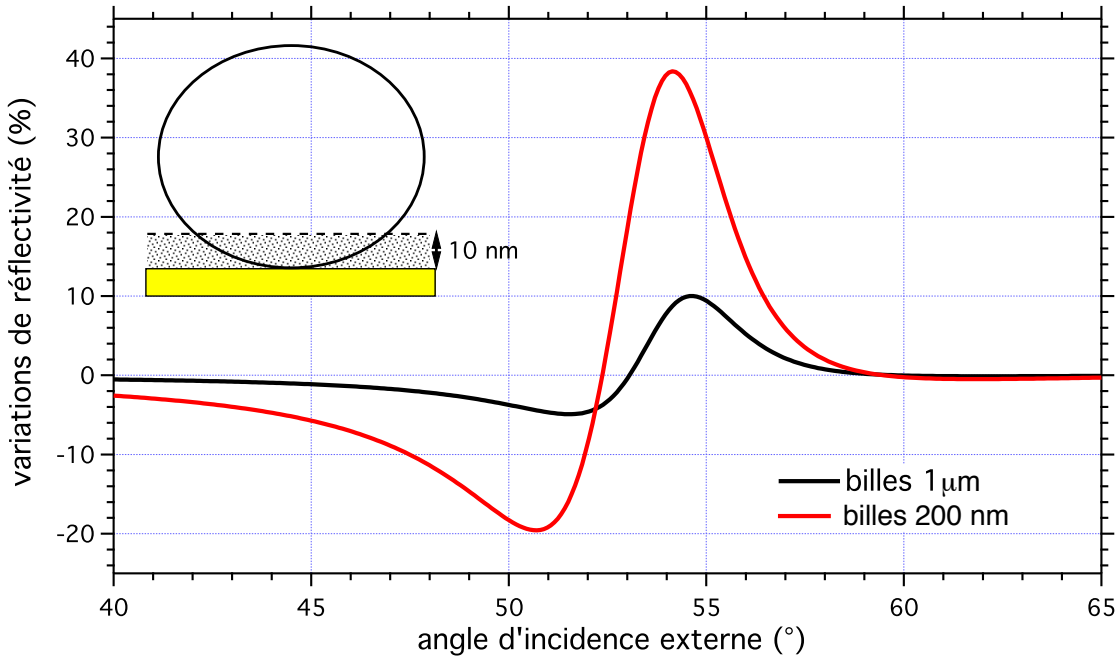


FIGURE 78 – Simulation de la variation de réflectivité induite par le dépôt de billes de PMMA sur la surface d'or. Le calcul utilise une couche équivalente de 10 nm d'épaisseur, d'indice effectif calculé par la relation de Lorentz-Lorenz. (rouge) billes de 200 nm de diamètre. (noir) billes d'1µm de diamètre.

$1/e$ à 273 nm, il est donc raisonnable de considérer que la champ évanescent ne se propage plus au delà des 300 à 400 premiers nanomètres du milieu. Plus le diamètre de la billes utilisée est important, et plus le contraste d'indice engendré par la présence de la bille est faible. Pour clarifier, en se positionnant à 10 nm de la surface, on peut déterminer que l'indice de réfraction du milieu sera constitué à 20% de matériau appartenant à la bille de 1 µm et de 80% de tampon. En utilisant des billes de 200 nm de diamètre, le ratio devient 87% de matériau appartenant à la bille. La sensibilité obtenue dans le cas de billes de 200 nm est donc beaucoup plus importante. Nous avons effectué une simulation, donnée dans la figure 78, illustrant ce fait. En calculant par la relation de Lorentz-Lorenz l'indice de réfraction effectif moyen d'un milieu de 10 nm d'épaisseur constitué d'un mélange de bille (PMMA) et d'eau, nous pouvons tracer la variation de réflectivité induite par le dépôt des billes sur la surface d'or. Il advient que les billes de 200 nm donneraient une réponse 4 fois plus importante que les billes de 1 µm de diamètre.

Malgré les différents points évoqués, cette expérience nous montre qu'une anisotropie induite par l'orientation de filaments de tailles microniques sous l'effet d'un champ magnétique est observable de manière nette avec le système de P-SPRI. De futures expériences

permettrons sans aucun doute de franchir les limitations de taille (avec des billes de 200 nm par exemple), de stabilité des mesures (en améliorant le dispositif mécanique), et de précision, afin de pouvoir passer d'une mesure qualitative à une mesure quantitative de l'anisotropie. Il serait alors envisageable de remonter à une information angulaire, et par là, remonter à la position de l'aimant en observant l'anisotropie.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord mis en place un algorithme de traitement des données générées par le système de P-SPRI. Celui-ci s'appuie en premier lieu sur le calcul d'un vecteur de recalage spatial pour aligner les images issues de chaque axe avec une précision proche du pixel. Les données ainsi recalées sont ensuite normalisées au sein de chaque axe (**normalisation intra-axe**), puis corrigées entre-elles (**correction inter-axes**). Il est ainsi possible, en utilisant un moyennage spatial suffisant, de comparer le niveau de réflectivité des deux axes pour extraire la différence de réflectivité de l'échantillon. Cette différence est directement liée à l'anisotropie optique de l'échantillon. Nous avons vu que la mesure en P-SPRI sur un échantillon isotrope n'entrainait pas d'anisotropie artefactuelle grâce à l'algorithme mis au point.

Nous avons ensuite utilisé le système de P-SPRI pour déterminer l'anisotropie dynamique d'échantillons, principalement due à une orientation de molécules dans une direction privilégiée. En utilisant de nouvelles structures basées sur les PDNA, nous avons caractérisé l'anisotropie d'une couche autoassemblée de d'alkanethiols. Une première expérience a fait apparaître une forte sensibilité de la couche aux changements de régime d'un flux de liquide en surface. Cette anisotropie, caractérisée par P-SPRI, semble provenir de la relaxation de la couche lors que le flux est arrêté. Une seconde expérience, basée cette fois sur l'utilisation d'un champ électrique parallèle à la surface de la puce, a montré qu'il était possible de structurer de manière anisotrope une hémimembrane de phospholipides et la couche de d'alkanethiols sous-jacente. Cette structuration anisotrope électrique possède un seuil au delà duquel le phénomène n'est plus réversible.

Finalement, nous avons observé l'orientation dynamique de filaments magnétiques microniques sous l'effet d'un champ magnétique d'orientation variable. L'observation en P-SPRI a pu être corrélée avec une observation directe des filaments sous microscope optique. Il résulte de nos observations qu'une anisotropie faible (de l'ordre de 0,1% de signal SPR) peut être observée entre deux orientations de l'aimantation. Des performances supérieures sont attendues grâce à l'utilisation de billes d'un diamètre inférieur.

4

Micro– et nano–structuration anisotrope de substrats

Sommaire

Introduction **128**
4.1 Modélisation de réseaux métalliques par la méthode modale de Fourier **129**
4.1.1 Méthode modale de Fourier 130
4.1.2 Étude de réseaux métalliques 1D : or structuré sur verre 133
4.1.2.1 Couche métallique uniforme 135
4.1.2.2 Structures métalliques sur verre 136
4.2 Dépôts de couches minces métalliques **140**
4.2.1 Évaporation sous vide 141
4.2.2 Pulvérisation cathodique 143
4.2.3 Mesures d'épaisseur des dépôts 145
4.2.3.1 Échantillons obtenus par évaporation sous vide 147
4.2.3.2 Échantillons obtenus par pulvérisation cathodique . . 148
4.2.4 Mesures de résistivité des couches d'or 149
4.3 Structuration par photolithographie UV **152**
4.3.1 Définition des motifs à réaliser 152
4.3.2 Procédure de structuration par photolithographie UV 154
4.3.3 Caractérisation par SPRI 155
4.4 Structuration par lithographie à faisceau d'électrons focalisé 158
4.4.1 Principe de la lithographie à faisceau d'électron focalisé 159
4.4.2 Définition des motifs à réaliser 161
4.4.3 Procédé de fabrication 161
4.4.4 Caractérisation par SPRI 165
Conclusion **167**

Introduction

Ce chapitre présente les principaux travaux que nous avons effectués concernant la mise au point de substrats micro et nanostructurés de manière anisotrope.

L'intérêt d'un tel développement, dans le contexte de notre travail, est de pouvoir observer un comportement optique anisotrope de la structure (réseaux métalliques unidimensionnels) et, à terme, d'orienter des molécules biologiques le long de ces structures, donnant ainsi une forte anisotropie aux échantillons observés. La structuration de la couche de métal permet également d'élargir notre champ d'activité vers le domaine très prometteur de la nanoplasmonique, où les dimensions en jeu sont inférieures à la longueur d'onde excitatrice. Dans ce cas de figure, la théorie prédit des inhomogénéités de champ évanescent aux abords des discontinuités, donnant lieu dans certains cas à une exaltation du signal. Le développement de telles structures, dotées de « points chauds » et de bandes interdites de propagation [43], nous permettrait de repousser les limites des systèmes « classiques » basés sur la SPRI en termes de limites de détection et de sensibilité.

Le but de ce chapitre n'est pas de réaliser un état de l'art poussé des techniques expérimentales de structuration de couches minces, mais plutôt d'illustrer le cheminement effectué, depuis l'étude théorique et les premiers échantillons possédant des structures de tailles microniques, jusqu'à la mise au point de premiers échantillons nanostructurés.

Ces échantillons ne possèdent pas encore les caractéristiques de sensibilité requises pour être plus efficace en termes de détection qu'une simple lame d'or, mais leurs propriétés anisotropes en font un objet d'étude intéressant pour le système de P-SPRI. Ainsi, un plasmon de surface se propageant le long de pistes d'or déposées sur un substrat de verre « verrait » le réseau or / verre comme une couche uniforme dont l'indice consiste en un mélange d'or et de milieu ambiant. En revanche, un plasmon de surface se propageant orthogonalement au réseau subirait une modulation périodique. Le principe est schématisé dans la figure 79. Ce phénomène devrait intervenir lorsque la période du réseau atteint un seuil au dessous duquel le plasmon de surface orthogonal au réseau peut se propager à travers les discontinuités de celui-ci. Il est donc utile de fabriquer un ensemble de réseaux de différentes tailles, afin de pouvoir déterminer le seuil en question.

Ce chapitre est articulé comme suit. Tout d'abord nous décrirons, dans la section 4.1, la technique de modélisation que nous avons utilisé, c'est à dire la méthode modale de Fourier, que nous illustrerons avec un exemple pratique : la modélisation des structures réalisées expérimentalement.

La section 4.2.3 portera sur la réalisation de dépôts métalliques sur substrats de verre, possédant des caractéristiques compatibles avec le couplage de plasmons de surface. Nous

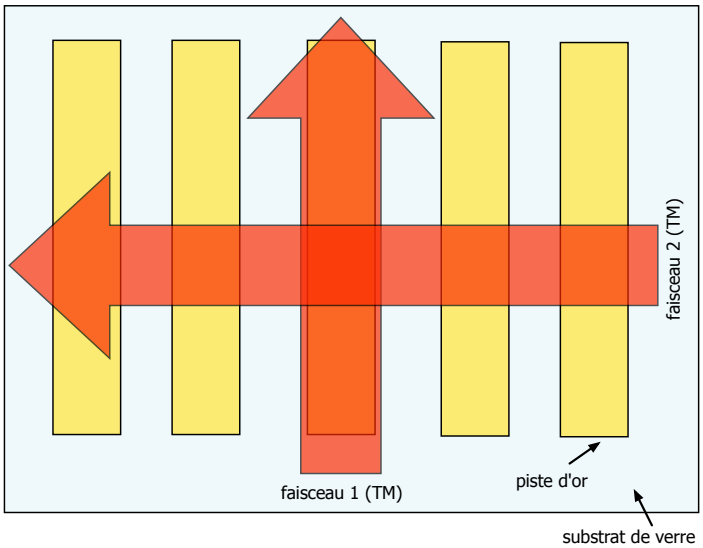


FIGURE 79 – Illustration schématique d'un réseau de pistes d'or sur un substrat de verre. Un plasmon de surface se propageant le long des pistes (faisceau 1) se comporterait comme si le milieu était uniforme. Un plasmon de surface se propageant orthogonalement au réseau (faisceau 2) subirait une modulation périodique.

décrirons les deux méthodes utilisées : l'évaporation sous vide, et la pulvérisation cathodique. Nous donnerons ensuite les caractéristiques de tels dépôts.

Une fois ces pré-requis établis, nous nous intéresserons à la structuration des substrats proprement dite. Deux méthodes largement répandues seront abordées.

Tout d'abord, nous verrons la mise au point d'échantillons microniques grâce à une technique de lithographie optique et de dépôt de métal par lift-off, ainsi que leur caractérisation par P-SPRI dans la section 4.3.

Dans un second temps, nous décrirons la technique utilisée pour nanostructurer des échantillons en utilisant une technique de lithographie par faisceau d'électron dans la section 4.4. Nous détaillerons le processus, depuis la simulation par la méthode modale de Fourier jusqu'à la caractérisation optique par SPRI d'un échantillon comportant des motifs or / verre de tailles nanométriques.

4.1 Modélisation de réseaux métalliques par la méthode modale de Fourier

La méthode modale de Fourier, également appelée méthode rigoureuse des ondes couplées (**RCWA** pour rigorous coupled-wave analysis), est une méthode permettant de

calculer les efficacités de diffraction de réseaux périodiques. Cette méthode est rigoureuse car elle ne repose sur aucune approximation pour résoudre les équations de Maxwell. Cette méthode prend tout son intérêt lorsque le pas du réseau Λ et la longueur d'onde λ se situent dans le même ordre de grandeur. Dans cette section, nous résumerons tout d'abord le principe de la méthode modale de Fourier, puis nous appliquerons cette méthode à des réseaux métalliques utilisés dans notre travail de thèse, grâce au programme écrit sous *Matlab* par J.P. Hugonin et P. Lalanne [96] et que nous avons implémenté pour notre problématique par le biais d'une bibliothèque de fonctions utilitaires.

4.1.1 Méthode modale de Fourier

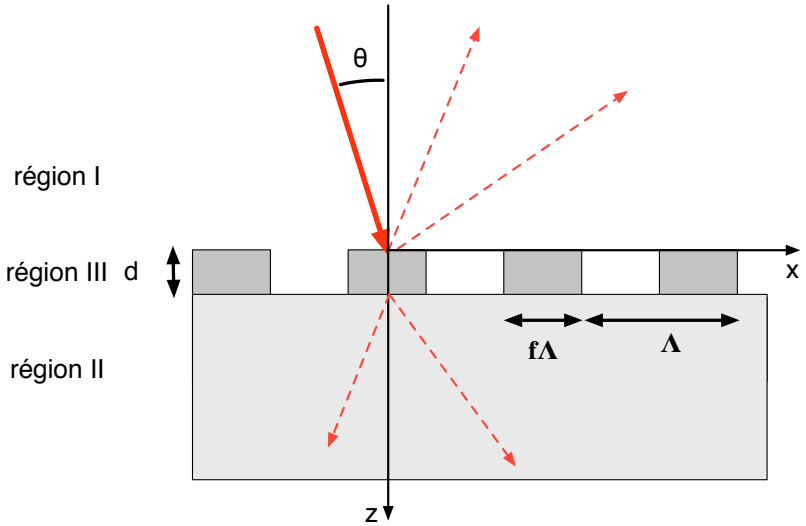


FIGURE 80 – Géométrie d'un réseau lamellaire périodique de période Λ et d'épaisseur d. La largeur des motifs (ou îlots) est déterminée par le taux de remplissage f. La région III peut-être décomposée en un nombre quelconque de sous-régions d'épaisseur variable. L'onde plane, d'incidence oblique (angle θ par rapport à la normale) est diffractée et transmise par le réseau. La méthode consiste à calculer les énergies relatives des ondes transmises et diffractées par rapport à l'onde incidente.

L'implémentation de la méthode modale de Fourier que nous utilisons repose sur l'algorithme de Moharam *et al.* [97]. Pour plus de clarté, nous ne développerons ici que le cas d'un réseau 1D périodique sous incidence orthogonale. Les diffractions coniques ne seront donc pas abordées (angle azimuthal $\phi = 0$). La géométrie du problème est donnée dans la figure 80. Une onde plane polarisée linéairement possède une incidence oblique d'angle θ par rapport à la normale au réseau. Nous ne détaillerons ici que le cas où le réseau

lamellaire (région III) n'est constitué que d'une couche d'épaisseur d, de pas Λ et de taux de remplissage f des pistes. Il est possible de suivre un raisonnement analogue pour un nombre quelconque de couches de même période.

L'onde plane incidente va donner naissance à des ondes diffractées et des ondes transmises, dont les vecteurs d'onde k sont donnés par la classique formule des réseaux :

$$k = \sin\theta \pm m\frac{2\pi}{\Lambda}, (m \text{ entier}) \tag{50}$$

Cette formule est très utile pour déterminer les directions des ondes transmises et diffractées, mais elle ne donne aucun renseignement sur l'intensité des champs. Il faut pour cela recourir à la méthode modale de Fourier.

À l'extérieur du réseau (dans les régions I et II), le champ total réfléchi (u_r) et le champ total transmis (u_t) peuvent s'exprimer sous la forme d'un développement de Rayleigh [98] :

$$\begin{cases} u_r &= \sum_n r_n e^{j(\alpha_n x - \beta_n z)} \\ u_t &= \sum_n t_n e^{j(\alpha_n x - \beta_n (z-d))} \end{cases} \tag{51}$$

Les coefficients r_n et t_n seront donc les inconnues de notre système, et la méthode modale de Fourier nous permettra de les déterminer. Le calcul est dépendant de la polarisation TE ou TM et des indices de réfraction des milieux I (n_{I}) et II (n_{II}), ainsi que de l'indice à l'intérieur du réseau. Nous ne détaillerons ici, par soucis de simplicité, que le cas TE. Le cas TM, plus subtil à résoudre numériquement, sera rapidement abordé par la suite.

La première étape consiste à déterminer la fonction diélectrique à l'intérieur du réseau. Celui-ci étant carré et périodique de période Λ, il est possible de la décomposer comme une série de Fourier :

$$\varepsilon(x) = \sum_h \varepsilon_h e^{j(\frac{2\pi h}{\Lambda}x)} \tag{52}$$

Les harmoniques de Fourier ε_h sont déterminées à partir de l'indice de réfraction dans une « vallée » (n_v), l'indice de réfraction dans une « crête » (n_c), et le taux de remplissage du réseau f. On obtient donc :

$$\begin{cases} \varepsilon_0 &= n_c^2 f + n_v^2(1-f) \\ \varepsilon_h &= (n_c^2 - n_v^2)\frac{\sin(\pi h f)}{\pi h} \end{cases} \tag{53}$$

Le théorème de Bloch-Floquet nous permet d'écrire les champs E_y, H_x et H_z sous la

forme de séries de Fourier généralisées, ayant pour coefficients les harmoniques spatiales des champs S_i, U_i et f_i :

$$\begin{cases} \mathrm{E}_y &= \sum_i \mathrm{S}_i(z) e^{j(k_x + i2\pi/\Lambda)x} \\ \mathrm{H}_x &= -j\sqrt{\frac{\varepsilon_0}{\mu_0}} \sum_i \mathrm{U}_i(z) e^{j(k_x + i2\pi/\Lambda)x} \\ \mathrm{H}_z &= -j\sqrt{\frac{\varepsilon_0}{\mu_0}} \sum_i f_i(z) e^{j(k_x + i2\pi/\Lambda)x} \end{cases} \tag{54}$$

Ces champs peuvent être injectés dans les équations de Maxwell. Il advient, après simplification et élimination de f_i, la forme couplée des équations précédentes :

$$\frac{\mathrm{dS}_i}{\mathrm{d}z} = k_0 \mathrm{U}_i \tag{55}$$

$$\frac{\mathrm{dU}_i}{\mathrm{d}z} = \frac{{k_{x_i}}^2}{k_0} \mathrm{S}_i - k_0 \sum_p \varepsilon_{i-p} \mathrm{S}_p \tag{56}$$

Avec $k_{x_i} = k_0 \left[n_\mathrm{I} \sin\theta - i(\lambda_0/\Lambda) \right]$. Soit sous la forme matricielle :

$$\begin{bmatrix} \frac{\mathrm{dS}_i}{\mathrm{d}z} \\ \frac{\mathrm{dU}_i}{\mathrm{d}z} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & \mathbf{I} \\ \mathbf{A} & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathrm{S}_i \\ \mathrm{U}_i \end{bmatrix} \tag{57}$$

Où $\mathbf{I}$ est la matrice identité, et $\mathbf{A} = \mathbf{K}_{\boldsymbol{x}}^2 - \mathbf{E}$. La matrice $\mathbf{K}_{\boldsymbol{x}}$ est une matrice diagonale ayant pour éléments k_{x_i}/k_0. La matrice $\mathbf{E}$ est la matrice de Toeplitz des permittivités relatives du matériau. Elle est définie par $\mathrm{E}_{i,p} = \varepsilon_{i-p}$. Toutes ces matrices ont pour dimensions $n \times n$ (avec n le nombre d'harmoniques utilisées dans le calcul). Finalement, il est possible d'exprimer le système matriciel précédent sous la forme d'une équation différentielle :

$$\frac{\mathrm{d}^2 \mathbf{S}_i}{\mathrm{d}z^2} = k_0^2 \mathbf{A} \mathbf{S}_i \tag{58}$$

La résolution de cette équation différentielle implique le calcul des vecteurs propres et des valeurs propres de $\mathbf{A}$. Nous définissons la matrice $\mathbf{V} = \mathbf{WQ}$, où $\mathbf{W}$ est la matrice des vecteurs propres de $\mathbf{A}$ ordonnés en colonnes, et $\mathbf{Q}$ est la matrice diagonale des valeurs propres positives λ_i de $\mathbf{A}$. Il est possible de déterminer les amplitudes des champs diffractés $\mathbf{R}$ et transmis $\mathbf{T}$, grâce aux conditions aux limites posées sur les composantes tangentielles des champs. Le problème se résume donc à résoudre les coefficients $\boldsymbol{c}^+$ et $\boldsymbol{c}^-$ à partir des

conditions aux limites. Ainsi, pour $z = 0$ (interface région I / réseau) le système devient :

$$\begin{bmatrix} \delta_{i0} \\ jn_{\mathrm{I}} \cos\theta\, \delta_{i0} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ -j\mathbf{Y_I} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{R} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{W} & \mathbf{WX} \\ \mathbf{V} & -\mathbf{VX} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{c}^+ \\ \boldsymbol{c}^- \end{bmatrix} \tag{59}$$

Et pour $z = d$ (interface région II / réseau) :

$$\begin{bmatrix} \mathbf{WX} & \mathbf{W} \\ \mathbf{VW} & -\mathbf{V} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{c}^+ \\ \boldsymbol{c}^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{I} \\ j\mathbf{Y_{II}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{T} \end{bmatrix} \tag{60}$$

Avec $\delta_{i0} = 1$ pour $i = 0$, et $\delta_{i0} = 0$ pour $i \neq 0$. On introduit les matrices diagonales $\mathbf{X}$, $\mathbf{Y_I}$ et $\mathbf{Y_{II}}$, qui ont pour valeurs respectives : $\mathbf{X}_{i,i} = \exp(-k_0\lambda_i d)$, $\mathbf{Y}_{\mathbf{I}_{i,i}} = k_{\mathrm{I},zi}/k_0$ et $\mathbf{Y}_{\mathbf{II}_{i,i}} = k_{\mathrm{II},zi}/k_0$. Les vecteurs d'onde suivant z, $k_{\alpha,zi}$ (où $\alpha = \{\mathrm{I}, \mathrm{II}\}$), sont donnés par :

$$k_{\alpha,zi} = \begin{cases} k_0 \left[n_\alpha^2 - (k_{xi}/k_0)^2\right]^{1/2} & , k_0 n_\alpha > k_{xi} \\ -jk_0 \left[(k_{xi}/k_0)^2 - n_\alpha^2\right]^{1/2} & , k_{xi} > k_0 n_\alpha \end{cases} \tag{61}$$

Comme nous l'avons indiqué, le cas TM est plus complexe à résoudre. En procédant de manière analogue, la matrice $\mathbf{A}$ devient $\mathbf{A} = \mathbf{E}\left(\mathbf{K_x E^{-1} K_x} - \mathbf{I}\right)$. Il apparaît dans ce cas des instabilités numériques, et les solutions convergent moins rapidement. Des solutions ont été trouvées, afin d'améliorer la convergence des solutions et la stabilité [99]. Leur étude sortirait largement du cadre de ce travail.

4.1.2 Étude de réseaux métalliques 1D : or structuré sur verre

La méthode modale de Fourier a été utilisée pour calculer la réflectivité TM d'une biopuce à résonance de plasmon de surface structurée. Nous avons développé une interface *Matlab* pour le programme de J.P. Hugonin et P.Lalanne [96] sous forme de fonctions permettant d'effectuer certaines opérations de manière automatisée. La cellule de calcul élémentaire est définie dans la figure 81 et sera utilisé dans tous les exemples suivants.

Il est utile d'expliquer la géométrie particulière de la cellule, à savoir une alternance or/eau sur un substrat uniforme de verre, car elle diffère sensiblement des réseaux obtenus dans la littérature (voir [100] ou [101] par exemple). L'un des aspects les plus intéressant de tels réseaux est de pouvoir réaliser une chimie différentielle or/verre. Il serait ainsi possible de fonctionnaliser uniquement les pistes d'or (couches autoassemblées d'alkanethiols par exemple) et de passiver la surface de verre (silanisation). Dans ce cas, les analytes pourraient se fixer de manière sélective sur les pistes, permettant ainsi de réduire la surface

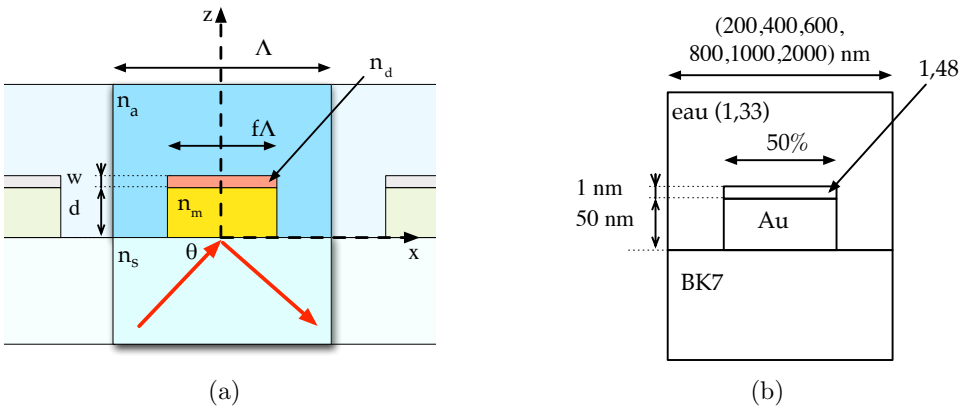


FIGURE 81 – (a) Cellule élémentaire de calcul représentant une période Λ du réseau. L'onde plane (de longueur d'onde λ) polarisée TM est incidente au réseau suivant un angle θ dans le milieu du substrat n_s. Le réseau est caractérisé par une piste métallique (d'indice n_m) de largeur $f\Lambda$ et d'épaisseur d, centré sur l'axe de symétrie $x = 0$. La piste est recouverte d'une couche de diélectrique (n_d) d'épaisseur w afin de simuler l'effet d'un dépôt sur la structure. Le milieu ambiant est caractérisé par un indice n_a. (b) jeu de paramètres utilisés dans la simulation.

d'intéraction tout en augmentant le signal SPR grâce à l'exaltation du champ électrique sur les pistes [102].

