



Développement d'un instrument plasmonique bimodal couplant SPRI et SERS pour la détection et l'identification de molécules biologiques

Aurore Olivéro

► To cite this version:

Aurore Olivéro. Développement d'un instrument plasmonique bimodal couplant SPRI et SERS pour la détection et l'identification de molécules biologiques. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. [⟨NNT : 2016SACLO017⟩](#). [⟨tel-01469228⟩](#)

HAL Id: tel-01469228

<https://pastel.hal.science/tel-01469228v1>

Submitted on 16 Feb 2017

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.



HAL Authorization

NNT : 2016SACLO017

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

préparée à

L'INSTITUT D'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL

ÉCOLE DOCTORALE N°575

Physique et ingénierie : électrons, photons, sciences du vivant (EOBE)

Spécialité de doctorat : Physique

par

Aurore OLIVÉRO

Développement d'un instrument plasmonique bimodal
couplant SPRI et SERS
pour la détection et l'identification de molécules biologiques

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 16 décembre 2016

Composition du jury :

Rapporteurs :	Mme. Thérèse LEBLOIS	Professeur des Universités	FEMTO-ST
	M. Eric BOURILLOT	Maître de conférences	Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne
Présidente :	Mme. Béatrice DAGENS	Directrice de recherche	Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies
Examineurs :	M. Loïc LEROY	Maître de conférences	Institut Nanosciences et Cryogénie
	M. Julien MOREAU	Maître de conférences	Laboratoire Charles Fabry
Directeur de thèse :	M. Michael CANVA	Directeur de recherche	Laboratoire Charles Fabry
Membre invité :	M. Emmanuel MAILLART	Ingénieur	Horiba Scientific

Table des matières

Introduction Générale	1
1 La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation	5
1.1 L'imagerie par résonance des plasmons de surface	5
1.1.1 Bases de la technique SPRI : processus de transduction	7
1.1.2 Interrogation spectrale VS interrogation en intensité	21
1.1.3 Limites de la mesure SPRI	25
1.2 Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces	28
1.2.1 Amélioration du système fluidique	29
1.2.2 Amplification de la masse des molécules cibles	31
1.2.3 Optimisation de la transduction	35
1.2.3.1 Par le choix des matériaux	35
1.2.3.2 Par nanostructuration	36
1.3 Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire	39
1.3.1 Quelles mesures peuvent être combinées avec la SPRI?	39
1.3.1.1 Electro-chimie	40
1.3.1.2 Microbalance à quartz	41
1.3.1.3 Ellipsométrie	42
1.3.1.4 Microscopie à Force Atomique	43
1.3.1.5 Fluorescence	44
1.3.1.6 Spectrométrie de masse	45
1.3.2 Quantification et identification de molécules par le couplage SPRI/SERS .	46
1.3.2.1 Principe de la détection par Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (SERS)	47
1.3.2.2 État de l'art du couplage SPR/SERS	50
1.4 Conclusion	54
2 Développement de l'instrument	57
2.1 L'organisation du projet	58
2.1.1 Les partenaires	58
2.1.2 La répartition du travail	59
2.1.3 Développement instrumental dans le cadre de cette thèse	62
2.2 Module SPRI	65
2.2.1 Le système d'illumination	67
2.2.1.1 Flux reçu par le capteur	69
2.2.1.2 Stabilité en intensité	71
2.2.1.3 Stabilité spectrale de la source à LEDs	74
2.2.1.4 Choix de la gamme spectrale	75
2.2.2 Considérations d'optique instrumentale	77

Table des matières

2.2.2.1	Conjugaison miroir/prisme	77
2.2.2.2	Choix de l'indice du prisme : influence sur la dispersion spectrale	78
2.2.2.3	Choix de l'angle au sommet du prisme : influence sur la conjugaison prisme/caméra	82
2.2.2.4	Anamorphose et champ de vue	84
2.2.2.5	Remarques sur l'alignement du système SPRI	85
2.2.3	La cellule fluide, pièce maîtresse du prototype	86
2.2.4	Pilotage d'une expérience SPRI	91
2.2.5	Performances instrumentales	94
2.2.5.1	Qualité de l'imagerie	94
2.2.5.2	Caractéristiques de la détection	99
2.3	Module SERS	111
2.3.1	Développement du module de balayage angulaire du laser	112
2.3.2	Performances instrumentales	118
2.4	Conclusion	126
3	Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype	129
3.1	Nanostructuration des substrats	130
3.1.1	Choix de la structure du transducteur	130
3.1.2	Calcul des modes électromagnétiques	133
3.1.3	Optimisation du design du substrat	136
3.1.4	Caractérisations expérimentales des substrats nanostructurés	146
3.1.4.1	Réponse électromagnétique	146
3.1.4.2	Performances SERS	147
3.1.4.3	Performances SPRI	149
3.1.4.4	Profondeur de pénétration	153
3.2	Développement d'une biopuce bi-fonctionnelle	158
3.2.1	Intérêt d'un substrat bi-fonctionnel	158
3.2.2	Fabrication d'un substrat bi-fonctionnel	158
3.2.3	Optimisation de la chimie de surface pour interaction modèle de validation de l'instrument ADN/ADN	161
3.3	Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS	164
3.3.1	Définition d'une expérience modèle fiable	164
3.3.2	Présentation de l'expérience de validation	166
3.3.3	Résultats SERS	170
3.3.4	Résultats SPRI	175
3.4	Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex	180
3.4.1	Modèle agro-alimentaire : Ochratoxine A / aptamère	182
3.4.2	Modèle bio-médical 1 : protéine MnSOD / aptamère	187
3.4.3	Modèle bio-médical 2 : protéine FAB-p3 / fragment d'anticorps	189
3.5	Conclusion	190
	Conclusion Générale	193

A Annexes	197
A.1 Diagramme d'Abbe	197
A.2 Dispersion de la mesure en interrogation en intensité	197
Bibliographie	199
Remerciements	213

Introduction Générale

Préambule : La recherche est liée par son histoire aux philosophes, comme le confirme le titre de docteur en philosophie (PhD : Philosophiæ Doctor) remis aux chercheurs. Les philosophes sont ces esprits curieux et perspicaces qui ont fait naître le goût pour le questionnement et le doute, pour la découverte et l'approfondissement. A la renaissance, la philosophie désigne la science et les connaissances. Ce préambule met en lumière l'origine de ce lien entre philosophes et scientifiques.

Les premiers détenteurs de doctorats en Europe à l'époque médiévale étudiaient la théologie. Ils s'interrogeaient sur l'homme et sa place dans le monde. Ils réfléchissaient à ce vaste sujet et partageaient leurs idées au plus grand nombre. Ensuite, ce fut le temps de la remise en question des réalités les plus ancrées à la Renaissance avec Galilée, Copernic et Kepler qui bouleversent l'astrophysique. Ces grands physiciens sont les initiateurs de la victoire de la raison et de la démonstration sur la croyance religieuse et l'obscurantisme. Ils inspirent leurs successeurs à la révolution de la réflexion et ouvrent ainsi la voie au siècle des Lumières. Dans ce mouvement, philosophes et scientifiques sont étroitement liés et font progresser ensemble la pensée critique. L'encyclopédie voit le jour, symbole de cette volonté de diffusion du savoir auprès du public, grâce à l'impulsion de Diderot et d'Alembert.

La démarche scientifique évolue pour s'intéresser plus particulièrement à la nature, tout comme les philosophes tels que Jean-Jacques Rousseau le suggèrent. Pour John Locke d'ailleurs, la physique, c'est la philosophie naturelle. Bien sûr, la physique pure et les mathématiques continuent de progresser à grandes enjambées avec des cerveaux brillants comme Newton, Euler ou Gauss, mais l'intérêt pour la nature est nouveau. Les scientifiques observent les phénomènes de façon expérimentale, les analysent, les approfondissent. Les connaissances sont acquises de l'expérience.

Par ailleurs, c'est cette façon d'observer la nature qui a donné naissance à la médecine moderne, bien avant cette ère, au *V^{ième}* siècle avant J.C. en Grèce antique, par les pratiques du célèbre Hippocrate : les maladies relèvent de causes naturelles, et non du sacré. Les arabes progressent beaucoup en médecine, contrairement aux occidentaux, qui rejettent cette science durant tout le Moyen-Age. C'est seulement à partir du *XVI^{ième}* siècle que les progrès en médecine reprennent, grâce à l'autorisation de la dissection. Même si l'anatomie devient une science mieux maîtrisée, il faut attendre le *XIX^{ième}* siècle pour que la médecine moderne soit initiée : l'observation du patient est combinée avec les données anatomiques pour une meilleure compréhension des maladies. Désormais, la santé est un objectif à atteindre. De nombreux moyens technologiques d'analyse et de diagnostic se développent au *XX^{ième}* siècle, à la fois physiques, chimiques et biologiques.

Même si les avancées dans le traitement des maladies ont été considérables au cours du siècle précédent, de nouveaux fléaux s'abattent sur les populations vieillissantes des pays développés économiquement : le cancer, les maladies cardio-vasculaires, Alzheimer et Parkinson touchent la majorité de ces populations. L'étude des maladies génétiques représente également un enjeu majeur de la recherche médicale. Pour mieux comprendre les causes de ces pathologies et pouvoir les prévenir, c'est à l'échelle moléculaire que sont menées les investigations.

L'analyse des phénomènes biologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire repose sur le développement de méthodes d'observation optiques. Désormais, la chimie, la physique et la biologie s'unifient dans un but commun, celui de l'étude du vivant dans le domaine de l'infiniment petit.

La parfaite illustration de cette interdisciplinarité scientifique est donnée par le prix Nobel de chimie 2014, qui honore les travaux d'Eric Betzig, William Moerner et Stefan Hell sur le développement de la microscopie de fluorescence à très haute résolution. Ils parviennent à imager des molécules individuelles grâce à la superposition d'images de fluorescence.

Un microscope optique a également permis l'observation du processus de réparation de l'ADN, primé par le prix Nobel de chimie 2015. Cette découverte est envisagée comme moyen de rendre les traitements contre le cancer plus efficaces, en inhibant la réparation du code génétique des cellules tumorales. Une fois de plus, ces recherches ont abouti grâce à la mise en commun de connaissances de physique et de biologie.

Outre l'émergence de nouvelles idées de traitement contre le cancer, d'importants efforts sont mobilisés pour améliorer le diagnostic de la maladie. D'une part, les recherches en biochimie ont révélé un grand nombre de marqueurs biologiques traduisant le développement de plusieurs types de cancers [Ludwig 2005, Gutman 2006, Kulasingam 2008]. Par exemple, le gène suppresseur de tumeur p53 est altéré chez plus de 50% des patients atteints de cancer, quelle que soit sa nature [Bérout 1998, Soussi 2000]. Les fonctions de la protéine codée par p53 sont extrêmement variées. Notamment, elle joue un rôle essentiel dans l'apoptose cellulaire et la transcription de l'ADN. Les déclinaisons des mutations possibles de ce gène sont nombreuses, et l'interaction de la protéine avec l'ADN est complexe.

Au sein du laboratoire Charles Fabry, la technique **d'Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRI)** a été développée en étroite collaboration entre chimistes, biologistes et physiciens afin d'analyser des cinétiques d'interaction entre deux molécules. Grâce à cette méthode, il est par exemple possible de résoudre jusqu'à une différence d'une base d'ADN entre deux séquences du code génétique. Le cas modèle prouvant la force de cet instrument optique concerne la détection de mutations génétiques liées à la mucoviscidose [Hottin 2007]. Ainsi, pour analyser différentes configurations d'interactions entre p53 et l'ADN en parallèle, à haut débit et en temps réel, la SPRI s'impose comme une méthode d'observation moléculaire adaptée à l'étude de biomarqueurs [Maillart 2004b, Shabani 2013].

L'intérêt de la SPRI s'étend également au domaine de l'agro-alimentaire pour la détection de contaminants alimentaires [Piliarik 2009b, Spadavecchia 2005], ou encore à la surveillance environnementale grâce à la mesure de la concentration de pesticides ou de gaz polluants comme le dioxyde d'azote par exemple [Mauriz 2007, Wright 1995]. D'ailleurs, l'analyse de gaz constitue la première application de la méthode de résonance des plasmons de surface par l'équipe de Liedberg en 1982 [Nylander 1982].

Toutefois, l'analyse de petites molécules, telles que les toxines alimentaires, ou de marqueurs

biologiques en très faible concentration, dont la détection permettrait de diagnostiquer plus précocement le cancer, pousse la technique SPRI dans ses retranchements.

Un résumé des différentes stratégies permettant d'améliorer la sensibilité de la détection est dressé dans le premier chapitre. Cette thèse CIFRE entre le laboratoire Charles Fabry et l'entreprise Horiba Jobin-Yvon propose d'implémenter la solution d'amélioration de la détection par le couplage de la SPRI et de la **Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (SERS)**, piste également explorée par d'autres laboratoires. Toutefois, leurs recherches n'ont pas abouti à un instrument pouvant être transféré à des utilisateurs biologistes afin d'étudier des applications d'intérêt pour leur recherche, challenge que se propose de relever le consortium rassemblé autour du projet ANR Piranex dans le cadre duquel s'inscrit cette thèse instrumentale. A cet effet, un bio-capteur optique bimodal a été développé dans le but de mettre en œuvre mesures SPRI et SERS dans un unique instrument, grâce à l'utilisation de substrats nanostructurés. Le système est décrit dans le second chapitre. L'optimisation des substrats, sur le plan de leur fabrication et de leur fonctionnalisation chimique est abordée dans le troisième chapitre, dans lequel sont également présentés les premiers résultats d'expérience validant le couplage SPRI/SERS sur le prototype instrumental, ainsi que des perspectives d'applications biologiques.

La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

Sommaire

1.1 L'imagerie par résonance des plasmons de surface	5
1.1.1 Bases de la technique SPRI : processus de transduction	7
1.1.2 Interrogation spectrale VS interrogation en intensité	21
1.1.3 Limites de la mesure SPRI	25
1.2 Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces	28
1.2.1 Amélioration du système fluidique	29
1.2.2 Amplification de la masse des molécules cibles	31
1.2.3 Optimisation de la transduction	35
1.3 Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire	39
1.3.1 Quelles mesures peuvent être combinées avec la SPRI ?	39
1.3.2 Quantification et identification de molécules par le couplage SPRI/SERS	46
1.4 Conclusion	54

L'introduction qui suit commence par la présentation de la méthode d'analyse d'interactions moléculaires d'Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRI), qui souligne les atouts et les limites de ce système de détection. Un recensement de différentes solutions d'amélioration de la détection s'ensuit. Pour finir, l'accent est mis sur le couplage entre la SPRI et la spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS).

1.1 L'imagerie par résonance des plasmons de surface

Cette partie explique comment la SPRI est appliquée à l'étude d'interactions entre molécules.

Pour commencer, posons ici quelques définitions de termes essentiels en SPRI, résumés en figure 1.1 sur le schéma d'un bio-capteur SPRI.

- Un bio-capteur moléculaire permet de détecter une molécule ciblée en traduisant une interaction biologique entre cette molécule en solution et une molécule réceptrice, déposée sur une surface, en un signal mesurable. L'ensemble au sein duquel a lieu l'interaction s'appelle une **cellule fluidique**, aussi dénommée cuve.

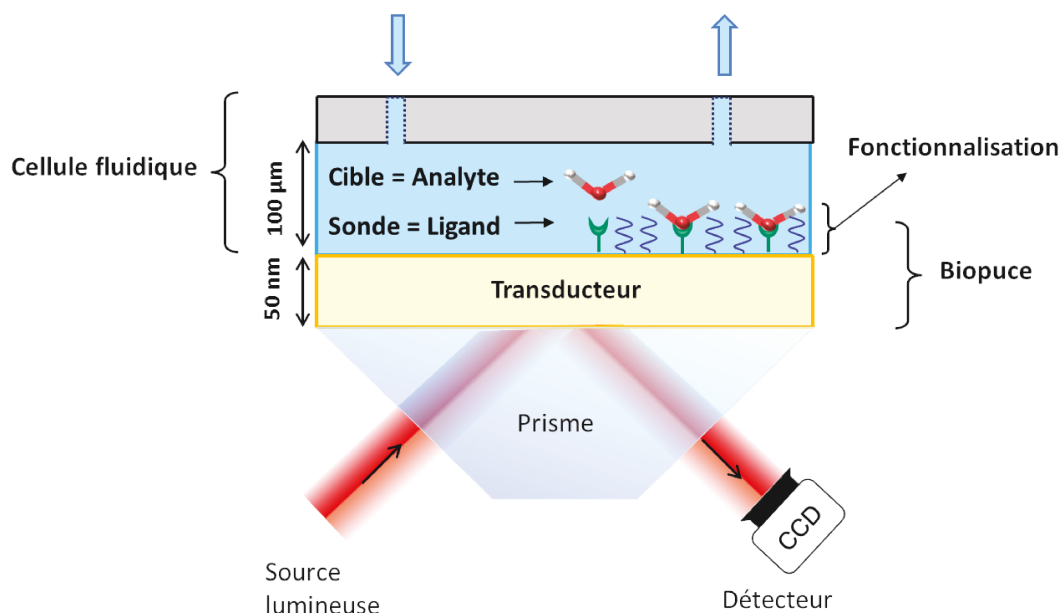


FIGURE 1.1 – Éléments principaux composant un bio-capteur SPRI en configuration Kretschmann.

- Le couple de bio-molécules étudié est composé d'une molécule **sonde**, appelée aussi **ligand** qui est immobilisée à la surface d'un substrat, et d'une molécule **cible**, ou **analyte** en solution, complémentaire à la sonde. La sonde fixe va interagir avec la molécule cible en solution, injectée grâce à un système fluidique.
- La sonde est fixée au substrat par l'intermédiaire d'une chimie de surface adéquate. L'ensemble composé de la chimie et des sondes est désigné par le terme de **fonctionnalisation** car la fonction de reconnaissance biologique est donnée à la surface.
- Le substrat sur lequel les molécules cibles sont capturées constitue l'élément central de la détection. Il convertit une information biophysique, une interaction entre deux molécules, en un signal optique mesurable par un détecteur : c'est un **transducteur**. En SPRI, le signal optique est acquis par une caméra, d'où le terme d'imagerie. Le transducteur est composé d'un film métallique très fin, de l'ordre de 50 nm d'épaisseur, déposé sur du verre, qui recèle des propriétés optiques particulières expliquées dans le paragraphe suivant. Le film mince de métal est généralement illuminé à travers un prisme, ce qui constitue la **configuration appelée Kretschman**, dont l'utilité est expliquée dans la suite.
- Le transducteur fonctionnalisé est qualifié de **biopuce**. Cet ensemble regroupe substrat métallique, chimie de surface et molécules sondes.
- Lorsque la biopuce est plaquée à l'aide d'un vérin contre une pièce mécanique contenant un trou d'entrée et un trou de sortie du fluide, la cellule fluidique est constituée. L'étanchéité est assurée par un joint.

La nature du couple de molécules analysé peut être multiple en fonction du processus biologique étudié. Par exemple, en immunologie, l'interaction en présence concerne deux protéines,

un anticorps et un antigène. La signalisation cellulaire, processus qui régit l'activité des cellules, est étudiée à partir de l'interaction entre protéines et sucres. La formation du complexe ADN/protéine renseigne pour sa part sur le processus de réplication. L'hybridation entre deux brins d'ADN permet de détecter des mutations génétiques.

Les molécules sondes les plus courantes sont les suivantes : oligonucléotide [Piunno 2005, Hottin 2007], anticorps [Luppa 2001, Karlsson 1997, Mullett 2000], enzyme [Amine 2006, Iwasaki 2001] ou aptamère [Song 2008, Li 2006b]. Les aptamères sont de courtes séquences d'ADN ou d'ARN, simple brin, qui s'organisent suivant une structure de repli 3D bien définie.

Pour récapituler, le bio-détecteur SPRI incorpore une plateforme optique, incluant le transducteur qui convertit l'interaction moléculaire en signal optique, une source lumineuse et une caméra, un élément de reconnaissance biologique, la sonde, spécifique de l'espèce moléculaire cible à détecter, et un système de micro-fluidique qui met en contact la solution d'espèces ciblées avec les molécules sondes.

1.1.1 Bases de la technique SPRI : processus de transduction

Principe de la mesure Pour commencer, une explication qualitative du phénomène physique sous-jacent à ce mode de détection est proposée.

Le film métallique qui compose le transducteur, le plus souvent en or, argent, cuivre ou aluminium, est très réflecteur sauf à un angle et une longueur d'onde particuliers, liés par une relation mathématique présentée dans la suite. Pour ce couple (λ_0, θ_0) , le film absorbe la majeure partie de la lumière incidente. Cette absorption est provoquée par la création d'une onde plasmon qui se propage à l'interface entre le film et un milieu diélectrique (de l'eau par exemple). Il s'agit du **phénomène de résonance des plasmons de surface**. Lorsque ce phénomène se produit, l'intensité du faisceau lumineux réfléchi, analysée par une caméra, décroît drastiquement : elle passe de 80% de réflectivité à une valeur presque nulle, comme illustré sur la figure 1.3 gauche. Toute l'énergie de la lumière incidente est transférée vers une onde qui se propage le long du film métallique.

Cette onde est évanescente, c'est-à-dire que son amplitude décroît de façon exponentielle dans la direction perpendiculaire à la surface du film jusqu'à s'évanouir complètement, comme cela est schématisé en figure 1.2. Pour donner quelques ordres de grandeur, dans le cas d'un film d'or d'une épaisseur de 50 nm, la profondeur de pénétration de l'onde dans un milieu aqueux recouvrant le film de métal vaut environ 200 nm pour une longueur d'onde d'illumination de 800 nm. A cette distance, l'intensité du champ électrique de l'onde plasmon a diminué de $1/e$, soit près de 60%, de sa valeur maximale. De plus, en se propageant à l'interface or/eau, l'onde perd de son énergie par absorption du métal. Au bout d'une distance parcourue de l'ordre de la vingtaine de microns, l'onde est presque totalement atténuée.

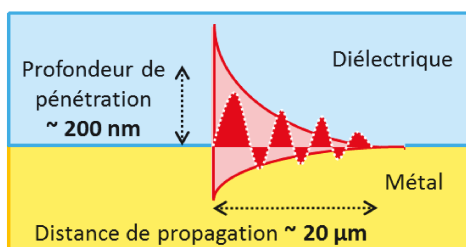


FIGURE 1.2 – Représentation d'une onde évanescente et illustration de la profondeur de pénétration et de la distance de propagation de l'onde.

Les caractéristiques de cette onde dépendent notamment de l'indice de réfraction du milieu diélectrique recouvrant le métal, propriété à la base des biocapteurs SPR. Plus précisément, le couple d'angle et de longueur d'onde incidents de la résonance plasmonique du film métallique change lorsque l'indice de réfraction au-dessus du film est modifié. Ainsi, la position de la résonance, spectrale ou angulaire, varie suite à un changement d'indice. L'unité RIU est utilisée pour parler d'indice de réfraction optique et signifie Refractive Index Unit.

L'application de ce phénomène physique à la mise au point d'un capteur dédié à l'étude d'interactions moléculaires découle de cette propriété : l'accroche de biomolécules à la surface du film métallique induit un changement d'indice qui cause lui-même un décalage de la résonance. En réalité, c'est une variation d'épaisseur optique qui est mesurée lorsque l'interaction a lieu, correspondant au produit entre indice et épaisseur de la couche moléculaire formée. Cette épaisseur optique dépend du taux de recouvrement de la surface, c'est-à-dire du nombre de molécules par unité de surface (voir la thèse d'Emmanuel Maillart [Maillart 2004a] pour plus de détails sur le calcul du taux de recouvrement).

La figure 1.3 gauche permet de visualiser ce décalage de la résonance. En situation initiale, le film d'or est recouvert d'une couche de chimie qui fixe les molécules sondes à sa surface. La résonance se produit à un certain angle et une certaine longueur d'onde d'incidence pour donner une chute dans le profil de réflectivité bleu enregistré par le détecteur. L'indice à la surface de l'or est noté n . Puis, le système fluide injecte une solution de molécules cibles qui se fixent sur les sondes : l'indice local à la surface du film métallique varie de la quantité Δn , et la position de la résonance est translatée pour donner la courbe de réflectivité rouge.

Pour observer cette modification de résonance, plusieurs types d'interrogations existent, c'est-à-dire plusieurs façons de sonder le capteur afin d'extraire un signal. Elles sont schématisées en figure 1.3. Il est possible de balayer une plage d'incidence angulaire ou spectrale donnée pour analyser le niveau d'intensité du faisceau réfléchi sur une caméra. Le minimum d'intensité mesuré sur la caméra permet de trouver le couple (λ_0, θ_0) de résonance.

La méthode d'interrogation la plus courante et la plus simple à mettre en œuvre du point de vue de l'imagerie 2D est l'**interrogation en intensité**. Elle consiste en une mesure de la variation de réflectivité à un angle et une longueur d'onde fixés [Kihm 2012]. Notamment, les systèmes de SPR Horiba utilisent ce type de mesure.

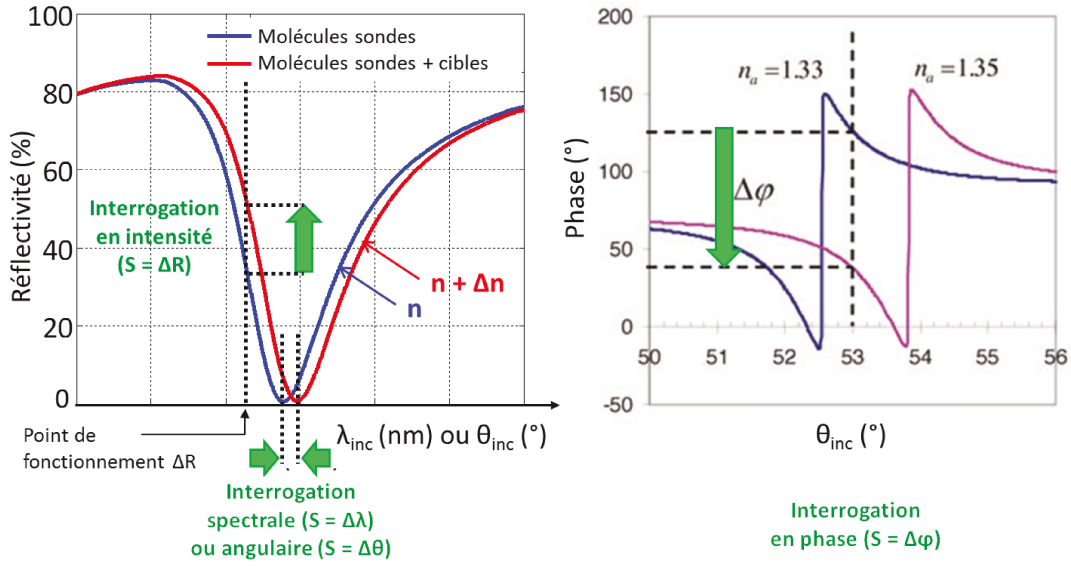


FIGURE 1.3 – Illustration de différentes méthodes d'interrogation permettant d'extraire un signal S . A gauche, un profil de réflectivité de la résonance, angulaire ou spectral, est présenté, avant (bleu) et après (rouge) interaction entre sonde et cible. A droite, il s'agit de profils de phase pour deux indices de réfraction, empruntés à l'article de Shalabney [Shalabney 2011].

Pour que cette variation d'intensité relevée sur la caméra suite à un changement d'indice soit maximisée, il est judicieux de choisir un couple (λ_0, θ_0) tel que l'intensité à ces conditions se trouve au niveau de la pente maximale de la résonance (point de fonctionnement indiqué en figure 1.3 gauche). Ainsi, la dérivée de la courbe est maximale, c'est-à-dire que la sensibilité de la mesure est la plus grande. Toutefois, si le décalage de la résonance est plus important que la zone de linéarité de la courbe de réflectivité, le signal n'est plus proportionnel à la variation d'indice. La plage de linéarité de la mesure en interrogation en intensité est de l'ordre de 10^{-3} RIU [Campbell 2007]. Une discussion plus précise sur la dynamique de mesure et le choix du point de fonctionnement est proposée un peu plus loin, en partie 1.1.2.

Si une **interrogation angulaire** est choisie, la longueur d'onde incidente est fixée, et la mesure consiste au suivi de l'angle de résonance [Karlsson 1995]. Cette mesure peut être implémentée en utilisant soit une barrette CCD, soit une caméra. Dans le premier cas, un faisceau monochromatique est focalisé sur la surface analysée. De fait, des rayons d'incidences variées éclairent le substrat de façon simultanée afin d'acquérir un profil de la résonance en temps réel [Guo 2008]. Ce système a par ailleurs été choisi par le fabricant Biacore pour équiper ses instruments commerciaux. Si la qualité d'imagerie de la mesure SPRI veut être conservée, un balayage angulaire peut être réalisé par la motorisation du bras mécanique supportant la source ainsi que celle du bras recevant la caméra, afin que les deux bras restent symétriques. Une solution moins couteuse et moins encombrante consiste à utiliser un miroir rotatif placé en sortie de source conjugué à la biopuce, le bras caméra restant fixe [Beusink 2008]. La rotation du miroir

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

est également plus rapide et plus précise que le mouvement du bras mécanique complet. Cette configuration est mise en place sur le prototype décrit dans le chapitre suivant.

L'interrogation spectrale correspond à la situation contraire, angle fixé et décalage de la longueur d'onde de résonance mesuré. Là aussi, il est possible de réaliser ce procédé d'interrogation de manière directe ou séquentielle.

En configuration directe, une source blanche éclaire le substrat. Le faisceau réfléchi est envoyé vers un réseau qui sépare les différentes longueurs d'onde de la source pour obtenir sur le détecteur un profil spectral de résonance [Bardin 2009].

En configuration séquentielle, des images sont acquises pour chaque longueur d'onde de la source. Un balayage spectral est implémenté de façon courante grâce à une source étendue, par exemple halogène, couplée à un monochromateur composé d'un réseau de diffraction qui permet de sélectionner une longueur d'onde précise du spectre de la source [Otsuki 2010].

Afin de s'affranchir du déplacement mécanique du réseau de diffraction qui ralentit la mesure, la solution de l'utilisation d'un filtre à cristaux liquides accordable a été envisagée [Ruemmele 2013]. Ainsi, le balayage est contrôlé par l'électronique, et non la mécanique.

Il est aussi possible de réduire le coût de l'instrument en remplaçant le monochromateur ou le cristal accordable par quelques LEDs qui vont permettre d'acquérir un profil de réflectivité discrétisé [Sereda 2014b]. A partir de ce profil, une fonction d'ajustement pseudo-lorentzienne permet de reconstituer l'ensemble de la résonance et de déterminer le minimum de réflectivité. Ce mode d'interrogation par une source à LEDs a été choisi pour équiper le système développé dans le cadre de cette thèse.

L'avantage d'une mesure par suivi de la position du minimum de réflectivité, par interrogation angulaire ou spectrale, par rapport à une interrogation en intensité consiste en une dynamique de mesure uniquement limitée par la plage de longueurs d'onde ou d'angles d'incidence disponible.

Implémentée à angle et longueur d'onde fixes, une **interrogation en phase** peut également être choisie. Dans ce cas, pour que la variation de phase avant et après interaction soit la plus grande, et donc la sensibilité la meilleure, le couple (λ_0, θ_0) est réglé pour que la phase initiale soit un point d'une branche du profil de phase, et que la phase après interaction se retrouve sur la seconde branche, ce qui est représenté sur le graphe de droite de la figure 1.3. La variation de phase importante mesurée induit une sensibilité plus grande que les méthodes d'interrogation précédentes [Law 2007, Kabashin 2009].

Par contre, cet avantage est contrebalancé par plusieurs limitations. D'abord, une mesure de phase requiert une source laser suffisamment cohérente pour créer des interférences contrastées à partir desquelles la phase est extraite. Or, une source cohérente est incompatible avec de l'imagerie à cause du phénomène de speckle qui dégrade le rapport signal à bruit des images. Ensuite, le signal de phase n'est pas proportionnel à la variation d'indice du fait de l'évolution non linéaire de la phase avec l'angle ou la longueur d'onde incidente, comme cela est visible sur la figure 1.3 droite. L'information de quantification du signal est perdue par rapport aux autres méthodes. De plus, la dynamique de la mesure est réduite car la phase devient rapidement constante hors résonance comme le montrent les deux plateaux situés de part et d'autre de la résonance. A titre d'exemple, une résolution de 10^{-6} RIU est associée à une dynamique de mesure de l'ordre

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

de 10^{-3} RIU [Junfeng 2005]. Une augmentation de la résolution s'accompagne d'une perte de dynamique de mesure. Pour finir, cette méthode d'interrogation nécessite un montage optique plus complexe car elle fait intervenir un système interférométrique analysant la phase de l'onde. La stabilité d'un montage interférométrique est limitée car la phase d'une onde est très sensible à des modifications des conditions environnementales (température, vibrations). Pour ces raisons, peu d'instruments SPR fonctionnent par interrogation en phase.

Les principales caractéristiques de ces quatre moyens d'acquisition d'un signal SPR sont résumées dans le tableau 1.4. La résolution est évaluée en terme de variation d'indice minimale pouvant être détectée par le système. La dynamique correspond au contraire à la variation d'indice maximale mesurable en conservant une relation de proportionnalité entre signal optique et changement d'indice.

L'inconvénient de l'interrogation spectrale par filtre accordable, non mentionné dans le tableau, est son coût très élevé. La méthode la plus sensible est la mesure de phase, et la dynamique la plus grande est obtenue par mesure de la position spectrale ou angulaire de la résonance, malgré une vitesse d'acquisition réduite lorsqu'un mouvement mécanique est nécessaire au balayage en angle ou en longueur d'onde d'incidence. Cependant, les temps d'acquisition restent suffisants pour la mesure d'interactions en temps réel, ce qui est prouvé au cours du chapitre II, en page 105.

Interrogation	Résolution	Dynamique	Imagerie 2D ?	Vitesse de mesure	Mouvement mécanique
Phase [Law 2007, Kabashin 2009]	10^{-8} RIU	$< 10^{-4}$ RIU	NON	+	NON
Intensité [Kihm 2012, Campbell 2007]	10^{-6} RIU	10^{-3} RIU	OUI	+	NON
Spectrale [Otsuki 2010, Sereda 2014] Angulaire [Beusink 2008, Karlsson 1995]	$10^{-6} / 10^{-7}$ RIU	10^{-2} RIU	OUI (balayage)	-	OUI
			OUI (filtre accordable) [Ruemmele 2013]	+	NON
			NON (mesure « directe ») [Bardin 2009, Guo 2008]	+	NON

FIGURE 1.4 – Comparaison des performances entre différents modes d'interrogation. Les points limitants des différentes méthodes sont colorés en rouge.

Formulation mathématique de l'onde plasmon Venons-en maintenant à des considérations plus quantitatives en abordant brièvement l'aspect théorique des plasmons de surface et en justifiant en particulier l'utilisation d'un film métallique et d'un prisme, qui mérite d'être expliquée.

Dans un métal, une partie des électrons est libre (les électrons de conduction) et répond à l'application d'un champ électrique. L'oscillation du nuage d'électrons est schématisée en figure 1.5. La composante du champ normale au film (E_y) polarise le nuage d'électrons libres en

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

séparant les charges positives des charges négatives. La composante longitudinale (E_x) le met en mouvement en décalant les charges positives par rapport aux charges négatives, ce qui assure la propagation de l'onde le long du film. C'est pour cette raison qu'une polarisation transverse magnétique (TM) est nécessaire à l'excitation de la résonance plasmon (le champ électrique se trouve inclus dans le plan du vecteur d'onde incident). L'or et l'argent sont les métaux les plus couramment utilisés pour l'excitation de plasmons de surface, l'or étant préféré pour sa stabilité en milieu aqueux (pas de problème d'oxydation).

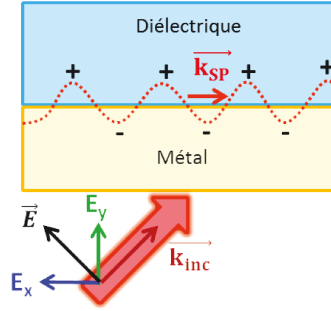


FIGURE 1.5 – Excitation du plasmon de surface par une onde de polarisation transverse magnétique (TM).

Le vecteur de l'onde plasmon k_{SP} se propageant à l'interface entre un métal et un diélectrique est déterminé à partir de la résolution des équations de Maxwell. La relation de dispersion définissant ce vecteur d'onde est la suivante :

$$k_{SP} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{n_m^2 n_d^2}{n_m^2 + n_d^2}} \quad (1.1)$$

avec n_m et n_d respectivement les indices du métal et du milieu diélectrique recouvrant le métal. L'indice du métal étant complexe, le vecteur plasmon est lui-même complexe, impliquant une atténuation de l'intensité du champ lors de sa propagation due à l'absorption du métal.

Expérimentalement, l'onde plasmon est créée lorsque la composante longitudinale du vecteur de l'onde incidente égalise la partie réelle du vecteur plasmon :

$$Re(k_{SP}) = k_{inc/x} \quad (1.2)$$

Or, lorsque l'onde incidente se propage dans l'air, la composante parallèle à la surface de son vecteur est égale à :

$$k_{inc/x/air} = \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\theta)$$

θ étant l'angle d'incidence de l'onde par rapport à la normale à la surface. Dans ce cas, le vecteur d'onde incident est insuffisant pour vérifier la relation de couplage donnée par l'équation (1.2) ($Re(k_{SP}) > k_{inc/x/air}$).

Différents moyens permettent de remplir cette condition en augmentant le module du vecteur d'onde atteignant le métal. Ces astuces sont appelées **méthodes de couplage**. Les techniques

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

de couplage les plus courantes sont basées sur l'utilisation d'un prisme, c'est la configuration Kretschman, ou d'un réseau de diffraction.

Un couplage par réseau de diffraction de période P permet d'obtenir un vecteur incident de la forme :

$$k_{inc/réseau} = k_{inc/x/air} \pm m \frac{2\pi}{P}$$

Dans le cas du prisme, d'indice n_p , la composante longitudinale du vecteur d'excitation devient égale à :

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

Le couplage par prisme est celui mis en œuvre sur l'instrument développé durant le projet. La condition de résonance de l'équation (1.2) est remplie grâce à l'utilisation d'un prisme lorsque :

$$\frac{2\pi}{\lambda} \left\{ \sqrt{\frac{n_m^2 n_d^2}{n_m^2 + n_d^2}} \right\} = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \times \sin(\theta) \quad (1.4)$$

Cette équation montre le lien entre indice du diélectrique, n_d et longueur d'onde ou angle d'incidence, mis en valeur en rouge. Pour trouver la relation qui unit une variation d'indice du milieu diélectrique à une variation de longueur d'onde par exemple, il faut dériver d'une part le terme de gauche de l'équation (1.4) par rapport à n_d , et d'autre part le terme de droite par rapport à λ . Cette démarche s'applique aussi pour obtenir l'égalité entre variation d'indice et décalage angulaire de la résonance. Le lien entre variation d'indice et variation de réflectivité est moins direct. Il est déterminé à partir de calculs basés sur les équations de Fresnel et la relation de dispersion de l'onde plasmon. Il s'agit d'un calcul de multicouches, expliqué dans l'article de Lecaruyer et al [Lecaruyer 2006].

Pour résumer, une onde de plasmon de surface est évanescence, c'est-à-dire que son amplitude décroît de façon exponentielle en s'éloignant de la surface sur une distance appelée profondeur de pénétration. Elle est créée à l'interface d'un métal et d'un diélectrique, lorsque la source lumineuse est polarisée TM et qu'une condition de couplage est remplie, liant vecteur d'onde incident et vecteur plasmon. Le couplage est réalisé par un système d'amplification du vecteur incident. Dans le cas de ce projet, il s'agit d'un prisme. L'onde se propage le long de l'interface et se trouve amortie par l'absorption du métal sur une dizaine de microns.

L'onde évanescence est sensible à tout changement d'indice se produisant dans un volume confiné à la surface du métal sur une profondeur d'une centaine de nanomètres. Cette propriété est la base de la détection SPR.

Mise en pratique de la technique SPRI Après cette rapide présentation de l'équation principale régissant l'onde de plasmon de surface propagative, revenons à des considérations

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

expérimentales. Comment la biopuce est-elle préparée ?

D'abord, le film métallique est déposé sur une lame de verre par évaporation. L'or est souvent préféré du fait de sa plus grande stabilité chimique, l'argent ayant besoin d'être passivé par un oxyde (de zinc par exemple) ou une fine couche d'or pour éviter sa dégradation en milieu liquide. L'adhésion entre métal et verre est renforcée par le dépôt d'une fine couche de titane ou de chrome de quelques nanomètres d'épaisseur, également réalisé par évaporation. Toutefois, cette couche d'accroche est très absorbante, elle réduit l'amplitude de la résonance, et par conséquent la sensibilité de la mesure, d'où l'importance de limiter son épaisseur au maximum.

Remarque : Pour éviter la formation d'un film d'air entre la lame de verre et le prisme, engendrant des réflexions parasites, une huile de couplage, d'indice proche de celui du prisme, est appliquée sur le prisme avant de placer la lame par-dessus. Il existe des prismes directement recouverts d'or qui permettent de s'affranchir de cette manipulation pouvant générer des bulles d'air dans l'huile, et perturber l'image.

Le transducteur doit ensuite être fonctionnalisé. Il existe une grande variété d'assemblages chimiques permettant de fixer des molécules sondes sur une surface [Scarano 2010, Wijaya 2011]. Parmi ces différentes possibilités, les configurations les plus courantes sont édifiées à partir de polymères conducteurs (polypyrroles), de Dextran, constituant une matrice 3D de molécules de glucose, ou de groupes hétéro-bifonctionnels, c'est-à-dire des molécules disposant de terminaisons chimiques différentes à chaque extrémité. C'est ce dernier cas qui a été utilisé durant le projet et qui est détaillé dans la suite.

Les chimies de surface hétéro-bifonctionnelles ont une structure de base commune schématisée en figure 1.6. Elle se décline en un groupement d'accroche qui se lie spécifiquement au substrat de façon stable et souvent irréversible. Il s'agit par exemple des thiols sur l'or ou des silanes sur le verre. Une chaîne carbonée, d'alkyle ou d'oligo(éthylène glycol) (OEG), a pour rôle d'éloigner les sondes de la surface du substrat afin de leur donner une structure plus rigide et une directionnalité rendant leur site de reconnaissance accessible aux cibles. La dernière strate comprend le groupe fonctionnel qui sert d'intermédiaire entre la sonde et la chimie structurante. Il peut par exemple s'agir de biotine, d'amine ou de groupe carboxyle. L'acide carboxylique COOH nécessite une activation par NHS (N-hydroxysuccinimide) et EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) qui lui donne la faculté de réagir avec des amines.

Une fonctionnalisation particulièrement appréciée pour ses performances et sa facilité de mise en oeuvre consiste en l'auto-assemblage de monocouches (SAM pour Self-Assembled Monolayers) [Palazon 2014]. Des chaînes en solution composées de l'ensemble des trois briques présentées en figure 1.6 sont mises en contact avec le substrat par phénomène de diffusion. Elles s'adsorbent à la surface du film grâce au groupement de fixation et des interactions de Van Der Waals entrent en jeu entre les brins se retrouvant à proximité les uns des autres. Ces interactions participent à la formation d'une couche chimique dense, homogène et bien ordonnée.

Cette chimie auto-assemblée peut être mixte dans le sens où un mélange de deux chaînes différentes mises en solution simultanément est déposé sur le substrat. Par exemple, il est possible de combiner groupements carboxyle et méthyle, ce dernier servant à désencombrer les groupements actifs de façon à les rendre plus accessibles.

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

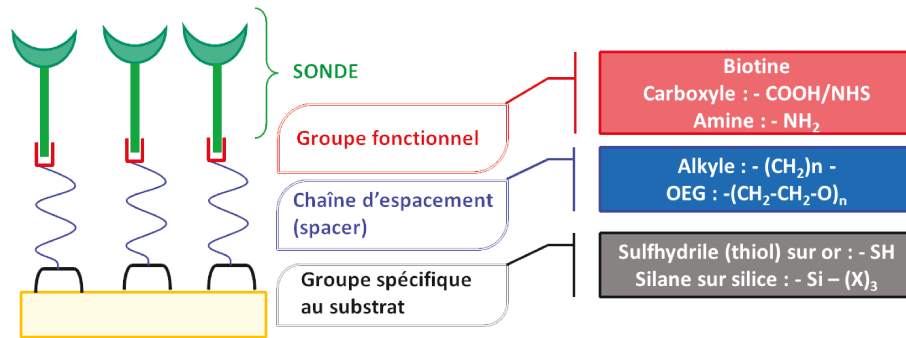


FIGURE 1.6 – Détail de la composition d'une fonctionnalisation de surface servant à fixer les molécules sondes sur le transducteur.

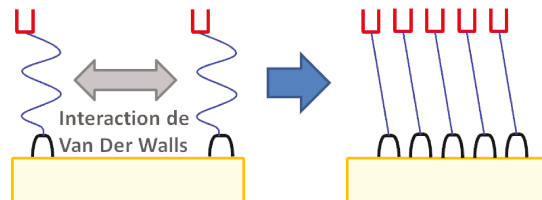


FIGURE 1.7 – Formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) grâce aux interactions de Van Der Walls.

L'article de J.Spavecchia [Spavecchia 2009] donne un exemple d'un protocole de fonctionnalisation optimisé pour l'immobilisation d'oligonucléotides. C'est ce type de chimie de surface qui est couramment mis en oeuvre au Laboratoire Charles Fabry (LCF) pour la préparation de biopuces ADN. Pour résumer les principales étapes de cette procédure, schématisées en figure 1.8, une SAM est d'abord initiée pour former une liaison covalente avec l'or à base d'une courte chaîne de cystéamine, autrement appelée β -mercaptoéthylamine. L'espaceur, ajouté à l'extrémité de la chaîne cystéamine, est un phénylene diisothiocyanate (PDC). Ensuite, une neutravidine est fixée à l'extrémité du PDC pour sa grande affinité avec la biotine, greffée sur l'ADN sonde qui va être immobilisé.

Toutes ces étapes sont assemblées dans une recette chimique faisant intervenir différents protocoles de nettoyage, divers solvants, des temps de réaction précis, ou encore des concentrations en espèces réactives mises au point et optimisées par expérience après plusieurs tests. En effet, les conditions de pH et de force ionique équilibrant les interactions électrostatiques ont un impact crucial sur les performances d'homogénéité, de spécificité ou de régénération d'une fonctionnalisation. La régénération désigne l'action de rupture de la liaison entre sonde et cible après interaction qui permet de libérer les sondes pour une nouvelle utilisation.

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

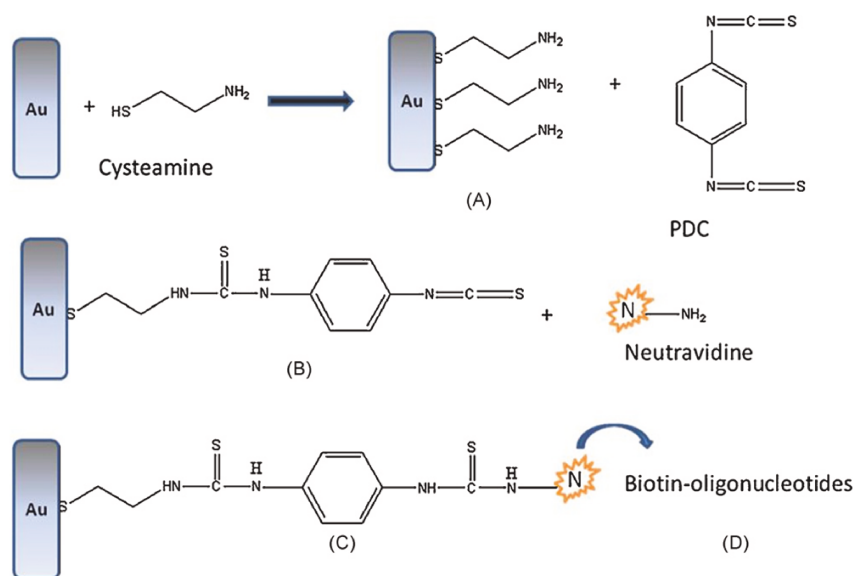


FIGURE 1.8 – Schéma de l'article de J.Spadavecchia [Spadavecchia 2009] décrivant la fonctionnalisation à base de cystéamine.

Désormais la surface du film est recouverte d'une chimie prête à accueillir les molécules sondes. Un des principaux atouts de la SPRI est sa capacité de haut débit de mesure. Comment parvenir à observer une centaine d'interactions en parallèle sur une même biopuce ?

Le haut débit est assuré par l'étape d'**immobilisation** réalisée à l'aide d'un instrument spécifique. Ce système permet de déposer sur le substrat fonctionnalisé des gouttes de solution contenant les molécules sondes en un réseau matriciel défini par l'utilisateur (10 colonnes par 10 lignes par exemple), comme cela peut être observé sur la photographie d'une biopuce en figure 1.9d). Il existe plusieurs technologies d'immobilisation : par contact avec une pointe, visible sur la photographie 1.9a) qui prélève par capillarité la solution dans des micro-puits, par "jet d'encre" grâce à un système piézoélectrique qui fait vibrer une pointe sur laquelle la solution est déposée, ou encore par flux continu, qui consiste en l'application d'un réseau de micro-tubes sur le substrat relié à des micro-puits. Dans ce dernier procédé, une pompe assure un va-et-vient de la solution du puits au substrat de façon à greffer uniformément les sondes, dont le principe est schématisé en figure 1.9b) à l'échelle d'un micro-tube. Chaque goutte déposée sur le substrat va s'étaler pour donner un plot biologique circulaire d'un diamètre de l'ordre de la centaine de micromètres, comme illustré en figure 1.9c) et d).

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

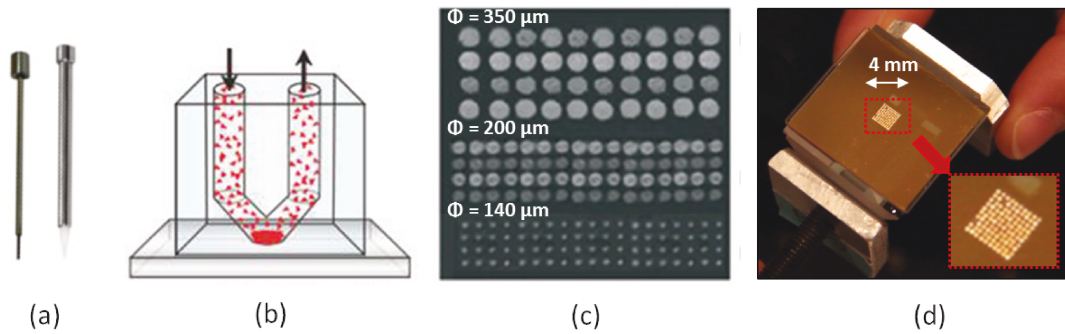


FIGURE 1.9 – Illustration du procédé d'immobilisation : (a) Photographie de différents types de pointes prélevant la solution de sondes dans des micropuits et déposant des gouttes par contact ou injection - (b) Schéma de principe de l'impression de plots biologiques par flux continu - (c) Exemple de résultats de matrices de plots biologiques de différents diamètres - (d) Biopuce déposée sur prisme prête à être positionnée sur le banc de mesure SPRI.

Une fois l'immobilisation des sondes réalisée, la surface non recouverte de sondes est rendue inactive par le dépôt d'une molécule dite de **passivation**. Par exemple, l'éthanolamine permet de désactiver les groupes fonctionnels COOH libres [Subramanian 2006].

Pour finir, l'espace libre entre les chaînes fixées sur l'or est comblé par une petite molécule, souvent l'albumine de sérum bovin (BSA) [Lahav 2004] ou des chaînes PEG [Uchida 2005], afin de bloquer complètement les sites d'interactions non spécifiques.

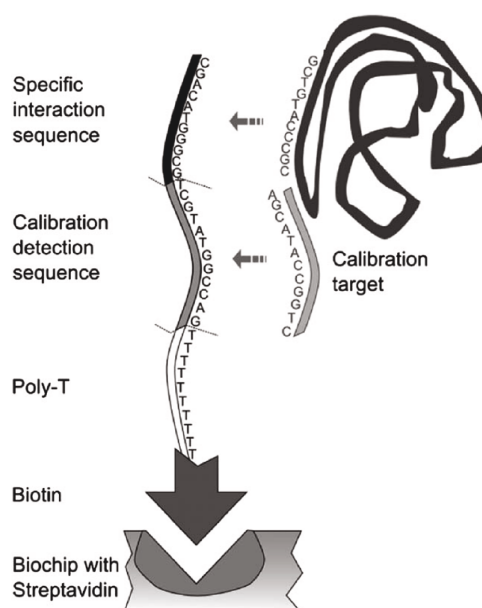
Ainsi, les cibles viendront se fixer préférentiellement sur les sondes, seuls sites actifs restants si la passivation et le **blocage** jouent bien leur rôle. La biopuce est ainsi prête à être utilisée sur un banc de mesure SPRI.

A l'issue de l'étape d'immobilisation, le taux de recouvrement en sondes immobilisées est variable d'un plot à l'autre en raison de l'uniformité relative de la chimie de surface. Lorsque cela est possible, une méthode de **calibration** est appliquée afin d'étalonner la réponse de chaque plot sonde.

Une telle calibration est aisément réalisée pour des sondes ADN mais ne peut être mise en œuvre sur une interaction à base d'anticorps. Il s'agit d'ajouter à la sonde ADN une séquence dite de calibration représentée en figure 1.10. En début d'expérience, la cible complémentaire de calibration est injectée à une concentration donnée, ce qui permet de déterminer un coefficient de calibration de la réponse de chaque plot biologique qui va homogénéiser les signaux des plots à la valeur moyenne mesurée lors de cette calibration. Le signal obtenu sur chaque plot lors de l'interaction d'intérêt sera ainsi corrigé par ce coefficient [Hottin 2012].

Un exemple de résultats d'une expérience de SPRI est illustré en figure 1.11. Dans cet exemple, une interrogation en intensité est mise en œuvre, c'est-à-dire que les variations de réflectivité du faisceau réfléchi par le transducteur sont analysées.

L'image des plots biologiques présentée est obtenue par soustraction des images avant et après une interaction entre deux séquences complémentaires d'ADN. Un signal de l'ordre de



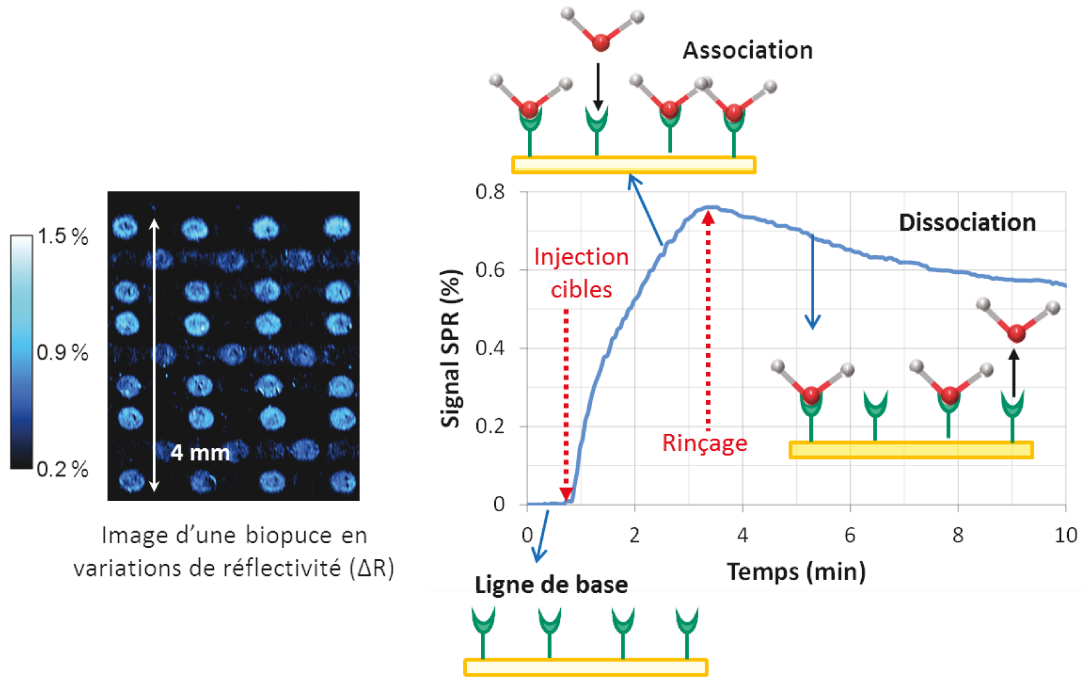
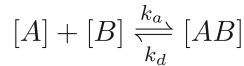


FIGURE 1.11 – Exemple de résultats d’une expérience de SPRI : à gauche, une image de variation de réflectivité après interaction entre deux brins complémentaires d’ADN (cible à la concentration de 0,2 μM), à droite, une courbe de cinétique montrant l’évolution temporelle de l’interaction entre la protéine MnSOD à la concentration de 1 μM et un aptamère.



Lorsque la cible B est apportée de façon continue au voisinage des sondes A, l’événement d’**association** est prédominant : les cibles s’apparient en plus grande quantité qu’elles ne se dissocient des sondes. Par conséquent, le signal SPR augmente (l’indice de réfraction augmente avec la proportion de cibles capturées). La surface s’appauvrit en sites récepteurs au fur et à mesure de la phase d’association, ce qui explique la diminution de pente de la courbe de cinétique dans le temps.

Lorsque le temps d’injection en cibles est suffisamment long, un régime d’**équilibre** s’établit : il y a autant d’événements d’association que de dissociation. Le signal SPR devient constant. Sur le graphe présenté dans le cas de la détection étudiée, le temps d’interaction est trop court pour atteindre un équilibre. Lorsque la totalité des sondes est occupée, la surface est **saturée**.

Un rinçage est effectué après l’interaction. Il n’y a plus d’apport en cibles, ce qui induit la **dissociation** des cibles capturées. Ces cibles libérées peuvent interagir avec d’autres sondes accessibles, avant d’être éjectées vers la fluide de sortie. Sur la cinétique présentée, la phase de dissociation est moins rapide que l’association car le taux de dissociation de ce couple est plus faible que le taux d’association.

La **constante d’affinité** K_A est définie comme le rapport k_a/k_d . L’inverse de K_A est nommé **constante de dissociation**, K_D . Ces constantes sont propres au couple sonde/cible analysé.

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

Par exemple, l'affinité entre deux séquences d'ADN complémentaires est très forte, l'étape de dissociation n'est pas visible, la constante de dissociation étant de l'ordre de 10 nanomolaires (nM) pour une hybridation ADN.

Il existe deux méthodes pour déterminer les constantes de cinétique d'une interaction. La première est réalisée à l'équilibre thermodynamique pour différentes concentrations de cibles injectées, jusqu'à atteindre la saturation des sondes (méthode de Langmuir). Une quantité importante de molécules cibles va donc être consommée (car pour atteindre l'équilibre, l'interaction doit avoir lieu pendant un temps assez long). La seconde stratégie de calcul des constantes de cinétique repose sur une analyse dynamique. Plusieurs interactions sont aussi réalisées avec différentes concentrations de cibles, mais cette méthode ne nécessite pas d'attendre l'équilibre. La deuxième démarche est souvent préférée car elle est moins fastidieuse et permet d'économiser les produits biologiques.

Le thèse d'Emmanuel Maillart donne plus de précisions au sujet du calcul des constantes de cinétique [Maillart 2004a].

L'atout majeur de la mesure SPR est son aspect quantitatif. Le signal SPR est proportionnel à la concentration en sondes déposées et en cibles injectées, comme cela est démontré sur une expérience ADN /ADN réalisée à trois concentrations de sondes différentes (1,25 / 2,5 / 5 μM), dont les courbes de cinétiques sont présentées en figure 1.12. Lorsque la concentration passe de 1,25 μM à 2,5 μM , le signal SPR est doublé. On peut remarquer qu'au-delà d'une certaine concentration de sondes (déjà visible pour 5 μM), le signal sature car le taux de recouvrement maximal de la surface du capteur est atteint.

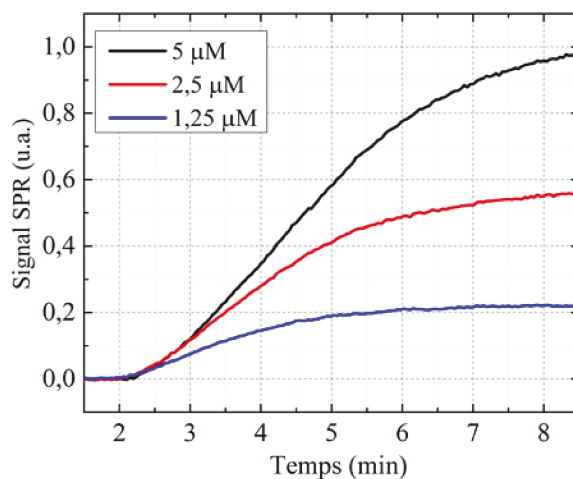


FIGURE 1.12 – Illustration de la quantification du signal SPR par rapport à la concentration en molécules sondes sur le cas d'une interaction ADN.

Le processus de reconnaissance biologique a lieu dans une couche d'épaisseur très petite, de la taille du complexe sonde/cible formé, de l'ordre de la dizaine de nanomètres, au-dessus du film métallique. La dimension de cette couche représente une proportion très faible du volume

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

de sensibilité de l'onde évanescente, qui s'étend sur une centaine de nanomètres dans le milieu biologique. Cela signifie que l'onde plasmon est sensible à toute variation d'indice ayant lieu dans le volume délimité par sa profondeur de pénétration. Ainsi, la moindre perturbation, de température ou d'inhomogénéité d'indice de la solution par exemple, sera aussi mesurée. C'est pourquoi une régulation précise de la température est primordiale dans les systèmes de SPR.

Pour s'affranchir de ces perturbations et obtenir un meilleur rapport signal à bruit, chimie de surface et profondeur de pénétration doivent être optimisées conjointement de façon à ce que le volume d'interaction occupe le plus possible le volume de l'onde évanescente.

D'une part, il est possible de jouer sur la taille de la chimie de surface. Par exemple, une fonctionnalisation à base d'une matrice Dextran, appelé aussi hydrogel, permet de créer un réseau 3D de sondes réparties sur une centaine de nanomètres (figure 1.13.a). Le nombre de molécules cibles capturé par unité de volume sera donc plus important que pour une chimie classique, donnant une sensibilité de mesure plus grande. La densité du réseau de sondes créé peut être adaptée, ainsi que sa taille, variant entre 30 nm et 1000 nm. Cette stratégie de fonctionnalisation est particulièrement intéressante pour la détection de petites molécules.

D'autre part, la profondeur de pénétration de l'onde peut être réduite par confinement du champ à la surface du capteur (figure 1.13.b). De cette façon, la mesure se concentre au niveau de la fine couche d'intérêt dans laquelle se déroule l'interaction biologique. A cet effet, l'ajout de nanoparticules à la surface du film métallique remplit cette fonction de confinement de l'onde. Cette solution d'amélioration de la sensibilité du capteur SPR a été sélectionnée dans le cadre du projet et est traitée dans la partie 3.1.

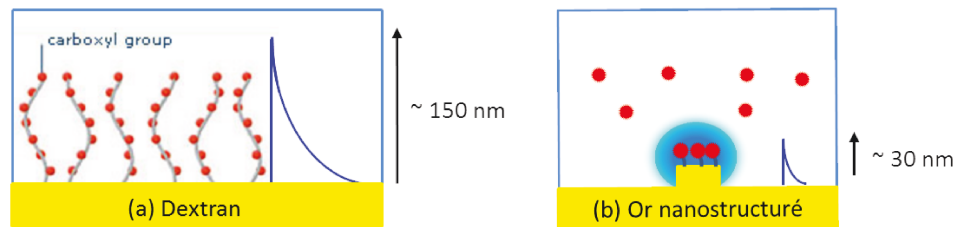


FIGURE 1.13 – Méthodes d'adaptation du volume d'interaction au volume de pénétration de l'onde évanescente : (a) à l'aide d'une fonctionnalisation Dextran en 3D (schéma tiré du site Biacore), (b) par confinement de l'onde autour de nanostructures.

1.1.2 Interrogation spectrale VS interrogation en intensité

Il a été évoqué lors de l'exposition de différentes méthodes d'interrogation de la résonance que la dynamique de mesure de la méthode de suivi par variation d'intensité est plus limitée que celle d'un suivi spectral ou angulaire. Le suivi de la position de la résonance présente aussi l'avantage d'améliorer l'homogénéité spatiale de la mesure. Ce paragraphe approfondit cette discussion en comparant interrogation en réflectivité et interrogation spectrale. L'étude est valide en ce qui concerne l'interrogation angulaire, mais le suivi spectral est privilégié car une source multi-spectrale a été développée par Alexandra Sereda au cours de sa thèse CIFRE [Sereda 2014a], réalisée en partenariat entre le laboratoire Charles Fabry et Horiba. Elle a mesuré le signal SPR

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

en fonction de variations d'indice croissantes. Les résultats montrent que la réponse du capteur est linéaire (avec une tolérance de 5%) en mode de suivi spectral jusqu'à une variation d'indice de réfraction de 10^{-2} , en utilisant une source délivrant 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm. En revanche, en terme de variation de réflectivité, le signal est proportionnel à la variation d'indice sur une plage de 10^{-3} RIU seulement.

La perte de linéarité du signal en variation de réflectivité est illustrée en figure 1.14 par des profils de réflectivité en fonction de la longueur d'onde calculés pour un film de 50 nm d'or à trois indices de réfraction : n , $n+0,4 \cdot 10^{-2}$ et $n+10^{-2}$. Le trait vertical en pointillés rouge spécifie le point de fonctionnement donnant la meilleure sensibilité de mesure en variation de réflectivité. Pour simplifier le raisonnement, il est souvent expliqué que ce point est choisi au niveau de la pente maximale de la courbe à l'indice n . Or, en pratique, le point de fonctionnement optimal est positionné à l'extrémité de la zone de linéarité de la courbe de résonance à l'indice n , modélisée par le trait plein rouge, plus près du minimum de réflectivité, et non au point où la pente est la plus importante. En effet, lors de la mesure d'une variation d'indice positive, la résonance spectrale se décale vers des longueurs plus grandes. Il est donc judicieux d'anticiper ce résultat en se plaçant au début de la zone de linéarité, au niveau du trait en pointillés rouges.

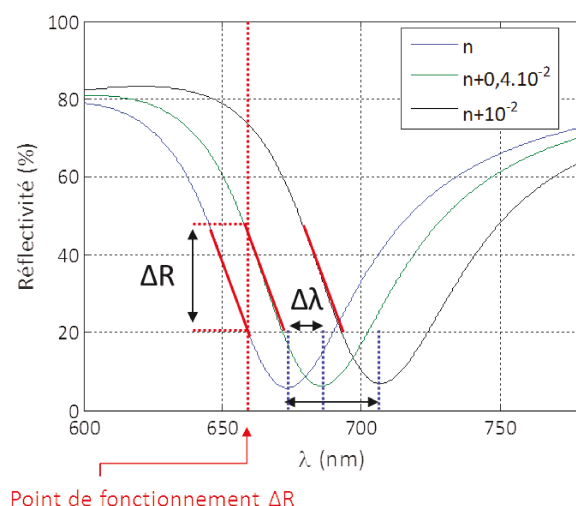


FIGURE 1.14 – Représentation de la dynamique de mesure par le tracé de profils spectraux de résonance à n , $n+0,4 \cdot 10^{-2}$ et $n+10^{-2}$.

Le profil de résonance à l'indice $n+0,4 \cdot 10^{-2}$ se décale de sorte que le point mesuré sur la courbe verte se retrouve à l'autre extrémité de la zone de linéarité. Au-delà de cette valeur, le signal ΔR n'est plus proportionnel à la variation d'indice, il est amorti. La dynamique de mesure en interrogation en intensité est donc de l'ordre de $0,4 \cdot 10^{-2}$.

La courbe noire, à l'indice $n+10^{-2}$, donne un point de mesure très éloigné de la zone de linéarité rouge. Lorsque l'indice est encore augmenté, le signal ΔR mesuré va stagner puisque le point de fonctionnement choisi sonde le plateau du profil de résonance.

A l'inverse, le signal $\Delta \lambda$ ne subit pas de saturation, le décalage du minimum étant tou-

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

jours proportionnel à la variation d'indice. La dynamique de mesure est limitée par la plage de longueurs d'onde choisie. Le minimum de réflectivité doit être inclus dans l'intervalle spectral utilisé lors de la mesure. Par exemple, sur la figure 1.14, si la plage de longueurs d'onde disponible s'étend de 660 nm à 710 nm, il ne sera pas possible de mesurer une variation d'indice supérieure à 10^{-2} RIU puisque dans ce cas, la résonance a lieu à la longueur d'onde maximale de la plage spectrale (710 nm). L'intervalle spectral de mesure ne peut pas être augmenté indéfiniment puisque le nombre de longueurs d'onde balayées détermine le temps d'acquisition. Un compromis est à trouver entre dynamique et résolution temporelle en ce qui concerne le choix de la plage spectrale.

Outre sa dynamique de mesure restreinte, la seconde limite d'une mesure en variation de réflectivité porte sur le choix d'un couple de longueur d'onde et d'angle (λ_0, θ_0) unique, appliqué à l'ensemble de la biopuce. Or, des conditions de résonance différentes co-existent sur la biopuce. Elles sont dues à des inhomogénéités d'illumination, du dépôt d'or, de la chimie de surface et surtout de densité ou de taille des molécules sondes déposées. Cela se traduit par des profils de résonance mesurés en fonction de l'angle (ou de la longueur d'onde) différents d'un plot à l'autre de la biopuce. Cette non uniformité spatiale de l'excitation de la résonance est illustrée en figure 1.15. Le profil de résonance est mesuré en fonction de l'angle d'incidence à la longueur d'onde de 760 nm sur 64 ROI d'un substrat d'or d'épaisseur 50 nm dans l'eau, sans chimie de surface. L'angle de résonance n'est pas unique, il varie de $\theta_{R,max} - \theta_{R,min} = 0,2^\circ$ entre différents points de la puce.

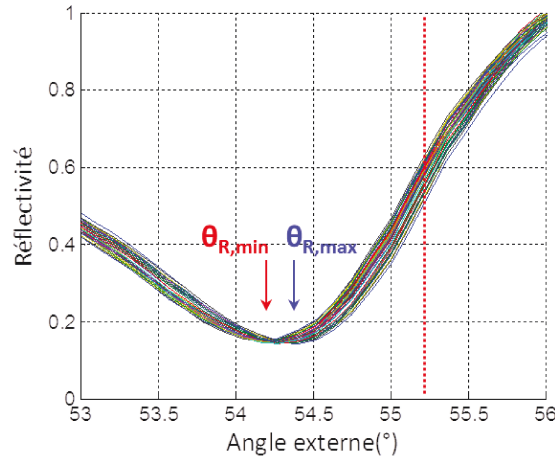


FIGURE 1.15 – Profils de résonance mesurés en fonction de l'angle d'incidence à la longueur d'onde de 760 nm sur 64 ROI de la puce. Les angles de résonance minimal et maximal obtenus sur l'ensemble des ROI sont repérés.

Ainsi, dans le cas d'une mesure de variation de réflectivité, les profils de résonance étant dispersés, l'angle choisi, représenté en pointillés rouges sur la figure 1.15, ne pourra se trouver au point de fonctionnement optimal tel que présenté ci-avant pour toutes les ROI. La sensibilité de la mesure, proportionnelle à la dérivée de la résonance au point de fonctionnement choisi, ne

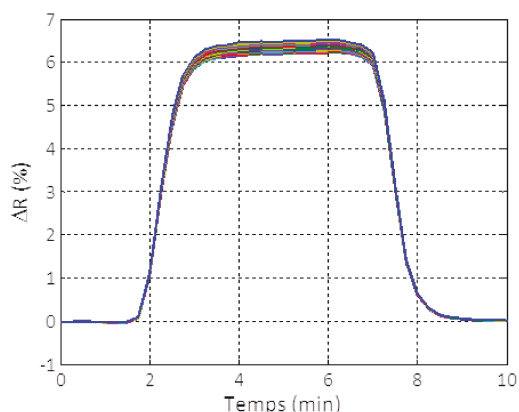
Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

sera donc pas la même sur l'ensemble des ROI. Autrement dit, une perturbation sensée être la même partout donne des signaux différents à cause de cette dispersion de sensibilité.

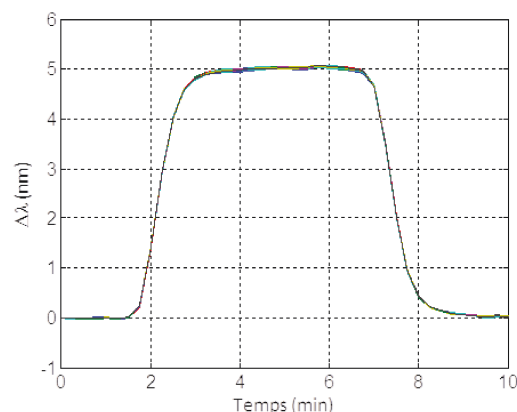
Pour illustrer cette dispersion spatiale des signaux sur une mesure de suivi en réflectivité, un changement d'indice de réfraction égal à 10^{-3} RIU produit par injection d'une solution de sucrose a été mesuré sur un banc SPRI du laboratoire Charles Fabry. Les résultats sont présentés en figure 1.16a. La valeur moyenne du saut d'indice en réflectivité est mesurée à 6,1 % et la dispersion des mesures, égale à l'écart-type sur l'ensemble des 64 points de mesure définis, vaut 0,17 %, soit une variation relative de 3%.

L'avantage de la mesure par suivi de la position spectrale de la résonance est d'être relative, peu importe la position initiale de la résonance sur chaque ROI (dans la mesure où le décalage de la résonance d'une ROI à l'autre reste compris dans la plage de la dynamique de la mesure). Le signal mesuré est ainsi le même sur l'ensemble des ROI. La sensibilité de la mesure ne dépend plus des variations spatiales des conditions de résonance.

La figure 1.16b permet d'observer la réduction de la dispersion des signaux en comparaison avec une mesure en interrogation d'intensité sur une même variation d'indice appliquée à la surface de la même biopuce. Le décalage spectral moyen de la résonance suite à la variation d'indice de 10^{-3} RIU vaut 5,02 nm, avec un écart-type mesuré sur l'ensemble des régions analysées de 0,015 nm. La dispersion relative de la mesure diminue à 0,3 % au lieu des 3% obtenus par interrogation en intensité.



(a) Mesure en variation de réflectivité.



(b) Mesure par suivi de la position de la résonance.

FIGURE 1.16 – Comparaison de l'interrogation en intensité et de l'interrogation spectrale en terme de dispersion de la mesure sur le cas d'une variation d'indice de 10^{-3} RIU.

Une amélioration de l'homogénéité spatiale du signal d'un ordre de grandeur est atteinte dans le cas d'une mesure d'un changement d'indice sur une puce non fonctionnalisée par suivi de la position spectrale de la résonance en comparaison avec une mesure par variation de réflectivité. En effet, une mesure relative ne tient pas compte de l'existence de multiples conditions de résonance sur l'ensemble de la puce.

Cet exemple considère un substrat sans fonctionnalisation. Dans le cas d'une biopuce com-

plète (chimie de surface et molécules sondes déposées), la variation spatiale des conditions de résonance peut être bien plus importante. En particulier, lors d'une expérience avec plusieurs interactions portées par la même biopuce, des sondes de natures différentes sont immobilisées à la surface du capteur. De plus, au sein d'une même famille de sondes, des concentrations de dépôt différentes peuvent aussi être testées. Par conséquent, l'indice local sur l'ensemble de ces plots biologiques est très variable, impliquant une grande variété de conditions de résonance. Une mesure par interrogation spectrale ou angulaire est alors plus adaptée.

Il existe tout de même des stratégies pour s'affranchir de la dispersion du signal en mesure par variation de réflectivité. Il a été expliqué plus tôt (page 18) comment calibrer le taux de recouvrement en sondes grâce à une séquence de calibration lors d'une interaction ADN. Cet étalonnage prend également en compte les inhomogénéités spatiales de résonance dues aux choix du point de fonctionnement, aux défauts d'illumination ou encore aux perturbations fluidiques impliquant un apport en cibles variable dans la cellule. La sensibilité en chaque ROI est ainsi calibrée.

En outre, un test préliminaire d'injection d'une solution générant une variation d'indice donnée (à base de sucrose par exemple) peut également être effectué en début d'expérience pour contrôler le fonctionnement du système fluide et le réglage du banc de mesure. Cette vérification initiale est particulièrement utile lors du développement d'un banc de mesure pour pouvoir décorrélérer les différentes contributions induisant une diminution de sensibilité de la détection.

Cette confrontation entre interrogation spectrale et interrogation en réflectivité souligne les avantages d'un suivi de la longueur d'onde de résonance et permet de justifier le choix du suivi de la position de la résonance comme mode de mesure sur le prototype instrumental présenté en Chapitre 2. La dynamique de mesure est ainsi plus grande (d'au moins un ordre de grandeur, dépendant de la taille de la plage spectrale choisie), et les signaux moins dispersés du fait du caractère relatif de la mesure par interrogation spectrale.

1.1.3 Limites de la mesure SPRI

Il est couramment reporté dans la littérature une résolution de l'ordre de 10^{-7} RIU des systèmes actuels de SPRI, quel que soit le mode d'interrogation choisi. Or, ces performances étaient déjà quasiment atteintes il y a trente ans par Liedberg [Liedberg 1983] avec un des premiers systèmes SPR par balayage angulaire. Il écrit à ce sujet qu'un changement d'indice de 10^{-5} RIU est facilement détecté par son appareil, signifiant qu'une résolution proche de 10^{-6} ou 10^{-7} RIU caractérise son système SPRI. Pourquoi aucune amélioration significative de la mesure n'a été obtenue jusqu'à nos jours ?

Les limites de détection par SPRI sont doubles : d'une part, la variation d'indice minimale détectable dans un cas idéal est fixée par le bruit intrinsèque de l'instrument, imposé par une limitation physique fondamentale, à savoir le bruit de photons. D'autre part, lorsque l'on cherche à détecter des molécules cibles à très faible concentration, une autre limitation intervient, liée

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

à la fonctionnalisation du substrat [Piliarik 2009a]. Des signaux non spécifiques engendrent un bruit de fond sur la mesure, diminuant le rapport signal à bruit et par conséquent dégradant la limite de détection du système.

Le **bruit de photons** se traduit par un bruit en intensité sur les images acquises par la caméra. Il est égal à la racine carrée du nombre d'électrons mesuré sur le capteur. Pour un capteur accueillant au maximum 18 000 électrons par pixel par exemple, et sachant que la réflectivité mesurée est proche de 30% au voisinage de la résonance, le bruit de photons est de l'ordre de 1,2%, sur un pixel et une image acquise. Sachant que les variations de réflectivité d'une expérience courante de SPRI, par exemple une interaction ADN/ADN, sont de l'ordre du %, ce bruit est très restrictif. Il est possible de diminuer le bruit de photons par la moyenne de plusieurs images et pixels car il évolue comme l'inverse de la racine du nombre d'images et de pixels moyennés. Dans des conditions standards de mesure, avec 8 images accumulées et une centaine de pixels moyennés, le bruit est ramené à 0,05% environ.

Au-delà de ce bruit physique, la seconde limite majeure des systèmes de SPRI est imposée par la **non spécificité** de la mesure. La sélectivité de ce type de capteur repose sur la performance de l'élément de reconnaissance moléculaire couplée à celle de la chimie de surface servant à immobiliser ces sondes à la surface du détecteur.

Le degré de sélectivité et d'efficacité d'un couple de molécules sonde/cible est très variable en fonction de la force de la liaison qui les unit, du nombre de sites de reconnaissance de la sonde, de la spécificité de ces sites à la cible, et de leur accessibilité. Cette dernière propriété dépend beaucoup de la structure de la chimie de surface qui positionne ces sondes à la surface du transducteur [Peluso 2003]. Par exemple, la chimie dextran [Wijaya 2011] est particulièrement efficace sur ce plan du fait de la grande flexibilité qu'elle confère aux sondes immobilisées.

Outre son rôle dans la disponibilité des sondes, la fonctionnalisation détermine également la quantité de signaux non spécifiques, dont l'origine est multiple.

Premièrement, comme cela a été expliqué plus haut, une étape de passivation est réalisée pour rendre inactives les zones dépourvues de molécules sondes. Les espaces restants entre les sondes sont comblés par une autre molécule neutre, pour faire en sorte que les cibles se fixent uniquement sur les récepteurs complémentaires. Si cette fonction est mal assurée, les cibles se déposent de façon aléatoire sur l'ensemble de la surface du capteur, et celles n'ayant pas interagi avec les sondes ne participent pas au signal, elles sont perdues (situation illustrée en schéma 1.17b, en comparaison avec le cas d'une détection spécifique, schéma 1.17a). Pire, ces signaux parasites dégradent le rapport signal à bruit, et donc les performances de détection de la mesure.

L'importance de la qualité de la chimie de surface est illustrée en figure 1.17.

1.1. L'imagerie par résonance des plasmons de surface

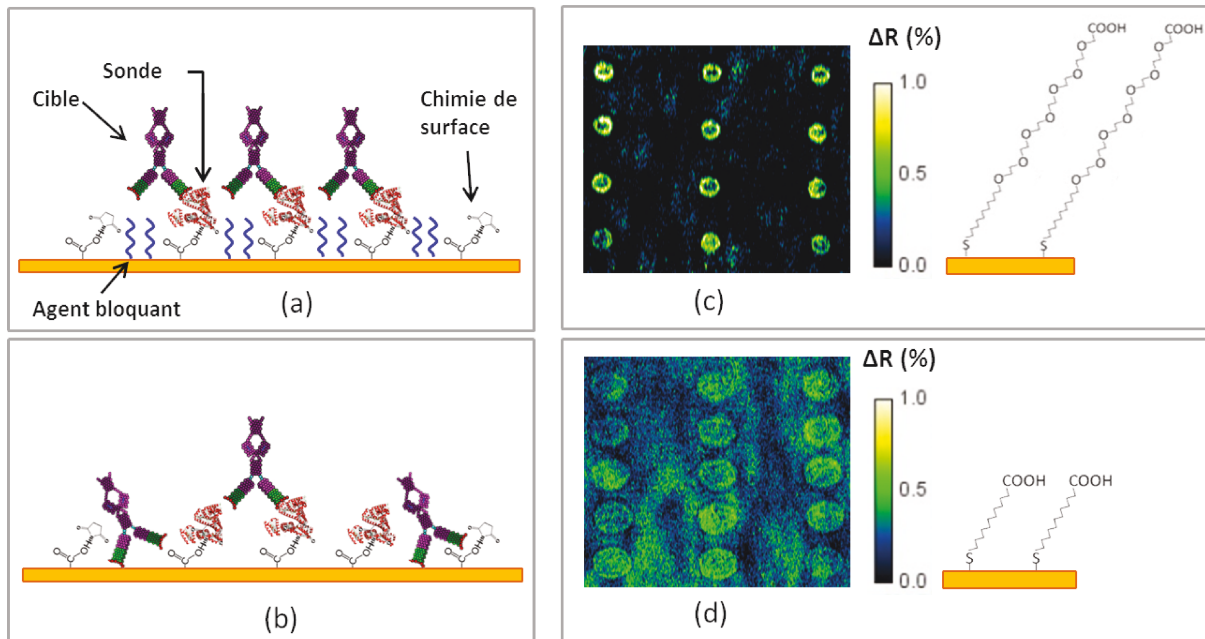


FIGURE 1.17 – Illustration du problème de non spécificité : (a) Schéma d’une interaction spécifique avec agent de blocage, (b) interaction non spécifique, sans blocage. Des images de variations de réflectivité suite à une interaction ADN sont acquises pour deux lames de chimies différentes : (c) EG₆COOH et (d) (CH₂)₁₀COOH.

Deux fonctionnalisations différentes sont comparées sur les images de variation de réflectivité (c) et (d) provenant d’une interaction ADN avec une cible concentrée à 0,2 μM . L’image (c) concerne une chimie EG₆COOH et l’image (b) une chimie (CH₂)₁₀COOH. Un blocage à la BSA est réalisé sur les deux lames. Toutefois, la lame (c) délivre un signal SPR plus important que la lame (d), avec moins de signaux non spécifiques en dehors des plots. Cela signifie que le blocage à la BSA est moins efficace sur la lame (d). Par suite, une partie des cibles s’accroche en dehors des plots sondes, diminuant la prise sur les plots eux-mêmes, et dégradant le rapport signal à bruit.

En outre, en présence d’une solution complexe d’analyse telle que le sang, de nombreuses espèces moléculaires cohabitent avec les molécules ciblées par l’expérience. Si la barrière de protection formée par le blocage de la chimie de surface n’est pas assez puissante, des espèces non désirées viennent polluer la mesure en se fixant partout, à la fois sur les sondes et autour, ce qui génère des signaux parasites.

L’optimisation du blocage de la surface est donc primordiale. Il est possible de diminuer les signaux parasites grâce à des chimies de surface hydrophiles à base de Dextran [Lofàs 1990, Wijaya 2011]. L’adsorption non spécifique peut également être réduite par une fonctionnalisation à base d’une mono-couche auto-assemblée de deux espèces chimiques différentes. Par exemple, des chaînes thiolées à terminaison amine (NH₂) accueillant les molécules sondes après une étape d’activation sont mélangées à des chaînes thiolées à terminaison hydroxyle (OH), qui servent à combler l’espace entre les chaînes actives en bloquant la surface [Li 2005]. Cette chimie a été

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

testée par Yu et al [Yu 2005] pour la détection de l'acide domoïque. Ces travaux ont montré qu'un mélange des deux espèces à la proportion de 50% chacune donnait une meilleure résistance aux espèces parasites extérieures injectées, comme de la BSA. Toutefois, si les sondes sont immobilisées sous forme de matrices de plots isolés, ce qui n'est pas le cas de l'expérience de Yu, il est nécessaire d'ajouter à cette fonctionnalisation une étape d'inactivation des chaînes amine non recouvertes de sondes, notamment avec de l'éthanolamine [Subramanian 2006].

Une autre cause de non spécificité de la mesure provient de l'existence de **réactions croisées**, c'est-à-dire lorsque la sonde peut reconnaître une autre espèce que la cible. Par exemple, un anticorps peut être pourvu de plusieurs sites de reconnaissance différents, les paratopes, chacun reconnaissant un antigène particulier. En présence d'un milieu complexe, des molécules cohabitent avec les cibles en solution peuvent s'associer au paratope de la sonde qui les reconnaît, et venir occuper le site de reconnaissance, empêchant la cible de se fixer en raison de l'encombrement stérique généré. Le signal mesuré ne correspond donc pas à la détection de la cible, la molécule capturée ne peut être identifiée de façon certaine. Pour cette raison, lorsque cela est possible, des anticorps monoclonaux sont choisis comme sonde car ils ne possèdent qu'un type de site.

Un capteur SPRI est doté de nombreux avantages en comparaison à des techniques plus communes de détection moléculaire. Il ne nécessite pas de marquage, ce qui permet une mesure rapide et une interaction plus représentative des conditions existant *in vivo*. Sa capacité d'imagerie en temps réel autorise le suivi de multiples interactions en parallèle et la détermination de leurs constantes d'affinité. La mesure est quantitative puisque le signal est proportionnel à la concentration en molécules capturées.

Les performances de détection des systèmes de SPRI sont pourtant contraintes par le bruit de photons et l'existence d'interactions non spécifiques, ce dernier point étant le plus restrictif. Le seuil de détection est alors de l'ordre du nanoMolaire pour des molécules de poids supérieur à 10 kDa environ, et de l'ordre du microMolaire dans le cas de petites molécules, de poids de la centaine de Da (soit un taux de recouvrement de la surface de l'ordre de 10 pg/mm²).

1.2 Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces

La plupart des molécules d'intérêt pour les domaines médical, environnemental et agro-alimentaire présente un poids moléculaire faible, généralement inférieur à 1000 Da [Shankaran 2007]. De plus, elles sont faiblement concentrées dans les conditions d'analyse réelles. Par exemple, l'ochratoxine, qui intéresse beaucoup la sécurité agro-alimentaire car elle contamine le vin, les céréales ou le café [Duris 2000], est dotée d'un poids moléculaire de 404 Dalton (g/mol), et sa concentration ne doit pas dépasser 2 µg/L, soit 5 nM dans le vin d'après les réglementations européennes fixées depuis 2005. Les méthodes traditionnelles pour la quantification de petites

1.2. Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces

molécules telles que la chromatographie et la spectroscopie nécessitent une préparation longue et compliquée de l'échantillon à analyser, réservée à des techniciens experts. La SPRI représente une alternative attrayante de part ses capacités de mesure en temps réel et à haut débit, et la portabilité de certains systèmes existants [Kim 2007] permet d'envisager des mesures sur site des aliments contaminés.

