HAL
open science

Imagerie multi-spectrale par résonance des plasmons de surface : développement et applications

Alexandra Sereda

To cite this version:

Alexandra Sereda. Imagerie multi-spectrale par résonance des plasmons de surface : développement et applications. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112321 . tel-01127017

HAL Id: tel-01127017

https://theses.hal.science/tel-01127017v1

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 422 :
Sciences et Technologies de l'Information, des Télécommunications et des Systèmes

Laboratoire Charles Fabry
HORIBA Scientific

THÈSE DE DOCTORAT

PHYSIQUE

par

Alexandra SEREDA

Imagerie Multi-Spectrale par Résonance des Plasmons de Surface : Développement et Applications

---

Date de soutenance : **25.11.2014**

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Michael CANVA	Directeur de Recherche	Laboratoire Charles Fabry
Président :	Thierry LIVACHE	Directeur de Recherche	Commissariat à l'Energie Atomique
Rapporteurs :	Wilfrid BOIREAU	Chargé de Recherche	FEMTO-ST
	Paul CHARETTE	Professeur	Université de Sherbrooke
Examinateurs :	Patrick ENGLAND	Chargé de Recherche	Institut Pasteur
	Sandrine LÉVÊQUE-FORT	Chargée de Recherche	Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay
Membres invités :	Emmanuel MAILLART	Ingénieur	HORIBA Scientific
	Julien MOREAU	Maître de Conférence	Laboratoire Charles Fabry

Sommaire

Introduction générale **5**

Partie I Introduction aux biocapteurs et au phénomène de résonance des plasmons de surface **7**

Chapitre 1 Qu'est-ce qu'un biocapteur ? **9**

1.1 Introduction à la biodétection 10

1.1.1 La transduction, base de la biodétection 10

1.1.2 Quelques exemples de biocapteurs 11

1.2 Quelques notions de plasmonique 13

1.2.1 Un peu de physique... 13

1.2.2 Quelques détails techniques... 16

1.3 La biodétection plasmonique 19

1.3.1 Une ingénierie dédiée à la bio-interaction 20

1.3.2 Quelques exemples d'application 26

Chapitre 2 Implémentation des biocapteurs plasmoniques **33**

2.1 Imagerie et temps réel : l'interrogation en réflectivité 34

2.2 L'interrogation angulaire 37

2.3 L'interrogation spectrale 39

2.4 L'interrogation en phase 41

2.5 Quelle méthode choisir ? 43

Partie II Développement d'un système de SPRI multi-spectrale **45**

Chapitre 3 Etat de l'art de l'interrogation spectrale **47**

3.1 Configurations basées sur un élément diffractant 48

3.2 Configurations basées sur un balayage spectral 50

3.3 Autres implémentations rencontrées 51
3.4 Quelle configuration retenir ? 52

Chapitre 4 Nous avons l'imagerie, mais le temps réel ? 55
4.1 Quelques mots sur le banc expérimental 56
4.1.1 Principe de fonctionnement général 57
4.1.2 L'interrogation spectrale en temps réel 59
4.2 Reconstruction du profil de la résonance plasmon 62
4.3 Résolution et nombre de longueurs d'onde 64
4.3.1 Etude expérimentale de la résolution en interrogation multi-spectrale 64
4.3.2 Détermination des limitations du système 67
4.4 Dynamique de mesure 74
4.5 Résolution temporelle 79

Chapitre 5 Validation de l'interrogation multi-spectrale 83
5.1 Evaluation du gain en dynamique de mesure 84
5.2 Evaluation du gain en dispersion des données 85
5.3 Application à la biodétection 87
5.3.1 Quelques détails sur les aspects "chimie" et "biologie" des expériences... 87
5.3.2 Résultats des mesures de cinétiques ADN-ADN 90
5.4 Transposition à l'interrogation multi-angulaire 93
5.4.1 Evaluation de la résolution en interrogation multi-angulaire 94
5.4.2 Evaluation de la dynamique de mesure en interrogation multi-angulaire 95

Conclusion et perspectives 97

Partie III Source à LEDs pour l'illumination multi-spectrale 99

Chapitre 6 Un peu d'ingénierie... 101
6.1 Des composants pour un système d'illumination multi-spectrale à bas coût . 102
6.2 Quelques considérations techniques... 103
6.3 Intégration du dispositif multi-LEDs au système de SPRI 107

Chapitre 7 Caractérisation et optimisation du système d'illumination multi-LEDs 109
7.1 Bruit en intensité et bruit de photon 110
7.2 Stabilité en longueur d'onde et résolution 115
7.2.1 Etude théorique 116

7.2.2 Etude expérimentale 119
7.3 Effet du combineur à fibres optiques 124

Chapitre 8 Validation du système d'interrogation multi-LEDs et perspectives 127
8.1 Des performances en biodétection satisfaisantes 127
8.1.1 Fonctionnalisation et protocole expérimental 128
8.1.2 Résultats des mesures de cinétiques ADN-ADN 129
8.2 Et des améliorations possibles ? 130
8.2.1 Stabilité en température de la source 130
8.2.2 Collection de l'illumination multi-spectrale 133

Conclusion et perspectives 135

Partie IV Applications et perspectives 137

Chapitre 9 Détection de marqueurs potentiels du cancer en milieu complexe 139
9.1 Le cancer et le rôle du système ubiquitine-protéasome 140
9.1.1 La détection des marqueurs du cancer 140
9.1.2 Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome 142
9.2 Approche expérimentale de la détection de marqueurs intervenant dans le système ubiquitine-protéasome 144
9.2.1 Réactifs et fonctionnalisation 144
9.2.2 Conditions expérimentales en interrogation multi-spectrale par SPR . 147
9.2.3 Déroulement de l'étude 148
9.3 Résultats 149
9.3.1 Détection des antigènes en tampon phosphate 149
9.3.2 Détection des antigènes en sérum dilué 156
9.3.3 Régénération des complexes antigène/anticorps 163
9.4 Conclusion des expériences de détection en milieu complexe et perspectives . 167

Chapitre 10 SPRI et SERS : le projet ANR PIRANEX 169
10.1 Principe général 170
10.2 Quelques mots sur la spectroscopie Raman exaltée de surface 171
10.2.1 La diffusion Raman 171
10.2.2 L'effet SERS 173
10.3 Modélisation des échantillons nanostructurés et validation expérimentale . . . 173

10.3.1 Validation d'un substrat commun 174
10.3.2 Etudes préliminaires des propriétés plasmoniques 177
10.4 Conclusions des résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet ANR PIRANEX 181

Conclusion générale **183**

Annexe A Extraction et traitement des données en interrogation multi-spectrale 187

A.1 Principe général 187
A.2 Création de l'image "masque" 188
A.2.1 Définition des paramètres de la matrice 189
A.2.2 Seuillage 189
A.2.3 Extraction des valeurs de réflectivité 190
A.3 Ajustement pseudo-Lorentzien 192

Annexe B Caractérisation du bruit thermique en interrogation multi-spectrale 195

Annexe C Fonctionnalisation des biopuces et interactions ADN-ADN **197**
C.1 Protocole de fonctionnalisation chimique des biopuces 197
C.1.1 Protocole de nettoyage des lames d'or 198
C.1.2 Protocole de chimie cystéamine 198
C.1.3 Préparation des solutions de spotting 200
C.2 Séquences ADN cibles et sondes 201

Annexe D Données expérimentales de la détection de marqueurs du cancer en milieu complexe **203**
D.1 Détection des antigènes en tampon phosphate 203
D.1.1 Première série d'expériences 203
D.1.2 Deuxième série d'expériences 208
D.2 Détection des antigènes en sérum dilué 213
D.3 Régénération des complexes antigène/anticorps 215

Bibliographie **219**

Introduction générale

Le cancer constitue la première cause de mortalité en France. Malgré cette incidence élevée, le diagnostic de cette pathologie reste relativement difficile, et nécessite le plus souvent une combinaison de plusieurs méthodes de détection. De plus, les traitements appliqués imposent très souvent des effets secondaires lourds aux personnes atteintes. Face à ces enjeux de santé publique, l'étude des mécanismes génétiques, protéiques et cellulaires représente à l'heure actuelle une voie de recherche active dans les domaines biomédical et pharmaceutique pour détecter, comprendre et traiter cette maladie complexe.

En réponse à ces préoccupations sanitaires, des outils de biodétection adaptés ont été mis en oeuvre. Dans ce contexte, les biocapteurs plasmoniques connaissent aujourd'hui un essor particulièrement important : de plus en plus de sociétés, telles que HORIBA Scientific, proposent des prototypes commerciaux, destinés tant à des utilisateurs du domaine de la recherche que de l'industrie.

Exploitant le phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR), la biodétection plasmonique repose sur l'extrême sensibilité d'une onde évanescente se propageant à l'interface entre un film d'or, appelé biopuce et support de l'information biochimique, et le milieu diélectrique couvrant, siège des interactions biomoléculaires étudiées. De manière plus concrète, toute adsorption de matériel biologique se produisant à cette interface entraîne une modification importante des propriétés optiques d'un faisceau de lumière réfléchi par la biopuce : le principe de transduction par SPR consiste alors à mesurer directement ces variations.

Différents modes de lecture de ces propriétés peuvent être implémentés, comme en témoigne la variété des configurations rencontrées à l'heure actuelle. Parmi les plus fréquentes, l'interrogation en réflectivité est basée sur le suivi des variations de l'intensité réfléchie, pour un faisceau incident de longueur d'onde et d'angle fixes sur la biopuce. Cette méthode offre ainsi la possibilité de réaliser une mesure cinétique, avec un débit de données élevé mais souffre cependant d'une limitation inhérente à son mode de fonctionnement, affectant la qualité des données dans des conditions de détection complexes.

De ce point de vue, l'interrogation spectrale offre une alternative intéressante, par la mesure du spectre du faisceau réfléchi pour un angle d'incidence fixe. L'information ainsi délivrée offre alors une précision et une dynamique de mesure inégalées, mais ce au détriment du multiplexage des données.

Face aux exigences posées par de nombreuses applications, du diagnostic d'une mutation génétique ponctuelle à la détection de contaminants alimentaires présents à l'état de traces, un développement instrumental a été initié, dans le but de proposer un nouveau mode de lecture des biopuces plasmoniques : l'interrogation multi-spectrale. Présentée dans ce manuscrit, cette méthode vise à combiner les avantages de l'interrogation en réflectivité, soit une capacité d'ima-

gerie de la biopuce et une mesure en temps réel, à celles de l'interrogation spectrale, en termes de qualité de mesure.

Afin d'appréhender les enjeux de ces développements instrumentaux, la première partie de ce manuscrit est consacrée à une introduction générale de la biodétection et du potentiel offert par les biocapteurs plasmoniques dans ce domaine. En particulier, un aperçu des applications possibles de ces systèmes permet de dégager quelques critères de performance. L'implémentation de la méthode d'interrogation multi-spectrale, présentée dans la deuxième partie, s'efforce ainsi de répondre aux souhaits exprimés, à travers une caractérisation théorique et expérimentale précise des limitations du système. Les résultats prometteurs obtenus lors de cette étude permettent également d'envisager un montage expérimental simplifié, à moindre coût : le développement d'une source multi-spectrale sur la base de 5 diodes électro-luminescentes est abordé dans la troisième partie. Validée dans le cadre d'interactions ADN-ADN, la méthode implémentée est particulièrement avantageuse vis-à-vis des configurations actuelles : quelques perspectives offertes par ces travaux sont ainsi évoquées dans la quatrième et dernière partie de ce document.

Première partie

Introduction aux biocapteurs et au phénomène de résonance des plasmons de surface

Chapitre 1

Qu'est-ce qu'un biocapteur ?

Sommaire

1.1 Introduction à la biodétection 10
1.1.1 La transduction, base de la biodétection 10
1.1.2 Quelques exemples de biocapteurs 11
1.2 Quelques notions de plasmonique 13
1.2.1 Un peu de physique... 13
1.2.2 Quelques détails techniques... 16
1.3 La biodétection plasmonique 19
1.3.1 Une ingénierie dédiée à la bio-interaction 20
1.3.2 Quelques exemples d'application 26

La définition peut sembler relativement intuitive : un biocapteur est un système permettant de « capter », de détecter une espèce ou un évènement biochimique. A l'heure actuelle, il existe de nombreux domaines d'application, avec des besoins de détection spécifiques, et une grande variété de biocapteurs adaptés à chaque utilisation.

Dépistage du VIH, test de grossesse, mais également surveillance des eaux, détection de contaminants agro-alimentaires : tout repose sur un principe de fonctionnement commun. Le signal biochimique à détecter correspond à une interaction entre une espèce biologique recherchée et un récepteur qui lui est spécifique. Un biocapteur a alors le rôle de transducteur, car il doit traduire cette interaction en un signal électrique, mécanique ou optique, facilement mesurable par les techniques de détection qui existent à l'heure actuelle.

Les performances d'un biocapteur reposent naturellement sur la méthode de transduction mise en place, mais également, et avant tout, sur la fiabilité et la spécificité de l'interaction permettant de capturer l'espèce ciblée. La biopuce, support de cette information biologique, joue donc un rôle déterminant dans l'efficacité du biocapteur.

Quelles sont alors les performances attendues des systèmes de lecture de ces biopuces ? Sensibilité, limite de détection, rapidité, criblage à haut débit ? Dans ce cadre, les capteurs exploitant le phénomène de résonance des plasmons de surface offrent des perspectives particulièrement intéressantes : des prototypes commerciaux sont actuellement disponibles sur le marché, et constituent une réponse fiable face aux besoins des analyses quotidiennes qui nécessitent rapidité et multiplexage. Cependant, une limitation inhérente à leur mode de fonctionnement rend ces systèmes peu robustes dans des conditions de détection plus complexes. Cette limitation a motivé le développement instrumental exposé dans ce manuscrit, qui sera abordé en détail dans les

deuxième et troisième parties.

Cette première partie introductive vise à définir les notions de base de la biodétection et des capteurs plasmoniques, pour une meilleure compréhension de la problématique et des aspects expérimentaux explicités dans la suite de ce manuscrit.

Un premier chapitre, consacré à la résonance des plasmons de surface, permet de donner une vue d'ensemble du large champ d'application de ce phénomène pour la biodétection. De manière plus concrète, l'implémentation expérimentale des capteurs plasmoniques, leurs performances et limites, sont abordés dans le second chapitre de cette partie.

1.1 Introduction à la biodétection

1.1.1 La transduction, base de la biodétection

Un biocapteur permet de détecter la présence d'une espèce biologique : il peut s'agir d'un fragment d'ADN, d'une protéine, voire d'une cellule, ou plus simplement d'une biomolécule quelconque, telle qu'un polluant ou un contaminant alimentaire... Le principe de son fonctionnement repose sur la transduction : le signal biochimique, soit la présence ou l'absence de l'espèce cible, est traduit en un signal physique mesurable, quantifiable, par les détecteurs actuels. La biopuce est l'élément-clé qui renferme l'information sur la présence ou l'absence de la molécule cible. Il s'agit d'un support physique contenant des ligands, des molécules dites "sondes" censées reconnaître de manière spécifique les composés biologiques "cibles" à détecter. Dans le cas présent, la notion de "molécules sondes" ne se limite pas seulement à des espèces moléculaires telles que les acides nucléiques, les protéines... Elle comprend au sens large tout composé biologique jouant un rôle de récepteur spécifique de l'espèce recherchée : micro-organismes, organites cellulaires... De la même manière, la notion de "molécules cibles" désigne de manière générale l'analyte recherché : ADN, hormone, bactérie...

Un biocapteur peut alors être défini comme une combinaison de trois éléments (Figure 1.1) : la biopuce, le transducteur, et le détecteur.

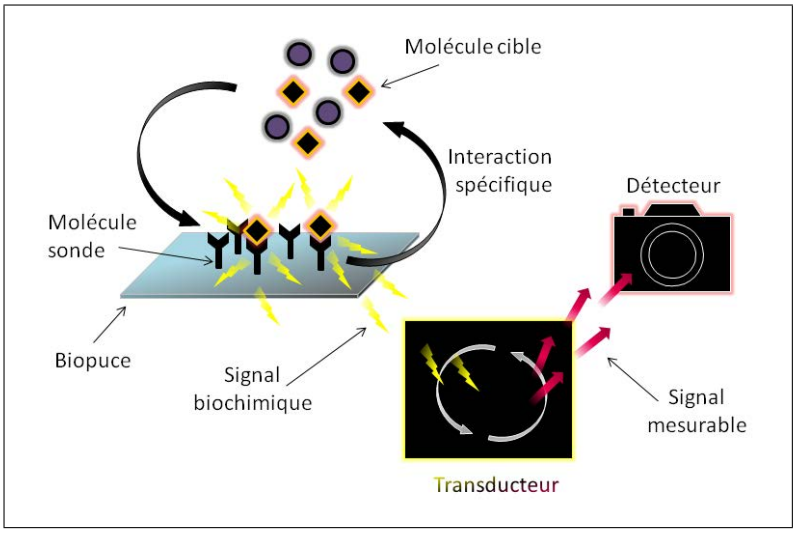


FIGURE 1.1 – **Principe de fontionnement d'un biocapteur.** Les molécules cibles interagissent de manière spécifique avec les molécules sondes greffées sur la biopuce. Cette interaction constitue un signal biochimique qui est capté par un élément transducteur puis converti en un signal mesurable par un détecteur.