Nous nous sommes tout d'abord concentrés sur des calculs de réseaux lamellaires possédant un taux de remplissage $f = 50\%$. Ces réseaux sont susceptibles d'agir à la manière de miroirs de Bragg, c'est à dire en réfléchissant un intervalle de longueur d'onde. Ainsi, il serait possible d'obtenir en bordure de la zone où le réseau est inscrit des exaltations de sensibilité en plasmon. De tels réseaux de Bragg plasmoniques ont été étudiés, par exemple dans [103] ou [104]. Il est également possible d'obtenir une exaltation de champs en utilisant une géométrie sinusoïdale [101], des nanofils [105] ou des formes plus complexes [106], mais ces types de réseaux sont bien moins évidents à réaliser expérimentalement. Nous nous restreindrons ici à des structures « simples », basées sur des réseaux lamellaires carrés, et nous ne chercherons pas à optimiser particulièrement le réseau. Une modélisation plus poussée de réseaux sortirait de toute évidence du cadre de notre travail.

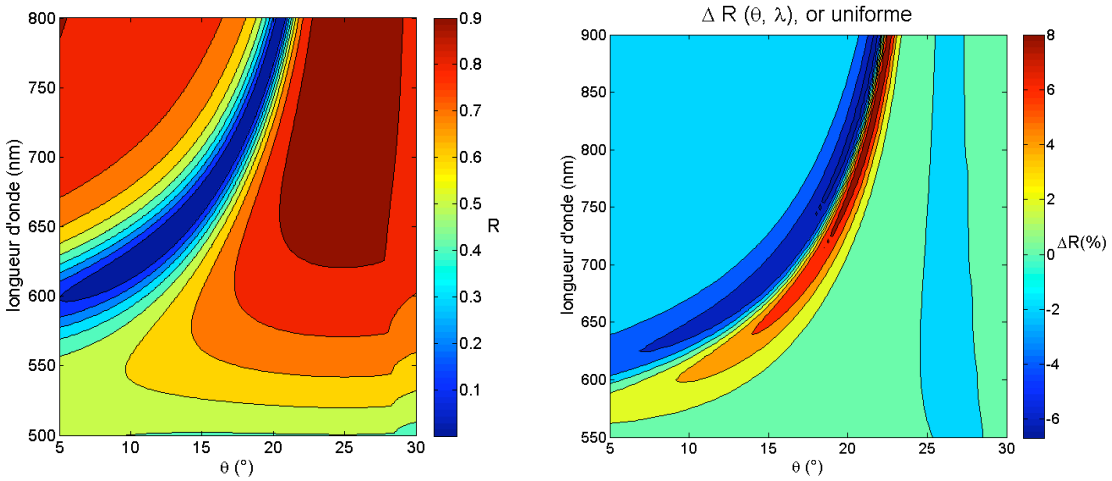
Afin de tirer partie des substrats de verre et d'or dont nous disposons en routine, nous avons basé nos calculs sur des substrat de verre BK7 ($n_s \approx 1,52$). En effet, ces substrats sont facilement trouvable sous formes de lamelles de microscope, que nous pouvons ensuite cliver à la taille de nos échantillons. L'indice de ce verre rend ces substrats inutilisables sur le banc de P-SPRI. En revanche, ils peuvent être utilisés sur le banc spectro-angulaire directement.

Dans tous les calculs, nous ne considérons que la réflexion spéculaire du réseau, c'est

à dire l'ordre de diffraction 0. En effet, les autres ordres, bien qu'intéressants sur le plan théorique sont distribués sur des angles souvent peu accessibles par nos montages. De plus, les intensités en jeu sont trop faibles pour utiliser des dispositifs d'imagerie de manière optimale.

4.1.2.1 Couche métallique uniforme

Afin de pouvoir fournir une base de comparaison avec les structures calculées plus loin, nous avons tout d'abord réalisé un calcul de nappe spectro-angulaire sur une lame d'or uniforme.



(a) (b)

FIGURE 82 – (a) Réflectance TM spectro-angulaire et (b) variation de réflectivité $\Delta R/\Delta e$ induite par le dépôt de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$), sur une couche d'or uniforme de $d = 50$ nm d'épaisseur. Le milieu ambiant est l'eau ($n_a = 1,330$). Les valeurs sont données pour un substrat BK7. Le pas de calcul est 0,25° et 5 nm.

Nous avons ainsi calculé la réflectance TM (voir figure 82-a) d'une couche d'or uniforme de 50 nm d'épaisseur par rapport à un diélectrique ambiant représentant de l'eau ($n_a = 1,330$). Nous avons ensuite déterminé la variation de réflectivité induite par l'adsorption d'1 nm de diélectrique d'indice $n_d = 1,48$ sur la couche d'or. La nappe spectro-angulaire de cette variation $\Delta R/\Delta e$ est donnée dans la figure 82-b.

On observe un variation de réflectivité $\Delta R/\Delta e$ maximale de l'ordre de 9% pour 1 nm déposé.

Finalement, nous avons tracé la correspondance entre la longueur d'onde du plasmon de surface λ_{pl} et la longueur d'onde d'excitation λ_0 utilisée, et ce pour différents indices

de réfraction du milieu ambiant. Les courbes sont données dans la figure 83. Connaître la longueur d'onde du plasmon de surface correspondant à une couche d'or uniforme est important pour le calcul des réseaux que nous allons effectuer dans la suite de cette section. Ainsi, lorsque le milieu ambiant est de l'eau à 1,33 RIU, une excitation à 800 nm génèrera un plasmon de surface à environ 580 nm.

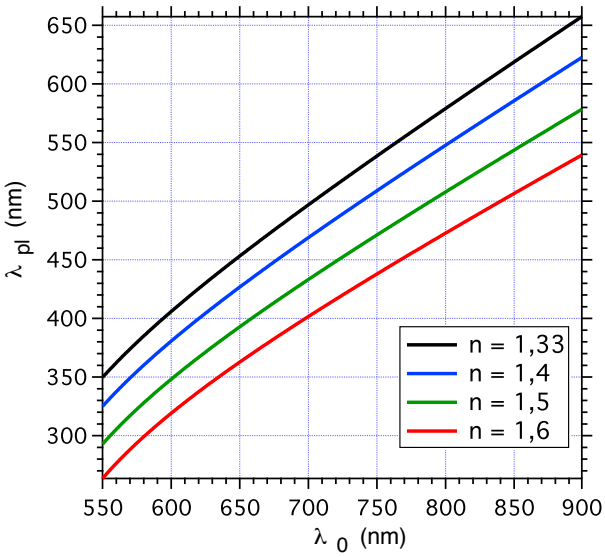


FIGURE 83 – Longueur d'onde du plasmon de surface λ_{pl} en fonction de la longuer d'onde d'excitation λ_0 pour les indices de réfraction du mileu ambiant suivants : (noir) 1,33, (bleu) 1,4, (vert) 1,5 et (rouge) 1,6.

4.1.2.2 Structures métalliques sur verre

Un ensemble de nappes spectro-angulaires de réflectance TM ont été calculées pour 6 pas de réseau, allant de $\Lambda = 200$ nm à 2 µm, avec un taux de remplissage de $f = 50\%$. Ce balayage très large nous permet de déterminer l'influence du pas de réseau sur la propagation transversale du plasmon de surface, et ce pour des pas supérieurs aussi bien qu'inférieurs à la longueur d'onde de propagation du plasmon de surface. Pour un balayage spectral allant jusqu'à $\lambda_0 = 900$ nm, le seuil se situera à environ 660 nm. Les trois premiers pas de réseau (200, 400 et 600 nm) seront donc inférieurs à la longueur d'onde de propagation. Les trois derniers (800, 1000, et 2000 nm) seront quant à eux supérieurs à cette longueur d'onde.

Le milieu ambiant est constitué d'un diélectrique représentant de l'eau ($n_a = 1,330$). Les nappes spectro-angulaires résultantes sont données dans la figure 84.

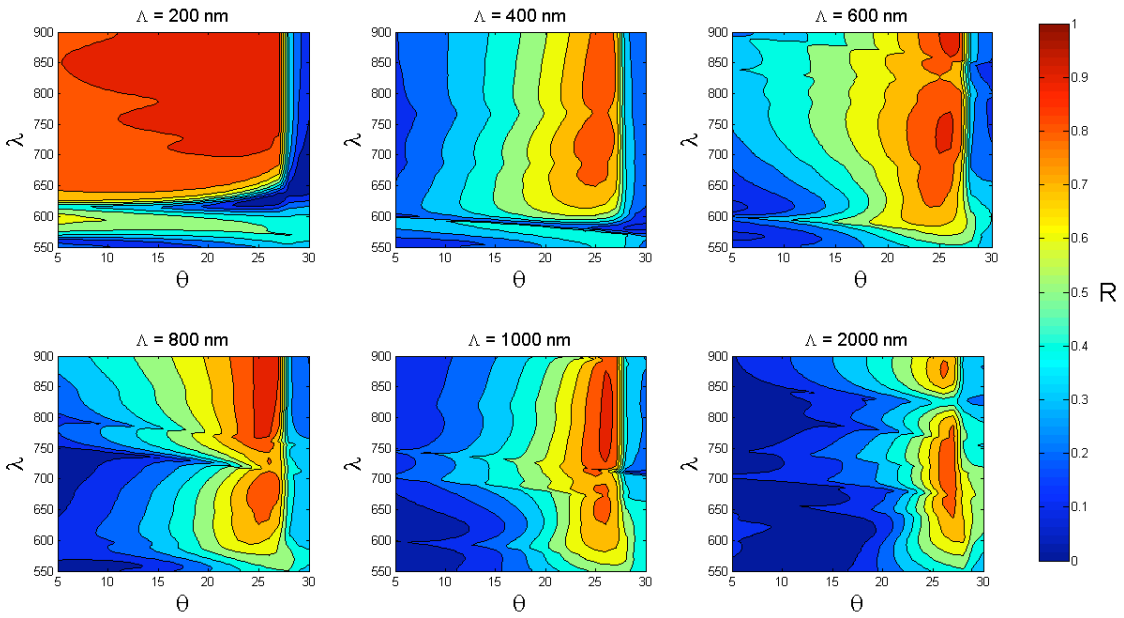


FIGURE 84 – Calcul par la méthode modale de Fourier de la réflectance TM de réseaux or (d = 50 nm) / eau ($n_a = 1,330$) sur substrats BK7, pour 6 pas de réseau $\Lambda = 200$, 400, 600 ,800, 1000, et 2000 nm, et un taux de remplissage $f = 50\%$. Le pas de calcul est de 1° et 2nm.

Les nappes de réflectance obtenues sont très différentes d'un pas de réseau à l'autre. Les réseaux possèdant un pas de 200 et 400 nm ont une double résonance spectrale sur quasiment tous les angles d'incidence. Une double résonance intéressante car beaucoup moins large apparaît également pour le réseau de pas 800 nm, aux environs de 20°. De plus, le réseau $\Lambda = 200$ nm possède une bande interdite plasmonique incomplète. Ce type de structure possèdent des flancs très étroits spectralement et sont quasiment insensibles à l'angle d'incidence [107].

Afin de vérifier les performances de tels réseaux, nous avons effectué un second calcul, cette fois en ajoutant un couche de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) sur l'or. La différence des nappes donne la variation de réflectivité $\Delta R/\Delta e$ induite par l'ajout d'une couche d'1 nm de diélectrique au système. Les résultats sont donnés dans la figure 85.

Dans tous les cas, la variation de réflectivité est inférieure à celle d'une lame uniforme. Ici, le maximum est atteint à environ 1,9 % / nm , contre environ 9 % / nm dans le cas uniforme. Le plus fort contraste est obtenu pour la structure à 200 nm, néanmoins des pics très fins apparaissent également à 400 nm. La table 12 résume les maxima obtenus

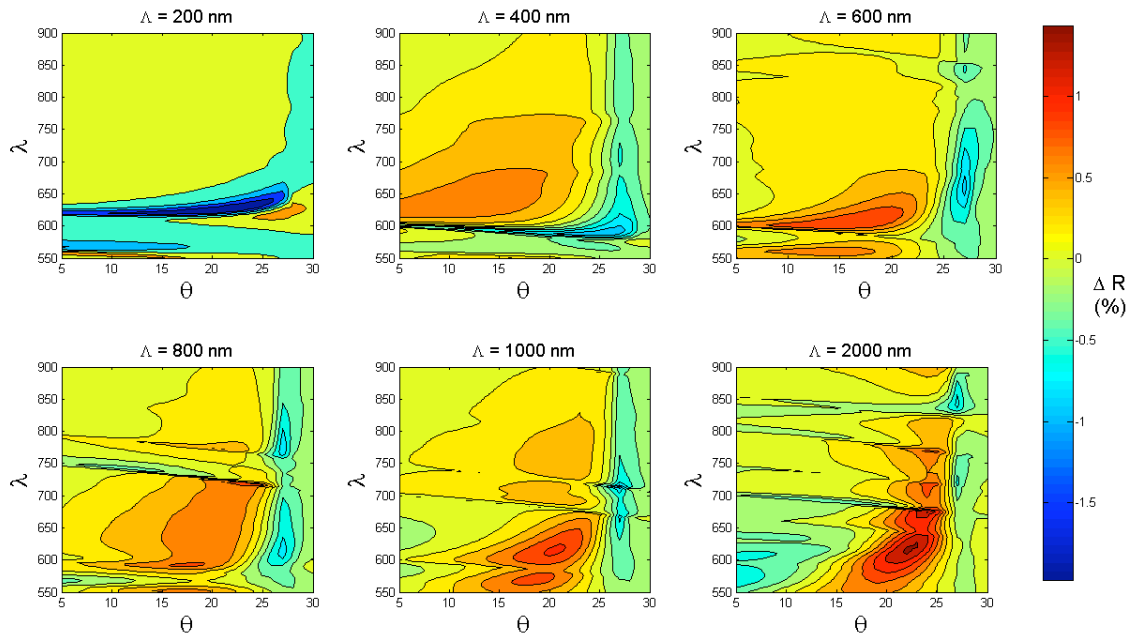


FIGURE 85 – Variation de réflectivité induite par l'ajout d'1 nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) à un réseau BK7 / or / eau. Le calcul est effectué pour les 6 pas de réseau précédents. L'échelle des couleurs $\Delta R/\Delta e$ est donnée en % / nm. Le pas de calcul est de 1° et 2nm.

et leur position pour les différents réseaux calculés.

Bien que la valeur maximale de $\Delta R/\Delta e$ soit largement inférieure à ce qu'il est possible d'atteindre avec une lame uniforme, les réseaux calculés ont un taux de remplissage de 50%. Cela implique que la surface « active » du capteur est moitié moindre que pour un capteur basé sur une couche d'or uniforme. Dans ce cas, notre capteur structuré aura les performances maximales ramenées à une unité de surface, comme indiquées dans la table 13. L'utilisation d'un taux de remplissage des pistes d'or beaucoup plus faible ou au contraire beaucoup plus grand (de l'ordre de 90% par exemple [108]) permet d'obtenir un rendement encore supérieur, capable d'égaler, voir de dépasser celui d'un capteur uniforme [100] du fait de la mise en place d'un phénomène d'exaltation locale du champ.

Λ (nm)	max($\lvert\Delta R/\Delta e\rvert$) (% / nm)	θ_{max} (°)	λ_{max} (nm)
200	1,974	22	626
400	0,917	25	588
600	0,994	17	608
800	0,985	24	718
1000	1,06	27	714
2000	1,437	22	614

TABLE 12 – Variation de réflectivité maximale induite par le dépôt de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) sur une couche d'or structurée (de pas Λ, $f = 50\%$) d'épaisseur $d = 50$ nm . Le milieu ambiant est l'eau ($n_a = 1,330$). Les valeurs sont données pour un substrat de BK7.

Λ (µm)	max($\lvert\Delta R/\Delta e\rvert$) par unité de surface (% / nm / µm^2)
uniforme	2,25
0,2	1,974
0,4	0,917
0,6	0,994
0,8	0,985
1	1,06
2	1,437

TABLE 13 – Variation de réflectivité maximale par unité de surface induite par le dépôt de $w = 1$ nm de diélectrique ($n_d = 1,48$) sur une couche d'or structurée (pas Λ et $f = 50\%$) de $d = 50$ nm d'épaisseur. Le milieu ambiant est l'eau ($n_a = 1,330$). Les valeurs sont données pour un substrat de BK7. La surface de référence est un carré de 2µm de côté.

4.2 Dépôts de couches minces métalliques

La réalisation de micro– et nano– structures métalliques sur substrats de verre passe tout d'abord par la maîtrise du dépôt uniforme du métal. En effet, le dépôt de couches minces (d'environ 50 nm pour l'or dans notre cas) présente quelques difficultés.

Tout d'abord, l'épaisseur de dépôt doit être maîtrisée le plus précisément possible. La qualité du couplage entre l'onde incidence et le plasmon de surface est très fortement dépendante de l'épaisseur du métal déposé. A une longueur d'onde donnée, il existe une épaisseur optimale, calculée par P. Lecaruyer *et al.* pour divers métaux, correspondante à un angle de couplage particulier [44]. Nous avons tracé à $\lambda = 670nm$ la variation de réflectivité résultante de l'adjonction d'une couche d'1 nm de diélectrique ($n = 1,48$) à un multicouche typique pour notre système (SF11 / 2 nm de chrome / or / eau). L'image résultante est donnée dans la figure 86. Il résulte que l'épaisseur d'or optimale est de $58,0$ nm, à un angle de $55,41^{\circ}$. Cette épaisseur entraine une sensibilité du système maximale, avec une variation de réflectivité de 7,46%.

De plus, le dépôt obtenu doit être le plus homogène et le moins rugueux possible. En effet, l'efficacité de couplage diminue avec une rugosité croissante. De plus, l'uniformité de certaines chimies de surface utilisées sur les biopuces, comme par exemple les chimies à base de **Dextran** [109] ou les membranes lipidiques, dépendent de la rugosité du métal. Cela implique que la méthode de dépôt utilisée doit créer le moins possible d'îlots de métal.

Dans cette section, nous n'aborderons que rapidement les deux principales techniques de dépôt utilisées, à savoir l'évaporation sous vide et la pulvérisation cathodique. L'étude poussée des paramètres de dépôt sortirait largement du cadre de cette thèse. Similairement, l'expérience a montré que la reproductibilité d'un dépôt dépendait très fortement de la technique et des paramètres utilisés, mais également du bâti et de l'environnement (autres matériaux déposés dans la cloche pouvant polluer l'échantillon, accès contrôlé au bâti etc.). Nous nous bornerons donc à illustrer les deux techniques de dépôt par quelques exemples tirés de la littérature et par des mesures d'épaisseur effectuées en résonance de plasmon de surface monocapteur durant ce travail de thèse, sans pour autant chercher à généraliser notre propos.

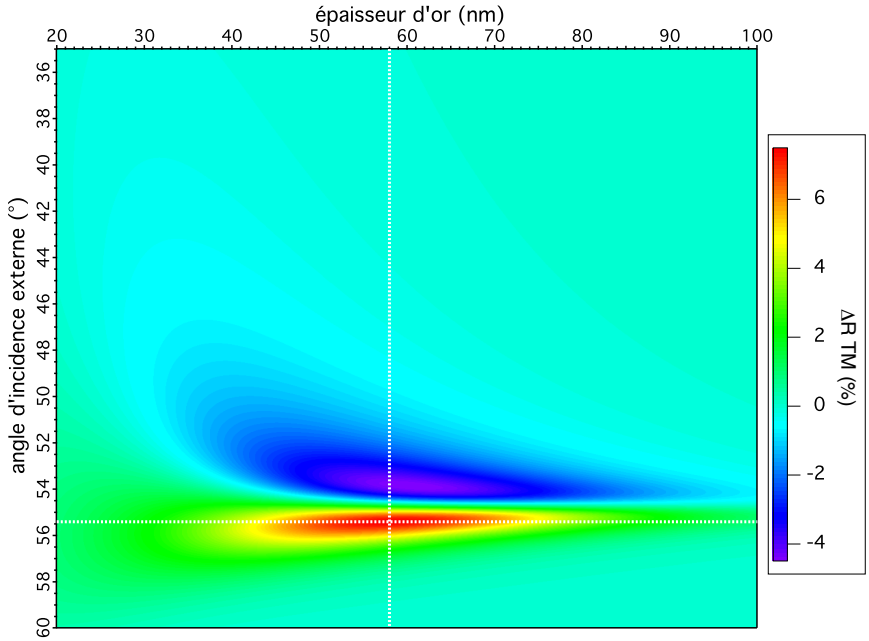


FIGURE 86 – Variation de réflectivité TM à 670 nm résultante du dépôt d'une couche d'1 nm de diélectrique ($n = 1,48$) en fonction de l'épaisseur d'or et de l'angle d'incidence, pour un système SF11 / chrome (2 nm) / or / diélectrique / eau ($n = 1,33$). Le point optimum (indiqué par des lignes pointillées blanches) se situe à $58,0$ nm et $55,41^\circ$. Le calcul a été effectué pour 1024×1024 points.

4.2.1 Évaporation sous vide

La technique de dépôt par évaporation sous vide consiste à faire condenser des atomes d'un matériau sur un substrat. Le matériau à déposer est placé dans un creuset situé dans la partie basse d'une enceinte à vide (environ 10^{-6} mbar soit 10^{-4} Pa). Le substrat est positionné dans un porte-échantillon quelques dizaines de centimètres au-dessus du creuset (voir figure 87). La température requise pour atteindre le point de pression de vapeur saturante du matériau à déposer (dans le cas qui nous intéresse, de l'or, du titane ou du chrome) peut être obtenue par effet Joule ou au moyen d'un faisceau d'électrons énergétiques. Les atomes de métal ainsi évaporés possèdent un libre parcours moyen de plusieurs dizaines de mètres et vont se condenser de manière très homogène à la surface du substrat tournant.

L'évaporation par effet Joule est la méthode la plus simple. Il s'agit de faire passer un fort courant (environ 100 A) dans un filament sur lequel est déposé le matériau à évaporer. La chaleur dégagée est alors suffisante pour évaporer la cible. Le chauffage par faisceau d'électron consiste à balayer la surface du matériau cible placé dans un creuset refroidi à

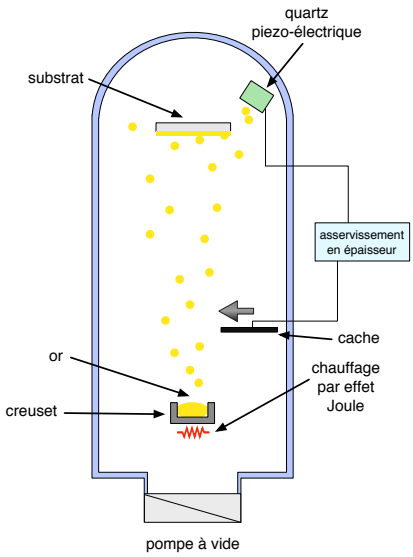


FIGURE 87 – Principe d'un bâti de dépôt de couches minces par évaporation sous vide. Ici, la technique de chauffage par effet Joule est utilisée. L'épaisseur du dépôt est contrôlé par une boucle d'asservissement. Une microbalance a quartz est positionnée à proximité de l'échantillon. La variation de fréquence du quartz donne l'ordre de positionner un coupe-faisceau lorsque l'épaisseur de dépôt de consigne est atteint.

eau avec un faisceau d'électron fortement accélérés (environ 10 keV).

L'épaisseur de dépôt est contrôlée par un système d'asservissement constitué d'une microbalance à quartz piézoélectrique et d'un cache mécanique rétractable. Ainsi, lorsque la couche de matériau déposée sur le quartz atteint l'épaisseur de consigne, l'évaporation est stoppée par le fermeture du cache. Il est également possible de contrôler la vitesse de dépôt en échantillonnant le décalage en fréquence du quartz régulièrement.

Dans la majorité des bâtis de dépôt, il est possible de changer la cible sans casser le vide, grâce à l'utilisation d'un porte-cible rotatif contenant plusieurs creusets. Dans nos applications, nous nous contentons de déposer du chrome par sublimation, pour réaliser une couche d'accroche sur la substrat de verre, d'environ 2 à 3 nm d'épaisseur ou du titane (qui possède les mêmes caractéristiques d'accroche, mais absorbe moins dans le visible, la couche est donc généralement de 5 nm) ; et de l'or pour l'effet plasmon. Il est important de noter que le risque de pollution des échantillons par l'utilisation de cibles multiples est très important, il est donc préférable dans l'idéal de restreindre l'utilisation d'un bâti à seul type de matériau à déposer.

Concernant le dépôt de couches minces d'or (50 nm), la rugosité et l'homogénéité de la couche jouent un rôle important dans l'efficacité de la résonance plasmon, ainsi que dans l'efficacité avec laquelle la fonctionnalisation chimique se réalise. Il est donc important de

déterminer avec précision les paramètres de dépôt optimum. Dans le cas de l'or, la vitesse de dépôt semble jouer un rôle crucial dans l'homogénéité de la couche. Ainsi, S. Zhang *et al.* [110] ont déterminé que, pour une vitesse de dépôt élevée (0,4 nm/s), la couche semblait plus homogène que pour une vitesse faible (0,02 nm/s). De plus, Z. Klusek *et al.* [111] ont observé qu'en chauffant le substrat à environ 300° C, tout en conservant une vitesse de dépôt faible (0,02 nm/s), une couche très proche de l'Au(111) était obtenue. Cette bonne homogénéité de la couche métallique et faible rugosité est principalement due à la faible énergie des atomes d'or évaporés. En effet, celle-ci est déterminée par leur température d'évaporation, soit environ 0,1 eV. À ce niveau d'énergie, les atomes ne pénètrent pas dans le substrat. Ils se réorganisent par autoassemblage au fur et à mesure, formant une couche quasi-uniforme.