Les systèmes de SPRI d'architecture standard comme présentée ci-avant ont atteint leurs limites [Piliarik 2009a] en raison de défauts de non spécificité, tant dus aux imperfections de la chimie de surface qu'à la sélectivité relative des molécules sondes. Différentes pistes sont explorées pour améliorer les performances de détection du capteur afin de parvenir à identifier des molécules à l'état de traces. Les voies de perfectionnement reportées dans la suite portent sur la mise au point de systèmes fluidiques délivrant de façon plus efficace l'échantillon en solution vers les éléments récepteurs, la nanostructuration du transducteur et l'amplification du signal par effet de masse ou par effet plasmonique à l'aide de nanostructures. Une modification plus radicale du système permet de renforcer la sélectivité de la mesure par le couplage de la SPRI avec une autre méthode complémentaire de détection, dont la nature peut être diverse comme le montre le panel de combinaisons développées à cet effet : électro-chimie, spectrométrie de masse, spectrométrie Raman, ellipsométrie ou encore fluorescence sont assez naturellement adaptables à un échantillon typique de SPRI.

1.2.1 Amélioration du système fluidique

Un des éléments clé du bio-capteur est le système de micro-fluidique permettant aux molécules cibles présentes dans la solution à analyser d'entrer en contact avec les molécules sondes immobilisées à la surface du transducteur. Il existe deux configurations principales de fluidique : la détection peut être réalisée dans une cuvette, remplie de la solution de cibles qui diffuse jusqu'à atteindre la surface du capteur, ou dans une cellule fluidique autorisant la circulation des solutions.

Le transport des molécules en solution est un phénomène physique complexe qui dépend de nombreux paramètres [Squires 2008]. En **régime diffusif**, le déplacement des molécules est aléatoire et suit une loi temporelle en \sqrt{Dt} , D correspondant à la diffusivité du milieu. Or, la plupart des détecteurs biologiques fonctionnent en **régime convectif**, avec un flux de circulation du fluide imposé. De cette façon, différentes solutions peuvent être injectées successivement sur une même surface fonctionnalisée, donnant une mesure à haut débit, un des principaux attraits de la SPRI. Dans un système à transport convectif, il existe une zone proche de la surface réceptrice où un régime diffusif s'instaure et devient dominant. Il se crée à cet emplacement une région de déplétion, pauvre en espèces cibles, puisque celles-ci se trouvent peu à peu adsorbées à la surface du film fonctionnalisé. La forme et l'épaisseur de cette zone de déplétion dépendent notamment de la géométrie du récepteur et de celle de la cellule fluidique.

Pour décrire complètement la collection des cibles, il faut également tenir compte de l'affinité chimique, qui diffère d'un couple biologique à l'autre en fonction de la valeur des constantes d'association et de dissociation le caractérisant. Lorsque le transport des molécules est suffisamment rapide pour fournir continuellement la zone de déplétion en molécules cibles, c'est alors la réaction chimique elle-même qui limite la collection, en opposition à une expérience limitée par le transport de masse. La circulation du flux doit donc être réglée suivant un compromis

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

entre obtention d'un régime où l'interaction est limitante et consommation raisonnée de produit biologique.

La composition de la solution tampon joue aussi un rôle important : il est possible d'adapter sa concentration ionique en réglant la proportion de sel du milieu de manière à favoriser les interactions électrostatiques en présence. Par exemple, l'ADN étant chargé négativement, une solution tampon salée fournit des ions Na^+ qui vont accélérer l'hybridation entre les deux brins.

Le transport de masse peut être optimisé par différents systèmes. Yoon [Yoon 2006] reporte plusieurs solutions d'amélioration de la circulation des cibles, comme le drainage de la région déficitaire en cibles grâce à un réseau de multiples tuyaux de sortie, ou bien l'apport de solution riche en cibles par différentes entrées positionnées de façon périodique le long de la cellule fluide (voir la figure 1.18).

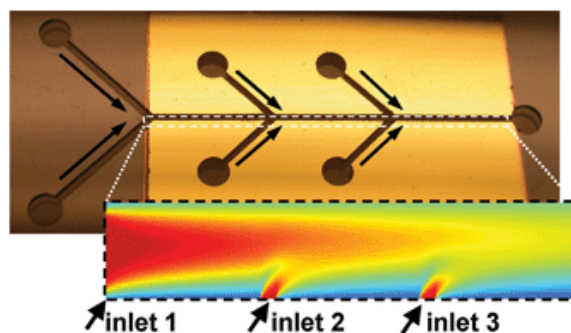


FIGURE 1.18 – Optimisation du transport des cibles par multiples tuyaux d'entrée le long du capteur [Yoon 2006].

Une autre limite du système de fluide concerne la dispersion et le mélange des fluides qui se produit lors de l'injection de la solution cible. Pour éviter cet effet, le trajet de la solution cible pour atteindre la surface sensible doit être le plus court possible. Springer et al [Springer 2010] ont développé un montage de micro-fluidique qui minimise le transport des fluides vers le capteur à un trajet de quelques millimètres seulement. Le temps de réponse est alors diminué par 20 et le signal multiplié par 5 pour de faibles concentration de cibles, de l'ordre du nanoMolaire, en comparaison avec une micro-fluidique conventionnelle. Un gain de plus d'un ordre de grandeur est obtenu en ce qui concerne la limite de détection, égale à 70 pM sur le cas d'une interaction ADN, par rapport à la plupart des instruments SPR appliqués à la détection de courtes séquences d'oligonucléotides, plutôt de l'ordre de 10 nM.

L'utilisation de micro-canaux en PDMS est une autre solution pour réduire le temps de réaction et la consommation d'échantillon à analyser. La limite de détection est de l'ordre du nanomolaire grâce à ce type de micro-fluidique, comme cela est rapporté par Wang [Wang 2007] dans le cas de la détection de l'anticorps IgE, impliqué dans les allergies et l'asthme. Une cellule fluide en PDMS déposée sur le film d'or est utilisée pour cette expérience, composée de 5

1.2. Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces

canaux parallèles de longueur 20 mm et de largeur 200 μm , d'un volume de 0,8 μL . L'effet du transport de masse est amoindri, mais l'analyse est limitée à 5 sondes différentes, du nombre des canaux disponibles.

Ces 5 canaux parallèles représentent un débit de mesure bien moindre en comparaison avec le système fluide développé par Ouellet qui a la capacité de sonder 264 événements moléculaires différents en une seule expérience grâce à la présence d'autant de chambres individuelles contrôlées par des micro-valves nécessitant un volume de 700 pL de solution d'intérêt [Ouellet 2010]. Cet atout de fort rendement est critique pour une application clinique viable et représente une grande avancée par rapport aux instruments commerciaux actuels qui ne peuvent injecter qu'une solution cible à la fois, ce qui allonge considérablement le temps d'analyse lorsque plusieurs analytes doivent être testés lors d'un dépistage médical. Ce système hautement miniaturisé est également fabriqué en PDMS, par superposition de deux couches, l'une comprenant le réseau de micro-canaux, l'autre étant le réseau de commande constitué de micro-valves activées par une micro-pompe. Un autre réseau inséré entre l'entrée du fluide et la chambre d'interaction permet de diluer la solution en 6 concentrations différentes de façon automatique.

Le système de fluide tient un rôle primordial dans le processus de détection et mérite d'être optimisé : il détermine la qualité de la collection des cibles, le volume minimal de solution cible nécessaire, la rapidité de la réaction et le débit de mesure.

1.2.2 Amplification de la masse des molécules cibles

Pour pouvoir détecter de faibles signaux SPR donnés par la capture de petites molécules ou l'analyse de solutions très peu concentrées, il existe différentes manières de décupler le signal. Il est possible d'agir sur l'interaction elle-même pour amplifier le signal en augmentant la masse des espèces à détecter par certains artifices comme la greffe de nanoparticules sur les cibles, la technique sandwich, ou la compétition entre deux cibles.

La technique de la **reconnaissance sandwich** par deux sondes intervenant dans deux étapes d'interactions est couramment mise en œuvre. Un groupe de sondes est préalablement immobilisé à la surface du substrat pour une première interaction avec la solution cible. Dans un second temps, des ligands secondaires libres en solution sont injectés pour une deuxième interaction avec les cibles capturées. De cette façon, la masse de l'espèce détectée est augmentée, égale à la somme des masses de la cible et de la molécule de reconnaissance secondaire. Un schéma de principe du déroulement d'une détection sandwich est présenté en figure 1.19.

Homola et al [Homola 2002] ont obtenu une limite de détection de l'enterotoxine B du staphylocoque dans le lait de 0,5 $\mu\text{g/L}$, soit 18 pM, son poids étant de 28 kDa. En comparaison avec une méthode directe, ils ont gagné un ordre de grandeur sur la sensibilité. Une des deux interactions requises pour accomplir cette méthode peut être directement réalisée en solution en mélangeant les molécules sondes aux cibles. Le complexe résultant subit ensuite une interaction avec les sondes immobilisées sur le transducteur [Pieper-Furst 2005].

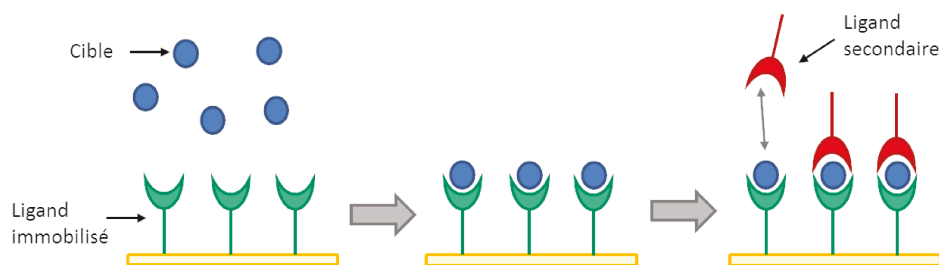


FIGURE 1.19 – Mise en œuvre de la détection par méthode sandwich.

Un marqueur peut être ajouté au ligand secondaire de façon à confirmer les résultats par une mesure complémentaire comme de la fluorescence ou de la spectrométrie Raman (dans ce dernier cas, le marqueur est composé d'une nanoparticule métallique fonctionnalisée par une molécule donnant un fort signal Raman).

Cette méthode de détection sandwich reste pourtant limitée dans le cas de petites molécules. D'abord, la cible doit présenter au moins deux sites de reconnaissance pour que deux molécules puissent se fixer à elle, et ces sites ne doivent pas être trop proches pour rester accessibles sans problème d'encombrement stérique. Par exemple, la molécule de trinitrotoluène (TNT), de poids 227 Da, est tellement petite qu'elle est univalente, c'est-à-dire qu'elle ne possède d'un épitope pour la fixation d'un unique anticorps [Sapsford 2002]. La méthode sandwich n'est donc pas adaptée dans ce cas.

Les performances de détection SPR peuvent également être améliorées par le **greffage de nanoparticules métalliques** aux molécules cibles.

Des particules colloïdales d'or sont fixées sur les molécules cibles par une chimie adaptée. Lorsque l'interaction avec les sondes a lieu, deux phénomènes entrent en jeu. D'une part, la masse effective vue par le capteur est augmentée. D'autre part, il se produit un couplage du champ des nanoparticules d'or et du film d'or. Cela modifie la résonance plasmonique et a pour effet de décaler fortement la résonance, pour obtenir un signal SPR amplifié. L'exaltation du signal peut encore être renforcée par la mise en œuvre d'une interaction sandwich faisant intervenir une seconde molécule de reconnaissance à laquelle une particule d'or a été fixée [Lyon 1998]. Une détection de l'immunoglobine G humaine à la concentration du picomolaire a été atteinte avec cette méthode. Le décalage de la résonance est proportionnel au recouvrement surfacique des particules d'or, et donc au recouvrement en molécules cibles. L'amplification du signal SPR par nanoparticules a aussi été appliquée à l'étude de la fusion et de la digestion de l'ADN à cette même concentration du picomolaire [He 2000]. Les travaux de Pieper-Fürst [Pieper-Furst 2005] ont mis en évidence l'importance de stabiliser les nanoparticules d'or par l'ajout d'une protéine telle que la BSA afin d'éviter leur agrégation pouvant survenir suite à l'interaction électrostatique entre l'or chargé négativement et les ions Na^+ du milieu salin.

L'inconvénient de cette méthode consiste en la préparation reproductible de particules colloïdales ainsi qu'en leur immobilisation chimique sur les biomolécules.

Dans cette même idée d'exaltation du signal par des nanoparticules, des travaux rapportent

1.2. Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces

des limites de détection impressionnantes grâce à une **amplification du signal SPR par des quantum dots (QD)** [Malic 2011, Vance 2014]. Ces quantum dots jouent un rôle double, identique à celui des nanoparticules d'or, dans le sens où ils ajoutent une masse à la molécule cible et introduisent un phénomène de couplage entre l'émission de fluorescence, dont la longueur d'onde dépend de leur taille, et l'onde plasmon. Il est à ce jour difficile de séparer les contributions de ces deux événements sur l'amplification du signal. La propriété de fluorescence des quantum dots facilite également l'implémentation d'une mesure complémentaire par fluorescence, utile pour vérifier l'homogénéité de recouvrement des cibles marquées de quantum dots.

Cette méthode d'amplification a par exemple été testée par Malic et al [Malic 2011] sur une expérience d'hybridation de l'ADN et sur l'interaction entre l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et son anticorps. L'amplification la plus significative du signal SPR est obtenue lorsque la longueur d'onde d'émission du quantum dot est égale à la longueur d'onde de la source. Des travaux théoriques sont en cours pour parvenir à décrire plus précisément les phénomènes électromagnétiques en jeu et à les décorrélés de l'effet de masse qui intervient simultanément.

La limite de détection obtenue pour l'interaction ADN/ADN atteint 100 fM après seulement 8 minutes d'interaction au débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, jusqu'à descendre à 1 fM lorsque l'interaction est suivie pendant 4h, ce qui représente un gain de temps considérable en comparaison à d'autres expériences réalisées précédemment.

En ce qui concerne la reconnaissance de la protéine PSA, trois types de mesures sont réalisées successivement sur le même échantillon : une interaction anticorps/antigène directe, une interaction sandwich avec un second anticorps, et l'ajout final des QD fonctionnalisés. Il est ainsi possible de comparer l'efficacité de ces trois modes de mesure lors d'une même expérience. La plus faible concentration de cible dépistée lors de la méthode directe vaut 500 ng/mL, contre 1 ng/mL pour la méthode sandwich, et 0,1 ng/mL en insérant les quantum dots. Trois ordres de grandeurs sont ainsi gagnés grâce aux quantum dots couplés à une détection sandwich par rapport à une méthode directe. Cette limite de détection améliorée devient intéressante pour détecter la protéine PSA dans des conditions cliniques, c'est-à-dire à la concentration de 2,5 ng/mL dans un sérum partiellement purifié.

Il est encore possible d'améliorer les performances de détection en remplaçant l'anticorps récepteur par un aptamère, une séquence courte d'ADN simple brin [Vance 2014]. La protéine CRP, biomarqueur de l'inflammation, utile au diagnostic du cancer et des maladies cardiovasculaires ou neurologiques, est quantifiée à la concentration de 5 fg/mL, soit 43 AttoMolaire, en sérum humain purifié grâce à l'utilisation d'une fonctionnalisation optimisée par un blocage PEG-SH. L'exaltation de la sensibilité est expliquée par le fait que les aptamères sont plus courts que les anticorps, ce qui rapproche les QD de la surface d'or et décuple le champ électrique. Les signaux non spécifiques dus à la présence d'un grand nombre d'espèces dans le sérum sont limités par l'augmentation de la concentration en sel de la solution.

Des stratégies de détection indirecte se révèlent également efficaces pour la détection de petites molécules (de poids moléculaire inférieur à 1000 g/mol ou Dalton, Da). La détection peut être réalisée par un **test d'inhibition** ou de **compétition**.

L'inhibition consiste à introduire dans la solution contenant les molécules cibles de petite taille une dose de récepteurs libres complémentaires, des anticorps le plus généralement. Après un temps donné d'incubation, la solution est injectée à la surface du capteur SPRI, préalablement

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

fonctionnalisée par les petites molécules d'intérêt. Les récepteurs libres restants en solution viennent alors interagir à la surface du transducteur (voir le schéma 1.20a). Connaissant la quantité de récepteurs initialement injectée dans la solution de cibles, le signal obtenu permet de déterminer le nombre de cibles grâce à cette mesure soustractive [Yu 2005]. Cette technique a été appliquée par Yu et ses collègues sur la quantification de la toxine d'acide domoïque, d'un poids de 310 Da, pouvant s'accumuler dans certains crustacés. Ils ont réussi à mesurer une concentration de 0,1 $\mu\text{g/L}$, ou 0,3 nM, de ce contaminant alimentaire.

Paradoxalement, cette méthode est également intéressante pour l'étude de gros éléments comme les bactéries ou les cellules, dont la dimension est bien supérieure à la profondeur de pénétration de l'onde plasmon. Les bactéries sont incubées avec des anticorps, puis les anticorps libres viennent interagir avec des sondes immobilisées. Wang [Wang 2011] a montré que la limite de détection de colonies de bactéries E.Coli (de poids 10^{12} Da) est améliorée d'un ordre de grandeur par méthode d'inhibition soustractive.

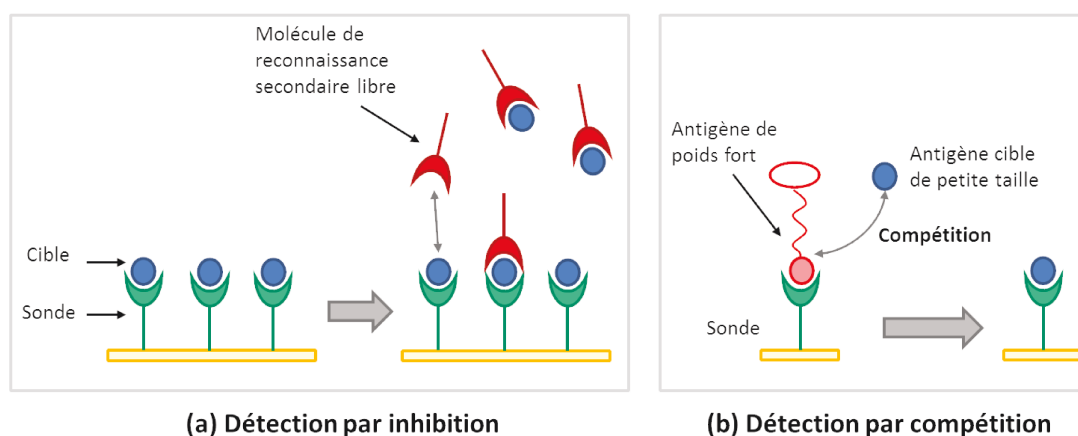


FIGURE 1.20 – Principe d'une mesure SPR (a) par inhibition et (b) par compétition pour la détection de petites molécules.

La détection par compétition repose sur la saturation des sondes immobilisées par un antigène de poids fort, amplifié par une nanoparticule par exemple. Les antigènes d'intérêt, des petites molécules, sont ensuite injectés dans le milieu et entrent en compétition avec les premiers antigènes lourds. Lorsque les antigènes 1 sont chassés par les antigènes 2, de poids plus faible, une diminution du signal SPR se produit (voir schéma de la figure 1.20b). Il est ainsi possible de déterminer la concentration de la solution en petites molécules [Sapsford 2002].

L'article de Pieper-Fürst [Pieper-Furst 2005] constitue un bilan de ces différentes stratégies d'amplification. La capture de la protéine inhibitrice des métalloprotéinases (21 kDa), impliquée dans l'expression de tumeurs du cancer, a été réalisée par amplification de nanoparticules d'or couplée à une détection soit par compétition, avec une immobilisation de la protéine d'intérêt, soit par sandwich à une étape, la première interaction entre protéine et ligand secondaire ayant lieu par incubation. La méthode par compétition atteint une limite de l'ordre de 10 pM, alors que la méthode sandwich donne une limite de détection de 0,5 pM. La présence des nanoparticules

1.2. Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces

augmente d'un facteur 100 le signal. Une telle limite de détection permettrait d'appliquer cette analyse au diagnostic du cancer des poumons ou de l'asthme à partir du prélèvement d'un condensat aqueux de gaz respiratoires expirés par le patient, technique de contrôle non invasive, contenant une très faible proportion de protéines.

Parmi toutes ces possibilités de format d'interaction amplifiée, celle permettant de détecter des molécules en plus faible concentration repose sur le couplage entre une configuration sandwich et des nanobilles métalliques ou quantum dots greffés à la molécule de reconnaissance secondaire de la cible. Cependant, l'atout de détection sans marquage est alors perdu, et la consommation en produits biologiques augmente du fait de l'utilisation de ligands secondaires.

L'effet d'exaltation du champ donné par la présence de nanoparticules peut être implémenté de façon différente en ajoutant des nanostructures directement sur la surface du capteur. Cette stratégie fait l'objet de la partie suivante.

1.2.3 Optimisation de la transduction

1.2.3.1 Par le choix des matériaux

Avant de modifier la géométrie du transducteur, les matériaux le composant peuvent être optimisés de manière à amplifier le champ électromagnétique qu'il génère. Plusieurs voies de recherche ont été explorées pour chacune des strates constituant le transducteur en configuration Kretschmann (à savoir prisme, couche d'adhésion et film mince plasmonique). D'abord, un prisme en céramique transparente à la place du BK7 ou de la silice le plus souvent employés améliore d'un ordre de grandeur la sensibilité de part son indice de réfraction élevé [Micheletto 2008]. Ensuite, le film d'adhésion entre le métal et le prisme couramment fabriqué en chrome ou titane a été testé en oxyde métallique tel que l'oxyde de zinc [Chang 2010] de façon à limiter l'absorption de l'onde, qui induit une perte de sensibilité. Toutefois, la qualité de l'adhésion n'a pas été discutée dans le rapport de l'équipe de Chang, ni l'effet de l'épaisseur considérable d'oxyde de zinc utilisée (égale à 50 nm). Les oxydes métalliques ont également été largement étudiés en tant que matériau de passivation permettant d'employer l'argent comme film résonant en le rendant chimiquement stable [Manesse 2009]. Des propriétés plasmoniques de transduction originales sont aussi mises à jour par l'utilisation de métamatériaux en remplacement des métaux. Par exemple, l'or nanoporeux constitue une piste d'amélioration de la détection [Maaroof 2007, Ruffato 2011]. La porosité extrême de l'or obtenue par gravure chimique offre une surface de capture des cibles beaucoup plus grande qu'avec un film d'or continu, 4 à 8 fois plus importante [Ahl 2008], ce qui augmente l'efficacité de collection et la sensibilité de la mesure [Biener 2008]. Ce type de structure résonne dans le proche infrarouge, et supporte à la fois des plasmons de surface propagatifs et localisés [Yu 2006].

D'après Abbas [Abbas 2011], les voies les plus prometteuses quant à l'optimisation du transducteur dans sa configuration classique concernent la mise au point de puces en argent stables couplées à une couche d'adhésion sans pertes.

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

1.2.3.2 Par nanostructuration

D'autres efforts portent sur le développement d'architectures en 3 dimensions structurant la couche qui supporte l'onde plasmon. Les principaux designs mis en œuvre pour l'amplification du champ sont des **réseaux de trous** de taille inférieure à la longueur d'onde [Ebbesen 1998] et des **réseaux de nanoparticules** de formes variées, basés sur le principe des miroirs de Bragg [Weeber 2004]. Le champ est confiné autour des aspérités (trous ou nanoparticules), créant des régions de forte exaltation du signal. C'est le même principe que celui ayant lieu lorsque des nanoparticules d'or sont attachées aux molécules cibles qui se fixent aux sondes immobilisées à la surface de l'or, avec l'avantage de conserver la propriété de non marquage des molécules, d'uniformité spatiale et de reproductibilité de l'exaltation. Ce confinement est intéressant du point de vue de la SPRI car il réduit la profondeur de pénétration de l'onde évanescente à quelques dizaines de nanomètres. L'onde est ainsi moins sensible à des perturbations d'indice de réfraction du diélectrique pouvant provenir d'instabilités de température par exemple. Lorsque l'interaction biologique a lieu dans un volume restreint au-dessus de la surface du capteur, il est judicieux que l'onde soit la plus concentrée possible sur cet événement de surface.

Une large variété de géométries a été testée, que ce soit des nanofils [Byun 2007], des nanotubes, des nanopilliers [Bottazzi 2014] et autres formes innovantes décrites dans la revue de Lu [Lu 2009].

Ces structures à forte exaltation du champ ont d'abord été explorées pour l'optimisation des substrats utilisés en spectrométrie Raman exaltée de surface [Willets 2007]. Une voie naturelle est ainsi ouverte vers la combinaison entre SPRI nanostructurée et SERS, point qui sera traité dans la section 1.3.2, idée à la base de l'émergence du projet dans lequel s'intègre cette thèse.

La localisation du champ va de pair avec le développement d'un nouveau genre de fonctionnalisation permettant de diriger préférentiellement les molécules cibles vers les zones de confinement du champ de façon à augmenter la sensibilité de détection [Feuz 2010]. Les travaux de Feuz présentent une **double fonctionnalisation** déposée sur une surface d'or sur verre percée de trous de 150 nm de diamètre et recouverte d'oxyde de titane. Seuls les flancs des orifices ne sont pas passivés par l'oxyde. Ainsi, une chimie à terminaison SH est déposée sur l'or, et une chimie à terminaison poly-lysine se fixe sur l'oxyde de titane. Chacune de ces deux fonctionnalisations peut être rendue bio-active par ajout d'une biotine capable d'interagir avec la neutravidine, comme schématisé en figure 1.21. Il est prouvé que l'activation seule des flancs dorés (cas (a) sur le schéma) donne une limite de détection de l'ordre de 1 nM, obtenue en quelques secondes, contre 2 nM lorsque la neutravidine se fixe sur toute la surface du capteur (cas (b)) ou partout sauf sur les flancs (cas (c)), cette concentration étant détectée pour un temps d'interaction près de 20 fois supérieur au cas (a). Cette différence est due à la dimension réduite de la surface active, dont le taux de recouvrement maximal va être atteint beaucoup plus rapidement que dans la configuration (b). Cette limite de détection n'est pas beaucoup améliorée par rapport aux systèmes standards de SPRI, mais le réel intérêt est la diminution de la quantité de solution cible nécessaire pour atteindre cette limite de détection en un temps donné.

1.2. Optimisation du système de SPRI pour la détection de molécules à l'état de traces

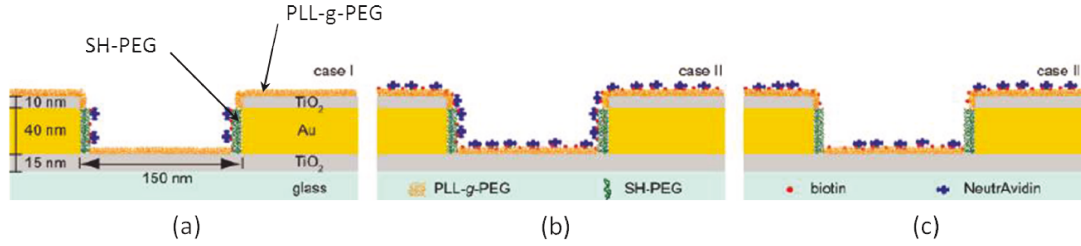


FIGURE 1.21 – Coupe schématique de l'échantillon présenté dans l'article de Feuz [Feuz 2010] composé de trous gravés dans un film d'or et recouvert d'oxyde de titane démontrant l'avantage de la localisation de l'interaction dans les régions à forte sensibilité. Une chimie à base de polyéthylène glycol (PEG) est déposée, avec une terminaison en poly-lysine (PLL) pour une fixation sur le TiO_2 , et une terminaison en thiols (SH) pour une accroche sur l'or. Dans le cas (a), seuls les PEG sont rendus actifs pour une interaction avec la neutravidine (donc seuls les flancs des trous participent au signal), en cas (b), l'ensemble de la surface est active, et en cas (c), seuls les flancs ne sont pas activés.

En plus de la combinaison nanostructuration et localisation de l'interaction au niveau des zones d'exaltation du champ, les travaux d'Eftekhari et al [Eftekhari 2009] associent **nanoplasmonique et nanofluidique**. Ils tirent profit des bénéfices optiques d'un réseau de nano-trous ainsi que du transport nano-confiné de la solution cible qui circule uniquement à l'intérieur des trous grâce à un système de canaux traversant le réseau de trous. Ce capteur est schématisé en figure 1.22. Le diamètre des trous est d'environ 300 nm pour une période de 500 nm, avec une épaisseur du film d'or de 100 nm. Une mesure comparative avec une fluidique conventionnelle, avec circulation du fluide uniquement au-dessus du réseau de trous, démontre un gain d'un facteur 6 sur le temps de réponse du capteur équipé de nanofluidique. Il a également été prouvé que la sensibilité d'un réseau de nano-trous est similaire à celle d'un film d'or en configuration Kretschmann [Tetz 2006]. Cependant, si la détection est localisée à l'intérieur des trous, sur les flancs, le reste de la surface d'or étant bloqué de la même façon que dans l'expérience de Feuz, la limite de détection peut atteindre l'ordre de l'attomolaire [Ferreira 2008].

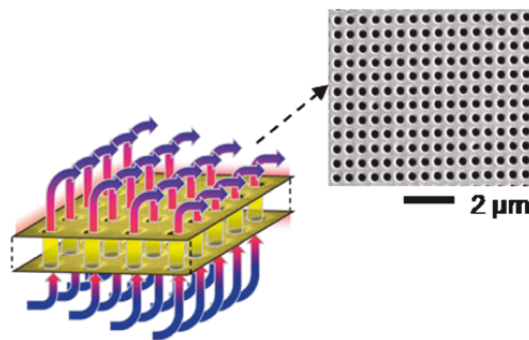


FIGURE 1.22 – Schéma du capteur couplant réseau de nano-trous d'or sur une membrane en nitrure et système de nano-fluidique [Eftekhari 2009]. Le fluide est en contact uniquement avec l'intérieur des trous du film d'or.

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

Malgré les capacités plasmoniques exceptionnelles de ces nanostructures, le problème de leur fabrication se pose. Elles sont généralement produites par lithographie électronique, méthode qui reste limitée car une production massive n'est pas envisageable compte tenu du temps et du coût de fabrication nécessaires pour obtenir une surface structurée de plusieurs mm^2 . La revue de Henzie [Henzie 2009] retrace les différents moyens de nanofabrication disponibles aujourd'hui. Par exemple, le projet dans lequel s'inscrit cette thèse explore une fabrication par nano-impression. Un moule nanostructuré est appliqué à la manière d'un tampon sur une résine photosensible pour imprimer des motifs sur un substrat. Ce moule peut être utilisé plusieurs fois pour produire un grand nombre de substrats. Ces problématiques de nanofabrication font l'objet de la thèse de Jean-François Bryche, dans le groupe Biophotonique du laboratoire Charles Fabry [Bryche 2016a]. L'avenir des capteurs nanoplasmoniques est donc étroitement lié au développement de nouvelles méthodes de fabrication plus abordables et maîtrisées.

Pour conclure sur les performances de détection des méthodes d'amplification du signal présentées ci-avant, le tableau 1.23 dresse un bilan des limites de détection des principales configurations de mesure SPR citées.

Il est difficile de comparer ces différents modes de mesure qui sont illustrés par des expériences et modèles biologiques variés, mais la tendance qui peut être dégagée de ces résultats démontre un gain de détection de 3 ordres de grandeurs pour les méthodes sandwich, amplifiées de nanoparticules, par compétition, par inhibition ou grâce à un système fluidique optimisé, par rapport à une méthode directe. Cependant, ces stratégies sont plus complexes à mettre en œuvre.

Méthode de détection	Article	Cible	Poids de la cible	LOD
Directe	[Malic 2011]	Protéine	28 kDa	10 nM
Sandwich	[Malic 2011]	Protéine	28 kDa	40 pM
Sandwich + QD	[Malic 2011]	Protéine	28 kDa	3 pM
Compétition	[Pieper-Furst 2005]	Protéine	21 kDa	10 pM
Inhibition	[Yu 2005]	Toxine	310 Da	0,3 nM
Micro-fluidique sans dispersion	[Springer 2010]	ADN	10 kDa	70 pM
Nano-trous + fluidique + chimie sélective	[Ferreira 2008]	Streptavidine	58 kDa	1 attoM

FIGURE 1.23 – Exemples typiques des limites de détection obtenues suivant différentes stratégies d'amélioration de la mesure SPR.

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

La solution de nanostructuration du transducteur couplée à une chimie sélective est plus simple à implémenter, sous réserve de maîtriser la nanofabrication des substrats et de disposer d'un système fluide efficace. Cette dernière piste a été testée au cours du projet Piranex, dans le cadre du couplage entre SPRI et SERS, développé dans la suite. D'autres techniques de couplage testées dans la littérature sont également évoquées.

1.3 Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

Lorsqu'une méthode, de mesure ou de calcul, a été poussée au maximum de ses performances, il est courant de l'associer à une seconde méthode complémentaire qui ouvre de nouvelles possibilités. Les défauts de l'une se trouvent compensés par les atouts de l'autre.

La combinaison entre deux techniques de détection d'interactions moléculaires peut être envisagée de deux manières : soit un même échantillon est analysé successivement par deux instruments différents, soit un seul instrument rassemble deux phénomènes physiques de détection pour acquérir une meilleure sensibilité. La seconde stratégie est préférable pour ne pas perturber l'échantillon lors de son transport d'un appareil à un autre ni le polluer.

Les principales techniques de couplage avec la SPR sont exposées ici, avec une attention plus particulière portée à la combinaison avec la Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (SERS pour Surface Enhanced Raman Scattering), couplage développé dans le cadre de cette thèse.

1.3.1 Quelles mesures peuvent être combinées avec la SPRI ?

L'architecture du capteur SPR s'adapte à de nombreuses méthodes d'analyse :

- L'utilisation d'un film métallique est compatible avec l'**électrochimie** qui nécessite des électrodes.
- L'interaction moléculaire générant une variation de masse, la **microbalance à quartz** représente un outil désigné pour mesurer cette quantité.
- L'**ellipsométrie**, qui mesure des variations de polarisation en réflexion peut aussi facilement être intégrée à un instrument SPR.
- Les techniques comme le **SERS** et la **fluorescence** sont pratiques à coupler à la SPR sur le plan de leur géométrie car elles observent l'échantillon par le dessus, tandis que la mesure SPR en configuration Kretschmann s'effectue par le dessous, en réflexion totale interne, lorsqu'un prisme sert d'intermédiaire de couplage entre onde incidente et onde plasmon (moins évident dans le cas d'un couplage par réseau). La propriété évanescente de l'onde profite à l'excitation locale des marqueurs fluorescents fixés près de la surface métallique.
- D'autres méthodes analytiques complémentaires sont la **spectrométrie de masse** et la **microscopie à force atomique** (AFM), qui ne peuvent cependant être associées dans un même système à la SPR, à l'inverse des techniques précédentes, mais s'effectuent dans un autre appareil, après interaction moléculaire enregistrée au sein de l'instrument SPR. La

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

SPR renseigne sur la fonction de la molécule alors que la spectrométrie de masse apporte des informations sur sa structure, de la même façon que la mesure SERS. La mesure AFM donne quant à elle des informations sur la morphologie de la surface.

Des exemples d'expériences de couplage de ces différentes technologies avec la SPRI sont reportés ici.

1.3.1.1 Electro-chimie

Une mesure par électro-chimie est une technique classique pour analyser des réactions d'oxydo-réduction. Elle permet d'évaluer la concentration en espèces chargées ou le pH d'une solution par l'obtention d'une courbe d'évolution du courant en fonction de la tension appliquée aux bornes d'électrodes. Elle est réalisée dans une cellule composée de trois électrodes : une électrode de comptage, une électrode de référence et une électrode de travail. La SPR est facilement couplée à l'électro-chimie du fait du format de la biopuce. Cette dernière peut être utilisée comme électrode de travail. L'ajout de deux électrodes dans la cellule fluidique SPR permet de constituer simplement un système de mesure électro-chimique (voir la figure 1.24). La SPR analyse ainsi les variations de concentration en molécules ioniques à la surface du capteur au cours de la réaction d'oxydo-réduction. Deux exemples d'application de ce couplage sont proposés dans ce qui suit.

Les travaux de Wu et al [Wu 2015] mettent en avant l'utilisation d'une combinaison électro-chimie/SPR pour évaluer *in vivo* l'effet d'une molécule d'intérêt thérapeutique sur le taux de survie de cellules cancéreuses. Le système est utilisé en conditions statiques, sans circulation de fluide.

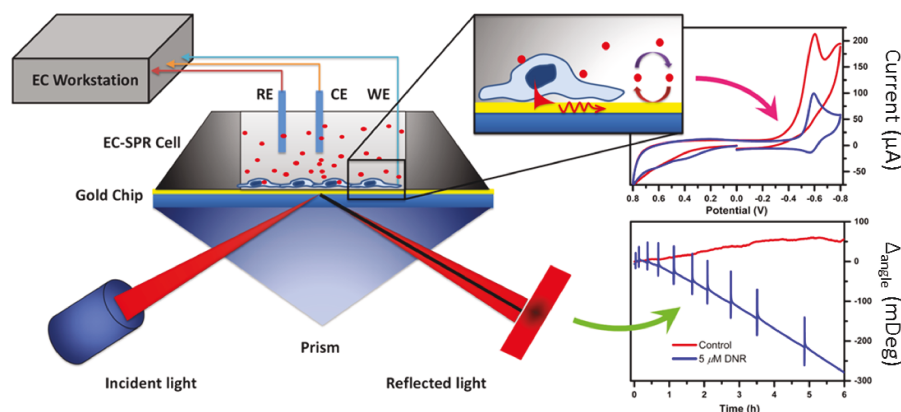


FIGURE 1.24 – Montage combinant SPRI et électro-chimie pour l'étude d'un traitement accélérant l'apoptose de cellule cancéreuses [Wu 2015].

L'interaction de la molécule avec les cellules induit l'apoptose cellulaire : les cellules détruites se détachent de la surface d'or, diminuant ainsi l'indice local à la surface du capteur, et donc le signal SPR. La mesure électrochimique, quant à elle, renseigne sur la concentration en molécules présentes dans l'ensemble du milieu de culture. Lorsque les cellules meurent, les molécules internalisées sont rejetées dans le milieu : le courant augmente.

Des informations sont donc acquises à la fois à l'échelle moléculaire et à l'échelle cellulaire

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

grâce à ce couplage.

Heaton propose d'appliquer le couplage électrochimie/SPR à l'identification de mutations de l'ADN [Heaton 2001]. Les performances de la technique SPR en ce qui concerne la sensibilité de la détection de modifications de bases d'une séquence d'oligonucléotides ne sont plus à démontrer. Dans ses travaux, Heaton propose l'électro-chimie comme méthode de détection de mutations génétiques alternative à la SPR, qui ne nécessite pas l'acquisition complète de la cinétique d'interaction. Ses mesures couplées montrent deux phénomènes se produisant lors de l'application d'un potentiel constant sur le film d'or. D'abord, un potentiel positif engendre une forte augmentation de l'affinité entre la sonde ADN et la cible dont deux bases sont mutées, alors que ce n'est pas le cas pour la cible sauvage. Ensuite, une fois l'équilibre de l'interaction atteint, l'application d'un potentiel négatif implique la dénaturation de l'hybridation, qui a lieu 35 fois plus rapidement sur le couple sonde/cible mutée que sur le couple sauvage.

Ainsi, l'électrochimie apporte des informations sur la concentration en espèces chargées d'une solution et peut favoriser les interactions en jouant sur le potentiel du film d'or.

1.3.1.2 Microbalance à quartz

Une microbalance à quartz (QCM pour Quartz Crystal Microbalance) mesure des variations de fréquence de résonance d'un cristal de quartz, liées à des changements de masse se produisant à la surface du quartz, ainsi que des variations de résistance associées à la densité et à la viscosité du fluide avec lequel il est en contact. Le couplage entre QCM, signal acoustique, et SPR, signal optique, permet alors de déterminer plus précisément si le signal mesuré provient d'un changement de masse ou bien d'une hydratation de la couche biochimique déposée. En effet, l'évaluation de l'épaisseur d'une mono-couche de molécules en SPR est réalisée sur le postulat de la valeur de son indice optique. Or, si cette mono-couche est hydratée par le solvant présent dans la cellule fluidique, l'indice optique effectif de la couche déposée diminue.

L'assemblage des deux méthodes a été testé en configuration Kretschmann [Kim 2010b] grâce à l'utilisation d'électrodes en métal transparentes (ITO) posées de part et d'autre du quartz. L'électrode supérieure est recouverte de 50 nm d'or par l'intermédiaire d'une couche adhésive en Titane. Cette plateforme, décrite par le schéma 1.25, est ensuite déposée sur un prisme.

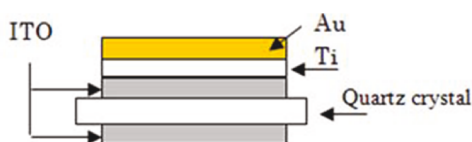


FIGURE 1.25 – Plateforme de couplage QCM/SPR en configuration Kretschman [Kim 2010b].

Le contact entre la seconde électrode et le prisme est optimisé par le choix d'une huile d'indice à faible viscosité, qui donne une fréquence d'oscillation du quartz et une résistance moins bruitées que dans le cas d'une huile d'indice plus visqueuse. L'ajout du quartz modifie la

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

position de la résonance ainsi que son amplitude car les interfaces supplémentaires vues par le faisceau incident génèrent des réflexions parasites qui diminuent l'intensité du signal. De plus, les signaux de la microbalance obtenus après le dépôt d'une goutte d'eau à la surface de l'or ne sont pas assez stables pour pouvoir détecter de faibles changements de masse. Ces tests préliminaires aboutissent à la conclusion qu'une telle configuration de mesure est plutôt destinée à l'étude de gros objets comme les cellules *in vivo*.

La combinaison de la mesure par microbalance à quartz avec la SPR est réalisée de manière plus efficace à partir d'une configuration réseau : un réseau est fabriqué sur un résonateur en cristal de quartz. Cette technique a été utilisée par Zhang [Zhang 2007] qui reporte un exemple de l'intérêt du couplage SPR/QCM sur la mesure de l'épaisseur d'un film d'albumine de sérum bovin (BSA) sur l'or. Le signal acoustique donne une épaisseur de 5,2 nm, alors que le signal optique prédit une épaisseur de 1,5 nm lorsqu'un indice de réfraction de 1,45 est sélectionné, indice standard d'une couche de molécules [Fu 2009], en considérant que la monocouche recouvre l'ensemble de la surface. Des études approfondies sur la structure de la BSA confirment que l'épaisseur de la couche ne peut être inférieure à 4 nm, donnant raison à la mesure de QCM.

La méthode QCM présente l'avantage de pouvoir déterminer de façon plus précise que la SPR l'épaisseur de couches d'espèces biologiques ou chimiques car elle tient compte de la visco-élasticité des couches et de leur hydratation, information qui peut avoir un intérêt pour caractériser des fonctionnalisations de surface ou des films minces de polymères par exemple, tandis que la SPR apporte des précisions sur l'affinité entre plusieurs couches déposées pour évaluer leur stabilité et sur la densité optique des couches. Plusieurs travaux rapportent l'utilisation conjointe de mesures de SPR, QCM et électro-chimie pour caractériser de façon exhaustive des films minces en analysant à la fois leurs propriétés électriques, optiques et diélectriques [Baba 2004, Schweiss 2005].

1.3.1.3 Ellipsométrie

La technique de l'ellipsométrie exaltée par plasmon de surface a été explorée, comme le montrent les travaux de différents groupes de recherche [Westphal 2002, Liu 2011]. Elle combine les avantages de l'ellipsométrie et de la résonance des plasmons de surface, pour donner une sensibilité 20 fois supérieure à celle des instruments conventionnels d'ellipsométrie. Une mesure ellipsométrique est toute désignée pour évaluer des changements d'indice de réfraction ou d'épaisseur de manière plus précise que la SPR puisqu'elle analyse deux propriétés de la lumière réfléchie par un prisme, à savoir son intensité et sa phase, de façon simultanée à partir d'une mesure de variation d'état de polarisation. Le montage est identique à une configuration Kretschman avec ajout d'un analyseur sur le trajet du faisceau réfléchi. La cadence de mesure est donc ralentie par l'analyse des différents états de polarisation.

La limite de détection obtenue par Liu par imagerie ellipsométrique en réflexion totale interne concernant l'interaction entre l'antigène et l'anticorps du virus de l'hépatite B est égale à 8 ng/mL, soit 0,3 nM, environ un ordre de grandeur meilleure que la limite conventionnelle de la SPR.

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

1.3.1.4 Microscopie à Force Atomique

Un autre type de couplage instrumental a été exploré afin d'ajouter à la capacité de détection et d'identification de la SPRI une possibilité de caractérisation morphologique des espèces capturées. Il s'agit de la combinaison SPRI/AFM.

Ce type de solution a notamment été développé par Obeid et al [Obeid 2016]. Une plateforme d'analyse multimodale a été mise au point pour une étude exhaustive de vésicules membranaires du sang. Ces microparticules d'une taille variant entre 50 nm et 1000 nm présentent l'intérêt d'être des biomarqueurs potentiels. La force de cet instrument par rapport aux méthodes d'analyse classiquement utilisées pour caractériser ces microparticules, telles que la cytométrie de flux ou la spectrométrie de masse, est de proposer une détection en temps réel et à haut débit grâce à la mesure SPRI, implémentée sous le format d'une biopuce fonctionnalisée par des sondes de natures différentes. Ce couplage instrumental donne également la possibilité de réaliser une mesure complémentaire de fluorescence par le marquage de ligands secondaires, tout en observant la forme et la taille des particules lors de la mesure AFM.

Dans le cadre de ces travaux, la mesure SPR est réalisée dans un premier temps au sein de la cellule fluide d'un appareil commercial. Ensuite, la surface biologique est figée par l'injection de glutaraldehyde et la biopuce est insérée dans un système commercial AFM pour une mesure par contact en milieu liquide. La mesure AFM analyse une surface de 2 par 2 μm . Chaque spot biologique de sonde composant la biopuce, de l'ordre de 1 mm de diamètre, est donc analysé par plusieurs mesures AFM. Il a été vérifié sur une même biopuce que le recouvrement de surface obtenu à partir de l'analyse du signal SPR concorde avec la densité de surface mesure par AFM.

Ce couplage SPRI/AFM permet donc d'analyser un grand nombre de particules en temps réel grâce à la mesure SPR et de les caractériser de façon plus précise par mesure AFM.

Outre l'étude de ce type de vésicules, une telle plateforme pourrait avoir le potentiel d'analyser des interactions analyte/ligand variées à la fois à l'échelle de la molécule unique grâce à la mesure AFM et sur une grande surface grâce à la mesure SPRI. En effet, d'après la revue de Li et al portant sur l'utilisation de la technique AFM pour l'observation de protéines membranaires [Li 2006a], depuis les développements des années 2000, il est possible d'imager par AFM la topographie de protéines biologiques uniques. Ce groupe de recherche a par exemple identifié de façon spécifique un type d'angiotensine localisé à la surface d'une membrane de cellule neuronale grâce à un mode de mesure AFM particulier utilisant une pointe fonctionnalisée oscillante.

Il serait ainsi possible de suivre en temps réel l'adhésion de cellules sur une grande surface par SPR pour venir ensuite observer des molécules membranaires particulières par pointe AFM fonctionnalisée. On peut aussi imaginer analyser la cinétique d'une interaction anticorps/antigène par SPR puis effectuer la topographie et l'identification de l'analyte par mesure AFM, sous un format similaire à une interaction sandwich (la pointe AFM étant fonctionnalisée par des ligands secondaires). Ainsi, le groupe de Zhou et al a combiné AFM et SPR ainsi que d'autres méthodes d'analyse (QCM et ondes acoustiques de surface) pour caractériser l'adsorption de l'immunoglobuline humaine sur une surface afin d'obtenir à la fois des informations cinétiques et structurales, à des échelles macroscopiques et microscopiques.

Ce type de couplage SPR/AFM est également intéressant pour la caractérisation de films

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

minces ou de fonctionnalisations de surface puisque qu'il permet de donner des informations sur l'indice optique du matériau déposé ainsi que sur sa topographie et son homogénéité de surface.

Par exemple, une étude du groupe de Kujawa et al [Kujawa 2005] analyse le mécanisme de croissance exponentielle de multicouches de polyélectrolytes à partir de mesures de spectroscopie SPR et de microscopie à force atomique réalisées in situ en milieu liquide. L'examen du film de polyélectrolytes au fil de sa construction par imagerie AFM révèle une évolution de l'état de surface du film en fonction du nombre de couches déposées, du point de vue de sa rugosité, de sa morphologie et de son homogénéité. L'épaisseur optique du film est simultanément mesurée par SPR, de façon non invasive, et cela en temps réel lors de la formation des couches superposées. La technique AFM peut également être appliquée pour mesurer des épaisseurs de film en utilisant la pointe pour creuser le matériau. La comparaison des résultats de mesure d'épaisseur AFM et SPR renseigne sur l'hydratation potentielle des couches formées.

Pour conclure, la mesure AFM est complémentaire de la mesure SPRI grâce à l'apport d'informations topographiques et à l'identification possible de molécules uniques. Cependant, il semble difficile d'envisager un couplage dans un unique instrument de ces deux méthodes.

1.3.1.5 Fluorescence

La fluorescence est une méthode de détection très sensible, permettant d'observer des molécules uniques lors de leur activité, comme les ribosomes au moment de la traduction de l'ADN par exemple [Bharill 2010]. L'excitation de la fluorescence des marqueurs par des plasmons de surface en configuration de réflexion totale interne présente plusieurs avantages : elle permet d'amplifier l'émission de fluorescence et de réduire le volume d'excitation à la taille de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente [Lakowicz 2008]. Les marqueurs libres en solution se trouvant hors de l'onde évanescente ne viennent pas perturber la mesure, ce qui augmente le rapport signal à bruit.

Les marqueurs fluorescents sont excités par des longueurs d'onde inférieures à 600 nm. L'or étant trop absorbant sur cette plage spectrale, le film métallique est composé d'argent passivé par une fine couche d'or servant à le stabiliser et à le rendre bio-compatible.

Le couplage SPR/fluorescence est pertinent pour l'analyse de phénomènes cellulaires faisant intervenir des processus moléculaires. Par exemple, l'étude de Chabot [Chabot 2013] présente des résultats montrant la corrélation entre une réorganisation des cellules du foie observée en fluorescence suite à l'injection d'un agent stimulant, l'angiotensine II, et les variations mesurées du signal SPR. La mesure de fluorescence analyse la structure des cellules grâce à des marqueurs fixés sur le cytosquelette d'actine. Elle délivre des données essentielles à la compréhension plus détaillée du processus cellulaire, qui se traduit en SPR par un signal global à partir duquel il est difficile d'isoler les différents événements se produisant au niveau de la cellule.

La combinaison de la SPR et de la fluorescence permet le suivi de réorganisations morphologiques de la cellule liées à des modifications de leur cytosquelette. Le rôle de la fluorescence est capital pour déconvoluer les différents processus cellulaires et moléculaires intriqués dans le signal SPR. L'atout de la SPR consiste à une observation sur grand champ, donnant une tendance globale du comportement des cellules, sur un grand nombre de cellules.

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

La fluorescence couplée à la SPR permet également d'exalter la détection d'interactions moléculaires de surface [Liebermann 2000] en marquant la cible, ou une molécule de reconnaissance secondaire (dans le cas d'un format sandwich) par un chromophore. Une mesure de fluorescence permet de gagner 3 ordres de grandeur sur la limite de détection de petites molécules en comparaison avec la SPR standard.

La distance à laquelle le marqueur se trouve de la surface doit être réglée avec attention pour éviter le phénomène de quenching se produisant lorsque le marqueur est trop près de la surface. L'amplification de l'intensité de fluorescence due à des interactions de champ proche est un phénomène encore à l'étude, faisant intervenir des mécanismes complexes.

Pour conclure, la fluorescence bénéficie des plasmons de surface en tant que méthode d'excitation pour augmenter le rapport signal à bruit de la mesure. D'un autre côté, la SPRI tire profit de la fluorescence de part sa grande sensibilité qui permet d'amplifier le signal, par interaction sandwich par exemple. Le couplage de fluorescence et SPRI est également intéressant pour l'étude de processus cellulaires et moléculaires se produisant simultanément. Dans ce cas, les informations apportées par la fluorescence sont complémentaires au signal SPR et permettent de mieux l'interpréter.

Plusieurs inconvénients, liés aux limites de la technique de fluorescence elle-même, entachent ce couplage. Le procédé de marquage est long et complexe et le greffage de marqueurs sur les molécules cibles peut perturber l'interaction en dénaturant la structure de la cible ou en générant un encombrement stérique empêchant l'interaction. De plus, les marqueurs présentent le risque de photo-blanchir et d'être quenchés par la proximité d'un film métallique.

1.3.1.6 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS pour Mass Spectroscopy) permet l'étude protéomique d'une protéine, c'est-à-dire qu'elle donne des informations relatives à sa structure et à sa fonction. Cette mesure est couramment combinée à une source d'ionisation laser MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) de façon à séparer les différents composés formant le complexe obtenu après interaction. La masse de chaque composé est donnée par la position du pic mesuré par le spectromètre. La méthode d'ionisation est particulièrement intéressante pour mettre en place un couplage avec la SPR. En effet, une fois les molécules capturées à la surface de la biopuce, elles sont arrachées par ablation laser, ionisées puis accélérées pour être analysées par un spectromètre de masse. Une méthode alternative et plus courante consiste en l'élution, correspondant à l'utilisation d'un solvant qui retire les analytes de la surface, mais cela requiert des étapes supplémentaires compliquant le couplage SPR/MS et pouvant endommager les molécules. En comparaison avec les analyses précédentes, la spectrométrie de masse présente l'inconvénient d'être destructive.

L'apport de la mesure SPR concerne sa capacité d'analyse thermodynamique de l'interaction entre deux espèces moléculaires, analyse impossible avec la spectrométrie de masse qui regarde la composition du complexe sonde/cible à un point donné dans le temps, lorsque l'équilibre est atteint. La spectrométrie de masse ajoute une identification précise de la molécule capturée, dans la même idée que la couplage avec une mesure Raman, présenté dans la section suivante. La combinaison des deux méthodes offre une approche complète pour la caractérisation biomoléculaire,

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

chaque méthode adressant une facette différente de cette caractérisation.

La spectrométrie de masse nécessite une moins grande quantité de protéines en comparaison avec la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la cristallographie aux rayons X, et elle est plus rapide. La stoechiométrie du complexe est déterminée précisément, mais la structure des protéines est moins résolue qu'avec ces autres méthodes.

La limite de ce couplage concerne la quantité de protéines d'intérêt capturées en SPR, qui est de l'ordre du femtomole, valeur du plancher de détection en spectrométrie de masse par MALDI. Lorsque les molécules fixées sur le substrat sont trop encombrantes, le nombre de protéines capturées par unité de surface en SPR diminue, ce qui rend la mesure MS difficile. Pour augmenter la densité surfacique en molécules capturées, et ainsi obtenir une meilleure sensibilité en MS, il est possible d'utiliser une chimie de surface à base de dendrons, une structure à forme arborescente qui augmente le nombre de sites de fixation accueillant les sondes [Mizuta 2010].

Néanmoins, la force du couplage entre SPR et MS est indéniable : Nedelkov a réussi à détecter une concentration d'un marqueur biologique impliqué dans le dysfonctionnement du rein de l'ordre de quelques dizaines de picomolaire dans une solution à base d'urine diluée [Nedelkov 2000].

L'électrochimie, l'ellipsométrie et la microbalance à quartz sont des méthodes de couplage avec la SPR minoritaires et peu adaptées à ce jour pour la détection de molécules à l'état de traces.

La combinaison entre microscopie à force atomique et SPR présente un intérêt prometteur mais reste à développer dans le cadre d'applications d'identification de molécules uniques capturées sur une surface.

La fluorescence utilisée en complément de la SPR délivre une sensibilité fortement améliorée mais cela au détriment du marquage des molécules et des problèmes de photoblanchiment ou de quenching.

Le couplage SPR/MS est le plus efficace pour la détection et l'identification de protéines en comparaison avec les méthodes présentées précédemment. Cependant, la spectrométrie de masse est destructive et ne peut être opérée de façon simultanée avec la SPR dans un même instrument.

Dans l'idée du développement d'un nouveau bio-capteur pour la détection de faibles quantités de molécules cibles, objectif de cette thèse, un couplage de la SPR avec la spectrométrie Raman a été sélectionné. Une présentation plus complète de cette méthode de mesure est réalisée dans le paragraphe suivant.

1.3.2 Quantification et identification de molécules par le couplage SPRI/SERS

Il a été expliqué que malgré de nombreux atouts, la mesure SPRI présente une spécificité relative à la qualité de la chimie de surface et au choix du couple sonde/cible utilisé. Une stratégie prometteuse pour pallier ce manque de sélectivité consiste en une combinaison entre SPRI et SERS. En effet, la mesure Raman délivre à la fois un atout d'identification des molécules avec une grande résolution spatiale et conserve la propriété non invasive et sans marquage de la SPR.

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

Un assemblage de ces deux méthodes dans un unique instrument est envisageable, contrairement à la spectrométrie de masse.

Le développement d'un tel système bimodal fait ainsi l'objet d'un projet ANR qui est décrit dans le chapitre suivant, rassemblant des partenaires académiques et l'industriel Horiba Jobin-Yvon. Ces deux technologies, SPRI et SERS, sont implémentées chez Horiba, raison supplémentaire pour mettre au point un prototype à partir des savoir-faire de l'entreprise.

Ce paragraphe s'attache à présenter les principaux attraits d'une mesure Raman ainsi qu'à rendre compte des travaux de couplage SPR et SERS réalisés jusqu'à présent.

1.3.2.1 Principe de la détection par Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (SERS)

Diffusion Raman L'émission Raman est un processus de diffusion inélastique de la lumière, par opposition à la diffusion Rayleigh, qui est élastique, et qui explique par exemple la couleur bleue du ciel. Il s'agit d'un phénomène d'interaction entre la lumière et la matière. La matière diffusante absorbe une partie de la lumière incidente pour ré-émettre les photons à une énergie et une fréquence différentes. Deux configurations de ré-émission Raman sont possibles. Lorsque l'énergie des photons émis par la particule diffusante est légèrement inférieure à l'énergie incidente, on parle de diffusion Stokes. Lorsque la molécule se trouve au préalable dans un état excité, ce qui est moins probable, il se produit un gain d'énergie des photons émis : c'est la diffusion anti-Stokes. Les bandes Stokes et anti-Stokes sont symétriques, de part et d'autre de la fréquence incidente des photons, mais l'amplitude des pics anti-Stokes est plus faible, car la probabilité qu'ils soient générés est moindre. On mesure ainsi une variation d'énergie des photons incidents, pondérée par l'intensité de chaque variation, exprimée en nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde), c'est-à-dire en cm^{-1} , unité adaptée pour représenter de faibles décalages de longueur d'onde. Pour convertir les longueurs d'onde en nombre d'onde en cm^{-1} et inversement, il suffit d'appliquer les égalités suivantes, avec λ_{inc} la longueur d'onde des photons incidents et λ_{em} la longueur d'onde des photons ré-émis par la molécule diffusante :

$$\Delta\sigma(\text{cm}^{-1}) = \frac{10^7}{\lambda_{inc}(\text{nm})} - \frac{10^7}{\lambda_{em}(\text{nm})} \quad (1.5)$$

$$\Delta\lambda \simeq \lambda_{inc}(\text{nm}) \times \frac{\Delta\sigma(\text{cm}^{-1})}{10^7} \quad (1.6)$$

Le mécanisme de cette diffusion est expliqué à l'échelle des états électroniques de la molécule excitée, sur le graphe 1.26. Si la molécule dans son état fondamental S^0 est excitée par un rayonnement dans le visible à la fréquence ν_{VIS} , deux événements se produisent simultanément : d'une part, la désexcitation à partir du même niveau d'énergie donne une émission Raman, et d'autre part, la molécule peut se désexciter en deux temps, d'abord de façon non radiative jusqu'au niveau le plus bas de l'état excité S^1 , puis par émission de fluorescence pour redescendre au niveau fondamental. Or la section efficace de la diffusion Raman, qui décrit la probabilité d'interaction onde/particule, d'une valeur typique de $10^{-30} \text{ cm}^2/\text{molécule}$, est plus faible d'à peu près 12 ordres de grandeur que celle de la fluorescence [Yih 2004]. La fluorescence domine donc largement l'émission lors d'une excitation dans le domaine visible. La solution pour privilégier l'émission Raman consiste à choisir un laser d'excitation dans le proche infrarouge. L'énergie

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

atteinte suffit à exciter des états de vibration ou de rotation de la molécule correspondant à des niveaux électroniques fictifs, intermédiaires entre l'état 0 et l'état 1. Ainsi, la fluorescence n'est pas permise.

L'adaptation de la longueur d'onde en fonction de l'échantillon est possible car l'effet Raman ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation. Le spectre Raman sera le même quelle que soit la longueur d'onde. Toutefois, l'intensité du signal Raman, liée à la section efficace de diffusion, diminue comme la puissance 4 de l'inverse de la longueur d'onde [Bischel 2008].

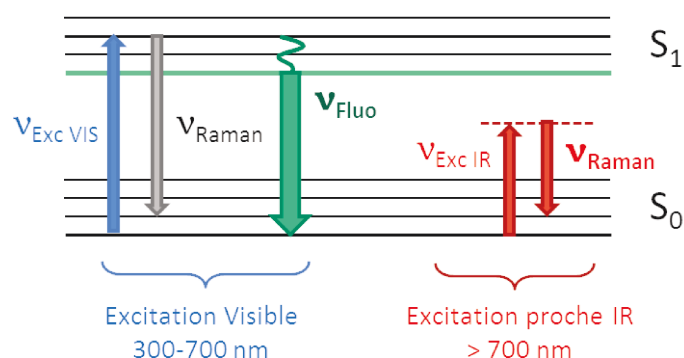


FIGURE 1.26 – Explication de la compétition entre émission Raman et fluorescence au regard des états électroniques de la molécule excitée.

Facteur d'amplification SERS Le signal Raman des molécules étant de très faible amplitude, cette technique d'analyse moléculaire n'a pu être appliquée de façon efficace qu'à partir de la découverte du phénomène d'exaltation par Fleischmann en 1974 [Fleischmann 1974]. Il a remarqué une forte amplification du signal en étudiant la molécule de pyridine sur des électrodes rugueuses en argent. Bien que le processus exact de l'exaltation ne soit pas encore complètement dévoilé, deux effets interviennent pour découpler le signal Raman : un effet chimique et un effet électromagnétique [Le Ru 2013].

L'amplification par voie chimique repose sur la modification de la structure électronique de la molécule suite à l'interaction avec une surface métallique. Un transfert de charges se produit entre métal et molécule, auquel est attribué un facteur d'amplification de l'ordre de 10^2 .

L'amplification par voie plasmonique domine tout de même l'effet d'exaltation, pour donner un facteur d'amplification total généralement compris entre 10^5 et 10^7 [Le Ru 2007]. L'excitation d'un plasmon de surface localisé autour d'une nanoparticule ou d'une aspérité amplifie dans un premier temps le champ incident d'un facteur M à la longueur d'onde d'illumination λ_{inc} . Une molécule adsorbée sur cette particule excitée absorbe les photons et les diffuse à la longueur d'onde λ_{em} avec une énergie proche de l'énergie incidente. Dans un second temps, la particule métallique recueille l'énergie émise par la molécule et se trouve excitée une seconde fois, générant un champ amplifié du même facteur M à la longueur d'onde de ré-émission cette fois-ci. Ces étapes sont résumées en figure 1.27. Le champ final, auquel est ajouté le facteur d'amplification chimique β , est alors égal à :

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

$$E_{tot} = M(\lambda_{inc}) \times M(\lambda_{em}) \times E_{em}(\lambda_{em}) \times \beta$$

En faisant l'approximation que $M(\lambda_{inc})$ et $M(\lambda_{em})$ sont équivalents, et que l'intensité diffusée est proche de l'intensité incidente, l'intensité caractéristique d'un signal SERS est de l'ordre de :

$$I_{SERS} = |E_{tot}|^2 \simeq M(\lambda_{inc})^4 \times I_{inc}(\lambda_{inc}) \times \beta^2$$

Le facteur d'amplification SERS est alors égal à $M^4\beta^2$.

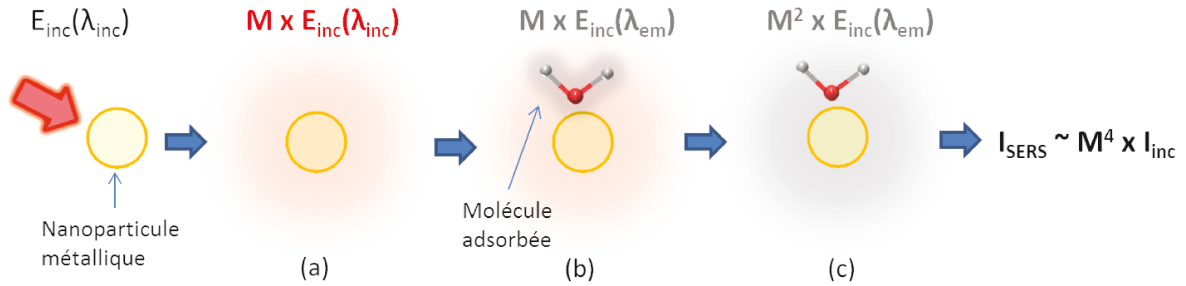


FIGURE 1.27 – Effet électromagnétique d'exaltation de l'intensité Raman : (a) Excitation de la résonance plasmon localisée autour de la nanoparticule métallique, le champ incident est amplifié d'un facteur M , (b) une molécule adsorbée se retrouve excitée par le champ plasmon et émet un champ à la longueur d'onde λ_{em} , (c) ce champ est transféré à la nanoparticule qui est excitée une seconde fois et amplifie une nouvelle le champ d'un facteur M .

Interprétation du spectre Raman Les modes de vibration et de rotation d'une molécule sont variés. Ils peuvent intervenir à l'échelle des liaisons entre atomes, mais aussi entre différentes parties de la molécule, si celle-ci présente une structure complexe, à l'image d'une protéine. En ce qui concerne les processus générant un signal Raman à l'échelle des liaisons, il peut s'agir d'étirement entre atomes, symétrique ou non, ou bien d'une pliure de la molécule, comme illustré en figure 1.28.

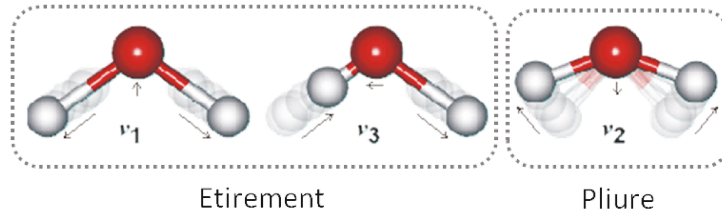


FIGURE 1.28 – Exemple de modes de vibration, par étirement ou pliure, d'une molécule simple, de l'eau, participant à l'émission Raman.

Chaque type de vibration génère une variation de la fréquence des photons absorbés qui lui est propre. Lorsque l'émission Raman d'une molécule comme le cholestérol par exemple

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

est collectée et dispersée sur un spectromètre, le spectre obtenu, visible en figure 1.29, révèle l'ensemble des fréquences émises par les liaisons ou par les sous-ensembles de la molécule entre eux après vibration. Chaque type de vibration est associé à une bande du spectre. Il est alors possible de reconstituer précisément la composition de la molécule excitée ainsi que sa structure en déterminant ainsi son empreinte moléculaire [Luo 2014].

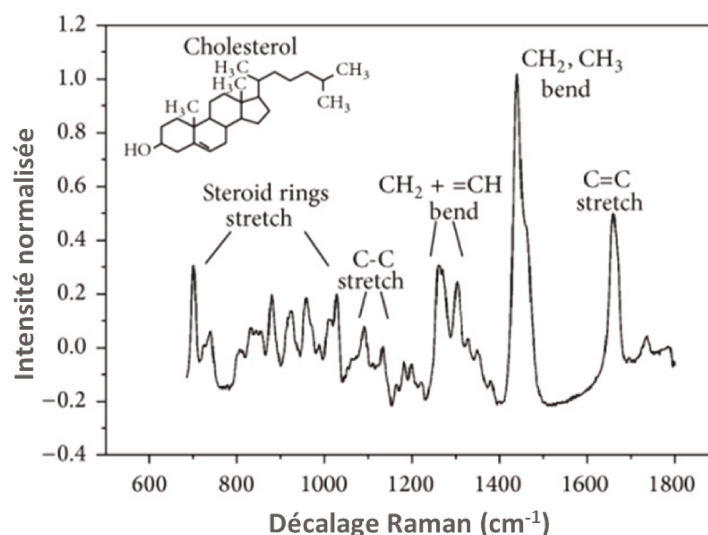


FIGURE 1.29 – Exemple du spectre Raman de la molécule de cholestérol et repérage des principales bandes caractéristiques de cette molécule donnant l'empreinte digitale de la molécule [Hanlon 2000].

Pour la plupart des protéines, le décalage Raman ne dépasse pas 3500 cm^{-1} , et les données principales de composition de la molécule sont concentrées de façon complexe entre 200 et 2000 cm^{-1} .

Ces informations de conformation des molécules sont précieuses pour l'étude de protéines impliquées dans le fonctionnement des cellules, dont les fonctions biologiques dépendent fortement de leur structure.

Les bandes Raman mesurées comportent différents types d'information. Leur position spectrale renseigne sur la famille de molécules présente (par exemple, alcane, amine, alcool, ester, amide...), leur largeur à mi-hauteur indique la structure de la molécule, et l'intensité détaille la concentration de la molécule désignée par cette bande.

1.3.2.2 État de l'art du couplage SPR/SERS

Plusieurs groupes de recherche ont exploité le potentiel du couplage entre SPR et SERS, prouvant l'intérêt porté à ce type de combinaison et son caractère prometteur.

Les prémices d'un tel système bimodal ont été mis en évidence pour la première fois par Nikitin et al [Nikitin 1997]. Ils mettent en avant la sélectivité et l'amplification de sensibilité permise par ce couplage appliqué à la détection du gaz de dioxyde d'azote. Deux phénomènes contribuent au signal SERS. Le premier concerne l'amplification du champ incident près de la surface

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

du réseau, choisi comme coupleur pour la création du plasmon de surface. Ensuite, le plasmon généré se couple à l'émission Raman du gaz. Une concentration de la dizaine de nanomolaire de NO_2 dans l'air a été détectée à la fois en SPR et en SERS grâce à la présence du réseau sinusoïdal.

Plus tard, Yih et al [Yih 2004] décrivent aussi un système de mesure simultanée de SPR et de SERS autour d'un substrat composé d'un film d'or de 30 nm d'épaisseur sur lequel sont déposées des billes d'or (voir figure 1.30). Par conséquent, des plasmons localisés et propagatifs sont excités sur ce même support. Le faisceau d'excitation des plasmons de surface, un laser He-Ne à 632,8 nm, est focalisé sur le substrat structuré du côté du prisme. La focalisation du laser joue le rôle d'un balayage angulaire puisque chaque rayon du pinceau de focalisation arrive avec un angle d'incidence différent sur le substrat. Les rayons réfléchis sont ensuite analysés par une barrette CCD. Ce laser sert aussi à exciter l'émission SERS, collectée au-dessus du substrat.

Le choix de la taille des nano-billes est crucial pour veiller à ne pas dégrader le signal SPR. Lorsque la taille des nano-particules augmente de quelques nanomètres (diamètre entre 2,7 et 4,1 nm), le profil angulaire de la résonance se trouve élargi, avec une diminution de son amplitude. Cet élargissement de la résonance proviendrait du couplage entre plasmon propagatif et plasmon localisé. Dès lors, il devient difficile de déterminer précisément le minimum de réflectivité, et une perte de résolution s'ensuit sur la mesure de SPR. Cependant, il a été prouvé que le signal SPR est augmenté (d'un facteur 2 à 4 environ) par la présence de ce film colloïdal. Hu et al [Hu 2004] montrent une amélioration de la détection SPR d'azote et d'hybridation de l'ADN en comparaison avec un film d'or continu.

Le spectre SERS de l'acide benzoïque est observé nettement sur un film colloïdal en argent par le biais de l'excitation par les plasmons propagatifs. Seule cette preuve de principe est avancée dans l'article de Yih. L'instrument n'est pas appliqué à une réelle détection couplée montrant des signaux SPR et SERS. La configuration Kretschmann agit plus comme méthode d'excitation que technique d'analyse complémentaire au SERS.

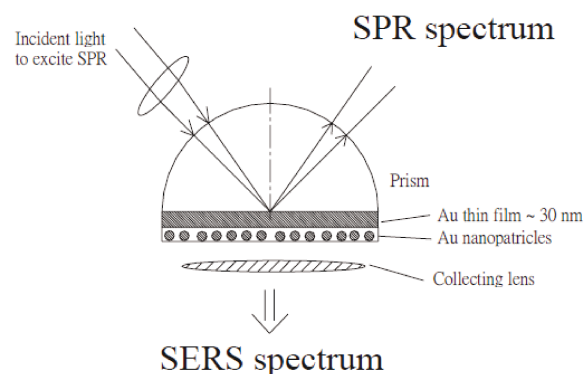


FIGURE 1.30 – Montage optique pour le couplage SPR et SERS présenté dans les travaux de Yih [Yih 2004].

Pour un couplage efficace, il est essentiel d'adapter la dimension des nanostructures pour que leur longueur d'onde de résonance se situe entre la longueur d'onde d'excitation laser et la

Chapitre 1. La détection d'interactions moléculaires par SPRI : principe et optimisation

longueur d'onde de diffusion Raman de la molécule analysée. La plage spectrale d'intérêt pour l'identification d'une molécule, exprimée en décalage de l'émission Raman par rapport à l'émission incidente et en nombre d'onde, est comprise entre 200 et 2000 cm^{-1} . A titre d'exemple, si un laser de 633 nm est employé comme source d'excitation, le spectre associé à l'empreinte moléculaire s'étale alors entre 640 et 725 nm. L'expérience de Driskell et al [Driskell 2006] se concentre sur l'optimisation de la taille de nanoparticules d'or déposées sur film d'or et fonctionnalisées avec du DSNB (5,5'-dithiobis- (succinimidyl-2-nitrobenzoate)) comportant un groupe NO_2 fortement vibrationnel, dont la bande d'émission se situe à 1336 cm^{-1} , soit une longueur d'onde de 690 nm. Ils mesurent un facteur d'amplification Raman le plus fort pour un diamètre de 60 nm de nanoparticules sphériques immobilisées à la surface d'un film d'or. En effet, pour ce diamètre, une résonance à 657 nm est observée, qui a la capacité de se coupler à la fois à l'excitation de la source laser, à 633 nm, et à l'émission de diffusion Raman, à 690 nm. Ce même groupe a réussi à détecter l'antigène spécifique de la prostate à la concentration du femtomolaire dans du sérum humain grâce à une mesure SERS effectuée sur ce type de substrat ainsi qu'à l'utilisation de la méthode sandwich [Grubisha 2003]. Cette mesure met en évidence le caractère ultra-sensible de la mesure SERS.

Cette géométrie de combinaison SPR/SERS avec SPR d'un côté du prisme et SERS de l'autre est également explorée par l'équipe de Liu [Liu 2010]. Les plasmons de surface jouent le rôle de pompage de l'excitation Raman. Leur montage de micro-spectromètre SPR-SERS a été breveté en 2005. Un film d'argent sert de transducteur. Le couplage est validé sur la mesure du spectre du thiophénol, molécule modèle en SERS du fait de sa grande section efficace.

Le groupe de Meyer [Meyer 2011] a fait le choix d'utiliser un substrat d'or continu, plus facile à réaliser et à contrôler qu'un film nanostructuré.

Dans la première configuration optique qu'ils développent, en géométrie Kretschmann, la mesure SERS est récoltée par rétro-diffusion, du côté du prisme (schéma 1.31.a). Les molécules adsorbées sur le capteur sont excitées par le plasmon de surface propagatif généré par une incidence laser à 633 ou 647 nm.

La récolte de l'émission Raman par rétro-diffusion implique une optimisation optique. En effet, puisque les molécules sont excitées depuis le côté du prisme, elle vont réémettre la lumière suivant une répartition conique, d'angle proche de l'angle de résonance, vers cette même direction. Dans le but de récolter le maximum de ce cône d'émission Raman, un objectif de microscope est ajouté sur le trajet du faisceau incident. Pour conserver la collimation de la lumière incidente sur le prisme, le laser est focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif. Le plasmon de surface reste ainsi excité efficacement. Les performances du système sont évaluées sur le cas modèle du colorant "Nile blue". L'intensité SERS et l'amplitude de la résonance sont les plus grands lorsqu'un objectif x10 (ON environ 0,3) associé à une illumination dans son plan focal arrière sont utilisés.

1.3. Émergence de la bimodalité : couplage de la détection SPR avec une autre technique d'analyse complémentaire

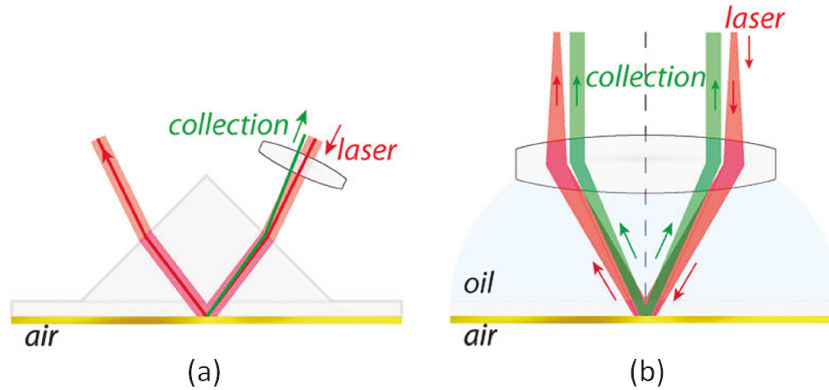


FIGURE 1.31 – Illustration de deux configurations de couplage SPR/SERS explorée par le groupe de Meyer. La première correspond au montage mis en place dans un premier temps, une seule direction de l'émission Raman en rétrodiffusion est analysée, la seconde est optimisée pour récolter l'ensemble du cône d'émission Raman. Cette figure est adaptée de l'article [Meyer 2012].

Une optimisation du système optique est présentée dans un second article [Meyer 2012]. La totalité du cône d'émission Raman par rétrodiffusion est récoltée grâce au positionnement de l'objectif dans un plan parallèle au film d'or (schéma 1.31b). Un cube de verre incliné inséré sur le trajet optique du laser réalise le déplacement du laser dans le plan de l'objectif, ce qui permet le réglage de l'angle d'incidence sur le prisme.

La subtilité de cette méthode repose sur le compromis à trouver concernant la taille du faisceau laser. Le Raman requiert une taille de faisceau la plus petite possible, au mieux égale à la limite de diffraction de l'objectif, de façon à obtenir une meilleure résolution spatiale et une intensité d'excitation plus grande. A l'inverse, une réduction de faisceau trop importante augmente la divergence du laser, dégradant la collimation et donc la sensibilité de la mesure SPR. De plus, lorsque la résonance s'élargit, l'excitation du plasmon est moins grande, et par conséquent l'efficacité SERS diminue.

Seule une preuve de principe expérimentale est donnée avec la mesure du spectre du colorant "Nile blue".

1.4 Conclusion

La détection par SPRI permet de suivre un grand nombre d'interactions moléculaires en temps réel, de façon quantitative et rapide, et sans marquage. Ces atouts sont contrebalancés par une spécificité de mesure reposant sur celle des molécules sondes immobilisées à la surface du capteur et sur la qualité de la chimie de surface. La limite de détection de la mesure est insuffisante dans la perspective d'adresser des enjeux de santé tels que la détection de bio-marqueurs en faible concentration ou de toxines de très petite taille.

Différentes voies d'amélioration de la détection ont été reportées, telles que les formats sandwich, par compétition ou par inhibition, l'amplification par des nanoparticules, la nanostructuration du transducteur ou l'optimisation du système fluide. La sensibilité de mesure peut aussi être exaltée par mesure complémentaire de fluorescence.

Toutefois, ces méthodes présentent plusieurs inconvénients : interactions supplémentaires, étapes de marquage nécessaires ou encore complexité de mise en œuvre, et elles n'apportent pas spécialement de sélectivité à la mesure. En revanche, la spectrométrie de masse recèle cette propriété de spécificité, délivrée sous réserve de destruction de l'échantillon biologique.

Une solution prometteuse pour développer un nouveau type de bio-capteur quantitatif, sélectif, sans marquage et non invasif consiste à coupler SPRI et SERS. Le tableau 1.32 met en regard les qualités et limites des deux systèmes, en pointant leur complémentarité.

SPRI	SERS
+ Multiplexage (Imagerie)	- Champ limité (mesure par balayage)
+ Temps réel	- Pas de mesure de cinétique
+ Quantification	- Difficile à quantifier
- Faible sélectivité	+ Identification (empreinte biochimique de la molécule)
- Détection de molécules > kDa	+ Détection de petites molécules efficace

FIGURE 1.32 – Résumé des atouts et inconvénients des méthodes de détection SPRI et SERS.

Différents essais de couplage SPR et SERS rapportent principalement la faisabilité instrumentale de cette combinaison. Une résonance SPR ainsi qu'un spectre SERS peuvent être acquis simultanément dans un même instrument. Certains groupes ont fait le choix de conserver un substrat simple, non structuré, en exploitant le potentiel d'excitation des plasmons de surface propagatifs qui servent de pompe à l'émission Raman avec une illumination laser. D'autres prennent le parti de déposer des nanoparticules à la surface du film métallique. Plusieurs architectures optiques sont testées, les deux mesures étant soit dissociées, l'une au-dessous du prisme, l'autre au-dessus, soit localisées du côté du prisme par mesure SERS en

rétro-réflexion.

Toutefois, aucune mesure de bio-détection n'est mise en œuvre pour démontrer la force de l'assemblage des deux méthodes sur un cas biologique concret et une mesure dynamique.

Le but de cette thèse consiste à développer un instrument bimodal associant SPRI et SERS et à démontrer le potentiel de cette analyse double sur une interaction moléculaire modèle, avant la mise au point d'applications biologiques plus délicates pouvant avoir lieu dans des milieux complexes. Les deux méthodes sont organisées autour d'une chambre d'expérience, où l'interaction moléculaire se déroule en milieu liquide, la mesure SPR ayant lieu par le dessous du prisme de couplage en configuration Kretschman, illuminé par une source à LEDs, tandis que la mesure Raman s'effectue par le dessus du prisme, grâce à une source laser qui lui est propre. En outre, le transducteur est un film d'or nanostructuré par un réseau périodique de nanodisques en or.

Le découplage des sources d'illumination SPRI et SERS permet d'optimiser les deux mesures sans avoir à instaurer de compromis quant à la taille et à la nature du faisceau : une source laser compliquerait beaucoup l'imagerie SPR à cause du phénomène de speckle, et une focalisation laser est essentielle pour l'excitation Raman. L'utilisation du film structuré périodique, et non colloïdal, assure l'exaltation de l'émission Raman, la reproductibilité des résultats et la possibilité de modéliser précisément les modes électromagnétiques de ce type de structure.

Développement de l'instrument

Sommaire

2.1 L'organisation du projet	58
2.1.1 Les partenaires	58
2.1.2 La répartition du travail	59
2.1.3 Développement instrumental dans le cadre de cette thèse	62
2.2 Module SPRI	65
2.2.1 Le système d'illumination	67
2.2.2 Considérations d'optique instrumentale	77
2.2.3 La cellule fluïdique, pièce maîtresse du prototype	86
2.2.4 Pilotage d'une expérience SPRI	91
2.2.5 Performances instrumentales	94
2.3 Module SERS	111
2.3.1 Développement du module de balayage angulaire du laser	112
2.3.2 Performances instrumentales	118
2.4 Conclusion	126

Les partenaires du projet ANR Piranex, dans le cadre duquel cette thèse CIFRE s'inscrit, ont décidé de développer un système de couplage de la SPRI avec la spectrométrie Raman exaltée de surface dans le but d'améliorer la sensibilité et la sélectivité de la détection. Ainsi, l'interaction moléculaire étudiée bénéficie :

- d'une part de la quantification en temps réel et à haut débit permise par la SPRI, qui mesure un signal en variation de masse par unité de surface sur le substrat métallique,
- et d'autre part, de l'identification hautement spécifique de l'espèce moléculaire capturée sur le substrat après interaction grâce à la mesure du spectre Raman exalté qui détaille la composition chimique et la structure dimensionnelle de la molécule.

La mesure SPRI est implémentée en configuration Kretschman avec une source à LEDs, en interrogation spectrale, tandis que la mesure SERS a lieu de l'autre côté du prisme, avec une excitation laser au-dessus du substrat, qui est nanostructuré. Le protocole général d'une expérience couplée, illustré en figure 2.1, débute par une acquisition de spectres SERS de référence avant interaction sur chaque plot biologique. Ensuite, une solution cible est injectée à la surface de la biopuce dans une cellule fluïdique adaptée aux deux types de mesure. Le processus cinétique est enregistré par mesure SPRI. Pour finir, les molécules capturées par les sondes sont excitées par la source laser afin de déterminer précisément leur nature.



FIGURE 2.1 – Déroulement général d'une mesure couplée SPRI/SERS.

Ce chapitre débute par une présentation du projet ANR et se poursuit par une description technique de l'instrument développé au cours du projet. Les parties SPRI et SERS sont adressées l'une après l'autre et caractérisées. Les premiers résultats de ce couplage sont ensuite rapportés dans le dernier chapitre.

2.1 L'organisation du projet

Il convient de faire le point sur l'organisation de ce projet hautement interdisciplinaire qui fait appel à plusieurs savoir-faire, et par conséquent plusieurs acteurs, académiques et industriels.

2.1.1 Les partenaires

Le consortium créé pour mener ce projet à bien est composé de partenaires apportant chacun leur expertise dans un des domaines scientifiques abordés par cette problématique de la combinaison SPRI et SERS. Il s'agit de cinq laboratoires et d'une entreprise. Plus précisément, les partenaires qui interviennent dans ce projet sont les suivants :

- l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF) à la faculté d'Orsay fabrique les substrats nanostructurés qui sont au coeur du fonctionnement de l'appareil bimodal,
- l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) met au point une chimie de surface optimisée pour ces substrats nanostructurés,
- le laboratoire de Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT) à Villetaneuse caractérise les substrats par leur réponse SERS et soutient le développement de l'instrument en apportant ses connaissances sur la spectroscopie Raman,
- le laboratoire Charles Fabry (LCF) déploie son expérience en instrumentation SPRI pour aider au développement du prototype et travaille avec l'IEF sur la modélisation de la réponse électromagnétique des substrats nanostructurés pour l'optimisation du design de ces structures, qui sont ensuite caractérisées par des mesures SPRI,
- l'entreprise Horiba Jobin-Yvon (HJY) développe l'instrument bimodal avec l'appui du LCF pour la partie SPRI et du CSPBAT pour la partie SERS. Elle fait part de son expérience dans l'ingénierie des systèmes SPRI et Raman qu'elle commercialise depuis plusieurs années.
- le laboratoire d'Ingénierie Analytique et Qualité des Aliments (IAQA) au sein d'AgroParistech soutient le projet en qualité d'utilisateur final de l'instrument par l'apport d'une application concernant la détection d'un contaminant alimentaire.

Le schéma 2.2 décrit ces différents acteurs du projet ANR Piranex en soulignant les savoir-faire principaux de chacun.

Plusieurs doctorants ont participé à l'aboutissement du projet grâce au financement de l'ANR qui soutient trois thésards : Jean-François Bryche de l'IEF pour la fabrication des substrats, leur caractérisation et leur modélisation, Raymond Gillibert, employé Horiba et détaché au CSPBAT, pour les mesures SERS, et moi-même, également employée Horiba et détachée au LCF, en charge du développement et de la caractérisation du prototype instrumental.

D'autres collègues ont également beaucoup œuvré pour la réalisation de ce système, notamment Alexandra Sereda [Sereda 2014a], qui a mis au point la source utilisée pour les mesures SPRI lors de sa thèse CIFRE avec l'entreprise Horiba, Mitradeep Sarkar et Mondher Besbes du LCF, qui étaient en charge des simulations électromagnétiques des nanostructures.