La Figure 1.1 ci-dessus permet de décrire de manière simple le fonctionnement d'un biocapteur. La réalité est bien entendu plus complexe, car pour offrir les meilleures conditions de détection, les trois éléments de base (biopuce, transducteur, détecteur) doivent être optimisés. Par exemple, il est indispensable de s'assurer de la spécificité du signal enregistré : en d'autres termes, est-on sûr de ne détecter que les composés recherchés ? Ou d'autres espèces présentes dans l'échantillon à analyser se sont-elles adsorbées de manière non spécifique à la surface de la biopuce ? Cette remarque permet d'entrevoir toute l'ingénierie liée à la bio-interaction elle-même : le développement d'un protocole de fonctionnalisation chimique de la biopuce, la sélection des ligands sondes pour être capable de différencier, par la suite, les signaux spécifiques et non spécifiques...

En complément de ces considérations de bio-ingénierie, le système de lecture lui-même doit être adapté à la biopuce et à la bio-interaction analysée. A l'heure actuelle, il en existe une grande variété : les biocapteurs piézoélectriques [1], électrochimiques [2], acoustiques [3]... ou encore ceux à lecture optique, donc font partie la fluorescence [4] et la plasmonique [5]. Ces différentes techniques, présentées de manière succincte dans le paragraphe suivant, permettent de rendre compte des performances atteintes aujourd'hui dans le domaine de la biodétection.

1.1.2 Quelques exemples de biocapteurs

Malgré la grande diversité des méthodes de transduction existantes, des propriétés communes permettent de juger de manière objective de l'efficacité d'un biocapteur. La limite de détection, très souvent premier critère de sélection avancé, correspond à la quantité minimale de molécules cibles pouvant être détectées par un biocapteur. Dans la littérature, cette donnée est généralement exprimée en termes de concentration molaire (mol/L) ou massique (g/L) des solutions injectées à la surface de la biopuce : dans ce cas, elle dépend de manière implicite des performances du système de fluidique utilisé pour la circulation de l'échantillon, ou encore du choix des espèces sondes greffées sur la biopuce. Pour une comparaison plus directe du point de vue instrumental, une autre expression peut être adoptée : la concentration surfacique (pg/mm^2) des cibles adsorbées sur la surface analysée par le biocapteur.

D'autre part, face à une demande grandissante d'analyses de routine pouvant être menées de manière parallèle, le caractère multiplexe représente également une part importante dans la sélection d'un biocapteur.

Selon ces critères, la lecture par fluorescence représente naturellement une solution particulièrement attrayante : alliant limite de détection très basse, de l'ordre de 1 fg/mm^2 [6], et débit de données élevé, allant jusqu'à 10^6 analyses simultanées [7], cette méthode performante est désormais bien établie à l'échelle industrielle [8]. Une sensibilité à l'échelle de la molécule unique peut également être atteinte [9], mais dans des configurations expérimentales particulières, et incompatibles avec un format de biopuce. Cependant, la nécessité d'une étape de marquage à la fois coûteuse en temps et susceptible d'altérer la bio-interaction étudiée, et la difficulté d'une lecture en temps réel (la mesure étant réalisée une fois l'état d'équilibre cible-sonde atteint), constituent des limitations importantes rendant cette méthode inadaptée à certaines applications. Pour cette raison, d'autres techniques, dites "sans marquage" ont été développées [10].

Parmi les plus couramment employées, la transduction piézoélectrique, électrochimique ou encore celle acoustique, exploitent directement la modification d'une propriété physique (en l'occurrence, la fréquence d'oscillation d'un cristal piézoélectrique, le courant provenant d'une réaction d'oxydoréduction et le déphasage d'une onde acoustique de surface, respectivement) induite par l'adsorption de molécules cibles à la surface d'une biopuce. De performances relativement

équivalentes en termes de limite de détection (1 à 10 pg/mm^2), ces méthodes offrent l'avantage non négligeable d'une mesure en temps réel de l'interaction cible-sonde. Cette notion, à considérer au sens large, renvoie dans le cas présent à une résolution temporelle suffisante permettant l'extraction des constantes de cinétique d'après le signal échantillonné enregistré. Ainsi, pour une bio-interaction "lente" présentant une phase d'association d'environ une heure, l'acquisition d'un point de mesure toutes les secondes n'est bien entendu pas impératif : une cadence de 0.02 Hz sera considérée comme parfaitement acceptable et pourra alors être assimilée à une mesure en "temps réel".

De manière générale, le faible débit de données constitue un frein majeur à l'utilisation de ces systèmes.

Face à ces limitations, la transduction plasmonique offre une alternative intéressante : sensibilité satisfaisante, absence de marquage mais également mutliplexage des données et analyse en temps réel... cette méthode s'est imposée progressivement comme un outil de premier choix vis-à-vis de la diversité des exigences et des applications de biodétection [11].

Les performances principales de ces méthodes sont résumées dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1 – **Caractéristiques des méthodes de transduction couramment employées en biodétection.**

Méthode de transduction	**Limite de détection** (pg/mm^2)	**Nombre d'analyses en parallèle**	**Mesure en temps réel**	**Marquage**	**Référence**
Piézoélectrique	1-10	< 10	Oui	Non	Karaseva et al. [1]
Electrochimique	1-10	< 10	Oui	Non	Lopez et al. [12]
Acoustique	10	< 10	Oui	Non	Horiguchi et al. [3]
Fluorescence (Optique)	$< 10^{-3}$	$> 10^5$	Non	Oui	Zhou et al. [6]
Plasmonique (Optique)	1	> 100	Oui	Non	Mariani et al. [5]

Les biocapteurs plasmoniques connaissent un essor particulièrement important depuis les années 1990 : de plus en plus de sociétés, telles que Biacore [13], Ibis Technologies [14], ou plus récemment HORIBA Scientific [15], proposent des prototypes commerciaux, destinés à des utilisateurs du domaine de la recherche académique et industrielle.

La suite de ce chapitre se concentre ainsi plus spécifiquement sur le phénomène de résonance des plasmons de surface, à l'origine de ces développements récents. En particulier, les aspects théoriques présentés dans le paragraphe suivant permettent de justifier les performances de ces capteurs plasmoniques en matière de biodétection.

1.2 Quelques notions de plasmonique

Observée pour la première fois en 1902 par Wood sous la forme de bandes sombres considérées "anormales" dans le spectre diffracté d'un faisceau de lumière blanche [16], la résonance des plasmons de surface ou SPR (en référence à l'anglais *Surface Plasmon Resonance*) est abordée pour la première fois de manière théorique par Fano en 1941, qui attribue alors le phénomène précédemment rapporté à l'existence d'ondes de surface supportées par le réseau de diffraction [17].

En 1968, les travaux de Otto [18] ainsi que ceux de Kretschmann et Raether [19], posent les fondements des implémentations expérimentales exploitant la SPR à l'étude de phénomènes de surface. Depuis, de nombreux développements et optimisations ont conduit à la réalisation des systèmes de biodétection performants et "user-friendly" actuellement disponibles sur le marché.

Désormais bien établie, la SPR a fait l'objet d'études théoriques étendues. De ce fait, les calculs basés sur les équations de Maxwell, permettant d'établir la relation de dispersion des plasmons de surface, ne seront pas explicités dans ce manuscrit. En effet, ces résultats ayant été démontrés à de multiples reprises lors de publications antérieures [20], la suite de ce chapitre s'oriente préférentiellement vers l'interprétation physique du phénomène de résonance des plasmons de surface, en relation avec les problématiques de biodétection actuelles.

1.2.1 Un peu de physique...

La résonance des plasmons de surface (SPR) se produit à l'interface entre un film métallique très fin (de l'ordre de 50 nm d'épaisseur) et un milieu diélectrique, tel que l'eau, par couplage d'une onde incidente polarisée transverse-magnétique (TM) aux électrons libres du métal (Figure 1.2).

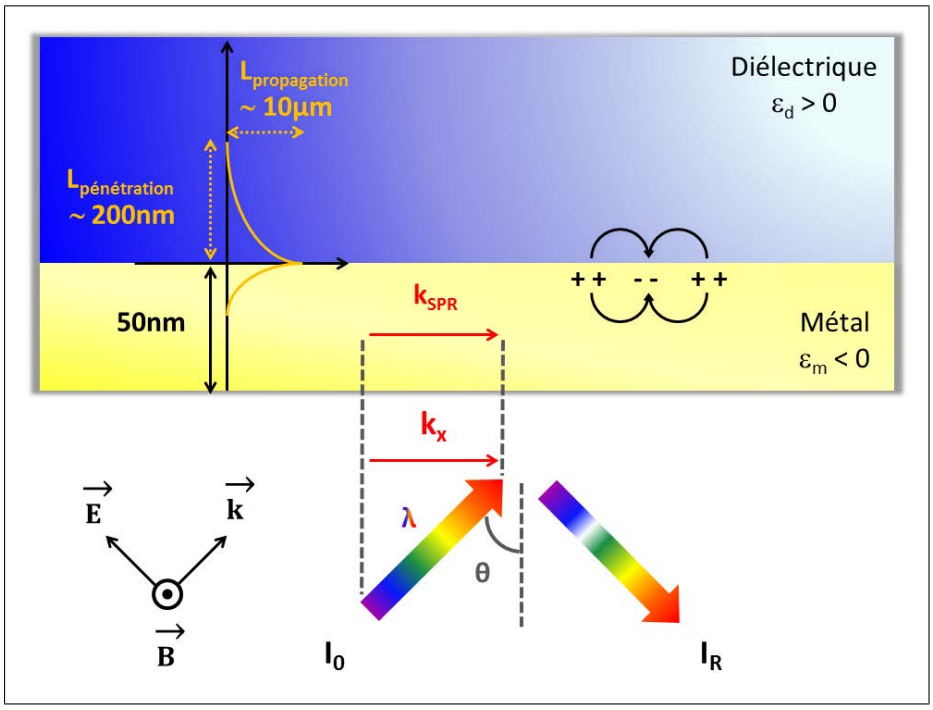


FIGURE 1.2 – **Phénomène de résonance des plasmons de surface.**

Plus précisément, le phénomène de résonance est observé lorsque le vecteur d'onde k_x du faisceau incident, défini pour un angle θ et une longueur d'onde λ précis (Figure 1.2), égale

le vecteur d'onde k_{SPR} caractéristique des plasmons de surface (Équation 1.1). Celui-ci étant directement dépendant des permittivités ε_m et ε_d des deux milieux en présence (soit le métal et le diélectrique, respectivement), la condition de résonance décrite par l'Équation 1.1 laisse présager une sensibilité du phénomène étudié vis-à-vis de toute perturbation du milieu diélectrique, d'où l'intérêt suscité dans le cadre de l'étude d'interactions biomoléculaires à la surface d'une biopuce.

$$k_x = k_{SPR} = \frac{\omega}{c} \cdot Re\left\{\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right\} \tag{1.1}$$

Ainsi présentée, la relation de couplage suppose de manière implicite une polarisation TM du faisceau incident, de même qu'une interface entre deux milieux de permittivités de signe opposé : ces deux paramètres indispensables à l'excitation plasmonique constituent la base expérimentale des biocapteurs exploitant cette méthode de transduction.

Dans ces conditions, l'énergie incidente est transmise aux électrons libres du métal qui entrent en oscillation collective, créant une onde évanescente à l'interface des deux milieux (Figure 1.2) : le plasmon propagatif. Dépendante de divers facteurs expérimentaux, la qualité de l'excitation plasmonique requiert en particulier une épaisseur optimale du film métallique. En effet, trop fin, celui-ci ne supportera pas d'onde évanescente d'amplitude significative ; trop épais, l'énergie incidente sera absorbée naturellement par le métal bien avant d'atteindre l'interface, et aucune résonance ne sera observée. Ainsi dans le cas d'un film d'or, une épaisseur d'environ 50 nm est idéale pour des longueurs d'onde du visible au proche infrarouge : le couplage maximal de l'onde incidente aux plasmons de surface se traduit alors par une réflectivité quasiment nulle dans des conditions d'incidence ($k_x = f(\lambda, \theta)$) validant l'Équation 1.1.

La Figure 1.3, obtenue par modélisation des propriétés optiques d'un empilement multi-couches, basée sur la méthode de Rouard [21], illustre la réponse en réflectivité d'une biopuce plasmonique, fonction des conditions d'incidence du faisceau d'illumination exprimés en terme de longueur d'onde (λ) et d'angle (θ). De manière plus précise, une structure formée d'un milieu semi-infini de verre, surmonté d'une couche de chrome de 3 nm d'épaisseur, d'un film d'or de 50 nm et d'un second milieu semi-infini constitué d'eau, a été simulée.

Dans une telle représentation, les conditions optimales de couplage ($k(\lambda, \theta)$) du faisceau incident se situent suivant une vallée sombre, traduisant une réflectivité minimale, et donc une absorption de l'énergie maximale par les plasmons de surface. De même, hors résonance, une réflectivité proche de 100% peut être observée, due à l'absence de couplage plasmon et donc à la réflexion quasi-totale de l'énergie incidente.

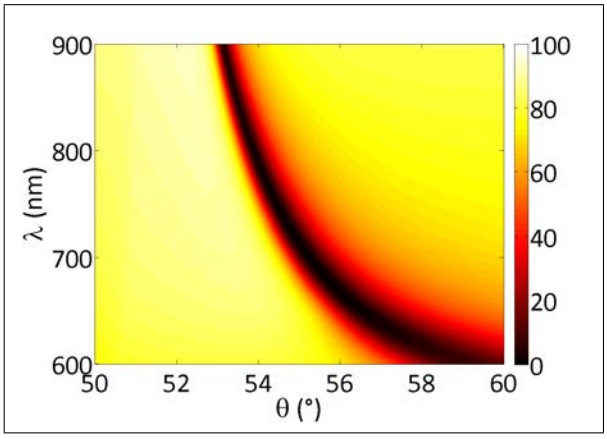


FIGURE 1.3 – **Réflectivité calculée sur un film d'or de 50 nm d'épaisseur en contact avec de l'eau.** Le résultat présenté a été obtenu par un calcul analytique du coefficient de réflexion d'un empilement multi-couches par la méthode de Rouard [21]. Une structure basée sur un milieu semi-infini de verre, surmonté d'une couche de chrome de 3 nm d'épaisseur, d'un film d'or de 50 nm et d'un second milieu semi-infini constitué d'eau a été utilisée lors de cette modélisation.

La biodétection plasmonique repose sur l'extrême sensibilité de cette onde évanescente à tout accrochage de matériel biologique à la surface du métal, de l'or dans la majorité des applications. De manière plus concrète, l'adsorption des molécules cibles entraîne une modification importante des propriétés optiques du faisceau réfléchi par la biopuce : la longueur d'onde ou l'angle de résonance, l'amplitude, la phase et la polarisation constituent les paramètres ainsi affectés (Figure 1.4).

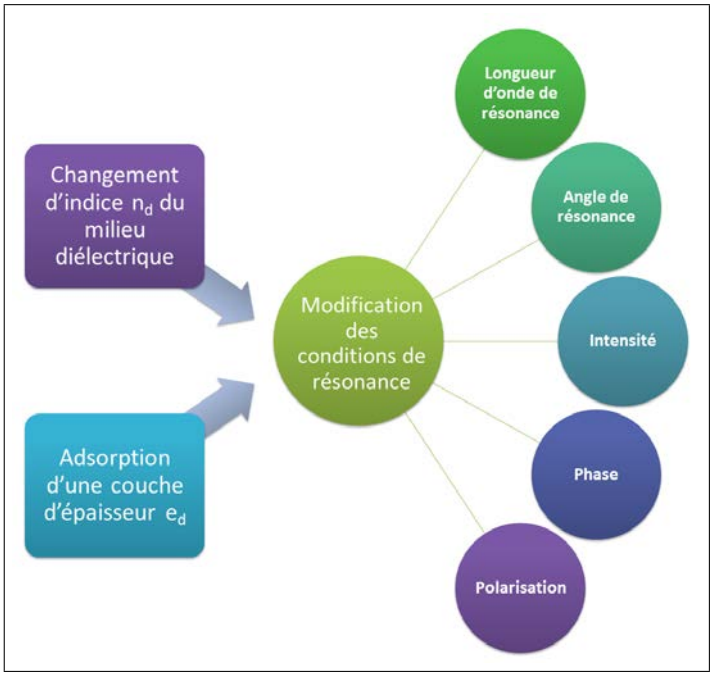


FIGURE 1.4 – **Principe de la biodétection par SPR.** Toute perturbation se produisant à l'interface entre le film métallique et le milieu diélectrique induit une variation des conditions de résonance des plasmons de surface. Ainsi, une variation de l'indice n_d du diélectrique, ou encore l'adsorption d'une couche biomoléculaire d'épaisseur e_d se traduit directement par une modification des propriétés optiques du faisceau réfléchi.