Les couches métalliques déposées par évaporation utilisées dans cette thèse ont été principalement obtenus dans le cadre des travaux de thèse de S. Held, de *l'Institut d'Electronique Fondamentale* d'Orsay pour les échantillons SF10 ou SF11/Ti/Au, et par le biais d'un fournisseur (*Schott*) pour les échantillons BK7 ou SF10/Cr/Au. Nous avons également effectué des tests d'évaporation dans la centrale technologique commune *Institut d'Optique Graduate School* et *Thales RT*, mais les paramètres de dépôt restent à optimiser. Nous verrons dans le paragraphe 4.2.3 des exemples de courbes de résonance plasmon angulaire obtenues à partir d'un montage monocapteur.

4.2.2 Pulvérisation cathodique

La pulvérisation cathodique consiste à créer un plasma de gaz rare (généralement de l'argon) autour d'une cathode sur laquelle est collé le matériau cible. Les ions du plasma sont accélérés par le champ électrique de la cathode et pulvérisent la surface de la cible. Les atomes éjectés sont ensuite déposés sur le substrat, positionné à quelques centimètres en face de la cible. Le principe de fonctionnement du dépôt par pulvérisation cathodique est illustré dans la figure 88. Une enceinte dans laquelle règne une vide partiel (0,6 à 0,8 Pa) est utilisée pour ce type de dépôt. De ce fait, il existe un quantité non négligeable d'électrons libres dans le milieu, et le parcours libre moyen est beaucoup plus faible que pour l'évaporation sous vide, compte-tenu de la gamme de vide utilisée. La mise en place et la stabilisation du plasma est facilitée grâce à un champ magnétique disposé parallèlement à la surface de la cible.

Du fait de l'utilisation d'ions accélérés par le champ électrique de la cathode, les atomes pulvérisés arrivant sur le substrat sont plus énergétiques (quelques eV) que pour la technique d'évaporation sous vide (de l'ordre de 0,1 eV). De ce fait, ils impactent

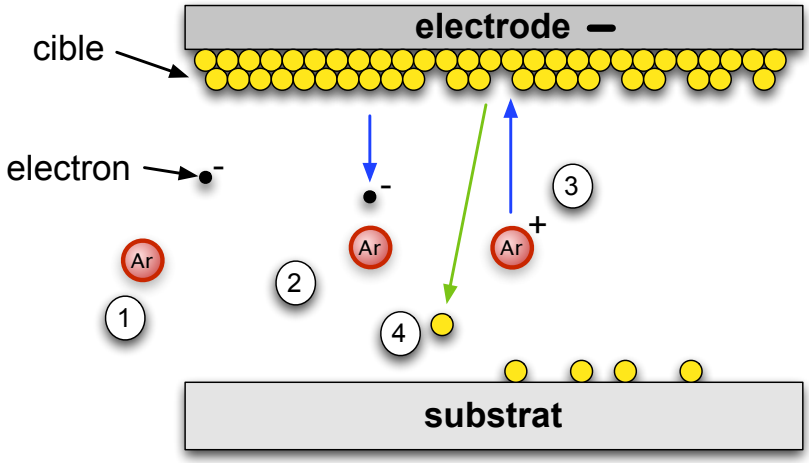


FIGURE 88 – Principe de fonctionnement d'un dépôt par pulvérisation cathodique. Le matériau à déposer (cible) recouvre la cathode, le substrat est disposé directement en face de l'électrode. (1) Un gaz d'argon est injecté dans la chambre et la cathode est mise sous tension. (2) les électrons libres présents dans l'enceinte sont naturellement repoussés par la cathode, entrant en collision avec les atomes d'argon. Il résulte des ions Ar^+, formant un plasma autour de l'"électrode. (3) Les ions sont attirés par la cathode, et entrent en collision avec les atomes de la cible. (4) Les atomes de la cible ainsi éjectés sont pulvérisés sur le substrat.

de manière plus importante le substrat, pénétrant de manière limitée (1 à 2 nm) dans celui-ci [112].

Il existe deux régimes de dépôt avec cette technique : balistique et thermalisé. Lorsque la vide est important, le libre parcours moyen des atomes est de l'ordre de grandeur de la distance séparant la cible du substrat. Dans ce cas, le régime balistique est favorisé et les atomes subissent peu de collisions. Lorsque la pression augmente, le libre parcours moyen devient inférieur à la distance entre la cathode et le substrat. Dans ce cas, le régime thermalisé devient prédominant, c'est à dire que les atomes parviennent au substrat par diffusion. La vitesse de dépôt diminue donc lorsque la pression augmente et les atomes sont moins énergétiques en régime thermalisé. Il est possible d'optimiser les paramètres du plasma de manière à maximiser ce rendement grâce à des logiciels basés sur un calcul de Monte-Carlo, comme par exemple *SRIM* [113] (Stopping and Range of Ions in Matter). Dans le cas du dépôt de films d'or, tous ces phénomènes concourent à l'obtention d'une couche mince de rugosité plus importante que pour l'évaporation sous vide.

Cette technique est néanmoins souvent plus rapide et plus simple à utiliser que la technique de dépôt par évaporation sous vide. Cette dernière, bien que plus intéressante du point de vue de l'homogénéité des échantillons, n'a été utilisée que pour le développement

de substrats structurés par lithographie optique à l'*Institut d'Electronique Fondamentale* ou pour obtenir des échantillons uniformes. L'optimisation des paramètres de dépôt par évaporation a été le fruit d'un travail de plus d'un an de la part de S. Held et P. Gogol.

Pour les échantillons structurés par lithographie électronique, réalisés avec B. Ea-Kim dans la salle blanche commune *Institut d'Optique Graduate School*, l'*école Polytechnique* et *Thales Recherche et Technologie - Palaiseau*, nous avons optés pour un approche plus rapide, favorisant le prototypage à l'instar de l'uniformité du dépôt. L'application recherchée est ici l'observation d'effets plasmoniques, il n'y a donc pas de chimie de surface. La rugosité n'est donc pas importante pour nos échantillons. Nous avons donc utilisé le bâti de dépôt par pulvérisation cathodique dont nous disposons, et procédé à une optimisation rapide des paramètres en vue d'obtenir une épaisseur de dépôt la plus proche possible de la cible à réaliser ; à savoir 5 nm de titane pour réaliser une couche d'adhérence puis 50 nm d'or.

4.2.3 Mesures d'épaisseur des dépôts

Nous avons utilisé le banc monocapteur à balayage angulaire décrit dans la section 1.2.6.1 du chapitre 1 pour déterminer l'épaisseur moyenne des dépôts réalisés en utilisant la technique par évaporation ou par pulvérisation cathodique. Des prismes de BK7 et de SF10 sont utilisés en fonction du substrat utilisé pour le dépôt.

Les substrats de verre (BK7 ou SF10) sont tout d'abord nettoyés avant de pouvoir déposer la couche métallique. Cette opération étant hautement critique vis à vis de la qualité du dépôt, celle-ci est réalisée en salle blanche juste avant le dépôt proprement dit. Le nettoyage des substrats suit le protocole suivant (à quelques variantes près sur la température du trichloréthylène) :

1. immersion pendant 5 min dans un bain de trichloréthylène sous ultrasons ;
2. immersion durant 5 min dans un bain d'acétone sous ultrasons ;
3. immersion durant 5 min dans un bain d'isopropanol sous ultrasons ;
4. séchage à l'azote ;
5. déshydratation durant 5 min à 200° sous hotte à flux laminaire ;
6. refroidissement 5 min à température ambiante et stockage dans une boîte préalablement remplie d'azote.

Après cette opération, les substrats sont métallisés suivant la technique d'évaporation sous vide (*IEF*) ou la technique de pulvérisation cathodique (*Thales RT*). Finalement, la

mesure au système de résonance de plasmon de surface monocapteur angulaire peut être effectuée.

Afin d'obtenir un résultat plus précis et reproductible, les échantillons à mesurer doivent tout d'abord être débarrassé de tous résidus organiques susceptibles d'avoir contaminé la surface. De nombreux protocoles de nettoyage de la surface d'or sont utilisables [114], comme le décapage par plasma d'oxygène réactif ou le nettoyage par ozone et UV. Nous avons choisi une méthode simple et efficace, basée sur l'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) chaud. Le protocole est le suivant :

1. immersion de l'échantillon dans un bain de de peroxyde d'hydrogène et d'eau déionisée (1 : 3) à 80° C pendant 10 min ;
2. rinçage rapide à l'éthanol puis immersion dans un bain d'éthanol pendant 10 min ;
3. rinçage final à l'eau déionisée puis séchage à l'air sec.

Le système de SPR monocapteur effectue un balayage angulaire de 250 points entre $\theta = 5^\circ$ et $\theta = 30^\circ$ (BK7) ou entre $\theta = 25^\circ$ et $\theta = 50^\circ$ (SF10) et mesure la réflectivité TM de la couche d'or en chaque point. Le milieu ambiant utilisé est de l'eau déionisée ($n = 1,332$ à 633 nm) à température ambiante, soit 20° C.

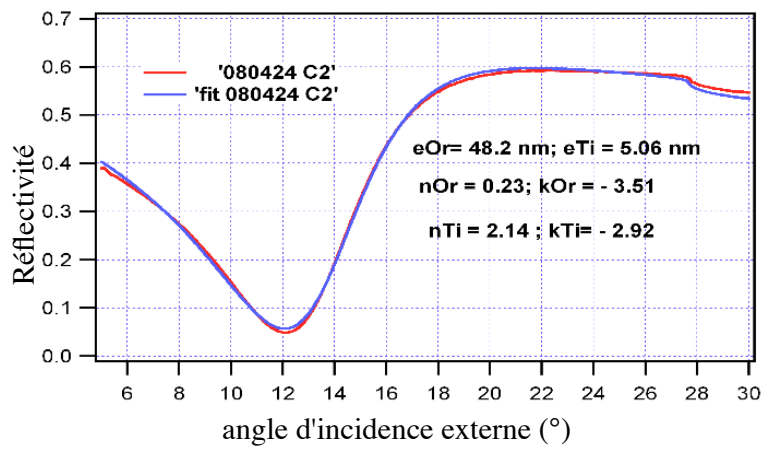
Une fois la réflectivité angulaire mesurée, les épaisseurs des couches d'adhérence (Ti ou Cr) et de la couche d'or sont déterminées par ajustement numérique, par la méthode de minimisation des moindres carrés, entre la courbe expérimentale et une courbe théorique. La courbe théorique est calculée à partir d'un modèle multicouche de Rouard étendu, en prenant comme base de calcul les paramètres des métaux de la table 14 (tous à la longueur d'onde He-Ne, soit 632,8 nm).

métal	**n**	**k**	**épaisseur (nm)**
Cr	3,14	3,32	2
Ti	2,71	3,77	5
Au	0,20	3,32	50

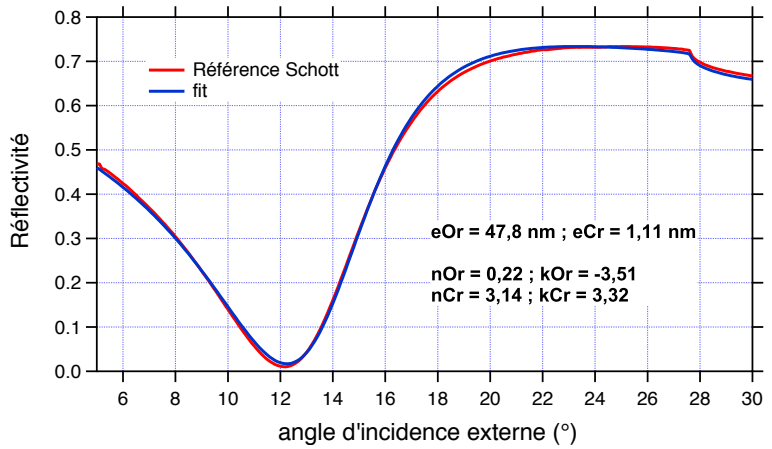
Table 14 – Paramètres initiaux utilisés pour le calcul de l'épaisseur des couches de métal déposées et caractérisées par SPR monocapteur angulaire à 632,8 nm.

Un premier ajustement est réalisé en laissant varier les épaisseurs et en conservant les indices fixes. Une fois la première estimation effectuée, une seconde passe est calculée en prenant comme hypothèses de départ les résultats de la première passe, cette fois-ci en laissant l'indice de l'or libre. Ceci est justifié par le fait que l'indice de l'or dépend très fortement de la qualité du dépôt en termes de rugosité et d'homogénéité. Il varie donc entre deux dépôts.

4.2.3.1 Échantillons obtenus par évaporation sous vide



(a)



(b)

FIGURE 89 – Courbes de réflectivité TM angulaire expérimentale (rouge) et théorique (bleu) obtenue pour des couches de métal déposées par évaporation sous vide. (a) Dépôt Ti/Au réalisé par l'*IEF*. (b) Dépôt de référence Cr/Au, réalisé par *Schott*.

La figure 89 donne deux exemples de mesures d'épaisseur effectuées à partir d'échantillons métallisés grâce à la technique d'évaporation sous vide. Le premier exemple (figure 89-a) a été réalisé par S. Held de l'*IEF*, tandis que le second est une lame provenant de notre fournisseur, *Schott*. La principale différence entre les deux échantillons provient de l'utilisation d'une sous-couche d'adhérence différente : titane dans le cas de la lame provenant de l'*IEF*, chrome pour la lame *Schott*. En effet, nous pouvons obtenir une adhérence équivalente en remplaçant le chrome, traditionnellement utilisé, par du titane, moins

absorbant. Il est donc possible dans ce cas de déposer une sous-couche plus épaisse, de l'ordre de 5 nm au lieu de 1 à 2 nm pour le chrome. Une plus grande épaisseur qui résulte en une meilleure continuité de la couche de titane, et par conséquent en une meilleure homogénéité de la couche d'or superficielle.

Dans les deux cas, la bonne adhérence de la sous-couche est contrôlée par un test très simple : on colle une bande adhésive sur la surface d'or. Si, lorsque l'on tente d'enlever la bande, l'or s'arrache, c'est que la sous-couche est trop fine ou mal déposée.

Les épaisseurs obtenues sont très proches de notre objectif dans les deux cas. Nous pouvons néanmoins observer certaines différences entre le dépôt Ti/Au et le dépôt Cr/Au, en termes de dynamique du plasmon angulaire. L'épaisseur de titane fait diminuer la dynamique de l'échantillon Ti/Au par rapport à l'échantillon Cr/Au (55% contre 72%). Il y a donc équilibre à trouver entre une couche d'accroche épaisse et uniforme, et un capteur possédant une dynamique importante. Néanmoins, ces différences n'impactent que très marginalement la pente de la résonance et donc la sensibilité du capteur.

4.2.3.2 Échantillons obtenus par pulvérisation cathodique

Pour les échantillons métallisés par pulvérisation cathodique, plusieurs tests ont été réalisés en faisant varier la puissance de cathode et le temps d'exposition. La figure 90 illustre les résultats obtenus avec une puissance de 200 W et des durées de 25 sec. (Ti) et 1 min (Au).

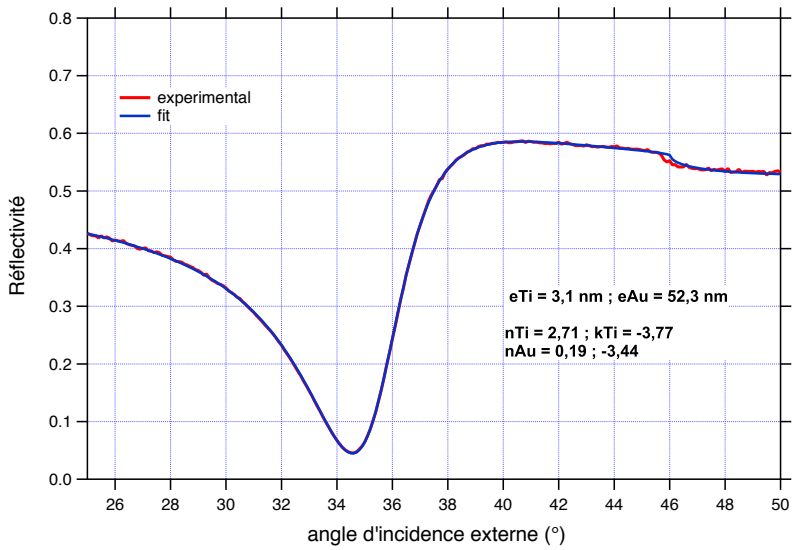


FIGURE 90 – Courbes de réflectivité TM angulaire expérimentale (rouge) et théorique (bleu) obtenue pour des couches de métal Ti/Au déposées par pulvérisation cathodique.

Les épaisseurs obtenues sont une fois encore proches de la consigne. Il est relativement difficile de faire une différence entre un dépôt Ti/Au par pulvérisation et un dépôt Ti/Au par évaporation. Néanmoins, nous supposons que la rugosité et l'homogénéité de la couche d'or sont différents. Nous avons donc utilisé un test rapide, permettant de différentier les deux techniques.

4.2.4 Mesures de résistivité des couches d'or

Afin de pouvoir rapidement déterminer si une couche mince d'or déposée possède des caractéristiques d'épaisseur et de rugosité compatibles avec une utilisation dans le cadre de capteurs SPR, et ce sans avoir recours systématiquement à un microscope à force atomique, nous avons comparé la résistivité mesurée à la résistivité théorique de celle-ci en utilisant la méthode des 4 pointes. En effet, il existe une corrélation inverse entre l'épaisseur de la couche (ou de l'ensemble de couches) de métal et sa résistivité. De même, il existe une corrélation inverse entre la rugosité d'une couche de métal, ou son homogénéité, et la résistivité de celle-ci. En d'autres termes, plus la couche métallique est épaisse, et plus sa résistivité va décroître pour tendre vers la résistivité du métal massif. De même, plus la rugosité du métal est élevée, plus sa résistivité augmente.

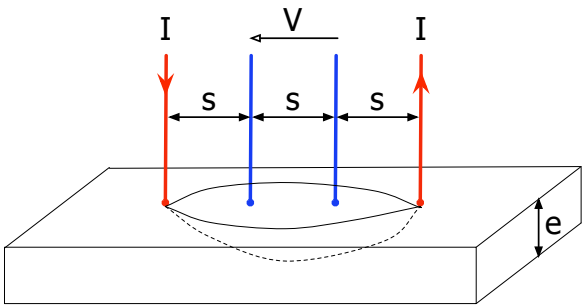


FIGURE 91 – Principe de la mesure de la résisitivité d'une couche mince métallique d'épaisseur e. Quatre électrodes, séparées par une distance s, sont mises au contact avec la surface du métal. Un courant I circule entre les électrodes extérieures (rouge). La tension aux borne des électrodes intérieures (bleu) est mesurée.

La mesure a été effectué en utilisant un système à 4 pointes comme schématisé dans la figure 91. Les pointes sont séparées d'une distance s, et sont maintenues au contact avec la surface d'or. Les deux électrodes externes sont utilisées pour faire circuler un courant I dans l'échantillon. Les deux électrodes internes servent à mesurer la tension sur la distance s. Nous avons effectué un ensemble de mesures pour chaque échantillon, allant de 10 µA jusqu'à une intensité de 10 mA, afin d'atteindre un régime courant/tension

stable. L'utilisation de courants de l'ordre de 10mA ne pose pas de problèmes quand à d'éventuels échauffements du métal. A. Bourque-Viens *et al.* [115] ont calculé qu'un tel courant impliquerait une variation de résistivité de moins de 1%.

La résistivité ρ de la couche est calculée à partir de la résistance / carré ($R_\square$ en $\Omega/\square$) mesurée aux bornes des électrodes grâce à la relation suivante :

$$R_\square = \frac{2\pi}{\ln(2)} \times \frac{V}{I} = \frac{\rho}{e} \tag{62}$$

Avec e l'épaisseur de la couche.

Afin de tester l'influence des paramètres de dépôt sur la résistivité de la couche, nous avons mesuré la résistance / carré d'échantillons ayant été métallisés avec des puissances différentes et des temps d'exposition variables. Les valeurs de résistivité résultantes, ainsi que les épaisseurs mesurées par SPR, sont données dans la table 15. D'après les résultats obtenus, portant sur un ensemble limité d'échantillons, il semble que les dépôts ayant une $R_\square$ inférieure à 180 $m\Omega$ sont le plus proche des paramètres idéaux pour notre système. Les modifications effectuées sur la puissance ou sur la durée de dépôt ont toutes amené à des résistances beaucoup plus importantes et n'ont pas permis d'obtenir une mesure pertinente en SPR.

Cette valeur, proche de 180 $m\Omega$ semble corroborée par la mesure répétée de la résistance / carré sur des échantillons Schott SF10 donnée dans la table 16. Pour deux échantillons Schott SF10 dont le dépôt d'or correspond à l'échantillon numéro 4 (53 nm d'or et 3 nm de chrome), nous avons reproduit la mesure de résistivité pour les quatre coins de l'échantillon et pour le centre. Les valeurs données correspondent à la moyenne de trois mesures. On observe clairement une résistivité proche de 180 $m\Omega$ à 200 $m\Omega$ dans tous les cas.

Afin de valider ou non l'utilisation d'une telle méthode en routine, il est bien sûr indispensable d'effectuer des mesures sur un ensemble beaucoup plus large d'échantillons. Il serait également opportun de comparer la rugosité des dépôts grâce à l'utilisation d'un AFM ou à défaut d'un profilomètre performant.

		couche 1				couche 2					
n°	**substrat**	**puiss. (W)**	**métal**	**t (s)**	**e (nm)**	**puiss. (W)**	**métal**	**t (s)**	**e (nm)**	**$R_\square$ ($m\Omega$)**	**ρ ($\Omega.m$)**
1	BK7	200	Au	20	–	80	Au	120	–	264	–
2	SF10	200	Ti	25	3,1	200	Au	60	52,3	167	$4,2 \times 10^{-8}$
3	BK7	200	Ti	10	–	100	Au	120	–	372	–
4	SF10	–	Cr	–	2,95	–	Au	–	53,1	173	$4,4 \times 10^{-8}$
5	BK7	200	Ti	25	–	100	Au	90	–	563	–
6	BK7	200	Ti	30	6,1	200	Au	60	46,5	–	–

TABLE 15 – Epaisseurs, mesurées par SPR, et résistivité de couches minces d'or pour différents paramètres de dépôt et combinaisons de métaux Ti/Au et Cr/Au. Les épaisseurs dont la valeur est indéterminée (–) n'ont pas pû être mesurée par SPR (plasmon trop loin du modèle, pas de convergence). Les résisitivités dont la valeur est indéterminée (–) n'ont pû être calculées, car l'épaisseur n'est pas déterminée. L'échantillon n° 4 est un dépôt par évaporation de référence (*Schott*).

échantillon	**$R_\square$ ($m\Omega$)**				
	C	NO	NE	SE	SO
7	182	187	191	201	233
8	182	190	192	196	194

TABLE 16 – Résistivité / carré d'une lame d'or de référence Schott SF10. La valeur donnée correspond à la moyenne de trois mesures. celle-ci s'effectue au centre (C), dans le coin nord-ouest (NO), nord-est (NE), sud-ouest (SO) et sud-est (SE) de la lame.

4.3 Structuration par photolithographie UV

Dans le cadre d'une collaboration avec S. Held et P. Gogol de l'*Insitut d'Electronique Fondamentale*, nous avons utilisé la technique de photolithographie optique pour fournir un ensemble de substrats structurés or / verre de tailles microniques (période supérieure au micron). L'idée ici n'est pas d'exhalter le champ électrique, mais d'observer la propagation du plasmon de manière anisotrope dans deux directions orthogonales. Il est attendu que la résonance plasmon moyenne, observée à travers le montage de P-SPRI, sera différente suivant que le vecteur d'onde du plasmon de surface est orthogonal ou parallèle aux pistes d'or. Ainsi, nous devrions être capables de mettre en évidence, et réduisant les tailles de structures, une anisotropie due à la propagation différentielle du plasmon de surface dans les deux directions.

Néanmoins l'utilisation de réseaux de tailles microniques a été problématique, comme nous le verrons dans la section 4.3.3. En effet, la période d'un réseau a, dans ce cas, des dimensions très proches de la taille des pixels de la caméra CCD. Il en résulte un effet de moiré important, réduisant la lisibilité des résultats.

Le protocole utilisé pour ces échantillons a néanmoins permis de mettre au point les motifs carrés utilisés dans le chapitre 3. Nous décrirons rapidement la procédure utilisée dans le paragraphe 4.3.2. Voyons tout d'abord les structures or / verre microniques utilisées.

4.3.1 Définition des motifs à réaliser

La caractéristique la plus contraignante de l'utilisation de techniques de photolithographie UV est qu'il est bien souvent obligatoire de passer par la définition et la fabrication d'un masque de lithographie. Il existe des techniques dites « maskless » (sans masque), mais elles reviennent bien souvent à balayer l'échantillon, ce qui peut prendre un temps important dans le cas de motifs très étendus comme dans notre cas. L'utilisation du masque est aussi un point positif dès lors où le motif est toujours identique. Dans ce cas,

la fabrication d'un nouvel échantillon est très rapide.

Le masque est généralement constitué d'une plaque de verre sur laquelle sont déposés des motif en chrome d'une épaisseur d'environ 150 nm. On utilisera des résines négatives afin d'inverser les motifs du masque. La mise au point et le transfert du masque illustré ici a été réalisé par S. Held dans le cadre de sa thèse de doctorat.

La figure 92-a donne une illustration de la géométrie d'un des motifs de masque utilisés. Le motif complet est constitué d'une matrice de 16 zones, au sein desquelles des réseaux de pas identiques Λ à 50% de taux de remplissage ont été réalisés. Chaque zone (figure 92-b) est constituée de 4 carrés contenant chacun un réseau structuré. Les deux orientations orthogonales sont obtenues en tournant le réseau de 90°. Chaque réseau recouvre une surface d'1 mm par 1mm, facilitant ainsi la mesure par P-SPRI.

Pour un motif complet, on peut donc réaliser 3 réseaux de pas différents, chacun suivant les deux directions orthogonales. Nous avons utilisé ici un motif de pas $\Lambda = 1\mu m$, $2\mu m$, et $5\mu m$. Dans la pratique, le réseau à 1 micron n'a pas pû être développé. Nous avons donc pû faire une mesure sur des réseaux orthogonaux à 2 µm et 5 µm.