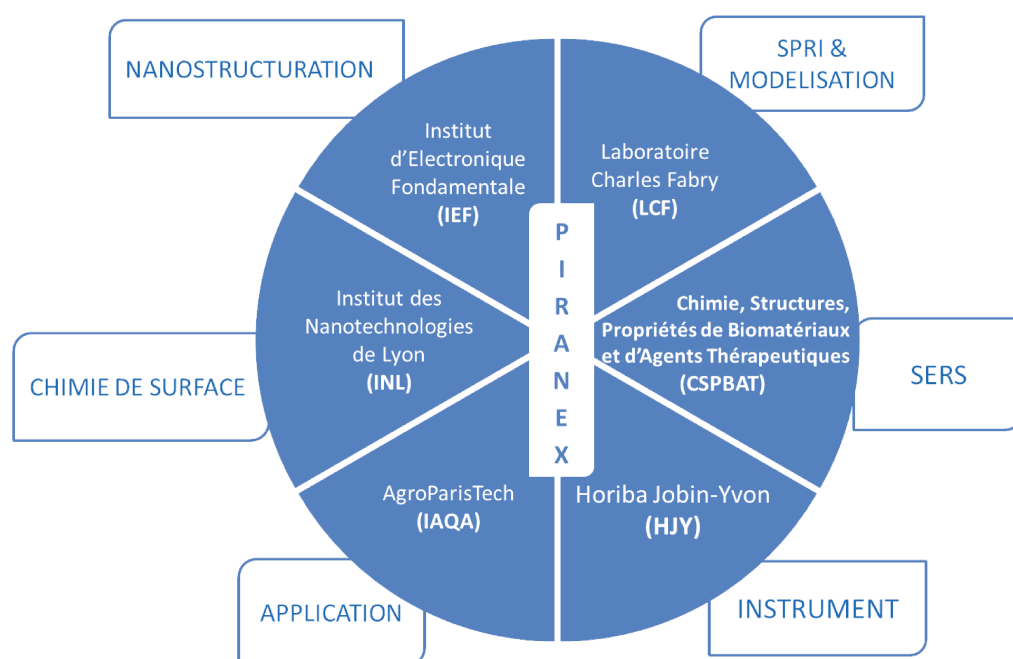


FIGURE 2.2 – Présentation des collaborateurs du projet Piranex et de leur expertise

2.1.2 La répartition du travail

La conception du prototype de l'instrument bimodal adresse un grand nombre d'enjeux, tant sur le plan de la mise au point des substrats et des applications biologiques modèles visées que sur le plan du développement du système en lui-même. Il a donc été décidé d'organiser le travail sous forme de tâches réparties entre les différents partenaires en correspondance avec leur savoir-faire. Ces tâches sont synthétisées dans le schéma 2.3, en précisant quel acteur est en charge de chacune d'elles.

L'optimisation des substrats constitue un enjeu majeur, au centre du fonctionnement de l'appareil. Le substrat sert de support aux interactions moléculaires et se trouve à la base de la transduction optique. La transduction optique correspond à la traduction d'un phénomène

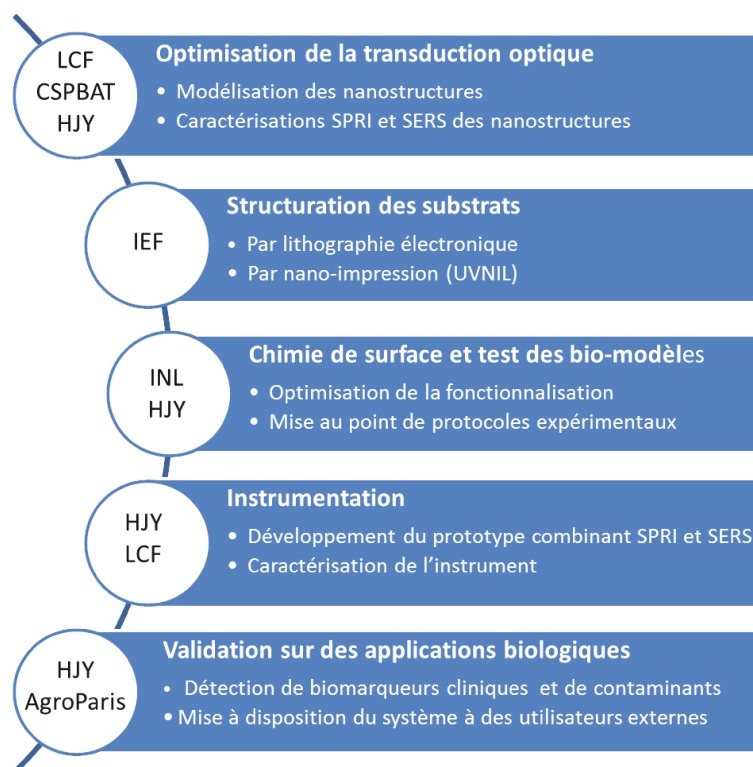


FIGURE 2.3 – Détail des groupes de travail définis pour traiter les différentes tâches à accomplir pour concevoir l'instrument bimodal final

physique ou chimique en un signal optique mesurable. Dans le cas de l'instrument bimodal, deux types de signaux sont mesurés :

- le décalage, spectral ou angulaire, de la résonance plasmonique côté SPRI, induit par une variation d'indice de réfraction à la surface du substrat fonctionnalisé suite à la capture de molécules d'intérêt par des molécules réceptrices,
- et un spectre en intensité côté SERS, correspondant au spectre de vibration Raman des molécules capturées.

Chacun de ces processus de transduction doit donc être optimisé sur un substrat commun aux deux mesures, ce qui représente un réel défi. Il s'agit alors de déterminer la forme et les dimensions des nanostructures qui donnent à la fois une grande sensibilité à une variation de masse et une intensité exaltée de la diffusion Raman (discussion détaillée en partie 3.1.3, page 136).

Ces structures sont ensuite fabriquées dans un premier temps par lithographie à faisceau d'électrons, une méthode maîtrisée et reproductible, mais coûteuse et relativement longue en terme d'écriture du motif de structures (4h de lithographie pour une surface structurée de 1 mm²). Pour satisfaire la demande en substrats nécessaires à la validation de l'instrument

2.1. L'organisation du projet

et au test des applications biologiques, la technique de la nano-impression est aussi explorée. Ces différentes méthodes de fabrication sont développées un peu plus en détail dans le dernier chapitre.

L'utilisation de ces substrats en tant que biopuces repose sur la mise au point d'une chimie de surface efface servant à fixer les molécules sondes sur le capteur. De plus, leur application à la détection de biomarqueurs nécessite de développer des protocoles de mesure robustes.

La tâche concernant le développement de l'instrument est celle traitée dans ce document. Le système est validé sur une expérience couplant SPRI et SERS dans la perspective de pouvoir le confronter à des tests biologiques plus poussés et de le mettre à la disposition de groupes de recherche externes afin d'élargir ses applications.

Les étapes clé de ce projet multidisciplinaire sont décrites dans le calendrier organisationnel de la figure 2.4. Cette représentation permet de souligner leur interdépendance et de prendre conscience de la chronologie des événements.

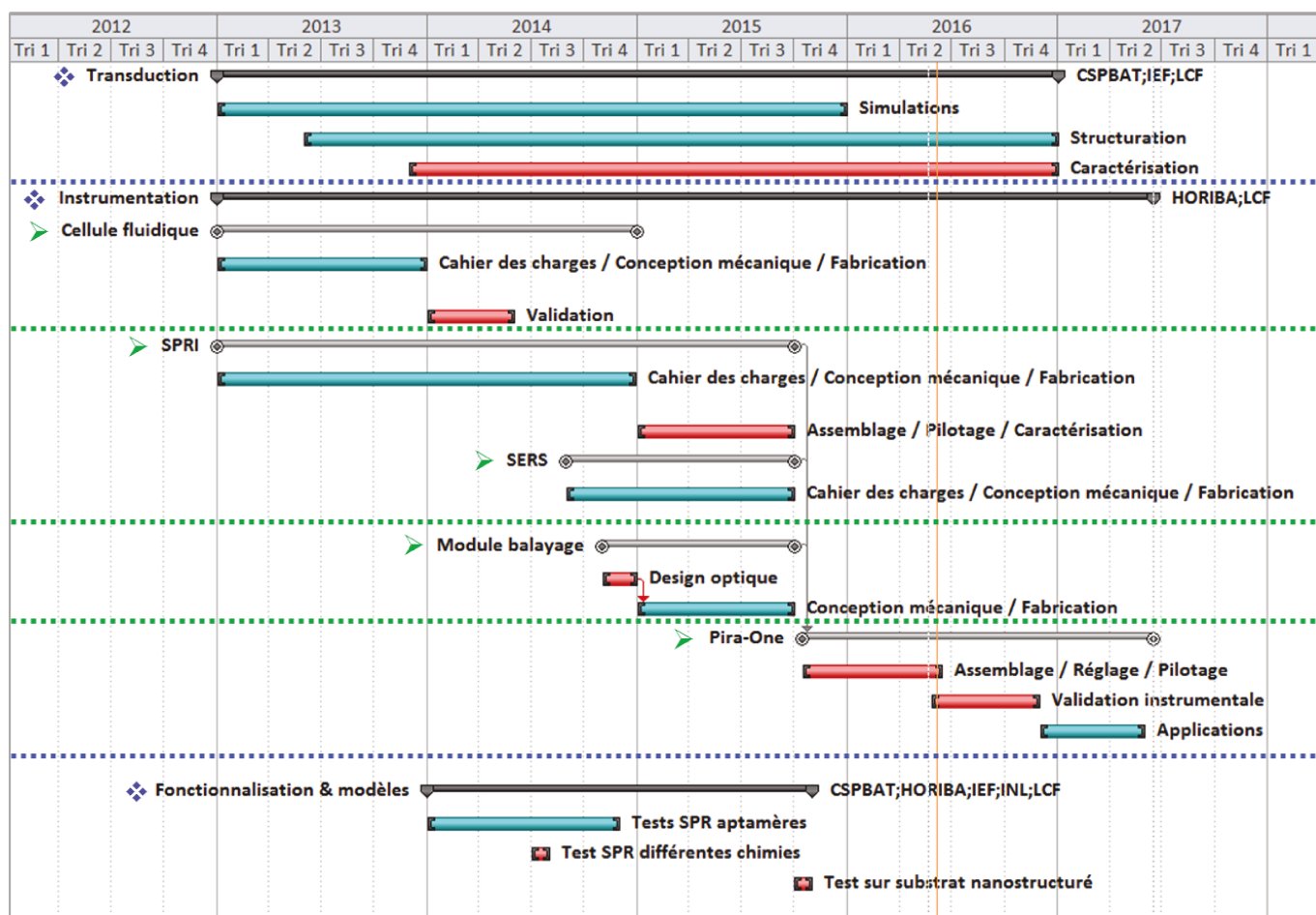


FIGURE 2.4 – Déroulement du projet avec détail des principaux jalons des missions de Transduction, d'Instrumentation et de Fonctionnalisation. Les tâches de couleur rouge sont celles englobées par mon travail de thèse. Les acteurs de chaque mission sont également cités.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

Cet agenda montre que trois missions ont commencé parallèlement et ont pu évoluer simultanément, à savoir l'optimisation de la transduction, le développement de l'instrument, et la mise au point de la fonctionnalisation chimique et biologique.

D'abord, la forte dépendance entre l'optimisation de la transduction et la fabrication est soulignée. Il s'agit d'une rétroaction constante entre simulation, réalisation et mesure des performances des nanostructures en SPRI et en SERS. Cette étape a nécessité une interaction et des échanges omniprésents entre l'IEF, le LCF et le CSPBAT pour réussir à converger vers des paramètres de fabrication optimaux et reproductibles pour le SERS et la SPRI. Une fois des dimensions de structures définies par des calculs électromagnétiques au LCF comme étant opérationnelles pour des mesures de SPRI et de SERS, elles sont fabriquées par lithographie électronique à l'IEF, observées au microscope électronique à balayage, puis, si leur homogénéité est suffisante, envoyées au LCF pour mesure SPRI, et au CSPBAT pour mesure SERS.

En parallèle de cette optimisation des substrats, le développement du système a également été lancé. Pour commencer, un cahier des charges a été défini, regroupant des briques technologiques déjà existantes chez Horiba, et d'autres complètement nouvelles. Ces idées ont ensuite été mises en forme lors de la conception mécanique pour pouvoir enclencher la fabrication du prototype. Une fois les éléments livrés, l'assemblage et le pilotage des parties SPRI et Raman ont pu être effectués.

Simultanément, des améliorations de la chimie de surface et des tests sur les bio-modèles ont été engagés à l'INL et chez Horiba.

Pour conclure sur la validation de l'instrument, chacune de ces tâches devait être aboutie, c'est-à-dire que l'on devait disposer à la fois du système bien réglé et caractérisé, de substrats nanostructurés fiables, sensibles en SPRI et amplifiant suffisamment l'émission Raman, et d'une chimie de surface maîtrisée. Plus encore, il a fallu trouver une expérience de référence validant le couplage de la mesure SPRI/SERS, faisant intervenir une interaction moléculaire avec une cible oligonucléotide délivrant un signal SERS facilement détectable. Ces conditions ont été réunies avec du retard par rapport au planning initial, ce qui explique pourquoi peu de résultats de mesures couplées sont présentés dans ce manuscrit. Le développement des applications du système se poursuit grâce à l'obtention d'un prolongement du projet.

2.1.3 Développement instrumental dans le cadre de cette thèse

En ce qui concerne la stratégie adoptée pour un développement efficace de l'appareil, une conception modulaire a été décidée, c'est-à-dire que la partie de l'instrument dédiée à la mesure SPRI est mise au point en parallèle de celle qui réalise la spectroscopie Raman, la cellule fluide étant elle aussi un module à part entière. L'assemblage des deux modules SPRI et SERS est permis par un autre module intermédiaire qui comporte en particulier l'objectif de microscope essentiel à la mesure Raman, ainsi qu'un système de balayage du faisceau laser introduit dans la perspective d'implémenter une cartographie de l'intensité Raman d'un échantillon.

Pour que ces modules s'imbriquent et soient compatibles, une attention spécifique a été portée à la création de la cellule fluide, chambre commune des expériences de SPRI et de SERS, qui soit adaptée à ces deux types de mesures. Ce choix de fabrication par briques élémentaires se justifie aussi par le fait que l'entreprise Horiba produit des instruments SPRI et Raman sur

deux sites différents, à Palaiseau et à Villeneuve d'Ascq respectivement, qui servent de base à la conception de l'instrument couplé. Il s'agit de l'OpenPlex pour la SPRI et de l'Xplora pour le Raman. L'architecture principale de ces appareils a été conservée, et des modifications ont été apportées pour assurer la combinaison des mesures.

Le prototype final, appelé Pira-One, première version d'instrument financé par l'ANR Piranex, est présenté sur la figure 2.5. Les différents blocs instrumentaux sont repérés sur la vue CAO du prototype.

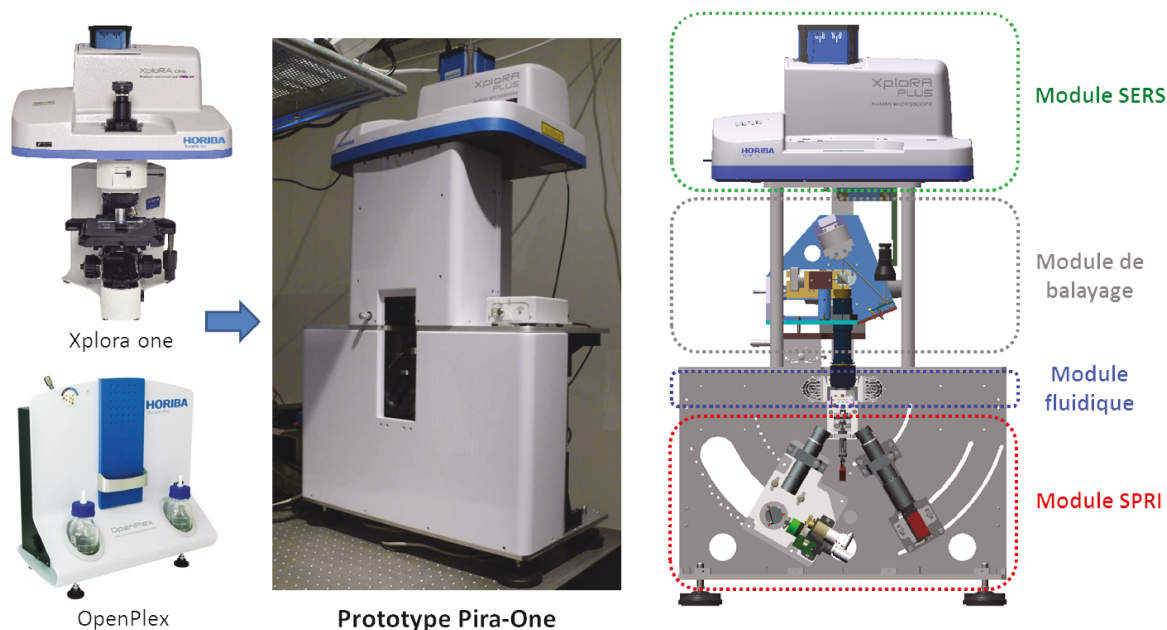


FIGURE 2.5 – Photographie du prototype d'instrument bimodal du projet Piranex, nommé Pira-one, inspiré de deux systèmes commercialisés par Horiba, l'OpenPlex pour la SPRI, et l'Xplora One pour la spectroscopie Raman. Une vue CAO du prototype souligne la stratégie modulaire mise en place pour le développement de l'instrument.

Les remodelages des instruments commerciaux et innovations intégrées à ce prototype font l'objet de la suite du chapitre, qui traite séparément le module SPRI, dans lequel le module fluïdique sera également présenté, et le module SERS, incluant la description du module de balayage laser.

Les différents points clé du développement instrumental du prototype bimodal sont mis en évidence sur le schéma général de l'instrument de la figure 2.6 par des encadrés en pointillés bleus. Il s'agit de :

- **La source multi-spectrale** : le premier élément critique sur lequel ont portés nos efforts est la source, point développé en partie 2.2.1. En effet, ses performances en terme de stabilité en intensité et en longueur d'onde sont déterminants pour la mesure SPRI par interrogation spectrale.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

- **Le prisme** : c'est un élément essentiel à la qualité de l'imagerie. Son design fait l'objet des paragraphes 2.2.2.2 et 2.2.2.3.
- **La cellule fluide** : elle doit permettre à la fois une mesure SPRI et une mesure SERS. Elle est innovante dans le sens où elle est équipée d'un hublot de verre qui sert de fenêtre d'analyse Raman. Sa description et sa caractérisation sont reportées en parties 2.2.3 et 2.2.5.2.
- **Le module de balayage Raman** : le montage Raman comprend un système de balayage laser spécialement conçu pour le prototype. Il a été développé pour pouvoir analyser une surface de la biopuce de l'ordre du mm^2 et ainsi couvrir le champ de vision de l'objectif sans déplacement mécanique du montage. Ce module est discuté en partie 2.3.1.

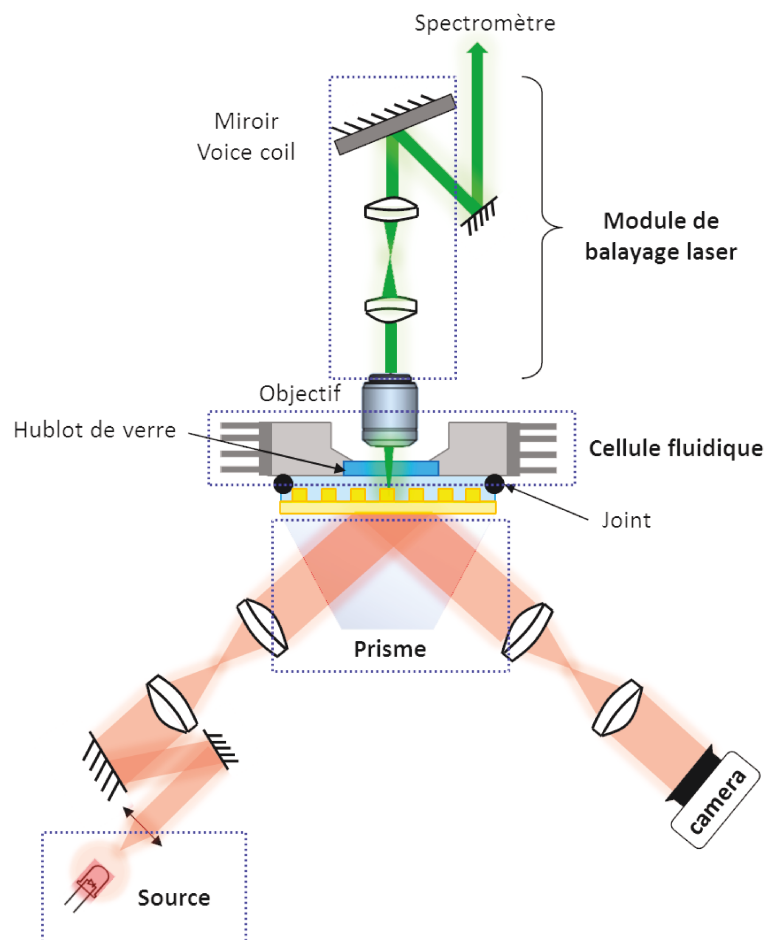


FIGURE 2.6 – Représentation schématique du prototype bimodal couplant SPRI et SERS. Les points clés développés dans la suite du chapitre sont repérés par des encadrés en pointillés bleus : il s'agit de la source SPRI, le prisme, la cellule fluide et le système de balayage laser.

2.2 Module SPRI

Cette partie décrit les principales caractéristiques optiques du prototype en SPRI. Le montage optique illustré par un schéma et une photographie en figure 2.7 est composé de trois blocs : un bras source et un bras imagerie articulés autour de la cellule fluïdique.

Le bras source comprend une source à LEDs permettant d'implémenter l'interrogation spectrale, un collimateur, un polariseur définissant la polarisation TM ou TE, un miroir de renvoi, un miroir rotatif qui règle l'angle d'incidence autour d'une position centrale sur une plage de $\pm 4^\circ$ et un système afocal conjuguant ce miroir au prisme (cette conjugaison est décrite en partie 2.2.2.1).

La cellule fluïdique est composée d'un joint, d'une sonde de température, de régulateurs Peltier et de radiateurs. Elle comprend des orifices d'entrée et de sortie entre lesquels circule une solution, transportée par des tuyaux peek et guidée par une pompe péristaltique. Un système de boucle à injection permet de délivrer un volume fixe de solution cible et un dégazeur inséré sur le trajet du fluïde limite la formation de bulles en chassant l'air des tuyaux. La cellule est dotée d'un hublot de verre pour être compatible avec une mesure SERS. Cette pièce est délicate dans le sens où de nombreuses fonctionnalités sont concentrées dans un espace restreint.

Le bras imagerie est constitué d'un système afocal qui conjugue le prisme à une caméra CCD.

L'angle d'incidence central peut être fixé entre 20° et 65° par rapport à la surface du prisme en déplaçant manuellement les plateaux source et imagerie supportant les deux bras.

L'ensemble de ces blocs est fixé sur un socle vertical de sorte que le prisme vient se plaquer contre la cellule fluïdique grâce à un vérin qui maintient une pression, rendant la cellule étanche. Cette géométrie verticale rend le système moins encombrant et adapté à un couplage avec le système SERS, positionné au-dessus de cet ensemble.

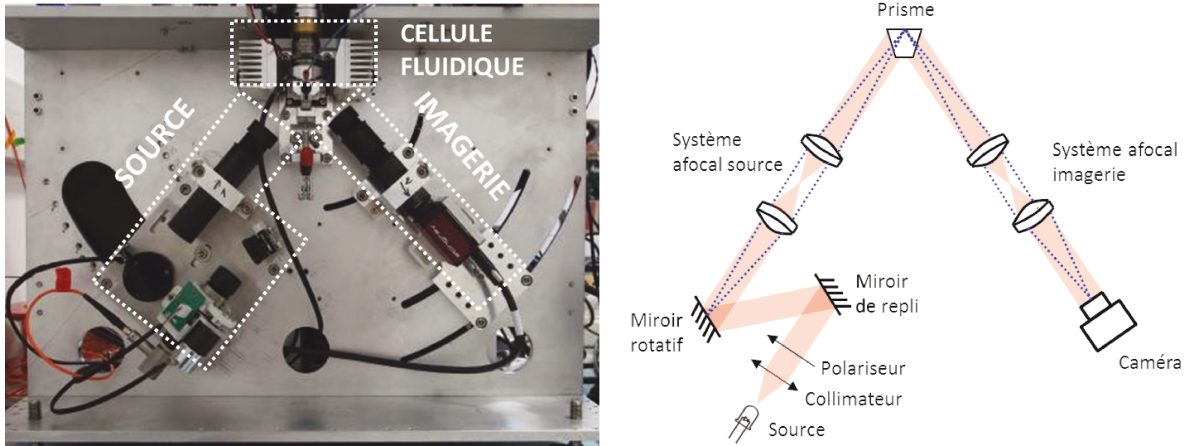


FIGURE 2.7 – Montage optique de la partie SPRI du prototype

Avant de rentrer dans des considérations techniques, un premier aperçu du déroulement d'une expérience SPRI est proposé ici. Le système fonctionne sur le concept d'imagerie multi-spectrale grâce à l'utilisation d'une source à LEDs fibrée développée dans le cadre de la thèse d'Alexandra Sereda [Sereda 2014a]. L'idée consiste à prendre N images de la biopuce au temps t à N longueurs

Chapitre 2. Développement de l'instrument

d'onde différentes ($N=5$ dans le cas de la source à LEDs) afin d'en extraire le signal SPR au cours du temps grâce à la reconstruction du profil de résonance par une fonction mathématique. Pour mettre en œuvre ce principe de mesure, les principales étapes nécessaires à l'acquisition du signal en interrogation spectrale sont décrites :

- Un plasmon angulaire est acquis à la longueur d'onde centrale de la source grâce au balayage mécanique du miroir rotatif du bras source.
- L'angle de travail est choisi comme l'angle donnant le minimum de réflectivité à cette longueur d'onde. Ce choix permet de positionner des points de mesure autour de la résonance afin de pouvoir déterminer la position du minimum.
- Des régions d'intérêt (ROI) sont définies à partir de l'image de la biopuce à l'angle de travail choisi, au niveau des plots biologiques créés lors de l'immobilisation des sondes.
- Au cours du temps, des images sont acquises à chaque longueur d'onde de la source à LEDs et le signal de réflectivité est extrait pour chaque ROI.
- La position de la résonance est calculée par l'ajustement des valeurs de réflectivité obtenues à chaque longueur d'onde de la source par une fonction mathématique, couramment une pseudo-lorentzienne ou un polynôme, grâce à un traitement Matlab (voir la figure 2.8). La longueur d'onde de la résonance est alors déterminée analytiquement par le calcul de la longueur d'onde du minimum de réflectivité de cette fonction.

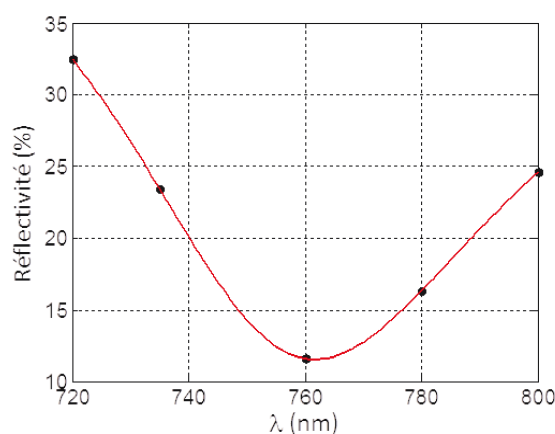


FIGURE 2.8 – Illustration de la reconstruction du profil de résonance par ajustement des 5 valeurs de réflectivités acquises au temps t à chaque longueur d'onde de la source à LEDs sur une région d'intérêt de la biopuce.

Les différents blocs modulaires, à savoir, la source, la cellule fluide et l'imagerie, sont présentés et caractérisés dans cette partie, en soulignant les principes optiques déterminant la qualité de l'imagerie et les performances de détection.

Une attention particulière est portée à la stabilité de la source, à la qualité de la conjugaison miroir-biopuce-caméra, au design du prisme, et à la robustesse de la cellule fluïdique, points essentiels au bon déroulement d’une expérience SPRI.

Remarque : ce chapitre fait référence à des angles d’incidence externes ou internes, définis sur le schéma 2.9 : l’angle appelé externe est l’angle fait entre le plan de la lamelle de verre et le rayon incident à l’extérieur du prisme, et l’angle interne est celui fait entre le rayon à l’intérieur de la lamelle de verre et sa normale.

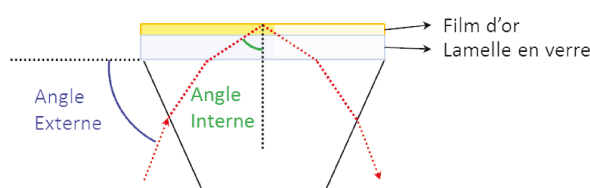


FIGURE 2.9 – Définition des angles externes et internes auxquels ce chapitre fait référence.

2.2.1 Le système d’illumination

Pour commencer la description du montage, prenons le temps de présenter la source, élément novateur par rapport aux instruments SPR commerciaux Horiba. Le prototype de cette source a été développé par Alexandra Sereda lors de sa thèse CIFRE au laboratoire Charles Fabry et à Horiba Jobin-Yvon de 2010 à 2013. A la suite de sa thèse, Alexandra a participé à la mise au point d’un système plus stable, qui équipe l’instrument présenté ici. Il s’agit d’une source fibrée composée d’une roue de cinq LEDs successivement adressées par une fibre optique de diamètre 365 μm montée sur un support motorisé. Une modélisation 3D de ce module est visible en figure 2.10.

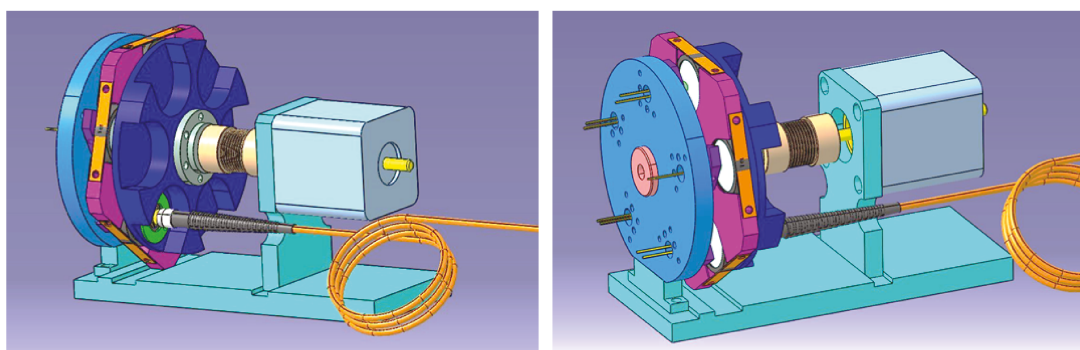


FIGURE 2.10 – Vue CAO du système d’illumination composé de 5 LEDs adressées successivement par une fibre montée sur une roue motorisée. Ce dispositif a été conçu par André Guilbaud, de l’atelier de mécanique au laboratoire Charles Fabry.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

Les cinq longueurs d'onde sont choisies typiquement entre 750 et 850 nm suivant le type de substrat utilisé. Le choix de la gamme spectrale d'illumination fait l'objet du point 2.2.1.4 abordé dans cette partie.

Cette source multi-spectrale permet une mesure par interrogation spectrale. Elle est collimatée par un miroir parabolique hors axe qui présente l'avantage d'être achromatique. Cette propriété est indispensable puisque l'on travaille avec différentes longueurs d'onde. Le collimateur utilisé sur le prototype provient de chez Thorlabs (RC08SMA-P01). Son diamètre vaut 8,5 mm et sa focale 33 mm. Son foyer est situé à 90° de l'axe optique du faisceau sortant collimaté. Le diamètre de la fibre étant relativement large, les rayons les plus éloignés de l'axe optique seront légèrement divergents, faisant un angle par rapport à l'axe, dessiné en figure 2.11, égal à :

$$\theta_{div} = \arctan\left(\frac{R_{fibre}}{f_{coll}}\right)$$

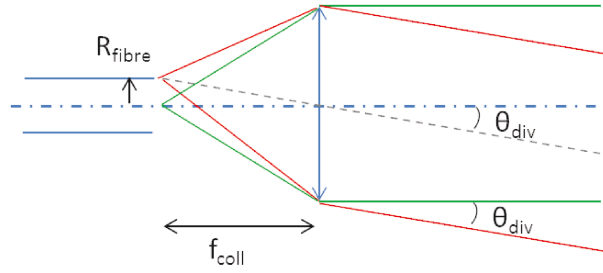


FIGURE 2.11 – Illustration de la divergence résiduelle du faisceau collimaté due à l'étendue de la source fibrée. Le système est déplié et le miroir parabolique substitué par une lentille équivalente pour faciliter le tracé de rayons.

Avec la fibre de diamètre 365 μm utilisée sur le prototype, l'angle résiduel traduisant l'imperfection de la collimation vaut 5,5 mrad dans l'air.

Un polariseur muni d'une fourche optique permet de choisir le mode d'illumination en TE ou TM grâce à un système mécanique décrit sur la figure 2.12. Ce système simple permet de se passer d'un moteur pas à pas, plus cher et encombrant.

La polarisation est contrôlée par l'application d'une tension. Lorsqu'un changement de polarisation est requis, la sortie est activée, c'est-à-dire qu'elle passe d'un état de circuit ouvert (résistance infinie) à un circuit fermé (résistance de 500 Ω), délivrant alors une tension de 12V. Le moteur se met en mouvement jusqu'à ce que la fourche optique détecte une variation de signal. S'il s'agit d'une augmentation de signal, c'est la polarisation TE, dans le cas contraire, c'est la polarisation TM. La polarisation TM est ajustée en se plaçant proche de la résonance d'une lame d'or et en minimisant la réflectivité sur l'image caméra.

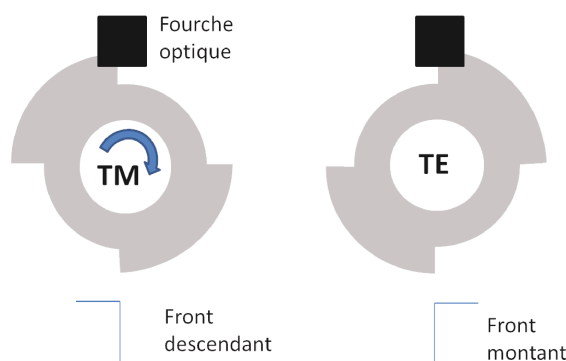


FIGURE 2.12 – Schéma du fonctionnement du changement de polarisation TM ou TE grâce à une mécanique simple associée à une fourche optique.

Cette solution d'illumination compacte et peu coûteuse se substitue au monochromateur classiquement utilisé pour réaliser une mesure SPRI par suivi de la résonance. Les principales qualités que doit présenter une source pour un système SPRI sont :

- un **flux** assez élevé permettant de choisir un temps de pose du capteur qui ne limite pas la vitesse d'acquisition du détecteur, et donc la cadence de mesure.
- une **stabilité en intensité** suffisante pour atteindre la résolution standard de 10^{-6} RIU des appareils de SPRI. Sachant que la sensibilité moyenne d'un système SPRI est de l'ordre de 10 000 %/RIU, le critère de stabilité en intensité se traduit par une variation de réflectivité inférieure à 0,01%.
- et une **stabilité spectrale** de l'ordre de la dizaine de picomètres pour obtenir cette même limite de détection de 10^{-6} RIU, sachant que la sensibilité spectrale d'une mesure SPRI sur un film d'or de 50 nm d'épaisseur avoisine 7 000 nm/RIU.

Les valeurs de sensibilité en variation de réflectivité et de sensibilité spectrale sont tirées des calculs de la thèse d'Emmanuel Maillart [Maillart 2004a] pour une longueur d'onde d'illumination de 800 nm.

Les caractéristiques de la source suivant ces différents points sont mesurées et présentées dans la suite de cette partie. Les différents bruits introduits par la source sont mis en perspective avec les autres bruits instrumentaux qui entachent la détection SPRI dans la section traitant des performances instrumentales, en page 99.

2.2.1.1 Flux reçu par le capteur

Le nombre de photons délivré par la source doit être suffisant pour que d'une part le temps d'intégration du capteur ne limite pas la vitesse d'acquisition de la mesure, et que d'autre part la dynamique de la caméra soit ajustée à la plage de réflectivité accessible, soit de 0 à 100%.

Le premier critère à discuter concerne donc le réglage du temps d'intégration de la caméra. Si le flux de photons n'est pas assez élevé, le temps d'intégration sera augmenté pour collecter un nombre de photons suffisant permettant d'optimiser le rapport signal sur bruit de la détection (car le bruit de photons, introduit en partie 2.2.5.2 page 99, évolue comme la racine carrée du nombre de photons reçus). Le capteur CCD acquiert des images de 1388 par 1038 pixels, soit

Chapitre 2. Développement de l'instrument

1,4 MégaPixels. Chaque pixel étant codé sur 2 octets, la charge totale de données à transmettre pour une image atteint 2,8 Moctets. La caméra est reliée au PC par un connecteur de norme IEEE1394b, dont la vitesse de transmission vaut 64 Moctet/s. Une image de poids 2,8 Moctets sera donc transférée au plus vite en un temps de 45 ms, limité par les capacités du connecteur IEEE1394b. Le choix d'un temps de pose de la caméra inférieur à 45 ms n'accélèrera donc pas la cadence de mesure.

La seconde exigence fait référence à la dynamique en intensité des images acquises. La dynamique est optimisée lorsque l'intensité maximale que l'on peut mesurer sur les images au cours de l'expérience, c'est-à-dire sur les images en polarisation TE, est proche du niveau de saturation du capteur (les images TE sont utilisées pour normaliser les images TM afin de compenser les inhomogénéités d'illumination de la source).

Ces deux contraintes de temps d'intégration et d'optimisation de la dynamique de la caméra vont permettre de calculer le flux minimal nécessaire en sortie de fibre pour une détection efficace.

D'abord, la saturation est atteinte lorsque chaque pixel accueille 18000 électrons (seuil lié au type de capteur équipant la caméra). Pour une longueur d'onde de 800 nm d'illumination, le rendement quantique de la caméra, qui traduit le nombre d'électrons émis par les pixels en fonction du nombre de photons reçus, vaut 0,13. Un nombre de 18000 électrons est donc converti en un nombre de 138500 photons reçus par un pixel en une acquisition de durée 45 ms au maximum (valeur seuil du temps d'intégration permettant de ne pas ralentir la mesure). Le flux de photons $\Phi_{photons}$ minimal à fournir au capteur est alors égal à $3,1 \cdot 10^6$ photons/pix/s.

Il s'agit maintenant de connaître la puissance minimale que la source doit délivrer dans ces conditions. Pour traduire un flux de photons en éclairement reçu par la caméra, E_{CCD} , il suffit de multiplier ce flux par l'énergie d'un photon, hc/λ , et de le diviser par la surface d'un pixel, S_{pix} , de côté $6,45 \mu\text{m}$:

$$E_{CCD} = \frac{\Phi_{photons}}{S_{pix}} \times \frac{hc}{\lambda}$$

L'application numérique donne un éclairement minimal reçu par le capteur de $19 \mu\text{W}/\text{m}^2$.

Le raisonnement qui suit permet de remonter à la puissance de la source minimale correspondant à cette valeur d'éclairement reçu par le détecteur.

Il faut d'abord tenir compte des pertes liées à la transmission des optiques. La réflexion sur les doublets achromatiques, traités anti-reflet, est négligeable ($R = 0,33\%$ à 800 nm, soit $R = 1,3\%$ pour 4 doublets). Par contre, le prisme n'étant pas traité, les pertes de Fresnel sur ses faces d'entrée et de sortie sont égales à 4% chacune, soit une transmission totale de $T_{prisme} = 92\%$. Le bruit est de plus évalué hors résonance, la réflexion sur la lame d'or est donc proche de 100%. Cet éclairement va également être atténué par la traversée du polariseur de deux manières. D'abord, la transmission du matériau polarisant est dépendante de la longueur d'onde. A 800 nm, le polariseur utilisé (LPVIS050 Thorlabs) a une transmission de $T_{polar} = 80\%$. De plus, la lumière des LEDs étant non polarisée, le flux transmis est divisé par deux en sortie du polariseur. Il faut donc multiplier le flux reçu par la caméra par 2 pour retrouver le flux sortant de la source afin de tenir compte de l'effet du polariseur.

Par ailleurs, la présence d'un objectif de grandissement 2 et l'effet de l'anamorphose du prisme, expliquée plus loin (voir la figure 2.24 page 85), donnent un grandissement 2 dans une direction et 1 dans l'autre, ce qui double la section du faisceau sur la caméra, et donc divise par 2 l'éclairement reçu par la caméra (inversement proportionnel à la surface du faisceau). L'éclairement E_{CCD} doit donc être multiplié une seconde fois par un facteur 2 pour retrouver l'éclairement incident.

Pour récapituler, l'éclairement présent en sortie du collimateur vaut :

$$E_{coll} = \frac{4 \times E_{CCD}}{T_{polar} \times T_{prisme}}$$

soit un résultat de 0,1 W/m², valeur de l'éclairement en sortie du collimateur.

Cependant, le flux qui entre effectivement dans le système est limité par l'ouverture numérique du collimateur ON_{coll} , d'une valeur de 0,167, inférieure à l'ouverture de la fibre ON_{fibre} , égale à 0,22. Une portion du flux sortant de la fibre est donc perdue. Si l'on considère une émission homogène de la fibre, hypothèse la plus défavorable en comparaison avec un profil gaussien par exemple, la perte de flux correspond au rapport des surfaces du collimateur et du champ incident dans le plan du collimateur, équivalent au rapport entre le carré des ouvertures numériques $(ON_{coll}/ON_{fibre})^2$.

De plus, un diaphragme est ajouté en sortie du collimateur, de diamètre 6 mm. Pour un résultat en terme de puissance, il faut alors multiplier l'éclairement calculé par la surface du faisceau, égale à celle du diaphragme, S_{diaphr} .

La puissance que la source doit effectivement émettre en sortie de fibre pour optimiser la détection est donc égale à :

$$P_{fibre} = E_{coll} \times S_{diaphr} \times \left(\frac{ON_{fibre}}{ON_{coll}} \right)^2$$

La puissance calculée en sortie de fibre vaut 5 µW. Il s'agit de la puissance minimale que la source doit fournir pour obtenir un flux suffisant sans ralentir la vitesse d'acquisition d'une mesure (c'est-à-dire sans augmenter le temps d'intégration au-delà du temps de transmission minimal des données) et pour que la dynamique de mesure soit optimisée.

En pratique, le flux mesuré en sortie de fibre (de diamètre 365 µm, référence FG365LEC Thorlabs), pour la LED de 800 nm (modèle 01AU de chez Roithner LaserTechnik) vaut une quarantaine de microwatts, bien supérieur à la valeur minimale de flux calculé à 5 µW. Le flux de la source à LEDs est par conséquent suffisant pour une dynamique et un temps d'intégration de la caméra optimisés.

2.2.1.2 Stabilité en intensité

Elle est dictée par la répétabilité mécanique de positionnement de la fibre devant chaque LED lors du mouvement du moteur nécessaire au balayage spectral. Si la fibre ne se repositionne pas exactement de la même façon devant chaque LED, l'intensité incidente en un point

Chapitre 2. Développement de l'instrument

fixe du substrat va varier. Pour pouvoir mesurer une variation d'indice de 10^{-6} RIU, résolution classique en SPRI, avec une sensibilité de l'ordre de $10\,000\ \%/RIU$, les fluctuations d'intensité de la source doivent être inférieures à $0,01\%$. L'erreur de positionnement de la fibre doit donc donner une variation de réflectivité inférieure à cette valeur.

Le moteur permettant de placer la fibre successivement en face des différentes LEDs de la source est un moteur micropas du constructeur Minebea. Il est composé de 200 pas par tour et l'électronique de pilotage ajoute $64\ \mu\text{pas}$ par pas, donnant une résolution angulaire de $0,028^\circ$.

Pour déterminer la répétabilité de positionnement de la fibre face à une LED, la fibre de diamètre $365\ \mu\text{m}$ est mise en mouvement de balayage continu pendant une dizaine de minutes, soit 40 points de mesure pour une LED donnée. L'intensité réfléchie par un prisme en air est relevée sur les images en une région d'intérêt donné, d'une aire de 1000 pixels, après chaque balayage de la LED de $800\ \text{nm}$, le nombre d'images moyennées étant fixé à 16. La même analyse est réalisée sans balayage de la fibre. Les variations d'intensité sur cette ROI sont tracées sur la figure 2.13.

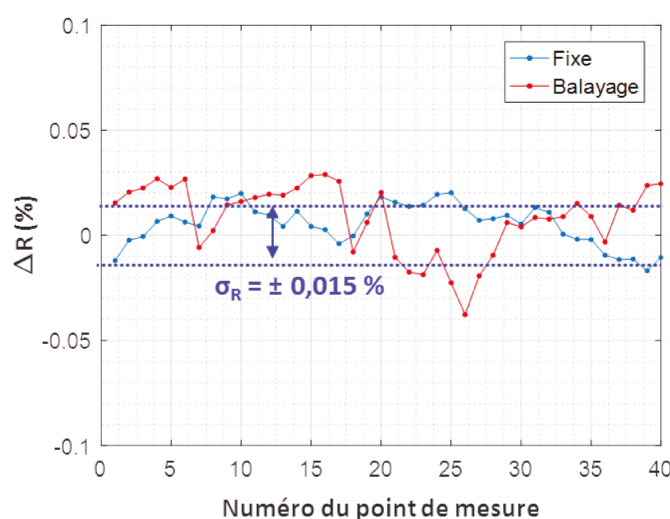


FIGURE 2.13 – Impact de la reproductibilité de positionnement de la fibre de diamètre $365\ \mu\text{m}$ contrôlé par un moteur micropas sur l'intensité incidente en une ROI du substrat.

L'évolution de l'intensité dans le temps est sensiblement la même avec ou sans balayage de la fibre. Le repositionnement de la fibre en face des LEDs après chaque tour ne perturbe donc pas l'intensité mesurée sur les images. L'écart-type sur les variations d'intensité mesurées est de l'ordre de $0,015\ \%$, niveau de bruit proche des $0,01\%$ attendus pour obtenir une résolution de 10^{-6} RIU. Cette valeur de bruit en intensité est discutée plus loin dans le paragraphe dressant le bilan des différents bruits instrumentaux (voir page 99).

Une question d'ordre économique pour un futur appareil commercial Piranex est la pertinence d'utiliser un moteur piloté par un module électronique de précision assez encombrant et coûteux (de l'ordre de 2000 euros). Est-ce qu'une telle précision de déplacement est nécessaire ? Pour le

savoir, l'intensité de la source a été mesurée pour différentes positions de la fibre de diamètre 365 μm variant d'abord sur une plage angulaire assez large, de -5° à $+5^\circ$ autour de l'angle central plaçant la fibre face à une LED. Les variations d'intensité obtenues sont représentées sur la figure 2.14a.

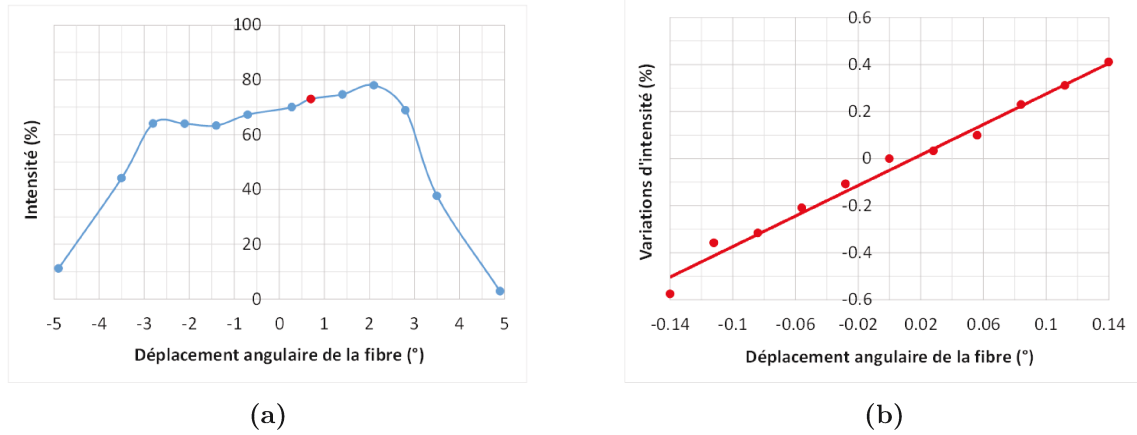


FIGURE 2.14 – Évaluation de la précision angulaire de positionnement de la fibre nécessaire pour limiter les variations d'intensité de la source : (a) sur une large plage angulaire, (b) sur une plage plus fine autour du point repéré en rouge du graphe (a).

La courbe de la figure 2.14a montre que l'évolution de l'intensité est à peu près constante sur un plateau de largeur 5° environ. Au-delà d'un décalage de $\pm 2,5^\circ$ autour de la position centrale de la fibre en face de la LED, une perte brutale d'intensité se produit. Une rotation de la fibre de 5° correspond à une distance parcourue de 3,6 mm, la fibre étant située à 40 mm de l'axe de la roue. Or, les LEDs utilisées émettent dans un cône de 20° et sont distantes de 10 mm de la fibre. La largeur du faisceau est donc égale à 3,5 mm dans le plan de la fibre. Cette valeur explique qu'après un décalage de $2,5^\circ$ de sa position centrale, correspondant à 1,8 mm, la fibre sort de l'étendue du faisceau source.

Une mesure plus précise de ces variations reportée sur le graphe 2.14b est effectuée autour du point repéré en rouge au niveau du plateau de la courbe 2.14a avec un pas angulaire de $0,028^\circ$ équivalent à 1 μpas , pas le plus fin possible. Cette analyse de l'évolution de l'intensité en un point du plateau révèle une progression linéaire de l'intensité avec le déplacement de la fibre. Le décalage angulaire le plus petit possible, de 1 μpas , donne une variation d'intensité de 0,08%. Cette variation d'intensité est considérable par rapport au bruit d'intensité observé au cours du temps de la figure 2.13 (5 fois plus grande). La fibre de 365 μm de diamètre ne peut donc subir un déplacement de plus de 1 micropas autour de sa position angulaire de référence pour ne pas perturber drastiquement l'intensité des images. La tolérance sur la position de la fibre est donc très sévère. La résolution angulaire du moteur de contrôle égale à $0,028^\circ$ est primordiale et justifie l'emploi d'un moteur 200 pas agrémenté d'une électronique ajoutant 64 micropas par pas. Précisons que cette résolution angulaire dépend du diamètre de la fibre, de sa distance à la LED, et du profil angulaire d'émission de la LED.

A noter qu'un second module micropas est utilisé pour piloter le moteur relié au miroir

présent sur le bras source, qui fixe l'angle d'incidence sur le prisme. Une solution pour rendre le système électronique plus compact serait de commander ces deux moteurs à partir de la même carte électronique. Des cartes à deux axes moteur sont disponibles chez le fabricant Midi Ingénierie par exemple. Dans le cadre du développement du prototype, nous composerons avec deux modules distincts.

2.2.1.3 Stabilité spectrale de la source à LEDs

Le signal mesuré par le prototype SPRI est la variation de la position spectrale de la résonance suite à des changements d'indice de réfraction. Classiquement, la résolution attendue est de l'ordre de 10^{-6} RIU, soit une résolution spectrale de 7 pm en considérant une sensibilité de la mesure sur film d'or continu à 800 nm de 7000 nm/RIU. Il est donc important de quantifier la stabilité de la longueur d'onde émise par les LEDs, qui impacte directement la mesure.

Pour évaluer la stabilité spectrale de la source à LEDs, la longueur d'onde émise par une des LEDs, celle de 770 nm par exemple ici, a été mesurée au cours du temps à l'aide d'un spectromètre (modèle USB2000+, OceanOptics), pour 100 ms de temps d'intégration et avec une moyenne de 4 spectres par acquisition. Ces paramètres donnent des conditions de mesure équivalentes à celles obtenues sur le prototype, puisque 8 images sont moyennées et le temps de pose vaut 50 ms environ pour une acquisition. Sur la figure 2.15, cette mesure est comparée à l'évolution dans le temps d'une longueur d'onde de la lampe halogène sélectionnée par le monochromateur, en l'occurrence à 780 nm, enregistrée de la même façon, qui sert de mesure de référence.

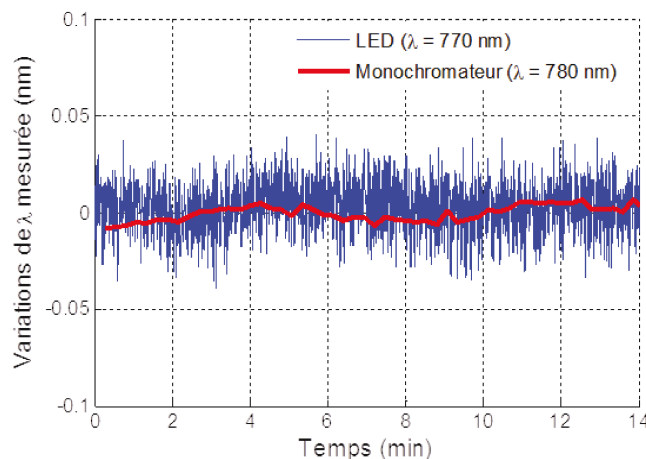


FIGURE 2.15 – Mesure de la variation de la longueur d'onde émise par la LED à 770 nm au cours du temps à l'aide d'un spectromètre commercial, comparée à l'évolution de la longueur d'onde en sortie du monochromateur qui sélectionne la longueur d'onde de 780 nm de la lampe halogène associée.

L'écart-type sur les variations de la longueur d'onde émise par la LED est égal à 14 pm, contre 4 pm pour ce qui est du monochromateur couplé à la source halogène, système d'illumination standard en mode de suivi spectral de la résonance [Otsuki 2010]. La stabilité spectrale des LEDs est donc proche des 7 pm attendus pour atteindre une résolution de 10^{-6} RIU.

Les fluctuations d'émission d'une LED sont causées par une instabilité du courant d'alimentation ou une variation de leur température. D'après les données constructeur, la dérive de la longueur d'onde des LEDs avec la température est de l'ordre de $0,13 \text{ nm}/^\circ\text{C}$ et la dérive en courant est estimée à $0,1 \text{ nm}/\text{mA}$. Les fluctuations de 14 pm mesurées sur l'émission de la LED proviennent de ces deux sources de bruit. Cela signifie que la température des LEDs est stable au dixième de degré près, valeur cohérente, et que la source de courant ne subit pas de variations plus grandes que $0,1 \text{ mA}$, ce qui est aussi plausible. En effet, les LEDs sont allumées en continu lors de la mesure, ce qui assure une stabilité en courant convenable, bien meilleure que lorsque chacune des LEDs est allumée et atteinte alternativement comme cela est décrit dans la thèse d'Alexandra Sereda [Sereda 2014a].

L'effet de ce bruit sur le signal SPR, c'est-à-dire sur la détermination de la position spectrale de la résonance, sera discuté dans la partie traitant des performances du système de détection en page 99 qui quantifie et commente les différentes sources de bruit expérimental.

2.2.1.4 Choix de la gamme spectrale

L'instrument étant destiné à analyser des substrats nanostructurés compatibles avec la mesure SERS, regardons de plus près l'évolution de la position de la résonance de différentes structures en fonction de l'angle et de la longueur d'onde d'excitation afin d'évaluer la gamme spectrale nécessaire à la mesure SPR. La figure 2.16 présente l'évolution des modes plasmoniques de structures de diamètre $D = 50 \text{ nm}$ et de période $P = 200 \text{ nm}$ d'une part, et de diamètre de 200 nm et période de 400 nm d'autre part.

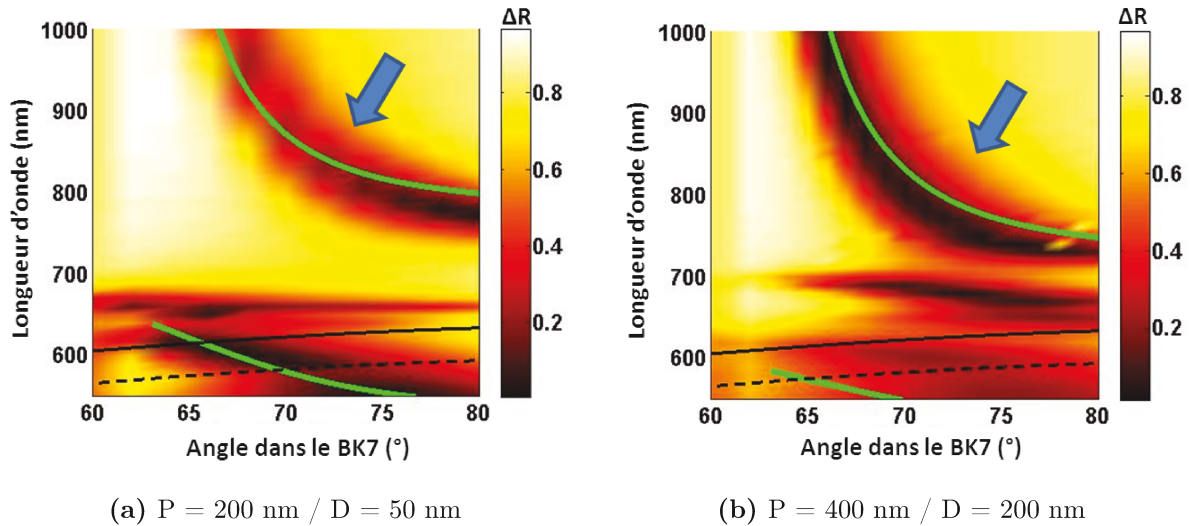


FIGURE 2.16 – Visualisation des modes électromagnétiques de deux réseaux de nanostructures de période P et de diamètre D différents en fonction de la longueur d'onde et de l'angle d'excitation sur une carte représentant des variations de réflectivité.

Ces multiples modes, représentés en rouge indiquant une chute de réflectivité, sont détaillés dans la thèse de Mitradeep Sarkar [Sarkar 2015a], et une description en sera donnée dans le chapitre 3 (3.1, page 130). Le mode d'intérêt pour la mesure de SPRI, appelé mode hybride,

Chapitre 2. Développement de l'instrument

est celui qui apparaît au-delà de 750 nm en longueur d'onde, et de 65° en angle interne dans le BK7, repéré par la flèche bleue sur les graphes.

Ces deux exemples de nappes angulo-spectrales permettent de remarquer que la position globale de la résonance plasmonique se décale vers le rouge pour les petites périodes des nanostructures. Par exemple, à l'angle de 70° , la résonance du mode hybride apparaît à une longueur d'onde de 850 nm pour une période de 200 nm, contre 800 nm pour une période de 400 nm. D'un point de vue angulaire, ce mode hybride étant dérivé du mode propagatif classique sur or continu, on retrouve la tendance habituelle qui est un décalage vers le rouge lorsque l'angle d'incidence diminue.

Ces considérations sont à confronter avec la plage de sensibilité de la caméra, présentée en figure 2.17 : à partir de 830 nm, le rendement quantique de la caméra passe en-dessous de 10%. On veillera donc à ne pas choisir de longueurs d'onde supérieures à cette valeur.

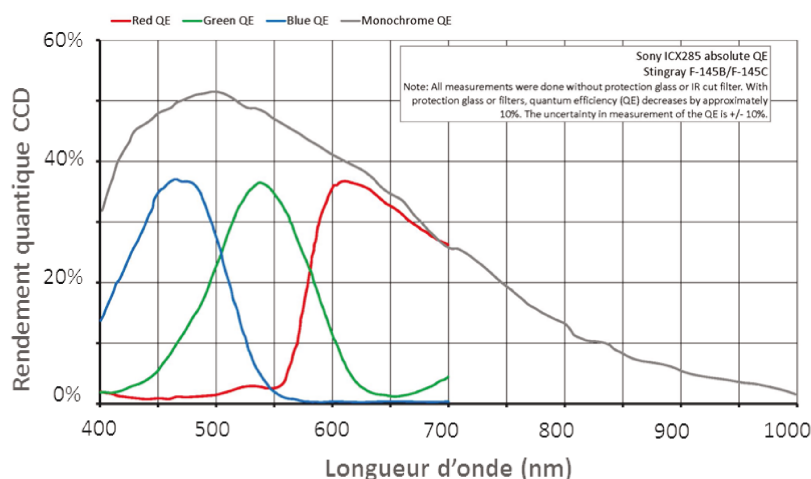


FIGURE 2.17 – Rendement quantique de la caméra indiquant sa sensibilité au regard de la longueur d'onde d'illumination (graphe tiré de la documentation constructeur de capteur Sony ICX285).

Finalement, le choix de la gamme spectrale repose sur un compromis entre dimensions des nanostructures, angle d'incidence et sensibilité de la caméra. D'après le comportement du mode hybride des nanostructures, la résonance ne pourra être atteinte pour une longueur d'onde d'excitation inférieure à 750 nm pour des périodes de réseau inférieures à 400 nm. La sensibilité de la caméra passant en-dessous de 10% à partir de 850 nm environ, la plage spectrale de fonctionnement du prototype avec substrat nanostructuré sera comprise entre 750 nm et 850 nm.

De plus, l'espacement entre les longueurs d'onde sélectionnées est réglé en fonction de la largeur de la résonance. Par exemple, les substrats nanostructurés présentent une résonance relativement large : un espacement de 20 nm entre les longueurs d'onde des LEDs est donc décidé. La résonance d'un film d'or étant plus fine, un espacement de 10 nm permettra de mieux reconstruire le profil de résonance, le pas d'échantillonnage étant plus fin. Des tests rapportés dans la thèse d'Alexandra pour évaluer l'effet de l'espacement spectral des LEDs sur la dynamique de mesure ont montré des résultats équivalents avec un pas de 10 nm ou un pas de 20 nm, sur un

film d'or plan de 50 nm d'épaisseur.

Cette première étude portant sur la source SPRI a permis de valider l'utilisation d'un système d'illumination à LEDs intégrant un balayage mécanique d'une fibre adressant tour à tour chaque LED. Compte tenu des résonances plasmoniques attendues des substrats nanostructurés, il a été choisi de travailler avec 5 LEDs dont les longueurs d'onde sont réparties entre 750 et 850 nm. Il a été vérifié par un calcul de flux que la puissance des LEDs est suffisamment élevée pour ne pas limiter la cadence de mesure. Le bruit en intensité et en longueur d'onde de ce système d'illumination conduit à une résolution de l'ordre de 10^{-6} RIU, comparable aux systèmes commerciaux.

2.2.2 Considérations d'optique instrumentale

Pour rendre le prototype le moins encombrant et complexe possible, les bras source et imagerie ne sont pas montés sur des platines de rotation. Cela implique différentes contraintes sur le réglage optique de l'instrument, qui sont expliquées dans cette partie. Une discussion est également menée au sujet du choix du prisme, élément optique central de la configuration Kretschmann qui a été choisie.

2.2.2.1 Conjugaison miroir/prisme

Le faisceau source polarisé se réfléchit sur un miroir motorisé dont la rotation détermine l'angle d'incidence sur le prisme et permet l'acquisition de la résonance plasmon par interrogation angulaire. La position centrale du miroir est réglée de sorte que le faisceau soit parallèle à l'axe optique, comme c'est le cas des rayons rouges sur la figure 2.18 avec le miroir en position 1.

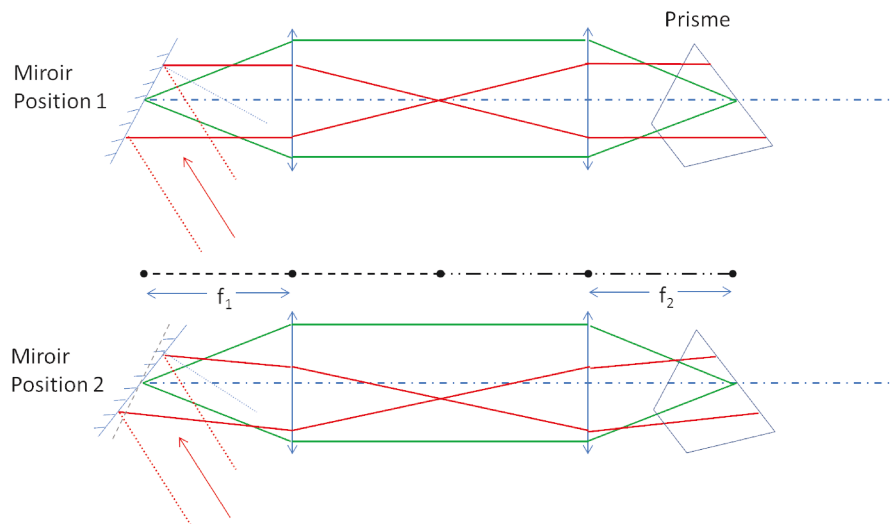


FIGURE 2.18 – Représentation du principe du montage afocal remplissant deux fonctions : collimation et conjugaison miroir/prisme.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

Pour que l'illumination reste centrée sur le prisme pendant le balayage angulaire, il est essentiel que le plan du miroir soit conjugué avec le plan situé à la surface du prisme. A cet effet, une combinaison optique classique de deux doublets en montage afocal est insérée sur le bras source. Le foyer image du premier doublet et le foyer objet du second sont confondus. La configuration schématisée en figure 2.18 représente deux doublets de focale égale, mais les focales f_1 et f_2 peuvent être différentes, notamment si le grandissement est différent de 1. Le tracé de rayons verts montre la conjugaison entre le miroir et le prisme (la réfraction à l'intérieur du prisme n'est pas représentée pour simplifier le schéma), et le tracé rouge illustre le trajet du faisceau source, qui reste centré sur le prisme quel que soit l'angle donné au miroir, cela pour deux positions angulaires du miroir. Ainsi, le tube afocal réalise la conjugaison miroir-prisme tout en conservant la collimation du faisceau, qui reste centré sur la surface du prisme pour toute position du miroir.

Remarque instrumentale : la priorité sur le bras source est d'obtenir un faisceau le mieux collimaté possible, de façon à créer le meilleur couplage plasmonique. Pour restreindre l'effet de l'aberration sphérique, on place la partie la plus bombée des doublets du système afocal vers l'infini. Le côté bombé introduit une convergence importante des rayons de bord, mais celle-ci est compensée par la lentille divergente suivante accolée, d'indice de réfraction plus élevé.

2.2.2.2 Choix de l'indice du prisme : influence sur la dispersion spectrale

Le prisme est en charge du couplage entre l'onde incidente et l'onde de surface plasmonique. Un prisme est caractérisé par deux paramètres : son angle au sommet et l'indice du verre. Une étude a été menée pour choisir ces deux paramètres de façon à minimiser les aberrations sur l'image SPRI. Ces aberrations ont deux origines : d'une part la dispersion spectrale et d'autre part l'inclinaison du plan image due à la réfraction en sortie du prisme.



FIGURE 2.19 – Pouvoir dispersif d'un prisme.

En premier lieu, l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde nécessaire au suivi de la résonance pose la question de l'effet de la dispersion spectrale introduite par le prisme. Par essence même, un prisme présente un pouvoir de dispersion, c'est-à-dire que son indice de réfraction varie avec la longueur d'onde. C'est l'élément optique qui sert justement à illustrer ce phénomène et à expliquer de façon vulgarisée qu'une lumière blanche est composée d'un ensemble de longueurs d'onde (voir dessin 2.19).

En ce qui concerne le prototype, nous travaillons en lumière monochromatique, mais avec plusieurs sources. Les longueurs d'onde des différentes LEDs de la source sont espacées d'une vingtaine de nanomètres, ce qui donne une plage spectrale totale parcourue lors du suivi de cinétique large de 80 nm à peu près. De plus, dans le cadre du projet Piranex, il a été décidé que l'excitation des substrats nanostructurés devrait pouvoir se faire entre 750 nm et 850 nm pour garder le plus de flexibilité possible à l'égard du choix de la période et du diamètre de ces nanostructures.

Le fait que l'indice du prisme varie avec la longueur d'onde a pour conséquence de modifier l'angle des rayons traversant le prisme et incidents sur le substrat. Or, un changement d'angle d'incidence modifie la position de l'image intermédiaire par le prisme, ce qui va être illustré dans la suite du paragraphe.

Classiquement, le matériau des prismes commercialisés par Horiba est le SF11, d'indice de réfraction 1,765 à $\lambda = 800$ nm. Son indice de réfraction élevé en fait un bon candidat pour les systèmes standards de SPRI. En effet, l'utilisation d'un indice de prisme élevé permet de travailler à un angle d'incidence externe plus grand pour atteindre l'angle de résonance plasmonique, ce qui limite les aberrations optiques et le phénomène d'anamorphose qui écrase les images suivant la direction de propagation lorsque les angles sont trop rasants. Cependant, le SF11 est un des verres les plus dispersifs, (nombre d'Abbe faible, voir sur le diagramme d'Abbe en annexe 1). Pour limiter la dispersion, le matériau LAK34 a été sélectionné. Le LAK34 est intéressant car son indice reste proche de celui du SF11, les angles d'incidence et angle au sommet du prisme seront donc à peu près identiques à ceux utilisés avec le SF11. L'imagerie n'a pas besoin d'être ré-optimisée.

Dans le but de mettre en évidence la minimisation de la dispersion spectrale grâce au remplacement du SF11 par le LAK34, trois images intermédiaires sont tracées sur la figure 2.20 aux longueurs d'onde de 650 nm (rouge), 755 nm (vert) et 845 nm (bleu), pour un angle d'incidence fixe dans l'air en entrée de prisme (équivalent à un angle interne dans la lamelle en BK7 de 67° à la longueur d'onde de 755 nm), cela pour un prisme en SF11 et un prisme en LAK34. A noter que pour les substrats nanostructurés finalement choisis dans ce projet, la plage spectrale utile est seulement comprise entre 750 nm et 850 nm. La lamelle posée sur le prisme modélise un substrat type du projet, en BK7. L'image intermédiaire correspond à l'image de la surface du prisme comprise entre -2 et 2 mm par le prisme. Les tracés en vert sont calculés à la longueur d'onde de 755 nm. L'angle au sommet des prismes est fixé à 32° pour isoler l'effet de la dispersion spectrale de l'effet de l'inclinaison du plan image due à la réfraction en sortie du prisme, problème qui sera traité dans le paragraphe suivant.

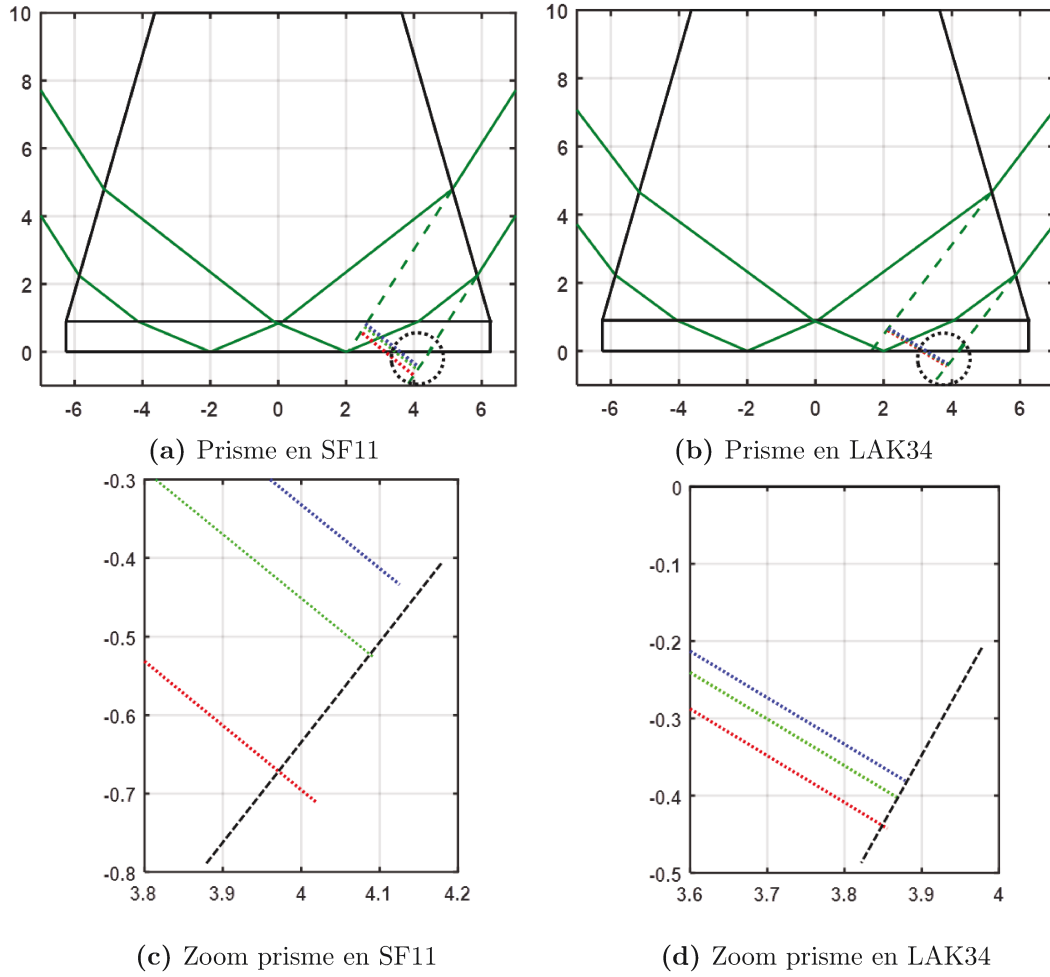


FIGURE 2.20 – Effet de la dispersion mis en évidence par le tracé des images intermédiaires (en pointillés) à trois longueurs d’ondes : $\lambda = 650$ nm (rouge) / $\lambda = 755$ nm (vert) / $\lambda = 845$ nm (bleu), cela pour un prisme en SF11 et en LAK34, avec 32° au sommet, et une lamelle en BK7, pour un angle d’incidence fixe dans l’air en entrée de prisme (équivalent à un angle interne dans la lamelle en BK7 de 67° à la longueur d’onde de 755 nm). Les rayons verts sont tracés à la longueur d’onde de 755 nm. Les zooms présentés dessous sont pris au niveau du cercle en pointillés noirs. Les traits en tirets noirs modélisent l’axe optique de la caméra.

Sur les agrandissements des tracés de la figure 2.20, les images intermédiaires aux longueurs d’onde extrêmes (en rouge et bleu) sont 6 fois plus éloignées pour le SF11 que pour le LAK34, l’écart étant de $400\ \mu\text{m}$ dans le cas du SF11. Par suite, la netteté de l’image sera plus difficile à conserver sur l’ensemble de la plage avec le SF11. De plus, un décalage de l’image est observé entre $\lambda = 650$ nm et $\lambda = 845$ nm, égal à $163\ \mu\text{m}$ pour le SF11 et à seulement $13\ \mu\text{m}$ pour le LAK34. Ces longueurs d’onde extrêmes ont été sélectionnées dans cet exemple pour accentuer l’effet de la dispersion. Cependant, en conditions réelles d’expérience, la plage de longueurs d’onde balayée vaut une centaine de nanomètres. Le déplacement de l’image sera donc plutôt équivalent au décalage obtenu entre l’image verte et l’image bleue, soit $45\ \mu\text{m}$ pour le SF11 et $5\ \mu\text{m}$ pour le LAK34, ce qui représente un gain énorme lorsque l’on travaille avec des zones

nanostructurées d'une dimension de $150\ \mu\text{m}$.

Ces prévisions théoriques sont comparées avec l'expérience sur l'image d'une mire dorée gravée de motifs en forme de bande de largeur variable sur une lame en BK7. Ces mesures sont réalisées sur un banc SPRI du laboratoire équipé d'un monochromateur permettant de choisir plus facilement les longueurs d'onde d'illumination. Sur le prototype, il faut changer de LED pour modifier la longueur d'onde, ce qui est beaucoup moins pratique.

Afin d'illustrer les aberrations dues à la dispersion, trois images des bandes de largeur $40\ \mu\text{m}$ acquises aux trois longueurs d'onde utilisées dans le calcul ($\lambda = 650 / 755 / 845\ \text{nm}$) sont superposées pour former une image fictive en RVB : rouge pour $\lambda = 650\ \text{nm}$, vert pour $\lambda = 755\ \text{nm}$ et bleu pour $\lambda = 845\ \text{nm}$. L'angle d'incidence sur le prisme est fixe, et égal à l'angle de résonance de la mire à $755\ \text{nm}$ (soit 67° dans le BK7). Ce traitement est appliqué aux images acquises sur le banc du laboratoire avec le prisme en SF11 et celui en LAK34. Ces images construites en RVB sont visibles en figure 2.21.

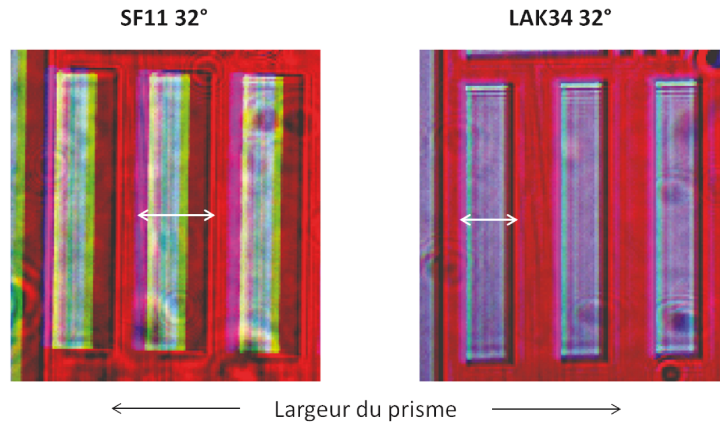


FIGURE 2.21 – Superposition de 3 images à $\lambda = 650 / 755 / 845\ \text{nm}$ pour reconstruire une image RVB dans le but d'évaluer la différence de dispersion des prismes SF11 et LAK34.

La flèche blanche modélise l'étalement total de la bande imagée aux trois longueurs d'onde. Cet étalement est plus grand pour le prisme de SF11. Plus précisément, le décalage de l'image entre les longueurs d'onde extrêmes est mesuré à $50\ \mu\text{m}$ pour le SF11 et à $13\ \mu\text{m}$ pour le LAK34. Le déplacement obtenu avec le SF11 est plus faible que celui attendu d'après les simulations, qui était de $136\ \mu\text{m}$. Cette différence peut être due au fait que l'axe de la caméra n'est pas parfaitement perpendiculaire à l'image intermédiaire, ou bien que d'autres aberrations, comme celles des doublets, viennent compenser le décalage des images. Pour ce qui est du prisme LAK34, on retrouve bien un déplacement de l'image identique à celui donné par les simulations, qui est donc 4 fois moindre que celui obtenu expérimentalement pour le SF11.

Par conséquent, un verre en LAK34 a été choisi pour le prisme afin de minimiser la dispersion spectrale.

2.2.2.3 Choix de l'angle au sommet du prisme : influence sur la conjugaison prisme/caméra

Une fois le matériau du prisme sélectionné, à savoir le LAK34, l'angle au sommet du prisme doit être choisi. Il constitue un paramètre critique de la qualité de l'imagerie. En effet, le bras imagerie est lui aussi constitué de 2 doublets en montage afocal qui conjuguent l'image du substrat par le prisme à la caméra. Pour que l'image sur la caméra soit nette, il est essentiel que le plan de l'image intermédiaire du substrat par le prisme soit parallèle au plan de la caméra. Si l'image arrive tiltée sur la caméra, les points de l'image hors du plan de la caméra seront défocalisés, et donc flous, comme c'est le cas en figure 2.22.

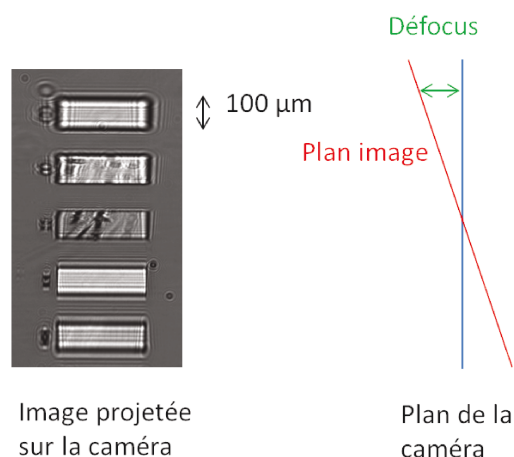


FIGURE 2.22 – Représentation de la défocalisation obtenue sur l'image caméra de zones de 100 µm de côté due à l'inclinaison du plan image par rapport au plan de la caméra.

Pour éviter ce défocus, il faut choisir l'angle au sommet du prisme de façon à ce que l'image intermédiaire par le prisme se retrouve perpendiculaire aux rayons sortants du prisme.

Or, dans le cadre du couplage SPRI/SERS, la biopuce est nanostructurée. Au début du projet, les valeurs de période et de diamètre de ces nanostructures n'étaient pas encore fixées. Par conséquent, l'angle de résonance plasmon n'était pas déterminé précisément, celui-ci dépendant fortement des dimensions des nanostructures. Toutefois, des premières simulations indiquaient une résonance entre 65° et 75° pour une excitation à 800 nm et des périodes variant de 150 à 400 nm et des diamètres compris entre 50 et 200 nm. Il était aussi prévu de pouvoir continuer à travailler avec un substrat standard de SPRI, composé d'or plan d'une épaisseur de 50 nm, qui résonne à l'angle de 66° à 800 nm. Ces considérations ont mené à la définition d'une plage angulaire de travail allant de 62° à 75°.

Cependant, l'imagerie ne peut être optimale sur l'ensemble de cette gamme angulaire avec un prisme unique. Dans un premier temps, cette gamme angulaire a alors été subdivisée en deux plages, l'une de 62° à 69°, et l'autre de 69° à 75°. Sur chacune de ces plages, l'angle au sommet optimal du prisme en LAK34 permettant de rendre l'image intermédiaire de la surface de la biopuce par le prisme perpendiculaire à l'axe optique de la caméra a été déterminé.

La figure 2.23 montre l'effet de l'angle au sommet du prisme sur l'inclinaison de l'image intermédiaire grâce à un programme Matlab codé par Emmanuel Maillart lors de sa thèse. Cette

inclinaison de l'image intermédiaire est calculée pour deux angles au sommet (32° et 20°) d'un prisme en LAK34, sur les deux plages angulaires considérées. Pour la première plage, un angle de 66° correspondant à l'angle de résonance d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur à 800 nm est choisi. Le deuxième angle d'incidence, de 74° , est celui associé à la résonance d'un réseau de nanostructures de période 400 nm et de diamètre 200 nm, également à 800 nm. Les tracés vert et bleu correspondent à des angles internes de $+3^\circ$ et -3° respectivement autour de l'angle principal choisi, qui est lui tracé en rouge. Ils permettent de déterminer la position de l'image. Les images intermédiaires sont en pointillés, partant du coin du prisme car la lame et le prisme sont pris dans le même matériau.

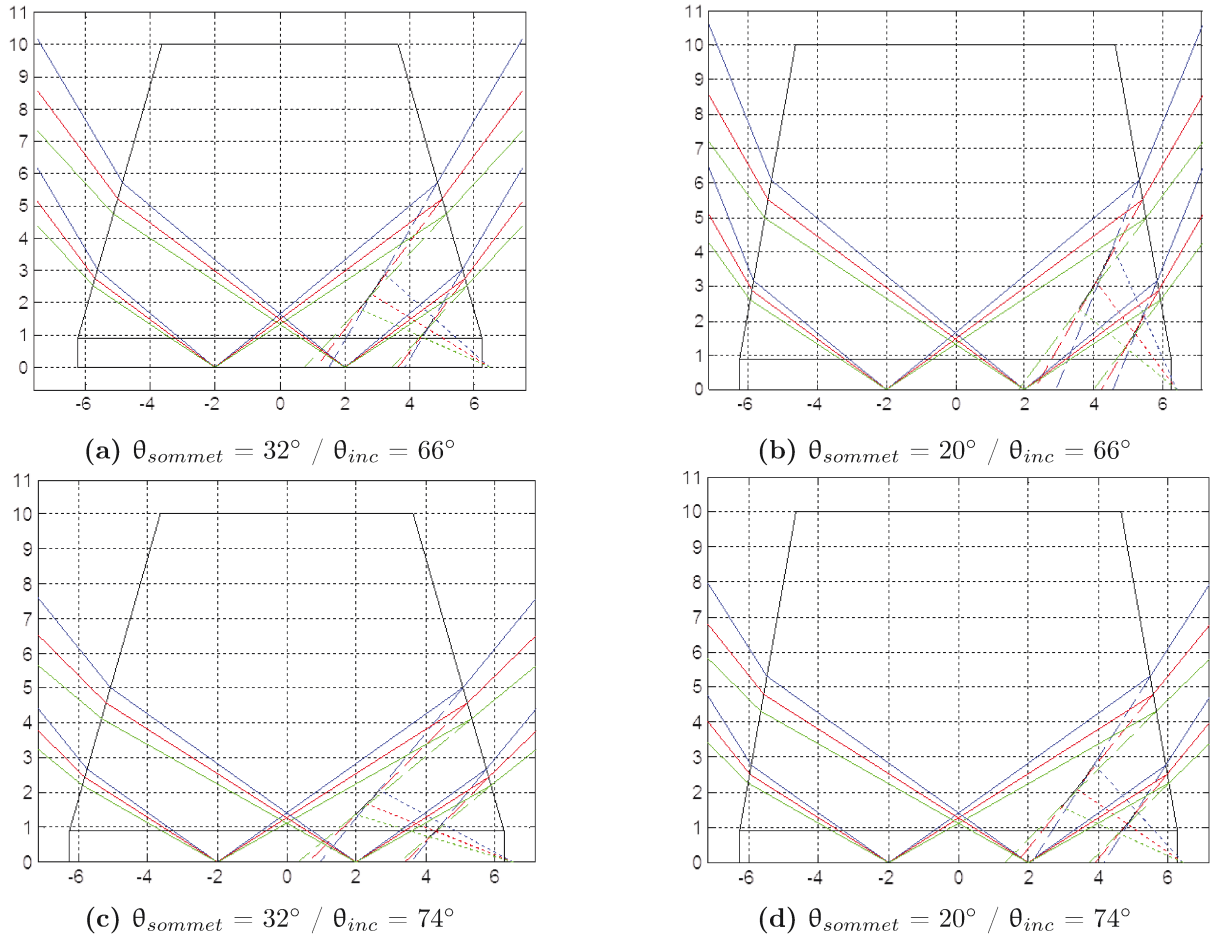


FIGURE 2.23 – Tracés de rayons montrant la position de l'image intermédiaire de la surface de la lamelle par le coin du prisme pour deux angles au sommet différents, 20° (fig.b et d) et 32° (fig.a et c) et deux angles d'incidence différents, 66° (angle de résonance d'un film d'or de 50 nm, fig. a et b) et 74° (angle de résonance d'un réseau de nanostructures de période 400 nm et de diamètre 200 nm, fig. c et d). Le prisme et la lamelle sont en LAK34, les axes sont notés en millimètres, la longueur d'onde d'illumination est de 800 nm.

Le capteur de la caméra est positionné perpendiculairement aux rayons sortants de manière à faciliter l'alignement du prototype. Il faut donc que l'image intermédiaire soit aussi perpendi-

Chapitre 2. Développement de l'instrument

culaire à l'axe optique afin de limiter les problèmes de défocalisation. Dans le cas d'une incidence à 66° (figure 2.23 a. et b.), l'angle au sommet de 32° permet d'obtenir une image intermédiaire (en pointillés rouges) perpendiculaire aux rayons sortants rouges alors que ce n'est pas du tout le cas lorsque l'angle au sommet vaut 20° . Le prisme d'angle au sommet de 32° donnera donc une image beaucoup plus nette sur la caméra que celui d'angle 20° .

Pour ce qui est d'un angle de résonance à 74° (cas d'un substrat nanostructuré), la tendance est différente : cette fois, c'est le prisme d'angle au sommet 20° qui permet de rendre l'image intermédiaire rouge perpendiculaire aux rayons sortants (voir figure 2.23d).

Après le choix du verre en LAK34 limitant la dispersion spectrale lors de mesures SPRI par interrogation spectrale, cette deuxième étude permet d'optimiser l'angle au sommet du prisme en fonction de la plage angulaire d'incidence visée. L'objectif consiste à rendre l'image intermédiaire de la biopuce par le prisme perpendiculaire à l'axe optique de la caméra pour que l'image caméra soit nette.