Le principe de transduction par SPR consiste alors à mesurer directement ces variations.

1.2.2 Quelques détails techniques...

L'introduction à la résonance des plasmons de surface, présentée dans le paragraphe précédent, a révélé les principaux aspects théoriques liés à cette méthode de transduction optique dans le cadre de l'étude de phénomènes de surface. Pour une meilleure compréhension des contraintes expérimentales abordées dans ce manuscrit, quelques données importantes, relatives d'une part à l'implémentation des systèmes de SPR, et d'autre part à la bio-ingénierie liée à la biopuce elle-même, sont précisées dans les paragraphe suivants.

Le couplage du faisceau incident : une étape indispensable à l'observation du phénomène SPR

L'égalité des vecteurs d'onde incident (k_x) et plasmon (k_{SPR}) introduite précédemment par l'Équation 1.1 constitue la base de l'implémentation des biocapteurs plasmoniques. En considérant l'expression de la projection k_x en fonction de l'angle θ et de la fréquence ω du faisceau incident, la condition de résonance se traduit alors par l'Équation 1.2.

$$n_i \cdot sin(\theta) = n_{SPR} = Re\left\{\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right\} \tag{1.2}$$

Noté n_i, l'indice du milieu incident doit nécessairement être supérieur à l'indice effectif n_{SPR} du mode plasmon pour pouvoir observer le phénomène de résonance recherché. Une illumination directe à travers le milieu diélectrique ne permet donc pas de satisfaire la condition de couplage, comme le met en évidence la Figure 1.5. En effet, l'absence d'intersection entre la courbe retraçant la relation de dispersion plasmonique (représentée en bleu) et celle correspondant à la propagation d'une onde plane dans le milieu diélectrique d'indice n_d (en rouge) démontre bien l'impossibilité d'une excitation des plasmons de surface dans cette configuration.

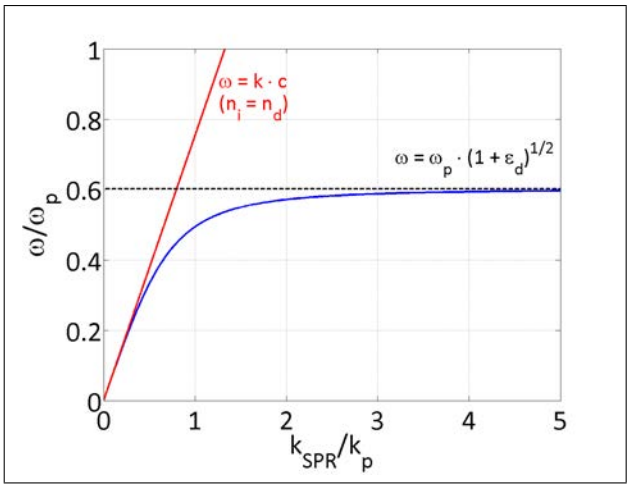
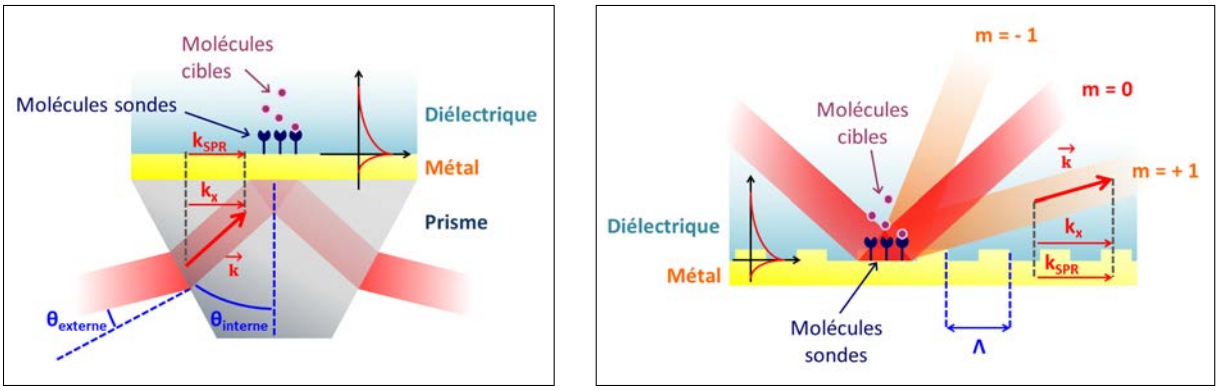


FIGURE 1.5 – **Relation de dispersion des plasmons de surface dans le cas d'une interface or / eau.** Le résultat présenté a été obtenu en considérant un indice n_d égal à 1.33 pour le milieu diélectrique (de l'eau, dans le cas de cet exemple), soit une permittivité ϵ_d de 1.77. La permittivité du métal (or) a été calculée d'après le modèle de Drude : $\epsilon_m(\omega) = 1 - (\omega/\omega_p)^2$, avec ω_p la fréquence plasma de l'or. Pour plus de clarté, les échelles d'ordonnée et d'abscisse ont été normalisées respectivement par la fréquence plasma (ω_p) et le vecteur d'onde associé (k_p).

Deux méthodes bien établies dans la littérature permettent cependant d'atteindre aisément l'égalité recherchée (Figure 1.6). Relativement simples à mettre en oeuvre, les solutions proposées sont basées sur l'augmentation de l'indice effectif du vecteur d'onde incident, par l'utilisation d'un prisme (Figure 1.6a) ou d'un réseau de diffraction (Figure 1.6b).



(a) **Principe de l'excitation plasmonique basée sur l'utilisation d'un prisme.** Dans cette configuration, la condition de résonance plasmon est satisfaite en augmentant l'indice du milieu incident par l'illumination de la biopuce à travers un prisme.

(b) **Principe de l'excitation plasmonique basée sur l'utilisation d'un réseau.** Dans cette configuration, la structuration de la biopuce en réseau de période Λ adaptée induit une diffraction du faisceau incident. De cette manière, l'indice effectif du premier ordre diffracté permet de satisfaire l'égalité avec le vecteur d'onde plasmon et atteindre la résonance.

FIGURE 1.6 – **Illustration des deux méthodes usuelles permettant l'observation du phénomène SPR.**

Dans le cas de la première configuration (Figure 1.6a), élaborée par Kretschmann et Raether en 1968 [19], l'illumination du film métallique par réflexion totale sur un prisme de verre d'indice n_p élevé permet l'excitation de l'onde plasmon (Équation 1.3). En pratique, un verre borosilicate BK7 ($n_p = 1.51$ à 750 nm) ou "flint" SF10 ($n_p = 1.71$ à 750 nm) peut être utilisé, suivant la plage angulaire envisagée pour l'excitation de l'onde plasmonique.

$$n_p \cdot sin(\theta_{interne}) = n_{SPR} \tag{1.3}$$

L'angle d'incidence $\theta_{interne}$ considéré correspond alors à la réfraction dans le prisme du faisceau d'illumination émis initialement avec un angle $\theta_{externe}$ dans l'air (par rapport à la normale à la première face du prisme). Seul cet angle "interne", présentant une réelle signification physique, est utilisé dans les articles scientifiques publiés dans le domaine de la plasmonique.

Introduite à la même époque, la seconde configuration présentée sur la Figure 1.6b fait appel à la diffraction du faisceau d'illumination par une structuration en réseau de période Λ de la surface de la biopuce [22] (Équation 1.4).

$$n_{diffraction} = n_d + m \cdot \frac{\lambda}{\Lambda} = \pm n_{SPR} \tag{1.4}$$

L'excitation de l'onde plasmonique est alors réalisée par le mode diffracté d'ordre 1, présentant un indice plus élevé que celui n_d du milieu diélectrique initial (Équation 1.5).

$$m = 1 \Rightarrow n_{diffraction} = n_d + \frac{\lambda}{\Lambda} = n_{SPR} \tag{1.5}$$

Cette implémentation particulière présente le désavantage d'un trajet optique à travers le milieu diélectrique, au sein duquel se produisent les interactions biomoléculaires étudiées. Les variations induites par les injections de divers échantillons biologiques sont susceptibles de perturber la propagation du faisceau incident et peuvent de ce fait induire un bruit de mesure supplémentaire. Ainsi, la première solution basée sur l'utilisation d'un prisme, dite configuration de Kretschmann, est généralement préférée dans le cadre de l'implémentation des biocapteurs plasmoniques.

Quelques propriétés intéressantes des plasmons de surface

La transduction plasmonique étant basée sur la sensibilité de l'onde évanescente générée à l'interface des deux milieux en contact, une variation ne pourra dès lors être mesurée que si elle intervient au sein de l'épaisseur de peau caractéristique de cette onde de surface. Ce paramètre, exprimé en termes de longueur de pénétration ${L^d}_{pénétration}$ des plasmons de surface dans le milieu diélectrique, peut être calculé précisément par l'Équation 1.6.

$$ {L^d}_{pénétration} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left[Im \left\{ \sqrt{\frac{{\epsilon_d}^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\} \right]^{-1} \tag{1.6} $$

De la même manière, la pénétration ${L^m}_{pénétration}$ dans le film métallique peut être évaluée par l'Équation 1.7.

$$ {L^m}_{pénétration} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left[Im \left\{ \sqrt{\frac{{\epsilon_m}^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\} \right]^{-1} \tag{1.7} $$

Autre paramètre important, la longueur de propagation $L_{propagation}$ de l'onde plasmonique à l'interface entre les deux milieux détermine quant à elle la résolution latérale des systèmes de biodétection basés sur cette méthode de transduction (Équation 1.8).

$$ L_{propagation} = \frac{c}{2\omega} \cdot \left[Im \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\} \right]^{-1} \tag{1.8} $$

Ces trois paramètres, caractéristiques intrinsèques de l'onde évanescente générée à l'interface, conditionnent la sensibilité vis-à-vis des interactions biomoléculaires à la surface de la biopuce. Le Tableau 1.2 donne un aperçu des valeurs des trois grandeurs présentées dans le cas de deux métaux, l'or et l'argent, supportant le phénomène SPR, pour deux longueurs d'onde typiques d'utilisation.

Tableau 1.2 – **Caractéristiques de l'onde plasmonique de surface.** Les résultats présentés ont été obtenus en considérant deux longueurs d'onde incidentes égales à 750 nm et 950 nm, et des indices respectifs de 1.329 et 1.326 (soit des permittivités de 1.767 et 1.758, respectivement) pour le milieu diélectrique.

Métal	**Permittivité**	$L^d{}_{pénétration}$ **(nm)**	$L^m{}_{pénétration}$ **(nm)**	$L_{propagation}$ **(μm)**
Or (λ = 750 nm)	$-18.501 + i \cdot 1.500$	138.6	13.2	10.1
Or (λ = 950 nm)	$-33.867 + i \cdot 2.973$	244.5	12.6	23.3
Argent (λ = 750 nm)	$-21.494 + i \cdot 1.637$	150.4	12.3	12.7
Argent (λ = 950 nm)	$-36.200 + i \cdot 2.633$	253.0	12.2	30.1

Ces quelques exemples illustrent l'intérêt de la biodétection plasmonique pour l'étude d'interactions de surface : en effet, l'énergie de l'onde évanescente étant principalement confinée dans le milieu diélectrique, toute variation de ce dernier entraînera une modification des conditions de résonance plasmon, et donc celle des propriétés optiques observées en réflexion.

Plus précisément, les perturbations influant sur le couplage, soit celles détectables, sont limitées par l'épaisseur de peau déterminée par la profondeur de pénétration $L^d{}_{pénétration}$ (de l'ordre de 200 nm dans le cas de l'or) de l'onde plasmonique dans le milieu couvrant. La transduction par SPR, naturellement adaptée à la lecture de phénomènes de surface, présente donc une limitation intrinsèque à l'étude d'espèces cibles de "grande taille" (en comparaison avec la valeur de $L^d{}_{pénétration}$) telles que les cellules ; de même, la variation locale induite par des objets de "petite taille" est en réalité moyennée sur toute la profondeur $L^d{}_{pénétration}$ sondée par les plasmons, et risque par conséquent d'être inférieure à la limite de détection du dispositif de mesure expérimental.

Ces problématiques peuvent cependant être contournées par l'excitation de modes plasmoniques moins conventionnels, tels que les plasmons dits "long-range" ou encore ceux "localisés", offrant une capacité de détection à des échelles plus étendues. Les exemples d'application présentés dans le paragraphe suivant rendent compte de cette adaptabilité.

1.3 La biodétection plasmonique

Le principe de la résonance des plasmons de surface, introduit dans les paragraphes précédents, offre une détection sans marquage de toute adsorption de matériel biologique à la surface de la biopuce. L'efficacité de cette méthode repose bien évidemment sur l'implémentation expérimentale du dispositif de lecture, indispensable pour l'analyse des propriétés optiques observées en réflexion, mais également, et avant tout, sur la spécificité du signal biochimique détecté. En effet, la transduction plasmonique étant par nature sensible à toute perturbation locale du milieu diélectrique sondé, un même signal sera enregistré pour deux molécules différentes, mais de masse identique.

Par conséquent, la capture spécifique de l'espèce biologique recherchée constitue en soi une

étape importante de la biodétection plasmonique. Comme le met en évidence la suite de ce chapitre, l'optimisation de cette étape permet d'atteindre d'excellentes performances pour une large gamme d'espèces cibles à détecter, de la molécule unique à la cellule.

1.3.1 Une ingénierie dédiée à la bio-interaction

La fonctionnalisation chimique de la biopuce ou, plus simplement, l'injection des échantillons à analyser sur la surface-sonde, jouent un rôle essentiel dans la qualité du signal SPR recueilli. Ces aspects importants liés à l'étude des interactions biologiques sont abordés dans ce paragraphe.

Une chimie de surface adaptée

Afin de produire une qualité de mesure satisfaisante lors de la biodétection, l'étape de fonctionnalisation chimique doit répondre à un certain nombre de critères :

- **Une passivation de la surface métallique** : une couche "isolante" déposée de manière irréversible sur la surface de la biopuce doit empêcher de manière efficace l'adsorption non désirée des espèces biologiques présentes dans l'échantillon analysé, mais non ciblées. De manière générale, l'or représente le métal le plus utilisé en SPR en raison de sa stabilité et son excellente biocompatibilité : l'argent, dont les propriétés plasmoniques sont également intéressantes, présente le désavantage d'une oxydation importante qui rend la fonctionnalisation chimique relativement moins évidente à réaliser. Pour cette raison, l'utilisation de groupements thiols est très souvent privilégiée en raison de leur liaison covalente forte avec les atomes d'or [23].

  A titre indicatif, quelques exemples de fonctionnalisations chimiques sont présentés sur la Figure 1.7.

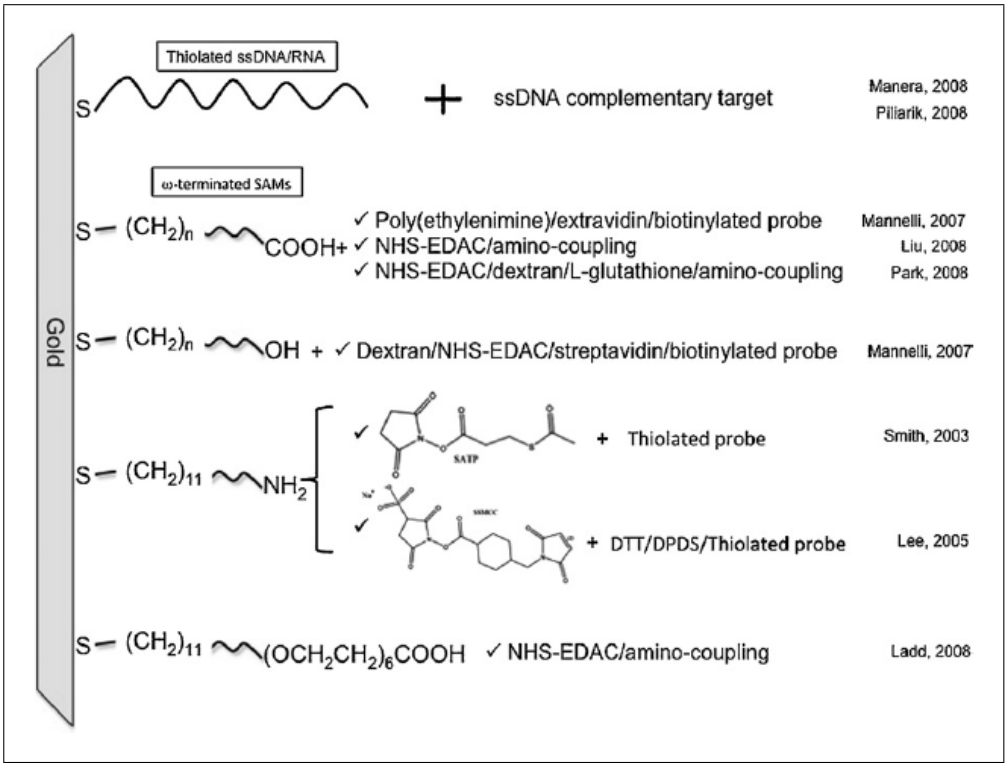


FIGURE 1.7 – **Exemples de chimies de surface couramment employées dans la littérature plasmonique.** Cette figure provient d'un article de revue écrit par Scarano et al. [23].