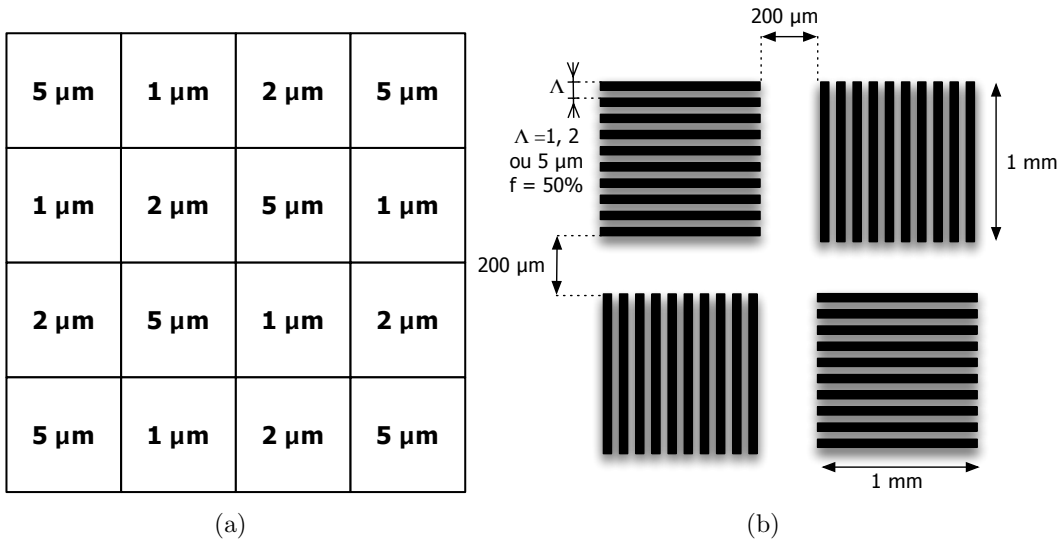


FIGURE 92 – Géométrie du motif or /verre déposé par photolithographie UV. (a) Matrice de zones de pas différent 1, 2 et 5 µm. (b) Détail d'une zone de pas Λ. Les réseaux sont séparés par un espace de 200 µm et sont orientés orthogonalement par paire diagonale. Chaque réseau couvre une surface d'1 mm par 1 mm.

4.3.2 Procédure de structuration par photolithographie UV

La technique utilisée pour passer du motif défini sur le masque à un échantillon or / verre structuré est assez classique dans le domaine des semiconducteurs. L'utilisation de substrats de verre nécessite des précautions particulières de nettoyage (voir la section 4.2.3). Le principal problème rencontré et résolu par S.Held et P. Gogol a été la présence de réflexions parasites lors de l'insolation des échantillons.

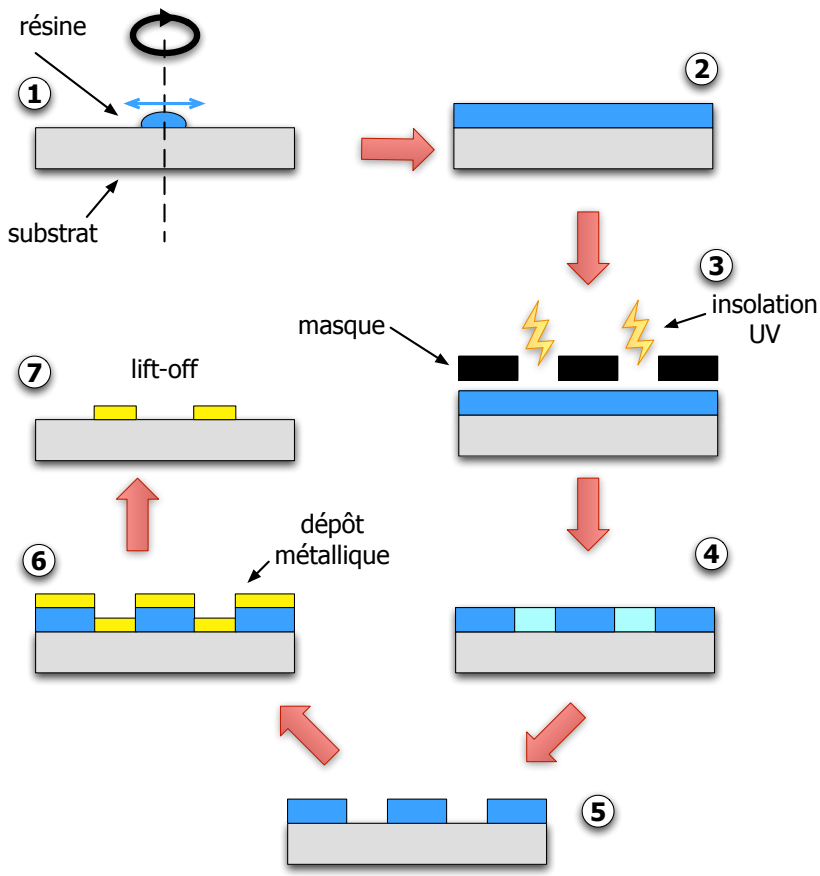


FIGURE 93 – Procédure de photolithographie UV par lift-off. (1) spin-coating, (2) couche de résine uniforme, (3) insolation UV, (4) monomérisation de la résine, (5) développement, (6) dépôt métallique, (7) lift-off.

Nous avons utilisé la technique dite de « lift-off » pour réaliser les structures métalliques. Nous avons également utilisé une résine positive, c'est à dire que l'exposition aux UV de la résine résulte en un dégradation de celle-ci. Toutes les étapes ont été réalisée sur notre échantillon en salle blanche à l'*IEF* d'Orsay, par S. Held. Cette technique est illustrée dans la figure 93, et est constituée de 7 étapes, numérotées sur la figure.

1. : Le substrat, préalablement nettoyé, est placé dans une tournette. Une goutte de résine photosensible est déposée au centre.
2. : Après rotation, une couche uniforme de résine recouvre la substrat.
3. : Le masque est positionné sur la couche de résine. L'échantillon est irradié par un faisceau UV (248 nm).
4. : Cette insolation a pour effet de monomériser la résine à l'endroit où le masque laisse passer les UV.
5. : L'échantillon es plongé dans un bain de développement, afin de dissoudre la résine exposée.
6. : Un dépôt métallique uniforme est effectué sur l'échantillon, recouvrant aussi bien le substrat que la résine.
7. : un nettoyage final est réalisé au solvant, permettant de dissoudre la résine restante. Il ne reste donc plus que les pistes de métal déposées directement sur le substrat de verre.

Cette procédure est bien sûr simplifiée. Dans la pratique, la métallisation nécessite une couche d'accroche, et des étapes de nettoyage et de rinçage ont été omises.

Une fois l'échantillon structuré correctement développé et le lift-off réussi, nous pouvons passer à l'étape de caractérisation anisotrope, grâce à un montage de SPRI.

4.3.3 Caractérisation par SPRI

L'étape de caractérisation proprement est celle qui a posé le plus de problèmes. L'idée initiale, à savoir observer la propagation anisotrope du plasmon de surface dans le réseau or /verre, s'est heurtée à la réalité du système d'imagerie utilisé. En effet, dans le cas qui nous intéresse et que nous avons détaillé dans cette section de réseaux microniques de 1, 2 et 5 microns de pas, le pas du réseau est très proche des dimensions caractéristiques des pixels de notre caméra CCD. Ceux-ci ont une dimension latérale d'environ 8 µm (incluant l'espace entre deux pixels sur la matrice CCD). De ce fait, il apparaît systématiquement sur les réseaux un effet de moiré très gênant dans l'observation de plasmons angulaires. Cet effet est également présent dans le cas de mesures temporelles, accentuant les défauts d'homogénéité de la couche d'huile d'indice ou les bruits vibrationnels.

La figure 94 montre une image de réflectivité SPR de l'échantillon structuré obtenu précédemment. On voit très distinctement l'effet de moiré sur le carré de période $\Lambda = 5\mu m$ lorsque le plasmon se propage suivant la même direction que la disposition du réseau.

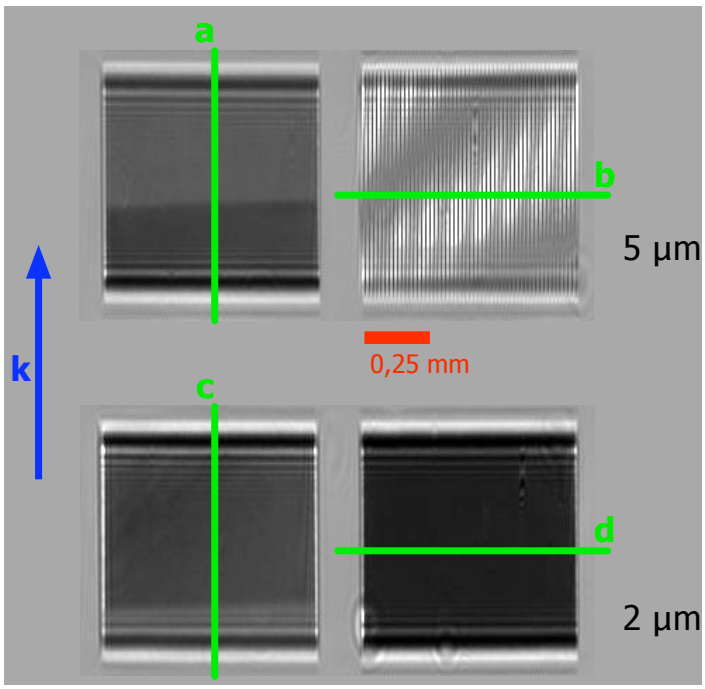


FIGURE 94 – Exemples de réseaux observés en SPRI (réflectivité normalisée TM/TE). La direction du vecteur d'onde du plasmon de surface est indiquée par la flèche bleue. La barre rouge indique l'échelle. Les deux réseaux du haut ont une période de 5 µm, et les deux réseaux du bas de l'image ont une période de 2µm. Les réseaux à gauche de l'image sont orientés horizontalement, tandis que les réseaux à droite de l'image sont orientés verticalement. Finalement, les lignes a, b, c, d (vert) indiquent les coupes détaillées dans la figure 95

Lorsque la propagation est orthogonale au réseau, l'effet disparaît. Il subsiste néanmoins un phénomène d'« ombrage ». Nous supposons que cet ombrage n'est pas un effet plasmonique, mais dépendait uniquement de la géométrie du réseau.

Des coupes représentant les profils de réflectivité TM /TE orthogonalement aux réseaux ont été tracées dans la figure 95. Les graphiques montrent clairement que le profil de réflectivité est abérrant pour le réseau 5 µm parallèle au plasmon, avec des pics de "réflectivité" à 3,5. Les coupes sur les réseaux 5 µm et 2 µm parallèles au plasmon ne présentent pas de telles artefacts, saufs sur les bords de réseau. Les pics observés sur les graphes (a) et (c) semblent dûs à des réflexions parasites de la face arrière de la lamelle de verre. Afin d'observer un comportement anisotrope des plasmons de surface, il est nécessaire de diminuer encore la taille des réseaux pour éliminer cet effet de moiré.

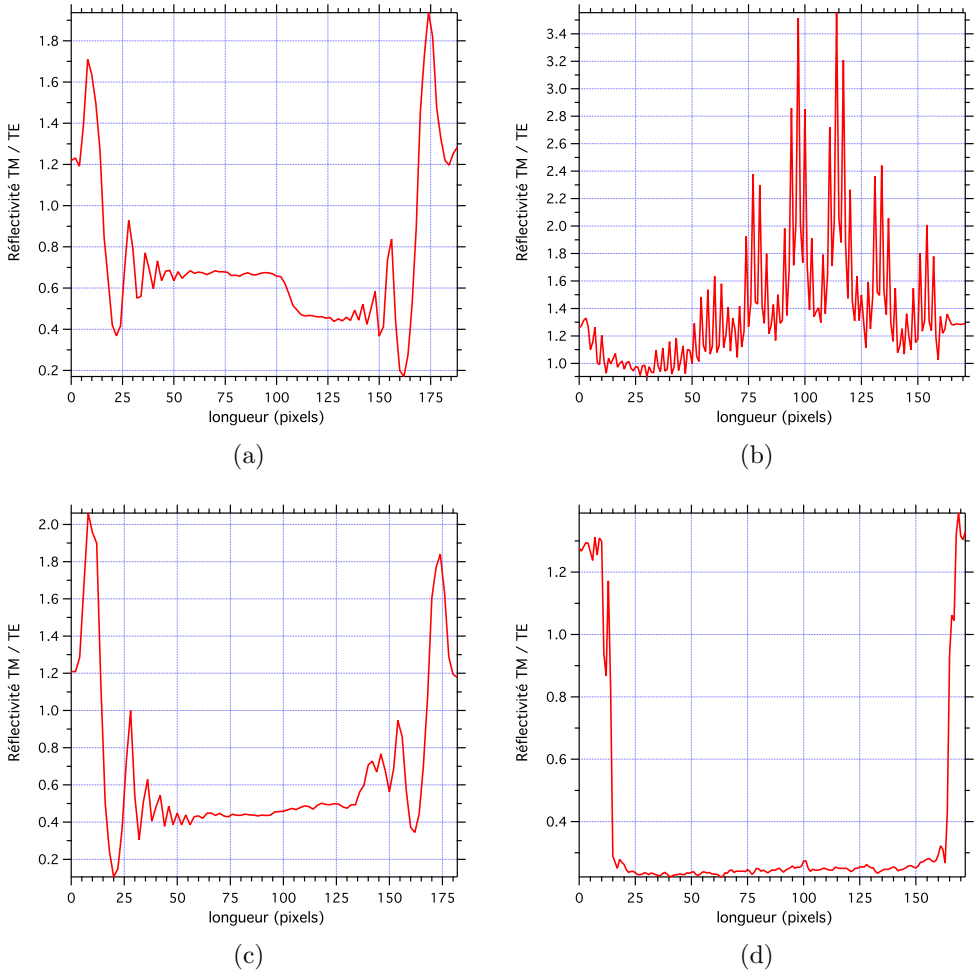


FIGURE 95 – Coupes orthogonales aux réseaux, représentant le profil de réflectivité TM /TE de différents réseaux de l'image SPR de la figure 94. (a) et (b) : réseaux 5 µm ; (c) et (d) : réseaux 2 µm. (a) et (c) : plasmon orthogonal au réseau ; (b) et (d) : plasmon parallèle au réseau.

4.4 Structuration par lithographie à faisceau d'électrons focalisé

Afin de pouvoir réaliser des motifs plus fins, et ainsi entrer dans le domaine de la nanoplasmonique, il devient utile de changer d'outil de lithographie. En effet, la lithographie UV, comme les autres méthodes par projections, est limitée intrinsèquement par la limite de diffraction du système d'insolation, et donc par la longueur d'onde utilisée. Dans la pratique, la taille de motif minimum atteignable est de l'ordre de 700 nm pour un insolateur fonctionnant à 450 nm [116]. Il existe de nombreuses méthodes pour détourner cette limite. Il est par exemple possible d'utiliser des plasmons de surface et un masque métallique pour descendre bien en dessous de la limite de diffraction [117].

Néanmoins, toutes ces techniques reposent sur l'utilisation d'un masque prédéfini. Dans une approche plus expérimentale, où la taille des motifs et leur géométrie sont susceptibles de changer fréquemment, il est plus judicieux d'avoir recours à une méthode d'écriture directe, où un faisceau est déplacé sur la surface à insoler (dans la pratique c'est l'échantillon qui se déplace sous le faisceau).

Une des techniques les plus fréquemment utilisées pour la nanostructuration est la lithographie par faisceau d'électrons focalisé (ou EBL pour electron beam lithography). Un faisceau d'électron de profil gaussien est focalisé sur la surface de la résine électrosensible et le déplacement de l'échantillon permet de créer des motifs variés très simplement. L'utilisation d'un faisceau d'électron permet d'obtenir une résolutions remarquable . La longueur d'onde d'un électron soumis à une tension d'accélération V est donnée par la relation suivante :

$$\lambda = \frac{h}{\{2me\mathrm{V}\,(1 + e\mathrm{V}/2mc^2)\}^{1/2}} \tag{63}$$

Où m est la masse de l'électron, e sa charge, c la vitesse de la lumière dans le vide et h la constante de Planck.

Pour une tension d'accélération de 120 kV, La longueur d'onde théorique d'un électron est $\lambda = 3,4 \times 10^{-3}$ nm, à comparer aux 248 nm atteignables en photolithographie UV profonde [118] (Deep UV ou DUV). Un des principaux inconvénients de la méthode est qu'il est nécessaire de balayer la surface à insoler. C'est une technique par conséquent lente, et donc réservée à la fabrication d'échantillons uniques. Nous disposons, au sein de la salle blanche commune *Institut d'Optique Graduate School*, *école Polytechnique* et *Thales RT*

– *Palaiseau*, d'un EBL (nB3 de *Nanobeam ltd.*). Nous avons donc eu la possibilité, avec B. Ea-Kim, de fabriquer nos propres échantillons nanostructurés.

4.4.1 Principe de la lithographie à faisceau d'électron focalisé

Le fonctionnement d'un système de lithographie à faisceau d'électron focalisé est dérivé de la microscopie électronique en transmission. Les électrons sont émis par une source en haut de la colonne et accélérés par une haute tension. Ils sont ensuite condensés et focalisés par une colonne d'optiques électroniques et de lentilles électromagnétiques sous forme d'un faisceau gaussien sur la surface de l'échantillon (voir figure 96). Le déplacement de l'échantillon est réalisé par une platine de translation X-Y, dont la position est contrôlée par un interféromètre, permettant un déplacement d'une précision de l'ordre du nanomètre. L'écriture des motifs se fait généralement par un balayage du faisceau dit « vector scan », c'est à dire que le motif est vectorisé dans la mémoire du système, qui détermine l'ordre d'écriture. Une ligne continue est en réalité tracée point par point plutôt que de manière continue par le faisceau. Entre chaque point, le faisceau est déflecté par l'effaceur de faisceau (beam blanker) hors de l'axe des lentilles.

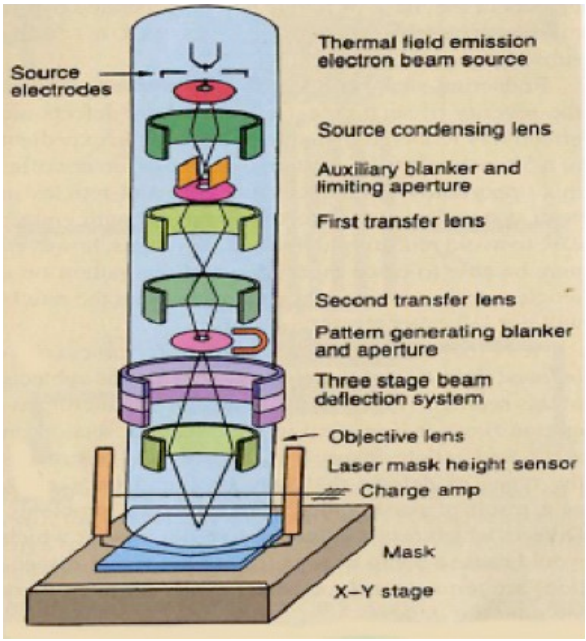


FIGURE 96 – Illustration du fonctionnement de la colonne d'un système EBL. La source (en haut) émet un faisceau d'électrons qui est focalisé sur le l'échantillon par le jeu d'un ensemble de lentilles. Ce dernier se déplace grâce au mouvement d'une platine de translation X-Y. l'écriture continue est assurée grâce à l'effaceur de faisceau (beam blanker), qui défléchi les électrons entre chaque point.

Le rôle de la source est crucial dans ce type de système. En effet, celle-ci doit pouvoir fonctionner de manière continue sur de très longues périodes de temps. A titre d'exemple, les motifs définis plus loin ont été écrits en plus de 10h. Des dérives thermiques ou du bruit sur la source rendraient la réalisation de motifs impossible. Des émetteurs de Schottky (filament de tungstène mono-cristallin porté à 1800° K par un fort courant, de l'ordre de quelques ampères) sont le plus souvent utilisés [119]. Il est de plus nécessaire de placer l'ensemble de la colonne sous ultravide, de l'ordre de 10^{-8} Pa. Un tel vide est nécessaire afin d'éviter toute interaction entre les électrons et d'éventuels atomes présents dans le milieu d'une part ; et d'autre part afin d'éviter l'adsorption d'atomes sur la surface de la pointe de source, générant du bruit ou un « flash » capable de détériorer le filament.

La limite de résolution d'un tel système peut être donnée en première approximation par le diamètre du faisceau gaussien d'électrons. Ce diamètre dépend des caractéristiques de la source et des optiques, mais il est généralement inférieur à 5 nm [120]. Néanmoins, aux énergies utilisées (quelques dizaines de keV), les interactions électrons / matière sont importantes. Ces interactions ont lieu dans la résine et les couches inférieures de l'échantillon, résultant dans la création le plus souvent d'électrons secondaire lorsque les électrons incidents ont une énergie supérieure à l'énergie de seuil du matériau (environ 5 eV pour du PMMA). Les électrons secondaire peuvent alors être diffusés vers l'avant (forward scattering), ou rétrodiffusés (backscattering). Ces deux phénomènes entrent en jeu dans l'élargissement de la zone exposée par le faisceau et donc augmente la limite de résolution du système. Afin d'illustrer notre propos, nous avons réalisé une simution Monte-Carlo (en utilisant le logiciel *Casino* [121]) de la propagation d'un faisceau d'électrons accélérés à 80 keV (la tension utilisée pour nos structures) traversant une couche de 300 nm de PMMA, puis 50 nm d'or, pour enfin atteindre le substrat de verre SF10. Les trajectoires sont données dans la figure 97 pour 500 électrons. On observe clairement le cône de diffusion avant, ainsi que les trajectoires isolées de rétrodiffusion dans le PMMA.

Dans la pratique, cela signifie que la résine va être insolée une seconde fois au passage des électrons secondaires. Ce comportement est moins problématique pour la traçage de motifs isolés que pour l'obtention de réseaux. Dans ce dernier cas, la dose reçue par la résine aux abords du point d'impact n'est pas négligeable, et il se crée un phénomène dit d'effet de proximité. La résolution pratique va donc dépendre de très nombreux paramètres, comme la qualité de la source et des optiques, les propriétés de l'échantillon (son numéro atomique) et l'épaisseur de la résine, la durée d'exposition etc. Des motifs périodiques de 20 nm ont ainsi pû être obtenus [122, 123].

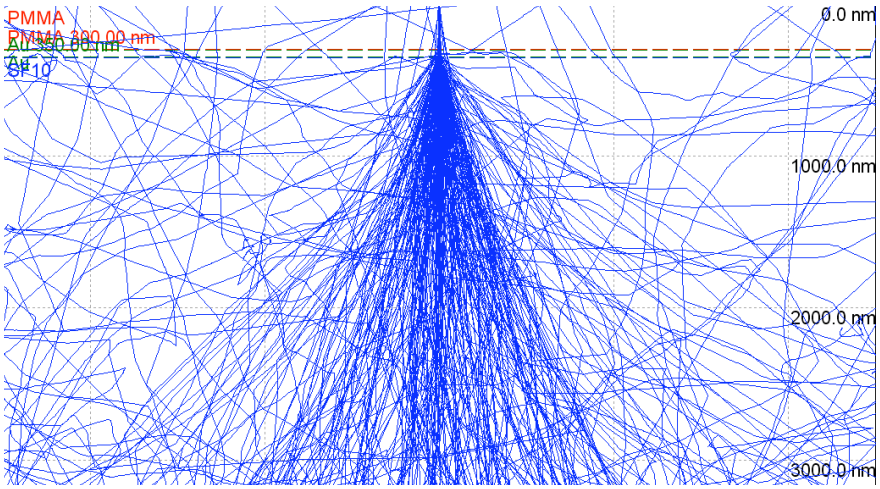


FIGURE 97 – Simulation Monte-Carlo (500 électrons) de la trajectoire d'un faisceau d'électrons à 80 keV à travers la résine électrosensible (PMMA), la couche d'or et le substrat de verre.

4.4.2 Définition des motifs à réaliser

Les motifs choisis suivent les paramètres des simulations détaillées dans la section 4.1. Nous avons donc défini une matrice de motifs, orientés orthogonalement les uns par rapport aux autres, et de pas variable. La figure 98 illustre la géométrie utilisée. Une matrice de 8×8 réseaux est ainsi définie. Un codage permet de reconnaître les différents réseaux. Les lettres donnent l'orientation : A pour horizontal et B pour vertical. Les chiffres donnent la période du réseau : 1 pour $\Lambda = 800$ nm, 2 pour 600 nm, 3 pour 400 nm et 4 pour 200 nm. Le taux de remplissage est toujours de 50%, quelque soit le motif ; afin de suivre au plus près les paramètres simulés. Les périodes de 1 µm et 2 µm n'ont pas été utilisées à cause des problèmes d'imagerie évoqués plus haut.

Une différence importante par rapport aux réseaux réalisés précédemment, est que cette fois-ci, nous sommes partis de substrats préalablement métallisés (substrats *Schott* ou bien métallisés par pulvérisation cathodique). Nous avons donc gravé les motifs jusqu'au verre au lieu de déposer du métal sur le substrat par lift-off. Cette méthode permet de mieux imager l'échantillon par SPRI (présence d'or sur tout la surface, sauf entre les pistes), et devrait réduire les problèmes optiques de moiré évoqué plus haut.

4.4.3 Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication diffère quelque peu de celui utilisé pour la lithographie UV. L'idée ici est de graver une lame recouverte d'or uniforme jusqu'au verre, plutôt que

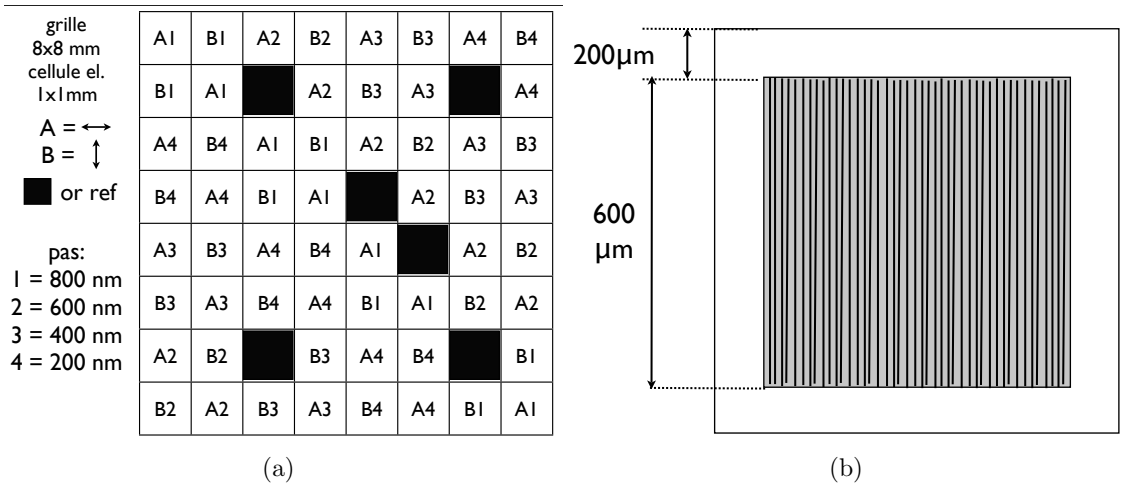


FIGURE 98 – Géométrie des réseaux fabriqués par lithographie électronique. (a) Matrice de 64 zones carrées de 1 mm de côté. Chaque zone est caractérisée par un réseau possédant un pas et une orientation propre formant un code. Les carrés noirs sont les références sans motif, pour mesurer le plasmon sur de l'or uniforme. (b) détail d'un réseau. la zone structurée correspond à une surface de 600 µm par 600 µm.

d'utiliser une technique de lift-off. Nous en avons définis les étapes principales dans la figure 99.