Par conséquent, un prisme en LAK34 d'angle au sommet 32° est choisi pour travailler sur la plage angulaire définie entre 62° et 69° , et sera donc plus adapté pour des mesures sur puce standard SPRI. La plage de 69° à 75° associée aux résonances des puces nanostructurées sera adressée avec un prisme en LAK34 d'angle au sommet 20° .

2.2.2.4 Anamorphose et champ de vue

Les doublets du système afocal ont été choisis de façon à obtenir un zoom 2 de l'image sur la caméra. Le capteur CCD a une dimension de 9 mm suivant la longueur du prisme et de 6,7 mm suivant sa largeur. Le champ maximal dans le plan de la lamelle visible par la caméra a donc une dimension de $9/2$ mm soit 4,5 mm suivant la longueur.

La taille du champ selon l'axe de la largeur du prisme est un peu moins évidente à déterminer car l'image est **anamorphosée** du fait de l'angle d'incidence choisi : le champ de vue de la caméra est rétréci suivant l'axe de propagation de la lumière. Sur l'exemple de l'image d'une mire carrée de côté 2 mm en figure 2.24, on voit que la taille de la mire suivant la largeur du prisme est deux fois plus petite que suivant la longueur. Ce facteur multiplicatif peut être calculé en fonction de l'angle au sommet du prisme, de son indice de réfraction et de l'angle d'incidence.

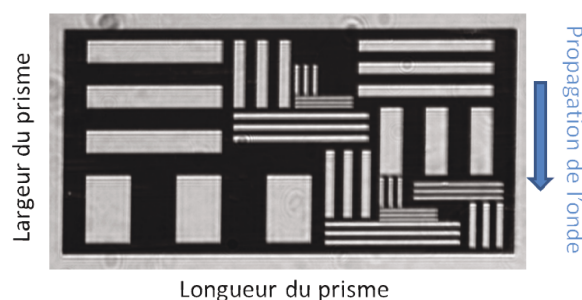


FIGURE 2.24 – Visualisation de l'anamorphose de l'image d'une mire carrée de côté 2 mm pour un angle d'incidence fait avec le plan de la lamelle de $56,2^\circ$ (soit un angle interne de $68,6^\circ$).

On trouve une dimension du champ maximal vu par le capteur dans le plan de la lamelle et suivant la largeur du prisme de 6,7 mm (car l'effet du zoom 2 est compensé par l'anamorphose, ce qui donne au final un grandissement proche de 1 suivant la largeur du prisme). L'anamorphose variant avec l'angle d'incidence, le champ vu suivant la largeur du prisme varie aussi avec l'angle d'incidence. Sachant que le prisme a une largeur de 12,5 mm et une longueur de 25 mm, c'est donc la taille du capteur qui limite la taille du champ imagé à la surface du prisme. Une dimension de champ de l'ordre de 7 mm est largement suffisante pour observer une matrice de plots biologiques standard, dont la surface s'étend sur 4 par 4 mm. Un zoom 3 aurait pu être installé pour voir un champ de 3 mm par 5 mm, mais cela aurait impliqué un temps d'exposition $1,5^2$ fois plus grand qu'avec un zoom 2, soit 2,25 fois plus grand, puisque le flux reçu par un pixel est diminué de cette valeur. Le temps d'acquisition des images serait multiplié par 2,25, ce qui ralentirait les mesures de cinétique d'autant.

Les deux systèmes afocaux, source et imagerie, combinés au choix de l'angle du prisme pour que l'image intermédiaire soit perpendiculaire au faisceau sortant et qu'il n'y ait pas de défocus font l'objet d'un brevet déposé par l'Institut D'optique Théorique Et Appliquée en 2001 (référence WO2002048689 A1), et racheté par Horiba.

Remarque instrumentale : Au contraire de la conjugaison du bras source (voir la remarque page 78), côté bras imagerie, le paramètre important est la qualité de la conjugaison entre le prisme et la caméra. Il faut donc que le faisceau entre les deux doublets soit le plus collimaté possible pour obtenir une image dans le plan focal du second doublet, sur la caméra. Les faces bombées des doublets sont donc placées vers l'intérieur du système afocal.

2.2.2.5 Remarques sur l'alignement du système SPRI

L'alignement de ce montage s'effectue en trois temps.

D'abord, il faut s'assurer que les deux tubes de doublets sont bien afocaux, donc réglés à l'infini, ce qui signifie qu'un faisceau incident parallèle doit ressortir parallèle afin de vérifier la superposition des foyers. Cet alignement est réalisé sur un banc équipé d'une diode laser éclairant une mire graduée placée au foyer d'un collimateur, et d'un viseur réglé à l'infini. Le réglage du

Chapitre 2. Développement de l'instrument

tube s'effectue alors en le positionnant sur ce banc et en ajustant la distance entre les doublets avec une bague vissée à une extrémité du tube. La bague est bien placée lorsque l'image de la mire par le viseur est nette.

Ensuite, il s'agit de réaliser les conjugaisons miroir-prisme et prisme-caméra. Chaque tube est inséré dans un support fixé sur l'axe optique du prototype SPRI. Pour régler la conjugaison prisme-caméra, il suffit de déposer une mire à la surface du prisme, et d'obtenir une image nette sur la caméra. Pour ajuster la conjugaison miroir-prisme, on positionne sur le prisme une lame sur laquelle se trouve une marque. La conjugaison est assurée lorsque l'image de cette marque sur la caméra reste fixe pour tout angle d'incidence.

Pour finir, il faut également s'assurer que le faisceau source est bien centré sur le prisme et l'éclaire de façon uniforme. Pour y parvenir, un miroir de repli réglable suivant les deux axes a ainsi été positionné sur le bras source, comme illustré en figure 2.7 de la page 65.

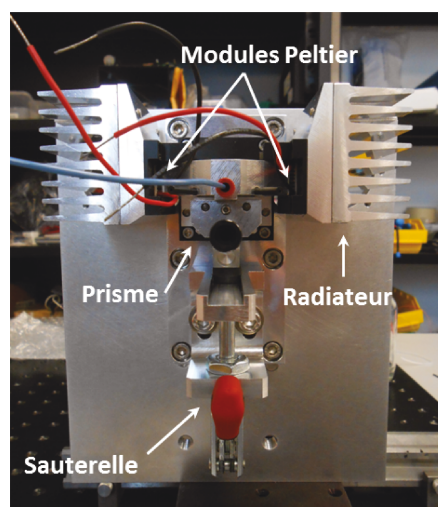
2.2.3 La cellule fluide, pièce maîtresse du prototype

La différence majeure entre le prototype Pira-One et les systèmes SPRI existant chez Horiba concerne la cellule fluide. C'est la pièce maîtresse sur laquelle repose la combinaison SPRI/SERS : elle doit à la fois assurer l'étanchéité de la chambre d'expérience et permettre l'excitation laser pour la mesure du spectre Raman.

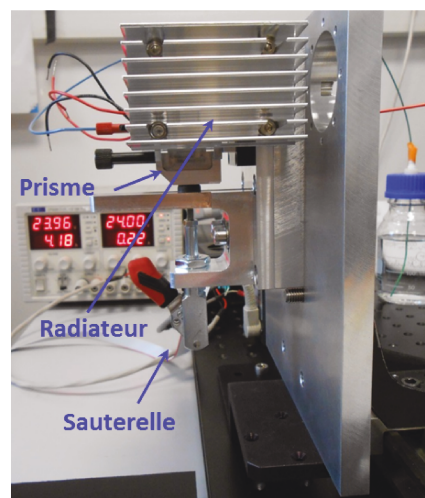
La description de la cellule fluide qui suit met en avant la concentration d'un grand nombre de fonctionnalités dans un espace réduit, et donc la complexité et l'importance de ce module en charge à la fois de la circulation des fluides, depuis une entrée vers une sortie, de l'étanchéité du contact de la biopuce et de la cellule, de l'asservissement en température grâce au dialogue entre une sonde et des Peltiers, et de l'accès au laser d'excitation par une ouverture optique. C'est pour cette raison que ce module a été testé en premier lieu, de manière à vérifier l'efficacité du joint garant de l'étanchéité entre la puce et la cellule fluide, la résistance du hublot au débit fixé par une pompe péristaltique et le réglage des paramètres d'asservissement du PID.

Ces différents tests ont été réalisés sur le montage présenté en figure 2.25 par deux photographies, l'une de face, l'autre de profil. Le prisme recouvert d'une lame d'or et d'un joint en Mylar, décrit un peu plus loin, est positionné dans un support et plaqué contre la cellule fluide par une sauterelle, un vérin qui maintient une pression contre le prisme. La chambre d'expérience présente alors une hauteur de 90 μm , égale à l'épaisseur du joint, une largeur de 0,8 mm et une longueur de 2 mm. La pièce mécanique se trouvant au-dessus du prisme et constituant la cellule fluide est détaillée en figure 2.26. Un hublot de verre circulaire au centre de la pièce permet au laser Raman d'exciter les molécules capturées sur la biopuce en milieu liquide. Deux modules Peltier sont placés de part et d'autre de la cellule et reliés à des radiateurs qui évacuent la chaleur.

Comme le montre la figure 2.26, la forme de la cellule est imposée par celle de l'objectif, qui doit pouvoir s'approcher au plus près de l'échantillon et se translater sur toute la surface du hublot afin d'analyser la plus grande partie possible de la biopuce. La circulation des solutions dans la cellule est permise par deux canaux d'entrée et de sortie très fins, de diamètre 0,8 mm, creusés par électro-érosion.

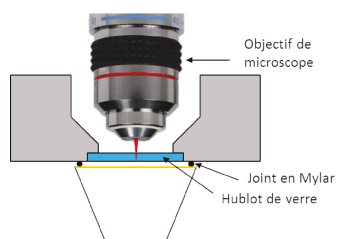


(a) Cellule fluide vue de face



(b) Vue de côté de la cellule

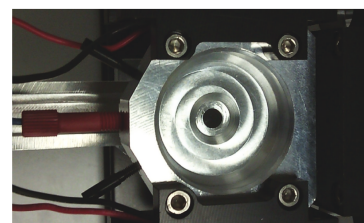
FIGURE 2.25 – Photographies du module de la cellule fluide dans son ensemble. Le prisme est maintenu par une sauterelle. Les radiateurs entourent la cellule.



(a) Schéma de la cellule fluide percée d'une fenêtre de verre laissant passer le laser d'excitation Raman



(b) Photographie en vue de dessous du hublot de verre inséré dans la cellule fluide



(c) Photographie en vue de dessus de la cellule fluide montrant la découpe complexe de la mécanique qui s'ajuste à la forme de l'objectif

FIGURE 2.26 – Détails de la cellule fluide

Test de la robustesse du hublot Le hublot de verre permettant la focalisation du laser par l'objectif et la récolte de l'émission Raman des molécules est une des nouveautés principales du design de la cellule fluide. Le débit de circulation du flux varie entre 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, débit courant des expériences SPRI, et 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$, débit utilisé pour remplir la cuve et chasser des bulles d'air si cela est nécessaire. Le hublot doit donc être capable de supporter des variations de pression de l'ordre du bar, surpression obtenue à l'intérieur de la cellule lorsque le débit est réglé à 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Différentes épaisseurs de hublot ont été testées : 0,2 mm, 0,5 mm et 1 mm. Elles ont été montées sur trois cellules fluidiques distinctes, dont l'épaisseur du logement circulaire est égale à celle du hublot testé. En effet, lorsque le hublot est inséré dans son emplacement, il doit affleurer pour créer une surface de cellule la plus plane possible, sans variation de hauteur, afin de ne pas

Chapitre 2. Développement de l'instrument

perturber l'écoulement. Le collage du hublot est donc une étape délicate et minutieuse qui a été réalisée par l'atelier d'optique du laboratoire au moyen d'une colle thermique. En admettant une tolérance de variation de hauteur de la cellule de l'ordre de 10%, et sachant que la hauteur de la cuve vaut 90 μm , le collage doit être effectué de façon à obtenir un écart à la planéité inférieur à la dizaine de microns. Cela révèle le caractère critique de cette manipulation.

La robustesse des trois épaisseurs de hublot testées a été évaluée en réglant le débit à différentes valeurs comprises entre 50 et 3000 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 10 min chacune. Puis le débit le plus élevé, de 3000 $\mu\text{L}/\text{min}$, a été appliqué pendant 2h. Les trois hublots ont résisté à ce test. L'épaisseur la plus faible de 0,2 mm semblait trop fragile pour pouvoir résister dans le temps. Une épaisseur de 0,5 mm paraissait être le meilleur compromis pour éviter de perturber la mesure SERS, sensible à l'émission du verre, et assurer une solidité à long terme.

D'ailleurs, lors de différentes phases de réglage ou de déplacement de l'instrument, le hublot s'est fendu à deux reprises, confirmant qu'une épaisseur de 0,2 mm aurait rendu le hublot trop vulnérable. La propriété thermique de la colle se révèle alors d'une grande praticité lors du développement de l'instrument car il suffit de chauffer la pièce métallique à 50°C pour faire fondre la colle. Le hublot cassé peut être enlevé facilement et le résidu de colle nettoyé pour réaliser un nouveau collage. En revanche, la fusion de la colle à cette température deviendrait problématique dans le cadre d'un système commercial car des pics de température de ce type sont facilement atteints lors du transport de l'appareil.

Optimisation de l'injection des solutions cibles Le système fluide, en charge de la circulation d'une solution vers la cellule fluide puis la poubelle, est constitué d'un dégazeur, qui élimine les bulles d'air, d'une pompe péristaltique qui entraîne le fluide suivant son sens de rotation et d'une vanne à boucle d'injection. Ces différents éléments sont schématisés en figure 2.27. Les tuyaux sont rigides, à l'exception de ceux montés sur la pompe, de diamètre de l'ordre de 0,25 mm.

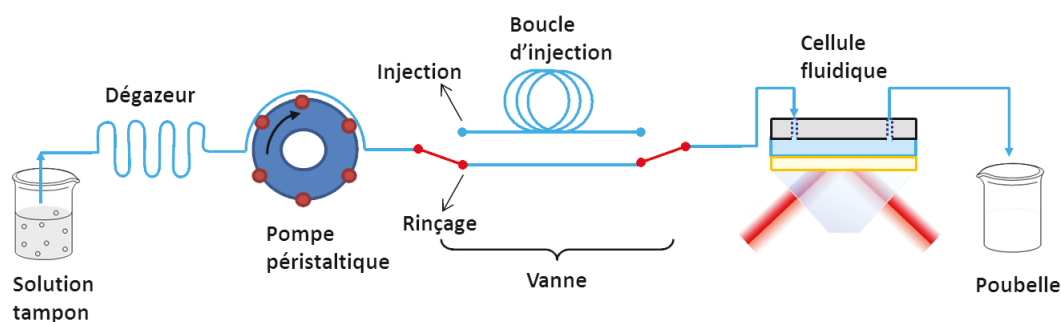


FIGURE 2.27 – Schéma du système fluide utilisé sur le prototype.

L'injection de la solution cible est réalisée par une vanne à boucle centrale qui permet de réduire le volume de solution injectée et de rendre les injections plus reproductibles. La vanne peut prendre deux positions. La première, nommée voie de rinçage sur le graphe 2.27, sert à remplir le circuit fluide de solution tampon, disposée en entrée du dégazeur. La boucle d'injection est ainsi isolée du reste du réseau pour être chargée en solution cible à l'aide d'une

seringue. Le surplus de solution cible est envoyé directement vers la poubelle. C'est la position de chargement. Différentes boucles de volumes variables sont disponibles. Une boucle de 200 μL est le plus couramment choisie.

Lorsque la vanne est basculée en seconde position, vers la voie d'injection, elle introduit la boucle emplie de solution cible dans le système de circulation principal qui mène vers la cellule fluïdique. La solution tampon vient pousser le contenu de la boucle vers la cellule.

Avec un volume de solution injectée de 200 μL et un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, les molécules cibles seront en contact avec le substrat pendant environ 4 minutes, temps suffisamment long pour observer une cinétique d'interaction.

Il est recommandé de remplir la boucle d'injection avec un volume de solution cible deux fois plus important que le volume total de la boucle de façon à chasser complètement le reste de la solution tampon présent dans la boucle. En effet, si le volume injecté par la seringue est plus faible que deux fois le volume de la boucle, la solution emplissant la boucle sera un mélange de solution cible et de solution tampon à cause du phénomène de diffusion des fluides et de la forme parabolique du front de fluïdique laminaire. Cela signifie que la vitesse de circulation du fluïde au centre du tuyau est deux fois plus importante que la vitesse moyenne (voir les points d'explication 6 et 7 du site internet [Inj]).

Malgré une consommation égale à deux fois le volume de la boucle, cette solution reste plus économe en solution cible et plus rapide qu'un circuit sans vanne, qui nécessite de remplir l'ensemble des tuyaux, depuis le dégazeur jusqu'à la cellule fluïdique.

Une étanchéité assurée et une forme de cellule flexible La cellule est rendue étanche par un film transparent en polyester (Mylar) qui se positionne au-dessus du prisme. C'est un film flexible et durable (durée de vie en utilisation : environ 6 mois), stable, résistant aux produits chimiques et à de fortes températures (jusqu'à 200°C) et qui ne se déchire pas. Ce type de joint est utilisé au laboratoire Charles Fabry sur les instruments de SPRI depuis plusieurs années. L'avantage est qu'il se découpe facilement au scalpel, de sorte que le joint peut prendre n'importe quelle géométrie. Dans un premier temps, une forme hexagonale a été choisie, de longueur 18 mm, avec deux encoches sur chaque bord pour aider à le positionner sur le prisme, comme cela est montré sur la photo de la figure 2.28.

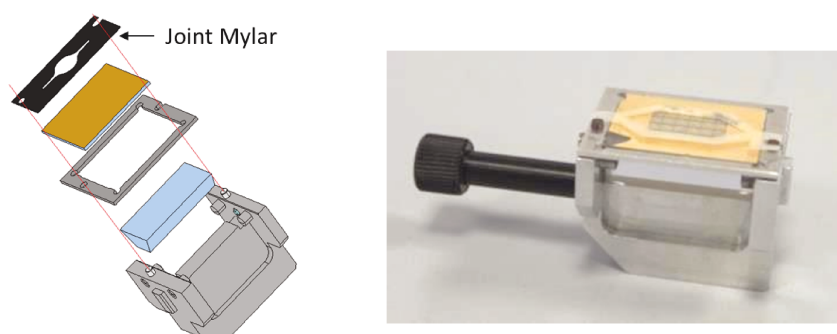


FIGURE 2.28 – Dessin CAO en vue éclatée du support de prisme et de tous les éléments qu'il intègre, dont le joint Mylar à découpe envisagée. Photographie de cet ensemble avec le joint hexagonal découpé à la main, avec une lame dorée composée d'une mire déposée au-dessus du prisme.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

Les orifices d'entrée et de sortie des fluides sont situés près des deux pointes de l'hexagone lorsque le prisme vient se plaquer contre la pièce contenant le hublot de verre, visible sur la photographie 2.26b. Un cadre métallique a été pensé pour aider au positionnement reproductible de la lame d'or sur le prisme. Ce cadre se met en place sur le prisme grâce à deux détrompeurs.

Toutefois, la forme idéale de cuve pour que le flux soit le plus uniforme possible est donnée par un joint en forme d'oeil et deux canaux fins qui dirigent le flux vers le centre de la cuve, comme le montre la vue éclatée de la figure 2.28. Cette forme ne peut être découpée à la main, mais sa fabrication a été confiée à un industriel, qui a mis au point un emporte-pièce spécifique. Il reste à tester ce type de Mylar sur le prototype.

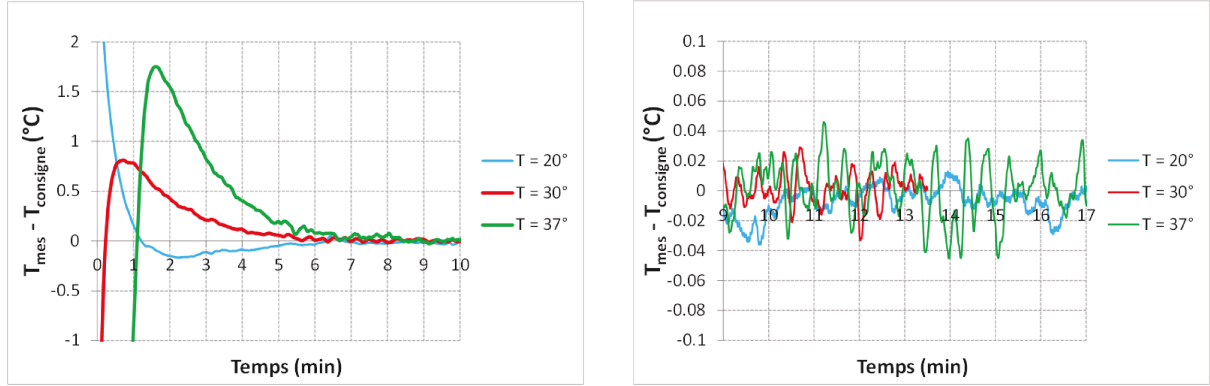
Un design en forme d'oeil permet d'éviter toute variation brusque de la section, comme expliqué dans l'article de Pike [Pike 2012]. Cet article démontre l'influence de la forme de la cellule fluidique et du débit de flux sur le remplissage de la cuve. Ces deux paramètres sont impliqués dans le type de régime de transport auquel des fluides obéissent (soit convectif, soit diffusif). Lorsque la section de cuve vue par le fluide augmente, il se produit un phénomène de mouvement de recirculation inverse du fluide appelé eddy. Dans ces zones, le transport est diffusif, ce qui signifie qu'il faudra plus de temps pour que la concentration du fluide injecté soit atteinte. Ces régions "mortes" se trouvent notamment au niveau de coins, c'est pourquoi il est déconseillé de choisir une cuve carrée. De plus, le débit de pompe doit être réglé de façon à trouver un compromis entre diminution du volume de solution nécessaire pour remplir uniformément la cuve, réduction du temps de remplissage, et formation d'eddies. La forme en oeil permet de réduire le volume de solution et le temps nécessaires pour atteindre la concentration finale en analyte en comparaison avec une forme carrée ou circulaire. Du fait du mouvement du fluide et des effets de bord, la zone centrale de la cuve atteindra dans tous les cas plus rapidement la concentration finale que les zones éloignées du centre. Ces considérations fluidiques sont d'une importance capitale lorsqu'on cherche à déterminer une concentration d'analytes.

Une température contrôlée Une sonde thermique en contact avec l'intérieur de la cellule est reliée à un système d'asservissement PID (proportionnel, intégral, dérivée). L'espace autour de la cellule étant très encombré (objectif au-dessus, prisme en-dessous, Peltiers à gauche et à droite, entrée de fluidique sur le devant), la sonde ne pouvait être positionnée autrement que de biais, sur la face avant (se reporter à la figure 2.26).

La sonde est ainsi insérée par un orifice taraudé jusqu'à la chambre d'expérience. Pour conserver la symétrie du système, et ainsi ne pas perturber l'équilibre de la température au sein de la cellule, un second trou est percé de façon symétrique à la sonde.

L'asservissement en température est contrôlé par deux cellules à effet Peltier réparties de part et d'autre de la cellule fluidique. Deux radiateurs accolés diffusent le surplus de chaleur dans l'environnement ambiant, aidés par des ventilateurs positionnés à l'arrière de l'ensemble. Le contact entre radiateur et Peltier est favorisé par un film thermo-conducteur (en mousse thermique). Les Peltier et la sonde thermique sont reliés à une carte numérique pilotée par ordinateur et alimentée en 12V. Le correcteur PID est réglé de façon automatique pour une température de consigne de 25°C dans l'air. Il est ensuite mis à l'épreuve pour trois valeurs de température de consigne caractéristiques des expériences de SPRI, à savoir 20°C, 30°C et 37°C, la cuve étant remplie d'eau. Les variations de température obtenues à la mise en route du

correcteur sont reportées en figure 2.29.



(a) Test des paramètres du correcteur PID après réglage automatique pour trois températures de consigne : $T = 20^\circ$ / 30° / 37° avec circulation d'eau dans la cuve

(b) Zoom sur l'évolution de la variation de température régulée par le PID

FIGURE 2.29 – Vérification de la qualité de l'asservissement en température de la cellule fluidique.

La figure 2.29a confirme que le jeu de paramètres PID défini par le logiciel de contrôle de température convient : les différentes températures de consigne testées sont atteintes après 7 minutes avec une stabilisation dont l'écart-type est mesuré à $0,01^\circ\text{C}$ pour les températures de 20°C et 30°C , et $0,015^\circ\text{C}$ pour une température de 37° , variations visibles sur la figure 2.29b.

Il est primordial de contrôler la température de la cellule à cette précision du centième de degrés compte tenu de la sensibilité de la mesure SPRI à des changements d'indice. En effet, l'indice de l'eau dépend de la température (et de la longueur d'onde) [Bashkatov 2003]. Dans le cadre du projet, des substrats nanostructurés sont utilisés, et leur champ plus confiné devrait être moins sensible à des variations d'indice dues à des instabilités de température. Il a tout de même été décidé de conserver la même stabilisation en température qu'avec un plasmon propagatif.

La variation de l'indice de l'eau en fonction de la température étant de l'ordre de -10^{-4} RIU/ $^\circ$, un PID stable à $0,01^\circ$ génère un bruit d'environ 10^{-6} RIU. En pratique, ce bruit étant corrélé spatialement, contrairement au bruit de photons, la soustraction d'un plot de contrôle négatif permet d'éliminer une grande partie de ce bruit thermique.

2.2.4 Pilotage d'une expérience SPRI

L'interface d'utilisation du prototype en SPRI est codée en langage Labview. Le programme de contrôle a été développé pour des appareils antérieurs d'Horiba et adapté au nouvel instrument pour implémenter le mode de mesure par suivi spectral. Jusqu'à présent, seule une mesure en variation de réflectivité était possible. Les principales modifications apportées au pilotage Labview au cours de ma thèse portent sur le programme de cinétique.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

Pour mieux comprendre le déroulement d'une mesure, l'enchaînement des étapes est résumé dans le graphe 2.30.

Initialisation :

- Pour commencer, le dialogue avec les ports COM est initié, les différents moteurs (fibre, polariseur, miroir) sont placés dans leur position initiale, et une session caméra est ouverte. L'asservissement en température est enclenché.
- Les paramètres de plage angulaire, temps d'intégration et nombre d'images moyennées sont fixés par l'utilisateur dans un fichier texte qui est ensuite chargé dans des variables Labview.

Sélection de l'angle de travail → Plasmons (en rouge sur la figure 2.30) :

- Dans un second temps, la résonance plasmon est acquise par balayage angulaire à la longueur d'onde centrale à partir d'images en polarisation TE et TM.
- Une image est sélectionnée pour définir des régions d'intérêt (ROI) localisées au niveau des plots biologiques immobilisés. Chaque ROI de la matrice définie est identifiée pour classer les plots suivant leur nature biologique (souvent plusieurs répliques sont présentes pour une même famille biologique). La grille de définition des ROI est représentée sur l'image a) de la figure 2.30.
- Les profils de résonance sont tracés pour chaque ROI. L'utilisateur pointe l'angle le mieux adapté à une mesure par suivi spectral, c'est-à-dire l'angle de résonance obtenu pour la LED centrale, comme cela est schématisé sur le graphe b) de la figure 2.30. Le balayage angulaire est réalisé à la longueur d'onde centrale pour que lors de la cinétique, les cinq mesures, acquises aux cinq longueurs d'onde de la source, se trouvent centrées sur la résonance pour des raisons de symétrie.

Mesure cinétique (en bleu sur la figure 2.30) :

- L'étape de mesure de cinétique en temps réel est ensuite amorcée par l'acquisition de valeurs de réflectivité de référence en polarisation TE à chaque longueur d'onde considérée avant de régler la polarisation en TM. La fibre balaye de façon successive l'ensemble des LEDs. Les images TE permettent de normaliser les images TM pour corriger les inhomogénéités d'éclairement à l'échelle de la puce, et uniformiser le niveau de réflectivité des images prises aux différentes longueurs d'onde, chaque LED délivrant un flux légèrement différent.
- Un lot d'images du nombre fixé par le moyennage choisi (en général 8 images) est capturé puis transféré vers l'ordinateur pour chaque LED adressée par la fibre, ce qui est schématisé par la pile d'images c) de la figure 2.30. Chaque image de la pile représentée est obtenue par la moyenne de 8 images, et cela pour chacune des 5 longueurs d'onde de la source à LEDs. Ces images sont traitées pour récupérer les valeurs moyennes de réflectivité de chaque ROI et à chaque longueur d'onde.
- Ces 5 valeurs sont envoyées vers un sous-programme Matlab intégré à Labview qui ajuste ces points de mesure acquis à 5 longueurs d'onde par une fonction mathématique (typiquement lorentzienne ou polynomiale, comme cela est discuté dans le dernier chapitre)

définie par différents paramètres et une tolérance qui limite le nombre d'itérations et la précision de reconstruction. Une fois la résonance tracée, la longueur d'onde du minimum est calculée de façon analytique comme le minimum de la fonction d'ajustement.

- Cette valeur de la longueur d'onde de résonance est affichée et enregistrée dans un fichier texte, ainsi que les 5 valeurs de réflectivité pour laisser la possibilité d'une analyse post-traitement.

Puis le cycle est repris au temps suivant de façon à reconstruire en temps réel la cinétique d'interaction entre deux espèces moléculaires, comme par exemple deux brins d'ADN, interaction illustrée sur le graphe d) de la figure 2.30. Chaque courbe est acquise sur une ROI donnée.

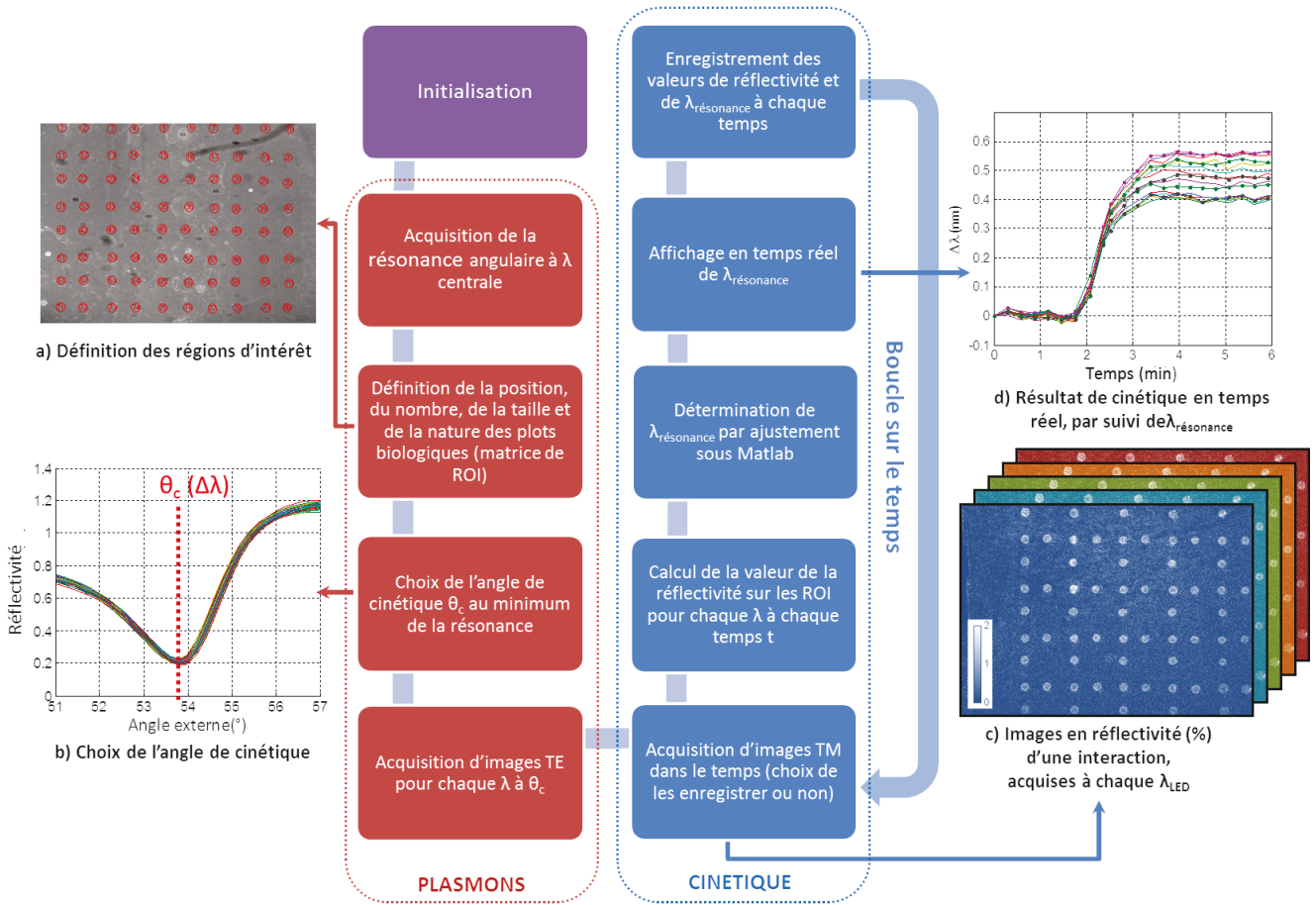


FIGURE 2.30 – Enchaînement des étapes du programme Labview pour une expérience de cinétique en mode de suivi spectral.

Remarque : Pour repérer plus facilement l'emplacement des plots sondes afin de définir une grille de ROI précise, une première injection d'une séquence de calibration est réalisée, lorsque cela est possible, de façon à obtenir une image en variation de réflectivité telle que celle vue en image c) de la figure 2.30. Sur cette image, les plots qui s'éclairent sont les sondes ADN. Les espaces vides visibles une colonne sur deux et une ligne sur deux sont les zones de référence, qui servent de contrôle négatif. Cette image de variation de réflectivité est ensuite chargée dans le

programme pour ajuster la position des cercles délimitant les ROI sur les plots de sondes.

2.2.5 Performances instrumentales

Les performances de la partie SPRI du prototype sont caractérisées d'une part en terme d'imagerie et d'autre part en terme de sensibilité de détection d'un point de vue instrumental et plasmonique.

2.2.5.1 Qualité de l'imagerie

Les zones nanostructurées sur les premières séries de puces fabriquées au cours de ma thèse, nécessaires au couplage avec le SERS, ont une taille typique de 150 par 150 microns. Par lithographie électronique, il est difficile de graver des zones plus grandes en raison du temps d'écriture important (4h d'écriture pour une surface de 1mm²). Des plots de sondes biologiques sont déposés sur chacune de ces zones nanostructurées lors d'expériences couplées SPRI et SERS. La résolution spatiale et la stabilité des images lors des balayages angulaires et spectraux doivent donc être de l'ordre de quelques dizaines de μm au maximum afin d'imager ces zones d'intérêt.

Les éléments du montage optique déterminant la qualité de l'image sont le prisme, dont l'indice et l'angle au sommet ont été optimisés comme expliqué dans les paragraphes 2.2.2.2 en page 78 et 2.2.2.3 en page 82, et les conjugaisons optiques présentées en paragraphe 2.2.2.

Une attention plus particulière est ici portée à l'influence de la conjugaison prisme/caméra, qui est garante de la stabilité de l'image lors du balayage angulaire réalisé en début d'expérience. L'imagerie est aussi caractérisée en terme de résolution spatiale grâce à une mire.

Influence du réglage des conjugaisons optiques D'abord, la conjugaison miroir/prisme est chargée de garder le faisceau source centré sur le prisme. Si cette conjugaison est mal réglée, l'éclairage va varier en fonction de l'angle d'incidence. Le diamètre du faisceau source, égal à 6 mm, étant plus grand que la zone sur laquelle les sondes sont immobilisées (de l'ordre de 1,5 par 1,5 mm), on dispose d'une certaine tolérance sur le réglage de cette conjugaison.

Par contre, satisfaire la conjugaison substrat/caméra sur une plage angulaire de plusieurs degrés autour de la résonance peut se révéler impossible. En effet, comme expliqué précédemment (voir figure 2.23 en page 83), la caméra reste fixe lors du balayage angulaire alors que l'image intermédiaire du substrat par le prisme change de position avec l'angle d'incidence. Lorsque l'angle au sommet du prisme est bien choisi et que les indices des matériaux de la lame et du prisme sont proches, le décalage de l'image peut être négligé.

Les conditions réelles d'expérience peuvent rendre le réglage de l'imagerie bien plus chaotique. Prenons l'exemple concret de l'analyse d'une biopuce dont les plots sondes sont immobilisés sur un substrat nanostructuré en borosilicate étiré, matériau choisi dans le cadre du projet Piranex car courant et peu coûteux. Pour un prisme en LAK34 d'angle au sommet 20° et une résonance des nanostructures (de période 400 nm et de diamètre 200 nm) intervenant pour un angle de 74,3° dans le borosilicate à la longueur d'onde de 800 nm, les images acquises à différents angles balayés, à savoir 77,3°, 74,3° et 71,3°, montrent des zones nanostructurées carrées, de côté 150

μm , décalées d'une image à l'autre sur la figure 2.31. Une translation de l'image est observée sur la caméra, égale à 10 pixels entre θ et $\theta+3^\circ$, correspondant à environ $60 \mu\text{m}$ de décalage sur le substrat, significatif par rapport aux $150 \mu\text{m}$ de largeur de zone nanostructurée. A l'inverse, entre les images à θ et $\theta-3^\circ$, aucun décalage n'est visible.

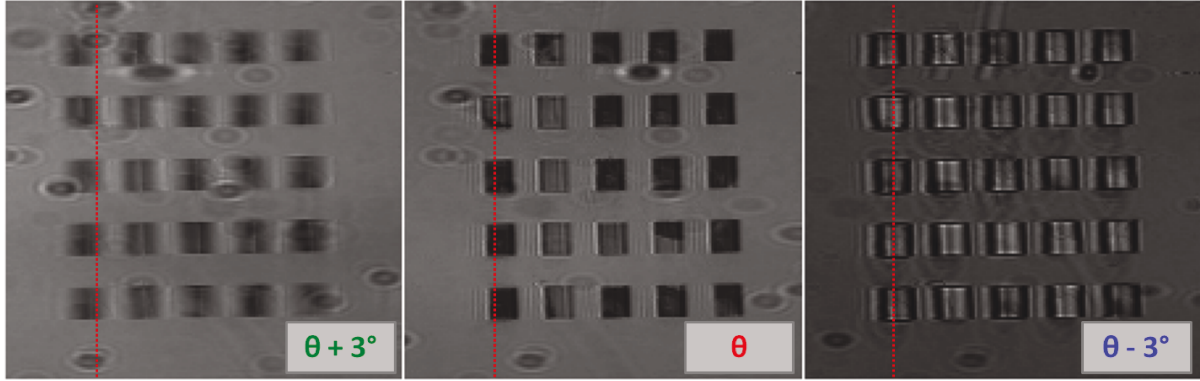


FIGURE 2.31 – Visualisation du décalage de l'image aux angles $77,3^\circ$, $74,3^\circ$ et $71,3^\circ$ de gauche à droite avec un prisme de LAK34 et une lame de BK7 nanostructurée sur des zones carrées de dimension $150 \mu\text{m}$. Le trait rouge sert de repère fixe sur le capteur CCD.

Ce décalage de l'image avec l'angle est problématique lors de l'étape de balayage angulaire intervenant en début d'expérience et permettant de définir l'angle de travail de cinétique. En effet, la taille des ROI analysées est seulement d'une dizaine de pixels de diamètre en présence de nanostructures, soit $65 \mu\text{m}$ environ, taille choisie avant le balayage angulaire de façon à ce que les ROI restent comprises à l'intérieur des zones structurées durant l'acquisition du plasmon angulaire. Dans les conditions actuelles du réglage optique, l'image se décale d'environ 10 pixels, c'est-à-dire que tous les pixels de la ROI, d'une taille de 10 pixels également, voient une partie complètement différente de la biopuce entre le début et la fin du balayage angulaire. Pour certains angles, les ROI seront positionnées sur une partie nanostructurée, et pour d'autres, sur une partie en dehors de cette zone, sur or plan (voir le repère en pointillés rouges de la figure 2.31, fixe sur le capteur).

Le profil angulaire de réflectivité généré sur chaque ROI à partir des images enregistrées lors de l'acquisition du plasmon sera donc très difficile à interpréter, du fait du mélange entre résonances des nanostructures et de l'or plan, moyennées dans le signal acquis sur la ROI. Le minimum de réflectivité ne peut être déterminé précisément, et il sera donc compliqué de définir un angle de travail optimal.

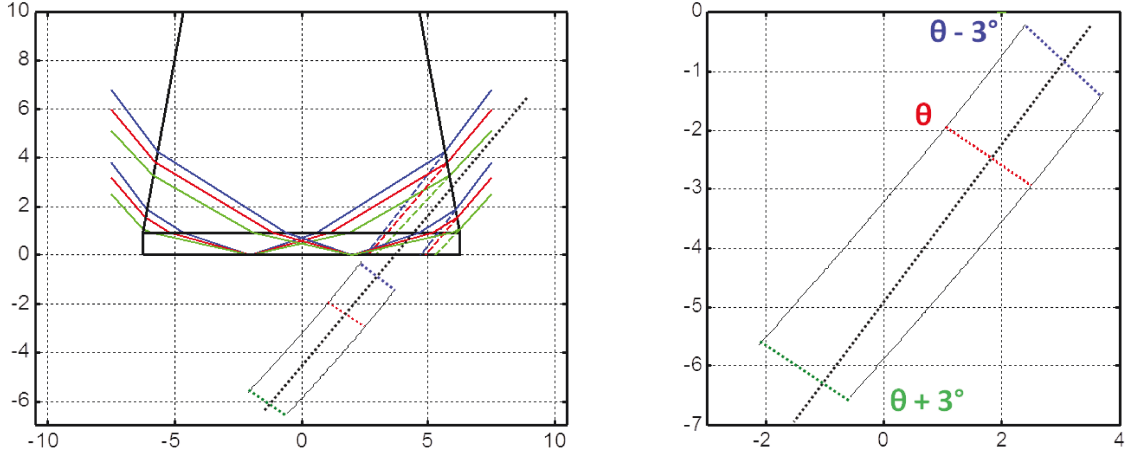
Ce problème pourrait être corrigé informatiquement en déplaçant la grille de ROI au fur et à mesure du balayage angulaire.

Les images des nanostructures mettent également en évidence la difficulté de choisir une distance de focalisation. Premièrement, aucune des images n'est complètement nette. Même suivant la direction de la longueur du prisme, parallèle au repère rouge, un léger flou persiste.

Pour expliquer plus précisément l'origine de ces défauts d'imagerie, une simulation optique est réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience, c'est-à-dire qu'un prisme en LAK34 d'angle

Chapitre 2. Développement de l'instrument

au sommet 20° est considéré, ainsi qu'une lamelle en BK7, et pour trois angles d'incidence centrés autour de l'angle de résonance de $74,3^\circ$ obtenu dans l'expérience présentée précédemment, les deux autres angles étant éloignés de $\pm 3^\circ$ de l'angle central de résonance. Ce tracé de rayons permet de trouver la position des images intermédiaires pour chacun des trois angles en question, dessinées sur le graphe 2.32 : le trait vert en pointillés modélise l'image intermédiaire à $77,3^\circ$, le rouge l'image à $74,3^\circ$ et le bleu l'image à $71,3^\circ$. Le trait en pointillés noirs représente l'axe optique de la caméra, qui reste fixe pendant le balayage angulaire.



(a) Tracé des images intermédiaires à $\theta + 3^\circ$ et $\theta - 3^\circ$ (b) Zoom sur la position et l'inclinaison des 3 images

FIGURE 2.32 – Tracé des images intermédiaires à $77,3^\circ$ (pointillés verts), $74,3^\circ$ (pointillés rouges) et $71,3^\circ$ (pointillés bleus), avec un substrat de BK7, à 800 nm et sur un prisme de LAK34 d'angle au sommet 20° . Le trait en pointillés noirs schématise l'axe optique de la caméra, fixe pour tous les angles balayés.

Au regard de la figure 2.32, les trois images intermédiaires considérées se retrouvent très éloignées les unes des autres, rendant une focalisation adaptée pour l'ensemble de la plage angulaire impossible. La distance séparant les deux images extrêmes verte et bleue étant de 7 mm environ, le plan de focalisation choisi ne pourra être optimal pour l'ensemble de ces images. Ce plan de focalisation se situe près de l'image intermédiaire rouge puisque le réglage de la netteté est effectué avant balayage, à l'angle central. Le flou s'accroît en s'éloignant de ce plan, jusqu'à ne plus distinguer les bords des zones carrées suivant la direction de la propagation du faisceau dans le cas de l'incidence $\theta + 3^\circ$, pour laquelle le plan de l'image intermédiaire se trouve deux fois plus éloigné du plan de l'image centrale qu'à l'incidence de $\theta - 3^\circ$.

De plus, un point fixe du capteur CCD verra une partie différente du substrat en fonction de l'angle d'incidence, comme schématisé en figure 2.32b. En effet, l'axe optique de la caméra en pointillés noirs, représenté à titre illustratif, image le centre du substrat à l'angle θ et à l'angle $\theta - 3^\circ$ mais ce n'est pas le cas à l'angle $\theta + 3^\circ$. Cela explique le décalage de l'image à $\theta + 3^\circ$ par rapport à l'image à θ de la figure 2.31.

En raison de ces défauts d'imagerie, il est délicat de définir précisément les ROI pour l'acquisition des données et l'extraction des signaux SPR.

Ces difficultés de réglage optique auraient pu être anticipées si le modèle utilisé pour évaluer les performances optiques au début du projet avait pris en compte la réfraction introduite par une puce en borosilicate étiré (proche du verre BK7, d'indice 1,5 mais fabriqué différemment, sans polissage). La différence d'indice avec le prisme en LAK34 ($n=1,72$) induit des angles internes beaucoup plus rasants que ceux prévus par ces premiers calculs erronés.

Une solution pour s'affranchir de ce problème serait de changer soit le matériau du prisme pour passer à du BK7, et dans ce cas l'image intermédiaire se retrouve à l'intérieur du prisme, soit remplacer la lamelle en BK7 par du LAK34 ou du SF10 (d'indice proche du LAK34), lorsqu'un prisme de LAK34 est choisi.

La première proposition n'est pas envisageable car les angles de résonance des nanostructures étudiées pour ce projet (de diamètre 200 nm et de période 400 nm) sont très rasants dans le BK7 sur la plage de longueurs d'onde accessible. Par exemple, 75° dans le BK7 avec un prisme en BK7 d'angle au sommet 32° donne un angle externe de $14,5^\circ$ non atteignable dans la configuration du prototype, qui ne peut voir en-deçà de 20° . Les images seraient également très écrasées à cause de l'anamorphose présente suivant la largeur de prisme, rendant leur traitement plus délicat.

La meilleure façon de corriger ce défaut d'imagerie pour imager ce type de structures consisterait alors à changer le matériau de la biopuce. Par exemple, si prisme et lamelle étaient en LAK34, les images intermédiaires seraient moins éloignées les unes des autres et positionnées à l'intérieur du prisme, comme l'illustre la figure 2.33. Dans ce cas, l'image serait moins floue aux angles extrêmes de la plage angulaire balayée, et le décalage de l'image moins important (l'axe optique de la caméra reste à peu près centré sur l'image sur toute la plage).

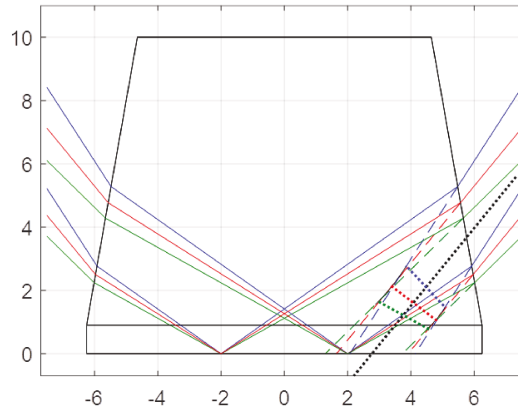


FIGURE 2.33 – Tracé des images intermédiaires sur une plage de $\pm 3^\circ$ autour d'un angle central interne de $74,3^\circ$ à 800 nm, avec un substrat et un prisme en LAK34, d'angle au sommet 20° . Le trait en pointillés noirs schématise l'axe optique de la caméra. Les axes sont gradués en millimètres.

Ces observations expérimentales pointent l'importance du choix du matériau du substrat pour définir les meilleures conditions expérimentales de l'expérience de cinétique qui suit l'acquisition du plasmon, et impacte donc directement les performances de détection.

Résolution de l'imagerie La qualité de l'image est également caractérisée par la limite de résolution. Une mire a été fabriquée par dépôt de motifs carrés de côté 2 mm constitués de bandes de chrome de largeur variable (200, 100, 50, 40, 30 et 20 μm) sur un film d'or d'épaisseur 50 nm.

Cette mire est imagée de façon à évaluer la taille minimale de bandes résolue. L'image obtenue en figure 2.34a montre un motif positionné au centre de la cellule fluide. Il n'y a pas de nanostructures sur la mire, elle ne résonne pas au même angle. Pour se ramener à un angle de résonance proche de celui des nanostructures, et donc équivalent aux conditions réelles d'expérience, l'indice du liquide a été augmenté par l'ajout de sucre dans de l'eau. L'angle de résonance de la mire est alors égal à 73° à la longueur d'onde de 800 nm.

Puisque l'analyse est réalisée à la résonance, la résolution spatiale est dégradée dans le sens de propagation de l'onde plasmon. En effet, la netteté de l'image dans cette direction dépend de la distance de propagation du plasmon, caractéristique intrinsèque à la technique SPR. A titre d'exemple, un plasmon créé sur 50 nm de film d'or va se propager le long de l'interface or/diélectrique sur une distance d'une vingtaine de micromètres à la longueur d'onde de 800 nm. Cette distance augmente avec la longueur d'onde.

Dans le cas d'un réseau de nanostructures, il est moins évident de déterminer cette grandeur. Un calcul analytique n'est pas réalisable. Numériquement, le problème est complexe car la méthode des éléments finis n'est pas adaptée à cette échelle de longueur. Elle fait intervenir un maillage très fin, de l'ordre du nanomètre, autour des nanoparticules alors que l'étude de la propagation nécessite un calcul du champ à l'échelle de la dizaine de micromètres. Ces travaux de simulation font l'objet de la thèse de Frédéric Banville de l'Université de Sherbrooke (Département d'Ingénierie Électrique et Informatique), en co-tutelle avec le laboratoire Charles Fabry. Une valeur précise ne peut pour l'instant être avancée, mais la distance de propagation de l'onde parcourant les nanostructures semble être significativement inférieure à celle associée à un plasmon propagatif.

Les profils du graphe 2.34b montrent que les bandes de largeur 20 μm (dimension la plus petite présente sur la mire) sont résolues dans la direction orthogonale au sens de propagation du plasmon (profils bleus) alors qu'elles le sont légèrement moins bien dans la direction parallèle au faisceau (profils rouges).

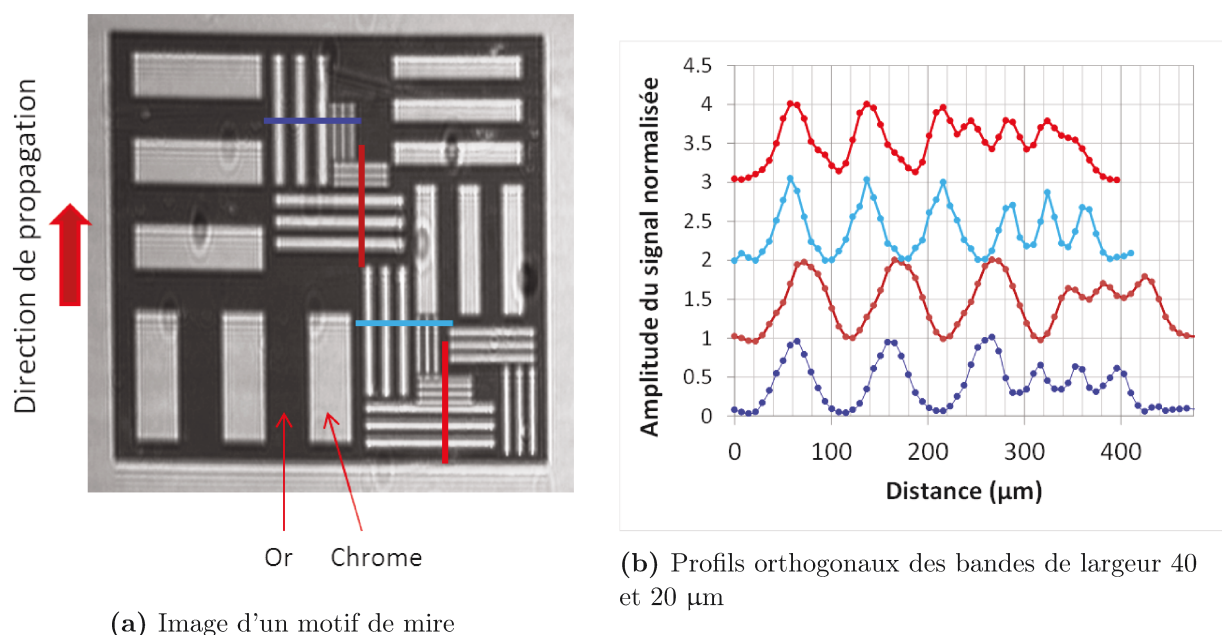


FIGURE 2.34 – Mesure de la résolution spatiale sur l'image d'une mire dont les dimensions varient entre 20 μm et 200 μm . Les profils du graphe (b) sont repérés sur l'image de la mire (a) par un trait de couleur correspondante. Les profils rouges sont tracés suivant la direction de propagation du plasmon.

La résolution spatiale, mesurée sur l'image d'une mire, est déterminée à 20 μm environ dans les deux directions. Cette résolution est tout à fait suffisante compte tenu de la taille des zones nanostructurées des substrats Piranex et de la taille des plots biologiques, de l'ordre de 150 μm .

2.2.5.2 Caractéristiques de la détection

L'ensemble des bruits instrumentaux perturbant la détection est présenté dans le paragraphe suivant. En particulier, l'influence du bruit de photons est traitée, ainsi que l'effet du bruit de speckle dégradant l'uniformité de l'intensité des images.

Outre ces considérations d'imagerie, d'autres paramètres influent sur la qualité des résultats de mesure, en particulier la discrétisation temporelle du suivi de cinétique, la maîtrise du système fluide et la sensibilité plasmonique du transducteur. Ces différents facteurs responsables de la sensibilité finale de la mesure sont discutés ici.

A noter que les éventuels artefacts de détermination de la position de la résonance dus au choix de l'algorithme d'ajustement seront décrits dans le chapitre 3 sur un véritable jeu de données expérimentales provenant de l'expérience de validation du couplage SPRI/SERS.

Bruit instrumental Est-ce que le système de détection est limité par le bruit de photons ?

Le bruit de photons, autrement appelé bruit Schottky ou shot noise en anglais, est une limite fondamentale d'un système de détection optique, lié à la nature quantique de la lumière.

Chapitre 2. Développement de l'instrument

Il dépend de la source lumineuse utilisée. Une source émet des photons de façon aléatoire, qui sont reçus par le détecteur suivant une statistique de Poisson. En pratique, cela signifie que pour un nombre moyen de N photons détectés pendant un temps donné, l'écart-type sur le nombre de photons reçu est égal à \sqrt{N} .

Un système limité par le bruit de photons est ainsi un système optimisé au mieux.

Pour s'assurer que le bruit limitant est bien le bruit de photons, il s'agit d'abord d'identifier les différentes sources de bruit influant sur la détection :

- Les **fluctuations d'intensité de la source** obéissent au bruit de photons.

⇒ La réflectivité mesurée sur les images au cours d'une expérience peut descendre jusqu'à 15%, valeur de réflectivité à la résonance. Le nombre maximal d'électrons collectés par un pixel étant égal à 18000 (valeur dépendant du capteur) et étant atteint sur les images TE pour une réflectivité de 100%, on dispose de $(15/100) \times 18000$ soit 2700 électrons dans le cas considéré, pour une réflectivité de 15%. Le rendement quantique de la caméra à la longueur d'onde moyenne de 800 nm valant 0,13, le nombre de photons incidents est égal à 21000, soit un bruit de $\sqrt{21000}$ égal à 145 photons. Il faut ensuite convertir ce bruit en nombre d'électrons par une multiplication par le rendement quantique de 0,13, pour obtenir un bruit de photons de 19 électrons.

- Le **courant d'obscurité** du capteur CCD (modèle SONY ICX 285) désigne le nombre d'électrons produits de façon spontanée par le semi-conducteur. C'est un bruit intrinsèque à la technologie CCD. Il traduit l'agitation thermique des porteurs de charges du détecteur et augmente avec la température.

⇒ Le courant d'obscurité est proportionnel au temps de pose, et varie entre 0,1 et 10 électrons par pixel et par seconde à une température de 20°C en fonction du modèle de caméra considéré (valeur exacte de la caméra choisie non spécifiée dans sa documentation). Il se traduit par un offset d'intensité sur les images. Le temps de pose est typiquement de 45 ms sur le prototype. Dans le cas le plus défavorable de 10 électrons par seconde, le signal issu du courant d'obscurité est égal à 0,45 électrons et peut être négligé. Par conséquent, le **bruit thermique** qui en découle, correspondant au bruit de Shot sur le courant d'obscurité, donc à la racine de 0,45, est également très faible.

- Le **bruit de lecture**, également lié au système électronique du capteur, correspond à l'erreur commise sur la lecture de la charge du pixel.

⇒ Ce bruit de lecture est de l'ordre de 6 électrons par acquisition.

Au total, le bruit instrumental associé au détecteur est égal à la somme quadratique de l'ensemble de ces bruits, soit :

$$Bruit_{tot} = \sqrt{Bruit_{phot}^2 + Bruit_{obs}^2 + Bruit_{lecture}^2}$$

ce qui donne une application numérique de 19,9 électrons. Par conséquent, le bruit de photons, d'une valeur de 19 électrons, est dominant par rapport aux bruits intrinsèques du capteur.

Une autre manière de prouver que le bruit de photons limite le système consiste à vérifier que le bruit mesuré sur l'expérience varie comme la racine carrée du nombre d'images moyennées par acquisition et la racine carrée du nombre de pixels sur lequel le signal est extrait.

En effet, le bruit de photons, quantifié sur une image et un pixel de la caméra, suit la loi suivante :

$$Bruit_{photons}(N_{e^-}/pix) = \sqrt{\frac{\Phi_{photons} \times t_{int} \times \eta_{CCD}}{N_{ima} \times N_{pix}}} \quad (2.1)$$

avec η_{CCD} le rendement quantique de la caméra, qui dépend de la longueur d'onde, t_{int} le temps d'intégration de la caméra, N_{ima} le nombre d'images moyennées lors de l'acquisition et N_{pix} le nombre de pixels analysés lors du traitement des images. On note que le bruit de photons est ainsi réduit lorsque le signal est moyenné sur un grand nombre d'images ou de pixels.

Le bruit de photons peut être traduit en valeur de réflectivité en pourcentage par la relation suivante :

$$Bruit_{photons}(\%) = \frac{Bruit_{photons}(N_{e^-}/pix)}{18000} \times 100 \quad (2.2)$$

sachant que lorsque la caméra est saturée, le nombre d'électrons maximal reçu par pixel vaut 18 000, comme cela a été dit auparavant.

Le bruit expérimental est mesuré comme l'écart-type du signal en intensité en niveaux de gris d'une LED, celle de longueur d'onde 800 nm, sur les images acquises pendant 15 minutes sur un prisme en air, et en 100 points de taille 1 pixel répartis sur une zone de 100 par 100 pixels. Dans le but de vérifier que le mouvement mécanique de balayage de la fibre optique n'ajoute pas un bruit supplémentaire sur l'intensité, cette mesure de bruit est effectuée en deux exemplaires, avec balayage de la fibre, et sans balayage. Afin de confirmer que ce bruit mesuré est bien du bruit de photons, le nombre d'images moyennées est réglé à différentes valeurs, 2, 4, 8, 16 et 32. Le résultat de ces mesures est tracé en figure 2.35 et comparé au bruit de photons théorique, égal au rapport entre la racine carrée de l'intensité moyenne des images acquises pendant 15 minutes et la racine carrée du nombre d'images accumulées.

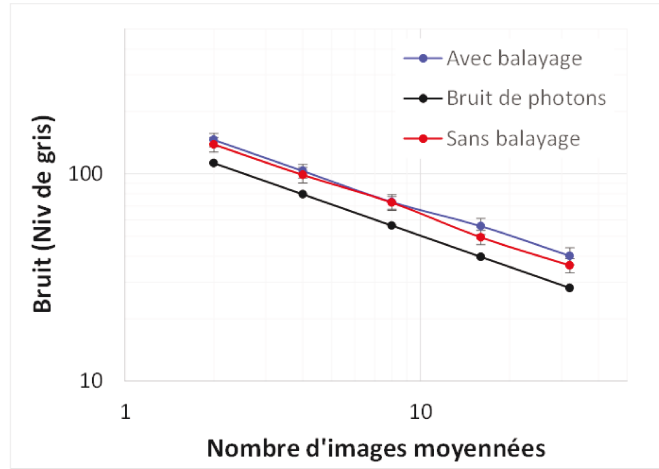


FIGURE 2.35 – Mesure du bruit en intensité d'une LED en niveaux de gris (sur 16 bits, soit un maximum de 65563), avec et sans balayage de la fibre, pour un nombre variable d'images moyennées, en échelle log-log, sur un pixel, comparée au bruit de photons théorique. Les barres d'erreur représentent la dispersion du bruit obtenue sur 100 ROI incluses dans un carré de 100 par 100 pixels au centre des images acquises dans le temps.

La figure 2.35 révèle d'une part que le bruit expérimental est le même avec et sans mouvement de la fibre. Le balayage mécanique de la fibre, garant de la mesure par interrogation spectrale, n'introduit pas de bruit supplémentaire.

Au regard de la figure 2.35, il est vérifié que le bruit expérimental évolue comme l'inverse de la racine carrée du nombre d'images moyennées, tendance caractéristique du bruit de photons, comme démontré par l'équation (2.1). Même si une légère différence est observée entre bruit expérimental et théorique, le bruit de détection dominant est bien le bruit de photons.

Comment se traduit ce bruit de photons, mesuré en écart-type sur la réflectivité, sur la détermination de la position spectrale de la résonance, qui est la grandeur mesurée lors d'une expérience de cinétique ?

Dans les conditions expérimentales, 8 images sont moyennées pour des ROI d'une centaine de pixels de surface. Le bruit de photons, exprimé comme l'écart-type sur la réflectivité, pour ces paramètres d'acquisition est de l'ordre de 0,02%. Une simulation a été réalisée pour calculer l'écart-type sur la position de la résonance engendré par ce bruit attribué aux valeurs de réflectivité des 5 LEDs. En pratique, un écart-type de $\sigma = 0,02\%$ est considéré sur les valeurs de réflectivité moyennes mesurées expérimentalement pour 5 LEDs données (en l'occurrence de longueurs d'onde 720, 735, 760, 780, et 800 nm) sur un film d'or. Un tirage aléatoire donne 5 valeurs de réflectivité comprises dans l'intervalle $R_{moy,LED} \pm \sigma$, qui sont ensuite ajustées par une fonction lorentzienne, cela répété 1000 fois. La longueur d'onde du minimum de la fonction lorentzienne tracée à chaque tirage est relevée. Cette position spectrale de la résonance varie suivant un écart-type égal à 25 pm.

Cela signifie que la position spectrale de la résonance ne pourra être déterminée à mieux que 25 picomètres près, ce qui donne la résolution de la détection.

Une autre source de bruit a été évoquée précédemment, lors de la caractérisation du système d'illumination quant à ses performances en terme de stabilité spectrale (voir en page 74). Il s'agit de fluctuations de la valeur de la longueur d'onde émise par une LED, dont l'écart-type est mesuré à 14 pm. De la même façon que précédemment, les variations de position de la résonance dues à ce bruit spectral sont simulées par un ajustement lorentzien appliqué à 5 valeurs de réflectivité moyennes pour des longueurs d'ondes variant aléatoirement entre $\lambda_{moy} \pm 14 \text{ pm}$, pour $\lambda = 720, 735, 760, 780, \text{ et } 800 \text{ nm}$, le tirage étant réalisé 1000 fois. Avec un bruit sur l'émission des LEDs de 14 pm, la position de la résonance varie d'un écart-type égal à 9 pm.

Le bruit spectral d'émission des LEDs est donc inférieur au bruit de photons. Le système est effectivement limité par le bruit de photons.

Ainsi, la mesure de l'évolution du bruit en fonction du nombre d'images moyennées a prouvé que le bruit limitant la détection est le bruit de photons. Or, cette analyse a été effectuée sur un unique pixel de l'image. Une étude similaire à celle présentée dans la figure 2.35 est cette fois menée pour étudier l'évolution du bruit avec le nombre de pixels moyennés.

Le nombre d'images accumulées est fixé à 8, valeur choisie lors des expériences réalisées sur le prototype, et la mesure est effectuée avec balayage mécanique de la fibre. Cette étude est réalisée sur un prisme dans l'air, et le temps d'intégration de la caméra a été réglé de sorte que l'intensité moyenne en niveaux de gris soit équivalente à une réflectivité de l'ordre de 30% pour se ramener à des conditions expérimentales classiques. En effet, la réflectivité acquises sur les images en présence d'une lame d'or ne dépasse pas 30% au cours d'une expérience de cinétique.

Le bruit expérimental est comparé au bruit de photons théorique, égal à $\sqrt{I_{moy}} / \sqrt{8 \times N_{pix}}$, I_{moy} étant l'intensité moyenne mesurée sur le nombre de pixels N_{pix} . Les résultats sont représentés sur la figure 2.36a. Le bruit expérimental correspond à l'écart-type en intensité mesuré sur les images acquises au cours du temps, durant 15 minutes, et moyenné sur 100 ROI choisies au centre de l'image. Les barres d'erreurs sont égales à la déviation de ce bruit moyen sur les 100 ROI de l'image.

Le bruit expérimental mesuré sur 1 pixel est légèrement supérieur au bruit théorique, comme cela a déjà été discuté précédemment. Ce point est égal à celui tracé sur la figure 2.35 pour 8 images moyennées. La courbe diverge rapidement de la loi d'évolution théorique du bruit de photons. Le tracé de deux asymptotes, en tirets rouges, permet d'estimer une "fréquence de coupure" approximative, positionnée au croisement des deux asymptotes, autour de 50 pixels moyennés. Au-delà de ce nombre de pixels analysé, le bruit tend vers un plateau proche de 10 niveaux de gris, soit 0,015% de variations d'intensité, et ne diminue que très faiblement.

Cela signifie que lorsque le signal est extrait sur plus de 50 pixels environ, un autre bruit devient dominant. Ce bruit spatial provient du **phénomène de speckle** introduit par la cohérence spatiale de la source. Il se traduit par des variations hautes fréquences l'intensité sur la différence entre deux images acquises. Une figure de grains dont l'intensité est aléatoirement

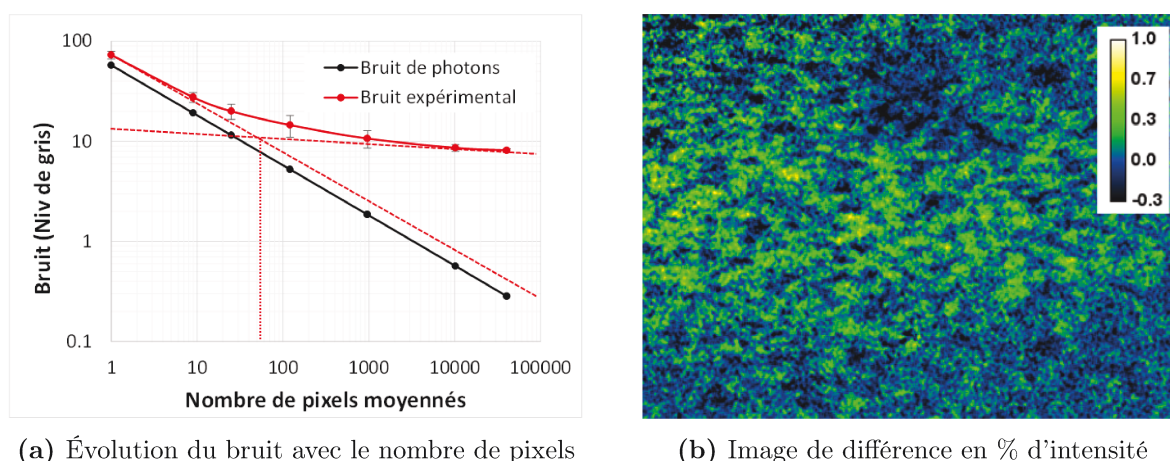


FIGURE 2.36 – Mise en évidence du bruit spatial introduit par le phénomène de speckle : (a) tracé de l'écart-type de l'intensité dans le temps (sur 80 points de mesure, soit 15 minutes d'acquisition) à $\lambda = 800$ nm en fonction du nombre de pixels analysés, et (b) résultat de la soustraction de deux images acquises à 10 min d'intervalle sur un prisme en air, à 800 nm et pour 32 images moyennées.

forte ou faible apparaît lors de la soustraction d'images consécutives acquises dans le temps. Ce bruit de speckle est observable sur l'image de la figure 2.36b correspondant à la différence de deux images acquises sur un prisme dans l'air à un intervalle d'une dizaine de minutes, à la longueur d'onde de 800 nm, pour 32 images moyennées, nombre d'images choisi pour diminuer le bruit de photons de façon à rendre le phénomène de speckle visible. L'image a été normalisée par une image en polarisation TE pour se ramener à des variations d'intensité en %. L'amplitude de ces variations spatiales d'intensité est de l'ordre de 1%.

Le speckle est généré par l'emploi d'une fibre multimodes et d'une source LED relativement monochromatique. Les multiples modes supportés par la fibre, dont le nombre dépend de son ouverture numérique et de son rayon de coeur, interfèrent entre eux lors de leur propagation le long de la fibre, ce qui donne cette figure de speckle [Bartula 2008, Rodriguez-Cobo 2012].

La taille des grains peut être évaluée en calculant la fonction d'autocorrélation d'une zone au centre de l'image. La largeur à mi-hauteur de la fonction donne une largeur de grain d'environ 7 pixels, soit une aire de 50 pixels au total. Cette valeur correspond à la fréquence de coupure de l'évolution du bruit observée en figure 2.36a. La granularité de l'image devient ainsi le bruit limitant lorsque le nombre de pixels choisi pour l'analyse des données est supérieur à la taille des grains. En effet, lorsque la zone analysée est incluse à l'intérieur d'un grain, le seul bruit en intensité mesuré est le bruit de photons. Par contre, lorsque la taille de la zone d'analyse dépasse la taille d'un grain, les variations spatiales d'intensité dues à la figure de speckle sont également prises en compte et prévalent sur le bruit de photons.

Il existe différentes solutions pour atténuer le speckle, comme l'agitation de la fibre qui détruit les interférences, l'ajout d'une membrane vibrante en sortie de fibre, d'un diffuseur ou d'un élément diffractant qui élimine la cohérence spatiale de la source [Wang 1998, Thomas 2012]. Toutefois, cela complique le montage et entraîne une perte de flux.

Lorsque le signal est extrait sur plus de 50 pixels pour 8 images moyennées, le bruit expérimental n'est plus dominé par le bruit de photons. Un bruit spatial s'introduit du fait de l'existence du phénomène de speckle. Par conséquent, l'évolution du bruit tend vers une asymptote proche d'une valeur de 0,015%. Cette observation aurait également pu être obtenue en augmentant le nombre d'images moyennées pour compléter la figure 2.35. En effet, la figure de speckle évolue à la fois spatialement et temporellement, ce qui signifie que l'intensité en un point de l'image varie lentement au cours du temps à cause du speckle. En pratique, les plots biologiques analysés ont une dimension de 150 μm correspondant à un nombre de pixels total proche de 1000. Le bruit sur une mesure de cinétique sera donc limité par ce bruit spatial aléatoire décorrélé, qui ne peut être corrigé à la manière du bruit thermique par soustraction d'un contrôle négatif.

Résolution temporelle Lors d'une mesure de cinétique, 5 valeurs de réflectivité associées aux 5 longueurs d'onde d'excitation des LEDs sont enregistrées à chaque temps t . Par suite, l'acquisition est ralentie en comparaison à une mesure de variation de réflectivité : un point de mesure est acquis toutes les 13 secondes environ pour une mesure en $\Delta\lambda$ contre 3 secondes pour une mesure en ΔR , avec un nombre d'images moyennées fixé à 8.

La durée d'une mesure prend en compte le temps d'acquisition des images par la caméra, le déplacement de la fibre vers la LED suivante et le temps de traitement par le programme Labview. Plus précisément, le cycle d'acquisition en suivi spectral est décomposé suivant les étapes ci-après :

- le **déplacement de la roue à fibre** : il faut compter 1,1 secondes de délai pour le déplacement de la fibre entre chaque LED, et 2,1 secondes pour le retour à la première LED une fois les 5 LEDs adressées par la fibre.
- le **enregistrement et le transfert des images** : 8 images moyennées sont acquises en 0,54 secondes, soit 2,7 secondes au total pour récupérer les images des 5 LEDs. Or, il a été expliqué plus tôt qu'un temps de pose de 45 ms était choisi pour que le transfert des images soit limité par le débit de la connexion IEEE 1394b. 8 images moyennées devraient alors donner un temps d'acquisition de 0,36 secondes. Cependant, le dialogue entre la caméra et Labview ralentit ce transfert à 0,54 s. Finalement, c'est donc Labview qui limite le temps d'acquisition des images tant que le temps d'exposition réglé sur la caméra ne dépasse pas 0,54/8 secondes, soit 67,5 ms.
- le **traitement des images par Labview** : les valeurs de réflectivité pour 5 longueurs d'onde et 36 ROI sont extraites en 0,28 secondes. Cette durée augmente avec le nombre de ROI défini.
- le **ajustement et la détermination de la position de la résonance** : le code d'ajustement mathématique, lorentzien ou polynomial, comme cela sera détaillé plus loin, est écrit sous Matlab. Cette fonction Matlab a été intégrée au sein du programme Labview puisqu'il est possible de faire communiquer ces deux logiciels en temps réel. Pour 36 ROI, on compte 2 secondes de calcul de la fonction et de détermination du minimum de la réflectivité de cette courbe pour chaque point acquis dans le temps. En moyenne, le traitement

Chapitre 2. Développement de l'instrument

d'une ROI prend entre 50 et 60 ms.

Au total, un cycle d'acquisition de données de cinétique dans le temps avec l'exemple de 36 ROI s'étend sur 12,6 secondes par interrogation spectrale, contre moins de 3 secondes par interrogation en réflectivité.

Le logiciel Labview est assez lent en comparaison à d'autres langages de pilotage tels que le C ou le Pascal qui sont plus adaptés pour optimiser l'acquisition et le traitement de données expérimentales. Cependant, le langage Labview est plus facile à prendre en main pour un non initié, et satisfaisant dans le cadre de la mise au point et de la validation d'un prototype.

En pratique, une résolution temporelle de 13 s en interrogation spectrale est tout de même suffisante pour suivre une interaction en temps réel. Cela est vérifié sur l'exemple du suivi d'une variation d'indice de 10^{-3} RIU, comparé à la même mesure acquise en ΔR en figure 2.37. Avec un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un volume de solution injectée de 200 μL , la durée d'une injection est de 4 minutes. La résolution de l'acquisition de cette injection en suivi cinétique est donc de 16 points pour une mesure de décalage spectral de la résonance, contre 80 points de mesure en variation de réflectivité. Dans ces conditions, la transition du changement d'indice est acquise en 3 points et la stabilisation du plateau est enregistrée en 7 points en mode $\Delta\lambda$.

Le profil du saut d'indice est aussi bien reconstruit qu'en mode ΔR dans l'ensemble, avec une moins bonne résolution au niveau des transitions d'indice de réfraction, mais ce qui importe est la détermination de l'amplitude de la variation.

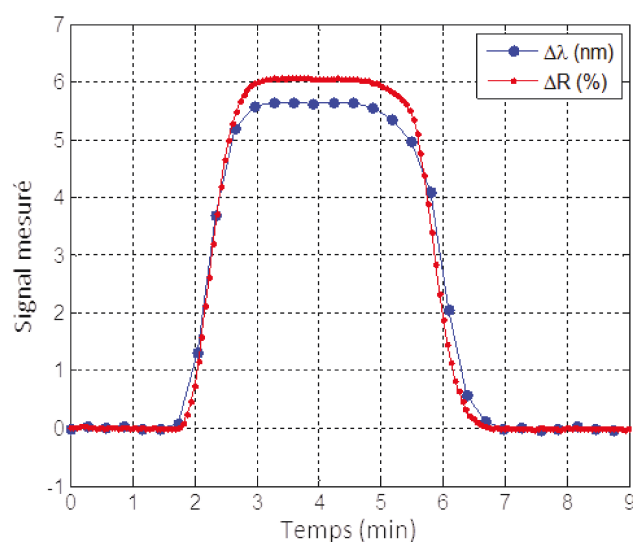


FIGURE 2.37 – Mesure en temps réel d'une variation d'indice de réfraction de 10^{-3} RIU en mode suivi spectral ($\Delta\lambda$) et suivi en réflectivité (ΔR).

Lors de l'étude d'une interaction moléculaire, la phase de transition recèle des informations importantes pour déterminer les constantes de cinétique. Mais la diffusion des molécules et leur

fixation sur les sondes est moins rapide qu'une variation d'indice. Plus de points seront donc acquis lors de l'étape d'interaction avant équilibre.

Homogénéité de la fluide Il a été expliqué en partie 2.2.3 la complexité de la cellule fluide. Notamment, la faible tolérance sur la position du hublot de verre dans son emplacement circulaire, et donc sur la précision de collage, a été soulignée. Vérifions ici le comportement de l'écoulement des fluides.

Dans cette perspective, un changement d'indice de 10^{-3} RIU créé par l'injection d'une solution de sucrose à la concentration de 6,9 mg/mL est mesuré par variation de réflectivité sur une lame recouverte d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur. Le mode de mesure de variation de réflectivité a été choisi de façon à réduire le temps entre chaque point de mesure à 3 secondes. Il est alors possible de suivre avec une résolution temporelle suffisante l'évolution de l'écoulement dans la cellule fluide. Un suivi spectral aurait seulement permis l'acquisition de 4 images durant la phase d'arrivée ou de départ de la solution de sucrose, à moins d'abaisser au préalable le débit de l'écoulement.

L'évolution temporelle de la réflectivité mesurée par le système SPRI suite à l'injection de la solution de sucrose au débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ est reportée en figure 2.38a. Ces courbes de cinétique sont mesurées en 10 zones réparties suivant la largeur de la cellule fluide, sur une distance de 5 mm, chaque zone s'étendant sur une dizaine de pixels de diamètre. La position de ces zones de mesure est représentée en figure 2.38c sur une image de variation de réflectivité de la cellule fluide. Cette image est acquise lorsque la solution de sucrose emplit 50% du volume total de la cellule. Elle est normalisée par l'image obtenue lorsque la variation de réflectivité est la plus importante. Ainsi, l'analyse s'affranchit de la différence de sensibilité à travers la lame due à l'existence de conditions de résonance différentes, comme expliqué lors de la comparaison entre interrogation en intensité et spectrale en partie 1.1.2 page 21.

Au niveau du front descendant du changement d'indice, correspondant au départ de la solution de sucrose de la cellule fluide, un décalage temporel de l'écoulement entre les différentes zones peut être observé sur l'agrandissement en graphe 2.38b : un niveau de réflectivité donné est atteint à des temps différents en fonction de la zone considérée. Plus précisément, la solution de sucrose est éjectée plus rapidement du côté de la zone 10 que de la zone 1. Le graphe 2.38d illustre de façon plus quantitative cette inhomogénéité temporelle de l'écoulement des fluides. Une valeur de réflectivité égale à la moitié de la réflectivité maximale mesurée lors du changement d'indice est atteinte 4 secondes plus tard en zone 1, côté gauche de l'image de la cellule, qu'en zone 10, côté droit. Une certaine stabilité de l'écoulement peut être relevée des zones 5 à 10, correspondant à la partie droite de la cellule.

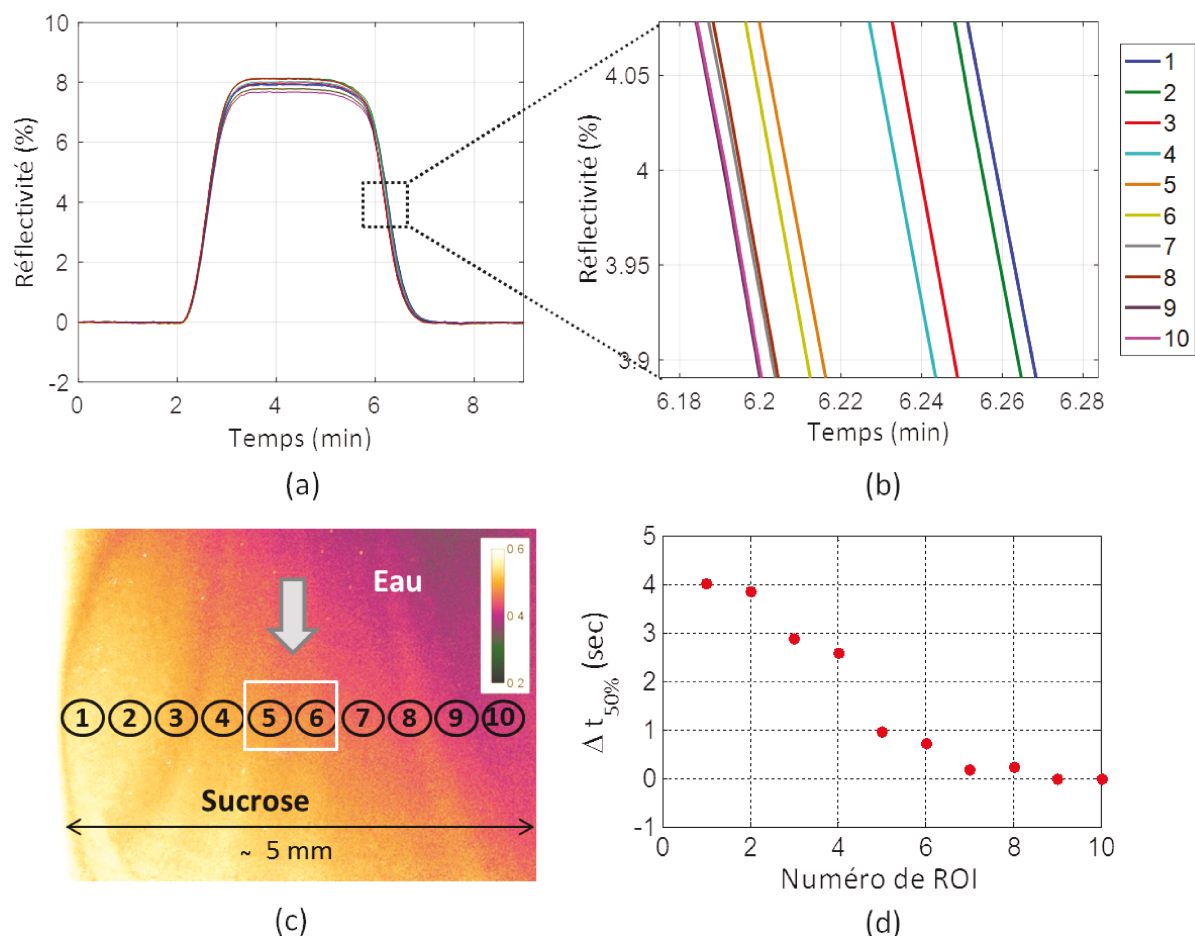


FIGURE 2.38 – Caractérisation de l'écoulement des solutions dans la cellule fluidique. (a) Évolution du front de la fluide au cours du temps sur l'exemple de l'injection d'une solution de sucrose au débit de $50 \mu\text{L}/\text{min}$ sur 10 ROI réparties sur une largeur de 5 mm. (b) Agrandissement des courbes de cinétiques autour d'une réflectivité de 4%. (c) Image de différence de réflectivité prise lorsque la cellule est remplie à 50% de son volume total en solution de sucrose, en phase de départ de la solution, normalisée par l'image pour laquelle la variation de réflectivité est maximale. (d) Retard du départ de la solution de sucrose mesuré en fonction des ROI considérées à une réflectivité égale à la moitié de la réflectivité maximale mesurée.

L'image de la cellule 2.38c montre également que la progression de la solution de sucrose n'est pas complètement uniforme suivant la largeur de la cellule (et donc de l'image) lors de la vidange de la cellule. Ce genre de défaut n'est pas observé sur les bancs SPRI du laboratoire. Il est donc possible que le hublot, suivant la façon dont il a été collé, perturbe l'écoulement à l'intérieur de la cellule.

Cette légère différence de vitesse d'écoulement lorsque la cuve se vide ne posera pas de problème lors d'une expérience de cinétique. En effet, les défauts d'homogénéité de la fluide peuvent être corrigés grâce à la normalisation du signal par la valeur maximale du changement

d'indice effectué au début de chaque expérience et mesuré sur chaque plot de sonde. De plus, la matrice de plots biologiques définie dans le cadre du projet s'étend seulement sur une zone carrée de côté de l'ordre de 1 mm, zone matérialisée sur l'image 2.38c par un rectangle blanc. L'écoulement sur cette zone utile sera donc beaucoup plus homogène que sur l'ensemble de la largeur de la cellule. Pour finir, un décalage temporel de 4 secondes ne sera même pas détecté lors d'une mesure en mode d'interrogation spectrale, le temps d'acquisition étant de 13 secondes environ.

L'écoulement de cette nouvelle cellule fluide avec un hublot de verre et un joint de forme hexagonale n'est pas tout à fait aussi uniforme qu'avec une cellule SPR classique. Mais ce défaut d'homogénéité de fluide reste moindre en comparaison à la dynamique d'acquisition et à la zone spatiale analysée au cours d'une expérience. De plus, ces différences de vitesse d'écoulement pourront être en grande partie compensées par une normalisation préalable des signaux lors des expériences de cinétique.

Linéarité de la réponse par interrogation spectrale Une première caractérisation de la réponse du système consiste à vérifier que le signal évolue de façon proportionnelle à l'indice du diélectrique. Le décalage spectral a été mesuré pour différentes concentrations de sucre en solution, donnant des variations d'indice par rapport à l'indice de l'eau comprises entre 10^{-5} RIU et $3 \cdot 10^{-3}$ RIU. Les résultats sont tracés sur le graphe 2.39, les mesures étant effectuées sur un substrat recouvert d'un film d'or continu de 50 nm d'épaisseur autour d'une longueur d'onde centrale de 750 nm. Une régression linéaire ajustée aux points de mesure démontre que la sensibilité du système à une variation d'indice vaut 6700 nm/RIU, valeur en accord avec la théorie (voir la thèse d'Emmanuel Maillart [Maillart 2004a]).

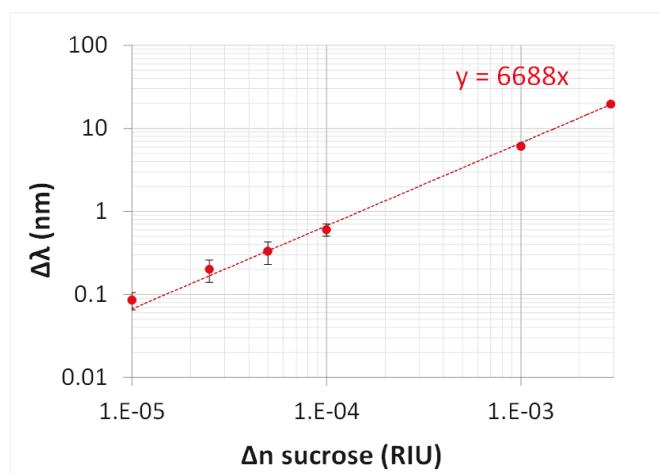


FIGURE 2.39 – Vérification de la linéarité du décalage spectral mesuré en fonction de la variation d'indice appliquée par l'injection d'une concentration croissante de solution de sucre. Mesure sur film d'or d'épaisseur 50 nm, à 750 nm.

Sachant que le bruit de photons impose une limite de détection de 25 pm environ, la résolution du système SPRI avec une sensibilité de 6700 nm/RIU est de l'ordre de 10^{-6} RIU sur film d'or continu d'épaisseur 50 nm, valeur comparable à la résolution des systèmes standards de SPRI.