- La couche chimique servant à la passivation doit présenter un **groupement actif** permettant un accrochage solide des molécules sondes : de cette manière, seules les espèces cibles recherchées sont supposées s'adsorber à la surface de la biopuce (Figure 1.8). Cette propriété est vérifiée expérimentalement par le dépôt d'un contrôle négatif, des ligands sondes choisis spécialement sans aucune affinité pour les cibles à détecter : dans un cas idéal, aucune adsorption ne doit être détectée à ce niveau.
  Cette étape particulière représente un réel défi : en effet, une perte de l'activité de reconnaissance de sondes parfaitement fonctionnelles peut parfois être observée suite à leur dépôt sur la biopuce. La conformation spatiale (repli de la molécule...) adoptée en surface, difficile à prévoir, gêne alors toute interaction avec les molécules cibles.

  La Figure 1.8 résume le principe de fonctionnalisation chimique basée sur ces trois premiers critères.

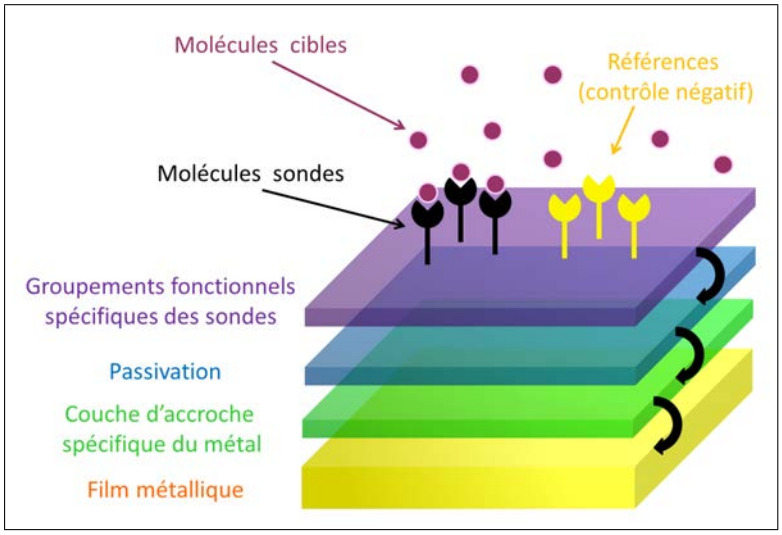


FIGURE 1.8 – **Principe de la fonctionnalisation chimique d'une biopuce plasmonique.** Cette vue schématique représente de manière simplifiée les propriétés de la chimie de surface recherchées : un groupement assurant l'accroche de la couche de passivation à la surface métallique, et un groupement spécifique des espèces sondes déposées. Cette structure peut être obtenue en une seule étape, par l'utilisation d'une molécule présentant les propriétés désirées, ou par une succession de plusieurs étapes de fonctionnalisation faisant intervenir des espèces chimiques distinctes.

- Non indispensable, mais vivement souhaitée, la **capacité de régénération** de la biopuce revêt toute son importance lors d'expériences nécessitant l'analyse de plusieurs solutions cibles. Suivant la nature de la chimie de surface, l'injection d'une solution de pH acide ou basique permet alors la désorption des molécules cibles seules, sans détérioration de la couche de passivation ni des molécules sondes.
- La **stabilité dans le temps** représente également un critère non négligeable dans la sélection d'une chimie de surface . En effet, le protocole associé étant généralement relativement long (2 à 3 jours peuvent être nécessaires), la préparation d'une biopuce impose une contrainte expérimentale supplémentaire. A l'heure actuelle, bon nombre de sociétés proposent une grande diversité de fonctionnalisations de surface qu'il est possible de conserver quelques semaines, voire quelques mois : la bonne conservation des groupements fonctionnels nécessite cependant quelques précautions mineures (stockage au réfrigérateur, à l'abri de la lumière).

En conclusion, la spécificité du signal représente le point limitant de la biodétection plasmonique. Pour cette raison, un couplage avec d'autres techniques de détection, apportant une signature caractéristique de l'espèce biologique adsorbée sur la biopuce, peut être envisagé : la spectrométrie de masse, ou plus récemment, la spectroscopie Raman exaltée de surface (chapitre 10, partie IV), permettent ainsi d'apporter des informations complémentaires fiables aux mesures de SPR.

Un format de détection spécifique

La variété et la complexité des conditions d'analyse rencontrées a conduit au développement de différents formats de détection, offrant une sélectivité et une spécificité adaptée à l'espèce biologique recherchée [11].

Format le plus répandu, la détection directe (Figure 1.9) constitue également la configuration la plus simple. Le ligand sonde immobilisé à la surface de la biopuce interagit de manière spécifique avec les biomolécules cibles injectées : la variation d'indice réfractif ainsi induite est alors mesurée directement par le biocapteur plasmonique. Cette méthode suppose bien évidemment que l'adsorption de l'espèce recherchée seule produit un signal suffisant et détectable : elle n'est donc pas adaptée à des molécules de très petite masse, pour lesquelles des configurations légèrement plus complexes doivent être adoptées.

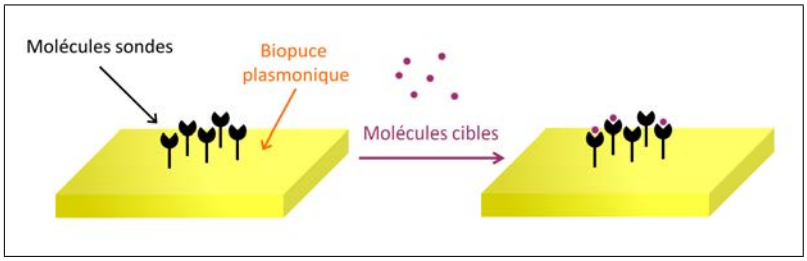


FIGURE 1.9 – **Format de détection directe.** Dans cette configuration simple, le signal SPR mesuré correspond à la variation d'indice du milieu réactif induite par l'adsorption des molécules cibles sur les sondes greffées à la surface de la biopuce.

Les performances en termes de spécificité et de limite de détection de ce premier format peuvent être améliorées par une détection quelque peu plus indirecte, exploitant une capture "en sandwich" de l'espèce cible (Figure 1.10). De manière plus précise, la procédure est relativement analogue à la précédente : le complexe sonde-cible formé à la surface de la biopuce est exposé à une seconde injection de molécules sondes. Ces dernières sont naturellement sélectionnées afin de reconnaître de manière spécifique la partie laissée libre des cibles capturées par les premières sondes greffées à la surface.

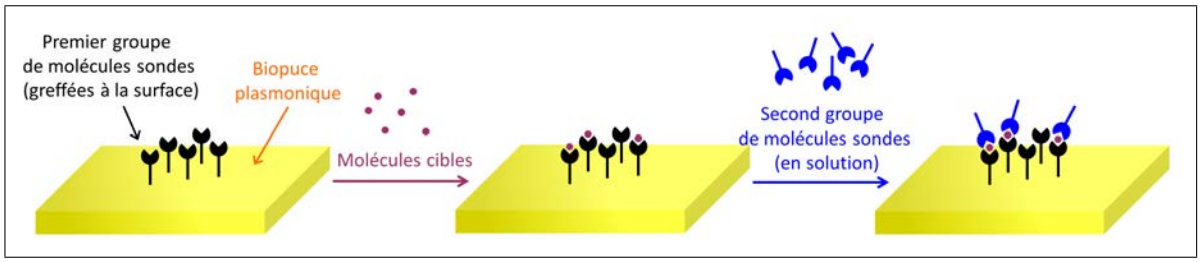


FIGURE 1.10 – **Format de détection indirecte.** Une première injection de l'échantillon à analyser conduit à la formation d'un complexe cible-sonde à la surface de la biopuce, de manière analogue à la détection directe. Une seconde injection est réalisée : des molécules dites "sondes" en solution s'adsorbent sur la partie libre des cibles complexées, induisant un SPR détectable.

Une solution alternative, particulièrement intéressante dans le cas de molécules de faible poids moléculaire ($<$ 5 kDa), consiste en un format de détection par compétition (Figure 1.11) ou inhibition (Figure 1.12). Dans la première configuration citée, l'espèce cible est introduite à la fois seule et conjuguée à une molécule de masse plus importante dans le milieu réactif. Ces deux familles entrent alors en compétition pour interagir avec les sites sondes disponibles :

contrairement aux exemples donnés précédemment, le signal détecté, correspondant à l'espèce conjuguée, est inversement proportionnel à la concentration des cibles libres en solution.

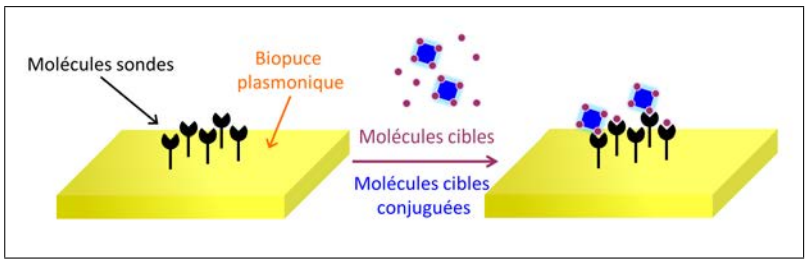


FIGURE 1.11 – **Format de détection par compétition.** La biopuce greffée avec des molécules sondes spécifiques de l'espèce recherchée est exposée à une solution contenant à la fois les cibles libres et conjuguées à une molécule de poids moléculaire plus important. Le signal SPR détecté, induit par l'adsorption de la forme conjuguée, est alors inversement proportionnel à la quantité de cibles libres en solution.

Dans le cas du dernier format de détection cité, fonctionnant par inhibition (Figure 1.12), les molécules cibles de concentration inconnue sont en premier lieu mises en incubation avec une quantité déterminée de molécules sondes en solution. Le mélange est alors injecté à la surface d'une biopuce fonctionnalisée avec l'espèce cible elle-même ou une molécule analogue. De la même manière que dans le cas de la configuration précédente, le signal SPR mesuré, induit par l'adsorption des molécules sondes libres, est inversement proportionnel à la concentration de molécules cibles recherchée.

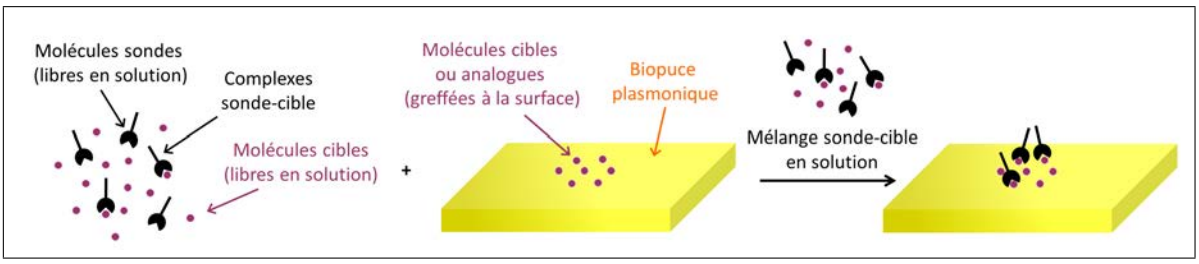


FIGURE 1.12 – **Format de détection par inhibition.** Dans cette configuration particulière, la biopuce est greffée avec les molécules cibles. La solution injectée sur la surface ainsi fonctionnalisée contient un mélange des molécules cibles, de concentration inconnue, et des sondes spécifiques, de concentration quant à elle déterminée. Le signal SPR enregistré correspond alors à l'adsorption des sondes libres en solution sur les molécules cibles greffées à la surface : de la même manière que pour la détection par compétition, il est inversement proportionnel à la quantité de cibles libres.

Les quatre formats présentés comptent parmi les plus couramment employés dans le domaine plasmonique : les exemples d'applications donnés en fin de ce chapitre illustrent la nécessité de ces différentes configurations face aux exigences de détection particulières qui peuvent être rencontrées.

Un système de fluidique performant

Dans le cadre d'applications complexes nécessitant l'analyse de plusieurs interactions en parallèle, l'homogénéité des conditions expérimentales présente une importance capitale pour une interprétation non biaisée des résultats. Comme évoqué dans les paragraphes précédents, la qualité de la fonctionnalisation chimique est naturellement primordiale. Cependant, l'acheminement des molécules cibles sur la surface sondée doit également être contrôlé et optimisé : un système de fluidique adapté est dès lors requis pour une répartition homogène des solutions injectées sur la biopuce.

De manière générale, un tel dispositif comprend les éléments suivants :

- Une **enceinte** constituant le milieu de réaction en contact avec la biopuce : la cellule fluidique. Des ouvertures d'entrée et de sortie du flux doivent présentes afin de permettre la circulation des solutions injectées à la surface.
  A l'heure actuelle, différentes configurations peuvent être rencontrées dans la littérature : dans le cas le plus simple, une enceinte unique est utilisée pour l'analyse d'une solution cible à la fois, mais un système multi-canaux peut également être implémenté pour une injection simultanée de plusieurs solutions en parallèle.
  Dans chaque cas, la géométrie de la cellule fluidique résulte d'une optimisation visant à produire un écoulement homogène des liquides à la surface de la biopuce.
- Un **système de régulation de température**, implémenté sur la cellule fluidique : un module à effet Peltier est généralement utilisé. En effet, certaines interactions biomoléculaires présentent une sensibilité particulièrement importante vis-à-vis des variations thermiques du milieu réactif. De plus, l'indice optique du milieu diélectrique étant lui-même dépendant de la température, des fluctuations trop importantes conduiront nécessairement à un bruit de mesure élevé. De ce fait, pour une meilleure reproductibilité des mesures, le contrôle de la température devient primordial : une précision de 0.01 °C est visée de manière générale.
- Une **pompe péristaltique** assurant la circulation du flux, avec un débit réglable.
- Une **vanne** munie d'une **boucle de stockage** (des volumes standards de 200 μL ou 500 μL sont disponibles commercialement) pour des injections optimales et reproductibles.
- Un **dégazeur**, placé en entrée du montage, afin d'éliminer les bulles d'air susceptibles de perturber le signal.
- Des **matériaux** entièrement **bioinertes** : les surfaces en contact avec les solutions injectées (cellule fluidique, tuyaux connectiques...) doivent être totalement inertes vis-à-vis des matières biologiques et des solvants utilisés. Par exemple, un métal oxydé tel que le titane, présentant une bonne conductivité thermique (facteur important pour une régulation thermique optimale du milieu réactif) peut être employé pour former le bloc fluidique. Des tuyaux rigides en Peek ou souples en Tygon (ou Pharmed Ismaprene) présentent également des propriétés très satisfaisantes pour la circulation des solutions analysées.

La Figure 1.13 illustre une configuration possible du système de fluidique constitué de tels éléments.

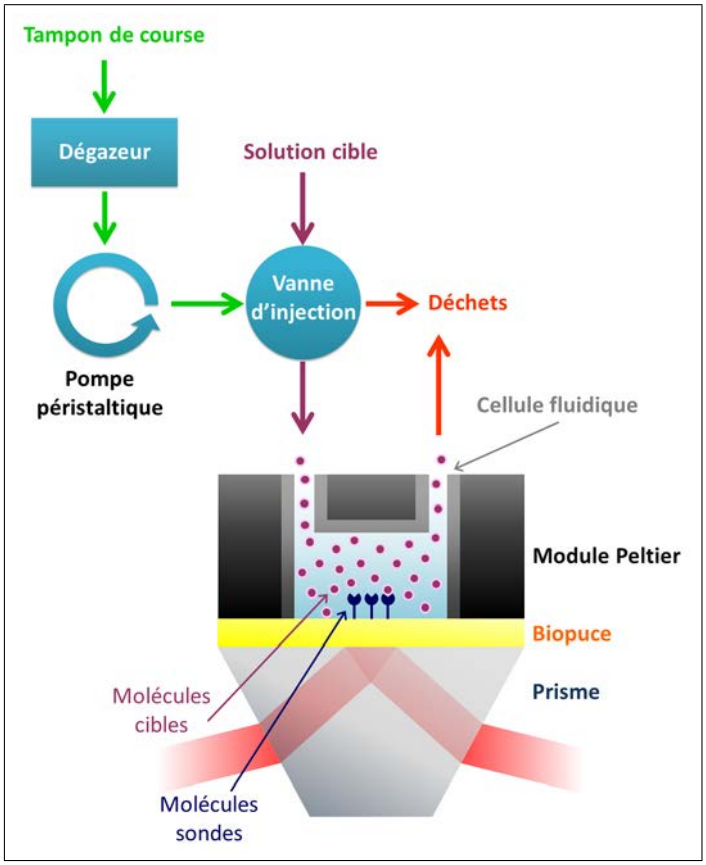


FIGURE 1.13 – **Représentation schématique des principaux éléments du système fluidique d'un biocapteur plasmonique.** A titre d'exemple, la configuration de Kretschmann a été adoptée pour l'excitation des plasmons de surface.