Les substrats de verre (BK7) sont préalablement nettoyés en utilisant le protocole défini au paragraphe 4.2.3. Nous avons fabriqué des réseaux or / verre en partant cette-fois ci de substrats métallisés. La première étape (numérotée sur la figure) consiste donc à déposer par pulvérisation cathodique (puissance de 200 W) la couche d'adhérence de titane (30 sec.) et la couche d'or (1 min). Les épaisseurs mesurées par SPR sont données dans la table 15 (substrat n° 6).

La résine électrosensible est déposée sur l'échantillon par rotation grâce une tournette (étape 2). Nous avons utilisé une résine PMMA haute densité de poids moléculaire 950 000 MW dans une solution d'anisole (4%). La tournette effectue une rotation à 4000 tours / minute pendant 20 sec, donnant ainsi une épaisseur uniforme de PMMA d'environ 200 nm [124].

L'étape 3 consiste à sensibiliser la résine grâce au faisceau électronique. Nous avons utilisé une dose de 780 µC / cm^2. La réalisation du motif a demandé environ 10 heures (environ 600 sec par motif). La résine est ensuite développée (étape 4) pendant 40 sec dans un bain de développeur de MIBK (méthyl isobutyl cétone) et isopropanol (en proportions 1 :3), puis rincée 15 sec dans un bain d'isopropanol avant un séchage à l'azote.

L'étape suivante (5) consiste à graver la couche d'or à l'endroit où la résine a été dé-

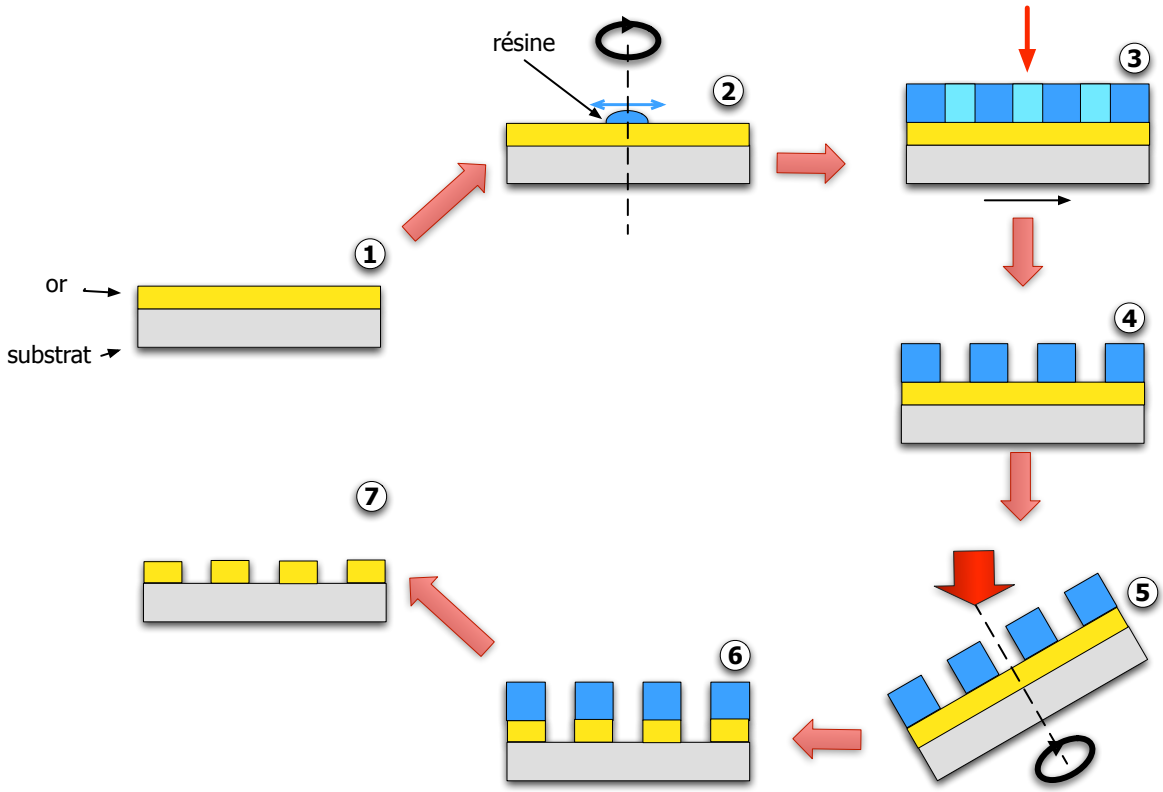


FIGURE 99 – Procédé de fabrication de motifs or / verre par lithographie à faisceau d'électrons focalisé.(1) échantillon uniforme, (2) spin-coating de la résine, (3) sensibilisation de la résine par faisceau d'électron, (4) développement, (5) gravure ionique (IBE), (6) échantillon structuré recouvert de résine. (7) échantillon final.

veloppée. Pour cela, nous avons utilisé un bâti de gravure ionique (ion beam etching ou IBE). Des ions d'argon sont ejecté d'un canon à ions et fortement accélérés vers l'échantillon. L'impact des ions sur ce dernier va pulvériser les atomes de surface, gravant ainsi l'échantillon. Afin d'obtenir une meilleur uniformité, l'échantillon est mis en rotation et est disposé à 30°par rapport aux ions préalablement neutralisés. La gravure ayant lieu de manière indiscernée sur l'or et la résine, il faut pouvoir stopper le processus quand l'or est entièrement gravé dans les creux. Pour cela nous observons la décroissance du signal de spectroscopie de masse des ions secondaire (secondary ions mass spectroscopy ou SIMS) pour l'or. Quand le signal devient négligeable, cela signifie que l'or est totalement gravé. Le substrat obtenu (6) est donc un motif or / verre, avec les pistes d'or surmontées d'une couche de PMMA. Un dernier rinçage dans un bain de solvant (trichloréthylène) permet d'éliminer cette couche résiduelle (7).

La figure 100 donne des images prises en microscopie électronique à balayage (MEB)

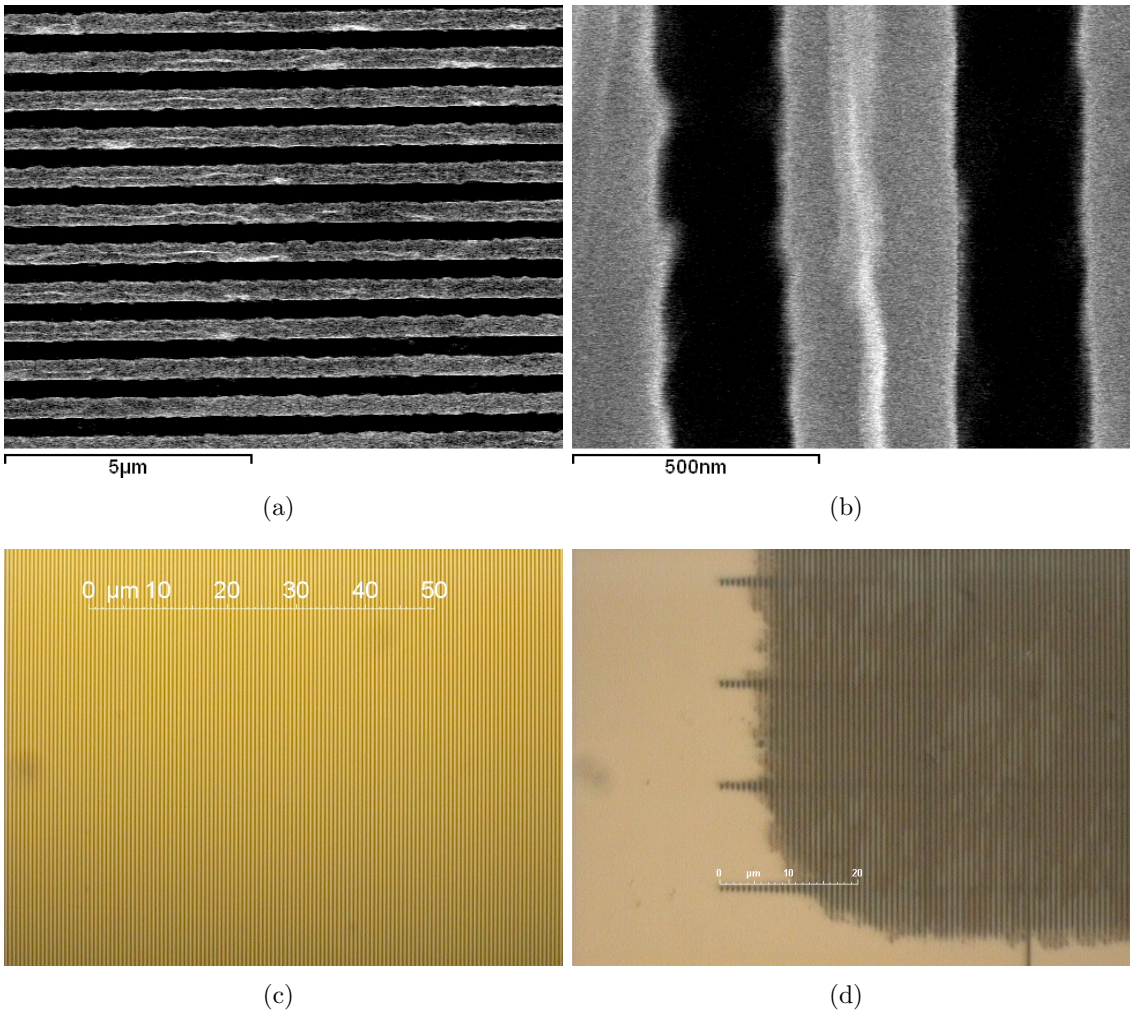


FIGURE 100 – Images caractéristiques de l'échantillon nanostructuré obtenu. (a) image MEB d'un réseau 800 nm (10 kV, ×10000). (b) détail du réseau (10 kV, ×60000). (c) Image en microscopie optique d'un motif avant gravure ionique. (d) Image en microscopie optique du bord d'un motif après gravure, illustrant le sous-développement de l'échantillon.

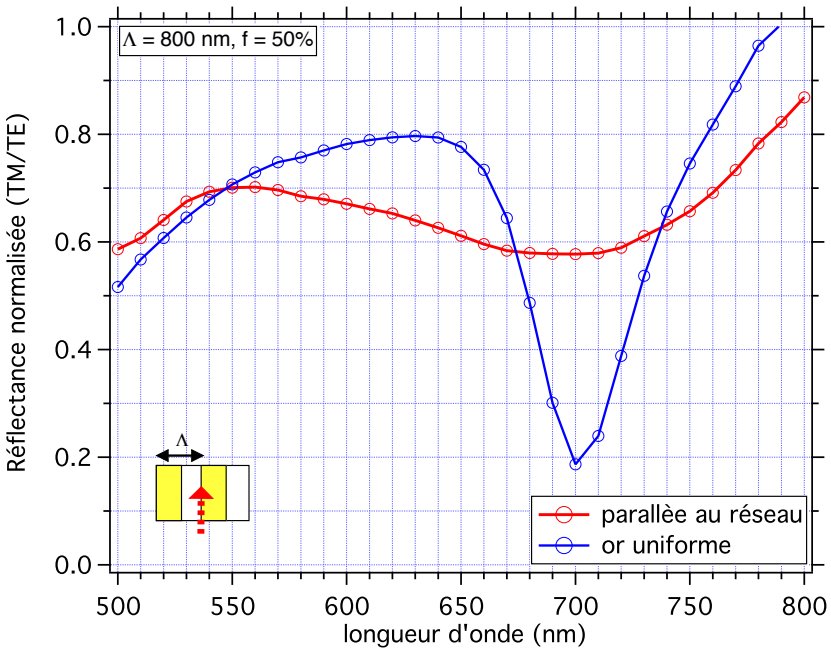
et en microscopie classique des structures obtenues. Les pistes sont bien séparées et continues. On peut observer des irrégularités de forme sur les bords de ligne. L'image prise en microscopie optique montre que le développement des motifs a été un peu trop court (bordures non développées). On peut entrevoir également les raccords de champs du système de lithographie électronique. Globalement, l'échantillon obtenu est très satisfaisant pour un premier test.

4.4.4 Caractérisation par SPRI

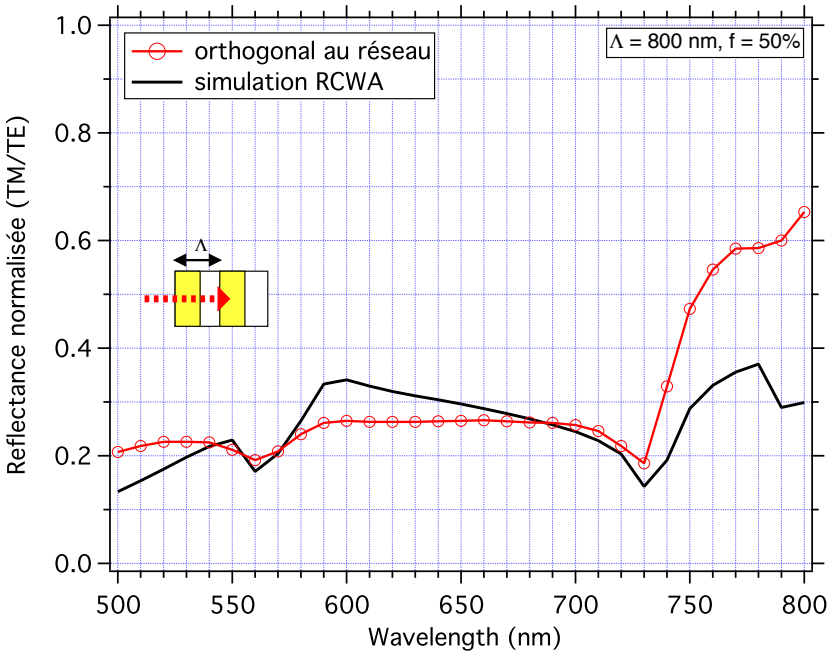
Nous avons voulu caractériser cet échantillon en utilisant le banc de de SPRI spectro-angulaire disponible au laboratoire. Le calcul effectué sur cette structure avait montré l'existence de deux pics de résonance spectrale à un angle aux environs de 20°pour le réseau de période 800 nm. Une mesure de la réflectivité spectrale normalisée (TM/TE) de la couche d'or a été effectuée par M. Nakkach en utilisant de l'eau déionisée comme milieu ambiant et un angle d'incidence externe de 18°. Le résultat est donné ici dans la figure 101.

La première courbe (figure 101-a) correspond à la réflectivité moyenne d'un motif lorsque le plasmon se propage parallèlement au réseau. On observe une faible résonance vers 700 nm, ce qui est caractéristique d'une couche uniforme (courbe bleue). Il semble donc que dans ce cas, la réflectivité soit assimilable à une couche équivalente uniforme d'indice de réfraction hydride entre l'or et l'eau.

Le profil de réflectivité d'un motif dont le plasmon se propage orthogonalement au réseau est en revanche très différent, comme l'atteste la courbe de la figure 101-b. On voit clairement deux pics de résonance situés à 560 nm et à 730 nm. On peut faire coincider ces pics avec ceux obtenus par le calcul, dans des conditions semblables (courbe noire). L'allure générale de la courbe simulée est quelque peu différente, notamment à 600 nm et à 780 nm. En effet, la largeur spectrale de la source de lumière (fente d'entrée du système) du banc de SPRI multispectral convolue le signal. Pour cette expérience, la largeur spectrale est d'environ 15 nm.



(a)



(b)

FIGURE 101 – Courbes de réflectivité spectrale normalisées TM/TE d'un motif Au / BK7 800 nm (f = 50%) à 18° d'incidence externe. Le milieu ambiant est de l'eau. (a) (rouge) le plasmon se propage parallèlement aux pistes de métal, (bleu) courbe de référence expérimental sur de l'or uniforme. (b) (rouge) Le plasmon se propage orthogonalement aux pistes, (noir) simulation par la méthode modale de Fourier de la propagation orthogonale aux pistes. Le pas de calcul et de mesure est de 10 nm. (courbes expérimentales) La largeur spectrale de la source est de 15 nm.

Conclusion

Ce chapitre nous a permis de jeter les bases pour les développements futurs dans le domaine de la nanostructuration de substrats métalliques.

La mise au point de réseaux métalliques passe au préalable par la maîtrise du dépôt de métal. Nous avons comparé deux techniques très répandues : l'évaporation sous vide, et la pulvérisation cathodique. Nous avons déterminé que, bien que la technique d'évaporation sous vide soit supérieure sur un plan de l'homogénéité et de la rugosité, la technique par pulvérisation cathodique permet un dépôt rapide et simple pour des prototypes de réseaux. Les échantillons ainsi réalisés ont été caractérisés par SPR monocapteur pour la mesure de l'épaisseur de métal. Nous avons également mesuré la résistivité de la couche de métal par la méthode à 4 pointes pour obtenir une information rapide sur la qualité des couches métalliques déposées.

Nous avons calculé un ensemble de structures à l'aide de la méthode modale de Fourier pour lesquelles des résonances intéressantes étaient susceptibles d'apparaître. Nous avons utilisé une géométrie or / verre, afin de tirer partie des potentialités offerte par la chimie différentielle des alkanethiols et des silanes. Bien que la sensibilité de tels réseaux soit inférieure à une lame uniforme d'or, un gain important est attendu en diminuant le pas du réseau et en optant pour un géométrie différente [102] (modulation d'épaisseur de la couche d'or), ou en structurant la couche de diélectrique [125]. Nous avons pû observer que les structures or / verre calculées possédaient un contraste ΔR suffisant pour observer un effet anisotrope lors de la mesure expérimentale.

Nous avons ensuite caractérisé par SPRI un échantillon microstructuré or / verre réalisé par lithographie UV et lift-off de la couche d'or. Les tailles en jeu dans un tel échantillon ont rendues très difficile la caractérisation du fait de la présence d'effet de moiré et d'ombrages. Ces phénomènes sont probablement liés à la géométrie du réseau ainsi qu'au rapport de la période du réseau à la taille des pixels de la caméra.

Finalement, nous avons défini un ensemble de réseaux nanométriques or / verre, que nous avons ensuite fabriqué en utilisant une technique de lithographie par faisceau d'électrons focalisé et de gravure ionique. Ces réseaux ont ensuite été caractérisés par SPRI multispectrale. Nous avons pû observer un bon accord entre le modèle et les données. Lorsque le plasmon de surface se propage parallèlement au réseau, la résonance obtenue est caractéristique d'une couche effective métal uniforme / eau. En revanche, lorsque le plasmon se propage perpendiculairement au réseau, deux résonances sont observées. Ces deux résonances sont également observées dans la simulation.

Conclusion et perspectives

Le premier objectif de ce travail de thèse était la mise au point expérimentale d'un système basé sur l'imagerie par résonance de plasmon de surface permettant de caractériser dynamiquement l'anisotropie de films biologiques sur des épaisseurs nanométriques et sa validation à travers plusieurs applications.

Après avoir brièvement abordé les biopuces à fluorescence, un tour d'horizon des techniques expérimentales basées sur la résonance de plasmon de surface a été réalisé. Nous avons détaillé les différents types de montages utilisés dans notre laboratoire, permettant d'adresser les différentes dépendances de l'équation de couplage. L'imagerie de la surface de métal, reposant sur l'utilisation d'une caméra CCD, permet de multiplexer les mesures possibles. Les systèmes à balayage angulaire, travaillant à longueur d'onde fixe, permettent par ajustement numérique de déterminer les épaisseurs et dans une moindre mesure les indices des couches métalliques déposées. En fixant l'angle d'incidence dans un zone où la dynamique de réflectivité est la plus importante, il est possible de travailler en cinétique. Ce mode d'interrogation permet de déterminer les constantes d'affinité entre les molécules sondes et cibles, et par extension d'effectuer un diagnostic génétique par exemple. En fixant l'angle d'incidence, mais en effectuant un balayage spectral, il est possible de remonter indirectement à l'absorption des biomolécules déposées (à la manière d'un spectromètre).

Notre objectif étant de mesurer l'anisotropie de films minces, nous avons ensuite passé en revue deux techniques de caractérisation de l'anisotropie d'échantillon : l'ellipsométrie et la microscopie en lumière polarisée. L'ellipsométrie permet de mesurer de manière très précise l'épaisseur et l'indice de réfraction de multicouches isotropes ou anisotropes. Il s'agit d'une technique très intéressante du point de vue de la caractérisation de matériaux, mais il est moins aisé de passer à une mesure dynamique de l'anisotropie d'échantillons. La microscopie en lumière polarisée est quant à elle plus qualitative et de résolution axiale très limitée pour les applications que nous voulons réaliser. Finalement nous avons établi une analogie avec la méthode de mesure de l'anisotropie de fluorescence, qui permet d'étendre une technique établie, pour obtenir de nouvelles informations sur l'état d'organisation de l'échantillon.

Nous nous sommes ensuite intéressés par la mise en œuvre théorique et expérimentale d'un biocapteur capable de mesurer l'anisotropie de films minces de manière dynamique. Du point de vue théorique, nous nous sommes basés sur le modèle de Rouard étendu. L'ajout d'une couche anisotrope sur le multicouche a été simulé par le calcul des indices de réfraction effectifs dans deux directions orthogonales (Ox,Oy) de l'espace. Nous avons ensuite appliqué le modèle au calcul de la réponse du capteur à la présence d'une couche

anisotrope d'ADN orienté (dont les indices sont $n_e = 1,507$ et $n_o = 1,627$. Nous avons ainsi calculé qu'une anisotropie $\Delta n = 0,1$ d'un couche d'1 nm d'épaisseur pouvait entraîner une différence de réflectivité de 3,7 % entre les deux axes de mesure.

Du point de vue expérimental, nous avons détaillé la mise au point du système, notamment au niveau de l'imagerie et du châssis. Nous avons ainsi déterminé que notre système de P-SPRI était capable de résoudre des indices (massifs) allant de 1,294 à 1,386, soit des épaisseurs inférieures à 50 nm de matériau biologique déposé sur la surface. Cette limitation dans le choix des indices de réfraction et des épaisseurs utilisables explique pourquoi nous avons dû avoir recours à des systèmes d'épaisseurs nanométriques au lieu de valider le système avec cristaux liquides par exemple. Nous avons ensuite mesuré le rapport signal à bruit de notre système, et déterminé que la mesure n'était limitée que par le bruit de photon. Nous avons déterminé le seuil de détection du montage de P-SPRI, qui a été établi à $\Delta n_{min} = 3,7 \times 10^{-5}$ RIU. Nous avons finalement mesuré la réponse du système à une rampe de concentration de glycérol, afin de déterminer la plage de linéarité de la réponse. Cette mesure nous a permis de déterminer le saut d'indice de réfraction maximal mesurable : 5×10^{-3} RIU.

Après avoir monté et validé le banc de P-SPRI, nous avons pu le mettre à profit pour trois applications expérimentales, réalisées en collaboration avec des membres du projet NANOBIOFORME [126] financé par l'ANR (Agence Nationale pour la Recherche).

La première application étudiée a été l'observation de l'anisotropie induite par la présence ou l'absence de flux de liquide dans la cellule d'interaction sur l'état d'organisation d'une couche autoassemblée de thiols surmontée d'un hémimembrane de phospholipides. Un fort signal différentiel, de l'ordre de 1% a pu être mis en évidence. L'origine exacte de l'anisotropie est encore à ce jour incertaine.

La seconde application que nous avons étudié concerne l'anisotropie de systèmes SAM / phospholipides induite par la présence d'un champ électrique. Là encore, une forte anisotropie à été observée. Un seuil de tension a été mis en évidence au delà duquel le phénomène présentait une hystérésis. L'hypothèse d'une désorption réductive partielle de la couche au dessus du seuil et l'orientation des molécules dans le champ en dessous à été avancée.

Finalement la troisième et dernière application étudiée concernait la mise en évidence d'une anisotropie de filaments magnétiques orientés sous l'influence d'un champ magnétique. Les filaments étant constitués de billes de taille micronique, le signal anisotrope obtenu était très faible, mais néanmoins existant.

Le second objectif de cette thèse était d'étudier les possibilités théoriques et pratiques

offertes par la structuration des substrats.

Nous avons tout d'abord calculé grâce à la méthode modale de Fourier la réflectivité de substrats or/verre structurés sous forme de réseaux de pistes 1D. Un fort comportement anisotrope était attendu, suivant la direction de propagation du plasmon de surface. Afin de réaliser expérimentalement de tels échantillons, nous avons tout d'abord effectué des tests de dépôt d'or uniforme sur substrats de verre par évaporation et pulvérisation cathodique. La caractérisation de l'épaisseur des couches de métal a été réalisée par le biais d'un montage SPR monocapteur. Afin d'avoir une idée qualitative plus rapide sur la qualité du dépôt, nous avons introduit la mesure de la résistivité électrique du métal. Nous avons ainsi pu établir que des dépôts par pulvérisation cathodique étaient suffisants pour nos prototypes (pas de chimie de surface).

Nous avons ensuite utilisé deux types de lithographie pour la structuration des échantillons : la lithographie UV pour des motifs dont la période était de l'ordre du micron et la lithographie par faisceau d'électron pour des motifs de taille inférieure. Ainsi, nous avons observé la propagation du plasmon sur des structures de tailles très diverses. De premières mesures sur le banc de SPRI multispectrale de réseaux or / verre ont permis de vérifier les calculs et d'observer une forte anisotropie dans la propagation du plasmon de surface.

De nombreuses améliorations peuvent être apportées au système de P-SPRI développé dans le cadre de ce travail. Tout d'abord, il est d'ores et déjà possible de porter la source de lumière et le monochromateur du banc de SPRI multispectral vers le banc de P-SPRI, afin de profiter du balayage en longueur d'onde ainsi apporté. Ce portage peut s'effectuer assez rapidement, grâce à la séparation du module d'illumination (table optique séparée) du reste du banc multispectral. De plus, l'utilisation d'entrées fibrées devrait permettre d'éviter d'avoir à adapter le banc de P-SPRI pour la nouvelle source.

Un nouveau banc de P-SPRI, conçu par notre équipe, est en cours d'assemblage dans le laboratoire. Les plages angulaires acceptables sont beaucoup plus étendues (20°) que dans la version actuelle. Des modules de polariseurs motorisés ont été utilisés pour remplacer les polariseurs manuels du banc actuel. La possibilité de placer un analyseur (lui aussi motorisé) devant la caméra a été étudiée, et est en cours de mise au point. Ainsi, des mesures ellipsométriques vont pouvoir être réalisées, augmentant encore le nombre de dimensions accessibles par l'appareil. Une innovation majeure du nouveau banc de P-SPRI est sans aucun doute l'ajout d'un microscope au dessus du système de P-SPRI, permettant aussi d'adjoindre une imagerie conventionnelle à l'imagerie plasmonique. Un échantillon pourra donc par exemple être caractérisé dynamiquement en P-SPRI et dans le même temps, la fluorescence de cibles marquées va pouvoir être observée à travers la

cellule d'interaction.