Un système de SPRI par interrogation spectrale en configuration Kretschman a ainsi été développé et caractérisé. Les points techniques optiques garants de la qualité de l'imagerie ont été décrits. L'importance du choix du prisme et des conjugaisons optiques a été soulignée. Il a été confirmé que la détection est limitée par le bruit de photons, ce qui valide l'utilisation de la source à LEDs intégrant un balayage mécanique de la fibre. La cellule fluidique équipée d'un hublot de verre autorisant une excitation SERS par le dessus a été testée pour la première fois sur un instrument. La stabilité thermique et fluidique de cette cellule innovante a été vérifiée.

2.3 Module SERS

Après la description du système SPRI intégré dans le prototype et la caractérisation de ses performances, le module en charge de la mesure SERS pour l'identification des molécules capturées sur la biopuce lors de la mesure SPR est présenté dans cette section.

La mesure SERS est réalisée au-dessus du prisme, tandis que la mesure SPRI s'effectue en configuration Kretschmann. Le prototype est donc équipé d'une cellule fluïdique originale, présentée dans la partie précédente, qui est percée d'une ouverture close par une fenêtre en verre d'épaisseur 0,5 mm. L'objectif de microscope peut donc focaliser une source laser à travers le hublot pour exciter les molécules capturées lors de l'interaction, et collecter leur émission SERS afin de déterminer leur nature par l'analyse du spectre acquis. A notre connaissance, il s'agit du premier système autorisant une mesure SERS en milieu liquide couplée à une cellule fluïdique de ce type.

La mise en forme du laser, la collecte du signal et son analyse sont permises par l'utilisation d'une partie d'un instrument commercial Horiba appelé Xplora One, dont une photo est visible en figure 2.5 page 63. Le plateau supérieur de l'appareil a été conservé sans modification majeure. Il contient trois diodes laser, le montage optique de transport et de réglage de l'intensité laser et le spectromètre. Un bâti a été conçu pour assembler ce plateau au système de SPRI.

Pour s'affranchir de la fluorescence du substrat, du hublot et de l'eau remplissant la cuve, un système de **microscopie confocale** équipe de façon standard les instruments Raman. Ce type de montage est basé sur la conjugaison entre le plan focal de l'objectif, où se situe l'échantillon analysé, et un diaphragme placé au foyer d'une lentille. Par conséquent, seul le plan conjugué au trou confocal sera imagé, ce qui est schématisé en figure 2.40. La lumière provenant des plans hors du plan focal est éliminée grâce à ce filtrage spatial. Le trou confocal réalise ainsi une coupe optique de l'échantillon, ce qui permet d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.

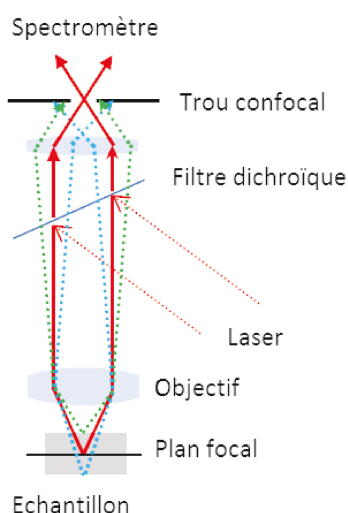


FIGURE 2.40 – Schéma de principe du fonctionnement d'un système Raman confocal.

Un champ incident focalisé va de pair avec un système de balayage, puisque la mesure

Chapitre 2. Développement de l'instrument

sera effectuée point par point. Le développement majeur de l'instrument Raman a ainsi porté sur la mise au point du système de balayage laser autorisant un champ de mesure de l'ordre de 1 mm, dont les caractéristiques sont rapportées dans cette partie. Les principaux éléments instrumentaux sur lesquels repose la mesure Raman sont également décrits.

2.3.1 Développement du module de balayage angulaire du laser

Le champ d'une mesure Raman est limité par la taille du spot laser. La tache laser mesurée à 638 nm est de l'ordre de 5 micromètres dans le plan de l'échantillon, valeur obtenue avec le filtre atténuant au maximum la puissance laser (à 0,1% de sa valeur maximale) et une densité optique supplémentaire pour ne pas saturer la caméra. La limite de diffraction prédit un diamètre de tache de $2,44\lambda/\text{ON}$, soit à 700 nm une tache de diamètre 2,4 μm , valeur proche de celle mesurée. Pour mesurer un signal sur la totalité du substrat, il est donc souvent nécessaire d'implémenter une cartographie. Manuellement, il est possible de se déplacer dans le plan de l'échantillon suivant les axes X et Y grâce à deux platines de translation. Des butées ont été installées suivant ces deux axes pour éviter que l'objectif ne rentre en contact avec les bords de la pièce mécanique épousant ses formes. Le réglage de ces butées autorise un déplacement manuel du laser par rapport au centre de l'image de $\pm 1,4$ mm suivant Y et $\pm 1,8$ mm suivant X.

Pour automatiser la mesure par cartographie, un système de balayage laser a été conçu. Une motorisation des platines de translation aurait été une autre solution, mais des platines de ce type, par mouvement piézo-électrique par exemple, coûtent très cher et se déplacent lentement. Plutôt que de mettre en mouvement l'objectif ou l'échantillon, il a été décidé de mettre au point un module qui change l'angle d'incidence du faisceau laser, et donc la position du spot sur le substrat.

La première idée venant à l'esprit consiste à associer deux miroirs galvanométriques, l'un contrôlant le déplacement en X, l'autre en Y.

Dans le cas d'une combinaison de deux miroirs placés à 45° du faisceau, parallèles entre eux, lorsque l'angle d'incidence augmente, le faisceau laser s'éloigne du centre de la pupille d'entrée de l'objectif jusqu'à être vignetté. Une partie du flux incident est alors perdue, et l'excitation des molécules sera donc moins efficace (voir les schémas (a) et (b) de la figure 2.41). De plus, un système à base de deux miroirs nécessite une synchronisation des miroirs entre eux, ce qui rend le balayage plus complexe à piloter. Enfin, le champ balayé ne sera pas de même dimension suivant les deux axes X et Y : l'angle maximal d'incidence atteint dans le plan de propagation du laser (plan de la feuille sur le schéma 2.42) est bien égal à deux fois l'angle maximal de rotation du miroir, alors que dans le plan orthogonal, l'angle sera réduit par un facteur en cosinus de l'angle entre la normale au miroir et le laser incident, soit $\cos(45^\circ)$, égal à $1/\sqrt{2}$, dans le cas présent.

La solution retenue consiste à utiliser un seul miroir contrôlable en rotation suivant deux axes, appelé voice coil en référence à la technologie le commandant, basée sur le fonctionnement d'une bobine acoustique, ou encore fast steering mirror. Ce miroir est conjugué à la pupille de l'objectif par un système afocal de façon à maintenir le laser au centre de l'objectif pour tout angle d'incidence. Cela est possible car le pivot du miroir est positionné à sa surface et est confondu pour les deux axes. Ce système est dessiné en figure 2.41c et 2.41d.

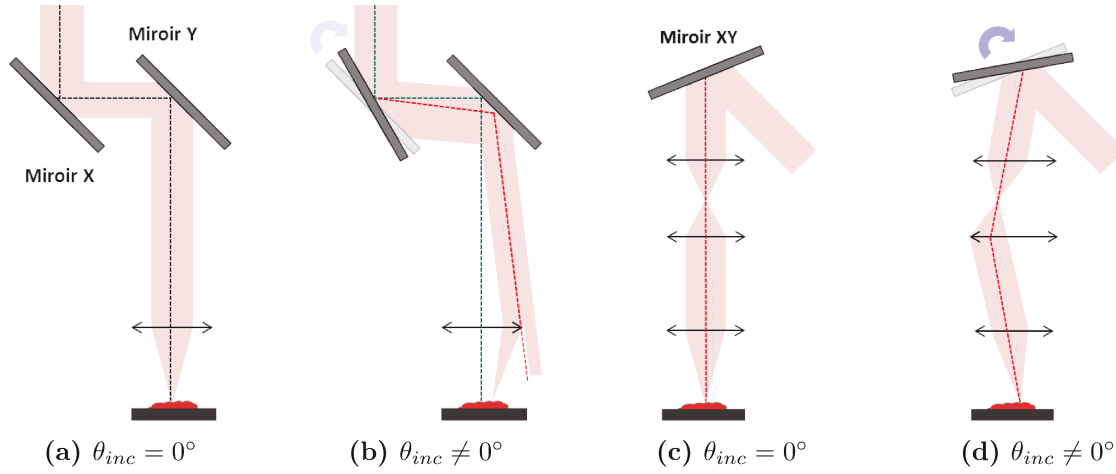


FIGURE 2.41 – Représentation de deux systèmes de balayage laser envisagés : le premier fait intervenir deux miroirs galvanométriques, l'un balayant en X et l'autre en Y, le second utilise un miroir voice coil conjugué à la pupille de l'objectif. Les schémas (a) et (c) montrent une incidence normale, à l'inverse des schémas (b) et (d).

Le module de balayage laser est positionné en-dessous du plateau de mise en forme du laser et de collection du signal détaillé. L'architecture réalisée est représentée en vision CAO et sous forme de schéma optique en figure 2.42. Elle comporte les éléments suivants :

Plateau source et collection :

- **Trois lasers**, à 638 nm, 691 nm et 785 nm, permettent d'adapter la source d'excitation à la molécule en présence et aux nanostructures du substrat. Les puissances de sortie de ces lasers sont respectivement égales à 35 mW, 30 mW, et 100 mW.

Une excitation dans le proche infrarouge permet d'éviter la fluorescence des molécules biologiques. Généralement, les bandes d'absorption de fluorescence des espèces biologiques sont comprises entre l'UV et le vert, en-deçà de 600 nm environ. Si l'énergie reçue est plus faible que ce seuil d'excitation de la fluorescence, c'est-à-dire que la longueur d'onde est supérieure à 600 nm, seuls les modes de vibration des molécules seront excités. Ce constat n'est pas toujours vrai comme cela sera montré sur l'expérience de validation présentée en chapitre 3. La cyanine 5, marqueur fluorescent, constitue un contre-exemple puisqu'elle absorbe à 655 nm.

Toutefois, augmenter la longueur d'onde présente l'inconvénient de diminuer la section efficace de diffusion, c'est-à-dire la probabilité de diffusion Raman des photons incidents par les modes de vibrations de la molécule, exprimée en unité de surface, qui est proportionnelle à $1/\lambda^4$ [Bischel 2008]. L'intensité du signal Raman décroît donc rapidement lorsque la longueur d'onde augmente.

Les sources choisies sont des diodes laser. Elles sont relativement stables et monomodes, propriétés essentielles pour résoudre les pics du spectre Raman. La longueur d'onde de 638 nm est la plus couramment utilisée en Raman. La diode à 785 nm peut se révéler utile si la fluorescence des molécules apparaît à plus basse énergie que dans le cas général. La

Chapitre 2. Développement de l'instrument

longueur d'onde médiane de 691 nm a été sélectionnée pour plus de flexibilité.

- Des miroirs de renvoi sont placés à 45° de chaque source laser. Les lasers sont positionnés du haut vers le bas par longueur d'onde décroissante du fait de la présence de miroirs dichroïques devant les lasers 691 nm et 638 nm. Ces deux miroirs réfléchissent le laser auquel ils sont associés et transmettent les longueurs d'onde supérieures à celle du laser. De cette façon, les trois lasers peuvent pendre le même chemin optique (lorsque le laser 785 nm est sélectionné, il traverse les deux miroirs dichroïques). Cette astuce permet de rendre le montage optique plus simple et moins encombrant.
- Des **densités** de valeurs différentes règlent le niveau de puissance du laser à 0,1%, 1%, 10%, 25%, 50% et 100% de sa puissance totale.
- Une **caméra** de visualisation du spot laser aide au réglage de la focalisation de l'objectif (non dessinée sur le schéma).
- Des **miroirs de repli diélectriques** acheminent le faisceau émis par l'échantillon afin de collecter le maximum de flux sur l'analyseur de spectre (la réflectivité d'un miroir diélectrique atteint 99,5% contre 90% pour un miroir en aluminium ou 97% en argent).
- Un **filtre edge** sert à envoyer le laser incident vers l'échantillon et à transmettre le signal Raman vers le spectromètre. Trois filtres sont présents. Leur choix est adapté au laser sélectionné. Le filtre réfléchit le laser incident pour le transporter vers l'échantillon, et transmet les longueurs d'onde supérieures provenant de l'émission Raman de l'échantillon vers le spectromètre.
- le **spectromètre** est composé d'un réseau qui sépare les longueurs d'onde du spectre collecté et d'un capteur CCD refroidi développé en interne chez Horiba (modèle Syncerity). Trois réseaux sont présents, dont le nombre de traits par millimètre est égal à 600, 1200 ou 1800. Plus la densité de traits est importante, meilleure est la résolution spectrale. Toutefois, l'intensité des bandes spectrales est amoindrie puisque l'intensité totale est répartie sur un plus grand nombre de points.

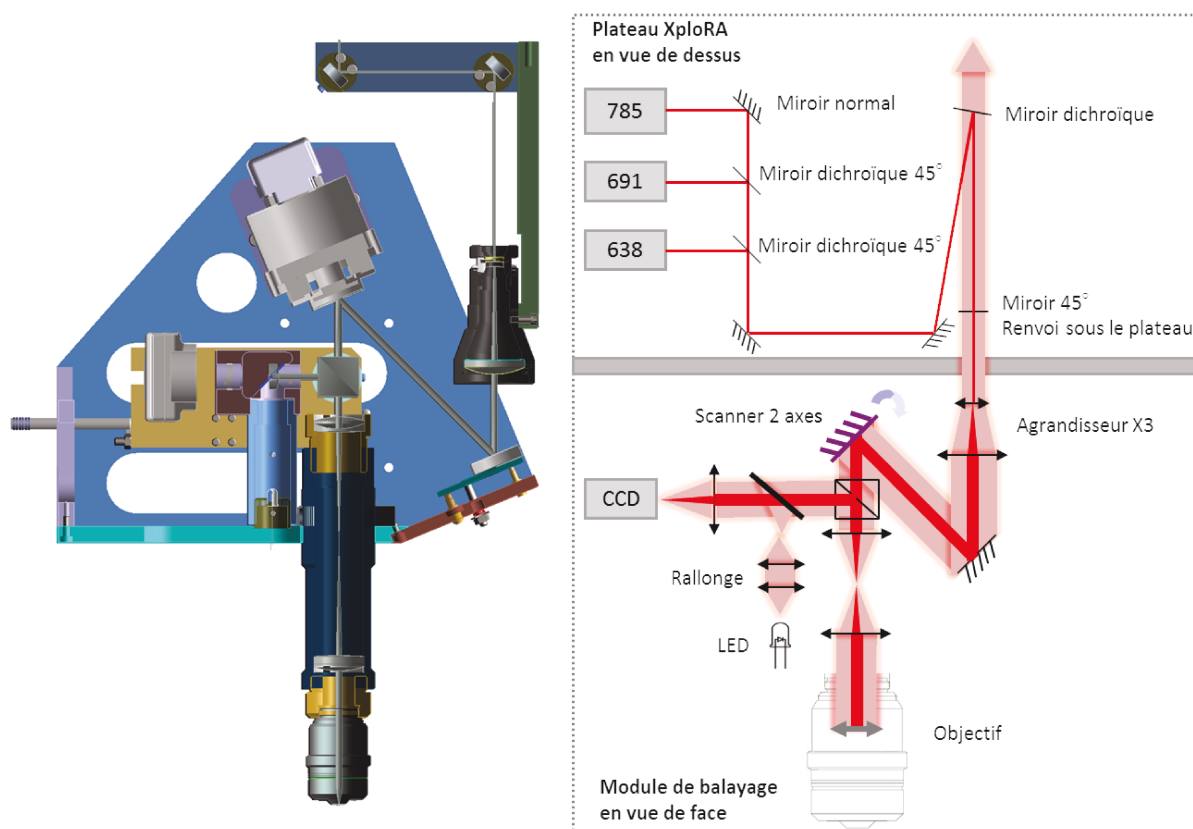


FIGURE 2.42 – Présentation du module de balayage en vue CAO et schéma optique du module et des principaux éléments optiques du plateau de mise en forme laser et collection du signal.

Module de balayage :

- un **agrandisseur x3** permet de ne pas perdre une partie du signal réfléchi par l'échantillon. En effet, les optiques du trajet de collection sont de dimension 10 par 10 mm alors que l'objectif récolte un signal Raman réparti sur la totalité de sa pupille, de dimension $2f_{obj}ON$, soit 12,6 mm. L'agrandisseur réduit le diamètre du faisceau signal à 4,2 mm, qui ne sera donc pas vignetté sur son trajet vers le spectromètre. Il est également profitable d'illuminer la plus grande partie de la pupille de l'objectif en augmentant la taille du faisceau laser grâce à cet agrandisseur de sorte que la résolution spatiale soit la plus proche de la limite de diffraction.
- un **miroir de repli** réduit l'encombrement du système,
- le **miroir voice coil** (scanner deux axes sur le schéma) orientable suivant deux axes de rotation de diamètre 1 pouce, dont la plage angulaire est de $\pm 1,5^\circ$, contrôle l'incidence du laser. L'angle de rotation du miroir est proportionnel à la tension appliquée aux actuateurs aimantés qui contrôlent sa position. La tension d'alimentation du miroir est comprise entre $\pm 10V$. Pour générer ces tensions et gérer le pilotage depuis le logiciel de l'instrument Raman, il a été choisi de développer une électronique simple à base d'Arduino (Nucleo STM32). Deux sorties de puissance à modulation de largeur d'impulsion de la carte sont

utilisées, une pour chaque axe de rotation du miroir. La plage de tension accessible en sortie de carte est ensuite mise en forme par un filtre passe-bas et par la combinaison de deux amplificateurs opérationnels. Le programme de commande de cette carte est généré à partir de la plateforme ARMmbed, accessible librement sur internet.

- le **système afocal** contenant 2 doublets achromatiques de focale 60 mm conjugue le miroir à la pupille de l'objectif. Une focale plus petite n'était pas envisageable à cause de la taille de l'objectif, égale à 47 mm, et sachant que la position exacte de la pupille d'entrée n'est pas connue.
- un **objectif** de microscope est positionné au-dessus du hublot de la cellule fluide. L'ouverture numérique de l'objectif Olympus UCPLFLN 20x choisi pour le projet vaut 0,7. Sa focale étant égale à 9 mm, le diamètre de la pupille de l'objectif vaut 12,6 mm. Cet objectif a été retenu pour sa distance de travail comprise entre 0,8 et 1,8 mm, compatible avec la présence du hublot de verre, d'épaisseur 0,5 mm. Cet objectif est corrigé pour des lamelles couvre-objet d'épaisseur variant entre 0 et 1,6 mm grâce à une bague de réglage.
- un **système de visualisation** permet de régler la position du laser sur l'échantillon. Il peut être retiré lors de la mesure afin de maximiser le flux incident grâce à un montage sur un rail coulissant. Il comprend un cube séparateur 50/50, et une lentille de focale 30 mm qui permet d'imager le substrat analysé sur une caméra CCD. Une focale de 30 mm a été choisie de façon à obtenir un champ balayé imagé sur la caméra inférieur aux dimensions du capteur, égales à 6,55 par 4,9 mm (1/2 pouce en diagonale, modèle UI-1460LE). Le grandissement obtenu sur la caméra est donc de 3,33, rapport entre la focale de la lentille et celle de l'objectif. Le champ SERS de 1 mm par 1 mm est donc imagé sur 3,33 par 3,33 mm, champ image inférieur aux dimensions du capteur. Un cube séparateur a été préféré à une lame séparatrice pour éviter les réflexions parasites présentes dans le cas de la lame.
- un **système d'illumination** éclaire le substrat, composé d'une LED blanche au foyer du doublet de l'afocal conjuguant le miroir voice coil à l'objectif, déporté perpendiculairement à l'axe de la caméra par une lame séparatrice et une rallonge optique utilisée pour une question d'encombrement.

L'encombrement du système de balayage vaut 35 cm, distance entre le plateau contenant les lasers et le substrat. La hauteur du système complet, SPRI et SERS assemblés, est de l'ordre de 1 mètre.

L'introduction du cube séparateur a pour effet de dérégler la conjugaison entre le miroir et la pupille de l'objectif. Cela signifie que le point d'impact du laser pour un angle d'incidence donné ne sera plus exactement centré sur la pupille de l'objectif. Plus précisément, le décalage du laser par rapport au centre de la pupille lorsque le cube se trouve sur son trajet optique est égal à $[(n-1)/n]e_{cube}\theta_{inc}$ dans l'approximation paraxiale (valable pour des angles d'incidence de 3°), e_{cube} étant l'épaisseur du cube, n son indice et θ_{inc} l'angle d'incidence. Pour un prisme d'épaisseur 20 mm et d'indice 1,5, et un angle d'incidence maximal de 3° , le décalage maximal du faisceau dans le plan de la pupille dû à l'introduction du cube sera alors égal à 0,35 mm. Il n'y a donc pas de problème de vignettage, puisque le diamètre de la pupille est de 12,6 mm et celui du laser de 9 mm. De plus, il a été vérifié par calcul Zemax que les aberrations ajoutées par le cube sont négligeables. La position du point focal laser sur l'échantillon sera de toute façon inchangée puisque le faisceau est collimaté et que l'angle d'incidence reste le même.

La plage angulaire de rotation du miroir étant égale à $\pm 1,5^\circ$, la plage d'angle d'incidence du laser sur l'échantillon est de $\pm 3^\circ$. De fait, le décalage maximal du spot laser par rapport à la normale de la pupille de l'objectif dans le plan de l'échantillon vaut $f'_{obj}\tan(3^\circ)$, soit 0,47 mm. Le champ total de balayage dans le plan de propagation du faisceau vaut donc 0,94 mm. Par contre, dans le plan perpendiculaire à la propagation, le champ sera réduit par l'ajout d'un facteur multiplicatif en $\cos(22,5^\circ)$, angle entre la normale au miroir et le faisceau incident, soit 0,87 mm.

Ainsi, le champ balayé dans la direction perpendiculaire au plan de propagation du laser sera donc de 870 μm , contre 940 μm dans l'autre direction.

Le format des biopuces du projet Piranex a été choisi de façon à ce que la majeure partie des plots biologiques soit couverte par ce champ de balayage. Les substrats Piranex, schématisés en figure 2.43, sont constitués de 5 par 5 zones nanostructurées de côté 150 μm et espacées de 150 μm . Les nanostructures sont nécessaires pour amplifier le signal Raman. A ce jour, ce sont des nanodisques d'or sur un film d'or, de diamètre 200 nm et de période 400 nm. Les plots biologiques sont déposés sur ces zones. Au total, la matrice de plots occupe une surface de 1350 par 1350 μm . Le balayage laser permettra donc d'atteindre 3 par 3 plots biologiques. Les autres plots seront mesurés grâce à la translation de l'objectif, qui peut être déplacé sur 2,8 mm en X et 3,6 mm en Y.

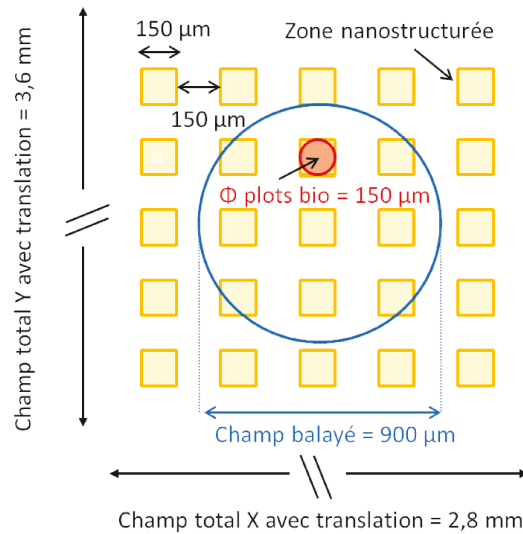


FIGURE 2.43 – Représentation d'une biopuce typique du projet Piranex composée de 5 par 5 zones nanostructurées sur lesquelles les plots biologiques sont déposés, de taille 150 μm . Le champ de balayage laser est représenté ainsi que les dimensions maximales de champ de mesure atteintes avec translation du module de balayage complet.

Le système Raman est piloté indépendamment du système de SPRI à partir d'un logiciel développé en interne par Horiba (LabSpec6). Le programme de contrôle du miroir de balayage

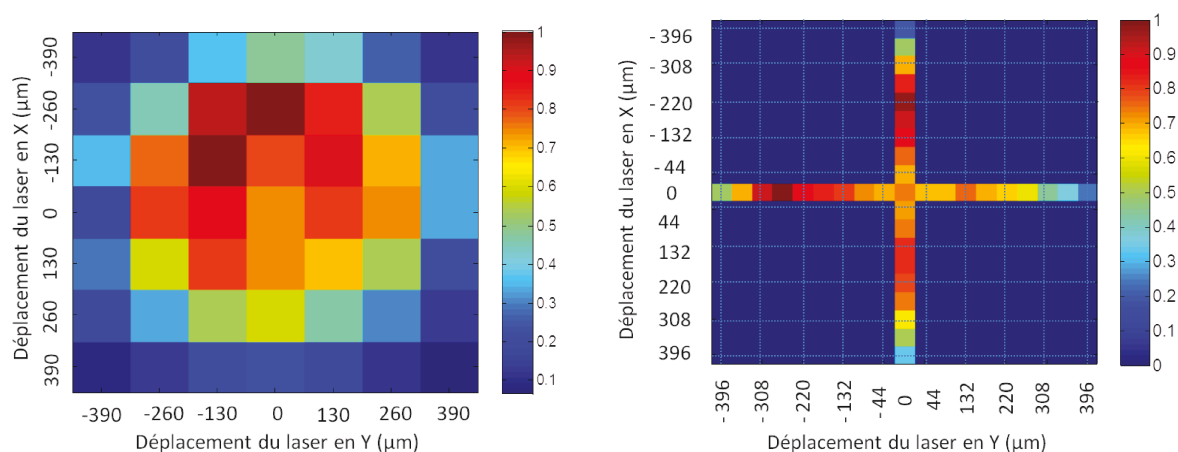
Chapitre 2. Développement de l'instrument

a été intégré à ce logiciel grâce à un script codé en langage VBScript (Microsoft Visual Basic Scripting Edition). L'utilisateur peut ainsi entrer les coordonnées du point à analyser, et le laser se déplace à cet endroit lorsque le script est lancé. Il est aussi possible d'implémenter une cartographie en utilisant ce même langage, ce qui devrait être développé à moyen terme.

2.3.2 Performances instrumentales

Pour valider le système Raman, plusieurs points sont à vérifier : d'une part, que la présence du hublot de verre ne dégrade pas significativement le signal et d'autre part que le balayage du laser dans la pupille permet une mesure homogène sur l'ensemble du champ théorique calculé, de diamètre 1 mm environ. En outre, une discussion sur le réglage de la mise au point est menée, puisque celui-ci est réalisé manuellement. Pour finir, les performances du prototype en terme d'analyse Raman sont comparées à celles de l'instrument commercial Horiba sur la mesure du spectre de la molécule de la cyanine, choisie comme molécule modèle pour la validation de l'instrument dans son ensemble, ce qui est expliqué dans le dernier chapitre.

Champ SERS et adaptation de la focalisation Pour vérifier la dimension du champ utile en Raman accessible par balayage laser, l'intensité du pic principal d'un substrat de silicium a été mesurée en déplaçant le laser sur l'ensemble du champ pouvant être balayé par le miroir, par pas de 130 μm (associé à une tension de 3 Volts appliquée au miroir). Le champ utile pour une mesure Raman correspond alors au champ balayé sur lequel l'intensité du pic à 521 cm^{-1} du silicium ne passe pas en-dessous de 50% de son maximum. Les mesures sont présentées en figure 2.44. Le détail de l'évolution de l'amplitude du pic sur le graphe 2.44b acquise suivant une croix orthogonale par pas de 40 μm (1 Volt) indique qu'une perte d'intensité de 50% est atteinte lorsque le laser se décale de plus de 350 μm environ de sa position centrale.



(a) Ensemble du champ balayé par pas de 130 μm (b) Mesure plus résolue suivant deux axes, par pas de 40 μm

FIGURE 2.44 – Mesure de l'intensité du pic du silicium à 785 nm en différents points du champ, normalisée par le maximum d'intensité mesurée.

Le champ utile de balayage pour les mesures Raman a une dimension de 700 μm en X et en Y. Au-delà de ce champ, une perte d'intensité de plus de 50% est observée.

Ces mesures ont été réalisées avec une focalisation de l'objectif de microscope fixe. L'appareil n'est pas équipé d'un système d'autofocus, la focalisation se règle donc à la main. Cette option existe sur certains instrument Horiba, mais il a été choisi de ne pas intégrer cette fonction dans un premier temps afin de ne pas compliquer le système, et de se concentrer sur le développement du module de balayage, qui lui est complètement nouveau. Toutefois, il sera possible d'ajouter cette option plus tard.

Une application du théorème de Pythagore indique que la défocalisation du waist du laser vaut 0,11 mm lorsque l'angle d'incidence du laser est égal à 3° dans le cas d'une lentille mince, cas très simplifié par rapport à un objectif composé de plusieurs optiques, qui permet d'illustrer le problème.

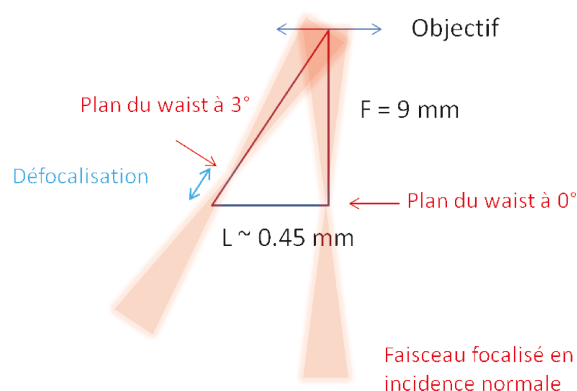


FIGURE 2.45 – Schématisation de la défocalisation du faisceau laser lorsque l'angle d'incidence vaut 3° par rapport à l'incidence normale.

Si l'on focalise le laser à sa position centrale, l'intensité sera très peu homogène sur l'ensemble du champ. Pour répartir l'intensité sur une zone plus grande, il est judicieux de défocaliser légèrement le laser. Deux exemples de défocalisation sont testés en figure 2.46 : $+2 \mu\text{m}$ et $+4 \mu\text{m}$ par rapport à une focalisation en incidence normale pour différentes incidences du laser sur le substrat de silicium. L'intensité est mieux équilibrée dans le champ avec une défocalisation par rapport à l'incidence normale de $4 \mu\text{m}$ qu'avec une défocalisation de $2 \mu\text{m}$. Par exemple, les pics à $\pm 260 \mu\text{m}$ en Y ont une intensité de 16 000 UA avec $+2 \mu\text{m}$ alors qu'ils atteignent 20 000 ou plus avec $+4 \mu\text{m}$. L'intensité des 5 pics mesurés est également moins étalée avec ce réglage.

Dans le cas d'un réglage manuel, le plan de meilleure focalisation associé au champ utile est ainsi légèrement différent du plan focal pour une incidence normale. Une défocalisation de $+4 \mu\text{m}$ est plus adaptée pour répartir l'intensité dans le champ. D'ailleurs, les mesures de la figure 2.44 ont été effectuées avec ce réglage à $+4 \mu\text{m}$ de la focalisation en incidence normale.

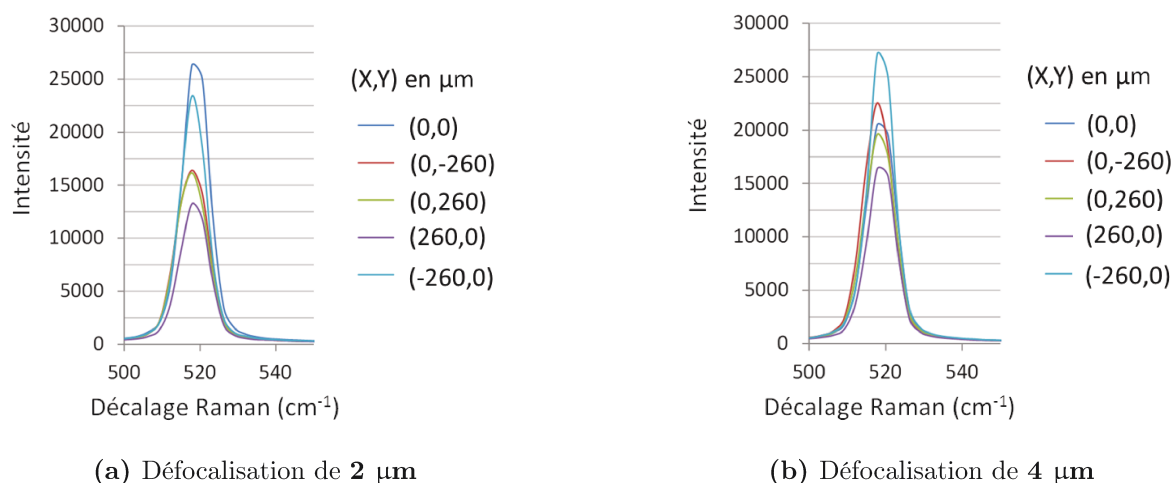


FIGURE 2.46 – Effet du choix de la focalisation sur la répartition de l'intensité dans le champ de balayage Raman : mesure de l'intensité de la bande caractéristique d'un film de silicium pour différentes positions du laser sur le substrat. Exemple d'une défocalisation de 2 μm et 4 μm par rapport au plan de mise au point de référence pris lorsque l'incidence du laser est normale.

Linéarité du balayage Vérifions la proportionnalité entre tension appliquée au miroir et déplacement du spot laser. Pour cela, une tension variant entre -7V et +9V est appliquée au miroir par pas de 1V et la position du laser est relevée sur l'image. Le déplacement du laser suivant l'axe Y est tracé en fonction de la tension appliquée en figure 2.47.

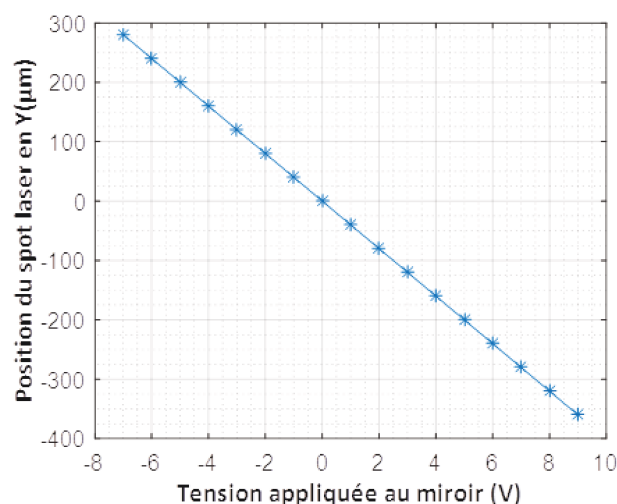


FIGURE 2.47 – Position du spot laser en Y pour différentes tensions appliquées au miroir.

La linéarité du déplacement du laser en fonction de la rotation du miroir est vérifiée. Le laser se déplace de 40 μm par Volt.

Un léger décalage du spot laser suivant la direction X peut être noté sur la caméra, de l'ordre de 9 μm entre les positions extrêmes obtenues à +9V et à -7V. Cela provient probablement d'un

tilt parasite du cube séparateur, qui est inséré sur le trajet laser pour cette mesure afin de pouvoir visualiser le déplacement du spot laser.

Tolérance sur la mise au point Pour une mesure ponctuelle, qui ne nécessite pas de balayage, intéressons-nous à la précision de réglage de la mise au point nécessaire pour ne pas perdre plus de 50% de l'intensité disponible à la meilleure focalisation. L'évolution de l'intensité du pic à 2932 cm^{-1} de la BSA déposée en goutte à 2,5% dans de l'eau sur un substrat a été relevée pour différents réglages de la focalisation et tracée en figure 2.48.

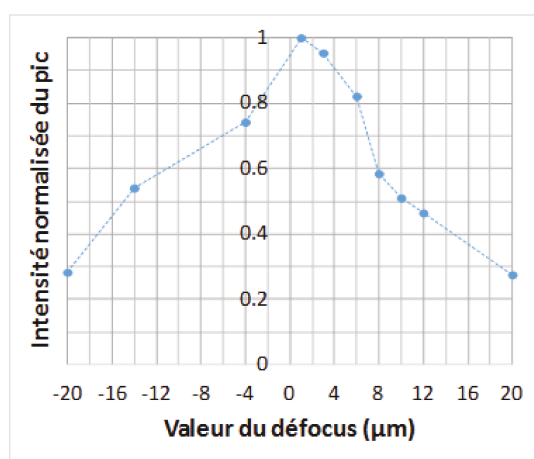


FIGURE 2.48 – Effet du réglage de la focalisation de l'objectif sur l'intensité du pic à 2932 cm^{-1} de la BSA en solution à 2,5% dans l'eau.

L'évolution de l'intensité du pic de la BSA n'est pas symétrique autour du meilleur plan de focalisation. Cela n'est pas étonnant puisque les valeurs positives de défocus donnent un plan de focalisation à l'intérieur du substrat de verre, alors que les valeurs négatives correspondent à une focalisation dans l'eau, au-dessus du substrat. Une perte de signal de 50% est observée pour un defocus d'environ $\pm 10\text{ }\mu\text{m}$.

En pratique, la mise au point est réglée en deux temps. D'abord, la tache doit être la plus concentrée possible sur l'image visualisée sur la caméra. Ensuite, si des bandes de l'espèce biologique étudiée sont visibles lors de l'acquisition du spectre en temps réel, avec un temps de mesure très court, de l'ordre de la seconde, alors la mise au point est ajustée de façon à maximiser l'intensité des pics du spectre. Il a été vérifié que la précision du pointé manuel de la mise au point est de l'ordre de $\pm 3\text{ }\mu\text{m}$.

A noter que le plan de meilleure focalisation est assez subjectif au regard de la variabilité du signal SERS spatialement et temporellement lors d'une mesure sur des molécules biologiques.

Aberrations optiques La présence d'aberrations optiques engendrées par les différents éléments traversés par le laser (doublets achromatiques, agrandisseur, hublot) élargit le diamètre de la tache laser dans le plan focal de l'objectif, d'autant plus que l'angle d'incidence est élevé.

Les images de taches laser de la figure 2.49 sont acquises pour différentes incidences du laser 638 nm sur la pupille de l'objectif grâce au système de balayage. Les 4 images en coin

Chapitre 2. Développement de l'instrument

sont obtenues pour l'angle d'incidence maximal de 3° suivant les axes X et Y, l'image centrale correspond à une position du laser centrée sur la pupille, et les images intermédiaires sont acquises avec un angle de 0° sur un axe, et $\pm 3^\circ$ sur l'autre axe. Les taches expérimentales sont comparées aux simulations obtenues par calcul optique sous le logiciel Zemax, qui ne tient pas compte des aberrations de l'objectif, non communiquées par le fabricant. Les images des taches laser sont saturées, elles sont présentées à titre illustratif pour comparaison avec les simulations.

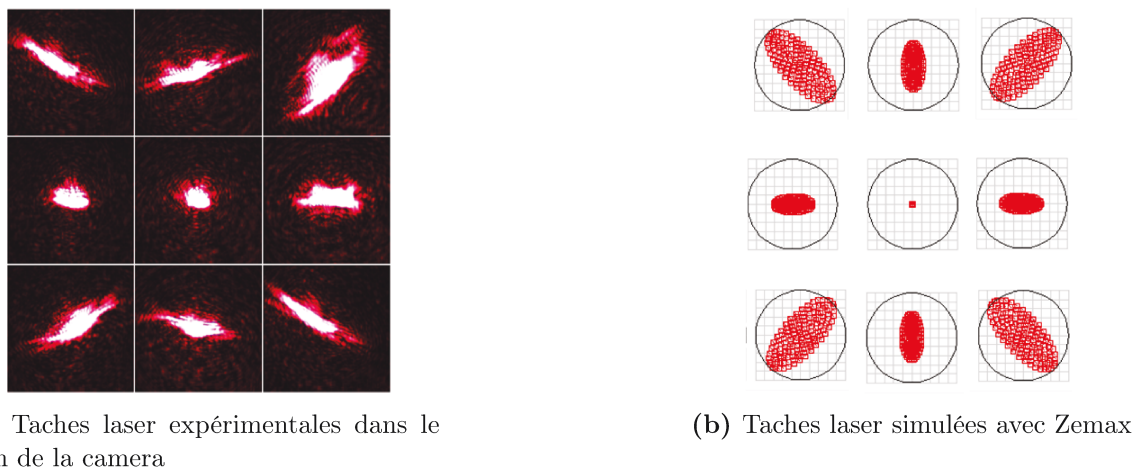


FIGURE 2.49 – Allure de la tache focale du laser 638 nm, avec un filtre de 1% pour différentes incidences sur un substrat de silicium en air, mesurées sur la caméra du plateau Raman et comparées à des simulations optiques.

L'aberration sphérique intrinsèque à la lentille de focalisation sur la caméra est dominante sur l'axe, cette aberration étant corrigée pour les doublets achromatiques. L'allongement de la tache pour une incidence du laser hors axe dénote la présence d'astigmatisme. En effet, les doublets, la lentille et l'agrandisseur ne sont pas corrigés de l'astigmatisme. L'inclinaison à 45° de la tache hors axe avec un angle suivant X et Y est typique de ce défaut optique (les 4 positions à 45° sont en réalité en dehors du champ de balayage de 1 mm puisque celui-ci est circulaire).

L'allongement des taches hors axe induit une perte de flux qui explique la perte d'intensité lorsque le laser se déplace de plus de $300\ \mu\text{m}$ du centre de la pupille de l'objectif.

Ces images de taches laser permettent aussi de vérifier le centrage du laser sur le système afocal et l'objectif. D'ailleurs, une différence de taille de tache peut être notée entre les images intermédiaires gauche et droite, révélant un léger décalage du laser par rapport au centre de la pupille suivant cet axe.

Validation du système Raman Pour conclure sur les performances de l'instrument en terme de mesure SERS, les spectres de deux séquences d'ADN fonctionnalisées avec des marqueurs fluorescents, la cyanine de type 3 (Cy3) et la cyanine de type 5 (Cy5), sont acquis sur un substrat d'or rugueux et comparés avec les résultats obtenus sur le même échantillon à partir de l'instrument commercial d'Horiba, l'Xplora Plus.

Cette famille de marqueurs est particulièrement appréciée pour sa flexibilité : lors de sa synthèse, la longueur de la chaîne carbonée reliant deux groupes aromatiques peut être variée

pour accorder la longueur d'onde d'absorption de la molécule. Par exemple, la cyanine 3 est composée d'une chaîne centrale de 3 carbones tandis que la cyanine 5 comprend 5 carbones centraux. Ces deux variantes de la cyanine sont représentées par leur formule plane et leurs spectres d'absorption et d'émission en figure 2.50.

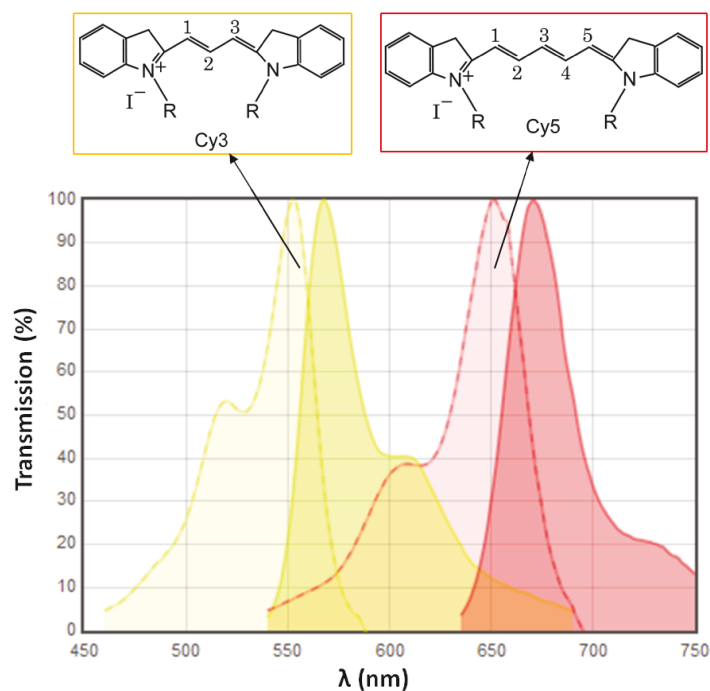


FIGURE 2.50 – Formules planes de la cyanine de type 3 et 5 (Wikipedia) et spectres d'excitation (remplissage clair) et d'émission de fluorescence (remplissage foncé) de chaque espèce (extraits du site Spectra Viewer de l'entreprise Chroma).

Cette mesure est aussi l'occasion de prouver la faisabilité d'une mesure SERS à travers le hublot de verre monté sur la cellule fluïdique. Une des principales inquiétudes sur les performances de l'instrument en terme de mesure Raman concerne l'introduction de la fenêtre de verre sur le trajet du laser au niveau de la cellule fluïdique. En effet, le verre possède son propre spectre Raman et peut aussi générer de la fluorescence. Lorsque le signal Raman d'une cible biologique que l'on cherche à détecter est faible, des matériaux plus inertes que le verre tel que le quartz sont employés comme substrat. Toutefois, la mesure SERS est réalisée par focalisation du laser sur l'échantillon, se trouvant à 90 μm sous le hublot. L'impact du verre composant le hublot sera donc réduit. Le quartz étant difficile à polir, le hublot a été fabriqué en borosilicate étiré (BK7).

Un film de 6 nm d'or est évaporé sur une lamelle de BK7 puis un laser pulsé permet d'obtenir une rugosité de surface capable d'exalter l'émission Raman.

Une goutte de chaque solution de cibles préparée dans de l'eau, à une concentration suffisante pour saturer la surface, est déposée sur ce substrat puis séchée à l'air libre. Aucune chimie de surface n'est employée, les brins d'ADN sont directement en contact avec l'or, dans une

Chapitre 2. Développement de l'instrument

configuration assez aléatoire, probablement étalés sur toute leur longueur sur le substrat. De fait, les marqueurs sont eux-mêmes en contact avec l'or rugueux.

La mesure de leur spectre est réalisée dans l'air, avec un temps d'intégration de 5 minutes à la plus faible puissance laser disponible, à la longueur d'onde d'excitation de 660 nm pour l'Xplora Plus, et de 638 nm pour le prototype. Il a été vérifié qu'à cette longueur d'onde la réponse des marqueurs était plus intense qu'à 690 nm et 785 nm puisque la diffusion évolue comme l'inverse de la puissance 4 de la longueur d'onde (résultats non montrés).

Les spectres mesurés sur les deux instruments sont tracés en figure 2.51. La correspondance entre les résultats des deux appareils est excellente, avec des amplitudes de pics plus importantes sur le prototype. La position des pics est identique sur les deux appareils, à quelques cm^{-1} près dus à une calibration légèrement différente. Le spectre de l'oligonucléotide marqué Cy3 est moins intense que celui avec marqueur Cy5. Le pic d'absorption Cy3 se trouve vers 557 cm^{-1} tandis que celui de Cy5 est positionné vers 655 cm^{-1} . L'excitation des bandes de Cy3 est donc moins forte à la longueur d'onde de 638 nm que celle du marqueur Cy5.

Les fluorophores étant déposés à même le substrat, leur émission de fluorescence est quenchée.

Le prototype d'instrument Raman présente ainsi des performances équivalentes à celles d'un système commercial Horiba. La mesure du spectre d'ADN marqué cyanine 5 donne une réponse intense et riche en pics pour une excitation à 638 nm, ce qui en fait un bon candidat pour une caractérisation complète de l'instrument bimodal.

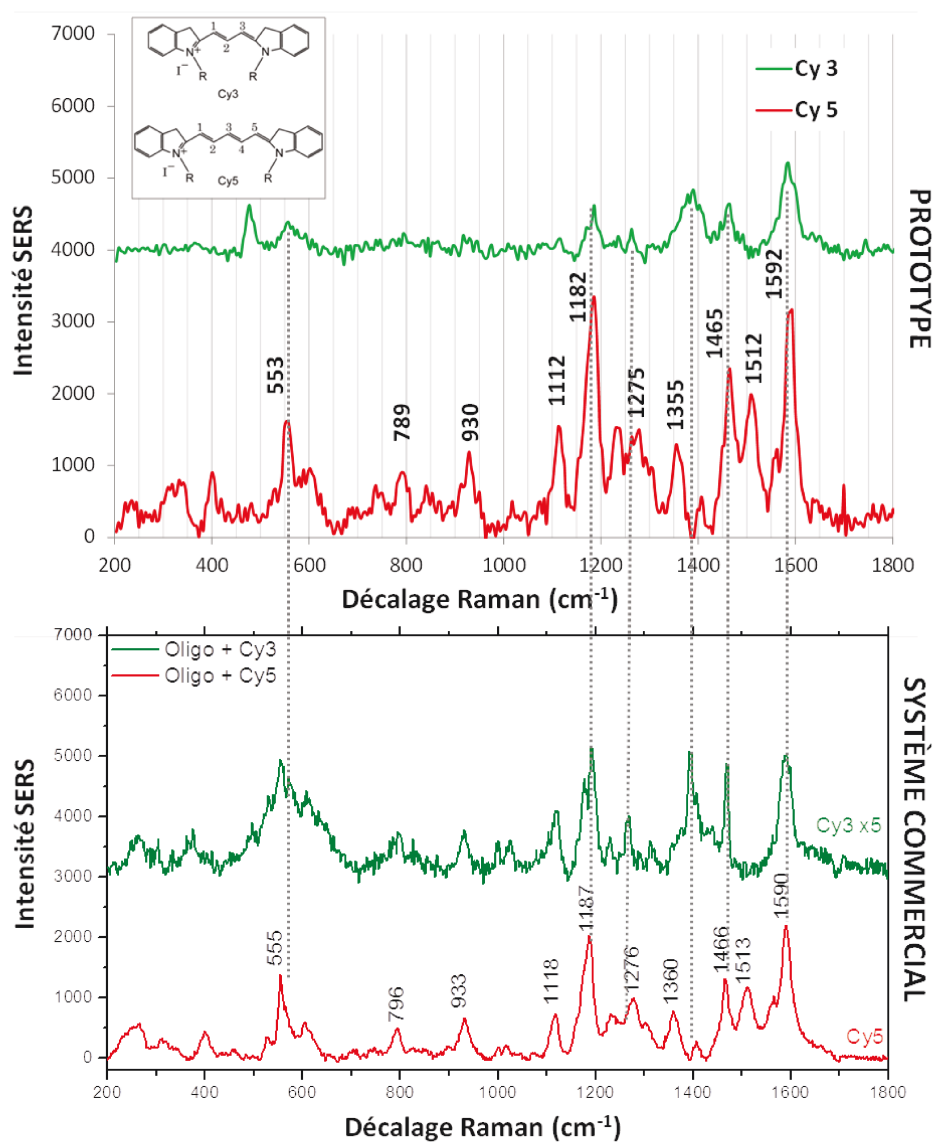


FIGURE 2.51 – Comparaison des performances du prototype Raman avec celles du système commercial Horiba sur la mesure en air du spectre de deux séquences identiques d’ADN marquées avec deux molécules fluorescentes sur substrat d’or rugueux : la cyanine 3 et la cyanine 5. Les spectres du graphe haut sont acquis sur le prototype à $\lambda = 638$ nm, les spectres du bas sont mesurés sur l’Xplora Plus, à $\lambda = 660$ nm, le temps d’intégration est pris à 5 minutes dans les deux cas. Le spectre d’ADN marqué Cy3 a été multiplié par 5 pour une meilleure visualisation sur la mesure de l’appareil commercial. Pour une comparaison plus facile entre les résultats, la position de certains pics est mise en évidence par des lignes en pointillés gris. La structure des deux marqueurs est illustrée dans l’encadré.

2.4 Conclusion

Ce chapitre instrumental a décrit les principaux enjeux techniques, à la fois en termes d'optique, de fluidique, et de thermique, liés au développement d'un système d'imagerie par résonance des plasmons de surface et d'un système de spectroscopie Raman exaltée de surface pour la détection de molécules en milieu liquide.

La source à LEDs autorisant une imagerie multi-spectrale a été caractérisée : sa stabilité spectrale a été mesurée, et il a été vérifié que le balayage mécanique de la fibre adressant chaque LED successivement ne perturbe pas la détection, qui est limitée par le bruit de photons. L'influence du prisme en configuration Kretschman a été discutée : son angle au sommet doit être adapté à la plage angulaire visée, et le choix du matériau détermine la dispersion spectrale. La cellule fluidique innovante intégrant un hublot de verre est à la fois adaptée à une mesure SPRI du fait de sa stabilité thermique et fluidique, et à une mesure SERS, comme l'a démontré l'acquisition du spectre de la cyanine, identique à celui obtenu sur un instrument commercial. Un système de balayage laser a également été développé. Il permet d'analyser un champ de 700 μm sur lequel le signal SERS mesuré subit des variations d'intensité inférieures à 50%. Ainsi, plusieurs plots de sondes peuvent être caractérisés après interaction afin d'identifier les molécules cibles capturées. Un bilan des principales caractéristiques des modules SPRI et SERS composant l'instrument développé est dressé dans le tableau 2.52.

La mise au point d'un biocapteur implique également une phase d'optimisation du transducteur, du point de vue de la fonctionnalisation de surface et de la nanostructuration, indispensable à la mesure SERS. De plus, pour conclure sur la validation du système dans sa globalité, c'est-à-dire en terme de bimodalité SPRI et SERS, il reste encore à tester ses performances sur une expérience de test impliquant simultanément les deux techniques de détection.

Pour finir, le système de couplage SPRI et SERS mis au point devra être confronté à des problématiques biologiques concrètes afin de démontrer son aspect novateur et son intérêt pour la communauté scientifique.

Ces questions seront traitées dans le chapitre suivant, qui souligne le caractère collaboratif et multidisciplinaire du projet en abordant des aspects de chimie, de nanoplasmonique et de biologie.

SPRI		SERS	
λ (5 LEDs)	760 / 780 / 800 / 830 / 850 nm	Objectif	ON = 0,7 x20
Résolution temporelle	13 secondes	λ_{Laser}	638 / 691 / 785 nm
Résolution spectrale	25 pm	P_{Laser}	35 / 30 / 100 mW
Résolution en variation d'indice	10^{-6} RIU	Champ de balayage laser	700 μm
Résolution spatiale imagerie	$\sim 20 \mu\text{m}$	Déplacement mécanique de l'objectif	$\pm 1 \text{ mm}$
Bruit de photons (8 images moyennées, 1000 pixels intégrés soit 150 μm de diamètre de spot)	0,015 %	Réseaux du spectromètre	600 / 1200 / 1800 traits/mm
Stabilisation en température	0,01°C		
Prisme Matériau Angle au sommet	LAK34 20°		
Plage angulaire accessible	64° - 81°		
Champ image	6,7 mm par 4,5 mm		

FIGURE 2.52 – Tableau récapitulatif des principales caractéristiques du prototype instrumental couplant SPRI et SERS. Les paramètres notés en rouge sont à adapter en fonction des dimensions de nanostructures de la biopuce. Les nanodisques considérés ici présentent une période de 400 nm, un diamètre de 200 nm et une hauteur de 30 nm. Le substrat de la biopuce est en borsilicate étiré.

Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

Sommaire

3.1 Nanostructuration des substrats	130
3.1.1 Choix de la structure du transducteur	130
3.1.2 Calcul des modes électromagnétiques	133
3.1.3 Optimisation du design du substrat	136
3.1.4 Caractérisations expérimentales des substrats nanostructurés	146
3.2 Développement d'une biopuce bi-fonctionnelle	158
3.2.1 Intérêt d'un substrat bi-fonctionnel	158
3.2.2 Fabrication d'un substrat bi-fonctionnel	158
3.2.3 Optimisation de la chimie de surface pour interaction modèle de validation de l'instrument ADN/ADN	161
3.3 Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS	164
3.3.1 Définition d'une expérience modèle fiable	164
3.3.2 Présentation de l'expérience de validation	166
3.3.3 Résultats SERS	170
3.3.4 Résultats SPRI	175
3.4 Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex	180
3.4.1 Modèle agro-alimentaire : Ochratoxine A / aptamère	182
3.4.2 Modèle bio-médical 1 : protéine MnSOD / aptamère	187
3.4.3 Modèle bio-médical 2 : protéine FAB-p3 / fragment d'anticorps	189
3.5 Conclusion	190

Le chapitre précédent a décrit la mise au point, le fonctionnement et les performances d'une plateforme optique couplant mesures SPRI et SERS. Chaque module de la plateforme a été caractérisé séparément. Il a été vérifié que la détection SPRI est principalement limitée par le bruit de photons, et que le système Raman donne des résultats semblables à ceux d'un appareil commercial Horiba. Désormais, l'objectif consiste à effectuer des mesures combinant simultanément analyses SPRI et SERS lors d'une même expérience.

Pour continuer de développer le bio-détecteur, il convient d'**optimiser le transducteur** qui convertit l'interaction moléculaire en signal optique. Le rôle du transducteur est double : il assure l'excitation des plasmons dont le décalage spectral pourra être mesuré suite à la capture

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

de molécules, et concentre le champ électrique afin d'amplifier l'excitation et l'émission Raman. Les substrats nanostructurés permettant le couplage SPRI/SERS sont présentés et caractérisés dans le paragraphe suivant. Ils sont simulés au LCF, fabriqués à l'IEF et validés au LCF par mesure SPRI et au CSPBAT par mesure SERS.

Rendre le détecteur apte à mesurer des signaux biologiques nécessite de **fonctionnaliser le substrat**, c'est-à-dire de lui donner la fonction de reconnaissance biologique par la mise au point d'une chimie de surface permettant l'immobilisation des éléments de reconnaissance et limitant les interactions non spécifiques. Différentes combinaisons d'espèces chimiques ont été réalisées à l'INL et caractérisées au LCF. C'est l'objet du second point de cette partie.

Une fois ces deux ingrédients disponibles, transducteur et chimie de surface, le prototype peut être **validé** par une mesure sur un modèle, qui servira de **preuve de principe**. Le modèle sélectionné consiste en une interaction ADN/ADN, dont les résultats sont présentés en troisième partie.

Pour conclure sur l'intérêt biologique apporté par ce nouvel instrument bimodal, des **applications dans les domaines agro-alimentaire et bio-médical** sont visées. Avant de les tester sur le prototype, une étape de développement de la chimie de surface, de mise au point des conditions expérimentales et de vérification de l'affinité des couples moléculaires sonde/cible choisis est nécessaire. Ainsi, des protocoles sont instaurés pour optimiser la mesure finale sur le prototype, qui sera effectuée dans un second temps, lors du prolongement du projet, en 2017.

3.1 Nanostructuration des substrats

L'élément central de la mesure optique est le transducteur, qui porte les plasmons de surface essentiels à la SPRI et au SERS. Il doit traduire la capture de molécules en un décalage spectral de la résonance le plus grand possible et une émission Raman la plus exaltée possible.

3.1.1 Choix de la structure du transducteur

La faible section efficace de la diffusion Raman traduit la faible intensité du signal Raman des molécules. A titre indicatif, la section efficace Raman est 10^{12} fois plus faible que celle de la fluorescence. Pour cette raison, il est nécessaire d'exalter l'intensité Raman par l'utilisation de substrats métalliques rugueux ou de réseaux de nanoparticules le plus couramment en or sur du verre. L'existence d'irrégularités de surface de dimensions de l'ordre de la longueur d'onde crée des points chauds de forte exaltation du champ électromagnétique, par effet de pointe, pour atteindre une amplification de l'intensité mesurée de l'ordre de 10^5 à 10^8 [Le Ru 2007, Shim 2008] par rapport au signal Raman de molécules mesuré en solution. Au niveau de ces aspérités se crée un plasmon de surface localisé qui génère cette amplification de champ.

Le premier critère du cahier des charges du transducteur est donc l'exaltation du signal Raman par plasmon localisé.

Or, cette amplification ne doit pas être obtenue au détriment de la sensibilité de la mesure SPRI.

La résonance est sensible à des variations d'épaisseur optique (produit entre indice de réfraction et épaisseur moyenne d'une couche moléculaire). Toutefois, en pratique, sa sensibilité spectrale est exprimée en terme de décalage spectral de la résonance en nanomètre par unité de variation d'indice (nm/RIU) dans le cas d'une variation d'indice globale du milieu diélectrique car la variation d'indice se produit sur une épaisseur infinie (donc la variation d'épaisseur optique est égale à la variation d'indice optique) ou bien dans le cas d'une interaction biologique, en nanomètres par unité de variation d'épaisseur (nm/nm) car l'indice de la couche biomoléculaire est approximé de façon standard entre 1,45 et 1,48 [Singh 2006].

Sur l'exemple du substrat nanostructuré classique de particules métalliques sur verre, la sensibilité de la résonance suite à la fixation d'une couche de molécules sur la surface est de l'ordre de 0,6 nm/nm. Cela signifie qu'un dépôt d'une couche de 1 nm d'épaisseur générant un contraste d'indice de $n_{couche} - n_{eau} = 1,5 \cdot 10^{-1}$ entraîne une translation de la résonance de 0,6 nm. quel que soit son diamètre, contre 4,5 nm/nm pour un film d'or d'épaisseur 50 nm à la longueur d'onde de 800 nm. Cette sensibilité spectrale d'un film d'or continu évolue avec la longueur d'onde de façon quasi proportionnelle, comme le montre le graphe 3.1 obtenu par le calcul à partir de la méthode de Rouard [Lecaruyer 2006].

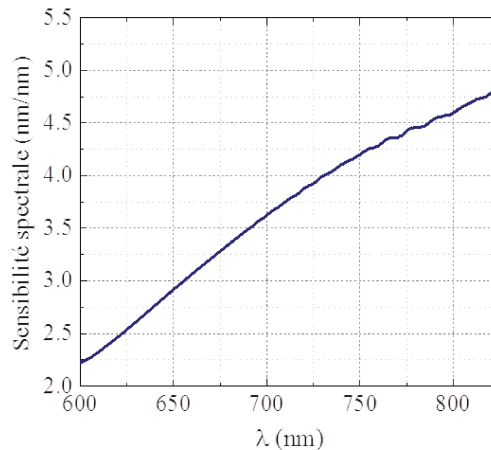


FIGURE 3.1 – Calcul de sensibilité spectrale du plasmon propagatif créé à la surface d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur pour des longueurs d'onde d'incidence variant entre 600 et 825 nm.

Le diamètre de la particule influe sur la longueur d'onde d'excitation, et donc de résonance de la particule. Cela signifie qu'en présence du mode localisé seul exhibé par la nanoparticule, le choix de la longueur d'onde d'illumination est à adapter avec la taille de la particule, et la sensibilité spectrale de la mesure SPR est réduite de près d'un ordre de grandeur. A l'inverse, un mode propagatif peut être excité par plusieurs longueurs d'onde, ce qui rend les conditions de mesures plus flexibles. L'idée d'un substrat métallique rugueux, ou composé de particules colloïdales, comme cela a été exploré par Yih [Yih 2004] pour coupler SPRI et SERS, ne semble pas non plus adaptée à la mesure SPRI. En effet, la rugosité de surface entraîne un élargissement dramatique de la résonance du plasmon propagatif lorsque la taille des aspérités dépasse 3 nm. La détermination du minimum de réflectivité est alors moins résolue.

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

Ainsi, le second point du cahier des charges porte sur la sensibilité spectrale de la résonance, qui doit être équivalente à celle d'un substrat d'or continu standard supportant un plasmon propagatif, soit de l'ordre de 4,5 nm/nm pour une illumination à 800 nm.

Pour résumer, la mesure SERS requiert un plasmon localisé qui amplifie fortement le champ du fait de son confinement autour des nanoparticules, alors que la mesure SPRI s'appuie sur la sensibilité d'un plasmon propagatif évoluant le long d'un film d'or métallique. A partir de ce constat, il n'y a qu'un pas pour arriver à la conclusion d'assembler film d'or continu et réseau périodique de nanostructures. La forme des structures a été choisie la plus simple possible pour limiter la difficulté de fabrication : un réseau de nanocylindres est déposé sur un film d'or.

La figure 3.2 retrace la démarche de mise au point de ce substrat dénommé hybride, du nom du mode qu'il supporte associant des propriétés de plasmons localisé et propagatif. Les trois modes, localisé, propagatif et hybride, sont comparés en terme de sensibilité spectrale et d'exaltation du champ électrique, qualifiée par le rapport entre intensité du champ plasmon et intensité du champ incident (noté I/I_0 sur la figure). Les valeurs de sensibilité et d'intensité sont obtenues par des simulations.

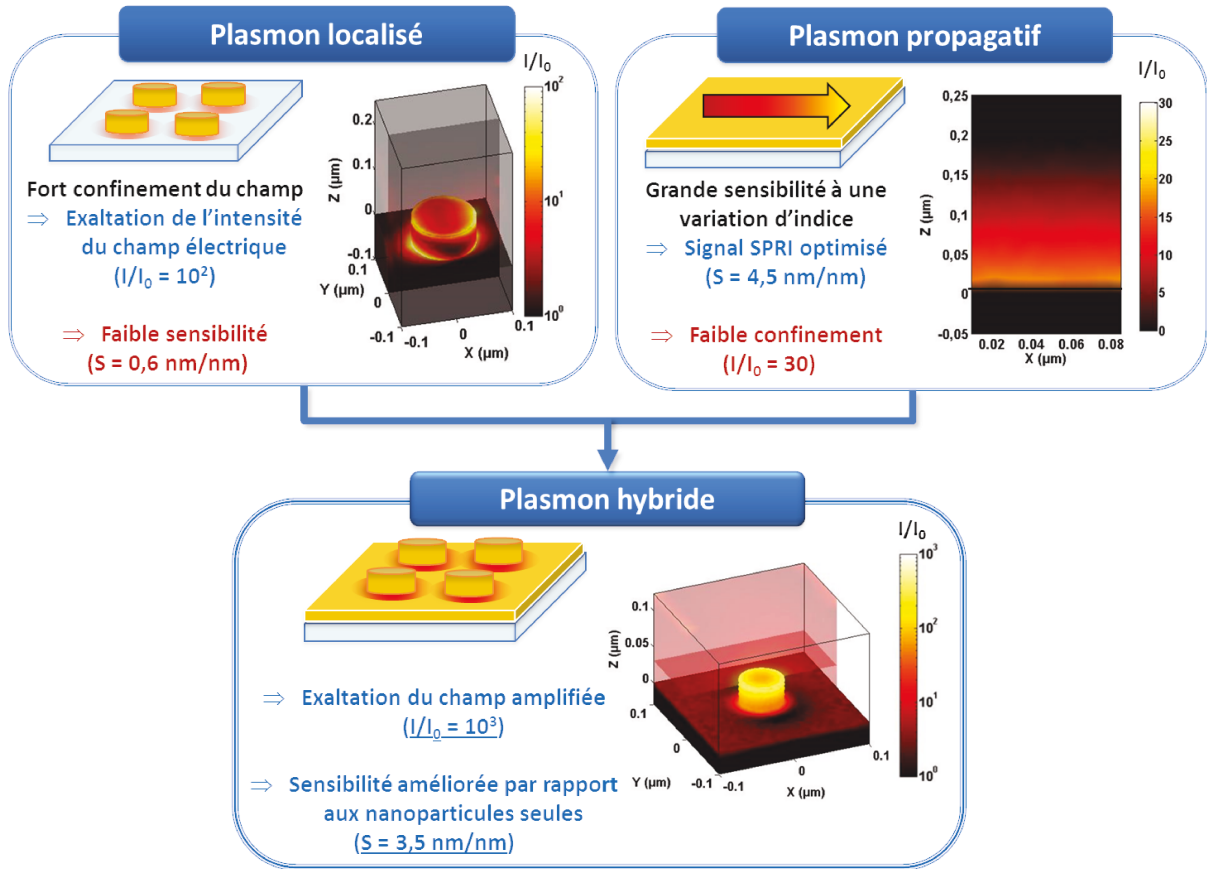


FIGURE 3.2 – Bilan des principales caractéristiques des modes localisé, propagatif et hybride en terme de sensibilité à l'adsorption d'une couche biologique (à 800 nm) et d'amplification de l'intensité par rapport à l'intensité incidente (résultats de simulations). Les valeurs données pour le plasmon localisé sont pour une nanostructure de diamètre 50 nm, pour le plasmon propagatif, l'épaisseur d'or est prise à 50 nm, et pour le plasmon hybride, l'épaisseur d'or vaut 30 nm, la hauteur de la particule 30 nm, le diamètre 70 nm et la période du réseau 200 nm.

La sensibilité simulée du mode hybride est de l'ordre de 3,5 nm/nm, proche de celle du plasmon propagatif, et presque 6 fois plus grande que celle d'un réseau de nanoparticules d'or sur verre, et le confinement du champ est plus fort que celui du plasmon localisé d'une nanoparticule individuelle (intensité du champ électrique exaltée d'un ordre de grandeur supplémentaire par rapport au localisé).

3.1.2 Calcul des modes électromagnétiques

Les simulations des modes électromagnétiques d'un réseau de nanostructures font l'objet de la thèse de Mitradeep Sarkar [Sarkar 2015a]. Elles ont été réalisées grâce à un code combinant deux méthodes numériques complémentaires, la méthode des éléments finis pour le calcul du champ proche et la méthode modale de Fourier pour le calcul du champ lointain, développé au LCF par JP. Hugonin, M. Besbes et P. Lalanne [Lalanne 2007, Hugonin 2008].

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

Cette méthode numérique hybride profite des avantages des deux approches et permet de diminuer le temps de calcul des modes de nanostructures et d'améliorer la précision de calcul. En effet, deux échelles de distance se confrontent lorsque l'on cherche à décrire le comportement d'un réseau de nanostructures : d'un côté, les particules ont une dimension inférieure à la longueur d'onde, de l'ordre de la centaine de nanomètres, pour pouvoir supporter des plasmons localisés, et de l'autre, il s'agit d'un réseau qui s'étend suivant deux dimensions sur plusieurs dizaines de micromètres.

Pour évaluer correctement la répartition du champ autour des nanoparticules, de géométrie complexe, l'utilisation de la méthode des éléments finis s'impose, d'autant plus qu'elle est performante pour décrire des phénomènes représentés par des équations aux dérivées partielles. Elle repose sur la discrétisation du problème différentiel (équations de Maxwell) en un système de matrices. La taille des mailles élémentaires au niveau desquelles le calcul est effectué est adaptée en fonction de la continuité du milieu. Près de l'interface métal/diélectrique, notamment autour des nanoparticules où le champ est le plus confiné, le maillage est le plus fin. Cette méthode profite des symétries du système qui permettent de limiter le temps de calcul.

L'utilisation de la méthode modale de Fourier est nécessaire pour déterminer la réflectivité d'une onde incidente sur un substrat nanostructuré (champ lointain), grandeur mesurée en SPRI, car la méthode des éléments finis se limite au calcul du champ proche. La méthode modale de Fourier se révèle particulièrement efficace pour obtenir le champ évoluant dans des zones planaires, c'est-à-dire au-dessus et en-dessous de la tranche contenant les nanostructures. Elle permet d'obtenir un gain de mémoire vive et de temps de calcul considérable, limite majeure de la méthode des éléments finis. Une représentation des domaines d'application de chaque technique de calcul est illustrée en figure 3.2.

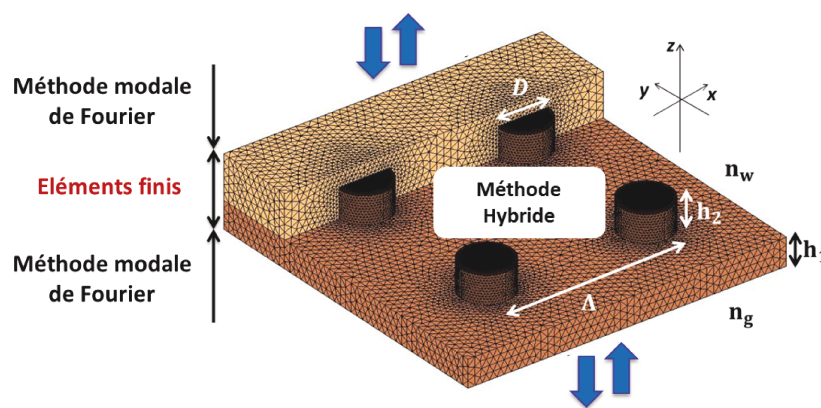


FIGURE 3.3 – Illustration du code numérique hybride permettant le calcul des modes du réseau de nanocylindres couplant méthode modale de Fourier et méthode des éléments finis.

Les modes obtenus par le calcul pour une période de 300 nm et un diamètre de 50 nm sont représentés en figure 3.4 par leur dispersion (réflectivité en fonction de la longueur d'onde et de

l'angle d'incidence) et par un profil spectral de réflectivité à une angle donné (égal à 70° sur le graphe à titre d'exemple).

Le substrat hybride supporte deux modes : un mode nommé hybride et un mode de Bragg. Cependant, le mode hybride est scindé en deux branches, l'une appelée inférieure et l'autre supérieure sur le profil spectral. Finalement, trois résonances sont observées à un angle fixé, excitées à des longueurs d'onde différentes.

Une étude exhaustive de ces modes est réalisée dans la thèse de Mitraddeep Sarkar. Pour résumer ses observations, deux phénomènes entrent en jeu, dus au couplage entre plasmon propagatif et plasmon localisé et à l'arrangement périodique des nanostructures.

Comme cela a été montré sur la figure 3.2, il se produit d'une part un couplage entre deux modes : le premier est un mode localisé, qui est excité en présence de nanostructures isolées, et le second un mode propagatif, supporté par un film d'or plan. L'existence de ces deux modes au sein d'un même support assemblant nanoparticules et film d'or induit un couplage entre plasmon localisé et propagatif. Le résultat de ce couplage donne un mode appelé hybride, à la fois confiné autour des nanostructures et sensible à une variation d'indice.

La dispersion de ce mode de couplage, tracée sur la carte de réflectivité de la figure 3.4 (pointillés verts), est très proche de celle d'un plasmon propagatif, à l'exception d'un anti-croisement autour de 700 nm (trait en tirés noirs), aussi appelé bande interdite. Celle-ci est l'indicateur d'un événement de couplage entre modes. C'est un peu comme si le mode propagatif standard présent sur film d'or était séparé en deux du fait de la compétition avec le mode localisé. Cette bande interdite se positionne à la longueur d'onde de 690 nm environ, quel que soit l'angle, correspondant à la longueur d'onde de résonance d'un nanodisque de diamètre 50 nm déposé sur une surface. La résonance du disque, et donc la position de la bande interdite, dépend du diamètre de la particule.

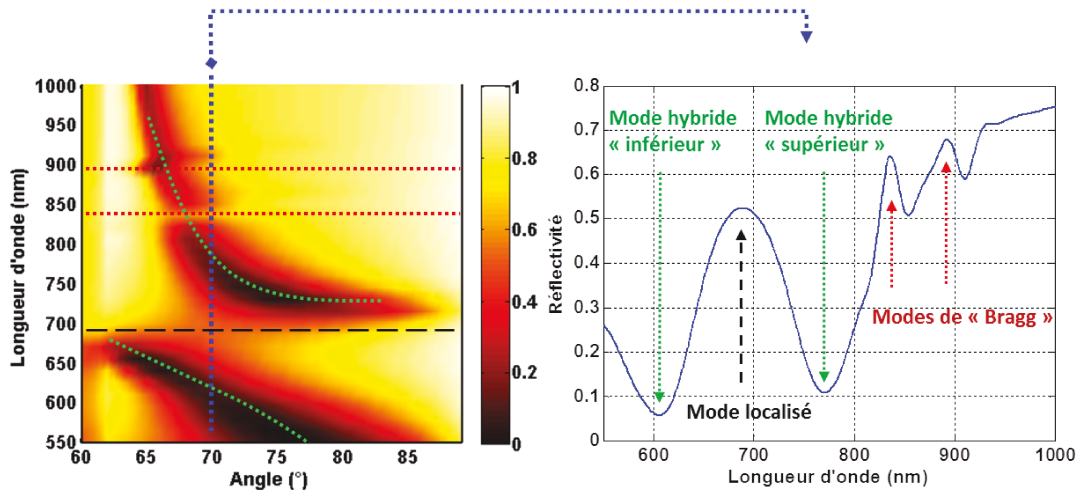


FIGURE 3.4 – Modes électromagnétiques du réseau de nanostructures. À gauche, la carte de dispersion calculée pour un réseau de nanocylindres de période 300 nm, de diamètre 50 nm et de hauteur 30 nm, avec une épaisseur d'or de 30 nm. À droite, un profil spectral est extrait de la simulation à l'angle de 70° .

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

D'autre part, l'arrangement périodique des nanostructures engendre une perturbation de l'onde plasmon propagative par le réseau de nanoparticules. L'onde, parallèle à la surface, est diffractée par le réseau, et des rétro-réflexions se produisent. Celles-ci peuvent interférer de façon constructive avec l'onde incidente lorsque qu'une condition de couplage, identique à la condition de Bragg, est remplie. Le vecteur d'onde du plasmon est alors augmenté de la quantité $m\frac{2\pi}{P}$, P étant la période du réseau. Par analogie avec un réseau de Bragg, le mode créé est désigné par le terme mode de Bragg (même si en toute rigueur, il ne s'agit pas d'un mode plasmonique puisque justement, à cette position la résonance est annulée). Il existe à l'interface or/verre et à l'interface or/milieu couvrant (eau ou air). Les deux versions de ce mode sont repérées par des pointillés rouges sur la carte de dispersion. L'interaction des modes de Bragg avec les modes localisé et propagatif donne un second événement de couplage, qui est illustré par la présence de deux bandes interdites supplémentaires vers 850 et 900 nm.

Ce couplage est secondaire, et le couplage entre plasmons localisé et propagatif, soit le mode hybride, reste prédominant.

3.1.3 Optimisation du design du substrat

Comment choisir la périodicité, le diamètre, la hauteur des nanocylindres ou encore l'épaisseur du film d'or ?

Le calcul des performances optiques d'un substrat hybride permet d'abord de définir une structure idéale, qui devient l'objectif à atteindre lors de la fabrication, dans la limite de faisabilité de la structure idéale définie par le calcul.

La structure idéale possède un couple diamètre et période qui maximise à la fois l'intensité autour des nanoparticules (pour le SERS) et la sensibilité du mode à une variation d'indice locale (pour la SPRI). Le calcul de ces deux grandeurs, intensité et sensibilité, est effectué à partir de l'utilisation du modèle hybride présenté plus haut. Les résultats de simulation sont tracés en figure 3.5.

3.1. Nanostructuration des substrats

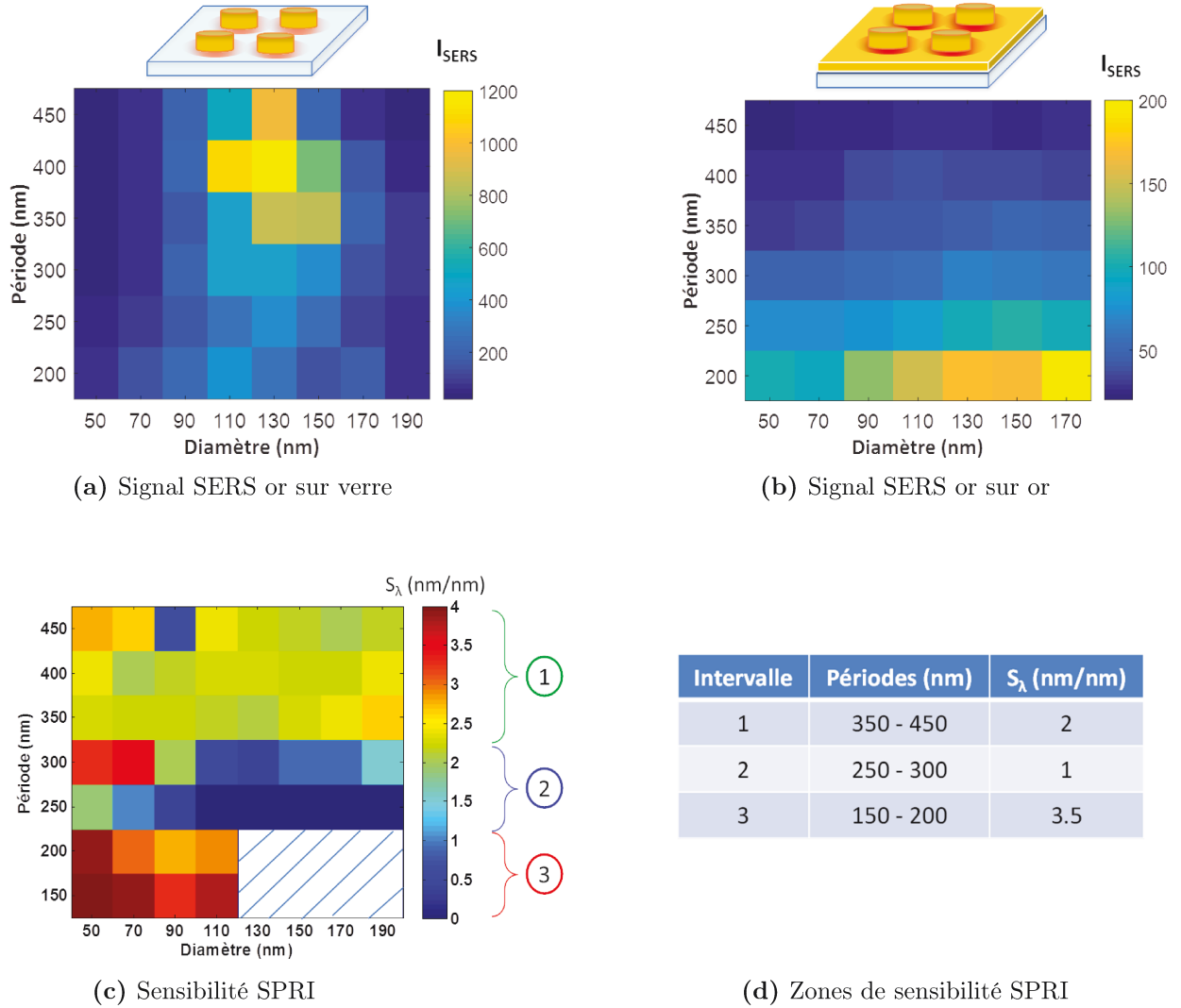


FIGURE 3.5 – Influence de la période et du diamètre des nanostructures sur l'intégrale de l'intensité du champ au carré sur la surface des nanoparticules (a) sur verre et (b) sur film d'or d'épaisseur 30 nm, quantité à laquelle le signal SERS est proportionnel. (c) Effet de ces mêmes paramètres sur la sensibilité du mode hybride à l'adsorption d'une couche biologique d'épaisseur nanométrique d'indice 1,48, pour une résonance à 800 nm. D'après cette carte de sensibilité, 3 zones de sensibilités différentes sont repérées et reportées dans le tableau (d).

L'intensité du signal SERS est simulée pour un substrat de nanostructures d'or de hauteur 30 nm sur verre et sur film d'or d'épaisseur 30 nm. Le réseau de nanoparticules métalliques d'or sur verre est choisi comme référence de comparaison car c'est un substrat classique pour effectuer une mesure SERS [David 2010]. Le calcul de l'intégrale de l'intensité du champ électromagnétique exhibé à la surface des nanoparticules pour une excitation à 638 nm est représenté en figure 3.5 a) et b) avec des périodes variant entre 200 et 450 nm et des diamètres compris entre 50 et 190 nm. Plus précisément, cette quantité simulée correspond à la valeur du signal SERS égale à l'intégrale surfacique du produit de l'intensité incidente à la longueur d'onde incidente et de l'intensité incidente à la longueur d'onde de diffusion Raman :

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

$$I_{SERS} = \frac{1}{S_{cyl}} \int \int I(\lambda_{inc}) \times I(\lambda_{em}) dS \quad (3.1)$$

Pour ce calcul, la longueur d'onde d'émission considérée correspond à un décalage Raman de 1075 cm^{-1} , une des bandes caractéristiques de la molécule de thiophénol utilisée pour la caractérisation des nanostructures par mesure SERS.

En ce qui concerne un réseau de nanoparticules d'or sur verre (figure 3.5a), un optimum clair de l'intensité à la surface des nanoparticules d'or est obtenu pour une période de 400 nm et un diamètre de 130 nm.

En effet, l'intensité confinée autour des nanoparticules obéit à l'expression théorique des anomalies de Wood-Rayleigh [Sarrazin 2003]. Lorsque l'onde diffractée par un réseau émerge avec un angle rasant, le champ peut être fortement amplifié. De la même façon que pour le mode de Bragg discuté plus haut, l'onde rasante se retrouve perturbée par le réseau et peut entrer en résonance. La condition pour obtenir une anomalie de Wood est remplie lorsque la période P du réseau est égale à un multiple du rapport entre la longueur d'onde d'excitation et l'indice du milieu incident, pour une incidence normale à la surface du réseau ($P = m\lambda/n_{verre}$). Avec un laser de 638 nm et un verre de BK7 ($n = 1,5$), la période de Wood vaut 421 nm (ordre $m = 1$). C'est donc à cette période là que l'amplitude du champ est maximale.

De plus, comme cela a été expliqué, la longueur d'onde à laquelle une nanoparticule est résonante dépend de sa taille. Avec une illumination à 638 nm, des particules de diamètre 130 nm sont excitées les plus efficacement (résultat obtenu par calcul de l'extinction d'une nanoparticule isolée avec la méthode numérique hybride, à bases d'éléments finis et de méthode de Fourier).

L'optimum d'intensité SERS est ainsi obtenu lorsque les deux phénomènes s'additionnent : un diamètre de nanoparticule pour lequel la résonance est la plus proche de la longueur d'onde d'excitation, et une période à laquelle l'anomalie de Wood intervient, également liée à la longueur d'onde incidente.

Dans le cas des substrats choisis pour le projet, des nanocylindres d'or sur film d'or de 30 nm d'épaisseur, la tendance est différente. La figure 3.5b permet de constater que l'intensité simulée augmente lorsque la période diminue et le diamètre augmente. En effet, les nanoparticules se comportent comme des dipôles. L'interaction entre les dipôles s'accroît lorsque la distance qui les sépare diminue. Le champ se trouve alors amplifié. Le fait d'augmenter le diamètre va dans le même sens, c'est-à-dire que lorsque le diamètre augmente à période fixée, les dipôles se rapprochent également. C'est donc la densité de nanoparticules qui est importante pour exalter le champ grâce au couplage entre les nanoparticules [Bryche 2015]. Les caractérisations expérimentales du paragraphe 3.1.4 confirment ce résultat. La croissance du signal obtenue pour la période de 200 nm lorsque le diamètre augmente sera également observée pour les périodes plus grandes si le rapport entre diamètre et période diminue.

Le maximum de signal calculé lorsque les nanoparticules sont en contact direct avec le verre est plus grand que celui obtenu pour un réseau de nanodisques d'or sur film d'or. Cette augmentation est liée à l'excitation d'un mode localisé alors qu'à l'incidence normale, seule la densité des nanoparticules joue sur l'intensité SERS lorsque le film d'or est présent. En revanche, en dehors de ces combinaisons de période et diamètre exaltant fortement le champ, les niveaux de sensibilité des deux configurations sont équivalents (par exemple, pour une période de 300 nm

et un diamètre de 70 nm, les valeurs d'intensité SERS dans les deux cas sont proche de 50). Or, il est montré dans la partie 3.1.4 que l'expérience donne des résultats opposés : le signal est en pratique amplifié par la présence du film d'or sous les nanodisques.

L'effet du diamètre et de la période des nanodisques est aussi étudié en terme de sensibilité SPR à l'adhésion d'une couche biologique nanométrique d'indice 1,48, à une longueur d'onde de résonance de 800 nm. Cette longueur d'onde a été sélectionnée car la branche supérieure du mode hybride existe au-delà de 750 nm environ, et que la caméra visible à un rendement très faible au-delà de 850 nm. La source à LEDs du prototype est donc centrée sur 800 nm. La sensibilité est calculée comme le rapport entre décalage spectral de la résonance et épaisseur de la couche déposée. Les résultats sont présentés sur la figure 3.5c. Les combinaisons de période et diamètre de la zone hachurée n'ont pas été calculées d'une part car le maillage du calcul par éléments finis choisi n'est plus adapté lorsque les nanostructures deviennent trop proches ($P = 200$ nm et $D = 130, 150$ et 170 nm donnent des valeurs de sensibilité aberrantes) et que ces combinaisons ne pourront de toute façon pas être fabriquées, et d'autre part, l'autre partie des points hachurés correspond au cas où le diamètre est supérieur à la période. Ces résultats démontrent que l'influence du diamètre est négligeable pour une période donnée. En effet, le plasmon hybride se propage sur une distance bien plus grande que la valeur d'un diamètre. Une légère perturbation telle qu'un changement de diamètre n'est pas ressentie par l'onde.