Le système de fluidique ainsi assemblé nécessite alors un volume minimal de l'échantillon de quelques centaines de microlitres : cette valeur peut être diminuée par l'utilisation d'une pompe automatisée générant une circulation alternative, permettant à un même volume analysé de passer plusieurs fois dans la cellule principale. Des optimisations microfluidiques plus complexes peuvent également être réalisées pour atteindre un volume minimal nécessaire de l'ordre de la centaine de nanolitres, sans compromettre les performances de détection par SPR [24].

1.3.2 Quelques exemples d'application

De performances équivalentes aux méthodes de transduction usuelles [25, 26], les biocapteurs plasmoniques permettent de détecter une très large gamme molécules cibles [5]. Les quelques exemples donnés dans la suite de ce paragraphe donnent une vue d'ensemble de la diversité des applications actuelles.

Acides nucléiques

Molécules de taille relativement petite ($<$ 10 kDa), les fragments d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) constituent des cibles intéressantes pour de nombreuses applications de diagnostic. En particulier, la détection de mutations ponctuelles, affectant un seul nucléotide de la séquence d'un gène, représente un domaine d'étude important dans les milieux médical et pharmaceutique.

A titre d'exemple, la Figure 1.14 illustre l'application de la SPR à l'étude de la mutation ponctuelle M470V affectant le gène CFTR responsable de la mucoviscidose [27]. En particulier, la différence notable des signaux enregistrés sur une même famille de molécules sondes pour trois injections différentes, correspondant aux cas homozygote malade (noté "MT" et représenté en rouge), hétérozygote (noté "HT", en bleu) et homozygote sain (correspondant aux courbes vertes "WT") affirme le potentiel de cette méthode de mesure dans le cadre du diagnostic génétique, obtenu dans le cas présent à l'aide de mesures cinétiques sur une dizaine de minutes seulement.

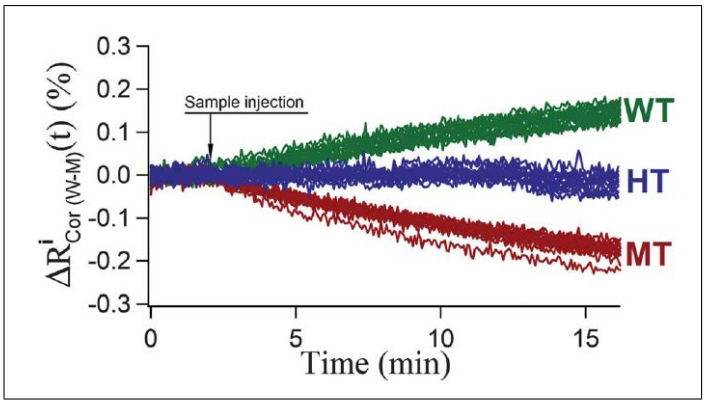


FIGURE 1.14 – **Exemple de cinétiques ADN-ADN obtenues dans la cadre d'une application au diagnostic génétique de la mucoviscidose.** Le signal SPR ($\Delta R^i{}_{Cor(W-M)}(t)$) permet de différencier la réponse des plots sondes à l'injection d'un échantillon homozygote malade (ne présentant que l'allèle muté responsable de la maladie, noté "MT" et représenté en rouge), d'un hétérozygote (ayant un allèle sain et un allèle muté, noté "HT", en bleu) et d'un homozygote sain (correspondant à la famille de courbes vertes "WT"). Les données présentées proviennent des résultats publiés par Hottin et al. [27].

La principale difficulté liée à cette application provient du faible signal SPR généré par les molécules cibles, elles-mêmes présentes à des concentrations relativement basses dans l'échantillon analysé. Pour cette raison, les expérimentateurs ont souvent recours à une amplification du génome par PCR (*Polymerase Chain Reaction*, ou amplification en chaîne par polymérase) ou WGA (*Whole Genome Amplification*, méthode d'amplification non enzymatique, à la différence de la PCR [28]). Cette procédure de préparation coûteuse en temps, permet d'augmenter la quantité de matériel biologique ciblé et ainsi atteindre une limite de détection basse (de l'ordre de la dizaine de picomolaires) ; cependant des fragments non désirés peuvent également être amplifiés et gêner la détection, d'autant plus que le signal attendu est naturellement peu élevé (inférieur à 10^{-4} RIU ou unités d'indice réfractif du milieu diélectrique).

Une solution alternative consiste à effectuer une détection indirecte en deux étapes, dans une configuration communément appelée "sandwich-like assay". Dans ce cas, une première hybridation entre les molécules cibles et les sondes greffées à la biopuce est suivie de l'injection d'un second groupe de molécules sondes, complémentaires à la partie libre des cibles hybridées (se reporter à la Figure 1.10, p.23). L'utilisation d'objets de masse plus élevée telles que les protéines [29], voire les nanoparticules [30], conjuguées aux molécules sondes lors de cette seconde injection, permet une amplification du signal SPR d'un facteur 10 ($\approx 10^{-3}$ RIU). Cette méthode de marquage offre alors une discrimination suffisante pour l'étude de séquences différant d'un nucléotide, et présentes à des concentrations de l'ordre de l'attomolaire.

Quelle que soit l'approche considérée, la principale difficulté réside dans la sélection et l'optimisation des molécules sondes (séquence d'ADN [28], de peptides [30]...) apportant la précision de discrimination souhaitée.

Protéines

La détection de protéines constitue l'un des défis les plus importants des biocapteurs plasmoniques. A titre d'exemple, le diagnostic du cancer, basé sur la présence de marqueurs spécifiques, fait l'objet de nombreuses recherches à l'heure actuelle.

Bien que leur poids moléculaire soit relativement élevé ($\approx$ 100 kDa), les conditions complexes associées rendent la détection de ces espèces peu aisée. En effet, le milieu contenant les protéines à analyser étant dans la plupart des cas du sérum, une dilution est généralement effectuée dans le but de limiter d'une part la variation d'indice importante (de l'ordre de 10^{-2} RIU) observée à l'injection, et d'autre part l'adsorption non spécifique des nombreuses autres espèces réactives présentes en solution. En dépit des développements de stratégies de blocage de la surface fonctionnalisée [31], ce signal non spécifique reste très souvent suffisamment élevé pour égaler celui des molécules recherchées (de 10^{-5} à 10^{-4} RIU), présentes à des concentrations relativement faibles dans l'échantillon.

De la même manière que dans le cas des acides nucléiques, différentes solutions peuvent être adoptées afin d'extraire l'information désirée. Une amplification du signal par détection indirecte [32] ou par compétition [33] conduit ainsi à la détection de l'antigène recherché en milieu complexe. La Figure 1.15 met en évidence l'utilité de telles procédures de marquage dans le cadre du diagnostic du cancer de la prostate [32]. En effet, dans le cas présenté, le sérum contenant l'antigène ciblé tPSA induit une variation d'indice (exprimée en termes de "resonance unit" ou RU) trop importante vis-à-vis du tampon de course (PBS) précédent l'injection de l'échantillon : toute différence de signal entre les plots sondes "actifs" (soit les premiers anticorps anti-tPSA greffés à la surface de la biopuce, correspondant à la courbe bleue) et ceux de contrôle négatif (en rouge) est ainsi masquée, ne permettant pas de conclure quant à la présence l'espèce recherchée. Pour cette raison, après rinçage de la surface par le tampon PBS, une seconde injection de nanoparticules d'or greffées avec des anticorps spécifiques anti-tPSA est réalisée : la différence affichée entre les deux familles de sondes permet alors de révéler l'antigène tPSA capturé.

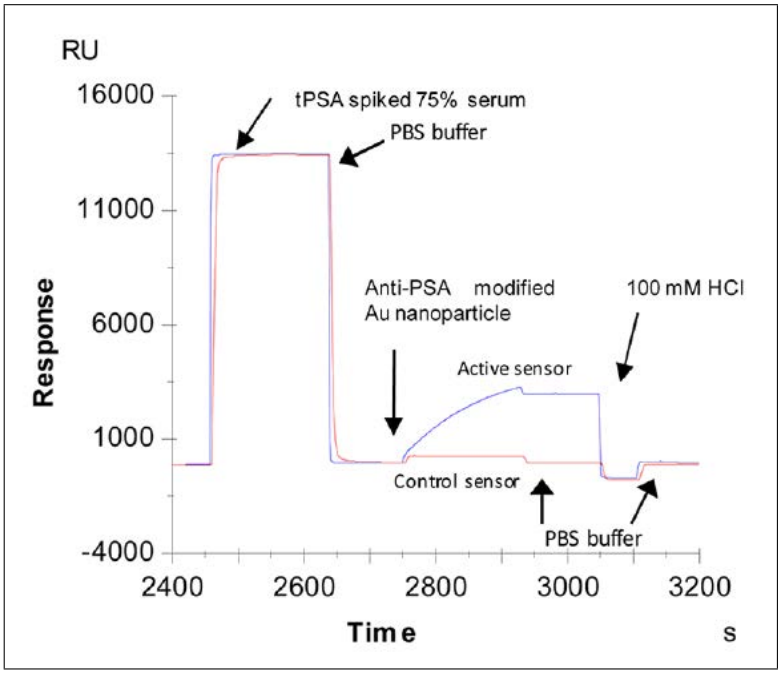


FIGURE 1.15 – **Exemple de cinétique d'adsorption de l'antigène tPSA obtenu dans la cadre d'un diagnostic du cancer de la prostate.** L'injection des cibles tPSA contenues dans du sérum dilué à 75% conduit à un signal SPR (exprimé en RU, correspondant à 10^{-6} RIU) trop important, dû à la grande différence d'indice optique entre le sérum et le tampon de course (PBS) précédent l'injection. De ce fait, la présence de l'antigène doit être révélée de manière indirecte par une seconde injection de nanoparticules d'or greffées avec des anticorps spécifiques anti-tPSA : la différence des signaux enregistrés pour les molécules sondes anti-tPSA et celles servant de contrôle négatif, greffées à la surface, met ainsi en évidence l'espèce recherchée. Les données présentées proviennent des résultats publiés par Uludag et al. [32].

Bien que très performant, ce type d'approche indirecte supprime toute mesure d'affinité entre l'antigène et son anticorps spécifique : or, dans le cas de certaines applications, cette information peut s'avérer indispensable pour poser un diagnostic [34].

Cependant, combiner la détection directe à la mesure précise des cinétiques d'association et de dissociation anticorps-antigène en milieu complexe constitue, encore aujourd'hui, une procédure peu aisée : cette problématique sera abordée dans le cadre de la dernière partie, applicative, de ce manuscrit.

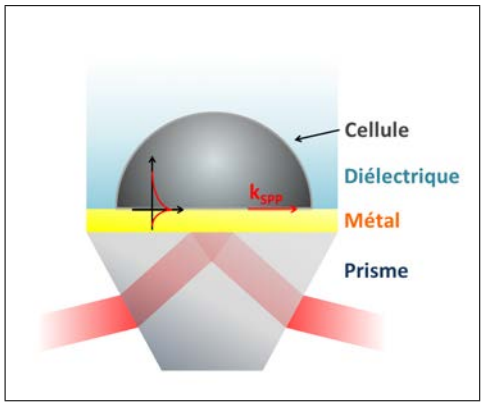
Cellules

A une échelle plus importante, la compréhension des mécanismes cellulaires représente également un domaine d'application relativement étendu des biocapteurs plasmoniques. En effet, le suivi de l'activation de cellules in vitro ouvre la voie à l'étude de nombreux phénomènes physiologiques, tels la toxicité [35], l'allergie [36] ou le comportement cancéreux [37].

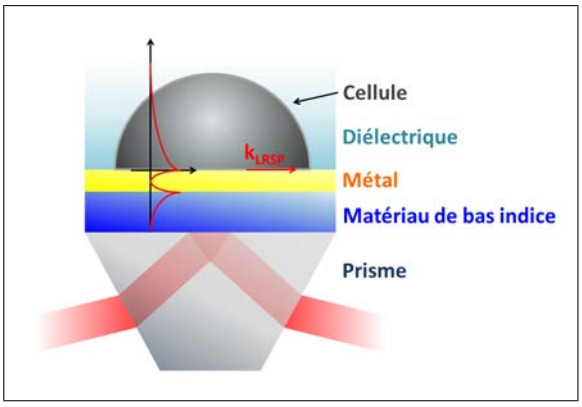
Cependant, à la différence des bio-espèces précédemment citées, les cellules présentent une taille de l'ordre de 1 μm, soit bien supérieure à la profondeur de pénétration sondée par l'onde évanescente plasmonique (quelques centaines de nanomètres). Cette limitation conduit naturellement à une sensibilité plus faible vis-à-vis de l'expression cellulaire. Pour cette raison, un mode plasmonique particulier est généralement exploité dans le cadre de ces études : le plasmon dit "long-range" (Figure 1.16).

A la différence de l'excitation plasmonique "conventionnelle", réalisée à l'interface entre un

film métallique et un milieu diélectrique (Figure 1.16a), le phénomène "long-range" requiert une configuration symétrique de la biopuce (Figure 1.16b). Ainsi, une couche de bas indice optique, idéalement égal à celui du milieu diélectrique, placée en contact avec la face inférieure du film métallique, conduit à l'observation de ce mode particulier [38], présentant une profondeur de pénétration plus adaptée [39] (≈ 1 μm).



(a) **Principe de la résonance plasmonique "conventionnelle".** Dans cette représentation, basée sur la configuration de Kretschmann, l'onde plasmon *SPP* est excitée à l'interface entre un film métallique et un milieu diélectrique, par réflexion totale atténuée sur un prisme de verre de haut indice. La sensibilité de ce phénomène reste limitée à une couche d'épaisseur de l'ordre de 200 nm dans le milieu diélectrique, ce qui restreint l'étude des phénomènes cellulaires à l'interface.



(b) **Principe de la plasmonique "long-range".** L'excitation du mode plasmon "long-range" nécessite une configuration symétrique de la biopuce : le film métallique doit être entouré de deux milieux d'indices relativement proches. Dans un cas satisfaisant cette condition, l'onde plasmon "long-range" *LRSP* générée se propage à l'interface, avec une profondeur de pénétration permettant de sonder intégralement la couche cellulaire déposée à la surface du substrat.

FIGURE 1.16 – **Plasmon propagatif "conventionnel" et plasmon "long-range".**

Des matériaux tels que le Cytop (n $\approx$ 1.34 à 830 nm [40]) ou le Téflon AF (n $\approx$ 1.31 à 830 nm [41]) permettent d'atteindre la configuration désirée : cependant, le long protocole de dépôt associé à ces structures et leur mauvaise tenue mécanique rend difficile une utilisation quotidienne dans le cadre d'études cellulaires.

Cette problématique peut être étendue à des objets similaires, tels que les bactéries. La détection de pathogènes dans l'industrie agro-alimentaire constitue également une part d'activité importante de la biodétection plasmonique [42].

Nécessitant des adaptations expérimentales très particulières (fabrication et fonctionnalisation d'un substrat "long-range", mais également implémentation d'un dispositif de fluidique adapté, intégrant une cellule d'incubation...), cette application de la plasmonique à l'étude de biomolécules de taille importante est citée dans le cas présent à titre d'exemple, et ne sera pas abordée dans la suite de ce manuscrit.

Molécule unique

La détection de molécules présentes à l'état de traces représente une difficulté pour la transduction plasmonique. En particulier, l'adsorption de molécules "uniques" sur un métallique ne permet pas de générer une variation d'indice suffisamment élevée pour pouvoir être détectée de manière directe. En revanche, les nanostructures plasmoniques offrent des propriétés particulièrement intéressantes pour ce type de mesure, et constituent, à l'heure actuelle, une voie de

recherche très active.

Initiée par les travaux de Mirkin et al. [43] sur des biocapteurs basés sur l'aggrégation de nanoparticules fonctionnalisées, l'utilisation de matériaux nanostructurés exploite un confinement du champ électromagnétique à l'échelle du nanomètre, le rendant particulièrement sensible à toute perturbation locale du milieu ambiant. Les nanoparticules métalliques constituent un exemple simple de ce type de structure, permettant de générer un signal détectable à l'échelle de la molécule unique. La configuration présentée sur la Figure 1.17, illustrant le principe de cette détection, repose sur un couplage des résonances plasmons localisées de deux nanoparticules d'or assemblées en un dimère [44]. Une structure basée sur des brins d'ADN partiellement hybridés maintient une distance fixe entre les deux particules, déterminant la longueur d'onde de résonance, et donc les propriétés spectrales de diffusion de l'ensemble ainsi formé. La présence de la séquence cible d'intérêt, reconnue par la structure, conduit à une modification de la distance inter-particules, et donc de la condition de couplage. Cette variation se traduit simplement par un changement de couleur, aisément visible en microscopie en champ obscur.