Les expériences de contrôle de l'orientation de PDNA sous flux de liquide devraient être poursuivies en vue de mettre en évidence une anisotropie de l'édifice complet et non de la SAM ou de la membrane. A moyen terme, des édifices similaires pourraient être utilisés comme des indicateurs d'intensité et de direction du flux de liquide à la surface de la puce. Ceci permettrait de calibrer les données de la biopuce pour des hétérogénéités de flux.

L'orientation de PDNA sous champ électrique à ouvert le champ à de nouvelles expériences, basées sur le contrôle de molécules électro-optiques placées en surface du biocapteur. A moyen et long terme, il devrait être possible d'adresser électriquement une biopuce de manière réversible et dynamique, ouvrant le champ à un nouveau type de biopuces, plus performantes et plus versatiles.

L'utilisation de billes de dimensions plus réduites pour réaliser les filaments magnétiques permettront d'obtenir un signal de P-SPRI plus clair, et la structuration de la surface par des billes de dimensions nanométriques promet des développements intéressants dans le domaine de la nanoplasmonique.

Les structures anisotropes 1D réalisées vont être à court terme optimisées, afin d'observer une exaltation locale du champ évanescent. De plus, la mise en place d'une chimie de surface différentielle or/verre devrait permettre de texturer la puce de manière anisotrope. La polymérisation d'édifices d'ADN orientés le long des pistes d'or pourra être réalisé.

Finalement, à moyen et plus long terme, le banc de P-SPRI amélioré devrait être mis à contribution pour étudier la dynamique de cellules endothéliales sur substrat d'hydrogel [127].

A

Equations de Maxwell à l'interface d'un métal et d'un dielectrique

Cette annexe décrit le comportement d'une onde électromagnétique se propageant à l'interface entre un métal et un diélectrique. En utilisant les équations de Maxwell et la continuité des champs aux interfaces, nous allons démontrer que seule une onde polarisée p (ou TM) peut créer les conditions de propagation d'un plasmon de surface.

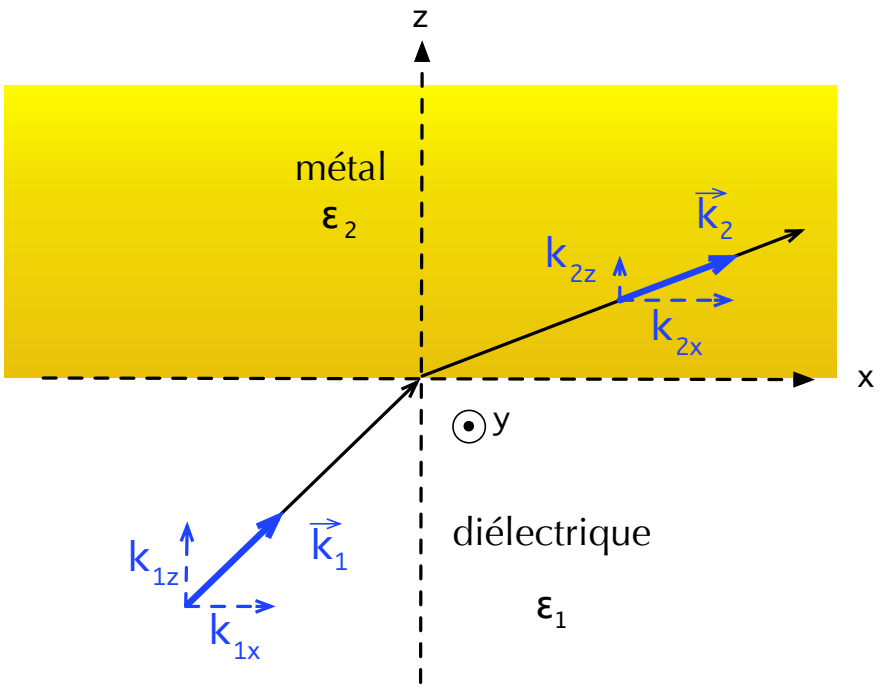


FIGURE 1 – Propagation d'une onde à l'interface entre un métal et un diélectrique.

La propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu non magnétique de constante diélectrique ε peut-être classiquement décrite par les équations de Maxwell comme suit :

$$\begin{cases} \vec{\nabla} \cdot \vec{\mathrm{E}} = 0 \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{\mathrm{E}} = -\frac{\partial \vec{\mathrm{H}}}{\partial t} \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{matrix} \vec{\nabla} \cdot \vec{\mathrm{H}} = 0 \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{\mathrm{H}} = -\varepsilon_0 \varepsilon \frac{\partial \vec{\mathrm{E}}}{\partial t} \end{matrix} \tag{1}$$

Avec $\vec{\mathrm{E}}$ le champ électrique et $\vec{\mathrm{H}}$ le champ magnétique. Les opérateurs $\vec{\nabla} \cdot \bullet$ (divergence) et $\vec{\nabla} \wedge \bullet$ (rotationnel) sont définis comme suit :

$$\vec{\nabla} \cdot \bullet = \frac{\partial \bullet}{\partial x} + \frac{\partial \bullet}{\partial y} + \frac{\partial \bullet}{\partial z} \quad \text{et} \quad \vec{\nabla} \wedge \bullet = \begin{bmatrix} \partial \bullet_z / \partial y - \partial \bullet_y / \partial z \\ \partial \bullet_x / \partial z - \partial \bullet_z / \partial x \\ \partial \bullet_y / \partial x - \partial \bullet_x / \partial y \end{bmatrix}$$

Seule la propagation d'ondes planes nous intéresse ici, nous pouvons donc écrire les

champs électriques et magnétiques sous la forme d'une exponentielle. En utilisant le repère défini dans la figure 1, nous obtenons :

$$\begin{cases} \vec{\mathrm{E}}=\vec{\mathrm{E}}_0 \exp\left(i(k_x x + k_z z - \omega t)\right) \\ \vec{\mathrm{H}}=\vec{\mathrm{H}}_0 \exp\left(i(k_x x + k_z z - \omega t)\right) \end{cases} \tag{2}$$

Où ω est la fréquence angulaire de l'onde plane, et k_x, k_z les composants suivant x et suivant z du vecteur d'onde $\vec{k}$. En développant les équations de Maxwell (1), et après simplification (en posant $c = (\mu_0\varepsilon_0)^{-1/2}$), nous obtenons l'équation de propagation de l'onde :

$$\vec{\nabla}^2 \cdot \vec{\mathrm{H}} - \frac{\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2 \vec{\mathrm{H}}}{\partial t^2} \tag{3}$$

En prenant en compte le repère défini par la figure 1, l'équation de propagation peut se résumer à :

$$k_x^2 + k_z^2 - \frac{\varepsilon\omega^2}{c^2} = 0 \tag{4}$$

Et les équations de Maxwell peuvent également s'écrire comme suit :

$$\begin{cases} k_x\mathrm{E}_x + k_z\mathrm{E}_z \quad =0 \\ \begin{bmatrix} -k_z\mathrm{E}_y \\ k_z\mathrm{E}_x - k_x\mathrm{E}_z \\ k_x\mathrm{E}_y \end{bmatrix} = \mu_0\omega \begin{bmatrix} \mathrm{H}_x \\ \mathrm{H}_y \\ \mathrm{H}_z \end{bmatrix} \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{cases} k_x\mathrm{H}_x + k_z\mathrm{H}_z \quad =0 \\ \begin{bmatrix} -k_z\mathrm{H}_y \\ k_z\mathrm{H}_x - k_x\mathrm{H}_z \\ k_x\mathrm{H}_y \end{bmatrix} = -\varepsilon_0\varepsilon\omega \begin{bmatrix} \mathrm{E}_x \\ \mathrm{E}_y \\ \mathrm{E}_z \end{bmatrix} \end{cases} \tag{5}$$

A l'interface entre le métal et le diélectrique ($z = 0$) la continuité des équations de Maxwell pour la composante x des champs permet de déterminer les relations suivantes :

$$\begin{cases} \mathrm{E}^0_{1,x}=\mathrm{E}^0_{2,x}=\mathrm{E}^0_x \qquad \mathrm{H}^0_{1,x}=\mathrm{H}^0_{2,x}=\mathrm{H}^0_x \\ \mathrm{E}^0_{1,y}=\mathrm{E}^0_{2,y}=\mathrm{E}^0_y \qquad \mathrm{H}^0_{1,y}=\mathrm{H}^0_{2,y}=\mathrm{H}^0_y \end{cases} \tag{6}$$

et

$$k^0_{1,x} = k^0_{2,x} = k^0_x \tag{7}$$

Si nous supposons E^0_y non nul, il est possible de déduire des équations (5) et (6) les relations suivantes :

$$\begin{cases} k_{1,z}\mathrm{E}_z^0 = k_{2,z}\mathrm{E}_z^0 & = -k_x\mathrm{E}_x^0 \\ -k_{1,z}\mathrm{E}_y^0 = -k_{2,z}\mathrm{E}_y^0 & = \mu_0\omega\mathrm{H}_x^0 \\ k_{1,z}\mathrm{E}_x^0 - k_x\mathrm{E}_z^0 = k_{2,z}\mathrm{E}_x^0 - k_x\mathrm{E}_z^0 & = \mu_0\omega\mathrm{H}_y^0 \\ \mathrm{H}_z^0 = \mathrm{H}_z^0 & = (k_x/\mu_0\omega)\,\mathrm{E}_y^0 \\ k_{1,z}\mathrm{H}_z^0 = k_{2,z}\mathrm{H}_z^0 & = -k_x\mathrm{H}_{x,0} \\ (k_{1,z}/\varepsilon_1)\mathrm{H}_y^0 = (k_{2,z}/\varepsilon_2)\mathrm{H}_y^0 & = \varepsilon_0\omega\mathrm{E}_x^0 \\ (k_x\mathrm{H}_z^0 - k_{1,z}\mathrm{H}_x^0)/\varepsilon_1 = (k_x\mathrm{H}_z^0 - k_{2,z}\mathrm{H}_x^0)/\varepsilon_1 & = \varepsilon_0\omega\mathrm{E}_y^0 \\ \varepsilon_1\mathrm{E}_z^0 = \varepsilon_2\mathrm{E}_z^0 & = -(k_x\varepsilon_0\omega)\mathrm{H}_y^0 \end{cases} \tag{8}$$

D'où on peut déduire que :

$$\begin{cases} k_z = (-\mu_0\omega\mathrm{H}_x^0)/\mathrm{E}_y^0 \\ \mathrm{E}_z^0 = -(k_x/k_z)\mathrm{E}_x^0 \\ \mathrm{H}_z^0 = -(k_x/k_z)\mathrm{H}_x^0 \\ \mathrm{H}_y^0 = \mathrm{E}_x^0 = 0 \end{cases} \tag{9}$$

De plus, comme nous supposons $\varepsilon_1 \neq \varepsilon_2$ et $\mathrm{E}_y^0 \neq 0$, la 7ème équation du système (8) ne peut admettre de solution. La propagation d'un onde de plasmon de surface à l'interface entre un métal et un diélectrique ne peut donc se faire en polarisation TE. Cette condition implique que **seules les ondes polarisées TM** (dont $\mathrm{E}_y^0 = 0$) **permettent de créer une onde de plasmon de surface**.

B

Indice de réfraction de l'or

E (eV)	**λ (nm)**	**Ordal [128, 129, 130]**		**Palik [131]**	
		n	**k**	**n**	**k**
0,50	2483	0,81	17,18	1,21	15,52
0,90	1379	0,33	9,51	0,46	9,69
1,00	1241	0,29	8,49	0,37	8,74
1,10	1128	0,26	7,65	0,31	7,94
1,20	1034	0,23	6,96	0,27	7,08
1,30	955	0,19	6,16	0,24	6,48
1,40	887	0,18	5,61	0,21	5,89
1,50	828	0,17	5,10	0,19	5,40
1,60	776	0,16	4,64	0,17	4,87
1,70	730	0,16	4,24	0,16	4,36
1,80	690	0,17	3,88	0,16	3,82
1,90	653	0,19	3,53	0,166	3,159
2,00	621	0,21	3,19	0,216	3,054
2,10	591	0,25	2,86	0,263	2,96
2,20	564	0,31	2,54	0,305	2,88
2,30	540	0,44	2,26	0,398	2,55
2,40	517	0,67	2,02	0,604	2,13
2,50	497	0,87	1,84	0,9	1,85
2,75	451	1,39	1,88	1,494	1,875
3,00	414	–	–	1,635	1,957
3,25	382	–	–	1,684	1,92
3,50	355	–	–	1,738	1,85
3,75	331	–	–	1,81	1,868
4,00	310	–	–	1,83	1,92
4,25	292	–	–	1,76	1,9
4,50	276	–	–	1,651	1,854
5,00	248	–	–	1,48	1,64

TABLE 1 – Indices de réfraction de l'or mesurés expérimentalement par M. Ordal *et al.* et E. Palik *et al.*. Données tabulées à partir de la page web *http ://www.luxpop.com/*, entre 0,5 eV et 5 eV

C

Modélisation de la fonction dielectrique des métaux

Cette annexe présente trois modèles capables de rendre compte de la fonction diélectrique des métaux dans le visible et le proche infrarouge. Ces modèles sont basés sur la compréhension des phénomènes liants le déplacement des électrons dans le métal à l'onde optique incidente. Le premier modèle étudié ici est le modèle de Drude, qui permet de rendre compte des transitions intrabandes des électrons du métal. Les transitions interbandes sont abordées par le modèle de Lorentz-Drude, qui utilise des profils Lorentziens à l'abord des fréquences propres du métal. Enfin, une amélioration du modèle de Lorentz-Drude est présentée, le modèle de Brendel-Bormann. Ce dernier remplace les profils Lorentziens par des profils Gaussiens, ce qui permet de mieux rendre compte de la fonction diélectrique de certains métaux, comme l'or. Enfin, une comparaison entre ces trois modèles et des données expérimentales issues de la littérature sera donnée pour le cas de l'or.

Modèle de Drude

Afin de mieux appréhender les phénomènes entrant en jeu dans la génération d'un plasmon de surface, il est utile de comprendre la façon dont les métaux se comportent lorsqu'ils sont traversés par une onde électromagnétique. Le modèle le plus simple est le modèle de P. Drude développé en 1900. Il repose sur la théorie cinétique des gaz, moyennant quelques modifications pour l'adapter au déplacement des électrons libres dans un métal. Ce modèle est très bien adapté pour décrire la conductivité thermique et électrique des métaux, mais ne permet pas de rendre compte fidèlement de la fonction diélectrique $\varepsilon(\omega)$ de certains métaux nobles. Néanmoins, ce modèle à l'avantage d'être simple à comprendre et à implémenter.

Le modèle de Drude repose sur les hypothèses [132] suivantes :

- les électrons du métal sont indépendants : il n'existe pas d'interaction entre deux électrons ;
- les électrons du métal sont libres : il existe un "gaz électronique" où les électrons circulent librement ;
- le champ magnétique est négligé ;
- le déplacement des électrons est rectiligne, de vitesse constante, seules les collisions électron–ion sont prises en compte.

Dans le modèle de Drude, les électrons de la couche atomique la plus énergétique (les électrons de la bande de conduction) sont totalement détachés de leur noyau, et sont donc libres de se déplacer entre les atomes du métal. Ces atomes deviennent donc des ions chargés positivement fixés en place par le maillage cristallin. Le métal peut donc

être approximé à un ensemble de charges négatives (les électrons libres) se déplaçant dans le vide sous l'action d'un champ électrique, et d'un réseau cristallin de charges positives (cations) immobiles (voir figure 2).

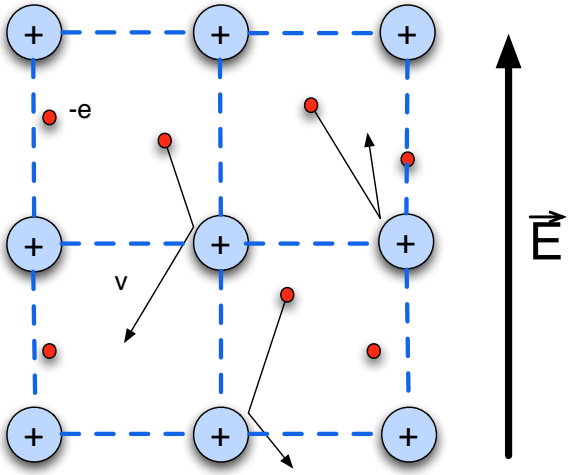


FIGURE 2 – Modèle de Drude des métaux : les électrons de conduction sont totalement déconnectés de leur noyau atomique et sont libres de se déplacer dans le réseau cristallin constitué par les cations métalliques.

Le nombre d'électrons par unité de volume est défini comme suit :

$$n = \mathrm{N}_a \frac{\mathrm{Z.\rho}}{\mathrm{M}} \tag{10}$$

Avec $\mathrm{N}_a \approx 6.02.10^{23}$ atomes. mol^{-1}, Z le nombre d'électrons de conduction par atome, ρ la densité, et M la masse volumique du métal.

Le modèle de Drude étant basé sur la théorie cinétique des gaz, les électrons se déplacent avec une vitesse moyenne constante ($< \vec{v} >$) entre deux collisions avec des ions. Le temps moyen entre deux collisions τ, également appelé temps de relaxation, ou temps de vol des électrons, est déterminé à partir de la loi d'Ohm locale :

$$\vec{\mathrm{J}} = \sigma\vec{\mathrm{E}} = -ne < \vec{v} > \tag{11}$$

Où $\vec{\mathrm{J}}$ est la densité de courant électrique, $\vec{\mathrm{E}}$ le champ électrique appliquant une force $\vec{\mathrm{F}} = -e\vec{\mathrm{E}}$, σ la conductivité électrique du métal et $e \approx 1.6.10^{-19}$ C la charge élémentaire de l'électron. La vitesse moyenne de l'électron après une collision ($< \vec{v} >$) est alors :

$$< \vec{v} >= \frac{-e\vec{\mathrm{E}}\tau}{m} \tag{12}$$

En remplaçant $< \vec{v} >$ dans l'équation (11), on obtient par identification :

$$\sigma = \frac{ne^2\tau}{m} \tag{13}$$

Avec m la masse d'un électron (usuellement $m \approx 9.1.10^{-31}$ kg). Le temps de relaxation est donc :

$$\tau = \frac{1}{\omega_\tau} = \frac{\sigma m}{ne^2} \tag{14}$$

Le modèle de Drude caractérise le mouvement d'un électron de position $\vec{r}$ dans le métal par son équation de mouvement sous l'action d'un champ électrique $\vec{E}(t) = E_0(\vec{r})\exp(-i\omega t)$:

$$m\frac{d^2\vec{r}}{dt^2} + m\omega_\tau\frac{d\vec{r}}{dt} = -e\vec{E}(t) \tag{15}$$

Il s'agit d'un classique oscillateur harmonique amorti (sans force de rappel, car les électrons ne sont pas liés aux ions dans le modèle), dont la solution peut s'écrire :

$$r(t) = r_0 exp(-i\omega t) = -\frac{e}{m}\frac{1}{\omega(\omega + i\omega_\tau)}E_0\exp(-i\omega t) \tag{16}$$

La polarisation induite par les électrons dans le métal découle directement de leur déplacement par la relation :

$$P(t) = ner(t) = -\frac{ne^2E_0}{m}\frac{\exp(-i\omega t)}{\omega(\omega + i\omega_\tau)} = -\frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\omega_\tau)}\varepsilon_0 E(t) \tag{17}$$

On définit alors la pulsation plasmon ω_p, c'est à dire la pulsation à laquelle la fonction diélectrique du métal $\varepsilon(\omega)$ s'annule, comme étant :

$$\omega_p^2 = \frac{ne^2}{m\varepsilon_0} \tag{18}$$

La polarisation est reliée à la susceptibilité diélectrique par la relation $P = \chi\varepsilon_0 E$, soit ici :

$$\chi(\omega) = -\frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\omega_\tau)} \tag{19}$$

Nous pouvons finalement déterminer la fonction diélectrique du métal avec la relation $\varepsilon = 1 + \chi$, soit :

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\omega_\tau)} = \varepsilon' + i\varepsilon'' \tag{20}$$

Cette équation va nous permettre de décrire le comportement d'un métal au passage d'une onde électromagnétique. Néanmoins, il est souvent plus pratique de travailler avec l'indice de réfraction du métal (n) et son coefficient d'extinction (k), avec $\varepsilon = (n - ik)^2$, soit :

$$\begin{cases} \varepsilon^{'}(\omega) = n^2 - k^2 = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2+\omega_\tau^2} \\ \varepsilon^{''}(\omega) = 2nk \quad = \frac{\omega_p^2\omega_\tau}{\omega(\omega^2+\omega_\tau^2)} \end{cases} \tag{21}$$

La table 2 suivante donne les paramètres du modèle de Drude pour une sélection de métaux usuels (suivant [133]) :

métal	ω_p (rad.s^{-1})	$\hbar\omega_p$ (eV)	ω_τ (rad.s^{-1})	$\hbar\omega_\tau$ (eV)
Au	1.2×10^{16}	7.876	8.05×10^{13}	0.053
Cr	1.63×10^{16}	10.75	7.14×10^{13}	0.047
Ti	1.10×10^{16}	7.29	1.25×10^{14}	0.082
Ag	1.37×10^{16}	9.01	7.29×10^{13}	0.048

TABLE 2 – Paramètres du modèle de Drude pour une sélection de métaux

Comme indiqué précédemment, ce modèle est assez peu adapté à la modélisation de la fonction diélectrique dans le visible de métaux nobles, fréquemment utilisés sur les biopuces à SPR. Le modèle de Drude permet de modéliser avec précision les transitions électroniques intrabandes dans le métal (perte ou gain d'un électron de conduction par exemple), mais ne permet pas de rendre compte des transitions interbandes, ou transitions hybrides. Il est donc assez bien adapté à des métaux "simples", comme les métaux alcalins, ou l'aluminium par exemple, mais beaucoup moins à des métaux comme l'or ou le chrome.

En effet, l'aluminium (d'orbitales électroniques [Ne]$3s^2\underline{3p^1}$) a toutes ses couches de valences ("de cœur") remplies, et une couche incomplète sur la bande de conduction ($3p^1$). Les électrons s'échangent donc sur la bande de conduction. Ces transitions intrabandes peuvent donc être comparées au comportement d'un oscillateur harmonique amorti forcé (par le champ électrique de l'onde électromagnétique traversant le métal).

Le modèle devient moins précis lorsque l'on veut modéliser la fonction diélectrique de métaux nobles, tels que l'or, le chrome ou l'argent. En effet, pour ces métaux, il existe en plus des transitions intrabandes décrites précédemment, des transitions interbandes. L'or par exemple (d'orbitales [Xe]$\underline{6s^1}4f^{14}5d^{10}$) possède une couche d complètement remplie, et une couche s incomplète. Les électrons de conductions ($6s$) sont donc bien décrits par le modèle de Drude, mais il existe un ensemble de seuils d'énergie (et donc de longueurs d'ondes) auxquels des transitions (par exemple $6s^15d^{10} \longrightarrow 6s^25d^9$) vont exister. Ces transitions créent un décalage de la pulsation plasmon vers les énergies plus faibles [134],

et donc un changement de la partie imaginaire de la fonction diélectrique au voisinage de ces seuils.

Modèle de Lorentz-Drude

Afin de tenir compte des limitations du modèle de Drude, un nouveau modèle, basé sur les oscillateurs de Lorentz a été mis au point. En effet, un métal noble possède plusieurs transitions interbandes, qui seront autant d'oscillateurs. Le modèle de Lorentz-Drude (LD) se base sur l'utilisation de k oscillateurs harmoniques pour modéliser la fonction diélectrique du métal. Chaque oscillateur possède une force de rappel (f_k), une pulsation propre (ω_k) et un temps d'amortissement ($1/\omega_{\tau,k}$). Le modèle peut donc se résumer à la somme des contributions des "électrons libres" dans le métal (composante de Drude) d'une part, et des contributions des transitions interbandes, à savoir des échanges noyau/électron (composante de Lorentz) d'autre part. Le système résultant est schématisé sur la figure 3. Au voisinage des fréquences propres des oscillateurs, la partie imaginaire de la fonction diélectrique du métal se comportera donc comme une Lorentzienne.

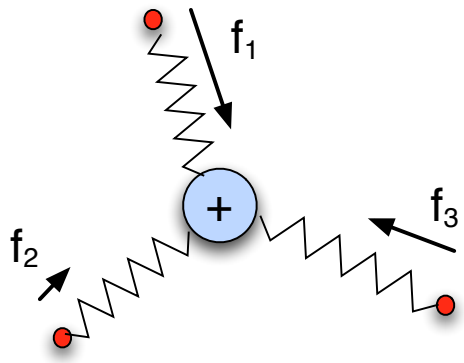


FIGURE 3 – Représentation schématique du modèle de Lorentz-Drude.

Comme nous l'avons vu, il est possible de séparer le modèle en deux parties. La fonction diélectrique du métal peut donc être écrite comme la somme des contributions de Drude et de Lorentz :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon^{D}(\omega) + \varepsilon^{L}(\omega) \tag{22}$$

Avec $\varepsilon^{D}(\omega)$ la fonction diélectrique donnée par l'équation (24), et $\varepsilon^{L}(\omega)$ la somme des

oscillateurs suivante :

$$\varepsilon^{\mathrm{L}}(\omega) = \sum_{k=1}^{n} \frac{f_k \omega_p^2}{(\omega_k^2 - \omega^2) - i\omega\omega_{\tau,k}} \tag{23}$$

Pour le cas limite $k = 0$, ce modèle revient au modèle de Drude, corrigé d'un facteur f_0 :

$$\varepsilon^{\mathrm{D}}(\omega) = 1 - \frac{f_0 \omega_p^2}{\omega(\omega + i\omega_{\tau,0})} \tag{24}$$

La table 3 donne les valeurs des paramètres du modèles de Lorentz-Drude pour une sélection de métaux (d'après [133]).

paramètre	**Au**	**Cr**	**Ti**	**Ag**
f_0	0.76	0.168	0.148	0.845
$\hbar\omega_{\tau,0}$ (eV)	0.053	0.047	0.08	0.048
–	–	–	–	–
f_1	0.024	0.151	0.899	0.065
$\hbar\omega_{\tau,1}$ (eV)	0.241	3.175	2.276	3.886
$\hbar\omega_1$ (eV)	0.415	0.121	0.777	0.816
f_2	0.010	0.15	0.393	0.124
$\hbar\omega_{\tau,2}$ (eV)	0.345	1.305	2.518	0.452
$\hbar\omega_2$ (eV)	0.83	0.543	1.545	4.481

paramètre	**Au**	**Cr**	**Ti**	**Ag**
f_3	0.071	1.149	0.187	0.011
$\hbar\omega_{\tau,3}$ (eV)	0.87	2.676	1.663	0.065
$\hbar\omega_3$ (eV)	2.969	1.97	2.509	8.185
f_4	0.601	0.825	0.001	0.84
$\hbar\omega_{\tau,4}$ (eV)	2.494	1.335	1.762	0.916
$\hbar\omega_4$ (eV)	4.304	8.775	19.43	9.083
f_5	4.384	–	–	5.646
$\hbar\omega_{\tau,5}$ (eV)	2.214	–	–	2.419
$\hbar\omega_5$ (eV)	13.32	–	–	20.29

TABLE 3 – Paramètres du modèle de Lorentz-Drude pour une sélection de métaux

Le modèle LD améliore grandement la modélisation des métaux dans le visible et le proche infrarouge. Néanmoins, la partie imaginaire de la fonction diélectrique ne suit pas convenablement les courbes expérimentales, notamment aux alentours de 600 nm, comme nous les verrons dans la section C.