Ensuite, la carte de sensibilité peut être divisée en trois gammes de périodes P de sensibilités S_λ différentes identifiées dans le tableau 3.5d et calculées pour une résonance proche de 800 nm. L'angle de calcul choisi pour avoir une résonance à 800 nm varie en fonction de la période car le mode hybride se décale. Les cartes de réflectivité de la figure 3.6 montrent que l'angle donnant une résonance pour une période de 300 nm est proche de 68° alors que pour une période de 200 nm, il vaut 75° . La sensibilité est de l'ordre de 2 nm/nm pour $P = [350-450]$ nm, de 1 nm/nm pour $P = [250-300]$ nm, et de 3,5 nm/nm pour $P = [150-200]$ nm. En comparaison, un film d'or continu d'épaisseur 50 nm exhibe une sensibilité de l'ordre de 4,5 nm/nm à 800 nm.

Pour comprendre la raison de ces différences de sensibilité, des cartes de réflectivité sont exposées en figure 3.6 pour trois périodes (350, 300 et 200 nm), chacune illustrant une zone de sensibilité différente. Les deux branches du mode hybride sont visibles (régions rouges des cartes de réflectivité). La position du mode de Bragg, dépendant de la période du réseau, est identifiée en pointillés noirs. Pour une période de 300 nm, ce mode réseau existe à la longueur d'onde de 840 nm. Sa proximité avec la résonance du mode hybride à 800 nm explique la faible sensibilité de la mesure SPR. En effet, le mode de Bragg est un mode statique dont la sensibilité à une variation d'indice locale est nulle. Pour des périodes de 350 ou 200 nm, le mode de Bragg se trouve assez éloigné de la résonance hybride de 800 nm pour ne pas détériorer la sensibilité de la mesure. La différence de sensibilité entre période de 350 nm et de 200 nm, qui vaut respectivement 2 et 3,5 nm/nm environ, s'explique par le fait que la résonance à 800 nm pour la période de 200 nm est plus écartée de la bande interdite de Bragg qu'à la période de 350 nm. Cette sensibilité est du même ordre de grandeur que celle sur or continu d'épaisseur 50 nm. Cela n'a en effet rien de surprenant : pour une énergie incidente donnée, le champ électrique moyen sur toute la surface de la puce n'a aucune raison d'être différent entre de l'or plan et de l'or nanostructuré. La sensibilité du mode hybride peut être assimilée à celle d'un mode propagatif évaluant à la surface d'un film d'or de 30 nm d'épaisseur. Pour vraiment améliorer la sensibilité grâce aux

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

nanostructures, il faudrait localiser les molécules sondes et cibles uniquement dans les zones de fort champ (voir la partie 3.2).

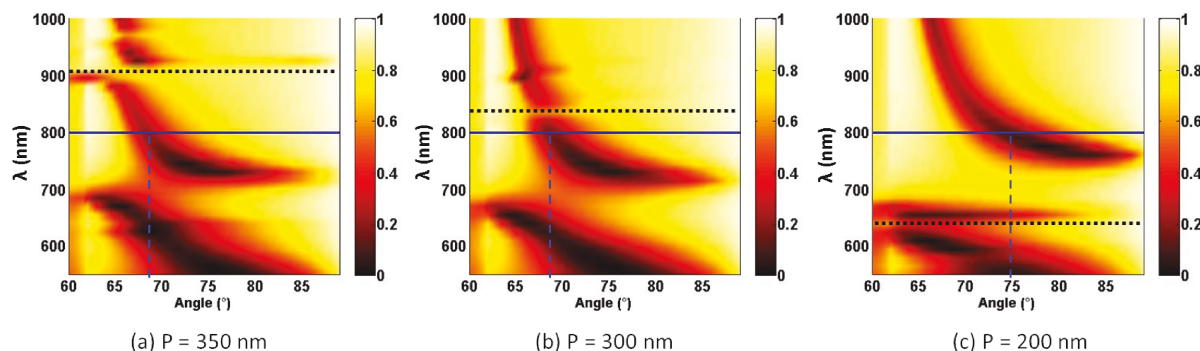


FIGURE 3.6 – Cartes de réflectivité en fonction de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence pour trois valeurs de périodes à un diamètre fixé à 50 nm : (a) 350 nm, (b) 300 nm, (c) 200 nm. Le trait bleu souligne la longueur d'onde choisie pour le calcul de sensibilité SPR et le trait en pointillés noirs la position du mode de Bragg.

Des points de forte sensibilité pour les petits diamètres à la période de 300 nm peuvent être remarqués sur la carte 3.5c. Ils sont dus à la présence d'anomalies présentées par le mode de Bragg (voir la thèse de Maha Chamtour [\[Chamtouri 2013\]](#) pour de plus amples explications). En pratique, il est peu probable d'atteindre ces valeurs de sensibilité à cause des défauts de surface du substrat et de la largeur spectrale de l'illumination (source pas strictement monochromatique).

Pour conclure, il n'y pas d'avantage du point de vue de la SPRI à diminuer la période du réseau de 450 nm à 350 nm, la sensibilité n'évolue pas. De même, le diamètre n'a pas d'influence sur la sensibilité SPRI. Des périodes de 250 à 300 nm environ ne sont pas adaptées à une mesure SPRI en raison de leur faible sensibilité.

Pour gagner en signal, il est alors nécessaire de descendre à des périodes inférieures à 200 nm. Cette rupture de sensibilité autour de 300 nm de période complique l'optimisation de la fabrication des substrats en grande quantité par nano-impression, expliquée dans la partie suivante. Cela signifie que ce procédé de fabrication doit être modifié assez drastiquement pour passer de 400 nm à 200 nm de période. Pour cette raison, une période de 400 nm a été sélectionnée dans un premier temps, associée à un diamètre de 200 nm pour obtenir un réseau suffisamment dense exaltant l'intensité SERS.

En outre, des nanostructures de période inférieure à 300 nm résonnent à des angles supérieurs à 74° pour une longueur d'onde fixée à 800 nm, angles dégradant fortement la qualité de l'imagerie car trop rasants. Il faudrait alors travailler au-delà de 850 nm pour revenir dans une plage angulaire viable du point de vue imagerie.

L'article de Mitraddeep Sarkar [\[Sarkar 2015b\]](#) étudie également l'influence de la hauteur des nanodisques ainsi que celle du film d'or. Pour une épaisseur de film d'or variant entre 30 et 50

nm, les simulations montrent que la position de la résonance du mode couplé est inchangée et son amplitude faiblement modifiée. En effet, le paramètre de l'épaisseur d'or n'impacte pas le couplage entre mode localisé et mode propagatif. En revanche, lorsque la hauteur des nanodisques augmente, la longueur d'onde de résonance du mode hybride est plus élevée et son amplitude augmente. Le couplage entre mode localisé et mode propagatif est renforcé lorsque la hauteur du cylindre augmente. Sachant qu'une caméra visible est utilisée pour la détection SPRI, la plage de longueurs d'onde d'analyse ne s'étendra pas au-delà de 850 nm. Le choix de la hauteur du cylindre doit s'adapter à cette plage spectrale.

Une hauteur de 30 nm de nanodisque sera plus adéquate que des hauteurs de valeur plus élevée car sa résonance intervient à des longueurs d'onde plus faibles (typiquement, 800 nm à l'angle de 70°).

Les expériences de validation du prototype sont réalisées sur des substrats de période 400 nm et de diamètre 200 nm. La répartition des modes caractéristiques de ce type de substrat, qui sera désigné comme substrat Piranex, du nom du projet ANR, est tracée en figure 3.7.

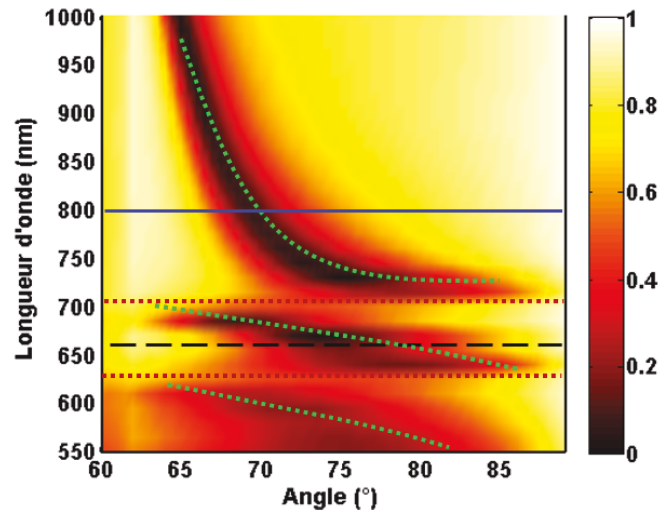


FIGURE 3.7 – Présentation des modes simulés d'un substrat Piranex (période 400 nm, diamètre 200 nm, hauteur 30 nm et épaisseur d'or 30 nm).

Les composantes du mode hybride expliquées plus haut sont reportées (en vert, le mode hybride, en rouge, les modes de Bragg, en noir, le mode localisé). La plage de longueurs d'onde utilisée comme source de l'expérience SPRI est centrée est 800 nm. C'est donc la branche supérieure du mode hybride qui sera sondée. La sensibilité du mode à l'adhésion d'une couche biologique uniforme (taux de recouvrement maximal) à 800 nm est de l'ordre de 2 nm/nm. Cette valeur de sensibilité devrait être augmentée lorsque les molécules se fixeront préférentiellement sur les nanostructures. D'autre part, la sensibilité à une variation d'indice globale dans le diélectrique est de 2000 nm/RIU. Cette dernière propriété est particulièrement intéressante

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

du point de vue de la mesure SPRI. En effet, le plasmon propagatif sur 50 nm d'or est sensible à un changement d'indice à hauteur de 7000 nm/RIU, soit plus de 3 fois plus que le plasmon hybride. Cela signifie que la détection avec un plasmon hybride sera plus robuste à des variations d'indice parasites telles qu'une instabilité du système fluide ou une dérive de température. Le partenaire Piranex en charge de la fabrication des substrats nanostructurés est l'IEF d'Orsay. En particulier, Jean-François Bryche est le doctorant qui a mis au point les procédés de fabrication en étroite collaboration avec Grégory Barbillon, Frédéric Hamouda et Marie-Claude Plante. Les points principaux de la fabrication sont évoqués dans la suite. Pour plus d'informations à ce sujet, il est recommandé de se rapporter à la thèse de Jean-François Bryche [Bryche 2016a].

Durant l'étape d'optimisation des dimensions des substrats, la méthode par lithographie à faisceau d'électrons s'impose comme la plus adaptée. Elle permet une grande flexibilité sur la forme des structures et donne des substrats uniformes et reproductibles.

Les principales phases de la fabrication par lithographie électronique sont résumées en figure 3.8. Un substrat de verre en borosilicate sert de support, matériau utilisé de façon standard en nano-fabrication. Comme cela a été discuté plus tôt, l'indice de réfraction proche de 1,5 de ce verre dessert le montage optique. Le matériau du support sera modifié dans la suite du projet (en LAK34 ou SF10).

Ce substrat de verre est d'abord nettoyé avec une solution de Piranha, puis une couche d'adhésion de titane est évaporée sous vide à sa surface (2 nm d'épaisseur), suivie d'une couche d'or d'épaisseur 30 nm.

Une résine de PMMA (polyméthylméthacrylate) est ensuite étalée par spin-coating, c'est-à-dire qu'une goutte de produit est déposée au centre du substrat monté sur une platine de rotation. La platine est mise en mouvement, ce qui répartit la résine de façon uniforme sur l'ensemble de la surface par effet de centrifugation (l'épaisseur de résine est fonction de la vitesse de rotation, de la viscosité et de l'accélération).

La résine est chauffée puis exposée à un faisceau d'électrons focalisé qui vient décrire le motif périodique de nanostructures point à point, par déplacement du substrat et du faisceau. A titre d'exemple, un motif de 25 zones carrées de côté 150 μm (modèle du projet Piranex pour un substrat) est décrit en 2h par le faisceau. Les électrons accélérés détruisent les liaisons carbone de la résine qui devient ainsi soluble.

L'étape de développement à base d'une solution de MIBK (méthylisobutylketone) et de IPA (isopropanol) a pour effet d'éliminer la résine attaquée par les électrons pour donner un négatif du motif final désiré imprimé dans la résine. Après 2 min d'immersion dans cette solution, un rinçage à l'isopropanol est effectué.

Une seconde évaporation d'or est réalisée pour remplir les orifices présents dans la couche de PMMA, sur une hauteur de 30 nm. La révélation du motif final, ou lift-off, s'effectue par un bain d'acétone de plusieurs heures qui retire la résine restante.

Pour finir, la surface d'or est nettoyée au plasma à oxygène pendant 5 minutes afin d'éliminer les résidus de résine. Un réseau de nanodisques d'or sur film d'or est ainsi fabriqué. L'image acquise au microscope à balayage électronique est visualisée en dernière étape de la figure 3.8 sur une surface de 3 par 3 μm pour des nanostructures de période 400 nm et de diamètre 200 nm. Les nanodisques sont très reproductibles et bien résolus, et la surface est uniforme. Sur l'ensemble de la surface d'une zone, de 150 par 150 μm , certains nanodisques isolés peuvent

manquer, par défaut de lift-off, mais cela ne modifie pas l'excitation globale du plasmon de surface.

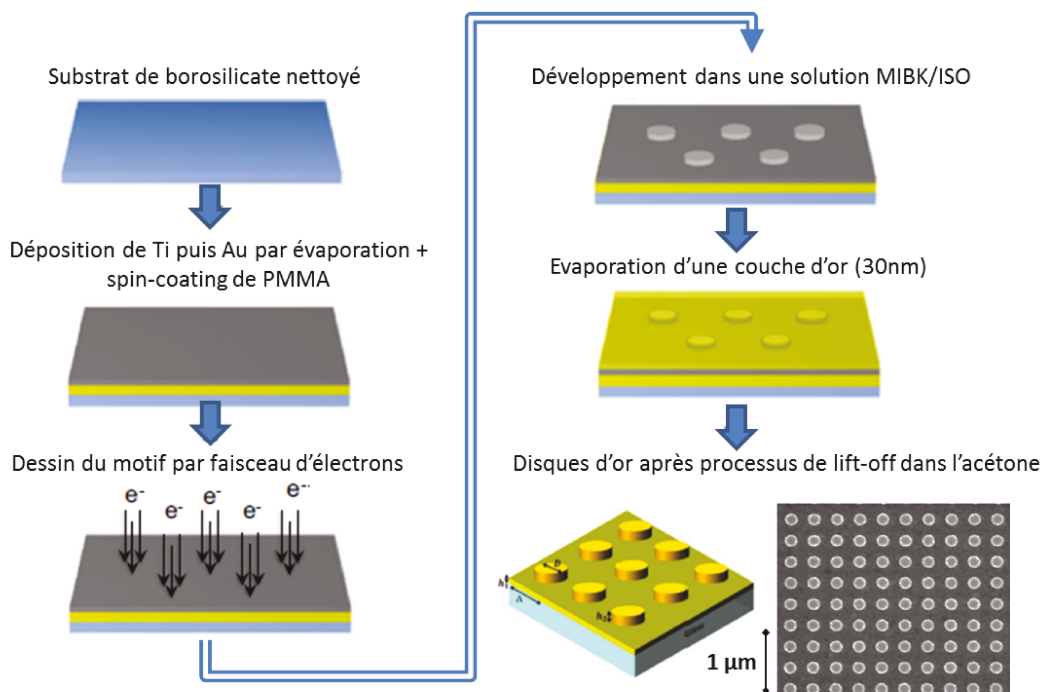


FIGURE 3.8 – Etapes du procédé de fabrication de nanostructures par lithographie électronique (schéma adapté de l'article [Bryche 2015]). L'image MEB d'un substrat final de période 400 nm et de diamètre 200 nm est présentée.

La lithographie électronique est la méthode la plus adaptée à la mise au point et à l'optimisation des nanostructures sur un petit nombre d'exemplaires de substrats de test. Toutefois, une production de masse de ces pièces servant de consommable dans l'appareil final n'est pas envisageable avec cette méthode. Le bâti de lithographie est partagé entre les différents membres du laboratoire, et ne peut donc être monopolisé plus de quelques heures par semaine pour un projet donné, sachant qu'il faut compter environ 24h pour lithographier une dizaine de substrats. De plus, le coût d'utilisation de la machine n'est pas compatible avec le coût de revient raisonnable d'un consommable (une centaine d'euros pour une biopuce SPR commerciale standard). Il faut compter environ 400 euros pour 1h de lithographie, soit 800 euros pour un substrat nanostructuré tel qu'il a été défini pour le projet, sans compter le reste de la fabrication et la fonctionnalisation chimique.

Pour diminuer le coût et le temps de fabrication des substrats nanostructurés, une méthode par nano-impression, ou UVNIL (Ultra-Violet NanoImprint Lithography) est en cours de développement. Cette technique nécessite de disposer d'un moule transparent qui va jouer le rôle de tampon [Barbillon 2010, Zhou 2011].

En soft-UVNIL, ce moule est structuré à partir d'un moule mère en silicium. Le moule mère est fabriqué par lithographie électronique. Le même procédé que celui présenté précédemment

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

est mis en œuvre jusqu'au développement de la résine. Ensuite, une étape de gravure du silicium vient transférer les motifs de la résine vers le moule mère. Ce moule mère peut alors donner naissance à une dizaine de moules filles en PDMS (polydiméthylsiloxane), eux-mêmes utilisables chacun une dizaine de fois. Le PDMS est un polymère souple et transparent. Le moule de silicium est déposé sur le PDMS qui est ensuite durci par cuisson.

Le nombre d'impressions est limité car il est difficile de nettoyer en profondeur les moules, dont les orifices s'encombrent au fur et à mesure des applications. De plus, leur qualité se dégrade à chaque utilisation (perte de résolution et présence de poussières).

En hard UVNIL, le moule transparent est construit en verre, suivant le procédé de fabrication du moule de silicium utilisé en soft UVNIL. Ce moule de verre est directement utilisé pour imprimer les substrats, au même titre que le moule de PDMS en soft UVNIL. Cela signifie que le moule de verre produira une dizaine de substrats avant d'être trop dégradé.

Une fois le moule préparé, le procédé décrit en figure 3.9 est appliqué.

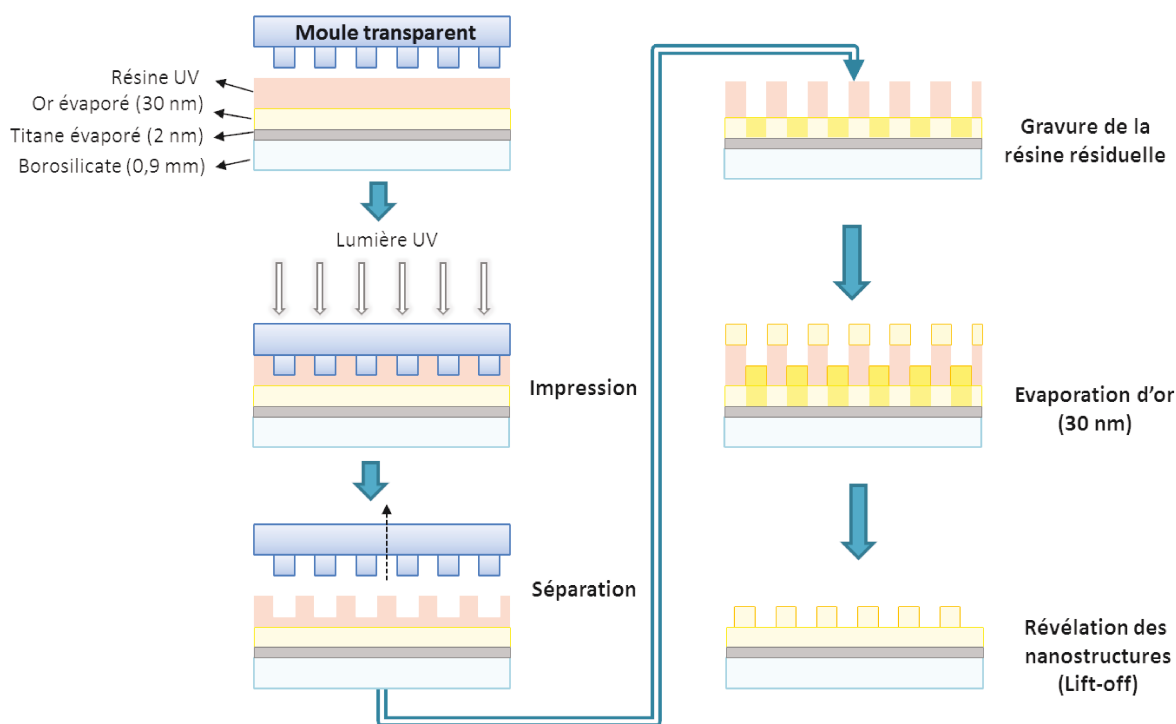


FIGURE 3.9 – Etapes du procédé de fabrication de nanostructures à haut débit par nano-impression (UVNIL).

Une résine photosensible est déposée par spin-coating sur un substrat en borosilicate sur lequel une couche de titane et une couche d'or ont été préalablement déposées par évaporation. Puis le moule est positionné au-dessus du substrat dans une presse et mis en contact avec la résine, qui prend la forme du moule. Le moule est maintenu sur la résine lors de l'insolation par une source UV qui durcit la résine par le phénomène de réticulation du polymère. Le moule est retiré, et la résine rendue solide est gravée afin de dégager la surface d'or. L'or est ensuite évaporé et la résine éliminée, de la même façon qu'en lithographie électronique.

La technique UVNIL permet de s'affranchir de la lithographie dans une certaine mesure, puisque le moule principal est tout de même construit par faisceau d'électrons. Cependant, une lithographie produit environ 100 substrats en soft UVNIL, et 10 substrats en hard UVNIL.

Un des points les plus critiques de cette méthode de fabrication lors de l'utilisation d'une résine souple (soft UVNIL) concerne l'optimisation de l'épaisseur de la résine UV et la dimension des piliers. En effet, les piliers restants après gravure doivent être environ deux fois plus hauts que les nanodisques désirés afin que la résine puisse être éliminée efficacement. D'un autre côté, si le rapport hauteur sur largeur des piliers du moule de PDMS est trop important, ceux-ci s'effondrent et le moule devient inutilisable. Le remplissage du moule mère pose également problème : d'une part, si les orifices du moule sont trop petits, la viscosité du PDMS l'empêche de s'étaler, et d'autre part, si le rapport hauteur sur largeur des trous atteint un certain seuil, un phénomène complexe entre en jeu, l'effet fakir [Ran 2008], lié à la tension de surface du PDMS qui présente une résistance à s'étaler.

Plusieurs essais ont été réalisés à l'IEF afin de mettre au point cette méthode, et il n'a pas été possible de produire des structures de dimension inférieure à 300 nm de diamètre et 600 nm de période. En-deçà, le lift-off du moule de PDMS est mal réalisé.

Pour diminuer les dimensions de structures, il est alors nécessaire d'utiliser la technique Hard UVNIL qui donne une meilleure résolution. L'inconvénient de cette méthode porte sur la sensibilité accrue à la planéité du substrat initial. Si des irrégularités de surface sont présentes, le moule en verre se trouve incliné, ce qui donne des hauteurs de piliers de résine non uniformes lors de la séparation moule/résine. Il est alors difficile d'adapter la profondeur de gravure pour que l'or soit dégagé sur l'ensemble de la surface, tout en conservant une hauteur de pilier deux fois plus grande que celle des nanostructures. Une première tentative de nano-impression en diamètre 200 nm et période 400 nm a été réalisée. Le moule mère se révèle être uniforme au regard d'images MEB. Le substrat résultant a été analysé par mesure SPRI. Les modes attendus par la théorie sont retrouvés. Cependant, une caractérisation SERS par dépôt de thiophénol ne dévoile pas de signal. Des tests supplémentaires n'ont pas pu être effectués pour le moment pour cause de panne (février 2016) suivie d'inondations (juin 2016) qui ont rendues la salle blanche non utilisable pendant plusieurs mois. A ce jour (octobre 2016), le niveau de propreté de la salle n'a pas encore été retrouvé.

Une piste pour amplifier la fabrication à l'échelle de production en masse est explorée en collaboration avec l'entreprise Silsef. Ils peuvent produire des moules de grande dimension (de l'ordre du m²) et ainsi imprimer sur une grande surface des substrats. La nanostructuration recouvrirait alors l'ensemble de la surface du substrat, ce qui simplifierait grandement l'immobilisation des molécules. Des tests sont en cours, en partenariat entre Silsef et l'IEF, freinés par les incidents survenus en salle blanche décrits ci-dessus.

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

A ce jour, l'avancement du projet dépend fortement de l'approvisionnement en substrats nanostructurés. En effet, la validation de l'instrument bimodal SPRI/SERS sur des expériences modèles d'intérêt biologique ne peut avoir lieu sans la disponibilité d'un grand nombre de substrats pour pouvoir tester des conditions expérimentales variées. De même, la viabilité de l'instrument en tant que système industrialisable ne pourra être assurée si la production des substrats est limitée.

3.1.4 Caractérisations expérimentales des substrats nanostructurés

Les simulations numériques ont permis de définir une forme de substrat composé d'un réseau de nanodisques d'or sur film d'or supportant à la fois un mode localisé et un mode propagatif, ingrédients nécessaires pour une mesure SERS et une mesure SPRI respectivement. Ces types de substrats sont fabriqués dans un premier temps par lithographie électronique, dans une perspective de production de masse par nano-impression.

Pour s'assurer de la fonctionnalité de ces substrats, des caractérisations SERS et SPRI sont effectuées.

3.1.4.1 Réponse électromagnétique

La façon la plus directe de caractériser un substrat afin de valider la fabrication consiste à observer son état de surface au microscope à balayage électronique (figure 3.10.a). Ensuite, une mesure SPRI permet de vérifier la présence des modes prédits par la théorie, ce qui confirme à la fois la pertinence du code de calcul et la validité de la méthode de fabrication. Ces deux caractérisations sont par exemple effectuées sur des structures de période 400 nm et de diamètre 200 nm. Les résultats de la figure 3.10 montrent une bonne uniformité des disques sur l'image MEB de gauche. Une comparaison entre cartes de réflectivité angulo-spectrales simulée et mesurée sur le banc SPRI du LCF (figure 3.10.b) révèle la concordance entre théorie et expérience. Le mode hybride (HLP) est présent à la position calculée de façon théorique, avec un léger décalage de la branche HLP inférieure. Le contraste de réflectivité est plus faible expérimentalement du fait d'éventuels défauts de périodicité ou de forme du réseau, et des épaisseurs des couches qui peuvent différer légèrement par rapport à la théorie.

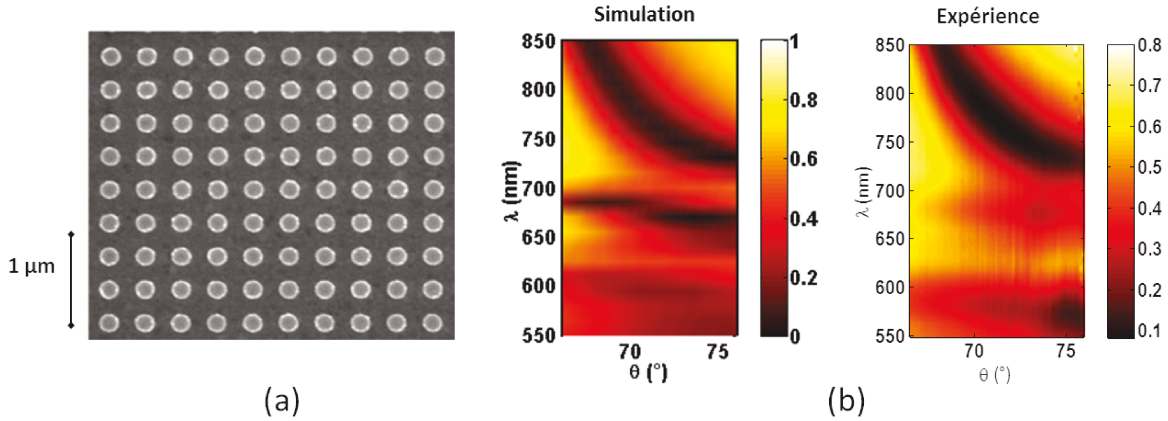


FIGURE 3.10 – Validation du procédé de fabrication et des calculs numériques par caractérisation SPR [Sarkar 2015b] pour des nanostructures de hauteur 30 nm, de période 400 nm et de diamètre 200 nm : (a) Image MEB, (b) Nappe de réflectivité SPR en fonction de l’angle et de la longueur d’onde.

3.1.4.2 Performances SERS

Un bilan des principales caractéristiques SERS des substrats est dressé dans ce paragraphe. Il n’est que partiel, ces travaux faisant l’objet de la thèse de Raymond Gillibert. Les résultats présentés proviennent en majeure partie de deux articles de Jean-François Bryche, doctorant à l’IEF, qui a effectué des caractérisations SERS en collaboration avec Raymond [Bryche 2015, Bryche 2016b].

Les calculs de la partie 3.1.3 indiquant une diminution du signal SERS suite à l’ajout du film d’or de 30 nm supportant les nanostructures est réfuté par la mesure du spectre SERS du thiophénol, molécule standard de caractérisation SERS car de grande section efficace. Il est montré qu’un gain d’un ordre de grandeur est obtenu lors de l’acquisition du spectre du thiophénol déposé sur un réseau d’or sur or par rapport à la mesure sur réseau d’or sur verre [Bryche 2016b], et ce pour plusieurs combinaisons de diamètres D et périodes P des nanoparticules ($D = 110$ nm pour $P = 200 / 250 / 300$ nm et $D = 210$ nm pour $P = 300 / 350 / 400$ nm). Un exemple de spectre mesuré pour une période de 400 nm et un diamètre de 210 nm est tracé en figure 3.12a pour les deux types de réseau (avec (1) et sans (2) film continu). Ce spectre est comparé à celui mesuré sur or sans particules (3) et sur verre (4). Aucun spectre n’est visible sur or et verre sans nanostructures, confirmant le pouvoir d’exaltation des structures fabriquées. De plus, l’amplitude des pics caractéristiques du spectre du thiophénol est multipliée par 10 lorsque le film d’or continu est présent en-dessous des nanostructures.

A noter que ce gain ne s’explique pas facilement par une augmentation de la surface d’or disponible. En effet, le champ électrique entre les nanostructures est quasi nul. La simulation de l’intensité du mode hybride d’un nanodisque de diamètre 50 nm normalisée par l’intensité incidente de la figure 3.11 démontre que la chute d’intensité est très rapide : à une dizaine de nanomètres d’éloignement de la particule, l’intensité diminue déjà de plus de deux ordres de grandeurs. Par conséquent, le film d’or à cet endroit ne contribue pas au signal SERS. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ce surprenant résultat expérimental : un effet

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

de réflectivité du film d'or sous-jacent et un couplage de la lumière incidente avec le plasmon propagatif. D'une part, le film d'or permettrait de réfléchir une partie de l'émission Raman des molécules vers l'objectif. D'autre part, le fait d'utiliser un objectif de microscope ouvert à 0,7 fait qu'une partie de la lumière incidente arrive avec des angles élevés, et donc potentiellement suffisants pour exciter un mode plasmon dans la couche d'or. Ces différentes possibilités sont encore à l'étude et ce phénomène ne peut être expliqué de façon définitive à ce jour.

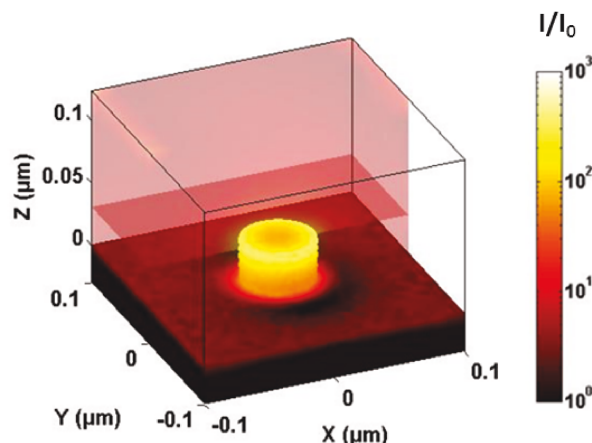


FIGURE 3.11 – Simulation de l'intensité du champ électrique du plasmon hybride sur un nanodisque de diamètre 50 nm normalisée par l'intensité incidente.

De plus, le facteur d'exaltation SERS propre à des structures de diamètre fixé à 110 nm et de périodes de 150, 200, 250 et 300 nm est déterminé expérimentalement comme le rapport de l'intensité SERS et l'intensité Raman (obtenue en solution, sans exaltation) respectivement normalisées par le nombre de molécules excitées [Bryche 2015]. Ce facteur d'exaltation est proportionnel au signal SERS calculé par l'équation (3.1). Les résultats sont donnés en figure 3.12b et confirment que la facteur déterminant l'amplification du signal SERS est la densité des nanodisques, et donc leur proximité, observations également obtenues du point de vue théorique.

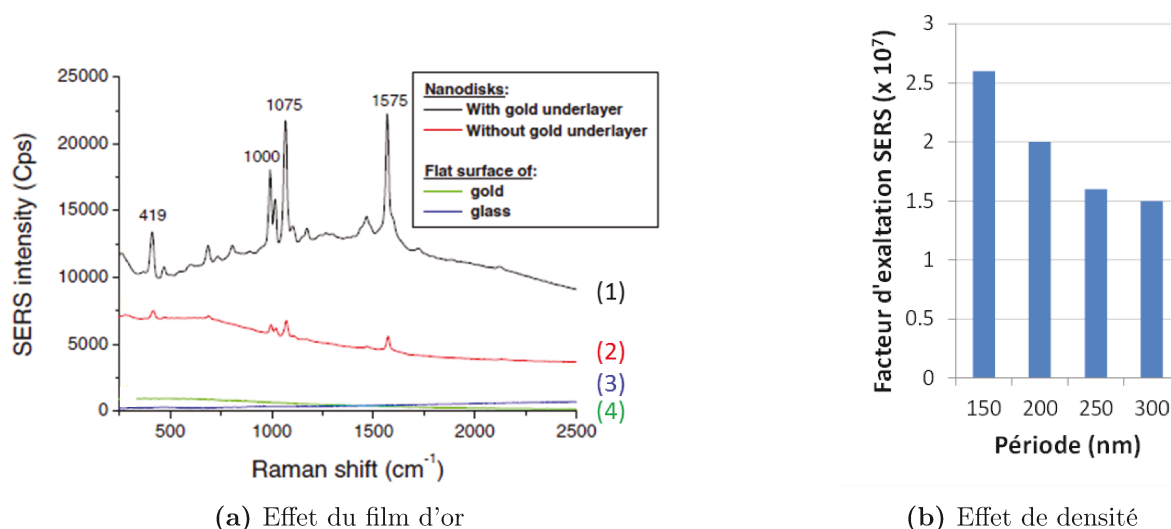


FIGURE 3.12 – (a) Signal SERS de la molécule de thiophénol avec une excitation à 660 nm pour un réseau de nanodisques d'or de diamètre 210 nm et de période 400 nm sur film d'or (1) et sur verre (2), et pour des surfaces planes d'or (3) et de verre (4) [Bryche 2016b]. (b) Valeur expérimentale du facteur d'exaltation SERS pour un diamètre de 110 nm et 4 périodes (150 / 200 / 250 / 300 nm).

3.1.4.3 Performances SPRI

La sensibilité de détection d'un substrat nanostructuré de période 400 nm et diamètre 200 nm a été confrontée à celle d'un film d'or d'épaisseur 50 nm utilisé classiquement pour les mesures SPRI sur une interaction ADN/ADN. Pour réaliser ce test, un substrat a été spécialement conçu à l'IEF : il est composé d'une moitié nanostructurée suivant une matrice de 6 lignes et 5 colonnes de zones carrées de côté 400 μ m comprenant le réseau de nanodisques de hauteur 30 nm sur un film d'or de 30 nm, et d'une moitié recouverte d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur (voir figure 3.13).

Le substrat est envoyé à l'INL à Lyon pour fonctionnalisation. La chimie de surface déposée sur l'or est un mélange de deux chaînes thiolées constitué de 40% de EG₆COOH et de 60% de (CH₂)₁₀Me . Cette chimie est le fruit d'une optimisation qui est présentée en paragraphe 3.2.3 ci-après. Les mêmes sondes sont déposées sur partie d'or continu et sur partie nanostructurée suivant le schéma présenté en figure 3.13. L'hybridation ADN/ADN étudiée fait intervenir une séquence de calibration complémentaire des sondes 1 à 4 résumées dans le tableau de la figure 3.13, à savoir les séquences M470vWT et MT et HPA1 a et b décrites dans le tableau 3.14. Un espaceur de 3 codons T est intégré à cette séquence pour éloigner la séquence d'intérêt de la chimie de surface à terminaison amine (NH₂). En rouge il s'agit de la séquence de calibration.

La sonde 5, l'aptamère MnSOD, a été déposée pour tester une autre interaction, non décrite ici. Deux types de contrôles sont intégrés : des plots dits de référence où seule une goutte de PBS 10x est déposée (T-buffer sur la figure 3.13) et d'autres avec immobilisation d'un aptamère non complémentaire de la cible injectée.

Une image de la biopuce 50/50 à 780 nm obtenue sur le banc du laboratoire LCF est visible sur cette même figure. A cette longueur d'onde, les zones carrées nanostructurées résonnent

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

(zones noires, pas d'intensité réfléchiée). L'or à 50 nm d'épaisseur sur le côté gauche de l'image résonne à 700 nm à l'angle fixé à 70° (choisi de façon à ce que la résonance sur nanostructures soit inférieure à 800 nm pour rester dans une plage de sensibilité de la caméra suffisante). Cette image permet de constater que la première ligne de la matrice nanostructurée et le début de la seconde sont abîmés. Les structures ne sont pas présentes à ces endroits à cause d'un défaut de fabrication.

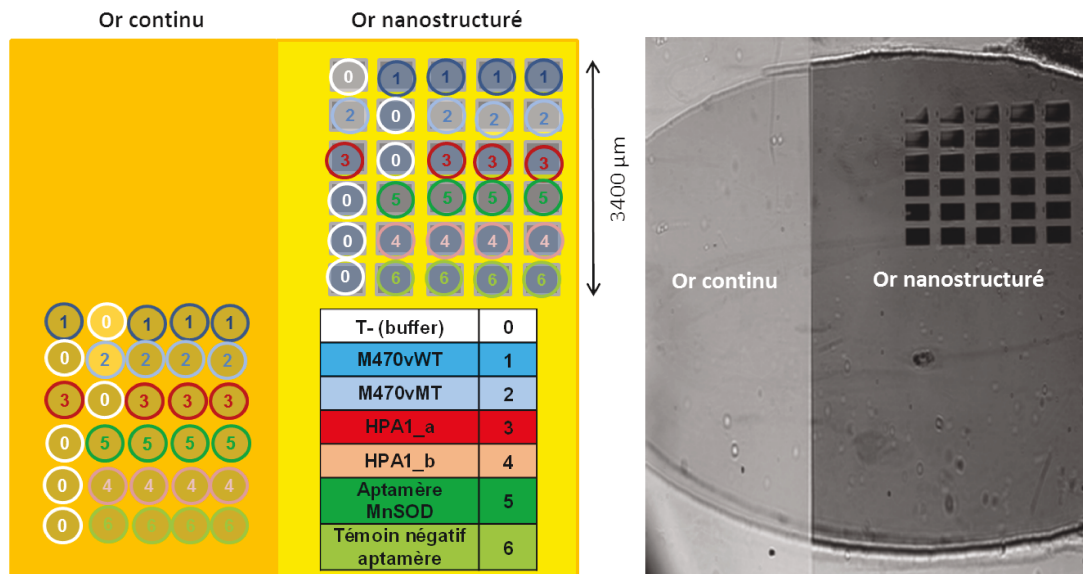


FIGURE 3.13 – Schéma et image SPRI à 780 nm de la biopuce réalisée pour comparer mesures sur or continu de 50 nm d'épaisseur et or structuré de nanodisques de période 400 nm, de diamètre 200 nm, de hauteur 30 nm sur film d'or de 30 nm d'épaisseur. Le tableau présente les différentes familles de sondes immobilisées sur les deux parties du substrat.

SONDES	SEQUENCE
M470vWT	5' NH2 TTT TTT TTT TGA CCG GTA TGC GTT CTA ATG ATG ATT A 3'
M470vMT	5' NH2 TTT TTT TTT TGA CCG GTA TGC GTG CTA ATG GTG ATT A 3'
HPA1_a	5' NH2 TTT TTT TTT TGA CCG GTA TGC GAG CCC AGA GGC 3'
HPA1_b	5' NH2 TTT TTT TTT TGA CCG GTA TGC GAG CCC GGA GGC 3'
CIBLE	SEQUENCE
calibration	3' AAA AAA ACT GGC CAT ACG 5'

FIGURE 3.14 – Description des séquences ADN des sondes s'hybridant avec la cible de calibration (la partie rouge est commune aux sondes et à la cible).

L'expérience SPRI est effectuée en mode de suivi de la position spectrale de la résonance. Pour sélectionner les longueurs d'onde appropriées à l'acquisition du signal à la fois sur or plan et

sur or nanostructuré, des plasmons spectraux sont enregistrés à l'angle de 70° . Ils sont présentés en figure 3.15.

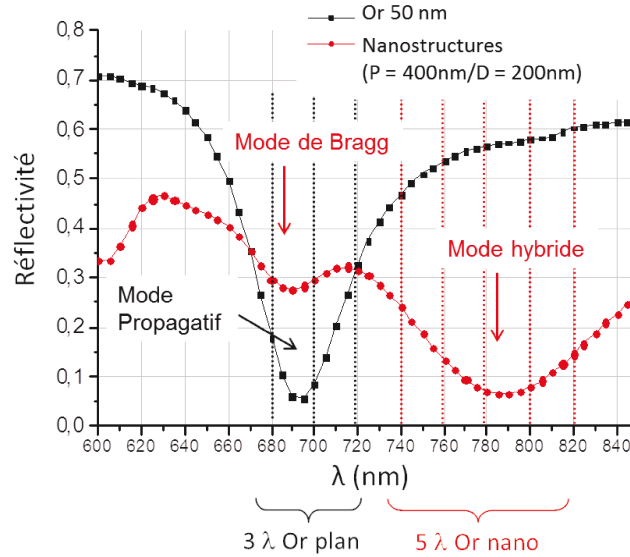


FIGURE 3.15 – Acquisition de profils spectraux de résonance à l'angle de 70° sur or plan d'épaisseur 50 nm et or structuré de nanodisques de période 400 nm et diamètre 200 nm. Les lignes verticales en pointillés pointent les longueurs d'onde choisies pour l'acquisition par suivi spectral des deux résonances.

Trois longueurs d'onde sont sélectionnées pour suivre le décalage du minimum de réflectivité de l'or plan (680 / 700 / 720 nm) et cinq longueurs d'onde réparties autour de la résonance du mode hybride sont choisies (740 / 760 / 780 / 800 / 820 / 840 nm), la résonance de ce mode étant plus large que sur or continu de 50 nm d'épaisseur. Le mode de Bragg est également visible sur la courbe de réflectivité, à la position de 690 nm environ. Le mode localisé se devine autour de 600 nm. Les résonances de ces trois modes à l'angle de 70° sont positionnées aux mêmes longueurs d'onde que celles calculées par la méthode numérique hybride dont les résultats ont été présentés en figure 2.16b page 75 sur une carte de l'évolution de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence. Cette observation confirme la bonne fabrication des nanostructures en terme de diamètre et de période.

Les signaux obtenus lors de l'interaction avec la cible de calibration à la concentration de 400 nM sont présentés en 3.16 sous la forme d'images de variations de réflectivité et de valeur du signal moyen sur chaque famille de sondes en terme de décalage spectral de la résonance sur les graphes. Le signal obtenu sur les plots de référence a été soustrait au signal moyen de chaque famille. Les barres d'erreur représentent l'écart-type du signal sur l'ensemble des plots d'une famille donnée.

Le signal en décalage spectral de la résonance est quasiment nul sur les plots d'aptamère MnSOD et de contrôle négatif, ces séquences ne possédant pas de séquence de calibration. Les signaux sur les autres sondes présentant la séquence de calibration sont très similaires d'une famille à l'autre, de l'ordre de 500 pm sur or continu d'épaisseur 50 nm, et de 700 pm sur nano-

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

structures. Cette légère différence de signal n'est pas due à une meilleure sensibilité intrinsèque des nanostructures mais simplement à l'écart entre les longueurs d'onde de résonance de chaque configuration (690 nm pour or plan et 790 nm pour nanostructures). En effet, la sensibilité des biopuces SPR augmente lorsque la longueur d'onde de travail augmente (voir la figure 3.1 page 131). Il est à noter que l'intensité des signaux en variation de réflectivité visualisés sur la partie or continu est environ deux fois plus forte que sur or structuré car le profil de résonance est plus étroit sur or plan. La pente à 680 nm sur or plan est plus forte qu'à 740 nm sur nanostructures, ce qui explique la différence de signal sur les images.

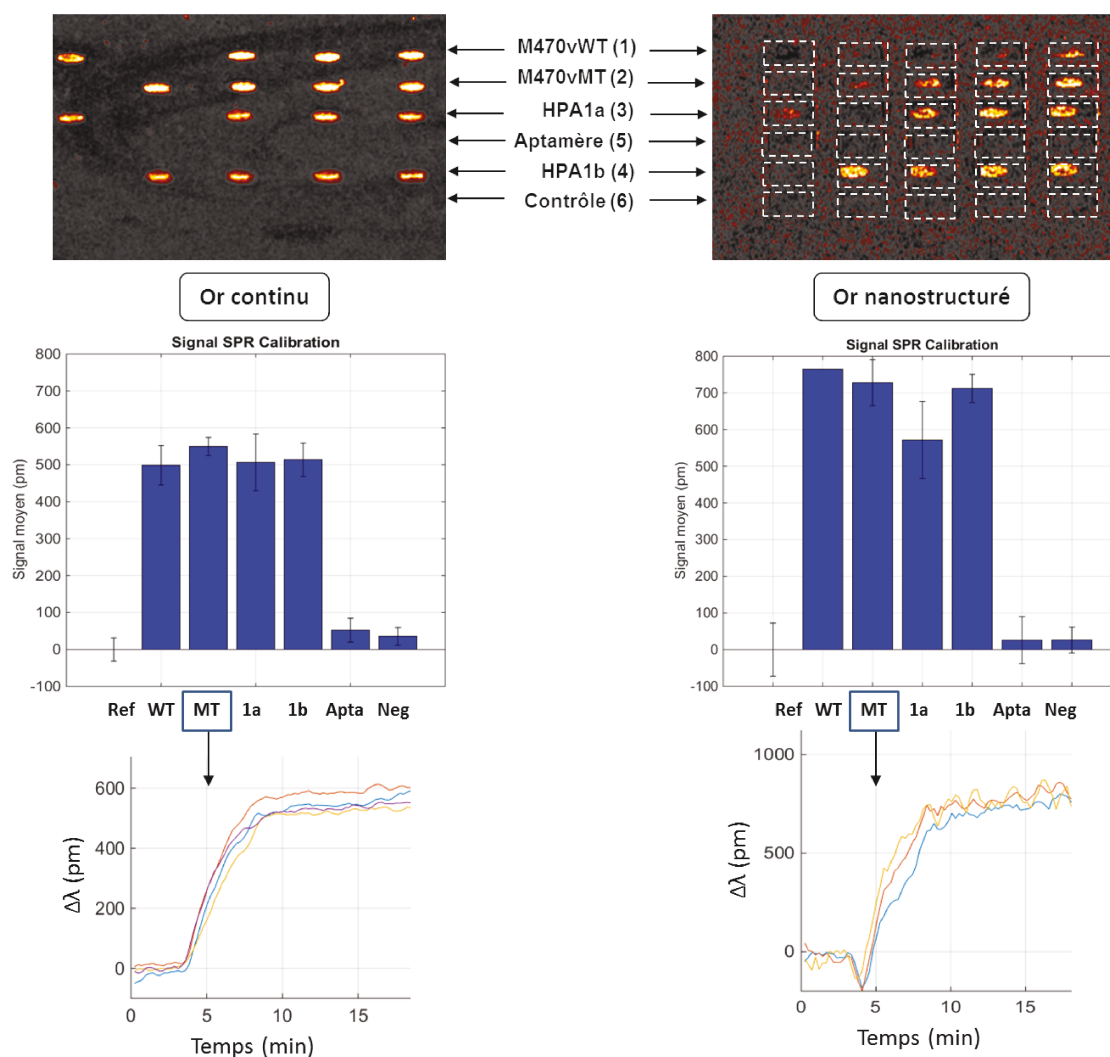


FIGURE 3.16 – Résultats de l'expérience de comparaison or plan / or nanostructuré : images de variations de réflectivité (respectivement à 680 nm et 740 nm) et signaux en décalage spectral de la résonance suite à l'hybridation d'une séquence de calibration. Les zones structurées sont encadrées de pointillés blancs. Les cinétiques d'interactions entre plots de sondes MT et calibration sont également présentées.

Cette expérience SPRI sur le modèle d'une interaction ADN/ADN démontre que la sensibilité par mesure de décalage spectral de la résonance obtenue sur or nanostructuré (nanodisques de période 400 nm et diamètre 200 nm) est du même ordre de grandeur que celle sur or continu d'épaisseur 50 nm, substrat standard de SPRI. De plus, ces résultats valident la chimie de surface utilisée (40% de EG_6COOH et 60% de $(\text{CH}_2)_{10}\text{Me}$), testée pour la première fois sur nanostructures.

3.1.4.4 Profondeur de pénétration

Un des principaux apports de la nanostructuration des substrats est le confinement du champ électrique autour des nanostructures. Cela se traduit par une profondeur de pénétration de l'onde évanescente réduite. Les simulations numériques donnent la répartition en intensité d'un nanodisque d'or sur film d'or excité par un plasmon propagatif (figure 3.17). Une exaltation d'un facteur 10^6 de l'intensité incidente est engendrée par l'excitation de la nanoparticule, avec une décroissance rapide de l'intensité suivant la direction perpendiculaire à la surface. La grandeur typique caractérisant cette décroissance est la profondeur de pénétration, évaluée autour de 30 nm. A titre de comparaison, l'or continu exhibe une profondeur de pénétration de l'ordre de 175 nm à $\lambda = 800$ nm.

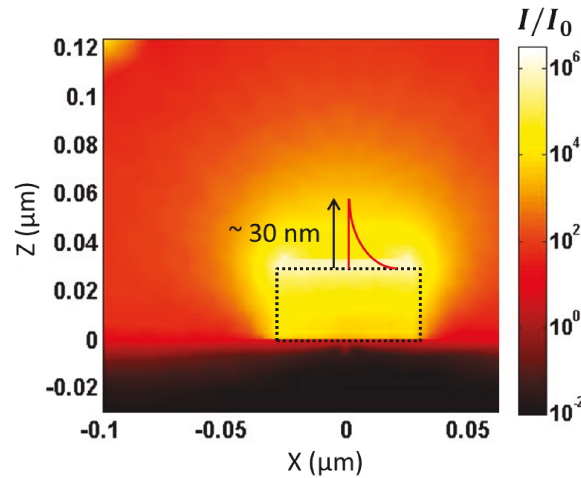


FIGURE 3.17 – Simulation de la répartition en intensité autour d'un nanodisque de 50 nm de diamètre sur un film d'or, normalisée par l'intensité incidente.

L'information de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente est primordiale lors du développement d'un biocapteur. Pour pouvoir sonder efficacement un changement d'indice induit par une interaction entre molécules, il est nécessaire que les molécules cibles se trouvent à une distance de la surface à laquelle l'intensité du champ évanescent est suffisante. En effet, la sensibilité de la mesure SPR est proportionnelle à l'amplitude du champ électrique [Chamtouri 2014a].

Nous avons donc cherché à vérifier expérimentalement la distance à laquelle le signal est

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

perdu, la valeur donnée par le calcul étant seulement une estimation de cette distance. Ainsi, le développement de la chimie de surface pourra être adapté à ce critère.

Pour y parvenir, un assemblage de multicouches de polyélectrolytes est déposé sur l'échantillon afin de mesurer l'évolution du signal en fonction de l'épaisseur de la couche déposée. Les polyélectrolytes sont des polymères possédant la propriété de s'ioniser dans un solvant. Deux polyélectrolytes de charge opposée sont sélectionnés : l'hydrochloride poly(allylamine) (PAH), chargé positivement, de poids 65 kDa, et le sel de sodium poly(styrenesulfonate) (PSS), de poids 75 kDa. Ces deux composés forment des liens électrostatiques entre eux lorsqu'ils sont mis en contact pour créer un film stable et d'épaisseur contrôlée. Le procédé de dépôt de multicouches est le plus souvent effectué ex-situ, à partir de bains alternant solution de PAH et solution de PSS, l'échantillon étant séché entre chaque étape. Les étapes de séchage réduisent la stabilité du film [Cornelsen 2010] et le retrait du substrat du banc de mesure après chaque analyse SPR perturbe le signal puisque le substrat ne se retrouve pas exactement dans la même position à chaque fois qu'il est positionné sur le banc.

Pour assurer une meilleure stabilité de la mesure, un procédé de dépôt in-situ sur le banc de SPR a été mis au point, à l'image des expériences de Nestler pour l'étude des interactions entre polyélectrolytes [Nestler 2012]. L'or étant naturellement chargé négativement, la solution de PAH, chargée positivement, est injectée dans un premier temps dans le système fluide de l'instrument de mesure pendant 4 minutes. Un rinçage de 5 minutes avec une solution saline est ensuite effectué avant d'introduire la solution de PSS. Ainsi, une première bicouche PAH-PSS est formée en milieu liquide. Cet enchaînement est ensuite réitéré autant que nécessaire. Le principe de dépôt est illustré en figure 3.18.

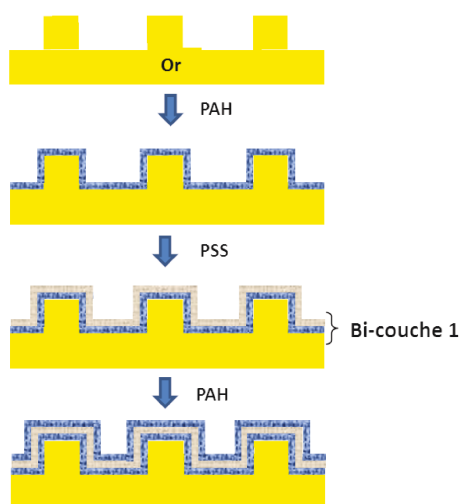


FIGURE 3.18 – Schéma de principe de dépôt d'un film de multicouches de deux polyélectrolytes successifs (PAH et PSS) sur or nanostructuré.

Cette méthode de dépôt est d'abord testée sur un substrat d'or continu d'épaisseur 50 nm afin de calibrer l'épaisseur d'une bi-couche et vérifier la reproductibilité du dépôt sur plusieurs événements de dépôt. Les solutions de polyélectrolytes sont préparées à une concentration de 3 mM dans un mélange d'eau ultra-pure et de NaCl à la concentration de 1M. Ces conditions sont

tirées de l'article de Nestler [Nestler 2012]. Six bi-couches PAH-PSS sont empilées, et la résonance angulaire est enregistrée après chaque dépôt d'une bi-couche sur une plage angulaire variant de 65° à 79° , avec un pas de $0,1^\circ$, à la longueur d'onde de 800 nm. La mesure révèle un décalage angulaire constant pour les 6 bi-couches déposées, illustré par le tracé des profils de résonance de la figure 3.19. En considérant un indice de réfraction de 1,5 à la température de 25°C pour les deux polyélectrolytes [Nestler 2012], une épaisseur moyenne de 7,4 nm par bi-couche déposée est calculée à partir de la méthode Rouard [Lecaruyer 2006]. Ces résultats confirment la faisabilité du protocole de dépôt in situ de bi-couches PAH-PSS d'épaisseur contrôlée et constante d'une bi-couche à la suivante.

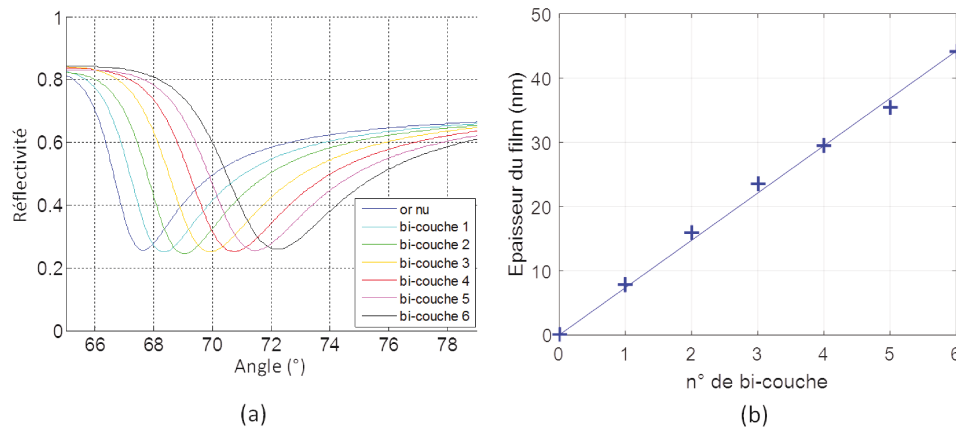


FIGURE 3.19 – (a) Profils angulaires de réflectivité sur or continu d'épaisseur 50 nm à 800 nm entre 65° et 79° mesurés après chaque dépôt de bi-couche, pour un total de 6 bi-couches. (b) L'évolution de la position angulaire de la résonance après chaque dépôt est traduite en évolution d'épaisseur totale du film de polyélectrolytes en considérant un indice de couche de 1,5.

Dans un second temps, le procédé de dépôt est appliqué sur un substrat nanostructuré afin de déterminer expérimentalement la profondeur de pénétration de l'onde évanescente créée à sa surface. Un film de polyélectrolytes d'épaisseur croissante est édifié sur un substrat composé de plusieurs types de réseaux de nanodisques, de diamètre 50 nm, et de période variant entre 200 et 400 nm fabriqué par lithographie électronique à l'IEF. Une plage de balayage angulaire a été choisie entre 67° et 79° pour l'acquisition des profils de résonance. Cette plage a été limitée à 12° par pas de $0,1^\circ$ en raison de la durée de l'acquisition d'un profil, de l'ordre de 30 minutes. Or, la position de la résonance dépend de la période du réseau. Il se trouve que cet intervalle angulaire n'était pas adapté à l'acquisition de la résonance pour des périodes inférieures à 300 nm. En effet, à partir de la troisième bi-couche, la résonance est positionnée au-delà de 76° , et une diminution de l'amplitude de la résonance est observée. L'angle d'incidence devient trop rasant pour exciter le plasmon. Pour pouvoir obtenir des résultats exploitables sur ces périodes de dimension inférieure à 300 nm, il faudrait refaire l'expérience en augmentant la longueur d'onde d'excitation de façon à réduire les angles d'incidence. Par conséquent, seuls les résultats obtenus pour les structures de période 400 nm et 300 nm seront présentés ici.

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

Un nombre total de 6 bi-couches est déposé sur le substrat nanostructuré. Il n'a pas été possible d'aller au-delà de cette valeur en raison de l'encombrement de la fluide : des résidus de polyélectrolytes et de NaCl se fixent sur les parois des tuyaux après chaque dépôt, jusqu'à les boucher complètement. Cette observation a été faite à deux reprises (le même phénomène s'est produit sur l'or continu lors de l'expérience d'étalonnage). L'épaisseur totale de film atteint donc près de 45 nm.

Des résultats surprenants sont mesurés pour des réseaux de période 300 nm et 400 nm. La résonance se décale de façon régulière jusqu'à l'épaisseur maximale de 45 nm comme le montrent les profils de réflectivité (a) et (b) de la figure 3.20 acquis après chaque dépôt, alors que la profondeur de pénétration de l'onde évanescente a été estimée à 30 nm théoriquement.

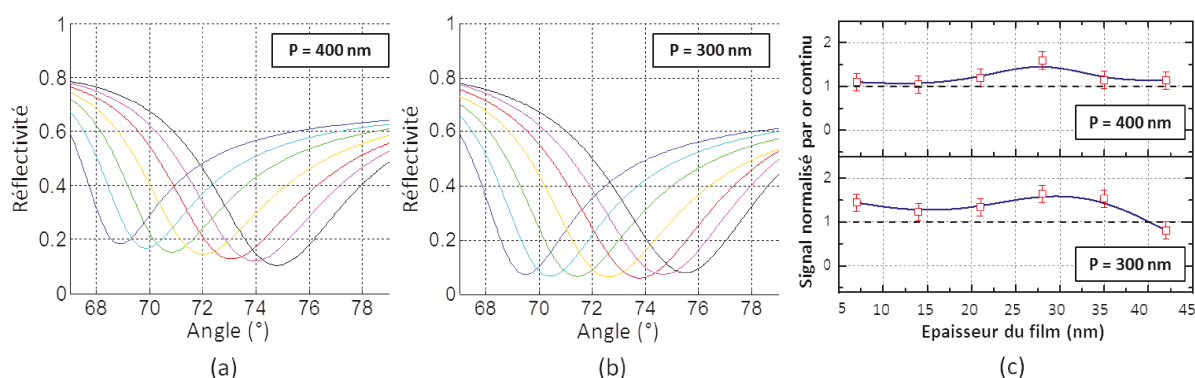


FIGURE 3.20 – Evolution de la position angulaire de la résonance pour des nanostructures de diamètre 50 nm et de période (a) 400 nm et (b) 300 nm au cours du dépôt de 6 bi-couches PAH-PSS (bleu : or nu à noir : 6^{ème} bi-couche). (c) Tracé du décalage angulaire mesuré après chaque adhésion de bi-couche sur les structures de période 400 nm et 300 nm normalisé par celui obtenu au préalable sur or plan d'épaisseur 50 nm.

Le décalage angulaire devrait diminuer de façon significative une fois la profondeur de pénétration dépassée. Ce signal est quasiment identique à celui mesuré sur or plan d'épaisseur 50 nm au vu du graphe (c) de la figure 3.20, représentant le décalage angulaire par bi-couche déposée obtenue sur les structures de périodes 400 nm et 300 nm normalisé par celui sur or plan mesuré lors de l'expérience de calibration de l'épaisseur des couches.

Ce comportement, au premier abord inattendu, a été expliqué en partie par des simulations numériques montrant l'évolution de l'intensité du champ normal à la surface sur une distance de 100 nm, pour différentes épaisseurs de film de polyélectrolyte. Les résultats sont tracés en figure 3.21.

Avant le dépôt de polyélectrolytes, sur or nu, le champ décroît de façon exponentielle à partir de la surface du nanodisque en s'enfonçant dans le milieu liquide. Cependant, en ajoutant une couche d'indice 1,5 sur le nanodisque, le champ est modifié de façon plus complexe que prévu : un palier se forme à l'intérieur de la couche moléculaire avant que le champ diminue en suivant une décroissance exponentielle. En émergeant de la couche d'indice 1,5, le champ peut même présenter un second plateau avant de continuer à décroître (cela est bien visible pour une épaisseur de couche de 16 nm). Le champ évanescent se déporte ainsi à l'interface

polyélectrolyte/eau, comme si la couche de molécules se comportait tel un guide d'onde.

Il n'y a donc pas de correspondance directe entre longueur de pénétration et épaisseur de couche biologique détectable, contrairement à l'idée simple que l'on trouve couramment dans la littérature. Le profil du champ évanescent n'est pas indépendant de ce qui se trouve au-dessus. Toutefois, en ce qui concerne la sensibilité aux perturbations d'indice dues par exemple à des fluctuations thermiques ou fluidiques, la vision classique reste valable : les échantillons nanostructurés seront beaucoup moins sensibles à ces perturbations que de l'or plan.

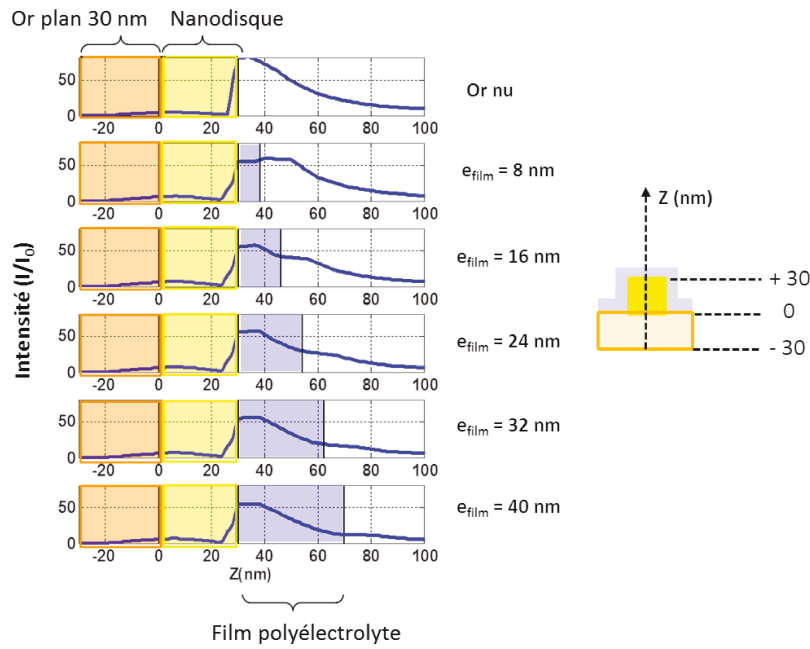


FIGURE 3.21 – Tracé de l'intensité du champ électrique à 800 nm le long de l'axe Z perpendiculaire à la surface du substrat, simulé pour un réseau de nanodisques d'or de période 300 nm après dépôt d'un film de polyélectrolytes d'épaisseur variable ($e = 0 / 8 / 16 / 24 / 32 / 40$ nm) sur une distance de 100 nm de la surface d'or continue. Le film d'or d'épaisseur 30 nm est positionné sur l'axe Z entre -30 nm et 0 nm. Le nanodisque est placé entre 0 et 30 nm. Le film de polyélectrolyte est modélisé par la tranche de couleur bleue, d'indice 1,5. Le milieu couvrant est de l'eau.

Cette expérience permet de conclure que bien que la profondeur de pénétration caractéristique des nanostructures étudiées soit de l'ordre de 30 nm, la détection SPR du dépôt d'une couche moléculaire reste possible au-delà de cette valeur, au moins jusqu'à 45 nm, épaisseur maximale de film de polyélectrolyte qui a pu être édifié in-situ sur le banc de SPRI du laboratoire. L'épaisseur de la chimie de surface se révèle être moins critique qu'imaginé en terme de mesure SPRI.

Toutefois, en ce qui concerne l'instrument bimodal, la distance à laquelle la cible se trouve de la surface d'or reste décisive à l'obtention de signaux SERS détectables.

3.2 Développement d'une biopuce bi-fonctionnelle

3.2.1 Intérêt d'un substrat bi-fonctionnel

La biopuce idéale imaginée dans le cadre du projet Piranex doit permettre de localiser préférentiellement l'interaction biomoléculaire au niveau des régions d'exaltation du champ électromagnétique. Cette problématique a été soulevée dans l'introduction en partie 1.2.3.2 page 36 par la présentation des travaux de Feuz et al [Feuz 2010]. Ils démontrent que la limite de détection est améliorée en SPRI par l'utilisation d'un substrat nanostructuré d'un réseau de trous couplée à une double chimie de surface qui fixe les molécules d'intérêt au niveau des flancs des trous, où le champ est le plus intense.

L'article de Chamtouri et al [Chamtouri 2014b] prouve que le signal SPR obtenu sur un réseau de nano-lignes d'or sur or est généré en majorité par les molécules localisées sur le dessus des lignes, région où le champ électrique est le plus confiné. Les molécules situées entre les lignes ne participent pas au signal. Par conséquent, il est judicieux de bloquer l'accès aux molécules à ces zones non sensibles, en déposant par exemple une couche de silice ou d'oxyde métallique à ces endroits. Ainsi, les molécules se localisent uniquement au niveau des points chauds de champ électrique. De cette façon, la surface où le greffage est autorisé diminue en comparaison à un film d'or continu. Un nombre de molécules cibles donné sera donc concentré sur une surface plus petite. La densification des molécules cibles est illustrée en schéma 3.22 par la comparaison entre le greffage de 3 unités de cibles sur or continu et sur or nanostructuré. Sur une unité de surface donnée, représentée en pointillés noirs, plus de molécules sont donc capturées avec nanostructuration et blocage par une couche protectrice des zones non utiles qu'avec un film d'or.

Le signal SPR, exprimé en masse par unité de surface, est ainsi plus élevé sur un substrat nanostructuré avec localisation des cibles au niveau des zones utiles que sur un substrat d'or continu, pour une même quantité de molécules. Par conséquent, la limite de détection est améliorée.

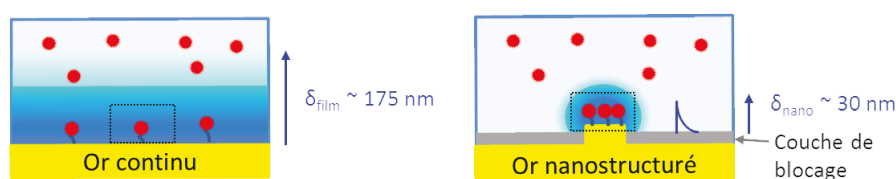


FIGURE 3.22 – Illustration de l'intérêt de la localisation des molécules cibles au niveau des zones de champ fort et du gain en limite de détection.

3.2.2 Fabrication d'un substrat bi-fonctionnel

Dans le cadre du projet Piranex, le matériau sélectionné initialement pour recouvrir l'or entre les nanodisques est la silice. Ce choix a été motivé par l'existence d'une double fonctionnalisation de surface développée par les partenaires de l'INL à base d'une couche auto-assemblée composée

3.2. Développement d'une biopuce bi-fonctionnelle

de chaînes silanes se liant spécifiquement à la silice, et de chaînes thiolées se fixant de façon covalente à l'or.

Plusieurs dépôts de silice ont été testés, d'abord sans nanostructures, directement sur or continu, mais sans succès. La silice n'adhère pas suffisamment à l'or. Un autre matériau est à l'étude, le silsesquioxane d'hydrogène (HSQ) en remplacement de la silice. Ce composé est utilisé comme résine photosensible dans le procédé de lithographie électronique. Une fois recuite, cette résine HSQ réorganise son réseau cristallin et ressemble à de la silice. L'idée consiste à déposer par spin coating la résine sur un substrat nanostructuré. Ensuite, elle est chauffée pour cristallisation puis gravée par méthode chimique sélective (RIE).



FIGURE 3.23 – Procédé de fabrication de la couche protectrice de résine HSQ par gravure chimique.

Ce procédé est maîtrisé par Clément Colin, en postdoctorat à l'Institut Interdisciplinaire pour l'Innovation Technologique de Sherbrooke (3iT). Clément a ainsi mis en oeuvre cette idée sur des substrats fabriqués dans un premier temps à l'IEF d'Orsay.

Les résultats sont très encourageants au regard des mesures AFM (figure 3.24) sur un substrat nanostructuré de nanodisques de période 200 nm et diamètre 100 nm dont l'espace les séparant est comblé de HSQ. Ces mesures ont été réalisées d'une part par topographie (résultats 3.24 a et c) et d'autre part par conduction (résultats 3.24 b et d), l'instrument de mesure permettant les deux modes d'analyse.

La mesure de la topographie du substrat est réalisée en analysant la déflexion d'un faisceau lumineux réfléchi par la pointe AFM sur une photodiode 4 quadrants. Lorsque la pointe se courbe au contact d'un obstacle, le faisceau est défléchi. Un profil topographique, extrait sur une droite tracée en vert et reporté en figure 3.24.c), révèle la présence de structures distantes de 200 nm, avec une profondeur mesurée autour de 3 nm. Seul le dessus des nanodisques affleure au-dessus de la couche de HSQ. La forme aplatie des pics présents sur ce profil est due à une saturation de l'intensité lumineuse mesurée. La résolution de l'image AFM dépend de la taille et de la forme de la pointe, large d'une trentaine de nanomètres, de l'ordre de grandeur du diamètre des structures, égal à 100 nm. L'image est alors le résultat de la convolution entre la pointe et le nanodisque. La pointe AFM est probablement éliminée, ce qui lui donne une forme triangulaire, que l'on retrouve donc sur les images AFM a) et b).

L'image b) a été obtenue par conduction : le substrat est déposé sur un support conducteur auquel une tension est appliquée (de l'ordre du Volt), et la pointe AFM est mise en contact avec la surface du substrat. Lorsqu'un courant est mesuré en sortie de pointe, cela signifie que le matériau est conducteur. Les zones brillantes de l'image correspondent à un matériau conducteur, de l'or dans le cas de ce substrat, et entre ces zones, aucun signal n'est mesuré. Le film d'or séparant les nanodisques est donc effectivement recouvert par la résine HSQ, isolante.

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

Le même type de substrat a été fonctionnalisé par chimie double (silanes et thiols) et des sondes ADN ont été immobilisées sur les zones nanostructurées dans le but de valider le procédé de fabrication et la chimie de surface par une mesure couplée SPRI/SERS sur le prototype. La double fonctionnalisation est composée de deux espèces : une chaîne PEG à terminaison silane pour une passivation de la surface de résine, et une SAM mixte à terminaison thiolée pour le greffage des sondes sur l'or (figure 3.25).

L'objectif consiste à vérifier que la limite de détection est améliorée par rapport à un substrat nanostructuré sans couche de résine. Cette expérience va être réalisée prochainement.

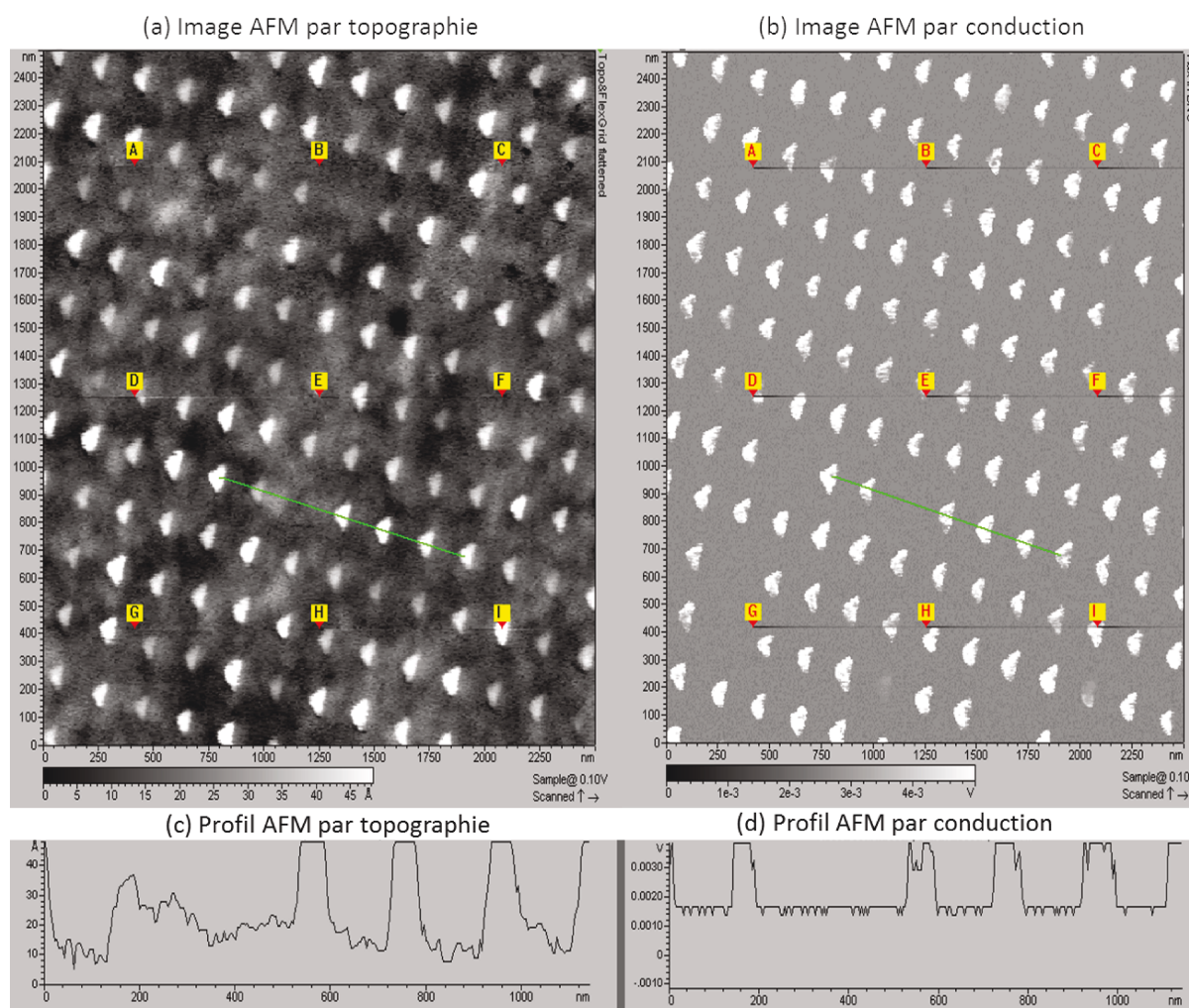


FIGURE 3.24 – Résultats d'une mesure AFM effectuée au LCF par topographie (a,c) et conduction (b,d) sur un substrat composé d'un réseau de nanodisques d'or de période 200 nm, diamètre 100 nm et hauteur 30 nm sur film d'or de 30 nm d'épaisseur, après dépôt d'une couche de résine HSQ. La mesure par topographie est exprimée en Angström tandis que la mesure par conduction est qualifiée en Volts. Les profils c) et d) sont extraits d'une section de l'image a) et b) respectivement, matérialisée par la ligne verte.

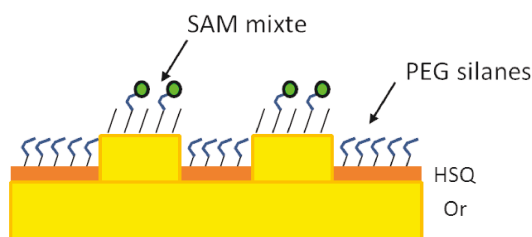


FIGURE 3.25 – Schéma de la double fonctionnalisation adaptée à un substrat bi-matériaux or/résine HSQ.

3.2.3 Optimisation de la chimie de surface pour interaction modèle de validation de l'instrument ADN/ADN

Dans un premier temps, les efforts se sont concentrés sur l'optimisation de la SAM mixte à base de deux thiols, l'un actif et l'autre non, servant de blocage de la surface d'or. Ces tests ont été effectués par un partenariat entre l'INL, en charge de la préparation de la fonctionnalisation, en particulier grâce aux travaux de Salomé Ansanay-Alex, ATER de l'Institut, et le LCF pour caractérisation SPRI sur le banc du laboratoire.

Les tests sont réalisés sur des substrats d'or continu pour commencer, avec un dépôt de 30 nm d'or (erreur de fabrication, 50 nm est l'épaisseur standard des biopuces planes). Une fois la chimie de surface déposée à Lyon, les substrats sont envoyés au LCF. Il reste alors à activer le groupement COOH accueillant la terminaison amine des molécules sondes ADN par un mélange NHS/EDC [Palazon 2014]. Après rinçage à l'eau, le substrat est prêt pour l'immobilisation des sondes à la concentration de 7 μM , réalisée au LCF. Il s'agit de la même séquence que celle utilisée dans l'expérience de caractérisation des nanostructures (3.1.4.3 en page 149), de référence M470vWT.

La biopuce est ensuite analysée sur le banc de SPRI. Pour commencer, la surface est passivée par injection d'une solution de BSA afin de limiter l'adsorption non spécifique des cibles. Puis une solution de cibles ADN complémentaires (les bases complémentaires sont repérées en bleu) est injectée dans le système de fluidique à la concentration de 0,2 μM , dont la séquence est la suivante :

► **Cible ADN** : 3' AGT GAA GAT TAC TAC TAA TAC CCT C 5'

Différentes combinaisons de SAM mixtes sont testées. Trois types de chimies sont développées, composées de deux espèces, l'une active (COOH) l'autre non (Me) :

- **Série 1** : un mélange d'hexa éthylène glycol à terminaison COOH au bout d'une chaîne carbonée thiolée (EG_6COOH) et de tri éthylène glycol à terminaison méthyle (EG_3OMe),
- **Série 2** : un mélange EG_6COOH et une chaîne courte de $(\text{CH}_2)_{10}\text{Me}$,
- **Série 3** : un mélange $(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ et $(\text{CH}_2)_{10}\text{Me}$.

Ces différentes séries sont dessinées en figure 3.26.

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

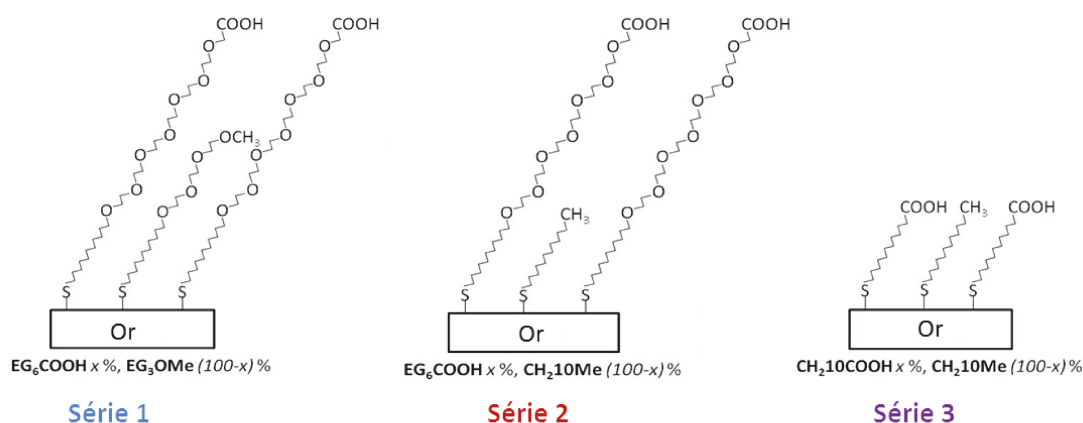


FIGURE 3.26 – Structure planaire des 3 séries de fonctionnalisation testées.

Au sein de chaque série, la proportion d'une espèce par rapport à l'autre varie entre 0 et 100 %. Les ratios mis en oeuvre pour chaque combinaison sont présentés dans le tableau de la figure 3.27. Les résultats obtenus en SPRI pour caractériser les performances de chaque configuration sont résumés sur le graphe de la figure 3.27. Pour chaque type de chimie, le signal SPR en variation de réflectivité est tracé. Ce signal est calculé comme la moyenne des signaux obtenus sur plusieurs plots biologiques à laquelle est soustraite le signal de fond, également reporté sur le graphe et appelé non spécifique. Il est ainsi possible d'analyser la spécificité de l'hybridation ADN sur ces différentes chimies.

En ce qui concerne la série 1, il peut être noté que le signal augmente avec la fraction de thiol -COOH, ce qui est logique puisque le nombre de sites de sondes augmente. Un effet de saturation apparaît à partir d'une proportion de 40% de COOH (le signal à 10% de COOH 1.C est seulement 3x plus faible qu'avec 100% en 1.A). Cela est dû à l'encombrement stérique qui rend des sondes trop proches inutilisables. Les signaux obtenus avec la seconde série sont beaucoup plus intenses, mis à part l'échantillon 2.B qui a peut être été confondu dans sa numérotation avec le 2.C. Cette forte amplification du signal, avec une faible non spécificité, pourrait être générée par un effet de moindre gêne stérique de la chaîne non active $(CH_2)_{10}Me$ par rapport à $(EG_3)OMe$. Les signaux obtenus avec la troisième série sont globalement plus intenses que ceux de la première série, mais inférieurs à ceux de la seconde. Les substrats 1.B et l'ensemble de ceux de la série 3 présentent des signaux non spécifiques, relevés en dehors des plots biologiques, environ 4 fois plus importants que les autres. Ces lames font partie d'un autre lot envoyé dans un second temps. Il est possible qu'une pollution ait dégradé la surface de la chimie lors du transport ou bien de l'étape d'immobilisation.

A noter que les lames utilisées lors de ces tests sont recouvertes d'une couche d'or d'épaisseur 30 nm, contre 50 nm généralement. Pour cette épaisseur de 50 nm d'or, la résonance plasmon est environ deux fois plus étroite, ce qui se traduit par une sensibilité en variation de réflectivité deux fois plus élevée. Par conséquent, les valeurs de signal obtenues sur l'ensemble de ces lames sont à doubler pour se ramener à des conditions expérimentales optimales et courantes (50 nm d'or). Un signal de 2% de variation de réflectivité est cohérent avec le signal moyen obtenu pour cette concentration de cibles sur chimie cystéamine, utilisée en routine pour la préparation des

3.2. Développement d'une biopuce bi-fonctionnelle

biopuces au LCF.

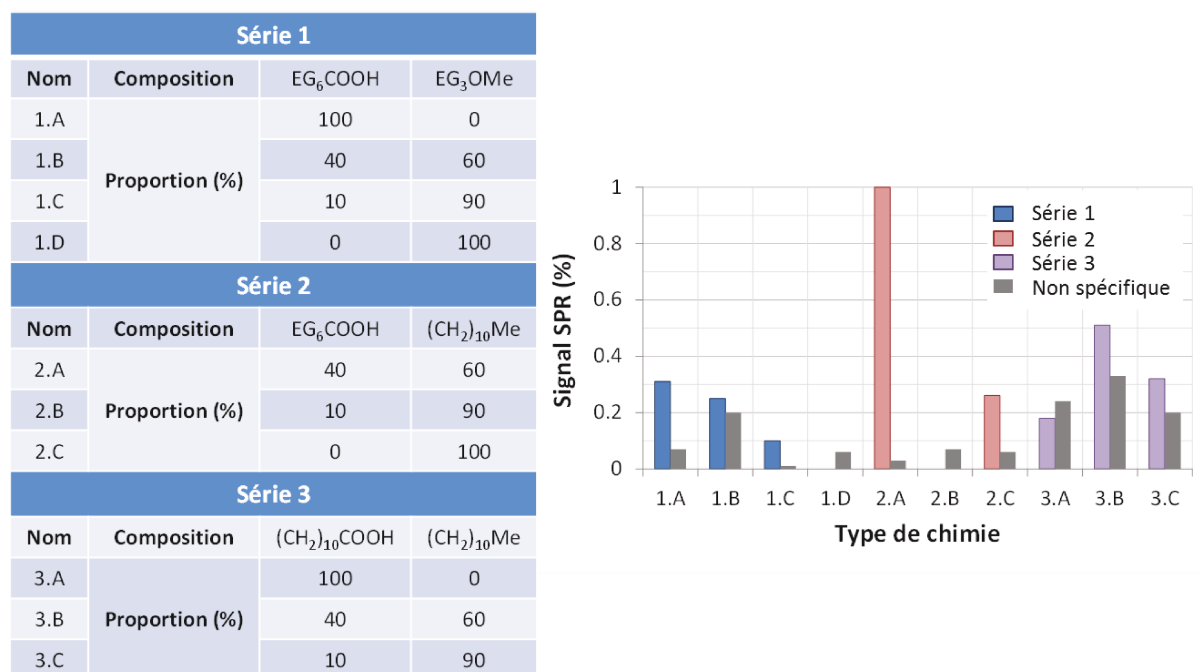


FIGURE 3.27 – Détail de la composition des différentes SAM testées sur substrat d'or continu de 30 nm d'épaisseur et résultats de caractérisations SPRI. Le signal non spécifique (barres grises) correspond à la variation de réflectivité mesurée en dehors des plots biologiques. Le signal SPRI est mesuré en variations de réflectivité et a été corrigé du bruit de fond par soustraction du signal non spécifique.

Les images d'un exemple de biopuce de chaque série sont présentées en figure 3.28. Elles permettent de s'apercevoir de la différence de taille des plots d'une série à l'autre : les plots des séries 2 et 3 sont nettement plus petits que ceux de la série 1. Il pourrait s'agir d'une différence d'hydrophobicité de la surface induite par le groupement (CH₂)₁₀Me qui est commun aux séries 2 et 3. Ainsi, lors de l'immobilisation, la solution s'étale moins, formant des plots de sondes plus denses. L'image de la lame 3.B illustre la présence de signaux non spécifiques plus importants que les lames 1.A et 2.A de part un bruit de fond hors des plots élevé.