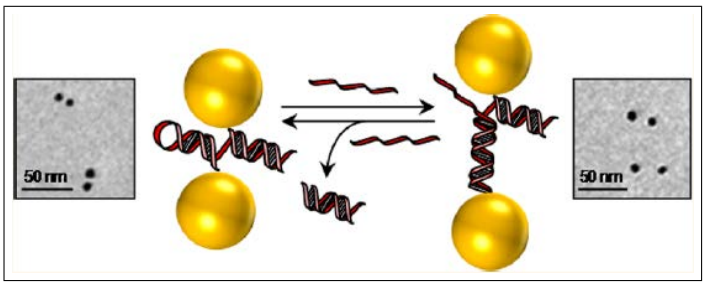


FIGURE 1.17 – **Principe de la détection d'un brin d'ADN unique par un biocapteur plasmonique basé sur des nanoparticules métalliques.** Deux nanoparticules d'or de 8 nm de diamètre sont assemblées en un dimère par des séquences d'ADN. La présence du brin d'ADN cible entraîne une modification de l'assemblage, se traduisant par une modification des propriétés optiques de diffusion du système. Cette représentation est tirée des résultats publiés par Lermusiaux et al. [44].

Depuis les premiers résultats prometteurs obtenus dans ce domaine, l'étude a été étendue à des nanostructures bien plus complexes [45], le phénomène de base étant l'excitation de modes plasmoniques dits "localisés" en raison du faible volume métallique disponible, à la différence des plasmons "propagatifs" plus conventionnels. Le champ électromagnétique ainsi confiné à l'échelle de ces structures présente une sensibilité extrême à toute perturbation locale du milieu ambiant. La faible portée de l'onde plasmonique ($\approx$ 30 nm) constitue dans ce cadre un avantage considérable, dans la mesure où elle limite l'influence des perturbations d'indice "lointaines" du milieu contenant les molécules cibles.

Des difficultés liées à l'utilisation de ces nano-objets peuvent cependant être relevées. En premier lieu, la fabrication des échantillons structurés nécessite dans certains cas un équipement lourd et coûteux (tels que la lithographie par faisceau d'électrons), et des procédures d'optimisation relativement longues. La fonctionnalisation des surfaces utiles à la biodétection est également plus complexe : le confinement du champ aux "points chauds" des structures nécessite une localisation précise des molécules cibles dans les zones exaltées [46]. Enfin, le système de lecture lui-même doit être adapté à ce type de substrat, présentant un comportement plasmonique, et donc une réponse optique, particuliers.

Ces problématiques, évoquées de manière succincte dans ce paragraphe, représentent un défi intéressant, relevé dans le cadre du projet innovant ANR PIRANEX, présenté dans le chapitre 10 de la partie IV de ce manuscrit.

La détection de séquences d'ADN et de protéines correspond, en revanche, à l'application majeure visée par les développements expérimentaux présentés dans les parties II et III suivantes. Comme évoqué lors des exemples introduits dans les paragraphes précédents, l'analyse de ces deux familles de biomolécules impose des performances précises aux capteurs plasmoniques. En raison de l'amplitude des signaux attendus, de 10^{-5} RIU à 10^{-4} RIU tout au plus, un bruit de mesure inférieur à 10^{-6} RIU, en termes de variation d'indice, est vivement souhaité. De même, en raison des perturbations observées pour l'injection d'échantillons complexes, une gamme mesurable allant jusqu'à 10^{-2} RIU semble nécessaire.

Une cadence d'acquisition adaptée aux cinétiques étudiées constitue également un paramètre important vis-à-vis de la qualité de données obtenue. Pour des interactions ADN-ADN aussi bien que pour celles protéines-anticorps, les temps de réaction sont du même ordre de grandeur, de quelques dizaines de secondes à quelques minutes, pour des concentrations injectées typiques de quelques centaines de nanomolaires et une affinité forte entre les espèces cibles et sondes. Pour les cas plus extrêmes des très faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire), les durées d'interaction évoluent de manière inversement proportionnelle à la quantité de cibles injectées et peuvent atteindre plusieurs heures. La cinétique est alors principalement limitée par les effets de fluidique ainsi que par la constante de diffusion des espèces cibles vers la surface de la biopuce [47]. Pour ces raisons, une durée d'acquisition de 30 s par point de mesure représente la limite maximale tolérable mais non satisfaisante, une valeur inférieure étant fortement souhaitée.

Afin de faire face à la compétitivité des systèmes de biodétection présents sur le marché industriel, l'implémentation des biocapteurs plasmoniques se doit de répondre à ces critères de performance. Différentes configurations permettent à l'heure actuelle de combiner les propriétés souhaitées : le chapitre suivant en résume les principales rencontrées dans la littérature.

Chapitre 2

Implémentation des biocapteurs plasmoniques

Sommaire

2.1 Imagerie et temps réel : l'interrogation en réflectivité 34
2.2 L'interrogation angulaire 37
2.3 L'interrogation spectrale 39
2.4 L'interrogation en phase 41
2.5 Quelle méthode choisir ? 43

Depuis les années 1990, les biocapteurs plasmoniques connaissent un essor relativement important, grâce à l'implémentation de dispositifs "user-friendly", compacts et performants. Dans ces systèmes, la détection sans marquage repose sur l'extrême sensibilité de l'onde évanescente générée par le couplage plasmon à toute adsorption de matériel biologique à la surface du film métallique. Plus concrètement, toute perturbation biochimique de ce type affecte les propriétés optiques du faisceau réfléchi par la biopuce : la transduction par SPR consiste à mesurer directement ces variations.

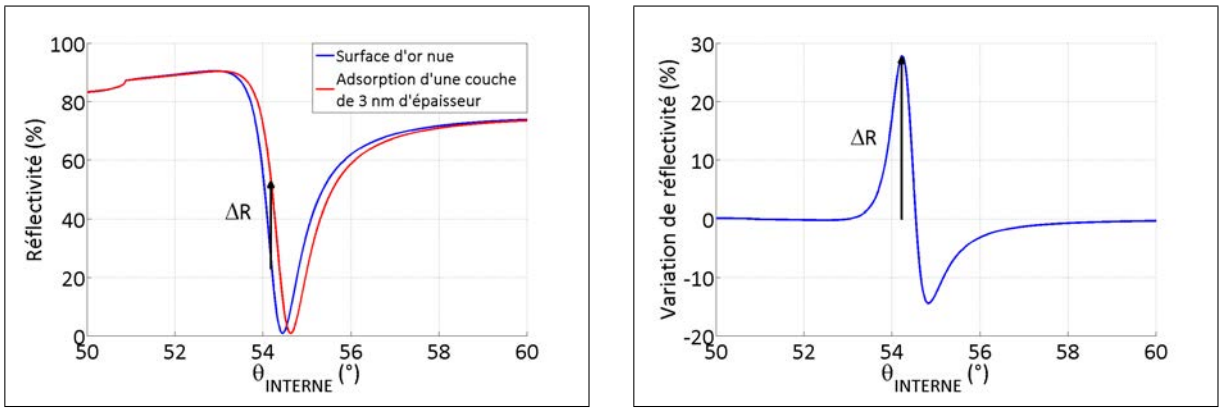
A l'heure actuelle, différents modes de lecture existent, permettant de retranscrire de manière quantitative l'information codée par les propriétés optiques obtenues en réflexion. L'intensité, le spectre, l'angle de résonance, ou encore la phase du faisceau réfléchi, constituent les paramètres les plus fréquemment exploités par la transduction plasmonique : les configurations expérimentales associées se distinguent alors par leurs performances intéressantes, mais également par leurs limites vis-à-vis des conditions de biodétection visées, inhérentes au mode de lecture choisi.

De manière plus précise, deux caractéristiques essentielles permettent d'évaluer ces différentes implémentations : la résolution, exprimée en unité d'indice optique (RIU), correspondant au signal minimal détectable par le système étudié, et la dynamique de mesure, soit l'amplitude maximale des signaux qu'il est possible de déterminer de manière précise. A ces considérations s'ajoutent naturellement la capacité d'imagerie, vivement souhaitée dans le cas d'analyses en parallèle, et la résolution temporelle, essentielle pour l'étude de cinétiques d'interactions.

Ainsi, une comparaison directe des modes de lecture rencontrés dans la littérature met en évidence la nécessité d'un compromis face à ces différents critères de performance. Cette étude, dont fait l'objet ce chapitre, permet d'appréhender les limitations des biocapteurs plasmoniques actuels, à l'origine des développements expérimentaux présentés dans la suite de ce manuscrit.

2.1 Imagerie et temps réel : l'interrogation en réflectivité

Relativement facile à mettre en oeuvre, l'interrogation en réflectivité est particulièrement adaptée à des applications nécessitant l'étude de plusieurs interactions cibles-sondes en parallèle, telles que le diagnostic génétique [30], la détection de pathogènes [48] ou encore le contrôle anti-dopage [49]. Dans ce cas, le signal mesuré correspond à une variation de l'intensité réfléchie, induite par la modification de la condition de résonance lors de l'adsorption de biomolécules à la surface de la biopuce (Figure 2.1a). Plus précisément, cette mesure est réalisée à un angle d'incidence et une longueur d'onde fixes, judicieusement choisis de manière à exploiter la sensibilité maximale de l'onde évanescente générée par le couplage plasmon (Figure 2.1b). Une longueur d'onde élevée, dans le proche infrarouge, est généralement privilégiée [50], car associée à un profil de résonance angulaire étroit (se reporter à la Figure 1.3, p.15) : l'angle de fonctionnement optimal correspond alors à la valeur maximale de la pente de la résonance.



(a) **Décalage angulaire de la résonance pour une longueur incidente fixe de 750 nm, induite par l'adsorption de molécules biologiques à la surface d'une biopuce.**

(b) **Variation de réflectivité induite par l'adsorption de molécules biologiques à la surface d'une biopuce.**

FIGURE 2.1 – **Principe de la mesure en interrogation en réflectivité.** L'adsorption de molécules biologiques (modélisées dans le cas présent par une couche de 3 nm d'épaisseur et d'indice optique égal à 1.48) modifie les conditions de couplage plasmon. Pour une longueur d'onde incidente fixe (750 nm dans le cas présenté), le décalage de la résonance est mesuré en termes de variation de réflectivité, à l'angle correspondant au maximum de sensibilité. Les calculs présentés sont basés sur la méthode de Rouard [21].

Cette méthode, traditionnellement citée sous l'acronyme de SPRI (de l'anglais *Surface Plasmon Resonance Imaging* ou Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface), offre l'avantage de pouvoir réaliser un multiplexage des analyses biomoléculaires. Une implémentation classique, représentée sur la partie haute de la Figure 2.2 fait appel à une illumination par un faisceau monochromatique collimaté dans une configuration de Kretschmann. Un capteur à deux dimensions peut alors être placé en sortie du montage afin collecter les l'intensité réfléchie sur toute la surface de la biopuce. A titre d'illustration, une image ainsi enregistrée est donnée sur la partie basse, à gauche, de la Figure 2.2 : codée en variation de réflectivité, elle fait apparaître en couleur claire les plots sondes ayant interagi avec les molécules cibles injectées. Le fond resté sombre présente quant à lui une variation de réflectivité nulle, en raison de l'absence d'interaction à la surface passivée de la biopuce.

De manière générale, l'ordre de grandeur de la zone imagée est d'environ 1 cm de diamètre, permettant de ce fait l'étude de près d'une centaine d'interactions en parallèle [51]. De plus,

grâce aux systèmes de détection actuels, les données ainsi enregistrées sont accessibles en temps réel (la cadence de mesure étant au plus de l'ordre de quelques secondes par point de mesure), rendant la méthode présentée parfaitement compatible avec l'étude de cinétiques d'interactions biomoléculaires. La partie basse, à droite, de la Figure 2.2 représente les signaux extraits en termes de variation de réflectivité (ΔR) au cours d'une expérience d'interaction ADN-ADN : les différentes familles de courbes tracées correspondent simplement à la gamme de concentrations de molécules sondes déposées.

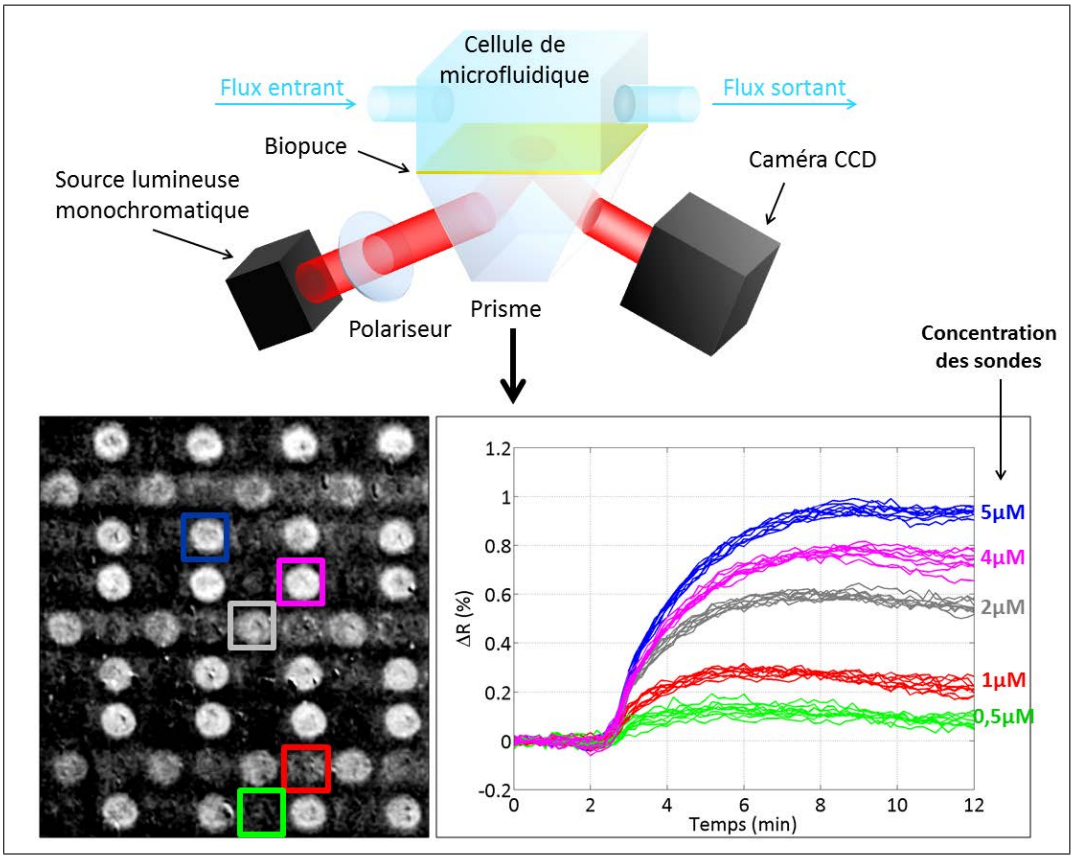


FIGURE 2.2 – **Illustration des propriétés de mesure offertes par l'interrogation en réflectivité.** Un montage classique de l'interrogation en réflectivité (présenté en haut de cette image) est basé sur une configuration de Kretschmann, avec une illumination monochromatique. L'angle d'incidence est fixé par la position angulaire de la pente maximale du profil de résonance plasmon. La mesure des variations de réflectivité est alors réalisée en polarisation TM, par un détecteur à deux dimensions en sortie du montage. Le suivi des interactions biomoléculaires peut ainsi être réalisé en temps réel (figure en bas à droite), et ce pour toute la surface de la biopuce imagée (représentée en bas à gauche).

Du point de vue des performances, la résolution affichée, de l'ordre de 0.005% de variation de réflectivité ou 10^{-6} RIU, correspond à une limite de détection de 1 $pg.mm^{-2}$ en termes de densité surfacique de matériel biologique adsorbé sur la biopuce. Cette valeur, limitée par le bruit de photons de la source (généralement une diode électro-luminescente), peut être optimisée par une méthode de "self-referencing" des fluctuations de l'intensité incidente combinée à un contraste de polarisation [52], ou plus simplement à une intégration spatiale du signal plus importante [53].

Malheureusement, à l'heure actuelle, le caractère multiplexe, principal atout revendiqué par ces systèmes, ne peut être obtenu qu'au prix d'une dynamique de mesure restreinte [54], de quelques 10^{-3} RIU. En comparaison, comme évoqué précédemment (sous-section 1.3.2), les

conditions de détection réelles sont susceptibles de conduire à des variations d'indice bien plus importantes ($\approx 10^{-2}$ RIU). D'autre part, le choix d'un point de fonctionnement unique ne permet pas d'atteindre une sensibilité optimale pour toutes les molécules sondes déposées à la surface de la biopuce, ce qui induit dans certains cas une dispersion relativement importante des signaux mesurés.