Modèle de Brendel-Bormann

Afin d'apporter une plus grande précision à la fonction diélectrique des métaux dans le visible et l'infrarouge, il a été observé que les oscillateurs de Lorentz utilisés dans le modèle LD peuvent tout à fait être remplacés par des oscillateurs de Gauss [135]. L'utilisation de Gaussiennes permet d'obtenir des profils moins dispersés autour de chaque fréquence propre du modèle. Brendel et Bormann [136] ont développé un modèle basé sur la superposition d'un ensemble infini d'oscillateurs de Gauss :

$$\chi_k(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_k} \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left[-\frac{(x-\omega_k)^2}{2\sigma_k^2}\right] \times \frac{f_k\omega_p^2}{(x^2-\omega^2)+i\omega\omega_{\tau,k}}\, dx \tag{25}$$

Ici, ω_k est la pulsation propre de l'oscillateur k, σ_k la largeur de la gaussienne, f_k la force de rappel (pondération de la courbe) et $\omega_{\tau,k}$ l'amortisssement. Il est possible de résoudre l'intégrale de manière analytique (voir [133]-annexe A pour plus de détails), et nous obtenons :

$$\chi_k(\omega) = \frac{i\sqrt{\pi}f_k\omega_p^2}{2\sqrt{2}a_k\sigma_k}\left[w\left(\frac{a_k-\omega_k}{\sqrt{2}\sigma_k}\right) + w\left(\frac{a_k+\omega_k}{\sqrt{2}\sigma_k}\right)\right] \tag{26}$$

Où $a_k = a_k^{'} + ia_k^{''} = (\omega^2 - i\omega\omega_{\tau,k})^{1/2}$ et $a_k^{''} > 0$. Avec w la fonction d'erreur complémentaire :

$$\begin{aligned} &w(z) = \exp\left(-z^2\right)\operatorname{erfc}(-iz) \quad , \operatorname{Im}(z) > 0 \\ &\text{Avec } \operatorname{erfc}(z) = 1 - \operatorname{erf}(z) = \tfrac{2}{\sqrt{\pi}}\textstyle\int_z^{\infty} e^{-\zeta^2}\, d\zeta \end{aligned} \tag{27}$$

Finalement et après simplification, l'équation (26) peut être remplacée par l'expression suivante :

$$\chi_k(\omega) = \frac{if_k\omega_p^2}{2\sqrt{2}a_k\sigma_k}\left[\mathrm{U}\left(\frac{1}{2},\frac{1}{2},-\left(\frac{a_k-\omega_k}{\sqrt{2}\sigma_k}\right)^2\right) + \mathrm{U}\left(\frac{1}{2},\frac{1}{2},-\left(\frac{a_k+\omega_k}{\sqrt{2}\sigma_k}\right)^2\right)\right] \tag{28}$$

Maintenant que le détail des oscillateurs est connu, il est possible d'adjoindre au modèle les transitions intrabandes, en ajoutant un terme de Drude à la somme des oscillateurs. La fonction diélectrique est donc représentée par la somme suivante :

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{f_0\omega_p^2}{\omega(\omega+i\omega_{\tau,0})} + \sum_{k=1}^{n}\chi_k(\omega) \tag{29}$$

La table 4 donne les paramètres de Brendel-Bormann pour une sélection de métaux.

Accord modèles – données expérimentales pour l'or

Une implémentation des différents modèles présentés dans cette annexe à été faite avec le logiciel **Igor Pro** et **Mathematica** pour l'or. Les fonctions diélectriques obtenues sont présentées dans la figure 4. Il est à noter que, pour plus de clarté et de cohérence

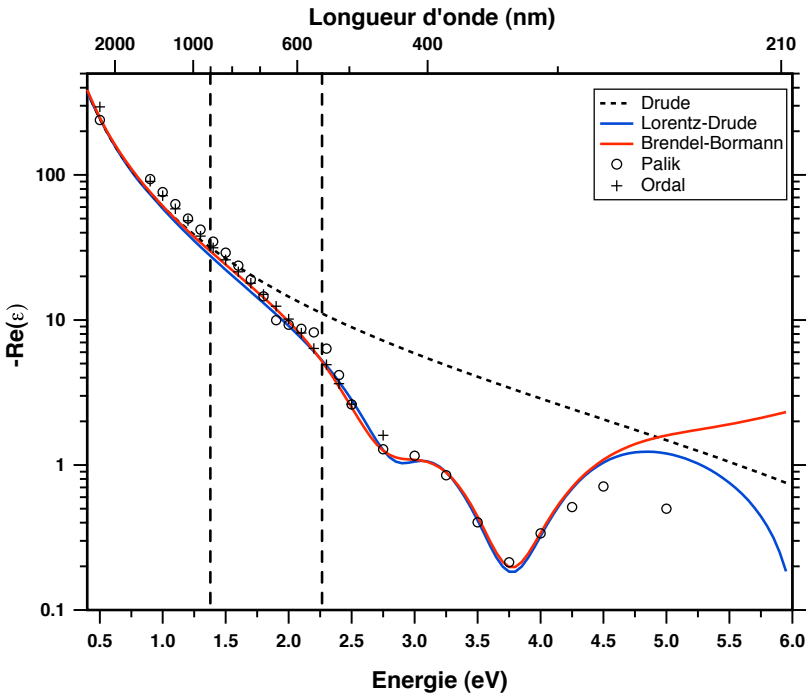
paramètre	**Au**	**Cr**	**Ti**	**Ag**
f_0	0.77	0.154	0.126	0.821
$\hbar\omega_{\tau,0}$ (eV)	0.050	0.048	0.067	0.049
–	–	–	–	–
–	–	–	–	–
f_1	0.054	0.338	0.427	0.050
$\hbar\omega_{\tau,1}$ (eV)	0.074	4.256	1.877	0.189
$\hbar\omega_1$ (eV)	0.218	0.281	1.459	2.025
$\hbar\sigma_1$ (eV)	0.742	0.115	0.463	1.894
f_2	0.050	0.261	0.218	0.133
$\hbar\omega_{\tau,2}$ (eV)	0.035	3.957	0.100	0.067
$\hbar\omega_2$ (eV)	2.885	0.584	2.661	5.185
$\hbar\sigma_2$ (eV)	0.349	0.252	0.506	0.665
f_3	0.312	0.817	0.513	0.051
$\hbar\omega_{\tau,3}$ (eV)	0.083	2.218	0.615	0.019
$\hbar\omega_3$ (eV)	4.069	1.919	0.805	4.343
$\hbar\sigma_3$ (eV)	0.830	0.225	0.799	0.189
f_4	0.719	0.105	0.0002	0.467
$\hbar\omega_{\tau,4}$ (eV)	0.125	6.983	4.109	0.117
$\hbar\omega_4$ (eV)	$6,137$	6.997	19.86	9.809
$\hbar\sigma_4$ (eV)	1.246	4.903	2.854	1.170
f_5	1.648	–	–	4.000
$\hbar\omega_{\tau,5}$ (eV)	0.179	–	–	0.052
$\hbar\omega_5$ (eV)	27.97	–	–	18.56
$\hbar\sigma_5$ (eV)	1.795	–	–	0.516

TABLE 4 – Paramètres du modèle de Brendel-Bormann pour une sélection de métaux.

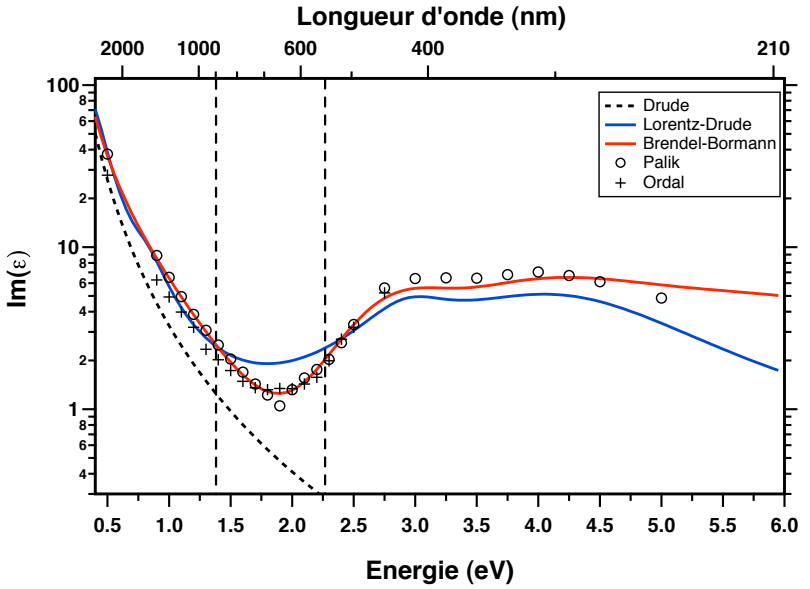
par rapport à l'article de *Rakic et al.* [133], l'opposé de la partie réelle de la fonction diélectrique $-\mathrm{R}e(\varepsilon(\omega))$ a été affiché. Ainsi, les deux courbes sont positives. Afin de tester la validité des différents modèles, nous avons superposé aux courbes des données expérimentales issues de la littérature. Les données sont tabulées dans l'annexe B, et sont issues de deux auteurs : M. Ordal *et al.* et E. Palik *et al.*, qui utilisent des méthodes de mesure similaires, à savoir la détermination de la réflectance et la transmittance d'une couche d'or d'épaisseur variable.

Nous pouvons observer que, comme attendu, le modèle de Drude ne parviens pas à rendre compte de la fonction diélectrique de l'or. En revanche, le modèle de Lorentz-Drude et Brendel-Bormann sont très similaires pour la partie réelle de $\varepsilon(\omega)$, et ce jusqu'a 4,5 eV environ. En revanche, la comparaison ne tient plus lorsqu'on s'intéresse aux parties imaginaires, et le modèle de Brendel-Bormann est le seul à pouvoir rendre compte des données expérimentales de manière satisfaisante, et ce de 0,5 eV ($\approx$ 2500 nm) à 4,00 eV

($\approx$ 300 nm). La divergence entre les données expérimentales et le modèle au delà de 4 eV peut être également lié aux conditions expérimentales. Le modèle de Brendel-Bormann est donc le plus précis d'un point de vue physique, et peut-être utilisé pour alimenter les modèles utilisés dans notre travail.



(a)



(b)

FIGURE 4 – Comparaison entre la fonction diélectrique de l'or calculée avec les modèles de Drude, Lorentz-Drude, et Brendel-Bormann d'une part, et des données expérimentales d'autre part. (a) opposé de la partie réelle. (b) Partie imaginaire. Les lignes pointillées verticales représentent la plage spectrale utilisée par les bancs de SPR décrits dans cette thèse.

D

Algorithme de recalage des images

Le recalage spatial des images entre les deux caméras de notre système se base sur un algorithme développé par T. Tang *et al.* [85] et implémenté par R. Garios dans le cadre de son stage d'ingénieur 1ère année dans notre équipe. L'algorithme a été développé en Java sous forme d'un module pour **ImageJ**. Il se base sur l'utilisation de transformées de Fourier pour le calcul de la corrélation croisée d'images. Il permet de déterminer avec une précision théorique « sous-pixel » le décalage spatial existant entre deux images. L'algorithme fournit un vecteur $(\Delta x, \Delta y)$ correspondant au décalage x et y entre deux images quelconques, mais ne calcule pas de rotation (phase). Il se décompose en deux parties : sélection des paramètres de recalage sur l'image 1, puis calcul du vecteur de recalage entre l'image 1 et l'image 2.

Sélection des paramètres de recalage

La première étape consiste à saisir des informations utiles au programme pour calculer des régions d'intérêt dans les images avec un décalage relativement faible (quelques dizaines de pixels au maximum). C'est à partir de ces régions d'intérêt que le programme calculera les corrélations.

Après sélection des images sources, celles-ci sont désanamorphosées pour compenser la déformation induite par la pyramide. L'image provenant de l'axe 1, de taille originale X × Y est interpolée linéairement pour atteindre la taille X × 2Y. De même l'image provenant de l'axe 2 est interpolée à 2X × Y. Les images ainsi désanamorphosées sont alors substituées aux originales. La sélection des paramètres se présente sous la forme d'un boîte de dialogue, par laquelle l'utilisateur entre les coordonnées (x_1, y_1) du coin supérieur gauche ainsi que la largeur (L) et la hauteur (H) de la région d'intérêt sur la première image. Celui-ci saisit également la précision du recalage demandé, généralement 1/4 ou 1/8ème de pixel pour de meilleurs résultats.

Une fois les paramètres entrés, le programme demande à l'utilisateur de déterminer sur chaque image un point fixe, commun aux deux images. Le plus simple est de se positionner sur une marque de calage de masque dans le cas d'un support lithographié, ou sur un bord net au contraste important. L'idée ici est d'être le plus précis possible, car les valeurs initiales du point de repère vont déterminer la précision avec laquelle le recalage s'effectue. Le programme détermine alors un premier vecteur de recalage $(\Delta x_0, \Delta y_0)$ grossier à partir des points de repère entrés. Une région d'intérêt (ou ROI pour Region of Interest) est ensuite calculée sur chaque image à partir des valeurs données par l'utilisateur et le vecteur de recalage. Les coordonnées (x, y) d'un point quelconque sur l'image 1 sont alors données

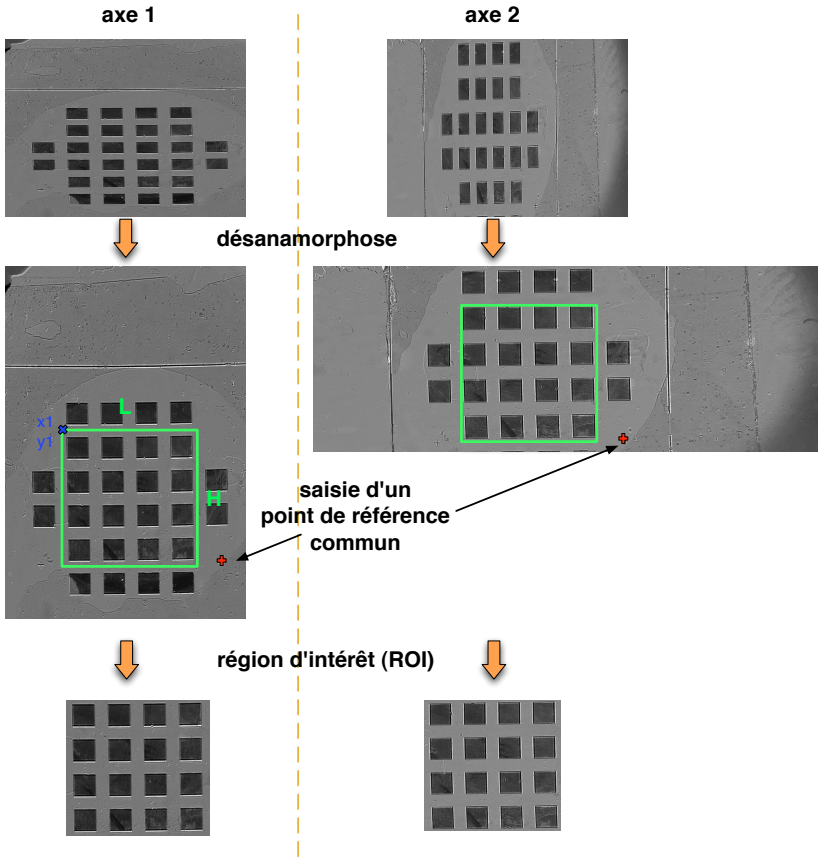


FIGURE 5 – Principe de la création de régions d'intérêt pour deux images.

sur l'image 2 par $(x + \Delta x_0, y + \Delta y_0)$. Une illustration de cet algorithme est donné dans la figure 5.

Calcul du vecteur de recalage

Les deux images ainsi obtenues présentent toujours un décalage spatial du fait de l'imprécision avec laquelle l'utilisateur sélectionne ses points de repère. L'algorithme décrit ici permet de réduire ce décalage en calculant le degré de corrélation des images entre-elles. La figure 6 illustre le déroulement de l'algorithme en utilisant comme point de départ les images calculées dans le paragraphe précédent. L'algorithme procède en 9 étapes, numérotées sur la figure :

Étape 1 : Une nouvelle région d'intérêt carrée et centrée sur chaque image est calculée, elle a pour dimension la puissance de 2 (en pixels) directement inférieure aux dimensions des images.

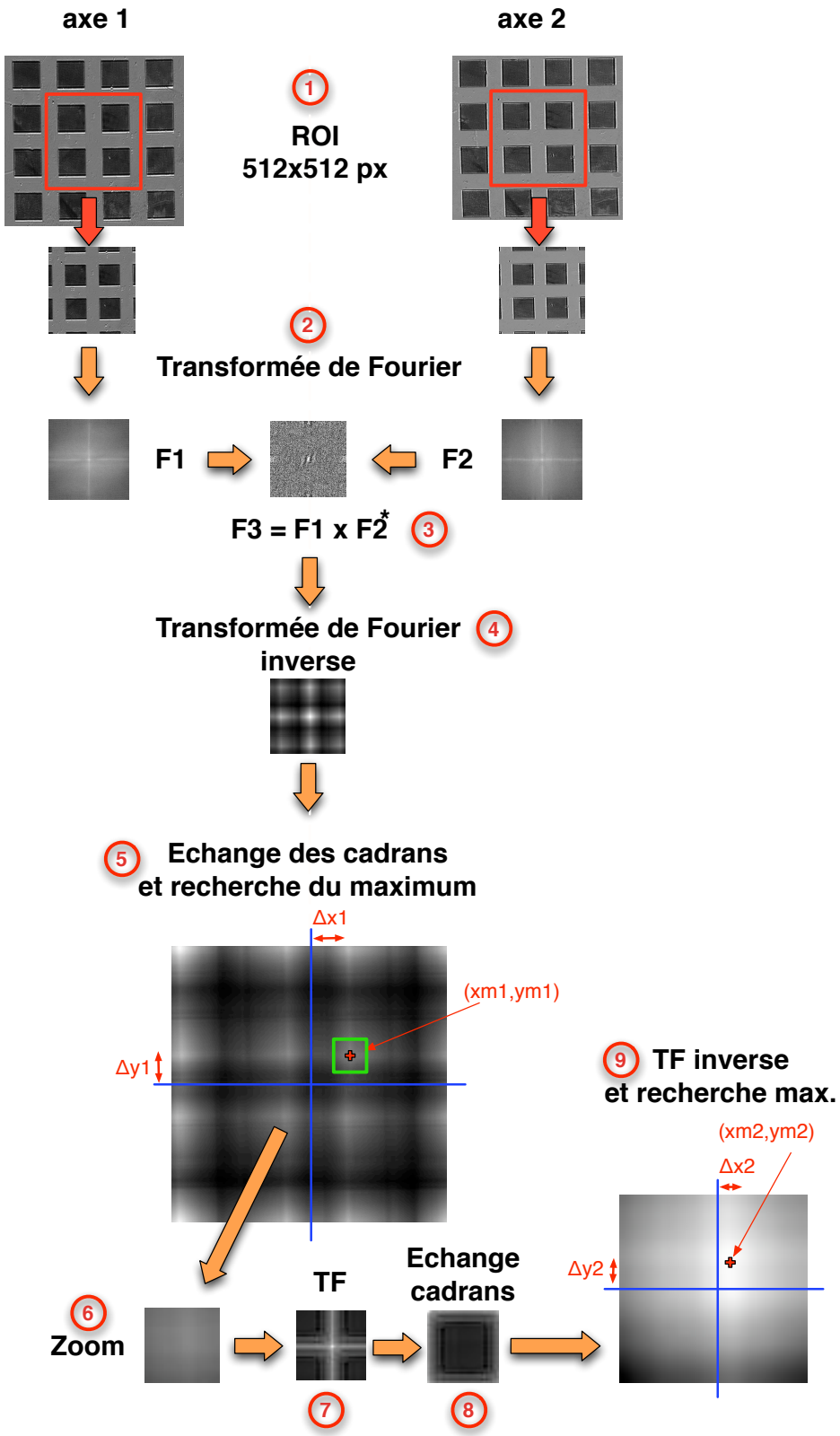


FIGURE 6 – Algorithme de recalage spatial.

Étape 2 : La transformée de Fourier des deux régions est calculée, on obtient des images complexes F1 et F2.

Étape 3 : F1 est multipliée au conjugué de F2, une nouvelle image F3 dans le domaine fréquentiel est crée.

Étape 4 : Une transformée de Fourier inverse est calculée sur F3.

Étape 5 : On procède à un échange des cadrans sur F3. Un maximum local est recherché autour du centre de l'image. Ce maximum, de coordonnées (x_{m1}, y_{m1}) permet de déterminer un complément au vecteur de recalage $(\Delta x_1, \Delta y_1)$. Une nouvelle région d'intérêt est calculée autour du maximum trouvé, de dimension 32×32 pixels.

Étape 6 : En utilisant la nouvelle sous-image, nous pouvons procéder à un zoom, d'un facteur dépendant de la précision du recalage souhaitée. Par exemple, pour 1/8ème de pixel, le facteur de zoom est 8, et donc l'image générée a pour taille 256×256 pixels.

Étape 7 : Une transformée de Fourier est de nouveau calculée pour la sous-image zoomée.

Étape 8 : On procède de nouveau à un échange des cadrans.

Étape 9 : Finalement, une transformée de Fourier inverse est calculée, et un maximum d'intensité local de coordonnées (x_{m2}, y_{m2}) est recherché autour du centre. Ce maximum va affiner le vecteur de recalage en ajoutant $(\Delta x_2, \Delta y_2)$.

Le vecteur de recalage spatial final sera donc :

$$\begin{aligned} \Delta x &= \Delta x_0 + \Delta x_1 + \Delta x_2 \\ \Delta y &= \Delta y_0 + \Delta y_1 + \Delta y_2 \end{aligned} \tag{30}$$

Cet algorithme, bien que complexe et impliquant de nombreuses opérations mathématiques, peut être exécuté en quelques secondes par un ordinateur. Une fois le vecteur de recalage déterminé précisément, il devient très simple de superposer les images provenant de deux axes.

E

Glossaire

ADN : acide désoxyribonucléique. Longue molécule responsable du codage des informations génétiques des cellules. Se présente sous la forme d'une double hélice, enchaînement de bases complémentaires.

ADNc : ADN complémentaire. Produit résultant de l'amplification par RT-PCR de l'extrait d'ARNm d'une cellule. Les ADNc sont complémentaires à l'ADN de la cellule. Ils sont principalement utilisés pour les biopuces à ADN.

ARnm : Acide ribonucléique messager. Transcription de fragment de gène provenant de l'ADN par le biais d'ARN polymérases. L'ARNm est ensuite utilisé par le ribosome pour traduire les informations en séquence d'acides aminés, formant les protéines.

ATR : Attenuated Total Reflection, ou réflexion totale atténuée.

biophotonique : science de l'analyse et modification d'objets biologiques par l'utilisation de l'optique-photonique.

cible : molécule à analyser dans un système de biopuces.

Cy3, Cy5 : cyanine 3 et 5, fluorophores synthétiques largement utilisés pour les puces à ADN. Le Cy3 est excité à $\approx$ 540 nm, et émet à $\approx$ 570 nm (vert), tandis que le Cy5 est excité à $\approx$ 650 nm, et émet à $\approx$ 670 nm (rouge).

plasmon : quasi-particule représentant une oscillation de plasma quantifiée dans un métal. Une « onde » plasmon est par abus de langage une onde optique oscillant à la fréquence du plasmon. Un « plasmon de surface »est quand à lui un raccourci pour une onde évanescente se propageant à l'interface entre un métal et un diélectrique.

PCR : polymerase chain reaction, ou réaction en chaîne de polymérase. Technique permettant d'amplifier un fragment d'ADN grâce à un jeu d'amorces d'hybridation et des enzymes spécialisées comme les TAC-polymérases. En réalisant une succession de cycles thermiques, les brins sont amplifiés par réplication du fragment. Il est possible de réaliser plusieurs millions de copies en quelques heures.

Relation de dispersion : Pour une onde électromagnétique, la relation de dispersion est la relation liant le vecteur d'onde k à la pulsation ω.

RIU : Refractive Index Unit, ou unité d'indice de réfraction. Grandeur sans unité permettant de définir l'indice de réfraction d'un matériau.

RT : Reverse Transcriptase, ou transcriptase inverse. Enzyme utilisée par les rétrovirus par exemple pour transcrir l'information contenue dans l'ARN vers de l'ADN.

RT-PCR : technique permettant d'obtenir des fragments d'ADNc (ADN complémentaire) à partir d'ARNm de la cellule. Elle est basée sur l'utilisation de la réaction en chaîne de polymérase, couplée à celle de la transcriptase inverse.

sonde : molécule connue fixée sur une biopuce par le biais d'une chimie de surface spécialisée, en vue de la faire interagir avec une cible.

SNP : Single Nucleotide Polymorphism, ou polymorphisme de nucléotide unique. Changement d'une paire de base dans un fragment d'ADN (gène par exemple) permettant de différentier un individu par rapport à l'autre, ou un groupe d'individus (cas des maladies génétiques à SNP).

SPR : Surface Plasmon Resonance, ou résonance de plasmon de surface. Phénomène de résonance physique entre les électrons libres d'une fine couche d'un métal comme l'or et l'onde optique incidente polarisée TM. La résonance de plasmon de surface reposent sur la création d'un onde optique évanescente se propageant le long de l'interface du métal : un plasmon de surface.

TE : polarisation Transverse Électrique. On utilise aussi souvent le terme polarisation s (pour *senkrecht*, perpendiculairement en Allemand).