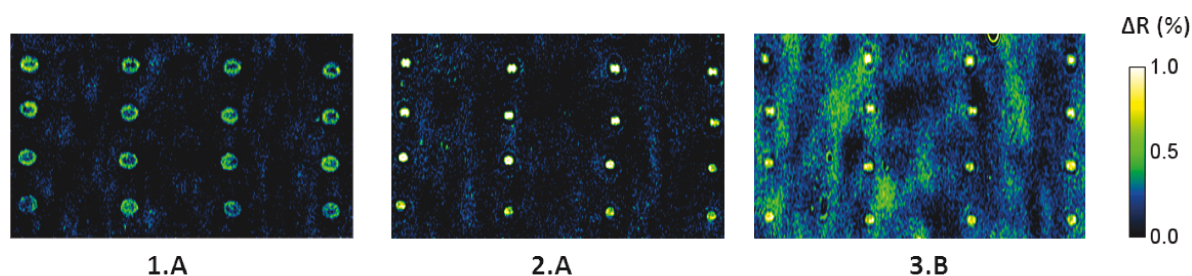


FIGURE 3.28 – Images des biopuces avec les fonctionnalisations 1.A, 2.A et 3.B en variations de réflectivité lors de la prise de la cible ADN.

En conclusion de ces caractérisations SPRI des performances de différentes combinaisons de 2 SAM thiolées, le couple EG_6COOH / $(\text{CH}_2)_{10}\text{Me}$ à la proportion de 40% et 60% respectivement est retenu pour la suite du projet de part la spécificité des signaux obtenus, la forte densité des sondes immobilisées, et l'intensité du signal en variation de réflectivité. De plus, l'ensemble des chimies testées se régénère très bien avec une solution à pH 11 mise en contact 5 min avec la biopuce.

L'expérience de caractérisation SPRI des nanostructures reportée en partie 3.1.4.3 page 149 confirme les performances de ce type de chimie sur or nanostructuré. La prochaine étape d'optimisation de la fonctionnalisation consiste à tester la double chimie de surface thiols / silanes sur substrat bi-matériau (or/HSQ).

3.3 Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

Des substrats nanostructurés de période 400 nm et diamètre 200 nm sont ainsi sélectionnés à ce stade du projet en raison des limites de fabrications rencontrées avec la technique de la nano-impression (UVNIL). Ils sont pour l'instant fabriqués par lithographie électronique, l'objectif étant d'atteindre ces dimensions en UVNIL.

Ces substrats fabriqués par lithographie ont été validés par des caractérisations SPRI et SERS. Les modes prévus par les calculs théoriques sont confirmés et la sensibilité SPRI à une mono-couche de molécules est mesurée au même ordre de grandeur qu'un film d'or standard. L'exaltation du signal SERS est également vérifiée.

Désormais, la validation de l'instrument bimodal peut avoir lieu grâce à ces substrats dont les performances ont été confirmées en SPRI et en SERS.

3.3.1 Définition d'une expérience modèle fiable

Une problématique est soulevée : avant de passer à des véritables biomodèles, comment qualifier l'instrument à partir d'une expérience unique à la fois en SPRI et en SERS ?

Il s'agit de définir une expérience simple donnant de forts signaux en SERS et en SPRI. Ce modèle doit être bien maîtrisé pour ne pas gâcher les substrats nanostructurés précieux dont la

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

fabrication a été compromise. Plusieurs tests ont été réalisés :

- la molécule de BSA, candidat d'utilisation facile car se fixe naturellement sur l'or et donne un signal SPR important, a été caractérisée en SERS. Malheureusement, son spectre n'est pas reproductible en SERS, et cette instabilité ne permettra pas de valider les mesures couplées SPRI/SERS en toute confiance. Sa section efficace Raman est par ailleurs faible, ce qui n'optimise pas la mesure SERS.
- la molécule de ribonuclease A, élément couramment employé en SERS car exhibe une section efficace importante, a été envisagée. Elle se fixe également de façon spontanée à l'or et donne un signal SPR facilement mesurable, mais de la même façon que la BSA, son spectre semble peu reproductible sur les échantillons au vu des tests effectués.
- la molécule de thiophénol, ingrédient standard pour les caractérisations de nanostructures en SERS au CSPBAT car un groupement thiol le compose et lui permet de se fixer durablement à l'or, et sa section efficace est très grande, a été testé sur le banc de mesure SPRI. Cependant, la présence de ce groupement thiol oblige à utiliser comme solvant l'éthanol pour éviter son hydrolise) ce qui rend une solution de thiophénol peu compatible avec le système de fluide de l'appareil SPRI. En effet, son caractère volatil le rend difficile à utiliser, en particulier lors du remplissage de la cellule fluide.

A la suite de ces tests, il a été conclu qu'une interaction ADN avec une cible marquée d'un agent impliquant un fort signal Raman serait plus adaptée à la validation de l'instrument car mieux maîtrisée. La première idée a porté sur le marquage de l'ADN cible par un groupement DNP (Dinitrophenyl) dont le cycle aromatique est très réactif en SERS. Une séquence cible d'ADN sur laquelle le DNP a été greffé est déposée à une concentration de 2 μM sur de l'or rugueux (6 nm d'or évaporé sur du verre puis bombardé avec un laser femtoseconde pour créer des irrégularités de surface). Lorsque la goutte a séché, un spectre SERS est acquis à la longueur d'onde d'excitation de 660 nm pendant 5 minutes de pose. La même mesure est réalisée pour la séquence originelle sans DNP. Les spectres sont présentés en figure 3.29. Les deux bandes repérées comme Groupe Nitro à 833 et 1372 cm^{-1} sont celle attendues en présence de dioxyde d'azote, qui compose le dinitrophenyl. Ces deux pics ne semblent pas exister sur le spectre de l'ADN d'origine, mais leur intensité reste faible devant l'intensité des autres pics constituant le spectre de la molécule.

Une seconde piste a été explorée avec l'utilisation d'un marqueur bien connu en fluorescence, la cyanine. Ce colorant a également été étudié en SERS pour ses propriétés d'absorption dans le rouge et proche infrarouge [Kneipp 1983, Yang 1985]. Son intérêt remonte à la photographie argentique pour son rôle de sensibilisateur. Malgré son rendement quantique de fluorescence élevé, il est possible de mesurer son spectre SERS. La cyanine a notamment été appliquée à la détection de cellules cancéreuses en SERS par le marquage d'anticorps spécifiques se fixant sur les cellules [Maiti 2011].

De plus, le greffage de cyanine sur des oligonucléotides est courant [Malicka 2003, Qi 2014] et des séquences marquées à la cyanine peuvent être commandées chez le fournisseur Eurogentec. Deux types de cyanines (Cy3 et Cy5) ont été testés. Dans un premiers temps, des séquences ADN marquées avec Cy3 et Cy5 à une extrémité sont déposées sur une lame d'or rugueux, sans chimie de surface particulière, et leur spectre SERS est mesuré de façon à vérifier leur réponse à une excitation laser. Cette mesure a déjà été présentée lors de la validation du prototype SERS

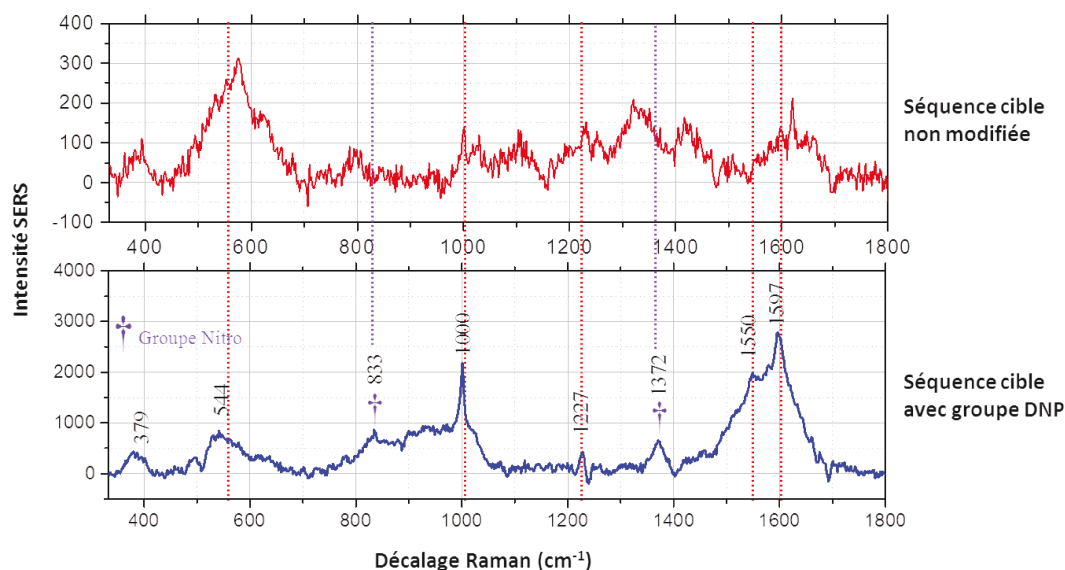


FIGURE 3.29 – Spectres SERS d’une séquence ADN avec et sans marqueur DNP, sur or rugueux, à la concentration de 2 μM , pour une excitation laser à 660 nm, sur instrument Xplora commercial.

dans le chapitre 2 (voir page 125 la figure 2.51). L’intensité des pics mesurée sur le prototype du spectre de Cy5 est 3 à 4 fois plus grande que les pics du spectre de Cy3 à la longueur d’onde d’excitation de 638 nm. Cette différence de réponse entre Cy3 et Cy5 provient de leurs longueurs d’onde d’absorption différentes : Cy3 absorbe à 557 nm alors que Cy5 absorbe à 655 nm (voir les spectres d’absorption de la figure 2.50 en page 123). Un laser à 638 nm va exciter plus efficacement la cyanine dont la longueur d’onde d’absorption est proche de la longueur d’onde incidente. Par suite, il a été décidé de conserver le marqueur cyanine 5 pour les interactions ADN/ADN étudiées ultérieurement.

3.3.2 Présentation de l’expérience de validation

Les ingrédients nécessaires à l’expérience de validation du couplage SPRI/SERS consistent en :

- un modèle biologique défini : l’interaction ADN avec cible marquée Cy5 (figure 3.30a),
- un substrat nanostructuré sur des zones carrées de côté 150 μm espacées de 150 μm organisées selon une matrice 5 par 5 : réseau de nanodisques d’or de hauteur 30 nm, de période 400 nm et de diamètre 200 nm déposé sur un film d’or d’épaisseur 30 nm, fabriqué par lithographie électronique (figure 3.30c),
- une chimie de surface sur or : fonctionnalisation auto-assemblée composée de deux chaînes thiolées, une chaîne active $(\text{EG})_6\text{COOH}$ à la proportion de 60% et une chaîne de blocage méthyle $(\text{CH}_2)_{10}\text{Me}$ à la proportion de 40% (figure 3.30b), choisie suite aux tests SPR présentés précédemment.

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

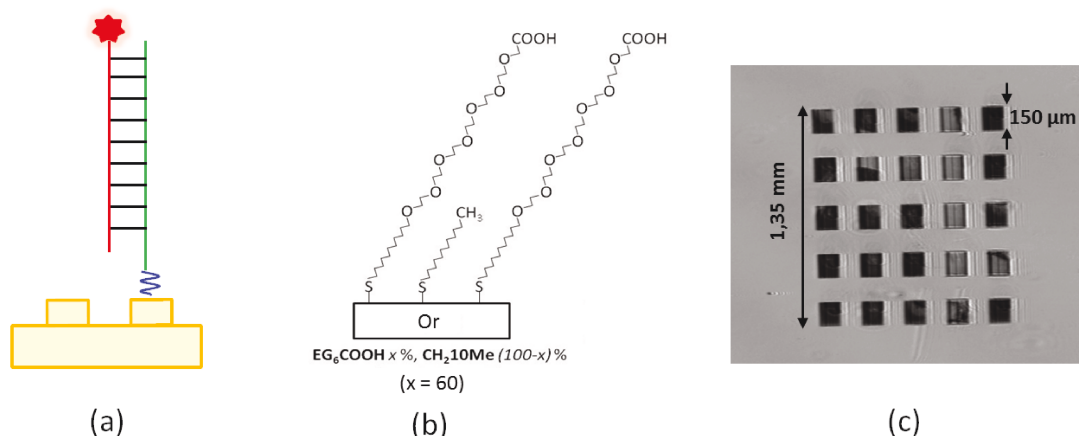


FIGURE 3.30 – Briques élémentaires pour une expérience couplée SPRI/SERS : (a) un modèle biologique capable de donner des réponses SERS et SPRI (cible ADN agrémentée du marqueur cyanine 5), (b) une fonctionnalisation de surface optimisée et (c) un substrat nanostructuré (image SPR sur le prototype à 800 nm en présence de PBS 2x dans la cuve).

L'image SPR de la biopuce nanostructurée de la figure 3.30 acquise sur le prototype avec un prisme LAK34 d'angle au sommet 20° à la longueur d'onde de 800 nm et à l'angle de 74° révèle que certaines zones ne sont pas résonantes (carrés clairs). Il peut s'agir d'un lift-off qui n'a pas bien fonctionné sur ces zones-là, laissant des résidus de résine qui modifient les conditions de résonance à ces endroits. La colonne 4 ne sera donc pas exploitable pour les mesures SERS et SPRI, ainsi que deux zones de la ligne 2 et une de la ligne 4.

L'immobilisation des sondes ADN est extrêmement délicate. En effet, les gouttes déposées par les systèmes d'immobilisation ont un diamètre de l'ordre de 150 μm , taille des zones nanostructurées. La précision de pointé doit donc être très grande pour que les gouttes tombent exactement sur les zones carrées. Un repère spatial en forme de croix de Lorraine à deux barres de tailles différentes a été gravé près de la matrice de zones pour pouvoir calibrer l'origine des axes de l'immobilisateur. Une caméra de visée est alors nécessaire pour localiser la croix. L'instrument d'immobilisation Horiba n'étant pas équipé d'une caméra, l'étape de greffage des sondes est réalisée à l'INL à Lyon qui dispose d'un système à injection sur lequel une caméra est montée.

Malgré toute l'attention portée à cette étape critique, les plots biologiques se trouvent légèrement décalés du centre des zones nanostructurées. Les images de la figure 3.31 permettent de constater ce décalage de l'ordre de la centaine de micromètres. L'image 3.31a est prise par une caméra placée au-dessus du substrat, éclairé par une LED blanche, en air. Cette image est en fait la juxtaposition de 6 images caméra mises bout à bout, le champ étant inférieur à la surface de la matrice de zones. Une grande quantité de débris recouvre la lame car celle-ci a dû être recoupée à la main, avec une pointe diamant à l'atelier d'optique du laboratoire pour pouvoir ajuster les zones au centre du champ de la caméra. En effet, une erreur de positionnement lors de la lithographie a décalé les zones de 2 mm environ du centre de la lame. Il a donc fallu rattraper ce décentrement en découpant un bord de la lame, ce qui a entraîné la projection de poussières

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

de verre sur l'ensemble de la lame. Sans cette découpe, il aurait été impossible d'atteindre la matrice de zones nanostructurées avec la course de réglage limitée des platines de translation de l'objectif de microscope Raman. Ces résidus de verre ont heureusement été nettoyés lors du remplissage de la cellule fluide en PBS. Seul un quart des zones nanostructurées sont recouvertes de sondes du fait de l'erreur de positionnement lors de l'immobilisation. Le décentrement des plots biologiques est également visible sur une image hors résonance à 760 nm prise par la caméra SPRI en figure 3.31b. Pour un premier essai d'immobilisation sur zones nanostructurées, le résultat est tout de même encourageant. Il suffira de corriger ce décalage lors des prochaines immobilisations. L'ajout d'un système d'illumination rasante a permis d'augmenter le contraste de l'image de la caméra d'immobilisation. De nouveaux tests montrent que le dépôt des gouttes est désormais centré sur les zones.

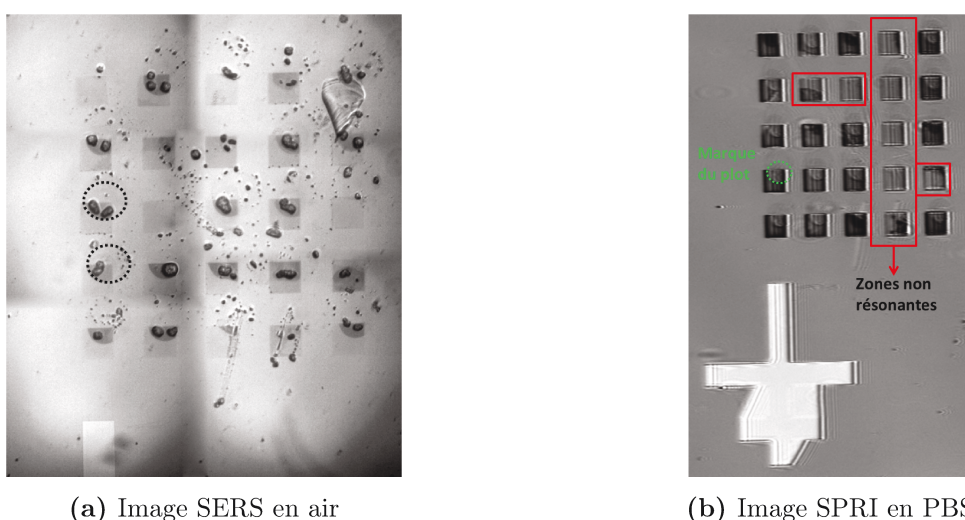


FIGURE 3.31 – Visualisation du décalage des plots de sondes immobilisés par rapport au centre des zones nanostructurées, (a) sur une image de la caméra présente dans le montage SERS, en air, et (b) sur une image SPRI à 760 nm à l'angle de 74° en PBS 2x. Les cercles en pointillés délimitent les plots biologiques.

Les signaux devront donc être extraits au niveau de ces coins de zones nanostructurées qui renferment des molécules sondes.

Cinq espèces sondes sont immobilisées à la surface de la biopuce :

- une référence constituée d'une goutte de PBS, jouant le rôle de contrôle négatif,
- une séquence modèle d'expérience ADN du LCF (M470vWT),
- la séquence mutée différant d'une seule base de la séquence sauvage précédente (M470vMT),
- une séquence codant l'antigène 1 de plaquette humaine (HPA1a), modèle d'expérience ADN de l'INL,
- et une séquence témoin à laquelle est greffée le marqueur cyanine 3 servant de second contrôle négatif.

Ces espèces sont détaillées dans le tableau de la figure 3.32 et localisées sur la biopuce par un schéma. Les chaînes de poly-T au niveau de l'extrémité 5' séparent la séquence sonde d'intérêt

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

de la surface de la chimie amine déposée sur l'or pour améliorer l'hybridisation. Le groupe de bases coloré en rouge commun aux sondes 1 et 2 est dédié à une interaction avec une séquence de calibration permettant d'évaluer l'homogénéité de l'immobilisation des sondes.

SONDES	N°	SEQUENCE
T- (buffer)	0	X
M470vWT	1	5' NH2 TTT TTT TTT TGA CCG GTA TGC GTT CTA ATG ATG ATT A 3'
M470vMT	2	5' NH2 TTT TTT TTT TGA CCG GTA TGC GTG CTA ATG GTG ATT A 3'
HPA1_a	3	5' GTG AGC CCA GAG GCA GGG NH2 3'
Témoin Cy3	4	5' GTG AGC CCT GAG GCA GGG Cy3 NH2 3'

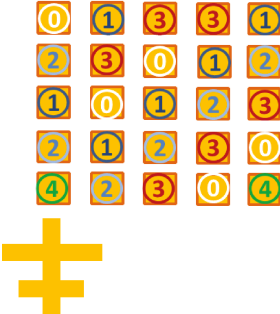


FIGURE 3.32 – Définition et positionnement des séquences sondes immobilisées sur les zones nanostructurées.

Les séquences cibles associées sont décrites dans le tableau 3.33. La séquence de calibration est disponible en deux exemplaires : l'un marqué en extrémité 5', appelé distal, l'autre en extrémité 3', appelé proximal. Le code de couleur permet d'associer les bases cibles aux bases sondes correspondantes.

CIBLES	SEQUENCE	d _{Cy5-chimie} (nb de bases)	d _{Cy5-or} (nm)
calib_proxCy5	3' Cy5 AAA AAA ACT GGC CAT ACG CGC GC 5'	3	3
calib_distCy5	3' AAA AAA ACT GGC CAT ACG CGC GC Cy5 5'	26	11
M470vWT_Cy5	3' Cy5 AGT GAA GAT TAC TAC TAA TAC CCT C 5'	18	8
M470vMT_Cy5	3' Cy5 AGT GAA GAT TAC CAC TAA TAC CCT C 5'	18	8
HPA1_a_Cy5	3' Cy5 C GCT CCA CTC GGG TCT CCG TCC CGG AC 5'	14	7

FIGURE 3.33 – Détail des séquences cibles marquées au niveau de leur extrémité 3 ou 5 avec une cyanine 5.

Pour visualiser plus simplement l'assemblage sonde/cible, l'hybridation de chaque couple est représentée en schéma 3.34. Une fois l'hybridation effectuée, la distance séparant le marqueur Cy5 de la surface est donc variable d'une cible à l'autre. Cette distance est évaluée en nombre de bases puis en nanomètres en considérant un écart de 0,34 nm entre paires de bases et en ajoutant environ 2 nm d'épaisseur de fonctionnalisation, dans le tableau 3.33. La calibration distale donne un marqueur Cy5 plus éloigné de la surface d'or que la calibration proximale (11 nm contre 3 nm respectivement), tandis que les autres cibles éloignent de 7 ou 8 nm le marqueur de la surface. Par ailleurs, la sonde témoin servant de contrôle négatif place le marqueur Cy3 au plus près de la chimie de surface, soit à 2 nm de la couche d'or.

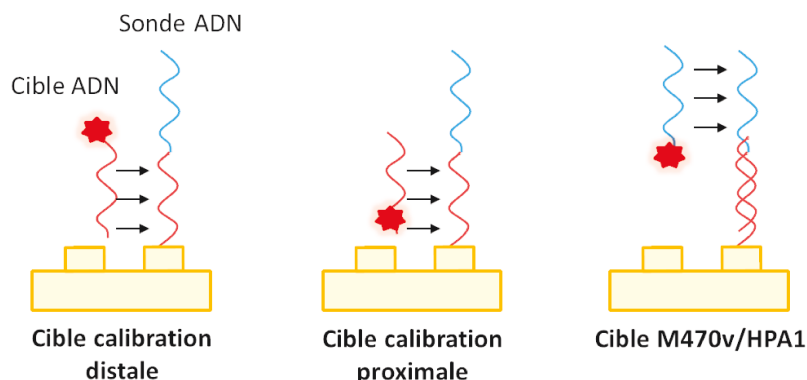


FIGURE 3.34 – Représentation des différents événements d'hybridisation possibles : avec une cible de calibration distale, proximale ou une autre cible (M470vWT, M470vMT ou HPA1a). Le marqueur Cy5 est modélisé par l'étoile rouge.

3.3.3 Résultats SERS

L'information de la distance à laquelle se trouve le marqueur Cy5 par rapport à la surface est primordiale pour la mesure SERS. En effet, le signal SERS diminue très rapidement lorsque la distance par rapport aux nanostructures augmente, avec une échelle caractéristique de l'ordre de la dizaine de nanomètres seulement. Une perte de 50% d'intensité SERS à une distance de 2 nm environ d'une surface métallique rugueuse a été mesurée par différents groupes [Compagnini 1999, Ye 1997], indiquant qu'à 10 nm d'éloignement de la surface, les vibrations SERS sont très peu excitées.

De plus, l'émission SERS est ici en compétition avec l'émission de fluorescence du marqueur. D'après les expériences de Malicka [Malicka 2003], l'intensité de fluorescence de la cyanine est la plus forte lorsqu'elle se trouve à une distance comprise entre 5 nm et 9 nm d'une surface composée de nanoparticules métalliques d'argent de diamètre 500 nm et hauteur 100 nm en moyenne. Le phénomène de quenching, c'est-à-dire de blocage de l'émission par fluorescence, se produit d'après ces mêmes travaux à une distance inférieure à 2 nm de la surface.

Mise à part la cible de calibration proximale, les autres cibles positionnent le marqueur précisément dans cette plage où la fluorescence est exaltée.

Pour commencer, des spectres sont acquis à 638 nm dans l'état initial de la biopuce, en PBS 2x, pour servir de référence. La figure 3.35 présente le spectre d'un plot sonde témoin muni de séquences marquées Cy3 et d'un plot sonde M470vWT. La ligne de base de ces spectres a été soustraite, et une normalisation par la valeur d'intensité maximale est effectuée. De nombreuses bandes sont repérées sur ces spectres, certaines visibles seulement sur le spectre du plot témoin, soulignées par des flèches en pointillés rouges, et d'autres communes aux deux plots, identifiées par des flèches en pointillés noirs. Pour comprendre l'origine de ces vibrations, les deux spectres sont comparés à un spectre mesuré sur un plot du substrat recouvert uniquement de la fonctionnalisation, et un spectre de test d'une séquence ADN marquée d'un Cy3 déposée à même un substrat d'or rugueux, acquis sur le prototype à 638 nm. Les bandes repérées en pointillés

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

rouge correspondent à des bandes présentes sur le spectre de la séquence Cy3 et ne sont pas présentes sur le spectre de la chimie de surface seule. A l'inverse, les pics repérés sur le spectre du plot sonde WT sont identiques à ceux du spectre de la chimie de surface seule. Cela signifie que les bandes enregistrées sur le plot sonde sont générées par les liaisons de la chimie de surface. D'autre part, le fluorophore Cy3 étant situé au plus près de la chimie de surface, à environ 2 nm de la surface d'or, la fluorescence subit le quenching, ce qui permet de distinguer clairement les vibrations Raman du marqueur Cy3.

La détection de la cyanine 3 permet de confirmer la présence de molécules ADN immobilisées à la surface de la puce.

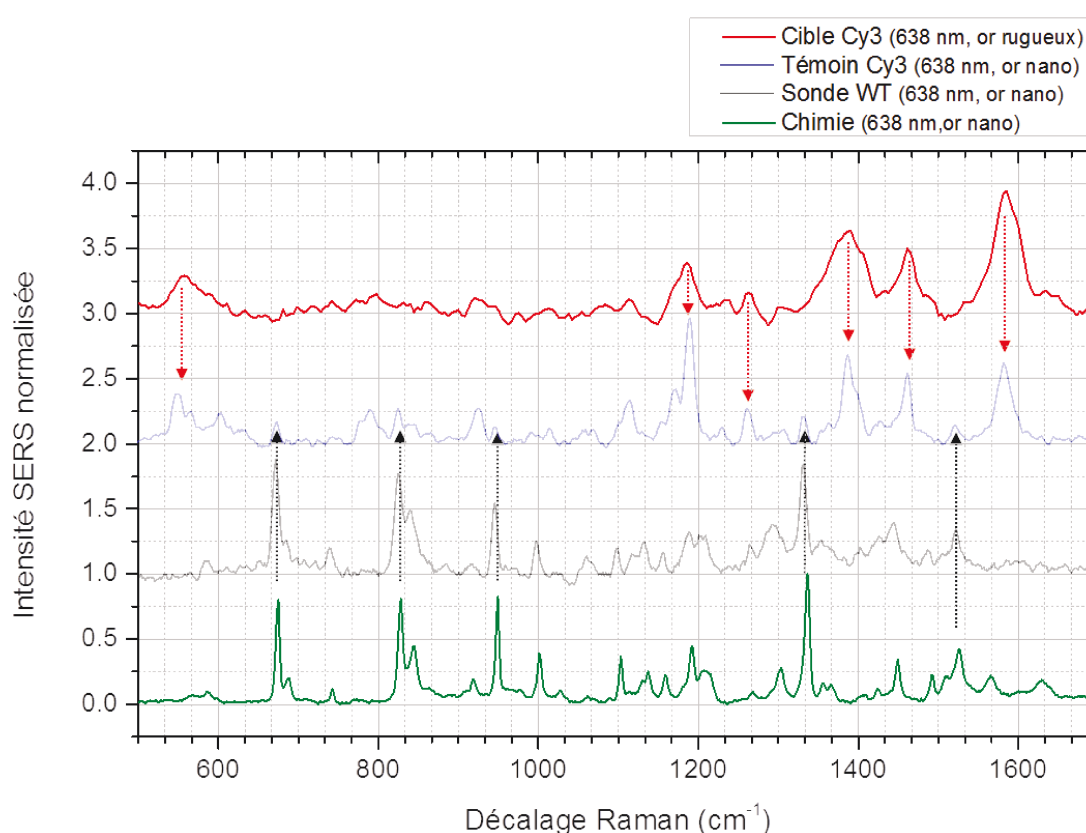


FIGURE 3.35 – Spectres mesurés en début d'expérience à 638 nm sur un plot témoin Cy3 (bleu) et un plot sonde M470vWT (noir). Ils sont comparés au spectre mesuré sur chimie de surface seule (vert), sans sonde, et au spectre de la cible de calibration marquée Cy3 sans chimie de surface (rouge), mesuré sur substrat d'or rugueux, sur le prototype. Les flèches en pointillés rouges désignent des bandes caractéristiques du marqueur Cy3, les flèches en pointillés noirs pointent des bandes propres à la chimie de surface. Tous ces spectres sont normalisés et leur ligne de base a été soustraite.

Il a aussi été vérifié que les spectres SERS sont identiques à la longueur d'onde d'excitation de 691 nm. Le graphique 3.36 confirme que les spectres de la chimie de surface sont très similaires

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

à 638 nm et 691 nm. Le troisième laser intégré au prototype, à 785 nm de longueur d'onde, n'a pas été utilisé lors de cette expérience car le spectre de la chimie est moins amplifié à 785 nm qu'à 638 et 691 nm. Il est possible qu'à 785 nm, les nanostructures sur film d'or soient moins excitées, hypothèse en cours d'étude.

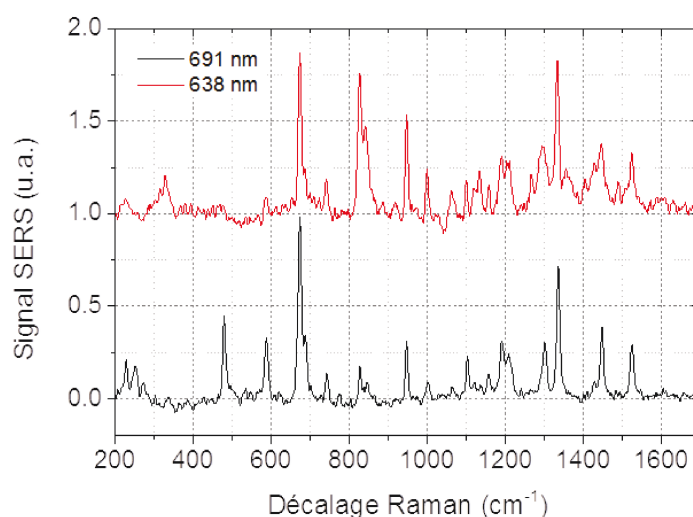


FIGURE 3.36 – Comparaison des spectres normalisés obtenus sur un plot sonde M470vWT en début d'expérience à 638 nm et 691 nm de longueur d'onde d'excitation laser, en PBS.

Une première expérience d'hybridation de la cible M470vWT marquée à la concentration de 200 nM a été tentée sur substrat nanostructuré pour évaluer la réponse SERS. Le résultat du spectre mesuré après hybridation est présenté en figure 3.37 sur un plot de sonde WT et un plot de contrôle négatif (référence), avec une excitation à 638 nm, un temps d'intégration du signal sur 10s et 12 accumulations, le filtre laser étant réglé sur 1%. Le spectre mesuré sur le contrôle négatif avant interaction est également tracé, le temps d'intégration étant cette fois de 60s, pour une accumulation, la ligne de fond ajustée par un polynôme et soustraite (axe de droite). Aucun nouveau pic n'apparaît après interaction avec la cible WT, mais une énorme bosse de fluorescence est enregistrée sur le plot sonde WT, avec un maximum d'intensité vers 600 cm^{-1} . Cette émission fluorescente n'est pas présente sur le spectre du contrôle négatif. Cela signifie que le marqueur Cy5 est présent sur le plot sonde WT, et pas sur le contrôle négatif. Cependant, le spectre SERS de la cyanine 5 est complètement noyé dans l'émission fluorescente car le marqueur est situé à 8 nm environ de la surface d'or, distance à la quelle la fluorescence est exaltée. De plus, à cette distance, l'intensité du signal SERS est très faible du fait de la décroissance exponentielle du champ de l'onde évanescente.

Par ailleurs, la cinétique de l'hybridation de la cible M470vWT n'a pas pu être acquise dans les conditions de l'expérience de SPRI, le prisme en SF11 avec un angle au sommet de 32° choisi et l'angle de résonance trop rasant dégradant la qualité de l'imagerie (voir la discussion sur le choix du prisme en section 2.2.2.2 page 82 et section 2.2.2.3 page 82). En effet, à ce stade, des

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

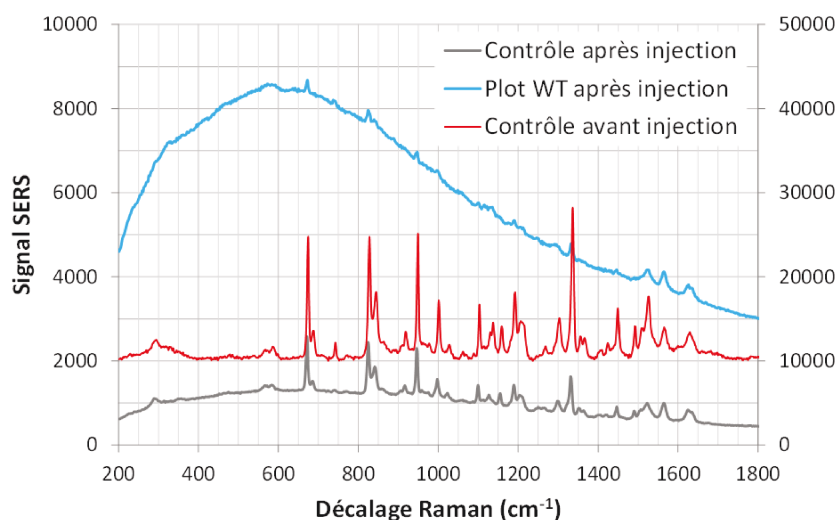


FIGURE 3.37 – Mesure du spectre SERS obtenu après hybridation de la cible M470vWT marquée Cy5 sur un plot de contrôle négatif et sur un plot sonde M470vWT, à 638 nm, pour un temps de pose de 10s, 12 accumulations et un filtre laser de 1%. Le spectre acquis avant interaction sur un plot de référence est également reporté ici, associé à l'axe de droite, pour un temps de pose de 60s et une seule accumulation.

tests comparatifs de prismes en SF11 et LAK34 sur or plan n'avaient pas montré de différence majeure sur l'imagerie, le SF11 avait donc été sélectionné, étant le prisme standard de Horiba. Ici, il s'agit du premier test d'expérience avec un substrat nanostructuré, ce qui modifie les conditions expérimentales.

Une seconde expérience est réalisée sur un substrat nanostructuré jumeau du précédent en focalisant les efforts sur l'étude de l'hybridation de la cible de calibration proximale rapprochant au maximum le fluorophore de la surface de façon à minimiser l'intensité de fluorescence pour faire ressortir le signal SERS. Un prisme en LAK34 d'angle au sommet 20° est utilisé pour une imagerie améliorée.

Après injection de la cible de calibration à la concentration de 400 nM, des spectres sont acquis à 638 nm et 691 nm avec un temps d'intégration de 60s, filtre laser à 1%, en 9 points de chaque zone nanostructurée pour pouvoir moyenner les résultats et ainsi obtenir une mesure statistique. Cette fois, on observe un signal de fluorescence sur quasiment l'ensemble de la puce, traduisant un accrochage non spécifique. En effet, après injection de la cible, la fluorescence excitée à 638 nm se manifeste autant sur le plot de sonde M470vWT que sur le plot de contrôle négatif comme l'illustrent les mesures de la figure 3.38. Les spectres tracés sont issus de la moyenne des 9 spectres acquis sur une zone donnée. Cette fois, il est possible de détecter un pic supplémentaire non visible avant injection à la position de 550 cm^{-1} , un des pics caractéristiques de la cyanine qui avait été identifié lors des tests préliminaires présentés en figure 2.51 page 125.

Le spectre enregistré sur or uniforme, en dehors des nanostructures, reporté en figure 3.38a, présente une amplitude très faible en comparaison avec le spectre sur nanostructures après injection de la cible. Cette observation confirme que le réseau de nanodisques exalte le signal de

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

fluorescence d'un facteur 26 par rapport à l'or continu.

Un test de photobleaching a été tenté à 638 nm dans le but de détruire la fluorescence et de pouvoir distinguer d'autres bandes Raman du marqueur. De fortes puissances laser sont injectées sur l'échantillon (filtre réglé à 50% au lieu de 1%). Cela a pour effet d'éliminer l'ensemble des pics de la chimie de surface, en brûlant les liaisons et n'a pas permis d'obtenir plus d'informations sur le spectre Raman de la cyanine 5.

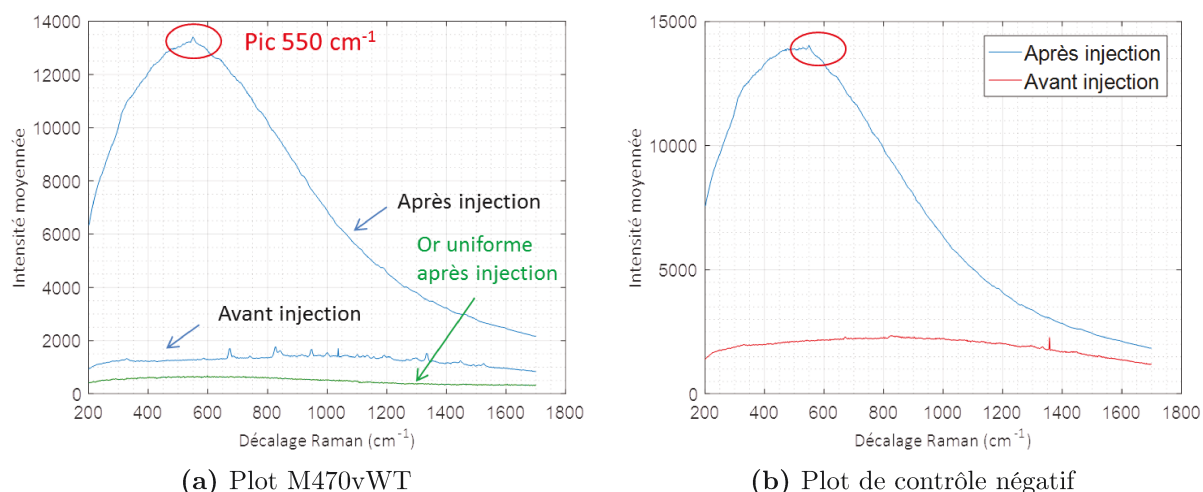


FIGURE 3.38 – Signaux SERS à 638 nm avant et après interaction avec la cible de calibration proximale marquée Cy5 pour (a) un plot de sonde M470vWT et (b) un plot de référence. Un spectre sur or à l'extérieur des nanostructures est également présenté sur la figure (a).

Des spectres ont également été acquis à 691 nm. Les spectres obtenus à cette longueur d'onde démontrent une émission de fluorescence environ 10 fois plus faible qu'à 638 nm. En effet, Cy5 absorbe 75% de l'énergie à la longueur d'onde d'excitation de 638 nm, contre seulement 5% à 691 nm (voir le spectre d'excitation de la cyanine 5 en graphe 2.50).

Les 9 spectres acquis après hybridation de la cible de calibration proximale sur ce plot avec 2 secondes de temps de pose et 10 accumulations sont moyennés après avoir retiré la ligne de base du signal. Le résultat est exposé en figure 3.39, en comparaison avec le spectre brut avant interaction sur ce même plot et le spectre de référence de la cible de calibration marquée Cy5 acquis sur or rugueux. Ces spectres sont normalisés à 1 pour faciliter l'analyse. De nombreuses bandes non présentes avant interaction apparaissent sur le spectre du plot sonde. Elles correspondent à des bandes de la cyanine 5, repérées par des pointillés bleus, les plus visibles étant identifiées par la valeur de leur décalage Raman en nombre d'onde. D'autres pics sont également identifiables sur le spectre après interaction, associés à la chimie de surface. Ils sont mis en avant par des flèches noires sur le graphe 3.39.

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

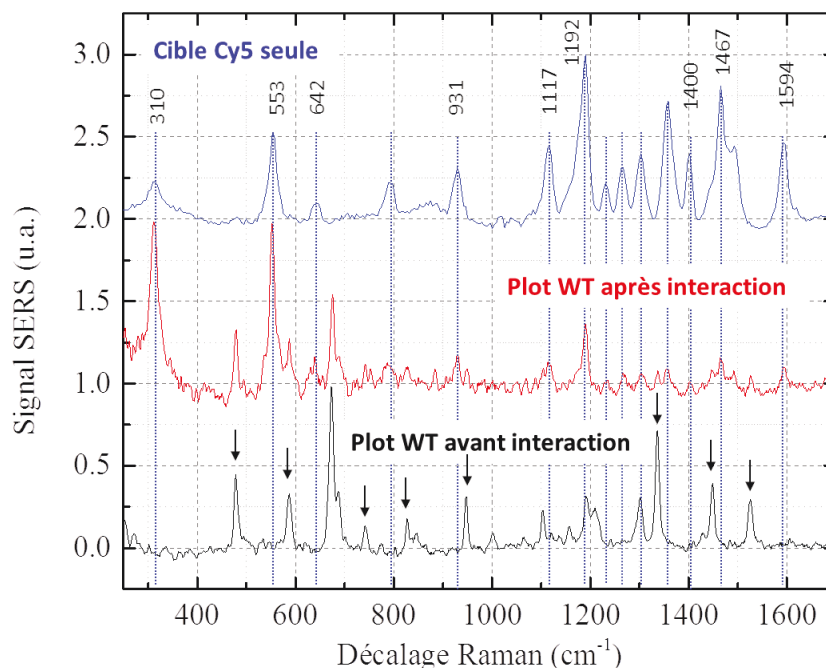


FIGURE 3.39 – Spectres normalisés à 1 mesurés à 691 nm sur un plot M470vWT avant et après interaction avec la cible de calibration proximale. Le spectre bleu de la cible marquée Cy5 mesuré sur or rugueux est apposé pour faciliter l'identification des bandes (acquis à 638 nm).

L'observation de bandes caractéristiques de la cyanine 5 dans le spectre SERS acquis à 691 nm sur un plot sonde M470v après injection de la calibration proximale confirme que l'interaction a eu lieu. La détection d'un événement d'hybridation ADN avec cible marquée Cy5 est ainsi réalisée en SERS sur le prototype. Cependant, l'adsorption non spécifique de la cible sur l'ensemble de la lame perturbe l'interprétation des signaux à cause du fort impact de la fluorescence.

L'étude des résultats SPRI du paragraphe suivant donne des informations complémentaires sur cette hybridation.

3.3.4 Résultats SPRI

L'hybridation de la cible de calibration a été suivie simultanément en SPRI. Sur substrat nanostructuré, les images de variations de réflectivité obtenues par la différence entre images avant et après interaction sont très peu contrastées en raison de la résonance du mode hybride plus large que sur or plan. L'image présentée en figure 3.40 montre le signal en variation de réflectivité après prise de la cible de calibration à la longueur d'onde de 760 nm. Cette image a été lissée en moyennant 10 images avant interaction et 10 images après. Elle est intégrée ici à titre qualitatif dans le but de montrer qu'un signal est visible au niveau des plots sondes M470v WT et MT (n°1 et n°2). Seuls deux de ces plots ne présentent pas de signal car les zones ne

Chapitre 3. Mise au point d’une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

sont pas résonantes (en 2^e ligne, 4^e colonne et 3^e ligne , 4^e colonne).

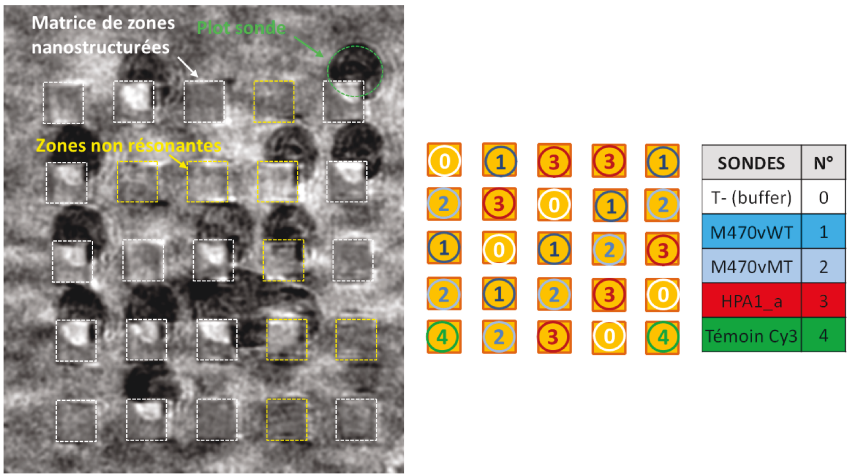


FIGURE 3.40 – Image de variations de réflectivité lors de la prise de la cible de calibration Cy5 proximale, à 760 nm. Les zones structurées sont repérées en pointillés blancs, les zones en pointillés jaunes ne sont pas résonantes et un plot sonde est entouré en pointillés verts. Le schéma d’immobilisation est rappelé à droite.

Pour exploiter correctement le signal SPRI, il est nécessaire d’utiliser une mesure par suivi de la position spectrale de la résonance qui nécessite la reconstruction du profil de résonance à partir des 5 valeurs de réflectivité acquises par balayage des 5 LEDs de la source. Or, les profils angulaires et spectraux obtenus sur film d’or ou réseau de nanostructures sont très différents. La résonance associée à l’or plan présente une forme de pseudo-lorentzienne [Kurihara 2002]. Cette forme se traduit par un profil de résonance asymétrique, comme illustré par l’ajustement basé sur cette fonction de 5 points de mesure acquis à 720, 735, 760, 780 et 800 nm sur un substrat recouvert de 50 nm d’or en figure 3.41a. La résonance mesurée sur or nanostructuré quant à elle présente une forme plus large et symétrique autour du minimum de réflectivité, que ce soit sur profil spectral ou angulaire (figure 3.41b). Un ajustement polynomial a par conséquent été confronté à un ajustement pseudo-lorentzien dans le cas de l’or nanostructuré afin de déterminer les meilleurs paramètres de reconstruction du signal.

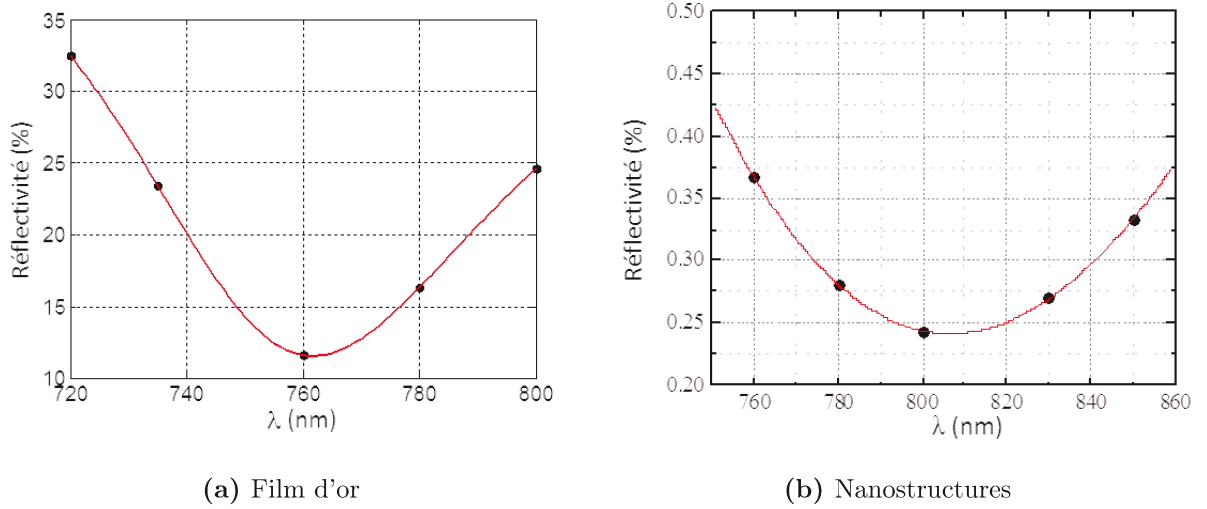


FIGURE 3.41 – Comparaison des profils de résonance d'un film d'or plan et d'un film nanostructuré. (a) Résonance spectrale sur or plan d'épaisseur 50 nm, (b) Résonance spectrale sur or nanostructuré.

Des tests rapides montrent qu'une fonction parabolique (ordre 2) est inadaptée à l'ajustement des données expérimentales. Une fonction polynomiale d'ordre 3 est donc testée pour la reconstruction de la résonance à partir de 5 valeurs de réflectivité : $f(\lambda) = a_0 + a_1\lambda + a_2\lambda^2 + a_3\lambda^3$. Cet ajustement est mis en oeuvre grâce à une fonction de la Toolbox Matlab. Il a été remarqué que les performances de l'ajustement Matlab en terme de précision et de stabilité de calcul sont meilleures lorsque les longueurs d'onde sont exprimées en micromètres (donc proches de 1) et non en nanomètres. Cela évite d'avoir plusieurs ordres de grandeur de différence entre les coefficients du polynôme, ce qui peut engendrer des erreurs d'arrondi sur les valeurs, la précision numérique étant limitée. Le code requiert d'indiquer la tolérance de l'ajustement, fixant l'écart quadratique maximal final entre valeur expérimentale et valeur de la fonction à cette longueur d'onde. Plusieurs valeurs de tolérance ont été testées : 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} . Les résultats de calcul de la fonction polynomiale obtenue pour chaque valeur de tolérance sont tracés en figure 3.42. L'écart entre points expérimentaux (croix bleues) et fonction polynomiale se réduit lorsque la valeur de tolérance diminue. Le nombre d'itérations de calcul passe de 5 à 10 approximativement entre une tolérance fixée à 10^{-4} et une tolérance à 10^{-6} . Deux ordres de grandeurs sur la précision d'ajustement sont gagnés contre seulement une augmentation d'un facteur 2 du nombre d'itérations, qui reste faible (10). Par conséquent, la tolérance de calcul est réglée à 10^{-6} .

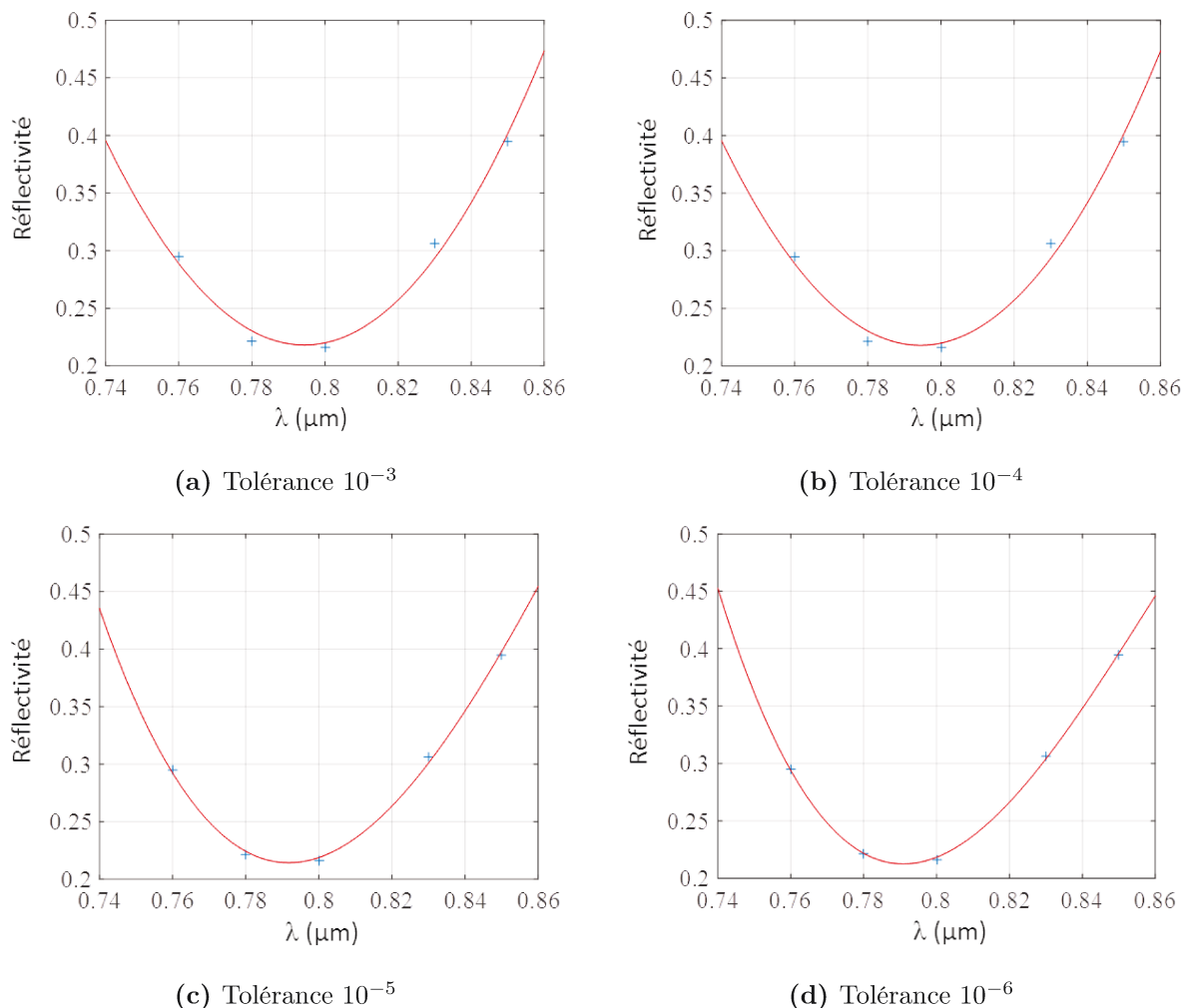


FIGURE 3.42 – Effet du paramètre de tolérance de la fonction d'ajustement Matlab par polynôme d'ordre 3. Les fonctions sont calculées et tracées pour ajuster des points de mesure obtenus sur or nanostructuré pour 4 valeurs de réglage de la tolérance : (a) 10^{-3} / (b) 10^{-4} / (c) 10^{-5} / (d) 10^{-6} .

Les cinétiques d'interactions de la cible de calibration en terme de décalage spectral de la résonance sont tracées pour un ajustement polynomial de degré 3 (figure 3.43a) et un ajustement pseudo-lorentzien (figure 3.43b), avec une tolérance de 10^{-6} , sur 5 plots de sondes M470vWT, 5 plots de sondes M470vMT et 3 plots de sondes HPA1a. Ces dernières séquences ne possèdent pas le groupement complémentaire à la calibration et servent ainsi de contrôle négatif. Un lissage des courbes par moyenne mobile sur 5 points adjacents est effectué.

3.3. Validation de l'instrument sur une mesure couplée SPRI/SERS

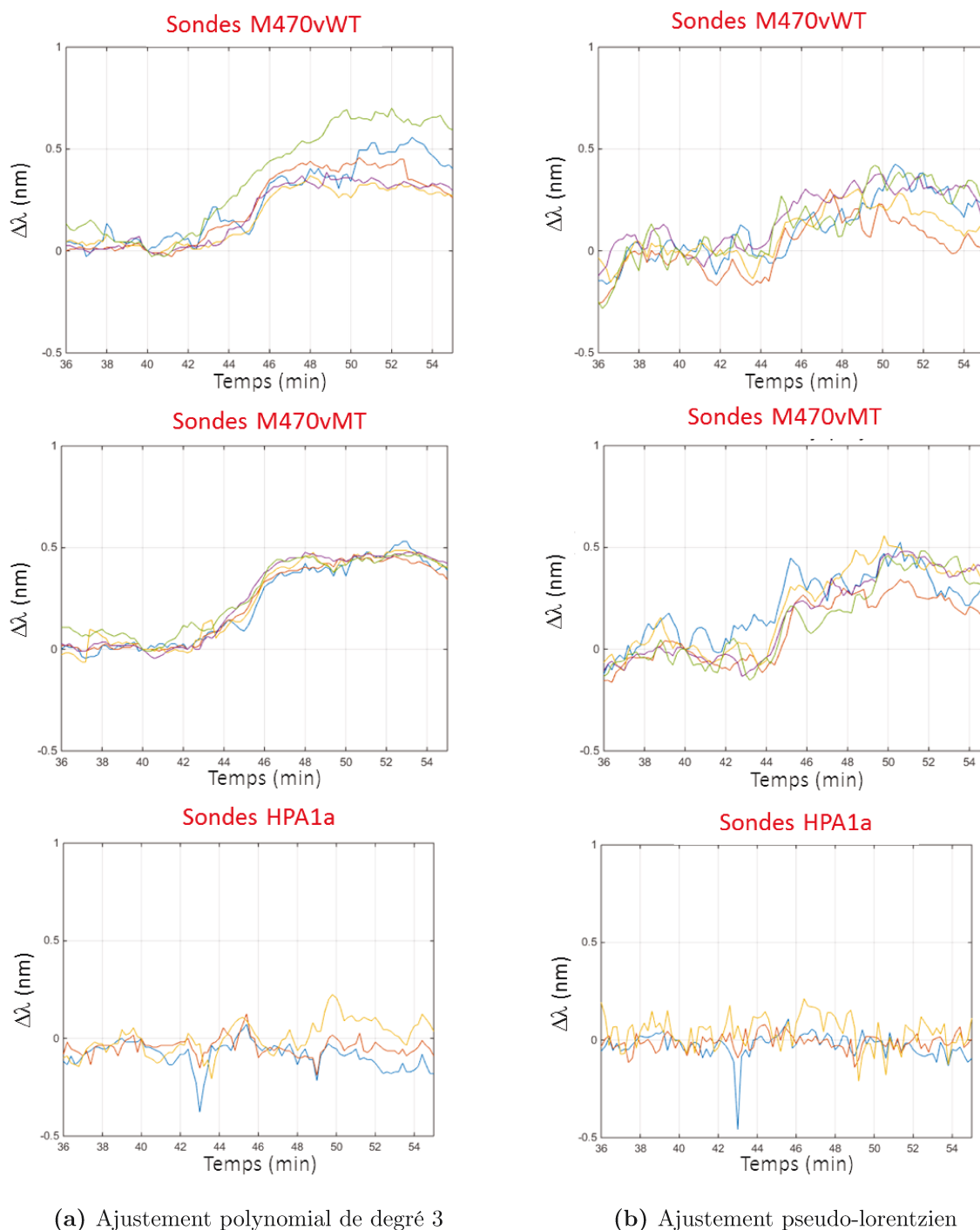


FIGURE 3.43 – Comparaison des résultats de cinétique de la prise de la cible de calibration proximale en décalage spectral pour une fonction de reconstruction (a) polynomiale d'ordre 3 et (b) pseudo-lorentzienne. La cinétique est tracée sur 5 plots de sondes M470vWT (première ligne), également 5 plots de sondes M470vMT (deuxième ligne) et 3 plots de sondes HPA1a (troisième ligne).

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

L'hybridation de la calibration est nettement visible pour les deux types d'ajustement sur les plots M470v WT et MT, donnant un signal SPR de l'ordre de 0,4 nm en moyenne. Aucun signal n'est enregistré sur les sondes HPA1a de contrôle négatif, montrant que l'interaction est spécifique du point de vue de la mesure SPRI. Les signaux sont toutefois plus bruités dans le cas de l'ajustement pseudo-lorentzien. La fonction de reconstruction de la résonance par polynôme d'ordre 3 est plus appropriée à un substrat de nanodisques de période 400 nm et de diamètre 200 nm.

L'analyse SPRI a permis de démontrer que l'interaction entre cible de calibration marquée Cy5 proximale a bien lieu sur les plots de sondes M470v, et cela de façon spécifique. Toutefois, le peu de cibles marquées Cy5 résiduelles, non hybridées à des sondes mais fixées de façon aléatoire à la surface, suffisent à générer un signal de fluorescence saturant les mesures SERS à la longueur d'onde d'excitation de 638 nm. L'émission de fluorescence est environ 10 fois plus faible à 691 nm, permettant de détecter les bandes caractéristiques de la cyanine 5. Néanmoins, l'idée d'utiliser un marqueur fluorescent comme témoin SERS ne s'avère pas la plus adaptée à la validation de l'instrument bimodal. Ce marqueur a pourtant été utilisé avec succès pour détecter par mesure SERS des cellules cancéreuses en étant greffé à un anticorps marqué d'une nanoparticule d'or, avec une longueur d'onde d'excitation de 633 nm [Maiti 2011]. Il est possible que la cyanine se trouve plus près de la nanoparticule dans ce cas, éliminant les problèmes de fluorescence à cette longueur d'onde. De plus, la détection est réalisée à l'intérieur des cellules, et non pas sur une surface.

Des conditions d'expérience plus similaires ont été rapportées par Qi [Qi 2014]. Il analyse l'hybridation ADN grâce à un marquage Cy3 et par mesure SERS. Toutefois, Cy3 est ici greffé à l'ADN sonde immobilisé à une surface structurée de nanodisques d'or poreux. La sonde est mise en début d'expérience en configuration d'épingle à cheveux, repliée sur elle-même, ce qui permet à la cyanine de se trouver au plus près de la surface d'or. Dans ce cas, un spectre SERS caractéristique de la cyanine est mesuré. Par contre, lorsque l'hybridation de la cible intervient, la structure de repli est cassée, éloignant ainsi le marqueur de la surface : le signal SERS est perdu. Le principe de la mesure est schématisé en figure 3.44. Le désavantage de ce mode de mesure est la perte de la propriété d'identification du SERS, puisque le signal est lié au marquage de la sonde et non de la cible.

Cette piste pourrait être une perspective de perfectionnement du modèle d'expérience de validation de l'instrument. Un autre marqueur SERS pourrait également être testé, en choisissant dans la multitude de molécules disponibles réactives en SERS un composé non fluorescent.

3.4 Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex

Des modèles biologiques, concernant à la fois les milieux agro-alimentaires et médicaux, ont été ciblés en tant qu'applications porteuses prouvant l'intérêt de l'instrument bimodal.

L'Ochratoxine A, de poids 404 Daltons (1 Da = 1 g/mol), a été sélectionnée comme modèle agro-alimentaire du fait de l'existence de normes de régulations européennes limitant sa teneur

3.4. Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex

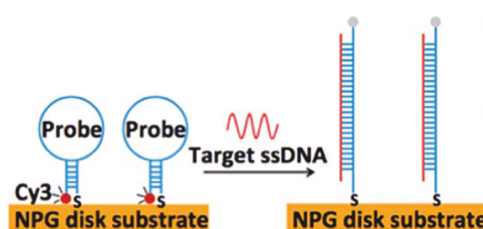


FIGURE 3.44 – Expérience de détection par SERS d’une interaction ADN/ADN réalisée par Qi grâce à la désactivation du marqueur Cy3 (extrait d’une figure de l’article [Qi 2014]).

dans les aliments et de l’intérêt que porte le laboratoire d’Ingénierie Analytique pour la Qualité des Aliments (IAQA) au sein d’AgroParisTech à cette application, partenaire du projet Piranex en qualité d’utilisateur final potentiel.

La protéine MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase), de poids 22,3 kDa, fait quant à elle l’objet du premier modèle biomédical choisi pour démontrer les performances de détection du système couplant SPRI et SERS. L’expression et l’activité de cette enzyme mitochondriale antioxydante sont dérégées chez la plupart des patients atteint de cancer, comme cela est connu depuis les années 70 [Yamanaka 1973].

Un second modèle biomédical est en cours d’étude. Il fait intervenir un biomarqueur des maladies cardiaques, la protéine FAB-p3, de poids 19 kDa, détecté par un fragment d’anticorps (scFv) correspondant à la partie de l’anticorps en charge de la reconnaissance avec l’antigène. Le fragment est environ 5 fois plus petit que l’anticorps (son poids moléculaire est de 28 kDa contre 150 kDa pour une immunoglobine [Byun 2013]).

L’ochratoxine et la MnSOD s’associent à des aptamères immobilisés à la surface du transducteur. Ces courtes séquences d’ADN, de la même façon que le fragment d’anticorps, sont particulièrement appropriées pour une détection en SERS car elles permettent d’approcher les cibles plus près de la surface d’or nanostructurée que des anticorps. Sachant que l’intensité du signal SERS diminue rapidement avec la distance à la surface, les sondes ont tout intérêt à être les plus courtes possibles afin de profiter au maximum du pouvoir d’amplification du champ des nanostructures.

Les aptamères, de courtes séquences d’ADN ou d’ARN, s’organisent suivant une structure de repli complémentaire de la cible visée. Ils présentent l’avantage d’être synthétisés chimiquement à partir d’une méthode *in vitro* reportée en 1990 pour la première fois, qui leur procure une stabilité et une robustesse à des changements de pH ou de température supérieures aux anticorps.[Rhouati 2013, Barthelmebs 2011]. Ils peuvent être mis au point sur mesure et de façon reproductible, à moindre coût, avec une grande variété de propriétés possibles.

L’étude de ces modèles requiert une étape d’optimisation importante réalisée par Karen Mercier, ingénieure d’application chez Horiba. Chimie de surface, conditions de dépôt et composition du tampon de course sont autant de points à explorer pour atteindre les meilleurs résultats en SPRI et vérifier la faisabilité de la détection sur un instrument SPR commercial.

Dans le même temps, Raymond Gillibert, doctorant Horiba/CSPBAT, a réalisé des tests en

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

mesure SERS, sur appareil commercial également, pour disposer de spectres de référence qui serviront de base de données comparative aux expériences effectuées sur le prototype dans un second temps.

3.4.1 Modèle agro-alimentaire : Ochratoxine A / aptamère

Le modèle agro-alimentaire adresse la problématique de la détection de petites molécules, de poids inférieur à 1000 Da, par l'étude de l'interaction entre une séquence d'aptamère et l'ochratoxine A (OTA). Cette application intéresse grandement la communauté agro-alimentaire puisque la détection de l'OTA est un enjeu actuel majeur. Cette mycotoxine se trouve dans un large panel de produits de grande consommation tels que les céréales, les fruits secs, les épices, le café ou les boissons fermentées pour citer quelques exemples. La contamination se répercute sur les produits animaux, le lait ou la volaille, du fait de leur alimentation à base de céréales. L'union européenne s'inquiète de l'effet de cette toxine depuis que des études réalisées en 1998 par le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH) ont révélé le caractère cancérigène de l'OTA. Ces découvertes ont abouti à la ratification d'un règlement européen limitant la teneur en OTA de plusieurs produits alimentaires à risque. Dans l'objectif de contrôler la concentration en OTA de ces produits, il convient de développer des techniques d'analyses performantes permettant de détecter de faibles concentrations de toxine. A ce jour, les méthodes analytiques les plus prisées utilisent l'amplification génétique par réaction en chaîne à la polymérase (PCR) [Hayat 2012]. Malgré sa complexité, cette technique permet de détecter de très faibles quantités de contaminant. D'importants efforts sont mis en oeuvre afin de trouver des technologies alternatives aussi précises mais plus rapides et moins coûteuses. L'instrument bimodal SPRI/SERS se révèle un candidat prometteur pour ce type de détection. La mise au point récente d'aptamères complémentaires de l'OTA profite au développement de biocapteurs basés sur l'interaction entre molécules.

Ce modèle présente aussi l'avantage de confronter l'instrument bimodal à une détection difficile en SPRI du fait de la petite taille de la toxine. La mesure simultanée en SERS se révèle particulièrement pertinente dans ce cas en tant qu'analyse complémentaire de l'interaction moléculaire, constituant une preuve de l'intérêt du couplage SPRI/SERS.

Les aptamères reconnaissant l'OTA synthétisés par Eurogentec ont été sélectionnés à partir des articles de Barthelmebs [Barthelmebs 2011] et Geng [Geng 2013]. Il s'agit des aptamères H12, H8c et 1.12.2, de séquences suivantes :

- H12c (30mer – 9.5 kDa - KD 96nM)
5' CGGGTGTGGGTGCCTTGATCCAGGGAGTCT 3'
- 1.12.2 (36mer – 11.5 kDa – KD 55nM)
5' TGATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA 3'
- H8c (30mer – 9.6kDa - KD 130nM)
5' CTGGGTGTGGGTGATCAAGGGAGTAGACT 3'

Ces trois aptamères ont été commandés avec terminaison amine ou thiol, la première étant adaptée à une chimie de surface, la seconde permettant un test directement sur or. D'après les constatations de Geng pointant l'importance du choix du site de fixation de l'aptamère sur

3.4. Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex

l'or, ces terminaisons sont testées en position 5' et 3'. Par conséquent, les deux types ont été commandés et testés. La fonctionnalisation de l'or pour l'aptamère aminé suit un protocole Horiba basé sur une monocouche auto-assemblée à terminaison COOH, activée par le mélange EDC/NHS. L'aptamère thiolé est déposé directement sur l'or. L'immobilisation est effectuée pour une concentration d'aptamères de 30 μM en PBS 20 mM à pH 7,4. Le blocage est réalisé par éthanolamine pour l'aptamère amine et par PEG-OH pour l'aptamère thiolé.

Lors de l'injection de l'OTA, aucun signal de variation de réflectivité n'est observé au niveau de l'aptamère aminé. Pourtant, les différents aptamères thiolés des trois espèces testées (H12c, 1.12.2, H8c) répondent à l'OTA, injectée à 3 concentrations : 198, 395 et 790 μM . Les efforts d'optimisation ont été concentrés sur le cas de l'aptamère thiol. Les résultats concernant les aptamères thiolés sont présentés en figure 3.45.

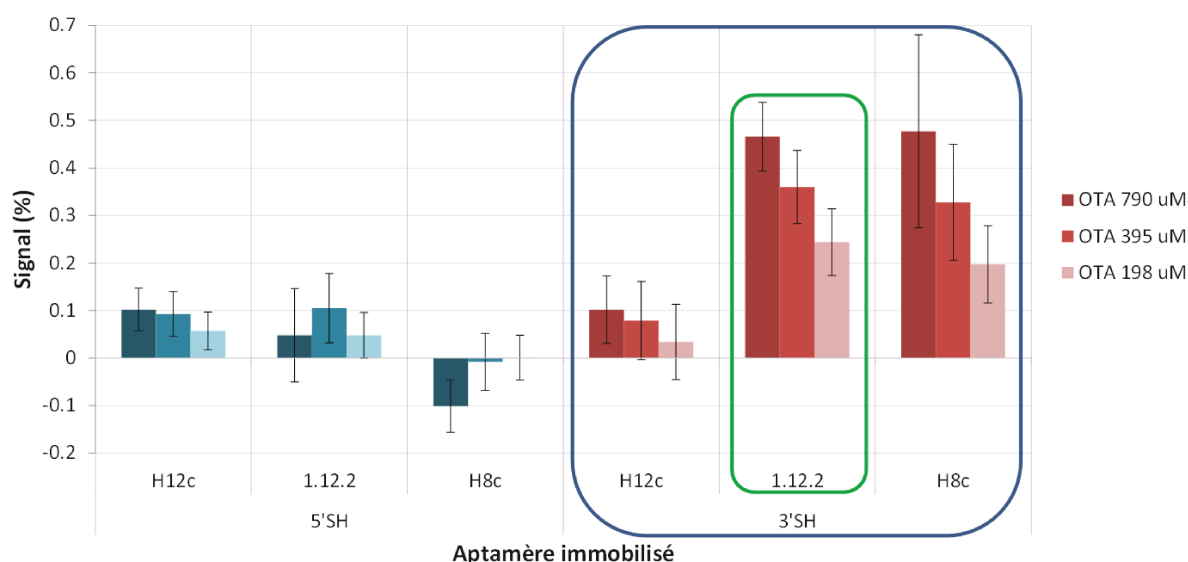


FIGURE 3.45 – Test SPRI de la détection de l'Ochratoxine A pour 3 concentrations (198, 395 et 790 μM) sur 3 espèces d'aptamères différentes (H12c, 1.12.2, H8c) immobilisées sur l'or par un thiol placé soit en position 3', soit en position 5'.

L'aptamère H12c est indifférent à la stratégie d'immobilisation, en 3' ou 5'. Il donne cependant peu de signal (0,1% de variation de réflectivité pour la plus grande concentration d'OTA) en comparaison avec les aptamères 1.12.2 et H8c immobilisés en 3', qui présentent un signal presque 5 fois supérieur à H12c. Cela confirme les conclusions de Geng au sujet du rôle déterminant des bases proches de l'extrémité 5' dans la reconnaissance spécifique de l'OTA alors que les 4 bases les plus proches de l'extrémité 3' ne sont pas impliquées dans d'interaction. L'immobilisation de l'aptamère sur l'extrémité 5' contraint trop la configuration de la molécule. Au regard des résultats de la figure 3.45, l'aptamère 1.12.2 avec SH en 3' est utilisé pour la suite des expériences. Il donne un signal légèrement supérieur à H8c.

L'article de Geng mentionne également l'importance de la composition de la solution tampon

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

utilisée pour l'injection de l'OTA. Grâce à des mesures par anisotropie de fluorescence, il observe une amplification de l'interaction par la présence combinée d'ions Na^+ et Ca^{2+} . Plus précisément, le tampon de course idéal est obtenu avec 10 mM de tampon Tris-HCl, 120 mM de NaCl et 20 mM de CaCl_2 . A la place du Tris, il a vérifié qu'un tampon HEPES fonctionne également, et que des performances similaires sont obtenues en remplaçant le CaCl_2 par du MgCl_2 , ou encore le NaCl par du KCl.

Pour les expériences SPRI, une base de tampon HEPES a été choisie. Plusieurs tampons sont ainsi testés lors de la prise de l'OTA sur l'aptamère 1.12.2 retenu, le tampon idéal proposé par Geng ne donnant pas de résultats probants, comme cela peut être vu sur les signaux mesurés en figure 3.46 au niveau du premier cas. Du KCl concentré à 5 mM est ajouté : le signal est presque triplé. Puis du MgCl_2 est inséré au tampon, sans grande amélioration.

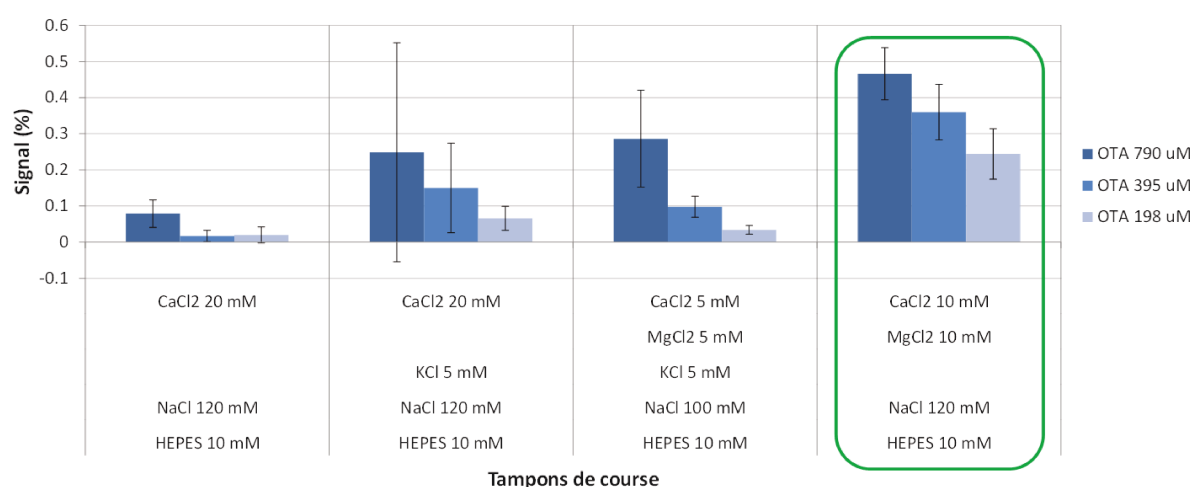


FIGURE 3.46 – Mesures SPRI de l'interaction OTA/aptamère 1.12.2 -SH en 3' pour tester des compositions de tampon différentes.

Finalement, la composition de tampon optimale pour l'interaction entre OTA et aptamère 1.12.2 thiolé en 3' est obtenue avec de l'HEPES à 10 mM, du NaCl à 120 mM, du CaCl_2 à 10 mM et du MgCl_2 à 10 mM. Dans ces conditions, une concentration de 200 μM d'ochratoxine génère un signal à hauteur de 0,25 %. Si la limite de détection est fixée à deux fois le bruit de photons, de l'ordre de 0,02%, la concentration minimale détectable approche les 40 μM , bien loin des 5 nM visés par la norme européenne.

Cette configuration de détection ne semble donc pas adaptée à l'interaction entre aptamère et ochratoxine. Une piste à envisager pourrait être de tester une interaction par compétition avec un conjugué OTA/BSA, comme proposé dans l'article de Barthelmebs et al [Barthelmebs 2011]. Il s'agirait de faire interagir ce conjugué OTA/BSA à une concentration fixée avec l'aptamère immobilisé, puis d'injecter l'OTA libre qui vient chasser le conjugué pour prendre sa place sur l'aptamère, processus illustré en figure 3.47. Une diminution de signal est ainsi observée.

3.4. Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex

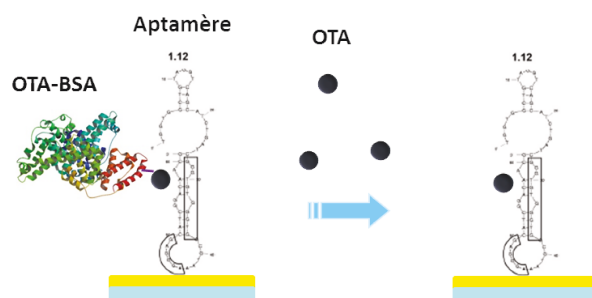


FIGURE 3.47 – Perspective d’amélioration de la détection de l’ochratoxine par réaction de compétition entre cible OTA libre et conjugué OTA/BSA.

Des mesures SERS sur ce modèle OTA/aptamère ont également été réalisées au CSPBAT sur or rugueux à 660 nm, par faute de disponibilité de substrats de type Piranex. Les spectres présentés sont acquis avec 20 secondes de temps d’intégration, 3 accumulations, à une puissance laser de l’ordre de 300 μW , et correspondent à une moyenne de 10 spectres acquis en 10 points du substrat répartis sur une surface de 5 par 5 mm.

L’aptamère 1.12.2 à terminaison thiol déposé sur l’or rugueux est caractérisé par le spectre noir de la figure 3.48. Lorsque l’ochratoxine est injectée à la concentration de 10 μM , le spectre obtenu est modifié.

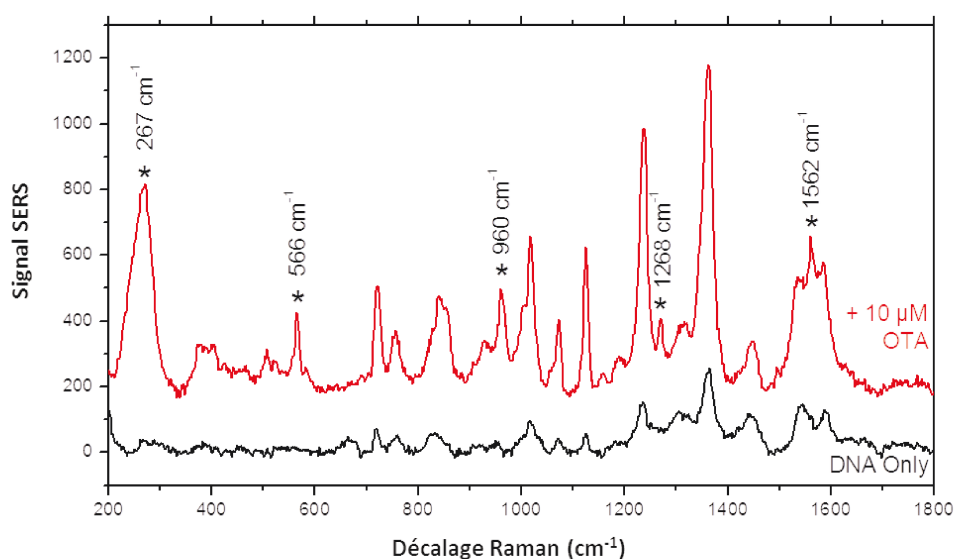


FIGURE 3.48 – Spectres mesurés avant et après interaction entre l’aptamère thiolé et l’ochratoxine à la concentration de 10 μM pour une excitation à 660 nm.

D’une part, des bandes caractéristiques de l’ochratoxine sont excitées, repérées par des étoiles sur le spectre rouge de la figure 3.48. Ces bandes ont été déterminées dans un premier temps lors de mesures de référence de l’OTA seule en poudre ou en solution sur or rugueux.

Chapitre 3. Mise au point d'une biopuce adaptée au couplage SPRI/SERS pour validation du prototype

D'autre part, l'amplitude des pics de l'aptamère est augmentée d'un facteur 4 en moyenne après interaction. Cette amplification de l'amplitude des bandes est le signe d'un changement de conformation de l'aptamère suite à son interaction avec l'OTA. Il peut s'agir d'un repli de l'ADN qui rapproche ainsi une partie des bases vers la surface d'or, ce qui génère une plus forte excitation des vibrations. Cependant, lors de cette mesure, aucun agent de blocage n'a été utilisé, conditions non représentatives d'une expérience de SPRI. Cela signifie également que le spectre SERS de l'OTA mesuré peut provenir de prises non spécifiques de l'OTA sur l'or, sans interaction avec l'aptamère. Il est aussi possible que l'aptamère doté d'OTA s'écroule sur la surface d'or, amplifiant son spectre.

Des tests supplémentaires ont été effectués en SERS en insérant cette fois un agent de blocage, du mercaptohexanol (MOH), qui vient combler les espaces entre les aptamères en se fixant à l'or. Dans ce cas, les spectres obtenus sont beaucoup plus difficiles à interpréter. La figure 3.49 rapporte les spectres mesurés pour l'interaction entre l'aptamère et différentes concentrations d'OTA réparties entre 10 pM et 100 μ M.

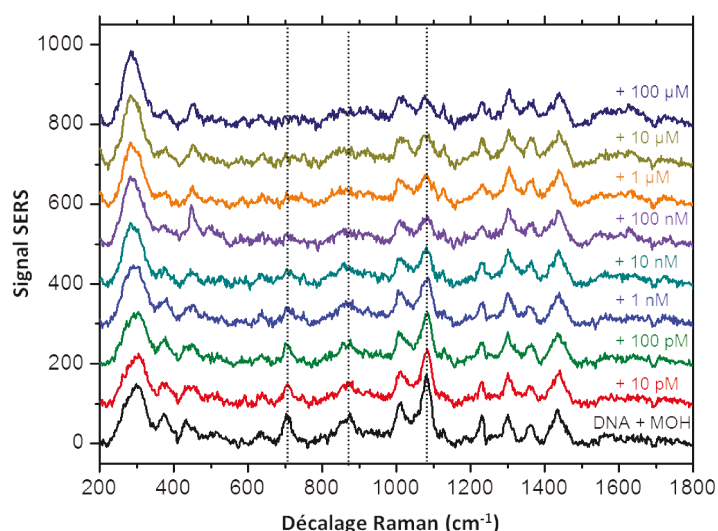


FIGURE 3.49 – Spectres SERS acquis à 660 nm sur or rugueux fonctionnalisé par l'aptamère anti-OTA et un agent de blocage (MOH), lors de l'interaction avec OTA à différentes concentrations (entre 10 pM et 100 μ M).

Aucune bande propre à l'ochratoxine n'est visualisée, indiquant peut-être que le MOH remplit son rôle d'agent bloquant en empêchant l'OTA de se fixer à l'or. Cela peut aussi signifier que l'aptamère est plus contraint du fait de la proximité avec les molécules de MOH : il ne peut s'étaler au contact de l'or, alors que cela était permis lors de la première mesure en figure 3.48. Toutefois, certains changements sont détectés lorsque la concentration en OTA augmente. L'amplitude de certains pics, vers 700, 870 et 1090 cm^{-1} identifiés par des lignes en pointillés noirs, diminue lorsque la concentration en OTA est accentuée. Une analyse plus poussée par méthode statistique PCA (Principal Component Analysis) permet d'obtenir plus de précisions et de quantifications de l'information. Des ajustements des spectres acquis à différentes concentrations génèrent des coefficients qui traduisent le niveau de corrélation entre l'évolution de l'intensité

3.4. Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex

de certains pics et la concentration en cibles. Ce type de traitement détermine une limite de détection de l'ordre de 10 pM en mesure SERS.

Il reste à vérifier que ces spectres peuvent être reproduits sur substrat nanostructuré Piranex.

Les caractérisations SPRI de l'interaction ochratoxine / aptamère ont permis de sélectionner l'aptamère 1.12.2-3' SH en tant que sonde donnant le plus fort signal. Il a été remarqué que le tampon de course a une influence non négligeable sur l'intensité du signal. Le tampon retenu est un mélange d'HEPES, de NaCl, de CaCl_2 et de MgCl_2 et peut encore être optimisé. Toutefois, dans les conditions expérimentales actuelles, 4 ordres de grandeurs doivent être gagnés en terme de limite de détection pour pouvoir prétendre à un contrôle agro-alimentaire dans la plage de concentration recommandée par la réglementation européenne au sujet du vin (de l'ordre de 1 nM). Une approche par compétition avec un conjugué OTA/BSA pourrait être une solution d'amélioration de la détection.

Les caractérisations SERS ont montré une détection possible sur or rugueux de l'ochratoxine capturée par l'aptamère jusqu'à la concentration de 10 pM grâce à l'application d'un traitement statistique (PCA). Une détection SPRI par compétition est a priori compatible avec une mesure SERS, la BSA pouvant être excitée en SERS. Toutefois, il est plus facile de détecter une faible capture de molécules de façon directe qu'un faible taux de remplacement de molécules lourdes par des petites molécules lors d'une compétition.

3.4.2 Modèle bio-médical 1 : protéine MnSOD / aptamère

La MnSOD, enzyme anti-oxidante, régule la concentration en radicaux libres générés de façon naturelle par les cellules lors de leur activité [Kim 2010a]. La rupture de cet équilibre peut endommager certaines macromolécules, et ainsi causer diverses maladies dont le cancer. En effet, la présence de radicaux libres en trop grande proportion dans l'environnement cellulaire favorise la prolifération des cellules cancéreuses et donc la progression de la tumeur. Des recherches ont montré que de nombreux types de cancers sont associés à une mauvaise régulation en radicaux libres.

Bien que le rôle précis de la MnSOD ne soit pas encore complètement maîtrisé, son implication dans la prolifération du cancer est indéniable. Pour cette raison, le premier modèle d'application bio-médicale visé concerne l'interaction entre la protéine MnSOD et l'aptamère associé, développé au cours du projet européen NanoAntena auquel le CSPBAT a pris part de 2009 à 2013. Ces travaux ont prouvé la possibilité de détecter la MnSOD par interaction avec cet aptamère jusqu'à une concentration de l'ordre de 1 nM [Cottat 2015]. Les résultats publiés dans l'article cité ci-avant présentent la modification du spectre SERS mesuré avant et après interaction sur un substrat composé de nanoantennes d'or développé dans le cadre de ce projet. Les spectres de la figure 3.50 révèlent l'apparition de nouvelles bandes après interaction, en particulier entre 1300 et 1500 cm^{-1} . Ces nouvelles bandes excitées une fois la MnSOD capturée sont identifiées par des barres hachurées sur le graphe.

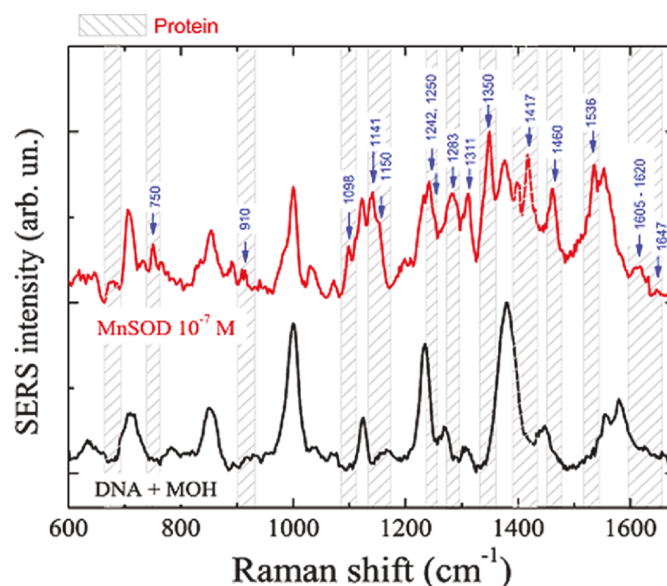


FIGURE 3.50 – Spectres SERS avant et après interaction entre aptamère immobilisé sur une nanoantenne dorée composée de dimères et protéine MnSOD dans le cadre du projet européen NanoAntenna [Cottat 2015] à la concentration de 0,1 μM pour une excitation à 785 nm.