La Figure 2.3 illustre la qualité de données ainsi affectée lors d'une mesure usuelle d'interaction ADN-ADN. Dans l'exemple choisi, une seule famille de molécules sondes a été déposée sous forme d'une matrice de réplicats à la surface d'une biopuce ; une solution cible unique a également été injectée. La variation importante du signal enregistré pour cette même interaction, extrait sur des plots d'ADN sondes distincts, est liée à l'inhomogénéité de la fonctionnalisation chimique et du dépôt des ligands sur la biopuce, qui affecte directement les conditions de résonance plasmon de ces différents régions analysées.

En effet, contrairement à la figure précédente (Figure 2.2), les variations de réflectivité extraites n'ont pas été corrigées par une première injection de cibles dites "de calibration" (cette procédure sera détaillée dans la section 5.3 du chapitre 5), afin d'illustrer les cas où un tel étalonnage n'est simplement pas possible en raison de la nature des sondes ou du déroulement des expériences.

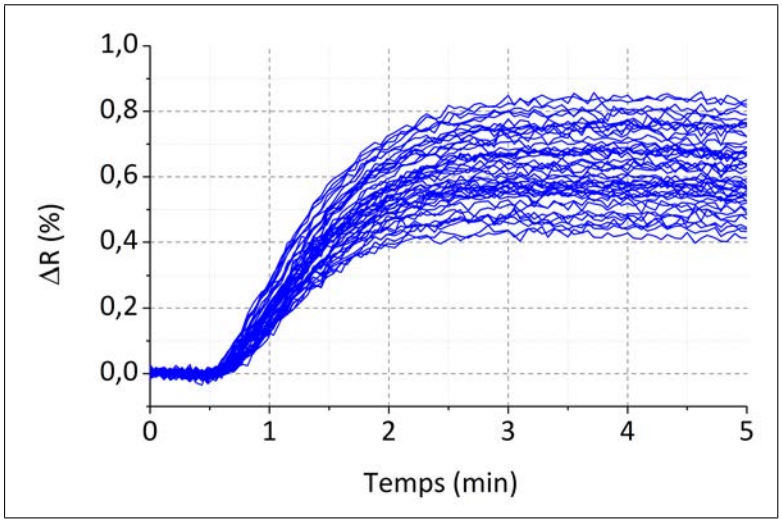


FIGURE 2.3 – **Dispersion des données en interrogation en réflectivité.** L'inhomogénéité de la surface analysée conduit naturellement à une dispersion des conditions de résonance plasmon. De ce fait, le choix d'un point de fonctionnement unique résulte en une dispersion des sensibilité aux différentes régions d'intérêt de la biopuce, et donc à une dispersion des données en termes de variation de réflectivité.

Ces deux principales limitations, inhérentes à l'interrogation en réflectivité, rendent les systèmes de SPRI associés peu robustes face à des conditions de détection complexes, telles que celles rencontrées dans le cadre d'applications de diagnostic [55].

Pour cette raison, d'autres méthodes sont généralement privilégiées en raison de leur qualité de mesure supérieure dans ce domaine : l'interrogation angulaire et l'interrogation spectrale, basées sur une détermination directe des conditions de résonance.

2.2 L'interrogation angulaire

De manière similaire à la méthode introduite dans le paragraphe précédent, l'interrogation angulaire exploite une longueur d'onde incidente fixe. Dans de telles conditions d'excitation, la modification des propriétés du couplage plasmonique se traduit directement par un décalage de la position angulaire de la résonance $\Delta\theta$ (Figure 2.4), signal d'intérêt mesuré par cette méthode.

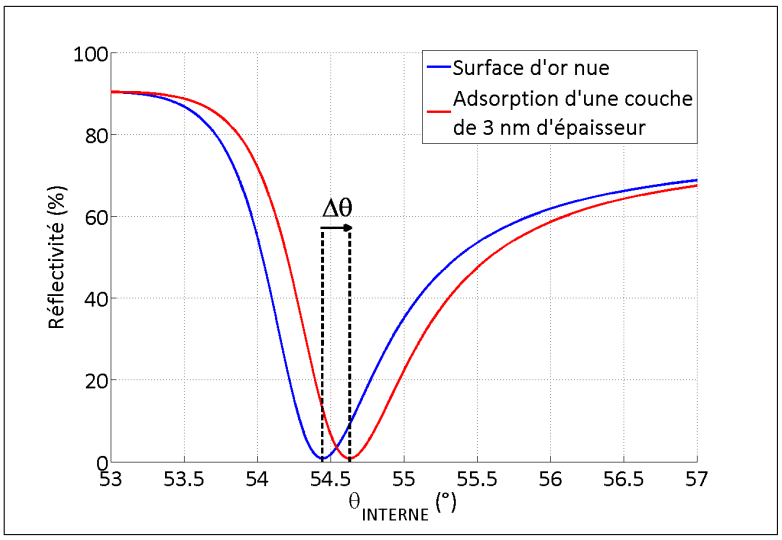


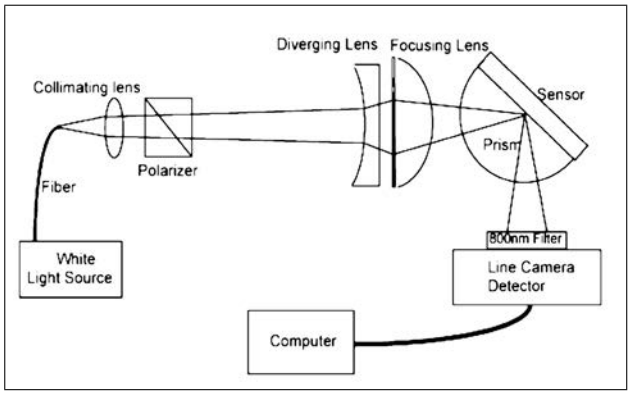
FIGURE 2.4 – **Principe de la mesure en interrogation angulaire.** Pour une longueur d'onde incidente fixe (750 nm dans le cas présenté), l'adsorption de molécules biologiques à la surface de la biopuce (modélisées par une couche homogène de 3 nm d'épaisseur et d'indice optique égal à 1.48) induit un décalage angulaire $\Delta\theta$ de la résonance plasmon, correspondant au signal mesuré par cette méthode d'interrogation. Les calculs présentés sont basés sur la méthode de Rouard [21].

L'implémentation de ce type de configuration vise principalement à optimiser deux paramètres essentiels : la sensibilité, soit le décalage angulaire enregistré pour une variation d'indice optique donné du milieu diélectrique (de l'ordre de 60 °/RIU dans les conditions de couplage présentées sur la Figure 2.4), ainsi que la largeur de la résonance, dont dépend directement la résolution du système. En effet, un élargissement du profil angulaire conduit à un rapport signal à bruit faible sur la détermination de la position du minimum de réflectivité : par conséquent, une résonance étroite est privilégiée. Cette démarche revient à considérer la figure de mérite du système [56], définie comme le rapport entre ces deux contributions (soit la sensibilité divisée par la largeur de la résonance) et exprimée en RIU^{-1}. Augmentant avec la longueur d'onde d'illumination, ce paramètre peut également être optimisé par le dépôt d'un film d'argent, au lieu de l'or traditionnellement utilisé : le profil de résonance plus étroit ainsi obtenu conduit alors à une meilleure résolution.

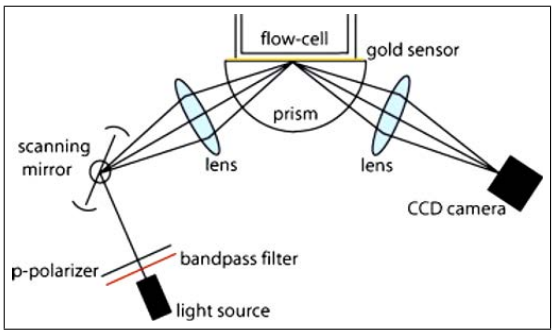
Indépendant de la dispersion des conditions de résonance initiales à la surface de la biopuce, le décalage angulaire mesuré est également linéaire vis-à-vis des variations d'indice du milieu diélectrique en contact avec le film métallique, donnant lieu à une plus grande dynamique de mesure. Ces deux avantages notables vis-à-vis de l'interrogation en réflectivité ne peuvent cependant être obtenus sans compromettre d'autres propriétés fondamentales, telles que la capacité d'imagerie, ou encore celle de mesure en temps réel.

En effet, la reconstruction du profil de la résonance nécessite une excitation multi-angulaire des plasmons de surface : cette procédure peut être réalisée de manière simultanée, par un faisceau

convergent à la surface de la biopuce (Figure 2.5a), ou de manière séquentielle, par un balayage mécanique de l'angle d'incidence (Figure 2.5b).



(a) **Montage d'interrogation angulaire basé sur un faisceau convergent à la surface de la biopuce.** Cette figure est tirée des résultats de Guo et al. [57].



(b) **Montage d'interrogation angulaire basé sur un balayage mécanique de l'angle d'incidence du faisceau à la surface de la biopuce.** Cette figure est tirée des résultats de Beusink et al. [58].

FIGURE 2.5 – **Exemples d'implémentations possibles de biocapteurs fonctionnant en interrogation angulaire**.

Illustrée sur la Figure 2.5a dans une configuration de Kretschmann, la première implémentation évoquée repose sur la convergence du faisceau d'illumination monochromatique sur la surface analysée. Les rayons réfléchis, issus des différentes conditions d'excitation plasmoniques, se retrouvent dispersés sur une caméra placée en sortie du montage. Un tel montage permet ainsi d'acquérir un profil plasmonique résolu en temps réel [57], mais ce au détriment de l'imagerie de la biopuce, dans la mesure où une dimension du détecteur utilisé est exploitée pour enregistrer les informations relatives au spectre angulaire. De ce fait, l'analyse est nécessairement limitée à une ligne de plots sondes, réduisant par conséquent le débit des données fournies par cette méthode. Une implémentation équivalente, basée sur un couplage par réseau [59] (se reporter à la Figure 1.6b, p.17), conduit à des performances similaires : de manière générale, une dynamique de mesure de quelques 10^{-2} RIU et une résolution de l'ordre de 10^{-7} RIU sont observées pour ces systèmes. A titre indicatif, ces données correspondent à des valeurs respectives de l'ordre de 1° et $0,1m^\circ$ en angle interne (défini sur la Figure 1.6a, p.17, comme étant l'angle d'incidence sur le film métallique, après réfraction du faisceau dans le prisme) : par comparaison, la largeur du profil de la résonance est d'environ 1° pour une longueur d'onde incidente de 750 nm (Figure 2.4).

La seconde implémentation de l'interrogation angulaire introduite dans ce paragraphe (Figure 2.5b) offre l'avantage d'une imagerie à deux dimensions, permettant ainsi l'analyse simultanée de différentes biomolécules [58]. Présentée également dans une configuration de Kretschmann basée sur un prisme hémisphérique, cette solution fait appel à un balayage mécanique de l'angle d'incidence du faisceau d'illumination monochromatique sur la biopuce. Pour chaque position angulaire considérée, une image de la matrice de plots est enregistrée par un détecteur à deux dimensions (caméra CCD...).

Cette procédure peut être réalisée par le mouvement mécanique d'un miroir du montage optique, ou, dans une configuration statique, par l'allumage séquentiel d'un ensemble de sources de même longueur d'onde mais d'angles d'incidence variés sur la biopuce. Dans les deux cas, le balayage angulaire semble limiter la cadence d'acquisition : une fréquence optimale de 3 Hz est rapportée [60], contre 10 Hz dans le cas de la configuration précédente [13]. Malgré ce détail,

le système reste néanmoins compatible avec des analyses en temps réel [61], mais affiche une résolution légèrement plus proche de celle de l'interrogation en réflectivité, de l'ordre de 10^{-6} RIU [60].

Les performances intéressantes des configurations présentées dans ce paragraphe ont conduit à la commercialisation de dispositifs de biodétection proposés par Biacore ou encore Ibis Technologies. Des performances similaires peuvent également être obtenues par une méthode semblable : l'interrogation spectrale. Présentée dans le paragraphe suivant, cette technique de mesure est, à la différence de l'interrogation angulaire, peu représentée au niveau industriel.

2.3 L'interrogation spectrale

Equivalent direct de la méthode exposée dans le paragraphe précédent, l'interrogation spectrale est réalisée à un angle d'incidence fixe. Le décalage spectral du minimum de réflectivité $\Delta\lambda$ constitue alors le signal mesuré dans cette configuration (Figure 2.6).

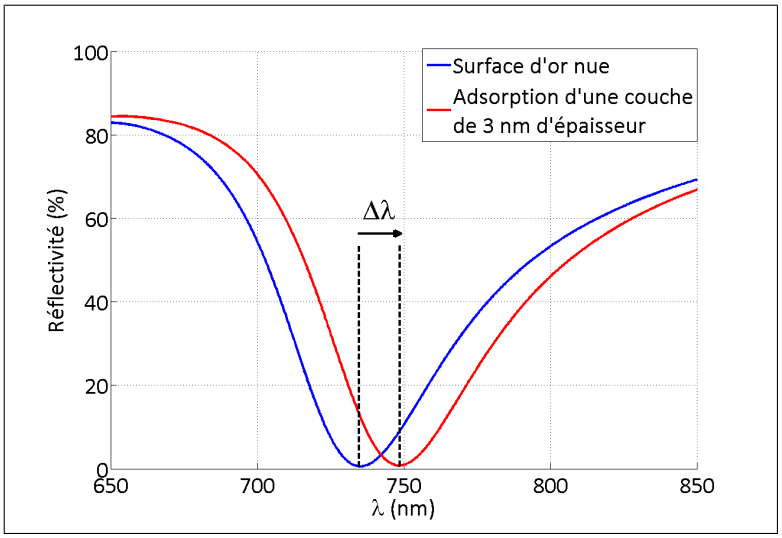


FIGURE 2.6 – **Principe de la mesure en interrogation spectrale.** Pour un angle d'incidence fixe (54.6 °, correspondant à l'angle interne après réflexion sur le prisme dans la configuration de Kretschmann), l'adsorption de molécules biologiques à la surface de la biopuce (modélisées par une couche homogène de 3 nm d'épaisseur et d'indice optique égal à 1.48) induit un décalage spectral $\Delta\lambda$ de la résonance plasmon, correspondant au signal mesuré dans le cadre de cette méthode d'interrogation. Les calculs présentés sont basés sur la méthode de Rouard [21].

L'implémentation la plus répandue est basée sur une illumination polychromatique en configuration de Kretschmann : un spectromètre est alors utilisé afin de récupérer en temps réel l'information spectrale du faisceau réfléchi par la biopuce (Figure 2.7).

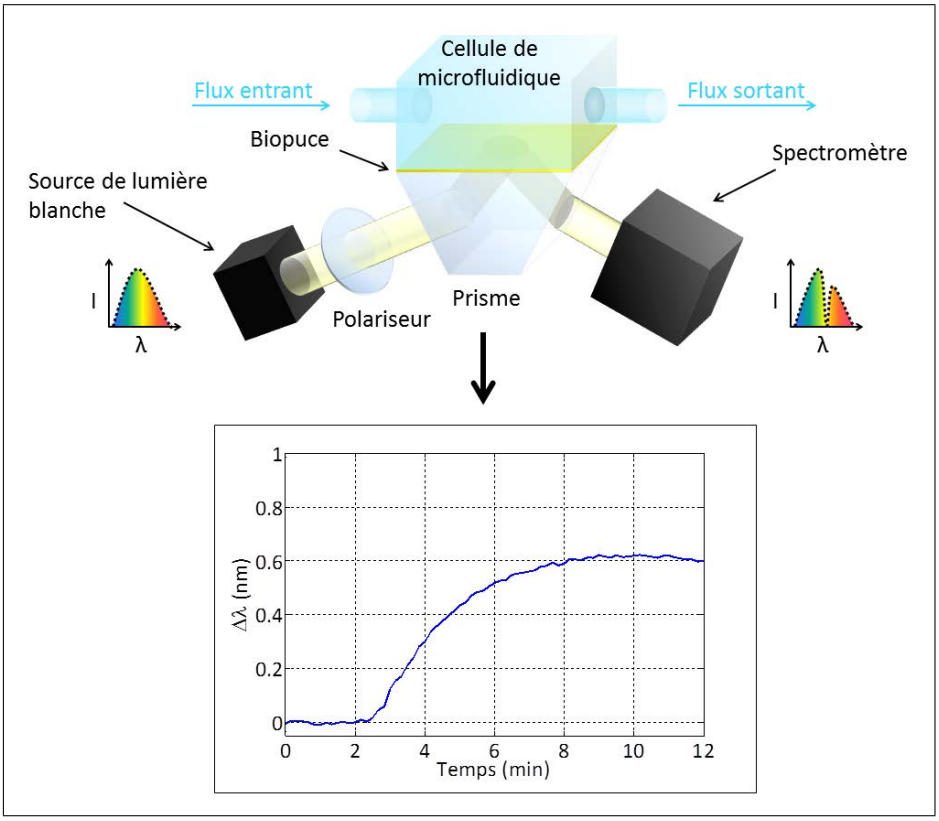


FIGURE 2.7 – **Représentation schématique d'un montage classique d'interrogation spectrale.** Dans une configuration de Kretschmann, pour un angle d'incidence fixe, une illumination polychromatique offre une large gamme spectrale d'excitation des plasmons de surface. La chute de réflectivité à la longueur d'onde de couplage est visualisée sur un spectromètre permettant l'acquisition d'un profil de résonance spectral résolu. Le suivi des interactions biomoléculaires par la position du minimum de réflectivité peut ainsi être réalisé en temps réel, mais pour une surface limitée de la biopuce.