TM : polarisation Transverse Magnétique. On utilise aussi souvent le terme polarisation p (pour *parallel*, parallèlement en Allemand).

Bibliographie

[1] W. Lin : Applications de la technologie des Puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des levure Saccharomyces cerevisiae. Thèse de doctorat, UMR144 CNRS - Institue Curie, Section de Recherche, 2004.

[2] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis et P.O. Brown : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. Science, 270(5235): 467, 1995.

[3] A. Besse, O. Cena et B. Dubois : Rapport sur les puces à adn : analyse scientifique. Mst biologie moléculaire et cellulaire, Université Pierre et Marie Curie, 2006.

[4] P.C. Robinson et M.W. Davidson : Introduction to polarized light microscopy. Nikon MiscroscopyU (site web) : http ://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html, 2009.

[5] http ://www.olympusmicro.com/primer/techniques/polarized/michel.html.

[6] D. Pompon et A. Laisne : PDNA as building blocks for membrane-guided self-assemblies. Biochemical society transactions, 35:495–497, 2007.

[7] OpticsValley, Genopole Evry et ADIT : La biophotonique française, perspectives et développement. Rapport technique, juin 2003.

[8] http ://www.photonics4life.eu/.

[9] J. Wang : Electrochemical nucleic acid biosensors. Analytica chimica acta, 469:63–71, 2002.

[10] M.S. Belluzo, M.E. Ribone et C.M. Lagier : Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. Sensors, 8:1366–1399, 2008.

[11] R.L. Bunde, E.J. Jarvi et J.J. Rosentreter : Piezoelectric quartz crystal biosensors. Talanta, 46(6):1223–1236, 1998.

[12] J. Homola : Present and future of surface plasmon resonance biosensors. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377:528–539, 2003.

[13] M. Chaigneau, K. Balaa, T. Minea et G. Louarn : Plasmon resonance microsensor for droplet analysis. Optics Letters, 32(16):2435–2437, 2007.

[14] F. Bardin : Capteur à fibre optique à gradient d'indice inversé basé sur la résonance plasmon de surface : applications à la détection d'espèces chimiques. Thèse de doctorat, Université Jean Monnet – Saint Etienne, 2001.

[15] P. Lecaruyer, I. Mannelli, V. Courtois, M. Goossens et M. Canva : Surface plasmon resonance imaging as a multidimensional surface characterization instrument – application to biochip genotyping. Analytica chimica acta, 573–574:333–340, 2006.

[16] M. Nakkach, P. Lecaruyer, F. Bardin, J. Sakly, Z.B. Lakhdar et M. Canva : Absorption and related optical dispersion effects on the spectral response of a surface plasmon resonance sensor. Applied Optics, 47(33):6177–6182, 2008.

[17] S. Boussaad, J. Pean et N.J. Tao : High-resolution multiwavelength surface plasmon resonance spectroscopy for probing conformational and electronic changes in redox proteins. Analytical Chemistry, 72:222–226, 2000.

[18] P.O. Brown et D. Botstein : Exploring the new world of the genome with dna microarrays. Nature genetics supplement, 21:33–37, 1999.

[19] E.M. Southern : Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98:503–517, 1975.

[20] R. Ekins et F.W. Chu : Microarrays : their origins and applications. Trends in Biotechnology, 17(6):217–218, 1999.

[21] R. J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras et D. J. Lockhart : High density synthetic oligonucleotide arrays. Nature genetics supplement, 21(20–24), 1999.

[22] D. J. Lockhart, H. Dong, MT. Byrne, M.C. abd Follettie, MV. Gallo, MS. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton et EL. Brown : Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nature biotechnology, 14(13):1675–1680, 1996.

[23] http ://www.affymetrix.com/.

[24] T. Goldmann et J.S. Gonzalez : DNA-printing : utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports. J. Biochem. Biophys. Methods, 42:105–110, 2000.

[25] http ://www.agilent.com.

[26] D. Stekel : Microarray bioinformatics. Cambridge University Press, 2003.

[27] F. Dardel et Képès F. : Bioinformatique, génomique et post-génomique. Les éditions de l'Ecole Polytechnique, 2002.

[28] Prix facturé par le Children's Memorial Research Center de Chicago (IL, USA), de la mesure du niveau d'expression de l'ARN total d'une cellule humaine, http ://www.childrensmrc.org/gene_chip/price_list/.

[29] Prix facturé par l'Orengon Health and Science Univesity pour mesurer le niveau d'expression de l'ARN total d'une cellule humaine. http ://www.ohsu.edu/xd/research/research-cores/gmsr/.

[30] Y. Marcy, PY. Cousin, M. Rattier, G. Cerovic, G. Escalier, G. Béna, M. Guéron, L. McDonagh, F. Le Boulaire, H. Bénisty, C. Weisbuch et JC. Avarre : Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. Biotechniques, 44:913–920, 2008.

[31] http ://www.genewave.com/.

[32] K. Nakatani et I. Sando, S. ans Saito : Scanning of guanineguanine mismatches in dna by synthetic ligands using surface plasmon resonance. Nature biotechnology, 19:51–55, 2001.

[33] R.W. Wood : On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. Proceedings of the Physical Society of London, 18:269–275, 1902.

[34] U. Fano : The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (sommerfeld's waves). J. Opt. Soc. Am, 31:213–222, 1941.

[35] R.A. Ferrell : Predicted radiation of plasma oscillations in metal films. Physical Review, 111(5):1214–1222, 1958.

[36] A. Otto : Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. Z. Naturforsch. für Physik, 216:398–410, 1968.

[37] E. Kretschmann et H. Raether : Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. Z. Naturforsch. A, 23:2135–2136, 1968.

[38] B. Liedberg, C. Nylander et I. Lundstrom : Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sens. Actuators, 4:299–304, 1983.

[39] R.B.M. Schasfoort et A.J. Tudos : Handbook of Surface Plasmon Resonance. Royal Society of Chemistry, 2008.

[40] C. Genet et W. Ebbesen : Light in tiny holes. Nature, 445:39–46, 2007.

[41] C. Billaudeau : Guidage optique dans les cristaux plasmoniques 1D et 2D. Thèse de doctorat, Laboratoire de photonique des nanostructures, Université Paris XI Orsay, 2007.

[42] X. Luo et T. Ishihara : Surface plasmon resonant interference nanolithography technique. Applied Physics Letters, 84(23):4780–4782, 2004.

[43] W.L. Barnes, A. Dereux et T.W. Ebbesen : Surface plasmon subwavelength optics. Nature, 424:824–830, 2003.

[44] P. Lecaruyer, M. Canva et J. Rolland : Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended rouard method. Applied Optics, 46(12):2361–2369, 2007.

[45] Karla Balaa : Capteur à fibre optique basé sur le principe de Résonance de Plasmons de Surface : optimisation pour la détection d'espèces chimiques. Thèse de doctorat, UNiversité de Nantes, 2007.

[46] E. Maillart : Developpement d'un systeme optique d'imagerie en resonance de plasmon de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. Thèse de doctorat, Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, Université Paris XI Orsay, 2004.

[47] P. Lecaruyer, E. Maillart, M. Canva et J. Rolland : Generalization of the rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance. Applied Optics, 45(33):8419–8423, 2006.

[48] P. Schiebener, J. Straub, J.M.H. Levelt-Sengers et J.S. Gallagher : Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density. J. Phys. Chem. Ref. Data, 19:677–717, 1990.

[49] disponible sur http ://www.sopra-sa.com/ (rubrique download > n&k database).

[50] J. Homola, S. S. Yee et G. Gauglitz : Surface plasmon resonance sensors : review. Sensors and Actuators B, 54:3–15, 1999.

[51] B. Liedberg, C. Nylander et I. Lundstrom : Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started. Biosensors and Bioelectronics, 10:i–ix, 1995.

[52] F. Bardin, A. Bellemain, G. Roger et M. Canva : Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. Biosensors and Bioelectronics, 24:2100–2105, 2009.

[53] M. Nakkach, P. Lecaruyer, F. Bardin, J. Sakly, Z.B. Lakhdhar et M. Canva : Multispectral imaging of a biochip based on surface plasmon resonance and integration of chromophores. In Proceedings of SPIE, volume 6450, page 64500I, 2007.

[54] J. Homola, I. Koudela et S. S. Yee : Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers : sensitivity comparison. Sensors and Actuators B, 54:16–24, 1999.

[55] R.L. Rich, M.J Cannon, J. Jenkins, P. Pandian, S. Sundaram, R. Magyar, J. Brockman, J. Lambert et D.G. Myszka : Extracting kinetic rate constants from surface plasmon resonance array systems. Analytical biochemistry, 373(1):112–120, 2008.

[56] N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Lévy, M.C. Millot, S. Pissard, R. Narwa et M. Goossens : One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations. Sensors & Actuators : B. Chemical, 94(3):313–323, 2003.

[57] J. Hottin, J. Moreau, G. Roger, J. Spadavecchia, M.C. Millot, M. Goossens et M. Canva : Plasmonic dna : towards genetic diagnosis chips. Plasmonics, pages 201–215, 2007.

[58] M. Schubert : Generalized ellipsometry and complex optical systems. Thin Solid Films, 313–314:323–332, 1998.

[59] M. Stchakovsky : Spectroscopic ellipsometric measurements on biochip structures in a liquid flow cell environment. note d'application, Horiba Jobin Yvon, 2004.

[60] S.T. Tang et H.S. Kwok : Transmissive liquid crystal cell parameters measurement by spectroscopic ellipsometry. Journal of Applied Physics, 89(1):80–85, 2001.

[61] F. Bernoux, J.P. Piel, B. Castellon, C. Defranoux, J.H. Lecat, P. Boher et Stehlé J.L. : Ellipsométrie : théorie. Techniques de l'ingénieur, juin 2003.

[62] F. Bernoux, J.P. Piel, B. Castellon, C. Defranoux, J.H. Lecat, P. Boher et Stehlé J.L. : Ellipsométrie : instumentation et applications. Techniques de l'ingénieur, juin 2003.

[63] B.M. Law et H.K. Pak : Ellipsometric imaging of surface drops. J. Opt. Soc. Am A, 13(2):379–384, 1996.

[64] J. Taboury : Etude des conformations en double hélice droite et en double hélice gauche d'ADN synthétiques par plusieurs techniques spectroscopiques. Thèse de doctorat, Univ Paris 13, 1985.

[65] O. D. Lavrentovich I. I. Smalyukh, S. V. Shiyanovskii : Three-dimensional imaging of orientational order by fluorescence confocal polarizing microscopy. Chemical Physics Letters, 336(1-2):88–96, 2001.

[66] C. E. Bigelow : Biological Applications of Confocal Fluorescence Polarization Microscopy. Thèse de doctorat, University of Rochester, 2005.

[67] I. Gautier, M. Tramier, C. Durieux, J. Coppey, RB Pansu, JC Nicolas, K. Kemnitz et M. Coppey-Moisan : Homo-FRET micoscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of gfp-tagged proteins. Biophysical Journal, 80(6):3000–3008, 2001.

[68] A. Diaspro, G. Chirico, F. Federici, F. Cannone, S. Beretta et M. Robello : Two-photon microscopy and spectroscopy based on a compact confocal scanning head. Journal of Biomedical Optics, 6:300, 2001.

[69] M. S. Nasir et M. E. Jolley : Fluorescence polarization : An analytical tool for immunoassay and drug discovery. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2(4):177–190, 1999.

[70] F. Baldini, A. Carloni, A. Giannetti, G. Porro et C. Trono : A new optical platform for biosensing based on fluorescence anisotropy. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391(5):1837–1844, 2008.

[71] R.A. Heller, M. Schena, A. Chai, D. Shalon, T. Bedilion, J. Gilmore, D.E. Wookkey et R.W. Davis : Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:2150–2155, 1997.

[72] M.P. Rouard : Etudes des propriétés optiques des lames métalliques très minces. Ann. Phys. (Paris) ser. II, 7:291–384, 1937.

[73] F. Abeles : Recherches sur la propagation des ondes électromagnétiques sinusoïdales dans les milieux stratifiés. application aux couches minces. Ann. Phys. (Paris), 5:596–640, 1950.

[74] P. Yeh : Electromagnetic propagation in birefringent layered media. J. Opt. Soc. Am, 69(5):742–756, 1979.

[75] P. Yeh : Optical Waves in Layered Media. Wiley, 1988.

[76] D.W. Berreman : Optics in stratified and anisotropic media : 4× 4-matrix formulation. J. Opt. Soc. Am, 62(4):502–510, 1972.

[77] M. Mansuripur : Analysis of multilayer thin-film structures containing magneto-optic and anisotropic media at oblique incidence using 2× 2 matrices. Journal of Applied Physics, 67:6466, 1990.

[78] K Eidner : Light propagation in stratified anisotropic media : orthogonality and symmetry properties of the 4×4 matrix formalisms. J. Opt. Soc. Am A, 6(11):1657–1660, 1989.

[79] YJ Jen et CC Lee : Reflection and transmission phenomena of waves propagating between an isotropic medium and an arbitrarily oriented anisotropic medium. Optics Letters, 26(4):190–192, 2001.

[80] I. Avrutsky : Guided modes in a uniaxial multilayer. J. Opt. Soc. Am, 20(3):548–556, 2003.

[81] K. Postava, T. Yamaguchi et R. Kantor : Matrix description of coherent and incoherent light reflection and transmission by anisotropic multilayer structures. Applied Optics, 41(13):2521–2531, 2002.

[82] R. Oldenbourg et T. Ruiz : Birefringence of macromolecules. Biophysical Journal, 56:195–205, 1989.

[83] S. Elhadj, G. Singh et R.F. Saraf : Optical properties of an immobilized DNA monolayer from 255 to 700 nm. Langmuir, 20:5539–5543, 2004.

[84] B. Zitova et J. Flusser : Image registration methods : a survey. Image and vision computing, 21:977–1000, 2003.

[85] T Tang, N François, A Glatigny, N Agier, M.H Mucchielli, L Aggerbeck et Delacroix H. : Expression ratio evaluation in two-colour microarray experimentsis significantly improved by correcting image mis-alignment. Bioinformatics, 23(20): 2686–2691, 2007.

[86] P. Thevenaz, U.E. Ruttimann et M. Unser : A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. IEEE transactions on image processing, 7(1):27–41, 1998.

[87] W. Boireau, S. Bombard, MA. Sari et D. Pompon : Bioengineering and characterization of DNA-protein assemblies floating on supported membranes. Biotechnology and Bioengineering, 77(2):225–231, 2002.

[88] Z Salamon et G Tollin : Optical anisotropy in lipid bilayer membranes : Coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape. Biophysical Journal, 80(3):1557–1567, 2001.

[89] Z Salamon et G Tollin : Graphical analysis of mass and anisotropy changes observed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy can provide useful insights into membrane protein function. Biophysical Journal, 86(4):2508–2516, 2004.

[90] Z Salamon, D Huang, WA Cramer et G Tollin : Coupled plasmon-waveguide resonance spectroscopy studies of the cytochrome b(6)f/plastocyanin system in supported lipid bilayer membranes. Biophysical Journal, 75(4):1874–1885, 1998.

[91] A. Tlili, A. Abdelghani, S. Hleli et A. Maaref : Electrical characterization of a thiol SAM on gold as a first step for the fabrication of immunosensors based on a quartz crystal microbalance. Sensors, 4:105–114, 2004.

[92] M. Chen, M. Li, C.L. Brosseau et J. Lipkowski : Afm studies of the effect of temperature and electric field on the structure of a dmpc-cholesterol bilayer supported on a au(111) electrode surface. Langmuir, 25:1028–1037, 2009.

[93] V. Lioubimov, A. Kolomenskii, A. Mershin, D.V. Nanopoulos et H. A. Schuessler : Effect of varying electric potential on surface-plasmon resonance sensing. Applied Optics, 43(17):3426–3432, 2004.

[94] Haddour, Chevolot, Trevisan, Souteyrand et Cloarec : Adressing and attachment of permanent magnetic filaments to functionnalised glass slide surfaces using magnetic field. Chemical Communications, soumis.

[95] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, Y. Chevolot et J.P. Cloarec : Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads. Sensors, 7:473–498, 2007.

[96] J.P. Hugonin et P. Lalanne : Reticolo software for grating analysis. Institut d'Optique, Orsay, France, 2005.

[97] M.G. Moharam, E.B. Grann et D.A. Pommet : Formulation for stable and efficient implementation of the rigourous coupled-wave analysis of binary gratings. J. Opt. Soc. Am A, 12(5):1068–1076, 1995.

[98] E. Silberstein : Généralisation de la méthode modale de Fourier aux problèmes de diffraction en optique intégrée. Application aux convertisseurs modaux par ingénierie des modes de Bloch. Thèse de doctorat, Univ Paris 6, 2002.

[99] P. Lalanne et G.M. Morris : Highly improved convergence of the coupled-wave method for tm-polarization. J. Opt. Soc. Am A, 13:779–789, 1996.

[100] K.H. Yoon et M.L. Shuler : Design optimization of nano-grating surface plasmon resonance sensors. Optics express, 14(11):4842–4849, 2006.

[101] C.J. Alleyne, A.G. Kirk, R.C. McPhedran, N-A.P. Nicorovici et D. Maystre : Enhanced spr sensitivity using periodic metallic structures. Optics express, 15(13):8163–8169, 2007.

[102] X.D. Hoa, A.G. Kirk et M. Tabrizian : Enhanced SPR response from patterned immobilization of surface bioreceptors on nano-gratings. Biosensors and Bioelectronics, 2009 (sous presse).

[103] S. Jetté-Charbonneau, R. Charbonneau et N. Laboud : Demonstration of bragg gratings based on long- ranging surface plasmon polariton waveguides. Optics express, 13(12):4674–4682, 2005.

[104] A. Hosseini et Y. Massoud : A low-loss metal-insulator-metal plasmonic bragg reflector. Optics express, 14(23):11318–11323, 2006.

[105] K. M. Byun, S. J. Yoon, D. Kim et S. J. Kim : Experimental study of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance biosensors by use of periodic metallic nanowires. Optics Letters, 32(13):1902–1904, 2007.

[106] K. M. Byun et S. J. Kim : Design study of highly sensitive nanowire- enhanced surface plasmon resonance biosensors using rigorous coupled wave analysis. Optics express, 13(10):3737–3742, 2005.

[107] A.J. Benahmed et C.M. Ho : Bandgap-assisted surface-plasmon sensing. Applied Optics, 46(16):3369–3375, 2007.

[108] K. Lin, Y. Lu, J. CHen, R. Zheng, P. Wang et H. Ming : Surface plasmon resonance hydrogen sensor based on metallic grating with high sensitivity. Optics express, 16(23):18599–18604, 2008.

[109] S. Löfaas : Dextran modified self -assem bled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance. Pure and applied chemistry, 67(5):829–834, 1995.

[110] S. Zhang, L. Berguiga, J. Elezgaray, T. Roland, C. Faibre-Moskalenko et F. Argoul : Surface plasmon resonance characterization of thermally evaporated thin gold films. Surface Science, (601):5445–5458, 2007.

[111] Z. Klusek, J. Balcerski, W. Olejniczak et P. Kobierski : scanning tunneling spectroscopy investigations of gold gilms deposited on the (0001) basal plane of highly oriented pyrolitic graphite. Electron Technology, 31(3–4):512–515, 1998.

[112] G.D. Scott, M. Xiao, H.W. Jiang, E.T. Croke et E. Yablonovitch : Sputtered gold as an effective schottky gate for strained Si/SiGe nanostructures. Applied Physics Letters, 90:032110, 2007.

[113] James Ziegler : Stopping and range of ions in matter : www.srim.org.

[114] L. M. Fischer, M. Tenje, A.R. Heiskanen, N. Masuda, J. Castillo, A. Bentien, J. Emmeus, H. Jakobsen et A. Boisen : Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. Microelectronic engineering, 86(4–6):1282–1285, 2009.

[115] A. Bourque-Viens, V. Aimez, A. Taberner, P. Nielsen et P. Charette : Modelling and experimental validation of thin-film effects in thermopile-based microscale calorimeters. Sensors and Actuators A : Physical, 2009 (sous presse).

[116] A. Martinez-Gil : Nanostructuration de surfaces de silicium pour guider la croissance auto-organisée de nanostructures métalliques. Thèse de doctorat, Université Paris XI Orsay, 2005.

[117] W. Srituravanich, N. Fang, C. Sun, Q. Luo et X. Zhang : Plasmonic nanolithography. Nano letters, 4(6):1085–1088, 2004.

[118] P. Dumon, W. Bogaerts, V. Wiaux, J. Wouters, S. Beckx, Van Campenhout J., D. Taillaert, B. Luyssaert, P. Bienstman, D. Van Thourhout et R. Baets : Low-loss SOI photonic wires and ring resonators fabricated with deep uv lithography. IEEE photonics technogy letters, 16(5):1328–1330, 2004.

[119] fiche technique du nb3 de nanbeam ltd. : http ://www.nanobeam.co.uk/.

[120] S. Matsui : Nanostructures fabrication using electron beam and its application to nanometer devices. In Proceedings of the IEEE, volume 84, pages 629–643, 1997.

[121] Casino : http ://www.gel.usherbrooke.ca/casino/.

[122] M.A. McCord et M.J. Rooks : SPIE handbook of microlithography, micromachining and microfabrication, volume 1 : microlithography, volume PM39. SPIE.

[123] C. Vieu, F. Carcenac, A. Pépin, Y Chen, M. Meijias, A. Lebib, L. Manin-Ferlazzo, L Couraud et H Launois : Electron beam lithography : resolution limit and applications. Applied Surface Science, 164:111–117, 2000.

[124] Fiche technique "Nano(tm) PMMA and copolymer", Microchem.

[125] P. Lisboa, A. Valsesia, I. Mannelli, S. Mornet, P. Colpo et F. Rossi : Sensitivity enhancement of surface-plasmon resonance imaging by nanoarrayed organothiols. Advanced Materials, 20(2352–2358), 2008.

[126] Projet NANOBIOFORME : Surfaces hybrides nanostructurées et anisotropes pour la conception de capteurs biologiques plasmoniques sensibles à la conformation et à l'état d'organisation des biomolécules. ANR (appel PNANO 2005).

[127] Projet BIOFIT : Impact of the architecture of adherens junctions on the dynamics and mechanical response of the endothelium. ANR (appel PIRIbio 2009) soumis.

[128] M.A. Ordal, L.L Long, R.J. Bell, S.E. Bell, R.W. Alexander et C.A. Ward : Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. Applied Optics, 22(7):1099–1119, 1983.

[129] LG Schulz et FR Tangherlini : Optical constants of silver, gold, copper, and aluminum. ii. the index of refraction n. J. Opt. Soc. Am, 44(362):18–20, 1954.

[130] LG Schulz : The optical constants of silver, gold, copper, and aluminum. i. the absorption coefficient k. J. Opt. Soc. Am, 44(5):357–362, 1954.

[131] E.D. Palik : Handbook of Optical Constants of Solids. Academic Press.

[132] Nanostructures at surfaces : http ://lns.epfl.ch/lectures/solid/. cours de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, physique du solide.

[133] A.D. Rakic, A.B. Djurisic, J.M. Elazar et M.L. Majewski : Optical properties of metallic films for vertical-cavity optoelectronic devices. Applied Optics, 37:5271–5283, 1998.

[134] M. Kanso : Modélisation, réalisation et caractérisation d'un capteur plasmonique à fibre optique : Effets de la rugosité, des réactions de surface et de la cinétique dans un système microfluidique. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 2008.

[135] C.C. Kim, JW Garland et PM Raccah : Modeling the optical dielectric function of the alloy system Al_{x} Ga_{1-x} As. Physical Review B, 47(4):1876–1888, 1993.

[136] R. Brendel et D. Bormann : An infrared dielectric function model for amorphous solids. Journal of Applied Physics, 71(1):1–6, 1992.

Résumé

La biophotonique a permis à de nombreuses avancées scientifiques et technologiques de voir le jour, tant dans le domaine de la compréhension des mécanismes du vivant que dans le domaine de la médecine. De nouveaux outils sont régulièrement mis au point, repoussant les limites de la compréhension des molécules du vivant et améliorant le diagnostic et le traitement de maladies.

Les biopuces optiques sont des outils participants à une plus grande compréhension des interactions biomoléculaires de surface et ont rendu possible le diagnostic génétique à haut débit ou la caractérisation simultanée d'un grand nombre d'interactions protéiques en parallèle. Les biopuces à résonance de plasmon de surface permettent de plus la caractérisation dynamique des interactions biomoléculaires, tout en se passant de l'utilisation de marqueurs fluorescents.

L'objectif principal de ce travail a reposé sur la mise au point expérimentale d'un système de biopuces à résonance de plasmon de surface capable de caractériser dynamiquement l'anisotropie résultante de l'orientation moyenne d'édifices biomoléculaires de surface. La validation du système ainsi réalisé a été effectuée au travers de trois applications : l'observation de l'orientation de biomolécules sous l'effet d'un changement de régime fluidique ; la détermination de l'anisotropie induite par un champ électrique sur un assemblage biomoléculaire d'épaisseur nanométrique ; et enfin l'orientation de filaments de billes magnétiques microniques sous l'effet d'un champ magnétique.

Le second objectif de ce travail reposait sur l'étude et le développement de nouveaux substrats métalliques structurés latéralement. La perturbation locale du champ évanescent se propageant à la surface du métal a ainsi pu être mis en évidence par le biais d'échantillons micro- puis nano- structurés.

Mots-clés: résonance de plasmon de surface, anisotropie, imagerie polarimétrique, nanoplasmonique, caractérisation de surface, biocapteur optique, biophotonique

Abstract

Biophotonics enabled numerous scientific and technological advances for understanding the mechanisms ruling the living as well as in the field of medicine. New tools are regularly developed in order to extend further the limits of the understanding of the molecules constituting the living, and to improve the diagnostics and treatment of diseases.

Optical biochips are tools participating into a better understanding of biomolecular surface interactions, and permitted high throughput genetic diagnostics or the simultaneous characterization of a large number of protein interactions in parallel. Furthermore, surface plasmon resonance-based biochips enable the dynamical characterization of biomolecular interactions, without the need of using fluorescent markers

The main goal of this work was to develop experimentally a biochip system based on surface plasmon resonance able to dynamically characterize anisotropy resulting from the mean orientation of surface-bound biomolecular assemblies. The system's validation was realized through three applications : the observation of biomolecules orientation effected by a change in the fluidic regime ; the characterization of the anisotropy induced by an electric field on a nanometric-thick biomolecular assembly ; and finally the orientation of strings of micronic magnetic beads under a magnetic field.

The second goal of this work was to study and develop new laterally-structured metallic substrates. The local perturbation of the evanescent field propagating at the surface of metal was observed through the use of micro- to nano- scale structured samples.

Keywords: surface plasmon resonance, anisotropy, polarimetric imagery, nanoplasmonics, surface characterization, optical biosensor, biophotonics