Avant de tester cette interaction sur le prototype, des tests préliminaires des réponses SERS et SPRI sur instruments commerciaux sont effectués. D'une part, il s'agit de vérifier que la détection SERS de la MnSOD peut être reproduite dans des conditions différentes du projet NanoAntenna, c'est-à-dire à une longueur d'onde différente et sur un substrat Piranex (nanodisques d'or de période 400 nm et diamètre 200 nm sur film d'or). D'autre part, l'interaction n'a encore jamais été testée en mesure SPRI avec cet aptamère.

L'aptamère est disponible avec terminaison thiolée ou aminée. De la même façon que pour la mise au point des conditions de mesures SPRI pour le modèle de l'ochratoxine, Karen Mercier a commencé par rechercher le tampon de course le plus performant pour amplifier le signal. La solution tampon de la MnSOD retenue contient 10 mM d'HEPES à pH 7,4, 5mM de KCl, et 5 mM de CaCl_2 . Pour une immobilisation de l'aptamère thiolé à la concentration de 1 μM en PBS à pH 7,4, une concentration de MnSOD de 18 nM est détectée sans problème comme le montrent les cinétiques d'interaction tracées en figure 3.51a. La limite de détection est de l'ordre de 10 nM pour le modèle de l'aptamère thiolé.

En ce qui concerne l'interaction avec aptamère aminé, il est nécessaire de l'immobiliser à une concentration 10 fois supérieure à l'aptamère thiolé sur une chimie de surface à base de SH-PEG-COOH, soit environ 10 μM . La solution d'immobilisation donnant de meilleurs signaux SPR est composée de 100 mM de NaHCO_3 à pH 8,2. L'intensité du signal à concentration équivalente de cible MnSOD est environ deux fois plus faible que dans le cas de l'aptamère thiolé (signal de l'ordre de 0,15 % pour une concentration de 140 nM avec amine et pour une concentration de 70 nM avec thiol). Au vu des cinétiques de la figure 3.51b, la limite de détection attendue est de l'ordre de 40 nM avec l'aptamère aminé (si l'on considère un bruit de photon de l'ordre de 0,02%, en posant que la LOD est égale à deux fois la valeur du bruit).

3.4. Tests en amont sur les modèles biologiques choisis dans le projet Piranex

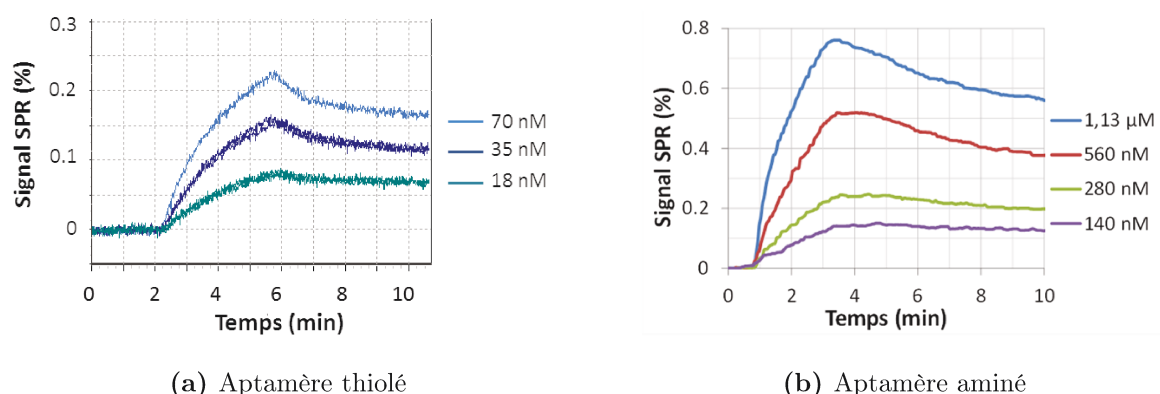


FIGURE 3.51 – Cinétiques d’interaction entre aptamère thiolé (a) ou aptamère aminé (b) et protéine MnSOD sur instrument SPRI Horiba. L’aptamère thiolé est immobilisé à la concentration de 1 μM contre 10 μM pour l’aptamère aminé. La protéine est injectée à différentes concentrations : (a) 70 / 35 / 18 nM et (b) 1130 / 560 / 280 / 140 nM.

Les mesures SPRI préliminaires ont permis de détecter la protéine MnSOD dans un buffer optimisé à la fois avec l’aptamère thiolé et l’aptamère aminé du projet NanoAntenna. Cependant, les performances de détection en présence d’aptamère thiolé sont environ 4 fois meilleures que celles de l’aptamère aminé, pour une limite de détection de l’ordre de 10 nM, similaire à celle obtenue en mesure SERS dans l’article [Cottat 2015].

La prochaine étape consiste à tester la détection de la MnSOD en milieu complexe pour se rapprocher de conditions médicales réelles et à mesurer les signaux SPRI et SERS de l’interaction entre MnSOD et aptamère sur un substrat de type Piranex.

3.4.3 Modèle bio-médical 2 : protéine FAB-p3 / fragment d’anticorps

Une seconde application à visée biomédicale a été étudiée en SPRI. Elle porte sur la détection de la protéine de liaison des acides gras du coeur, FAB-p3, de poids 19 kDa, avec un fragment d’anticorps (scFv), de taille réduite en comparaison avec l’anticorps originel. Cette protéine participe à la solubilisation et au transport des acides gras. Elle est un biomarqueur des maladies cardiaques.

Des tests SPRI sont menés pour optimiser les conditions d’immobilisation du fragment d’anticorps. Une chimie PEG-COOH est utilisée pour immobiliser les sondes. Une concentration de 7 μM de sondes est sélectionnée, ainsi qu’un tampon d’immobilisation d’acétate de sodium à 10 mM. L’importance du pH de la solution est remarquée. En effet, un pH de 4 génère des signaux plus de deux fois plus élevés qu’un pH 7,4, comme les courbes de cinétiques de la figure 3.52 acquises pour des concentrations variant entre 5 et 150 nM le confirment. La limite de détection obtenue est de l’ordre de 5 nM. Une régénération à base de 10 mM d’un mélange de glycine/HCL à pH 2,5 est efficace au vu des deux courbes de cinétique acquises à la concentration de 150 nM (la plus claire est la première injection) qui démontrent un signal équivalent entre premier et deuxième test.

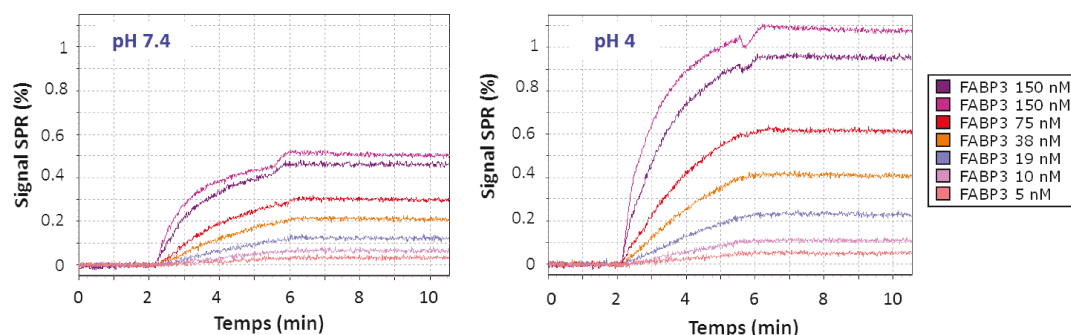


FIGURE 3.52 – Influence du pH de la solution d'immobilisation du fragment d'anticorps sur la détection de la protéine FAB-p3. Les signaux obtenus pour deux pH d'immobilisation, 4 et 7,4, et 6 concentrations de protéine, de 5 à 150 nM, sont comparés.

Ce modèle a été testé récemment en SPRI. Des mesures SERS devraient être effectuées sous peu pour s'assurer de la viabilité du modèle dans le cadre d'une mesure couplée SPRI/SERS.

3.5 Conclusion

Une fois l'instrument couplant SPRI et SERS développé du point de vue du montage optique, il faut pouvoir le valider et prouver son intérêt biologique. Ce chapitre a mis en avant les différents enjeux adressés pour parvenir à cet objectif.

D'une part, la combinaison des deux méthodes plasmoniques repose sur la mise au point d'un transducteur nanostructuré supportant un mode hybride adapté au SERS de part le confinement du champ qu'il génère, et à la SPRI, de part sa sensibilité à l'adhésion d'une couche moléculaire. Des calculs et des expériences montrent que la densité du réseau de nanoparticules est le paramètre clé à l'exaltation du signal SERS. La sensibilité de la SPRI est quant à elle améliorée lorsque la période du réseau est inférieure à 200 nm. Cependant, d'un point de vue optique et fabrication, il a été décidé de fixer la période à 400 nm et le diamètre des nanodisques à 200 nm.

Ces substrats ont été fabriqués par lithographie électronique et validés par des mesures SPRI et SERS confirmant la présence du mode hybride et l'effet d'amplification du signal SERS. Désormais, la technique de nano-impression est privilégiée pour produire de grandes quantités de substrats, nécessaires à l'avancement du projet.

D'autre part, la fonctionnalisation du transducteur a été optimisée sur or par test de différentes associations de SAM mixtes caractérisées par mesures SPRI. Cette chimie a permis de valider le bio-détecteur sur une expérience ADN/ADN avec marquage des cibles à la cyanine 5. La fluorescence de la cyanine complique l'interprétation des résultats à 638 nm d'excitation, mais son spectre SERS a été détecté avec succès à la longueur d'onde d'excitation de 691 nm. La cinétique d'interaction

a également été enregistrée en SPRI.

La biopuce peut encore être perfectionnée par l'ajout d'une couche de résine entre les nanodisques d'or donnant un substrat bi-fonctionnel permettant de localiser les cibles aux endroits de forte sensibilité afin d'améliorer la limite de détection du système. Dans cette perspective, de premiers tests de fabrication sont prometteurs. Il reste à analyser ce substrat bi-matériaux sur le prototype.

Pour finir, des résultats préliminaires de développement d'expériences modèles dans les domaines biomédical et agro-alimentaire ont été obtenus en SPRI et en SERS sur des appareils commerciaux. Le modèle de l'ochratoxine en mesure SPR ne permet pas d'envisager une limite de détection suffisante. Un format par compétition est une piste à explorer, à la fois en SPRI et en SERS. Le modèle de la MnSOD est validé par les deux types de mesure. Un autre modèle est en cours de test, au sujet d'un marqueur cardiaque. L'ensemble de ces modèles doit maintenant être testé sur substrat nanostructuré du projet Piranex dans des expériences simultanées sur le prototype bimodal.

La mise au point des applications requiert des substrats en grande nombre pour pouvoir optimiser les conditions expérimentales des mesures couplées. Les efforts se portent donc sur la production des substrats pour pouvoir appliquer l'instrument à l'analyse de ces modèles à fort intérêt biologique.

Conclusion générale

Un instrument **bimodal** a été mis au point pour coupler deux méthodes plasmoniques de détection moléculaire, l'Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRI) et la Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (SERS) dans l'objectif d'identifier des molécules à l'état de traces. Les atouts d'imagerie, de temps réel et de quantification de la SPRI sont renforcés par la sélectivité, la résolution spatiale et la sensibilité propres au SERS. Ces deux modes de mesure sont assemblés pour la première fois dans un **prototype robuste à visée industrielle**, intégrant une cellule fluide optimisée pour l'observation d'interactions biomoléculaires en milieu liquide.

La mesure SPRI est effectuée en configuration Kretschman grâce à une interrogation spectrale en temps réel, tandis que la mesure SERS s'opère en fin de cinétique d'interaction par le dessus de la cellule fluide, spécialement équipée d'un hublot de verre autorisant l'excitation laser. La mesure Raman peut être réalisée à différentes longueurs d'onde laser : 638, 691 ou 785 nm.

L'instrument développé intègre une source SPRI multi-spectrale fibrée constituée de LEDs, suffisamment stable et rapide pour suivre une interaction en temps réel. L'importance du design du prisme a été soulignée, tant du point de vue du matériau, limitant la dispersion spectrale, que de l'angle au sommet, permettant d'atteindre la plage d'incidence angulaire adéquate tout en conservant une imagerie de qualité. Au regard de ces contraintes, le prisme est fabriqué en LAK34, avec un angle au sommet de 20°. La cellule fluide thermostatée a été validée en SERS et en SPRI. Pour pouvoir exciter différents plots biologiques disposés à la surface de la biopuce, un module de balayage laser a été mis au point. Il autorise une mesure SERS sans déplacement mécanique sur un champ de 700 microns de diamètre.

La combinaison SPRI/SERS requiert le développement d'une **biopuce commune**, exhibant à la fois une sensibilité suffisante à l'adsorption d'une espèce moléculaire et un confinement du champ électro-magnétique amplifiant les vibrations des molécules capturées. Ces deux conditions sont remplies lorsqu'un transducteur constitué d'un film d'or recouvert d'un réseau de nanodisques d'or de taille inférieure à la longueur d'onde est utilisé. Un substrat de ce type supporte des plasmons localisé et propagatif qui se couplent pour donner naissance à un mode hybride, à la fois confiné autour des nanostructures et sensible à une modification des conditions de résonance.

L'optimisation du design du substrat a été réalisée à partir de simulations numériques et de caractérisations SPRI et SERS de substrats nanostructurés variés, fabriqués par lithographie électronique. Calculs et expériences s'accordent sur le fait que le signal SERS est amplifié par la densité des nanodisques répartis à la surface d'un film d'or. D'autre part, une amplification de l'intensité SERS a été mesurée en comparaison à des nanodisques directement déposés sur verre, sans film d'or intermédiaire. Pour l'instant, ce phénomène n'a pas pu être expliqué, les interactions de champ proche entre des molécules et des nanoparticules étant difficiles à modéliser. Ces mesures confirment l'exaltation du signal Raman par ce substrat hybride.

En ce qui concerne la sensibilité SPRI, il est moins évident de statuer de façon certaine sur la meilleure configuration de nanostructures. Il semble qu'une réduction de la période du réseau

Conclusion Générale

augmente la force du couplage entre plasmon localisé et propagatif, induisant une sensibilité plus grande du mode hybride. Toutefois, la condition de Bragg, liée à l'existence de structures périodiques, peut annuler cette sensibilité si la longueur d'onde choisie lors de la mesure induit une condition de résonance trop proche de la condition de Bragg.

Dans le cadre du projet Piranex, il a été décidé de se concentrer sur un format de substrat constitué de nanodisques d'or de diamètre 200 nm, de période 400 nm, de hauteur 30 nm sur un film d'or de 30 nm d'épaisseur. Du fait de son coût et son temps d'écriture, la lithographie électronique ne permet pas d'envisager la fabrication de substrats en nombre suffisant pour tester des applications biologiques. Une méthode par nano-impression est en cours de mise au point dans l'objectif d'une production de substrats à plus grande échelle.

Un biocapteur est composé d'une plate-forme instrumentale, d'un transducteur et d'une **fonctionnalisation de surface**. Ce dernier point est le garant de la spécificité de la mesure SPRI. La mise en place d'une chimie de surface reproductible et efficace représente donc un enjeu majeur déterminant les performances de détection du système. Elle doit en outre être compatible avec la mesure SERS, sensible à la présence de tout composé biochimique se trouvant à la surface du capteur, sur moins d'une dizaine de nanomètres. La profondeur de sensibilité restreinte de la mesure SERS impose donc un encombrement de la chimie de surface le plus limité possible. Une fonctionnalisation basée sur une SAM mixte à terminaison thiol a été mise en œuvre.

L'instrument bimodal a été **validé sur une expérience d'hybridation ADN** dont la cinétique d'interaction a été acquise par mesure SPRI, et la cible ADN identifiée de façon simultanée par mesure SERS grâce à un marquage par un colorant. Ce premier test de couplage concluant a permis de soulever certains points d'une importance critique.

L'effet de la distance entre la cible marquée et la surface d'or s'est révélé capital. Au-delà de quelques nanomètres au-dessus de la surface, le signal SERS est perdu. Cette contrainte devra être prise en compte lors de l'étude de modèles biologiques plus complexes. Afin d'évaluer la sensibilité de la mesure SERS en fonction de la distance de la cible à la surface d'or, une expérience est envisagée : il s'agit de positionner le marqueur SERS au niveau de bases différentes de la cible ADN. Lorsque l'hybridation aura lieu, le marqueur se trouvera ainsi à une distance variable de la surface en fonction de son greffage sur la cible.

De plus, la résonance des nanostructures de période 400 nm et de diamètre 200 nm sur la plage spectrale SPRI choisie (entre 750 et 850 nm) implique un angle de mesure externe élevé du fait de l'utilisation de lames de BK7. Pour améliorer l'imagerie, un matériau d'indice proche de celui du prisme en LAK34 retenu ($n=1,72$) sera plus adapté.

Une autre **perspective d'amélioration concernant la biopuce** est en cours de réalisation. Le but consiste à démontrer que la limite de détection du système couplé peut être améliorée par la localisation des molécules au niveau des zones de forte amplification de champ, autour des nanostructures. Pour obtenir ce résultat, un nouveau design de substrat va être testé. Il s'agit toujours d'un réseau de nanostructures sur un film d'or, mais désormais l'espace entre les nanodisques est comblé par la présence d'une couche de résine. Les molécules se fixeront uniquement sur le dessus des nanodisques d'or grâce à une double chimie bloquant la surface de résine par une SAM à base de silanes. Ainsi, le nombre de molécules cibles par unité de surface

devrait être augmenté, améliorant la sensibilité de la détection.

Une **perspective d'industrialisation du prototype** par l'entreprise Horiba pourra être envisagée si les conditions suivantes sont remplies :

- Des **substrats nanostructurés** doivent être disponibles et productibles à moindre coût et en grande quantité. Pour cela, la technique de fabrication par nano-impression doit être optimisée et appliquée à une production à grande échelle.
- **L'apport de l'instrument du point de vue biologique** doit être prouvé sur un modèle d'expérience biologique concret en milieu complexe. Pour le moment, la détection de molécules d'intérêt biomédical ou agro-alimentaire a été effectuée sur des appareils commerciaux de SPRI et de SERS. La validation finale de l'instrument devrait être effectuée durant les prochains mois sur ces différents modèles d'interaction analysés sur des biopuces nanostructurées. Le modèle le plus prometteur est celui impliquant l'interaction entre le biomarqueur du cancer MnSOD et l'aptamère associé.
- Enfin, ce nouveau type d'instrument de détection d'interactions entre molécules doit **intéresser des utilisateurs finaux externes au projet Piranex**. Il faut prouver que ce biocapteur est capable de répondre aux besoins des biologistes étudiant des biomarqueurs. Pour attirer l'attention d'utilisateurs potentiels, une campagne de communication est initiée par l'organisation d'un workshop par l'entreprise Horiba en juin 2017.

A.1 Diagramme d'Abbe

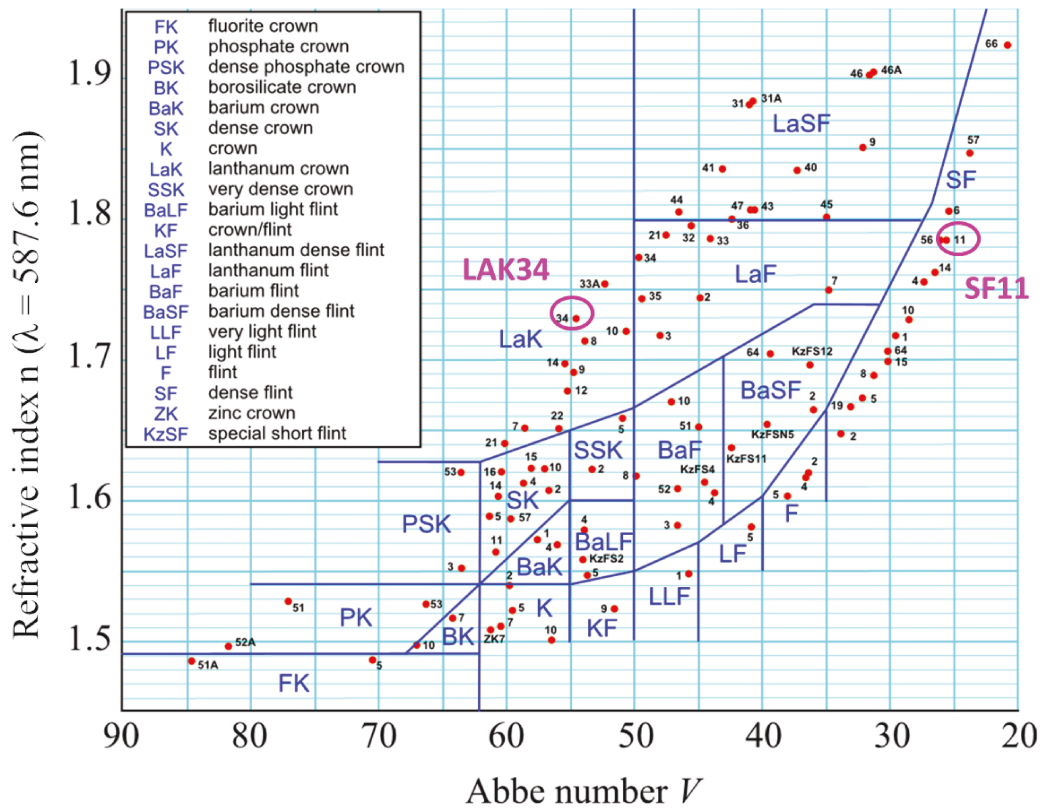


FIGURE A.1 – Diagramme d'Abbe regroupant l'ensemble des verres définis selon la nomenclature de Schott et classés en fonction de leur indice de réfraction, en ordonnée du graphe, et de leur nombre d'Abbe, en abscisse, renseignant sur leur dispersion.

A.2 Dispersion de la mesure en interrogation en intensité

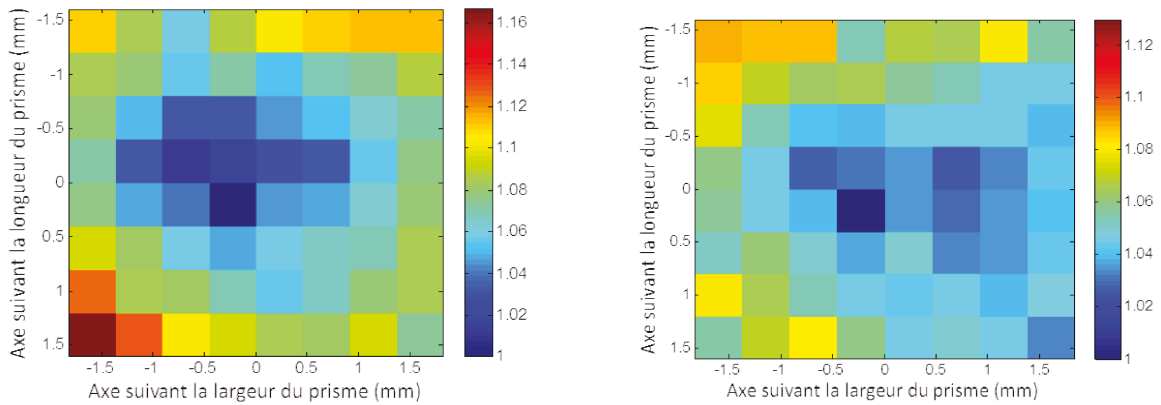
Ce paragraphe propose d'expliquer la corrélation entre signal en interrogation en intensité, sensibilité et valeur de la dérivée du profil de résonance.

Les signaux mesurés en variation de réflectivité suite à une variation d'indice de réfraction de 10^{-3} sur 64 régions du substrat d'or réparties sur une surface carrée de 1,5 mm de côté sont

comparés à la valeur de la dérivée de la résonance pour chaque ROI à l'angle de cinétique choisi en figure A.2.

Les signaux sont normalisés par la valeur minimale de variation de réflectivité obtenue en figure A.2a. Des signaux moins forts sont mesurés au centre de la puce, alors que les signaux en bordure de la zone analysée de la puce sont jusqu'à 15% plus importants.

Les valeurs de pente sont représentées sur la figure A.2b, également normalisées par la valeur minimale de pente obtenue, de façon à comparer plus aisément les résultats. La variation relative des valeurs de dérivée sur l'ensemble des ROI est du même ordre de grandeur que celle obtenue sur le signal mesuré, de l'ordre de 10%. De plus, les valeurs de dérivée les plus faibles sont également localisées au centre de la matrice, de la même façon que les zones de sensibilité plus faible sur la figure A.2a. Cela confirme que l'existence de valeurs de dérivée différentes à l'angle choisi pour la cinétique, et donc de conditions de résonance différentes sur le substrat doré, engendre une inhomogénéité du signal mesuré en variation de réflectivité.



(a) Dispersion de la mesure d'une variation d'indice en variation de réflectivité.

(b) Dispersion de la dérivée à l'angle de cinétique choisi.

FIGURE A.2 – Illustration de la dispersion de la sensibilité de la mesure en variation de réflectivité due au choix d'un point unique de fonctionnement.

Cette répartition du signal assez régulière de forme circulaire fait penser à un défaut d'illumination plus qu'à des inhomogénéités de dépôt d'or (il n'y a pas de chimie de surface sur le substrat utilisé). En effet, le faisceau lumineux utilisé sur la plupart des bancs de SPRI est collimaté. La collimation est particulièrement importante dans les systèmes de SPRI car le transfert entre énergie incidente et plasmon est maximisé lorsqu'une condition de résonance unique est satisfaite. Or, une divergence résiduelle persiste du fait de l'imperfection de la collimation. Par suite, le front d'onde non plan donné par ce faisceau divergent n'éclaire pas de façon uniforme l'ensemble de la puce. L'angle d'incidence sera légèrement différent d'un point à l'autre de la puce, ce qui explique la présence de conditions de résonance multiples.

Le choix d'un point unique de fonctionnement non optimal pour l'ensemble des ROI disperse donc le signal à travers la puce en mode d'interrogation en intensité.

Bibliographie

- [Abbas 2011] Abdennour Abbas, Matthew J Linman et Quan Cheng. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 5, pages 1815–1824, 2011. (Cité en page 35.)
- [Ahl 2008] Stefanie Ahl, Petra J Cameron, Jing Liu, Wolfgang Knoll, Jonah Erlebach et Fang Yu. A comparative plasmonic study of nanoporous and evaporated gold films. *Plasmonics*, vol. 3, no. 1, pages 13–20, 2008. (Cité en page 35.)
- [Amine 2006] Aziz Amine, Hasna Mohammadi, Ilhame Bourais et Giuseppe Palleschi. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 8, pages 1405–1423, 2006. (Cité en page 7.)
- [Baba 2004] Akira Baba, Shengjun Tian, Fernando Stefani, Chuanjun Xia, Zhehui Wang, Rigoberto C Advincula, Diethelm Johannsmann et Wolfgang Knoll. Electropolymerization and doping/dedoping properties of polyaniline thin films as studied by electrochemical-surface plasmon spectroscopy and by the quartz crystal microbalance. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 562, no. 1, pages 95–103, 2004. (Cité en page 42.)
- [Barbillon 2010] G Barbillon, F Hamouda, S Held, P Gogol et B Bartenlian. Gold nanoparticles by soft UV nanoimprint lithography coupled to a lift-off process for plasmonic sensing of antibodies. *Microelectronic Engineering*, vol. 87, no. 5, pages 1001–1004, 2010. (Cité en page 143.)
- [Bardin 2009] Fabrice Bardin, Alain Bellemain, Gisèle Roger et Michael Canva. Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 7, pages 2100–2105, 2009. (Cité en page 10.)
- [Barthelmebs 2011] Lise Barthelmebs, Justyna Jonca, Akhtar Hayat, Beatriz Prieto-Simon et Jean-Louis Marty. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin A in wine. *Food Control*, vol. 22, no. 5, pages 737–743, 2011. (Cité en pages 181, 182 et 184.)
- [Bartula 2008] Renata J Bartula et Scott T Sanders. Estimation of signal noise induced by multimode optical fibers. *Optical Engineering*, vol. 47, no. 3, pages 035002–035002, 2008. (Cité en page 104.)
- [Bashkatov 2003] Alexey N Bashkatov et Elina A Genina. Water refractive index in dependence on temperature and wavelength : a simple approximation. In *Saratov Fall Meeting 2002 : Optical Technologies in Biophysics and Medicine IV*, pages 393–395. International Society for Optics and Photonics, 2003. (Cité en page 91.)
- [Bérout 1998] Christophe Bérout et Thierry Soussi. p53 gene mutation : software and database. *Nucleic acids research*, vol. 26, no. 1, pages 200–204, 1998. (Cité en page 2.)
- [Beusink 2008] J Bianca Beusink, Angelique MC Lokate, Geert AJ Besselink, Ger JM Pruijn et Richard BM Schasfoort. Angle-scanning SPR imaging for detection of biomolecular interactions on microarrays. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, no. 6, pages 839–844, 2008. (Cité en page 9.)

Bibliographie

- [Bharill 2010] Shashank Bharill, Chunlai Chen, Benjamin Stevens, Jaskiran Kaur, Zeev Smilansky, Wlodek Mandecki, Ignacy Gryczynski, Zygmunt Gryczynski, Barry S Cooperman et Yale E Goldman. Enhancement of single-molecule fluorescence signals by colloidal silver nanoparticles in studies of protein translation. ACS nano, vol. 5, no. 1, pages 399–407, 2010. (Cité en page 44.)
- [Biener 2008] Juergen Biener, Gregory W Nyce, Andrea M Hodge, Monika M Biener, Alex V Hamza et Stefan A Maier. Nanoporous plasmonic metamaterials. Advanced Materials, vol. 20, no. 6, pages 1211–1217, 2008. (Cité en page 35.)
- [Bischel 2008] WK Bischel et G Black. Wavelength dependence of raman scattering cross sections from 200-600 nm. In Excimer Lasers—1983, volume 100, pages 181–187. AIP Publishing, 2008. (Cité en pages 48 et 113.)
- [Bottazzi 2014] Barbara Bottazzi, Lucia Fornasari, Ana Frangolho, Silvia Giudicatti, Alberto Mantovani, Franco Marabelli, Gerardo Marchesini, Paola Pellacani, Rita Therisod et Andrea Valsesia. Multiplexed label-free optical biosensor for medical diagnostics. Journal of biomedical optics, vol. 19, no. 1, pages 017006–017006, 2014. (Cité en page 36.)
- [Bryche 2015] Jean-François Bryche, Raymond Gillibert, Grégory Barbillon, Mitrad ep Sarkar, Anne-Lise Coutrot, Frédéric Hamouda, Abdelhanin Aassime, Julien Moreau, Marc Lamy de La Chapelle, Bernard Bartenlian et al. Density effect of gold nanodisks on the SERS intensity for a highly sensitive detection of chemical molecules. Journal of Materials Science, vol. 50, no. 20, pages 6601–6607, 2015. (Cité en pages 138, 143, 147 et 148.)
- [Bryche 2016a] Jean-François Bryche. Nanostructuration d’or pour la biodétection plasmonique et la diffusion Raman exaltée de surface : réalisation, caractérisation et modélisation. PhD thesis, Paris Saclay, 2016. (Cité en pages 38 et 142.)
- [Bryche 2016b] Jean-François Bryche, Raymond Gillibert, Grégory Barbillon, Philippe Gogol, Julien Moreau, Marc Lamy de La Chapelle, Bernard Bartenlian et Michael Canva. Plasmonic enhancement by a continuous gold underlayer : Application to sers sensing. Plasmonics, vol. 11, no. 2, pages 601–608, 2016. (Cité en pages 147 et 149.)
- [Byun 2007] Kyung Min Byun, Soon Joon Yoon, Donghyun Kim et Sung June Kim. Experimental study of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance biosensors by use of periodic metallic nanowires. Optics letters, vol. 32, no. 13, pages 1902–1904, 2007. (Cité en page 36.)
- [Byun 2013] Ju-Young Byun, Yong-Beom Shin, Taihua Li, Jin-Ho Park, Dong-Myung Kim, Dong-Hwan Choi et Min-Gon Kim. The use of an engineered single chain variable fragment in a localized surface plasmon resonance method for analysis of the C-reactive protein. Chemical Communications, vol. 49, no. 82, pages 9497–9499, 2013. (Cité en page 181.)
- [Campbell 2007] Charles T Campbell et Gbum Kim. SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. Biomaterials, vol. 28, no. 15, pages 2380–2392, 2007. (Cité en page 9.)
- [Chabot 2013] Vincent Chabot, Yannick Miron, Paul G Charette et Michel Grandbois. Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface

- plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50, pages 125–131, 2013. (Cité en page 44.)
- [Chamtouri 2013] Maha Chamtour. Etude exhaustive de la sensibilité des Biopuces plasmoniques structurées intégrant un réseau rectangulaire 1D : effet de la transition des plasmons localisés vers les plasmons propagatifs. PhD thesis, Université Paris Sud-Paris XI, 2013. (Cité en page 140.)
- [Chamtouri 2014a] Maha Chamtour, Anuj Dhawan, Mondher Besbes, Julien Moreau, Has-sen Ghalila, Tuan Vo-Dinh et Michael Canva. Enhanced SPR sensitivity with nano-micro-ribbon grating—an exhaustive simulation mapping. *Plasmonics*, vol. 9, no. 1, pages 79–92, 2014. (Cité en page 153.)
- [Chamtouri 2014b] Maha Chamtour, Mitraddeep Sarkar, Julien Moreau, Mondher Besbes, Has-sen Ghalila et Michael Canva. Field enhancement and target localization impact on the biosensitivity of nanostructured plasmonic sensors. *JOSA B*, vol. 31, no. 5, pages 1223–1231, 2014. (Cité en page 158.)
- [Chang 2010] Chia-Chen Chang, Nan-Fu Chiu, David Shenhsiung Lin, Yu Chu-Su, Yang-Hung Liang et Chii-Wann Lin. High-sensitivity detection of carbohydrate antigen 15-3 using a gold/zinc oxide thin film surface plasmon resonance-based biosensor. *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 4, pages 1207–1212, 2010. (Cité en page 35.)
- [Compagnini 1999] Giuseppe Compagnini, Clelia Galati et Salvatore Pignataro. Distance dependence of surface enhanced Raman scattering probed by alkanethiol self-assembled monolayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 1, no. 9, pages 2351–2353, 1999. (Cité en page 170.)
- [Cornelsen 2010] Matthias Cornelsen, Christiane A Helm et Stephan Block. Destabilization of polyelectrolyte multilayers formed at different temperatures and ion concentrations. *Macromolecules*, vol. 43, no. 9, pages 4300–4309, 2010. (Cité en page 154.)
- [Cottat 2015] Maximilien Cottat, Cristiano D’Andrea, Ryohei Yasukuni, Natalia Malashikhina, Ruta Grinyte, Nathalie Lidgi-Guigui, Barbara Fazio, Angela Sutton, Olivier Oudar, Nathalie Charnaux et al. High sensitivity, high selectivity SERS detection of MnSOD using optical nanoantennas functionalized with aptamers. *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 119, no. 27, pages 15532–15540, 2015. (Cité en pages 187, 188 et 189.)
- [David 2010] Catalina David, Nicolas Guillot, Hong Shen, Timothée Toury et Marc Lamy de La Chapelle. SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor. *Nanotechnology*, vol. 21, no. 47, page 475501, 2010. (Cité en page 137.)
- [Driskell 2006] Jeremy D Driskell, Robert J Lipert et Marc D Porter. Labeled gold nanoparticles immobilized at smooth metallic substrates : systematic investigation of surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 35, pages 17444–17451, 2006. (Cité en page 52.)
- [Duris 2000] D Duris et B Guyot. Café et contamination par l’ochratoxine A. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l’atelier international, CIRAD-FAO, pages 11–13, 2000. (Cité en page 28.)

Bibliographie

- [Ebbesen 1998] Thomas W Ebbesen, H J Lezec, HF Ghaemi, Tineke Thio et PA Wolff. Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays. *Nature*, vol. 391, no. 6668, pages 667–669, 1998. (Cité en page 36.)
- [Eftekhar 2009] Fatemeh Eftekhar, Carlos Escobedo, Jacqueline Ferreira, Xiaobo Duan, Emerson M Girotto, Alexandre G Brolo, Reuven Gordon et David Sinton. Nanoholes as nanochannels : flow-through plasmonic sensing. *Analytical chemistry*, vol. 81, no. 11, pages 4308–4311, 2009. (Cité en page 37.)
- [Ferreira 2008] Jacqueline Ferreira, Marcos JL Santos, Mohammad M Rahman, Alexandre G Brolo, Reuven Gordon, David Sinton et Emerson M Girotto. Attomolar protein detection using in-hole surface plasmon resonance. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, no. 2, pages 436–437, 2008. (Cité en page 37.)
- [Feuz 2010] Laurent Feuz, Peter Jonsson, Magnus P Jonsson et Fredrik Hook. Improving the limit of detection of nanoscale sensors by directed binding to high-sensitivity areas. *Acs Nano*, vol. 4, no. 4, pages 2167–2177, 2010. (Cité en pages 36, 37 et 158.)
- [Fleischmann 1974] Martin Fleischmann, Patrick J Hendra et AJ McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, vol. 26, no. 2, pages 163–166, 1974. (Cité en page 48.)
- [Fu 2009] Junxue Fu, Bosoon Park et Yiping Zhao. Limitation of a localized surface plasmon resonance sensor for Salmonella detection. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 141, no. 1, pages 276–283, 2009. (Cité en page 42.)
- [Geng 2013] Xia Geng, Dapeng Zhang, Hailin Wang et Qiang Zhao. Screening interaction between ochratoxin A and aptamers by fluorescence anisotropy approach. *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 405, no. 8, pages 2443–2449, 2013. (Cité en page 182.)
- [Grubisha 2003] Desiree S Grubisha, Robert J Lipert, Hye-Young Park, Jeremy Driskell et Marc D Porter. Femtomolar detection of prostate-specific antigen : an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Analytical chemistry*, vol. 75, no. 21, pages 5936–5943, 2003. (Cité en page 52.)
- [Guo 2008] Jing Guo, P Donald Keathley et JT Hastings. Dual-mode surface-plasmon-resonance sensors using angular interrogation. *Optics letters*, vol. 33, no. 5, pages 512–514, 2008. (Cité en page 9.)
- [Gutman 2006] Steven Gutman et Larry G Kessler. The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 7, pages 565–571, 2006. (Cité en page 2.)
- [Hanlon 2000] EB Hanlon, R Manoharan, T_W Koo, KE Shafer, JT Motz, M Fitzmaurice, JR Kramer, I Itzkan, RR Dasari et MS Feld. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in medicine and biology*, vol. 45, no. 2, page R1, 2000. (Cité en page 50.)
- [Hayat 2012] Akhtar Hayat, Nathalie Paniel, Amina Rhouati, Jean-Louis Marty et Lise Barthelmebs. Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control*, vol. 26, no. 2, pages 401–415, 2012. (Cité en page 182.)

- [He 2000] Lin He, Michael D Musick, Sheila R Nicewarner, Frank G Salinas, Stephen J Benkovic, Michael J Natan et Christine D Keating. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, no. 38, pages 9071–9077, 2000. (Cité en page 32.)
- [Heaton 2001] Richard J Heaton, Alexander W Peterson et Rosina M Georgiadis. Electrostatic surface plasmon resonance : direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 7, pages 3701–3704, 2001. (Cité en page 41.)
- [Henzie 2009] Joel Henzie, Jeunghoon Lee, Min Hyung Lee, Warefta Hasan et Teri W Odom. Nanofabrication of plasmonic structures*. *Annual review of physical chemistry*, vol. 60, pages 147–165, 2009. (Cité en page 38.)
- [Homola 2002] Jiri Homola, Jakub Dostalek, Shengfu Chen, Avraham Rasooly, Shaoyi Jiang et Sinclair S Yee. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *International journal of food microbiology*, vol. 75, no. 1, pages 61–69, 2002. (Cité en page 31.)
- [Hottin 2007] Jérôme Hottin, Julien Moreau, Gisèle Roger, Jolanda Spadavecchia, Marie-Claude Millot, Michel Goossens et Michael Canva. Plasmonic DNA : towards genetic diagnosis chips. *Plasmonics*, vol. 2, no. 4, pages 201–215, 2007. (Cité en pages 2 et 7.)
- [Hottin 2012] Jérôme Hottin, Julien Moreau, Alain Bellemain et Michael Canva. Biochip data normalization using multifunctional probes. *Analyst*, vol. 137, no. 13, pages 3119–3125, 2012. (Cité en pages 17 et 18.)
- [Hu 2004] WP Hu, S-J Chen, K-T Huang, JH Hsu, WY Chen, GL Chang et K-A Lai. A novel ultrahigh-resolution surface plasmon resonance biosensor with an Au nanocluster-embedded dielectric film. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, no. 11, pages 1465–1471, 2004. (Cité en page 51.)
- [Hugonin 2008] Jean-Paul Hugonin, Mondher Besbes et Philippe Lalanne. Hybridization of electromagnetic numerical methods through the G-matrix algorithm. *Optics letters*, vol. 33, no. 14, pages 1590–1592, 2008. (Cité en page 133.)
- [Inj] Points techniques de fluidique. [https ://www.idex-hs.com/education-and-tools/educational-materials/tech-tips](https://www.idex-hs.com/education-and-tools/educational-materials/tech-tips). (Cité en page 89.)
- [Iwasaki 2001] Yuzuru Iwasaki, Tsutomu Horiuchi et Osamu Niwa. Detection of electrochemical enzymatic reactions by surface plasmon resonance measurement. *Analytical chemistry*, vol. 73, no. 7, pages 1595–1598, 2001. (Cité en page 7.)
- [Junfeng 2005] Liu Junfeng, Ding Xiang, Yu Xinglong et Wang Dongsheng. Data analysis of surface plasmon resonance biosensor based on phase detection. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 108, no. 1, pages 778–783, 2005. (Cité en page 11.)
- [Kabashin 2009] Andrei V Kabashin, Sergiy Patskovsky et Alexander N Grigorenko. Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing. *Optics Express*, vol. 17, no. 23, pages 21191–21204, 2009. (Cité en page 10.)

Bibliographie

- [Karlsson 1995] Robert Karlsson et Ralph Stahlberg. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Analytical biochemistry*, vol. 228, no. 2, pages 274–280, 1995. (Cité en page 9.)
- [Karlsson 1997] Robert Karlsson et Anders Falt. Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *Journal of immunological methods*, vol. 200, no. 1, pages 121–133, 1997. (Cité en page 7.)
- [Kihm 2012] KD Kihm, S Cheon, JS Park, HJ Kim, JS Lee, IT Kim et HJ Yi. Surface plasmon resonance (SPR) reflectance imaging : Far-field recognition of near-field phenomena. *Optics and lasers in engineering*, vol. 50, no. 1, pages 64–73, 2012. (Cité en page 8.)
- [Kim 2007] Sook Jin Kim, K Vengatajalabathy Gobi, Hiroyuki Iwasaka, Hiroyuki Tanaka et Norio Miura. Novel miniature SPR immunosensor equipped with all-in-one multi-microchannel sensor chip for detecting low-molecular-weight analytes. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, no. 5, pages 701–707, 2007. (Cité en page 29.)
- [Kim 2010a] Aekyong Kim. Modulation of MnSOD in cancer : epidemiological and experimental evidence. *Toxicological research*, vol. 26, no. 2, page 83, 2010. (Cité en page 187.)
- [Kim 2010b] JongMin Kim, SeongHoon Kim, Tatsuya Ohashi, Hiroshi Muramatsu, Sang-Mok Chang et Woo-Sik Kim. Construction of simultaneous SPR and QCM sensing platform. *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 33, no. 1, pages 39–45, 2010. (Cité en page 41.)
- [Kneipp 1983] K Kneipp, G Hinzmann et D Fassler. Surface-enhanced raman scattering of polymethine dyes on silver colloidal particles. *Chemical physics letters*, vol. 99, no. 5-6, pages 503–506, 1983. (Cité en page 165.)
- [Kujawa 2005] Piotr Kujawa, Patricia Moraille, Jacqueline Sanchez, Antonella Badia et Françoise M Winnik. Effect of molecular weight on the exponential growth and morphology of hyaluronan/chitosan multilayers : A surface plasmon resonance spectroscopy and atomic force microscopy investigation. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, no. 25, pages 9224–9234, 2005. (Cité en page 44.)
- [Kulasingam 2008] Vathany Kulasingam et Eleftherios P Diamandis. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature clinical practice Oncology*, vol. 5, no. 10, pages 588–599, 2008. (Cité en page 2.)
- [Kurihara 2002] Kazuyoshi Kurihara, Kaori Nakamura et Koji Suzuki. Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 86, no. 1, pages 49–57, 2002. (Cité en page 176.)
- [Lahav 2004] Michal Lahav, Alexander Vaskevich et Israel Rubinstein. Biological sensing using transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *Langmuir*, vol. 20, no. 18, pages 7365–7367, 2004. (Cité en page 17.)
- [Lakowicz 2008] Joseph R Lakowicz, Krishanu Ray, Mustafa Chowdhury, Henryk Szmazinski, Yi Fu, Jian Zhang et Kazimierz Nowaczyk. Plasmon-controlled fluorescence : a new paradigm in fluorescence spectroscopy. *Analyst*, vol. 133, no. 10, pages 1308–1346, 2008. (Cité en page 44.)

- [Lalanne 2007] P Lalanne, M Besbes, JP Hugonin, S Van Haver, OTA Janssen, AM Nugrowati, M Xu, SF Pereira, HP Urbach, AS Van de Nes et al. Numerical analysis of a slit-groove diffraction problem. Journal of the European Optical Society-Rapid Publications, vol. 2, 2007. (Cité en page 133.)
- [Law 2007] Wing-Cheung Law, Przemyslaw Markowicz, Ken-Tye Yong, Indrajit Roy, Alexander Baev, Sergiy Patskovsky, Andrei V Kabashin, Ho-Pui Ho et Paras N Prasad. Wide dynamic range phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on measuring the modulation harmonics. Biosensors and Bioelectronics, vol. 23, no. 5, pages 627–632, 2007. (Cité en page 10.)
- [Le Ru 2007] EC Le Ru, E Blackie, Matthias Meyer et Pablo G Etchegoin. Surface enhanced Raman scattering enhancement factors : a comprehensive study. The Journal of Physical Chemistry C, vol. 111, no. 37, pages 13794–13803, 2007. (Cité en pages 48 et 130.)
- [Le Ru 2013] Eric C Le Ru et Pablo G Etchegoin. Quantifying SERS enhancements. MRS bulletin, vol. 38, no. 08, pages 631–640, 2013. (Cité en page 48.)
- [Lecaruyer 2006] Pierre Lecaruyer, Emmanuel Maillart, Michael Canva et Jannick Rolland. Generalization of the Rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance. Applied optics, vol. 45, no. 33, pages 8419–8423, 2006. (Cité en pages 13, 131 et 155.)
- [Li 2005] Lingyan Li, Shengfu Chen, Jie Zheng, Buddy D Ratner et Shaoyi Jiang. Protein adsorption on oligo (ethylene glycol)-terminated alkanethiolate self-assembled monolayers : the molecular basis for nonfouling behavior. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 109, no. 7, pages 2934–2941, 2005. (Cité en page 27.)
- [Li 2006a] Guangyong Li, Ning Xi et Donna H Wang. Probing membrane proteins using atomic force microscopy. Journal of cellular biochemistry, vol. 97, no. 6, pages 1191–1197, 2006. (Cité en page 43.)
- [Li 2006b] Yuan Li, Hye Jin Lee et Robert M Corn. Fabrication and characterization of RNA aptamer microarrays for the study of protein–aptamer interactions with SPR imaging. Nucleic acids research, vol. 34, no. 22, pages 6416–6424, 2006. (Cité en page 7.)
- [Liebermann 2000] Thorsten Liebermann et Wolfgang Knoll. Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 171, no. 1, pages 115–130, 2000. (Cité en page 45.)
- [Liedberg 1983] Bo Liedberg, Claes Nylander et Ingemar Lunström. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sensors and actuators, vol. 4, pages 299–304, 1983. (Cité en page 25.)
- [Liu 2010] Yu Liu, Shuping Xu, Bin Tang, Ye Wang, Ji Zhou, Xianliang Zheng, Bing Zhao et Weiqing Xu. Note : Simultaneous measurement of surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering. Review of scientific instruments, vol. 81, no. 3, page 036105, 2010. (Cité en page 52.)
- [Liu 2011] Li Liu, Yan-yan Chen, Yong-hong Meng, She Chen et Gang Jin. Improvement for sensitivity of biosensor with total internal reflection imaging ellipsometry (TIRIE). Thin Solid Films, vol. 519, no. 9, pages 2758–2762, 2011. (Cité en page 42.)

Bibliographie

- [Lofås 1990] Stefan Lofås et Bo Johnsson. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, no. 21, pages 1526–1528, 1990. (Cité en page 27.)
- [Lu 2009] Xianmao Lu, Matthew Rycenga, Sara E Skrabalak, Benjamin Wiley et Younan Xia. Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. *Annual review of physical chemistry*, vol. 60, pages 167–192, 2009. (Cité en page 36.)
- [Ludwig 2005] Joseph A Ludwig et John N Weinstein. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 11, pages 845–856, 2005. (Cité en page 2.)
- [Luo 2014] Shyh-Chyang Luo, Kundan Sivashanmugan, Jiunn-Der Liao, Chih-Kai Yao et Han-Chi Peng. Nanofabricated SERS-active substrates for single-molecule to virus detection in vitro : A review. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 61, pages 232–240, 2014. (Cité en page 50.)
- [Luppa 2001] Peter B Luppa, Lori J Sokoll et Daniel W Chan. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, vol. 314, no. 1, pages 1–26, 2001. (Cité en page 7.)
- [Lyon 1998] L Andrew Lyon, Michael D Musick et Michael J Natan. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 24, pages 5177–5183, 1998. (Cité en page 32.)
- [Maaroof 2007] AI Maaroof, A Gentle, GB Smith et MB Cortie. Bulk and surface plasmons in highly nanoporous gold films. *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 40, no. 18, page 5675, 2007. (Cité en page 35.)
- [Maillart 2004a] Emmanuel Maillart. Développement d’un système optique d’imagerie en résonance de plasmons de surface pour l’analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. PhD thesis, Paris 11, 2004. (Cité en pages 8, 20, 69 et 109.)
- [Maillart 2004b] Emmanuel Maillart, Karen Brengel-Pesce, Delphine Capela, Andre Roget, Thierry Livache, Michael Canva, Yves Levy et Thierry Soussi. Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging : application to p53 and DNA interaction. *Oncogene*, vol. 23, no. 32, pages 5543–5550, 2004. (Cité en page 2.)
- [Maiti 2011] Kaustabh Kumar Maiti, Animesh Samanta, Marc Vendrell, Kiat-Seng Soh, Malini Olivo et Young-Tae Chang. Multiplex cancer cell detection by SERS nanotags with cyanine and triphenylmethine Raman reporters. *Chemical communications*, vol. 47, no. 12, pages 3514–3516, 2011. (Cité en pages 165 et 180.)
- [Malic 2011] Lidija Malic, Marinella G Sandros et Maryam Tabrizian. Designed biointerface using near-infrared quantum dots for ultrasensitive surface plasmon resonance imaging biosensors. *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 13, pages 5222–5229, 2011. (Cité en page 33.)
- [Malicka 2003] Joanna Malicka, Ignacy Gryczynski, Zygmunt Gryczynski et Joseph R Lakowicz. Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dye-labeled oligonucleotides. *Analytical biochemistry*, vol. 315, no. 1, pages 57–66, 2003. (Cité en pages 165 et 170.)

- [Manesse 2009] Mael Manesse, Rosendo Sanjines, Valerie Stambouli, Corentin Jorel, Bernard Pelissier, Marcin Pisarek, Rabah Boukherroub et Sabine Szunerits. Preparation and characterization of silver substrates coated with antimony-doped SnO₂ thin films for surface plasmon resonance studies. *Langmuir*, vol. 25, no. 14, pages 8036–8041, 2009. (Cité en page 35.)
- [Mauriz 2007] Elba Mauriz, A Calle, JJ Manclus, A Montoya et Laura M Lechuga. Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides. *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 387, no. 4, pages 1449–1458, 2007. (Cité en page 2.)
- [Meyer 2011] Stefan A Meyer, Eric C Le Ru et Pablo G Etchegoin. Combining surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy with surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 6, pages 2337–2344, 2011. (Cité en page 52.)
- [Meyer 2012] Stefan A Meyer, Baptiste Augu , Eric C Le Ru et Pablo G Etchegoin. Combined SPR and SERS microscopy in the Kretschmann configuration. *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 116, no. 3, pages 1000–1007, 2012. (Cité en page 53.)
- [Micheletto 2008] Ruggero Micheletto, Katsumi Hamamoto, Takashi Fujii et Yoichi Kawakami. Tenfold improved sensitivity using high refractive-index substrates for surface plasmon sensing. *Applied Physics Letters*, vol. 93, no. 17, page 174104, 2008. (Cité en page 35.)
- [Mizuta 2010] Yutaka Mizuta, Takeshi Onodera, Praveen Singh, Kiyoshi Matsumoto, Norio Miura et Kiyoshi Toko. Highly sensitive detection of TNT using a poly (amidoamine) dendron-based SPR immunosensor. *Sensors and Materials*, vol. 22, no. 4, pages 193–200, 2010. (Cité en page 46.)
- [Mullett 2000] Wayne M Mullett, Edward PC Lai et Jupiter M Yeung. Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods*, vol. 22, no. 1, pages 77–91, 2000. (Cité en page 7.)
- [Nedelkov 2000] Dobrin Nedelkov et Randall W Nelson. Exploring the limit of detection in biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS) : detection of attomole amounts of native proteins present in complex biological mixtures. *Analytica chimica acta*, vol. 423, no. 1, pages 1–7, 2000. (Cité en page 46.)
- [Nestler 2012] Peter Nestler, Stephan Block et Christiane A Helm. Temperature-induced transition from odd–even to even–odd effect in polyelectrolyte multilayers due to interpolyelectrolyte interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 116, no. 4, pages 1234–1243, 2012. (Cité en pages 154 et 155.)
- [Nikitin 1997] Petr I Nikitin, AA Beloglazov, MV Valeiko, JA Creighton, AM Smith, NAJM Sommerdijk et John D Wright. Silicon-based surface plasmon resonance chemical sensors. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 38, no. 1, pages 53–57, 1997. (Cité en page 50.)
- [Nylander 1982] Claes Nylander, Bo Liedberg et Tommy Lind. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators*, vol. 3, pages 79–88, 1982. (Cité en page 2.)
- [Obeid 2016] Sameh Obeid, Adam Ceroy, Guillaume Mourey, Philippe Saas, Celine Elie-Caille et Wilfrid Boireau. Development of a NanoBioAnalytical platform for " on-chip" qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. (Cité en page 43.)

Bibliographie

- [Otsuki 2010] Soichi Otsuki et Mitsuru Ishikawa. Wavelength-scanning surface plasmon resonance imaging for label-free multiplexed protein microarray assay. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 1, pages 202–206, 2010. (Cité en pages 10 et 74.)
- [Ouellet 2010] Eric Ouellet, Christopher Lausted, Tao Lin, Cheng Wei T Yang, Leroy Hood et Eric T Lagally. Parallel microfluidic surface plasmon resonance imaging arrays. *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 5, pages 581–588, 2010. (Cité en page 31.)
- [Palazon 2014] Francisco Palazon, Cindy Montenegro Benavides, Didier Leonard, Eliane Souteyrand, Yann Chevolot et Jean-Pierre Cloarec. Carbodiimide/NHS derivatization of COOH-terminated SAMs : activation or byproduct formation ? *Langmuir*, vol. 30, no. 16, pages 4545–4550, 2014. (Cité en pages 14 et 161.)
- [Peluso 2003] Paul Peluso, David S Wilson, Duc Do, Huu Tran, Maanasa Venkatasubbaiah, David Quincy, Bettina Heidecker, Kelli Poindexter, Neil Tolani, Michael Phelan et al. Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Analytical biochemistry*, vol. 312, no. 2, pages 113–124, 2003. (Cité en page 26.)
- [Pieper-Furst 2005] Ursula Pieper-Furst, Walter FM Stocklein et Axel Warsinke. Gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance measurement with a highly sensitive quantification for human tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Analytica chimica acta*, vol. 550, no. 1, pages 69–76, 2005. (Cité en pages 31, 32 et 34.)
- [Pike 2012] Douglas J Pike, Nikil Kapur, Paul A Millner et Douglas I Stewart. Flow cell design for effective biosensing. *Sensors*, vol. 13, no. 1, pages 58–70, 2012. (Cité en page 90.)
- [Piliarik 2009a] Marek Piliarik et Jiri Homola. Surface plasmon resonance (SPR) sensors : approaching their limits ? *Optics express*, vol. 17, no. 19, pages 16505–16517, 2009. (Cité en pages 26 et 29.)
- [Piliarik 2009b] Marek Piliarik, Lucie Parova et Jiri Homola. High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 5, pages 1399–1404, 2009. (Cité en page 2.)
- [Piunno 2005] Paul AE Piunno et Ulrich J Krull. Trends in the development of nucleic acid biosensors for medical diagnostics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 381, no. 5, pages 1004–1011, 2005. (Cité en page 7.)
- [Qi 2014] Ji Qi, Jianbo Zeng, Fusheng Zhao, Steven Hsesheng Lin, Balakrishnan Raja, Ulrich Strych, Richard C Willson et Wei-Chuan Shih. Label-free, in situ SERS monitoring of individual DNA hybridization in microfluidics. *Nanoscale*, vol. 6, no. 15, pages 8521–8526, 2014. (Cité en pages 165, 180 et 181.)
- [Ran 2008] Chunbo Ran, Guqiao Ding, Weichang Liu, Yan Deng et Wentao Hou. Wetting on nanoporous alumina surface : transition between Wenzel and Cassie states controlled by surface structure. *Langmuir*, vol. 24, no. 18, pages 9952–9955, 2008. (Cité en page 145.)
- [Rhouati 2013] Amina Rhouati, Cheng Yang, Akhtar Hayat et Jean-Louis Marty. Aptamers : A promising tool for ochratoxin A detection in food analysis. *Toxins*, vol. 5, no. 11, pages 1988–2008, 2013. (Cité en page 181.)

- [Rodriguez-Cobo 2012] Luis Rodriguez-Cobo, Mauro Lomer, Carlos Galindez et José Miguel Lopez-Higuera. Speckle characterization in multimode fibers for sensing applications. In *SPECKLE 2012 : V International Conference on Speckle Metrology*, pages 84131R–84131R. International Society for Optics and Photonics, 2012. (Cité en page 104.)
- [Ruemmele 2013] Julia A Ruemmele, W Paige Hall, Laura K Ruvuna et Richard P Van Duyne. A localized surface plasmon resonance imaging instrument for multiplexed biosensing. *Analytical chemistry*, vol. 85, no. 9, pages 4560–4566, 2013. (Cité en page 10.)
- [Ruffato 2011] G Ruffato, F Romanato, D Garoli et S Cattarin. Nanoporous gold plasmonic structures for sensing applications. *Optics express*, vol. 19, no. 14, pages 13164–13170, 2011. (Cité en page 35.)
- [Sapsford 2002] Kim E Sapsford, Paul T Charles, Charles H Patterson et Frances S Ligler. Demonstration of four immunoassay formats using the array biosensor. *Analytical chemistry*, vol. 74, no. 5, pages 1061–1068, 2002. (Cité en pages 32 et 34.)
- [Sarkar 2015a] Mitradeep Sarkar. Modes plasmoniques hybrides de surface dans des nano-structures métalliques : Théorie, analyse numérique rigoureuse et leur application à la bio-détection par des expériences de résonance des plasmons de surface. PhD thesis, Paris Saclay, 2015. (Cité en pages 75 et 133.)
- [Sarkar 2015b] Mitradeep Sarkar, Mondher Besbes, Julien Moreau, Jean-Francois Bryche, Aurore Olivero, Gregory Barbillon, Anne-Lise Coutrot, Bernard Bartenlian et Michael Canva. Hybrid plasmonic mode by resonant coupling of localized plasmons to propagating plasmons in a Kretschmann configuration. *ACS photonics*, vol. 2, no. 2, pages 237–245, 2015. (Cité en pages 140 et 147.)
- [Sarrazin 2003] Michaël Sarrazin, Jean-Pol Vigneron et Jean-Marie Vigoureux. Role of Wood anomalies in optical properties of thin metallic films with a bidimensional array of subwavelength holes. *Physical Review B*, vol. 67, no. 8, page 085415, 2003. (Cité en page 138.)
- [Scarano 2010] Simona Scarano, Marco Mascini, Anthony PF Turner et Maria Minunni. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, vol. 25, no. 5, pages 957–966, 2010. (Cité en page 14.)
- [Schweiss 2005] Rüdiger Schweiss, Jörn F Lübben, Diethelm Johannsmann et Wolfgang Knoll. Electropolymerization of ethylene dioxythiophene (EDOT) in micellar aqueous solutions studied by electrochemical quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance. *Electrochimica acta*, vol. 50, no. 14, pages 2849–2856, 2005. (Cité en page 42.)
- [Sereda 2014a] Alexandra Sereda. Imagerie multi-spectrale par résonance des plasmons de surface : développement et applications. PhD thesis, Université Paris Sud-Paris XI, 2014. (Cité en pages 21, 59, 65 et 75.)
- [Sereda 2014b] Alexandra Sereda, Julien Moreau, Michael Canva et Emmanuel Maillart. High performance multi-spectral interrogation for surface plasmon resonance imaging sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 54, pages 175–180, 2014. (Cité en page 10.)
- [Shabani 2013] Arghavan Shabani et Maryam Tabrizian. Design of a universal biointerface for sensitive, selective, and multiplex detection of biomarkers using surface plasmon resonance imaging. *Analyst*, vol. 138, no. 20, pages 6052–6062, 2013. (Cité en page 2.)

Bibliographie

- [Shalabney 2011] Atef Shalabney et Ibrahim Abdulhalim. Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors. *Laser & Photonics Reviews*, vol. 5, no. 4, pages 571–606, 2011. (Cité en page 9.)
- [Shankaran 2007] Dheshingh Ravi Shankaran, K Vengatajalabathy Gobi et Norio Miura. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 121, no. 1, pages 158–177, 2007. (Cité en page 28.)
- [Shim 2008] Sangdeok Shim, Christina M Stuart et Richard A Mathies. Resonance Raman Cross-Sections and Vibronic Analysis of Rhodamine 6G from Broadband Stimulated Raman Spectroscopy. *ChemPhysChem*, vol. 9, no. 5, pages 697–699, 2008. (Cité en page 130.)
- [Singh 2006] Bipin K Singh et Andrew C Hillier. Surface plasmon resonance imaging of biomolecular interactions on a grating-based sensor array. *Analytical chemistry*, vol. 78, no. 6, pages 2009–2018, 2006. (Cité en page 131.)
- [Song 2008] Shiping Song, Lihua Wang, Jiang Li, Chunhai Fan et Jianlong Zhao. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, no. 2, pages 108–117, 2008. (Cité en page 7.)
- [Soussi 2000] Thierry Soussi. Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur p53. 2000. (Cité en page 2.)
- [Spadavecchia 2005] J Spadavecchia, MG Manera, F Quaranta, P Siciliano et R Rella. Surface plasmon resonance imaging of DNA based biosensors for potential applications in food analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 6, pages 894–900, 2005. (Cité en page 2.)
- [Spadavecchia 2009] Jolanda Spadavecchia, Julien Moreau, Jérôme Hottin et Michael Canva. New cysteamine based functionalization for biochip applications. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 143, no. 1, pages 139–143, 2009. (Cité en pages 15 et 16.)
- [Springer 2010] Tomas Springer, Marek Pilarik et Jiri Homola. Surface plasmon resonance sensor with dispersionless microfluidics for direct detection of nucleic acids at the low femtomole level. *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 145, no. 1, pages 588–591, 2010. (Cité en page 30.)
- [Squires 2008] Todd M Squires, Robert J Messinger et Scott R Manalis. Making it stick : convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature biotechnology*, vol. 26, no. 4, pages 417–426, 2008. (Cité en page 29.)
- [Subramanian 2006] Anand Subramanian, Joseph Irudayaraj et Thomas Ryan. A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157 : H7. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 7, pages 998–1006, 2006. (Cité en pages 17 et 28.)
- [Tetz 2006] Kevin A Tetz, Lin Pang et Yeshaiah Fainman. High-resolution surface plasmon resonance sensor based on linewidth-optimized nanohole array transmittance. *Optics Letters*, vol. 31, no. 10, pages 1528–1530, 2006. (Cité en page 37.)

- [Thomas 2012] Weston Thomas et Christopher Middlebrook. Speckle Reduction in Imaging Projection Systems. Optics and Photonics Journal, vol. 2, no. 04, page 338, 2012. (Cité en page 104.)
- [Uchida 2005] Katsumi Uchida, Hidenori Otsuka, Mitsuhiro Kaneko, Kazunori Kataoka et Yukio Nagasaki. A reactive poly (ethylene glycol) layer to achieve specific surface plasmon resonance sensing with a high S/N ratio : the substantial role of a short underbrushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption. Analytical chemistry, vol. 77, no. 4, pages 1075–1080, 2005. (Cité en page 17.)
- [Vance 2014] Stephen A Vance et Marinella G Sandros. Zeptomole detection of C-reactive protein in serum by a nanoparticle amplified surface plasmon resonance imaging aptasensor. Scientific reports, vol. 4, 2014. (Cité en page 33.)
- [Wang 1998] Lingli Wang, Theo Tschudi, Thorsteinn Halldorsson et Palmi R Petursson. Speckle reduction in laser projection systems by diffractive optical elements. Applied optics, vol. 37, no. 10, pages 1770–1775, 1998. (Cité en page 104.)
- [Wang 2007] Zhuangzhi Wang, Thomas Wilkop, Danke Xu, Yi Dong, Guangyu Ma et Quan Cheng. Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer–protein interactions with PDMS microfluidic chips. Analytical and bioanalytical chemistry, vol. 389, no. 3, pages 819–825, 2007. (Cité en page 30.)
- [Wang 2011] Yixian Wang, Zunzhong Ye, Chengyan Si et Yibin Ying. Subtractive inhibition assay for the detection of E. coli O157 : H7 using surface plasmon resonance. Sensors, vol. 11, no. 3, pages 2728–2739, 2011. (Cité en page 34.)
- [Weeber 2004] Jean-Claude Weeber, Yvon Lacroute, Alain Dereux, Eloïse Devaux, Thomas Ebbesen, Christian Girard, María Ujué González et Anne-Laure Baudrion. Near-field characterization of Bragg mirrors engraved in surface plasmon waveguides. Physical Review B, vol. 70, no. 23, page 235406, 2004. (Cité en page 36.)
- [Westphal 2002] Peter Westphal et Antje Bornmann. Biomolecular detection by surface plasmon enhanced ellipsometry. Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 84, no. 2, pages 278–282, 2002. (Cité en page 42.)
- [Wijaya 2011] Edy Wijaya, Cédric Lenaerts, Sophie Maricot, Juriy Hastanin, Serge Habracken, Jean-Pierre Vilcot, Rabah Boukherroub et Sabine Szunerits. Surface plasmon resonance-based biosensors : From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. Current Opinion in Solid State and Materials Science, vol. 15, no. 5, pages 208–224, 2011. (Cité en pages 14, 26 et 27.)
- [Willems 2007] Katherine A Willems et Richard P Van Duyne. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. Annu. Rev. Phys. Chem., vol. 58, pages 267–297, 2007. (Cité en page 36.)
- [Wright 1995] John D Wright, Arielle Cado, Stanley J Peacock, Vincent Rivalle et Ann M Smith. Effects of nitrogen dioxide on surface plasmon resonance of substituted phthalocyanine films. Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 29, no. 1, pages 108–114, 1995. (Cité en page 2.)
- [Wu 2015] Changyu Wu, Fawad ur Rehman, Jingyuan Li, Jing Ye, Yuanyuan Zhang, Meina Su, Hui Jiang et Xuemei Wang. Real-Time Evaluation of Live Cancer Cells by an in

-
- Situ Surface Plasmon Resonance and Electrochemical Study. ACS applied materials & interfaces, vol. 7, no. 44, pages 24848–24854, 2015. (Cité en page 40.)
- [Yamanaka 1973] N Yamanaka et D Deamer. Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures : effects of age, trypsinization and SV-40 transformation. Physiological chemistry and physics, vol. 6, no. 2, pages 95–106, 1973. (Cité en page 181.)
- [Yang 1985] J-P Yang et RH Callender. The resonance Raman spectra of some cyanine dyes. Journal of Raman spectroscopy, vol. 16, no. 5, pages 319–321, 1985. (Cité en page 165.)
- [Ye 1997] Qi Ye, Jianxin Fang et Li Sun. Surface-enhanced Raman scattering from functionalized self-assembled monolayers. 2. Distance dependence of enhanced Raman scattering from an azobenzene terminal group. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 101, no. 41, pages 8221–8224, 1997. (Cité en page 170.)
- [Yih 2004] Jenq-Nan Yih, Shean-Jen Chen, Kun-Tsai Huang, Y-T Su et G-Y Lin. A compact surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering sensing device. In Biomedical Optics 2004, pages 5–9. International Society for Optics and Photonics, 2004. (Cité en pages 47, 51 et 131.)
- [Yoon 2006] Seong Kee Yoon, Geoff W Fichtl et Paul JA Kenis. Active control of the depletion boundary layers in microfluidic electrochemical reactors. Lab on a Chip, vol. 6, no. 12, pages 1516–1524, 2006. (Cité en page 30.)
- [Yu 2005] Qiuming Yu, Shengfu Chen, Allen D Taylor, Jiri Homola, Bertold Hock et Shaoyi Jiang. Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 107, no. 1, pages 193–201, 2005. (Cité en pages 28 et 34.)
- [Yu 2006] Fang Yu, Stefanie Ahl, Anne-Marie Caminade, Jean-Pierre Majoral, Wolfgang Knoll et Jonah Erlebacher. Simultaneous excitation of propagating and localized surface plasmon resonance in nanoporous gold membranes. Analytical chemistry, vol. 78, no. 20, pages 7346–7350, 2006. (Cité en page 35.)
- [Zhang 2007] Nan Zhang, Rüdiger Schweiss, Yun Zong et Wolfgang Knoll. Electrochemical surface plasmon spectroscopy—recent developments and applications. Electrochimica acta, vol. 52, no. 8, pages 2869–2875, 2007. (Cité en page 42.)
- [Zhou 2011] Weimin Zhou, Guoquan Min, Jing Zhang, Yanbo Liu, Jinhe Wang, Yanping Zhang et Feng Sun. Nanoimprint lithography : a processing technique for nanofabrication advancement. Nano-Micro Letters, vol. 3, no. 2, pages 135–140, 2011. (Cité en page 143.)

Remerciements

Je remercie Michael, Julien, Denis et Emmanuel de m'avoir sélectionnée et fait confiance pour réaliser cette thèse CIFRE grâce à la collaboration entre le laboratoire Charles Fabry et l'entreprise Horiba Jobin-Yvon. J'ai beaucoup apprécié prendre part à la fois à la vie du laboratoire et à l'environnement industriel, tout en travaillant à l'interface entre physique et biochimie. L'alchimie entre ces deux acteurs, académiques et industriels, a été très harmonieuse grâce à l'entente historique entre Emmanuel et l'équipe de Michael, ce qui m'a permis de m'intégrer aussi bien d'un côté que de l'autre. Arrivée un peu par hasard à la décision de faire une thèse, je ne regrette aucunement cette expérience enrichissante, autant humainement que scientifiquement.

Merci à Emmanuel et Julien de m'avoir guidée au quotidien pendant ces trois années, de m'avoir fait partager votre expérience d'ingénierie et scientifique et d'avoir été disponibles pour répondre à toutes mes questions. Sans vous, je n'aurais pas été bien loin ! Ça a été un vrai plaisir de vous rencontrer et une chance d'apprendre à vos côtés. J'admire votre excellence et vos compétences ! Votre sourire et votre bonne humeur sont précieux.

Je remercie naturellement mes examinateurs (Loïc et Béatrice) et rapporteurs (Thérèse et Eric) de m'avoir délivré ce diplôme et d'avoir rédigé un compte-rendu exceptionnel qui représente une reconnaissance et un aboutissement de mon travail. Ces mots remarquables m'ont touché et concluent cette expérience en apothéose.

La réussite de ces travaux interdisciplinaires repose sur l'implication de nombreuses personnes expertes dans différents domaines avec qui j'ai beaucoup interagi, que je voudrais remercier ici :

- Mitradeep, pour ton savoir en plasmonique théorique et numérique,
- Jean-François, pour ton savoir-faire en nano-fabrication,
- Raymond, pour ton expertise en SERS et les quelques sessions expérimentales que nous avons réalisées ensemble,
- Karen, pour m'avoir formée à mon arrivée chez Horiba et pour ton expérience en chimie et biologie
- Jean-Pierre et Salomé, pour leurs travaux sur la chimie de surface.

Il a été très agréable et enrichissant de travailler avec vous et d'explorer vos domaines de compétences.

L'aboutissement de ce projet n'aurait pu survenir sans le financement ANR qui a permis de regrouper cinq laboratoires et une entreprise. Je remercie l'ensemble de ces partenaires qui ont tous contribué à la progression du projet, et que je cite brièvement (en espérant n'oublier personne !) par organisme de rattachement :

- LCF : Mitradeep, Julien, Michael, Mondher
- Horiba : Emmanuel, Karen, Chiraz, Elodie, Catalina, Emmanuel F
- IEF/C2N : Jean-François, Bernard, Grégory
- CSPBAT : Raymond, Marc

- INL : Jean-Pierre, Salomé, Francisco, Eliane
- IAQA : Douglas

J'ai été heureuse de faire partie de cette grande famille et de prendre part à nos regroupements durant lesquels les idées fusaient.

Toute ma reconnaissance également au groupe de Biophotonique du laboratoire qui m'a accueilli chaleureusement pendant ces trois années : Michael, Julien, Mitradeep, Nathalie B, Flavie, Jonas, Karen, Nathalie W, Arnaud, Frédéric, Antoine. Des remerciements particuliers à Alex, qui m'a passée le flambeau et initiée à l'art de la SPRI en me transmettant son savoir-faire à la fin de sa thèse. Nous avons passé de longues heures dans le noir à expérimenter et à debugger. A deux, ces moments ont été rendus beaucoup plus joyeux ! Merci d'avoir été une co-bureau enthousiaste et accueillante, toujours prête à me donner un coup de main. Tu m'as impressionnée par ta détermination, ta persévérance et ta perspicacité. Tu as été une source d'inspiration et un modèle !

Merci à Mitradeep pour ta bonne humeur constante et toute l'aide que tu m'as apportée. Tes éternels débats sur tous les sujet possibles auront animé nos repas de groupe d'une façon originale ! Frédéric, j'ai été heureuse de faire un bout de chemin avec toi et de découvrir la culture québécoise. Tu m'as tenu compagnie dans les derniers moments difficiles de la thèse, et j'espère n'avoir pas été trop insupportable à vivre. Jonas, j'ai beaucoup apprécié nos discussions, ton tempérament calme et ta gentillesse extrême.

Je suis très heureuse d'avoir vécu cette aventure simultanément avec Flavie, du début à la fin, des galères aux joies partagées. Ça a été une réelle chance de te découvrir et d'avoir pu bénéficier de ton soutien au fil de ces trois années. Je te remercie d'avoir été à mon écoute et de m'avoir motivée à me mettre au yoga.

J'ai également été très chanceuse de rencontrer Nathalie, pleine de dynamisme et d'enthousiasme ! Nos sessions musicales ont été un immense plaisir, un bol d'air frais pour l'esprit et l'occasion de se remettre à pratiquer.

Grâce à notre trio féminin de choc (cela est assez rare dans un laboratoire de physique), cette expérience a été épanouissante autant d'un point de vue scientifique qu'humain !

De bons moments me resteront aussi du temps passé à l'entreprise, autour d'un repas ou d'un café, ou pour réaliser des expériences sur le prototype. La convivialité est de mise chez Horiba ! Merci en particulier à l'équipe de SPRI pour leur accueil et leur gentillesse : Emmanuel, Karen, Géraldine, Geoffrey, Cécile, Fatima, Chiraz, Samia, Elodie, Liêm, Michèle, Chantal et Inès. Même si j'ai passé peu de temps sur le site de l'entreprise, il a été très facile de m'intégrer dans le groupe car vous êtes tous très avenants.

Je voudrais aussi mentionner les personnes qui se sont intéressées à mon travail et que j'ai appris à connaître au fil de discussions de couloir : Sylvie, Minh-Châu, Vincent, Patrick, Mondher, Marie-Christine, Benjamin et Mauro. Merci aux personnes des ateliers d'optique, de mécanique et d'électronique (Christian, Sophie, André, Frédéric), toujours disposées à trouver des solutions efficaces et rapides à nos problèmes.

Un grand merci à tous pour votre implication dans mon doctorat et dans mon quotidien au laboratoire et à l'entreprise. Sans vos conseils, votre soutien, votre excellence ou votre sourire, je n'aurais pas pu aller aussi loin !

Pour finir, je remercie mes parents, qui m'ont inculqué le goût de la science et m'ont accompagnée et encouragée durant toutes mes (longues) études. Merci à Sean, qui s'est occupé de moi avec attention, et qui a eu la patience d'attendre la fin de ce diplôme avant de se lancer dans ses propres projets vers l'étranger. Désolée des quelques sautes d'humeur et de la tension extrême que tu as dû subir à mes côtés à certaines moments ! Heureusement que tu étais présent pour calmer mes nerfs et me changer les idées quand j'en avais besoin.

En guise de conclusion et d'interlude après cette lecture technique, place à cet extrait de théâtre de la Jalousie du Barbouillé datant de 1660, qui fait écho au grade de docteur et le tourne en dérision. Ce cher Molière avait bien raison sur certains points ! Bravo pour l'interprétation de Benjamin et de Sean. Dédicace à mon père :

SCÈNE 1 :

LE BARBOUILLÉ - Il faut avouer que je suis le plus malheureux de tous les hommes. J'ai une femme qui me fait enrager : au lieu de me donner du soulagement et de faire les choses à mon souhait, elle me fait donner au diable vingt fois le jour ; au lieu de se tenir à la maison, elle aime la promenade, la bonne chère, et fréquente je ne sais quelle sorte de gens. Ah ! pauvre barbouillé, que tu es misérable ! Il faut pourtant la punir. Si je la tuais... L'invention ne vaut rien [1] , car tu serais pendu. Si tu la faisais mettre en prison... La carogne en sortirait avec son passe-partout. Que diable faire donc ? Mais voilà Monsieur le Docteur qui passe par ici : il faut que je lui demande un bon conseil sur ce que je dois faire.

SCÈNE 2 :

LE DOCTEUR, LE BARBOUILLÉ.

LE BARBOUILLÉ - Je m'en allais vous chercher pour vous faire une prière sur une chose qui m'est d'importance.

LE DOCTEUR - Il faut que tu sois bien mal appris, bien lourdaud, et bien mal morigéné , mon ami, puisque tu m'abordes sans ôter ton chapeau, sans observer rationem loci, temporis et personæ. Quoi ? débiter d'abord par un discours mal digéré, au lieu de dire : Salve, vel salvus sis, Doctor, Doctorum eruditissime ! Hé ! pour qui me prends-tu, mon ami ?

LE BARBOUILLÉ - Ma foi, excusez-moi : c'est que j'avais l'esprit en écharpe, et je ne songeais pas à ce que je faisais ; mais je sais bien que vous êtes galant homme.

LE DOCTEUR - Sais-tu bien d'où vient le mot de galant homme ?

LE BARBOUILLÉ - Qu'il vienne de Villejuif ou d'Aubervilliers, je ne m'en soucie guère.

LE DOCTEUR - Sache que le mot de galant homme vient d'élégant ; prenant le g et l'a de la dernière syllabe, cela fait ga, et puis prenant l, ajoutant un a et les deux dernières lettres, cela fait galant, et puis ajoutant homme, cela fait galant homme. Mais encore pour qui me prends-tu ?

LE BARBOUILLÉ - Je vous prends pour un docteur. Or çà, parlons un peu de l'affaire que je vous veux proposer. Il faut que vous sachiez...

LE DOCTEUR - Sache auparavant que je ne suis pas seulement un docteur, mais que je suis une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, et dix fois docteur : 1) Parce que, comme l'unité est la base, le fondement, et le premier de tous les nombres, aussi, moi, je suis le premier de tous les docteurs, le docte des doctes. 2) Parce qu'il y a deux facultés nécessaires pour la parfaite connaissance de toutes choses : le sens et l'entendement ; et comme je suis tout sens et tout entendement, je suis deux fois docteur.

LE BARBOUILLÉ - D'accord. C'est que...

LE DOCTEUR - 3) Parce que le nombre de trois est celui de la perfection, selon Aristote ; et comme je suis parfait, et que toutes mes productions le sont aussi, je suis trois fois docteur.

LE BARBOUILLÉ - Hé bien ! Monsieur le Docteur...

LE DOCTEUR - 4) Parce que la philosophie a quatre parties : la logique, morale, physique et métaphysique ; et comme je les possède toutes quatre, et que je suis parfaitement versé en icelles, je suis quatre fois docteur.

LE BARBOUILLÉ - Que diable ! je n'en doute pas. Écoutez-moi donc.

LE DOCTEUR - 5) Parce qu'il y a cinq universelles : le genre, l'espèce, la différence, le propre et l'accident, sans la connaissance desquels il est impossible de faire aucun bon raisonnement ; et comme je m'en sers avec avantage, et que j'en connais l'utilité, je suis cinq fois docteur.

LE BARBOUILLÉ - Il faut que j'aie bonne patience.

LE DOCTEUR - 6) Parce que le nombre de six est le nombre du travail ; et comme je travaille incessamment pour ma gloire, je suis six fois docteur.

LE BARBOUILLÉ - Ho ! parle tant que tu voudras.

LE DOCTEUR - 7) Parce que le nombre de sept est le nombre de la félicité ; et comme je possède une parfaite connaissance de tout ce qui peut rendre heureux, et que je le suis en effet

par mes talents, je me sens obligé de dire de moi-même : O ter quatuorque beatum !

8) Parce que le nombre de huit est le nombre de la justice, à cause de l'égalité qui se rencontre en lui, et que la justice et la prudence avec laquelle je mesure et pèse toutes mes actions me rendent huit fois docteur.

9) parce qu'il y a neuf muses, et que je suis également chéri d'elles.

10) parce que, comme on ne peut passer le nombre de dix sans faire une répétition des autres nombres, et qu'il est le nombre universel, aussi, aussi, quand on m'a trouvé, on a trouvé le docteur universel : je contiens en moi tous les autres docteurs. Ainsi tu vois par des raisons plausibles, vraies, démonstratives et convaincantes, que je suis une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, et dix fois docteur.

LE BARBOUILLÉ - Que diable est ceci ? je croyais trouver un homme bien savant, qui me donnerait un bon conseil, et je trouve un ramoneur de cheminée qui, au lieu de me parler, s'amuse à jouer à la mourre. Un, deux, trois, quatre, ha, ha, ha ! - Oh bien ! ce n'est pas cela : c'est que je vous prie de m'écouter, et croyez que je ne suis pas un homme à vous faire perdre vos peines, et que si vous me satisfaisiez sur ce que je veux de vous, je vous donnerai ce que vous voudrez ; de l'argent, si vous en voulez.

LE DOCTEUR - Hé ! de l'argent.

LE BARBOUILLÉ - Oui, de l'argent, et toute autre chose que vous pourriez demander.

LE DOCTEUR, troussant sa robe derrière son cul - Tu me prends donc pour un homme à qui l'argent fait tout faire, pour un homme attaché à l'intérêt, pour une âme mercenaire ? Sache, mon ami, que quand tu me donnerais une bourse pleine de pistoles, et que cette bourse serait dans une riche boîte, cette boîte dans un étui précieux, cet étui dans un coffret admirable, ce coffret dans un cabinet curieux, ce cabinet dans une chambre magnifique, cette chambre dans un appartement agréable, cet appartement dans un château pompeux, ce château dans une citadelle incomparable, cette citadelle dans une ville célèbre, cette ville dans une île fertile, cette île dans une province opulente, cette province dans une monarchie florissante, cette monarchie dans tout le monde ; et que tu me donnerais le monde où serait cette monarchie florissante, où serait cette province opulente, où serait cette île fertile, où serait cette ville célèbre, où serait cette citadelle incomparable, où serait ce château pompeux, où serait cet appartement agréable, où serait cette chambre magnifique, où serait ce cabinet curieux, où serait ce coffret admirable, où serait cet étui précieux, où serait cette riche boîte dans laquelle serait enfermée la bourse pleine de pistoles, que je me soucierais aussi peu de ton argent et de toi que de cela.

LE BARBOUILLÉ - Ma foi, je m'y suis mépris : à cause qu'il est vêtu comme un médecin, j'ai cru qu'il lui fallait parler d'argent ; mais puisqu'il n'en veut point, il n'y a rien de plus aisé que de le contenter. Je m'en vais courir après lui.

Titre : Développement d'un instrument plasmonique bimodal couplant SPRI et SERS pour la détection et l'identification de molécules biologiques.

Mots clés : Instrumentation optique, Plasmonique, SPRI, SERS, Biopuce nanostructurée, Interactions biomoléculaires.

Résumé : L'imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRI) est une technique d'analyse d'interactions moléculaires présentant de nombreux avantages. Elle peut être appliquée en temps réel et sans marquage, pour étudier un grand nombre d'interactions simultanément sur un même échantillon. La transduction d'un événement d'interaction entre deux molécules complémentaires en un signal optique, repose sur la perturbation de l'onde plasmonique évanescence créée à la surface d'un film métallique mince.

Toutefois, bien que la mesure SPR soit directe et sans marquage, sa spécificité repose entièrement sur celle des molécules sondes déposées à la surface de la puce et donc sur la chimie ayant servi à les immobiliser. Cette limitation devient problématique pour adresser les grands enjeux de santé actuels, liés à la détection de molécules à l'état de traces. En particulier, de nouveaux systèmes d'analyse plus sensibles sont requis pour pouvoir diagnostiquer le cancer au plus tôt, ou encore détecter la présence de contaminants agro-alimentaires en faible concentration.

Dans cette perspective d'amélioration de la spécificité de détection, ce travail porte sur la mise au point d'un instrument bimodal couplant la SPRI, capable de quantifier la capture de molécules cibles, à la Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (SERS), qui permet d'identifier la nature des molécules capturées en déterminant leur « empreinte » moléculaire. Cette thèse s'inscrit dans un projet ANR regroupant un consortium de partenaires académiques et un industriel.

Ce document se concentre sur le développement de l'instrument optique combinant les deux systèmes de détection en un seul prototype. La mesure SPRI est réalisée en configuration Kretschmann, tandis que l'analyse SERS s'effectue par le dessus, en milieu liquide, à travers un hublot. Ces deux mesures simultanées sont rendues possibles grâce à la mise au point d'un substrat métallique nanostructuré. Une caractérisation détaillée du système optique est tout d'abord présentée, puis de premiers résultats de validation de la mesure bimodale sur un cas modèle d'interaction biomoléculaire ADN sont démontrés. Ces expériences prometteuses confirment le fonctionnement de l'instrument bimodal dans la perspective d'applications d'intérêt biologique.

Title : Development of a bimodal plasmonic instrument coupling SPRI and SERS for the detection and identification of biological molecules.

Keywords : Optical instrumentation, Plasmonics, SPRI, SERS, Nanostructured biochip, Biomolecular interactions.

Abstract : Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) is a powerful technique to study molecular interactions providing a real time, label free and high throughput analysis. The transduction of an interaction between complementary molecules into an optical signal is based on the perturbation of a plasmonic evanescent wave supported by a thin metallic film.

However, despite its direct and label free assets, the specificity of SPR measurements is only guaranteed by the probe molecules grafted on the metallic surface and therefore by the quality of the surface chemistry. This limitation becomes an issue when addressing major health concerns relying on the detection of trace molecules. In particular, new systems are required to help early diagnosis and the control of food contaminants.

In view of improving measurement's specificity, this work reports the development of a bimodal instrument coupling SPRI, allowing the quantification of captured molecules, with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), adding the precise identification of the molecules by measuring their spectroscopic fingerprint. This PhD is part of an ANR project bringing together academic and industrial partners.

This manuscript focuses on the development of the optical instrument combining the two detection systems in a unique prototype. SPRI measurements are performed in the Kretschmann configuration while SERS analysis is implemented from the top, in solution, through a glass window. Nanostructured substrates have been designed and realized to allow the simultaneous experiment. The optical system is described, characterized and validated on the model case of a DNA hybridization. These first results prove the capabilities of the bimodal instrument in the perspective of more complex biological applications.