De manière générale, la cadence de mesure semble légèrement inférieure à celle de l'interrogation angulaire [62] ($\approx$ 1 Hz). En revanche, les performances affichées en termes de résolution (de l'ordre du picomètre, soit environ 10^{-7} RIU) et la dynamique de mesure ($> 10^{-2}$ RIU) restent comparables, voire supérieures.

La figure de mérite du système est également favorisée aux hautes longueurs d'onde [56] : dans le cas des conditions de couplage présentées sur la Figure 2.6, une sensibilité de 4600 nm/RIU et une largeur de 70 nm conduisent à une figure de mérite de 66 RIU^{-1}, comparable à la valeur obtenue dans le paragraphe précédent en interrogation angulaire. Cependant, une optimisation rigoureuse du dispositif expérimental, combinée avec une structuration de la biopuce, peut conduire à des performances exceptionnelles : ainsi, une figure de mérite supérieure à 800 RIU^{-1} et une résolution de 2.5×10^{-8} RIU ont été rapportées par Slavík et Homola dans le cas de biopuces "long-range" [41].

Plus précis et plus robustes face aux conditions de détection réelles, ces systèmes sont privilégiés par rapport à l'interrogation en réflectivité pour des applications en milieu complexe : dans le cas de l'antigène ALCAM (*activated cell leukocyte adhesion molecule*), marqueur potentiel du cancer du pancréas, une limite de détection de 10 ng/mL en sérum dilué à 10% a ainsi pu être atteinte en interrogation spectrale [63], contre 45 ng/mL dans une configuration d'interrogation en réflectivité particulièrement optimisée, bénéficiant à la fois d'une méthode de "self-referencing"

et de contraste de polarisation [64].

En raison de la symétrie des méthodes d'interrogation angulaire et spectrale, des contraintes expérimentales semblables à celles exposées dans le paragraphe précédent rendent difficile la combinaison de l'imagerie en deux dimensions avec une résolution temporelle satisfaisante. En effet, une implémentation classique, basée sur une illumination en lumière blanche couplée à un spectromètre (Figure 2.7), reste limitée à une mesure en mono-point à la surface de la biopuce. Les systèmes commercialisés par GWC Technologies constituent l'un des rares exemples d'une telle implémentation à l'échelle industrielle [65]. Par analogie avec l'interrogation angulaire, une configuration basée sur un balayage de la longueur d'onde du faisceau incident, en combinaison avec une caméra CCD placée en sortie du montage, pourrait être également envisagée : cependant, la nécessité d'une source accordable en longueur d'onde complexifie le prototypage d'un tel système, et ne garantit pas une cadence d'acquisition compatible avec les cinétiques biomoléculaires visées.

Abordées en détail dans la suite de ce manuscrit (chapitre 3 de la partie II), ces problématiques expliquent en grande partie le faible nombre de prototypes commerciaux fonctionnant en interrogation spectrale, à l'heure actuelle.

2.4 L'interrogation en phase

Nettement moins répandue, la méthode d'interrogation présentée dans ce paragraphe exploite l'existence d'un saut de phase abrupt en polarisation TM au voisinage de la résonance (Figure 2.8).

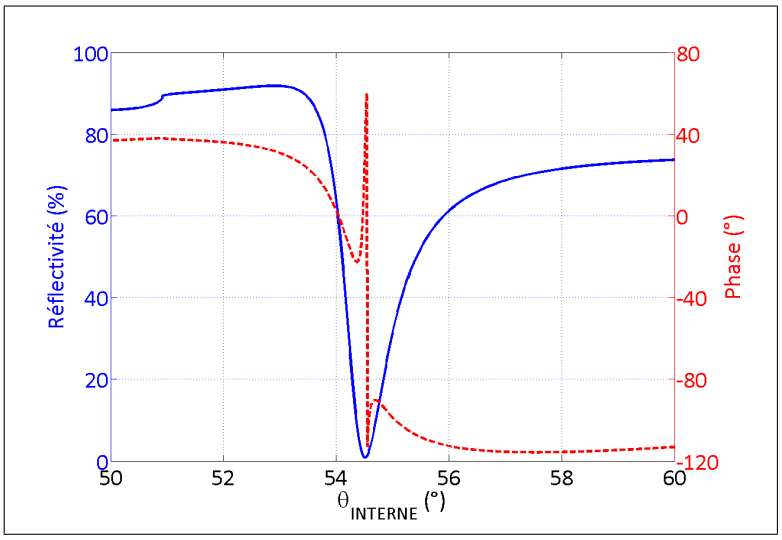


FIGURE 2.8 – **Principe de la mesure en interrogation en phase.** Pour une longueur d'onde incidente fixe (750 nm dans le cas présenté), l'adsorption de molécules biologiques à la surface de la biopuce (modélisées par une couche homogène de 3 nm d'épaisseur et d'indice optique égal à 1.48) induit un saut de phase important en polarisation TM. La mesure du déphasage entre les polarisations correspondant au signal mesuré dans le cadre de cette méthode d'interrogation. Les calculs présentés sont basés sur la méthode de Rouard [21].

Par analogie avec les méthodes présentées précédemment, l'interrogation en phase consiste à mesurer, par interférence, la variation de phase du faisceau réfléchi lors de l'adsorption de biomolécules à la surface de la biopuce. Une configuration de Mach-Zehnder, couplée à un montage

classique d'interrogation en réflectivité, peut être utilisée dans ce but (Figure 2.9). Dans une telle implémentation, le faisceau incident est tout d'abord divisé en deux faisceaux d'égale intensité à l'aide d'une lame séparatrice : le premier faisceau, servant à la mesure, est dirigé vers la biopuce plasmonique posée sur un prisme, dans une configuration de Kretschmann. L'angle d'incidence est ajusté à la résonance, correspondant au point d'inflexion de la phase. Le second faisceau de référence, est atténué par un filtre absorbant de manière a égaler en intensité le faisceau de mesure réfléchi par la biopuce dans les conditions de résonance plasmon. Les deux faisceaux sont alors à nouveau combinés par une lame séparatrice : la figure d'interférence obtenue peut être visualisée directement par une caméra CCD placée sur l'une des deux sorties de l'interféromètre. Le déplacement des franges, généré par la variation d'indice du milieu diélectrique sondé, reflète alors le déphasage recherché en temps réel (comme dans le cas de l'interrogation en réflectivité, la cadence d'acquisition dépend alors principalement des performances de la caméra utilisée et des paramètres de moyenne temporelle des signaux enregistrés).

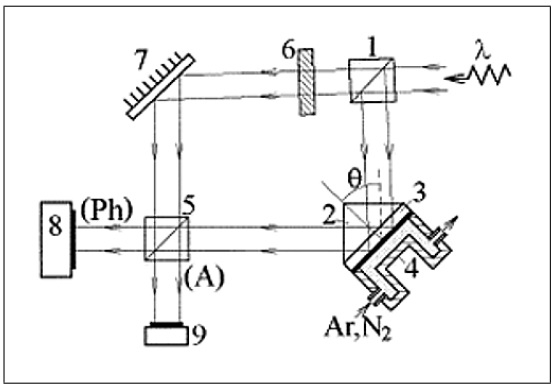


FIGURE 2.9 – **Représentation schématique d'un montage d'interrogation en phase.** Le faisceau incident, monochromatique, est divisé en deux faisceaux d'égale intensité par une lame séparatrice (1). Le faisceau de mesure est orienté vers la biopuce (3) placée sur un prisme (2) dans une configuration de Kretschmann, sous un angle d'incidence correspondant à la résonance plasmon. Le second faisceau de référence est atténué par un filtre absorbant (6), avant d'être réfléchi par un miroir (7) et combiné à nouveau au faisceau de mesure par une seconde lame séparatrice(5). Une caméra CCD (9) placée sur l'une des deux sorties de l'interféromètre permet de visualiser le décalage des franges d'interférence induit par la variation de l'indice du milieu diélectrique en contact avec la biopuce. Au niveau de la seconde voie de sortie, une photodiode (8) collecte les variations d'intensité moyenne de la figure d'interférence. Le montage présenté provient des résultats publiés par Kabashin et Nikitin [66].

La résolution supérieure aux méthodes précédentes, évaluée en premier lieu de manière théorique à 4×10^{-8} RIU [66], a été démontrée expérimentalement par la suite [67]. Cependant, cette performance exceptionnelle s'accompagne d'un saut de phase abrupt à la résonance, rendant le système particulièrement vulnérable aux fluctuations de température ou d'indice du milieu réactif. D'autre part, cette sensibilité accrue correspond à une gamme de variations d'indice très restreinte, et offre de ce fait une dynamique de mesure extrêmement limitée. Ce compromis entre la résolution et la dynamique de mesure peut être ajusté dans une certaine mesure par l'épaisseur du film métallique, mais ne permet pas d'atteindre une configuration optimale vis-à-vis des contraintes expérimentales évoquées précédemment. Les résultats de Junfeng et al. [68] dans le cadre d'un système combinant l'imagerie et l'interrogation en phase ont ainsi démontré qu'une résolution de 10^{-6} RIU était limitée à une dynamique de seulement 2×10^{-3} RIU ; de même, une gamme de mesure plus étendue, de 8×10^{-2} RIU compromettait fortement la résolution du système, qui n'atteignait alors que 10^{-4} RIU, soit l'ordre de grandeur maximal des signaux biomoléculaires attendus.

En raison de ces performances, cette méthode n'est que peu représentée le marché des biocapteurs plasmoniques : la société BiOptix [69] en constitue un exemple isolé.

2.5 Quelle méthode choisir ?

De manière générale, les mesures par SPR sont réalisées à l'heure actuelle avec un compromis sur les performances obtenues. Dans le cas de l'interrogation en réflectivité ou en phase, les analyses menées en parallèle nécessitent des conditions de détection idéales, et ne tolèrent qu'une faible variation d'indice de la solution contenant les molécules cibles à détecter. En interrogation angulaire ou spectrale, la robustesse offerte par une dynamique de mesure étendue ne peut être exploitée dans le cadre d'un multiplexage de données, du moins sans compromettre la résolution temporelle. Ces performances caractéristiques des méthodes d'interrogation introduites dans les paragraphes précédents sont résumées dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 – **Caractéristiques des méthodes d'interrogation des biopuces plasmoniques.**

Configuration	Résolution	Dynamique	Imagerie en 2D	Mesure en temps réel	Mouvement mécanique	Système commercial
Interrogation en réflectivité	10^{-6} RIU	10^{-3} RIU	Oui	Oui	Non	HORIBA Scientific [15]
Interrogation angulaire (faisceau convergent)	10^{-7} RIU	10^{-2} RIU	Non	Oui	Non	Biacore [13]
Interrogation angulaire (balayage de l'angle d'incidence)	10^{-6} RIU	10^{-2} RIU	Oui	Oui (Cadence limitée)	Oui	Ibis Technologies [14]
Interrogation spectrale	10^{-7} RIU	10^{-2} RIU	Non	Oui	Non	GWC Technologies [65]
Interrogation en phase	10^{-8} RIU	$< 10^{-4}$ RIU	Non	Oui	Non	BiOptix [69]

Les applications variées des biocapteurs plasmoniques, abordées précédemment dans le chapitre 1, nécessitent une certaine adaptabilité de ces systèmes face aux conditions de détection réelles qui peuvent être rencontrées. Ainsi, l'analyse de biomolécules de petite taille, telles que les séquences d'ADN, ou plus simplement présentes à de faibles concentrations, requiert une résolution de l'ordre de 10^{-6} RIU. D'autre part, l'injection d'échantillons complexes, tels que du sérum, ne peut être réalisée sans une dynamique de mesure suffisante, de 10^{-2} RIU. Enfin, ces performances indispensables doivent pouvoir être atteintes dans une configuration offrant à la fois un multiplexage de données suffisant ($>$ 100 interactions en parallèles) et une résolution

temporelle compatible avec les mesures de cinétiques visées : un point de mesure toutes les 30 s représente la cadence limite tolérable, mais non satisfaisante (une durée inférieure à cette valeur doit être visée impérativement), vis-à-vis de durées d'interaction de quelques minutes.

Dans ce contexte, l'interrogation angulaire représente une solution envisageable : cependant, la configuration offrant les performances souhaitées nécessiterait alors un balayage mécanique de l'angle d'incidence du faisceau sur la biopuce. Cela impose par conséquent certaines contraintes, à la fois sur l'imagerie (déplacement de l'image de la biopuce sur la caméra suivant l'angle d'incidence) et sur la précision du balayage angulaire (dont dépend la résolution de la mesure).

Face aux exigences énoncées, une nouvelle méthode d'interrogation multi-spectrale a été développée en collaboration avec le Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, et la société HORIBA Scientific. Présentée dans la suite de ce manuscrit, la solution implémentée ouvre la voie à une nouvelle génération de biodétecteurs performants, compacts et de coût relativement raisonnable, présentant un potentiel industriel certain.

Deuxième partie

Développement d'un système de SPRI multi-spectrale

Chapitre 3

Etat de l'art de l'interrogation spectrale

Sommaire

3.1 Configurations basées sur un élément diffractant 48
3.2 Configurations basées sur un balayage spectral 50
3.3 Autres implémentations rencontrées 51
3.4 Quelle configuration retenir ? 52

L'interrogation en réflectivité permet aux capteurs plasmoniques de combiner à la fois mesure en temps réel et imagerie en deux dimensions : grâce à ces deux modalités, une information sur la cinétique des interactions est accessible en tout point de la biopuce analysée. Bon nombre d'applications peuvent tirer avantage de ces propriétés, qui permettent d'analyser en parallèle l'affinité d'une molécule cible vis-à-vis de différentes sondes moléculaires. Non seulement les durées de mesure peuvent être considérablement réduites, mais les analyses deviennent également moins coûteuses en échantillons. Malheureusement, à l'heure actuelle, ce mutliplexage ne peut être obtenu qu'au prix d'une dynamique de mesure restreinte et d'un point de fonctionnement unique qui ne permet pas d'avoir une sensibilité optimale pour toutes les molécules sondes déposées à la surface de la biopuce.

Ces limitations peuvent cependant être contournées en exploitant les performances offertes par l'interrogation spectrale ou angulaire. Ces deux techniques permettent de s'affranchir des conditions expérimentales en proposant une mesure basée sur le décalage, respectivement spectral ou angulaire, de la résonance plasmon. Cette approche rend possible l'étude simultanée de multiples espèces biologiques, de poids moléculaires différents, à la surface d'une même biopuce. D'autre part, la robustesse apportée par la dynamique de mesure étendue permet de découpler la sensibilité de la mesure et les variations d'indice de l'échantillon analysé.

A l'heure actuelle, il existe des systèmes commerciaux combinant à la fois l'imagerie, le temps réel et l'interrogation angulaire : l'acquisition du profil de la résonance est obtenue par un balayage continu de l'angle d'incidence du faisceau sur la biopuce. En revanche, l'équivalent spectral de ce type de mesure, qui permettrait de s'affranchir de ce mouvement mécanique, n'est que très peu abordé dans la littérature.

En effet, l'état de l'art de l'interrogation spectrale, présenté dans ce chapitre, met en évidence les difficultés majeures liées au développement d'un système réalisant une mesure du décalage spectral de la résonance plasmon, en temps réel, et en tout point d'une matrice de plots-sondes à deux dimensions. Cependant, cette étude laisse également entrevoir des pistes de recherche permettant de répondre à cette problématique. La mise en place, l'optimisation et la validation d'un nouveau prototype d'interrogation multi-spectrale sont abordées de manière concrète dans

les chapitres 4 et 5 de cette partie.

3.1 Configurations basées sur un élément diffractant

Le développement récent de spectromètres performants, compacts et bas coût est à l'origine de la configuration très répandue, présentée dans ce paragraphe. En effet, l'interrogation spectrale étant par définition une mesure du décalage de la résonance plasmon pour un angle d'incidence fixe, il est évident qu'un spectromètre permettant d'acquérir le profil spectral en temps réel soit un élément à privilégier pour ce type de mesure [70].

Une implémentation typique, basée sur une illumination en lumière blanche dans une configuration de Kretschmann, est illustrée sur la Figure 3.1. Dans ces conditions, le faisceau d'illumination de large bande spectrale, en polarisation TM, est réfléchi par la biopuce plasmonique avant d'être collecté par un spectromètre placé en sortie du montage, conduisant à une mesure mono-point.

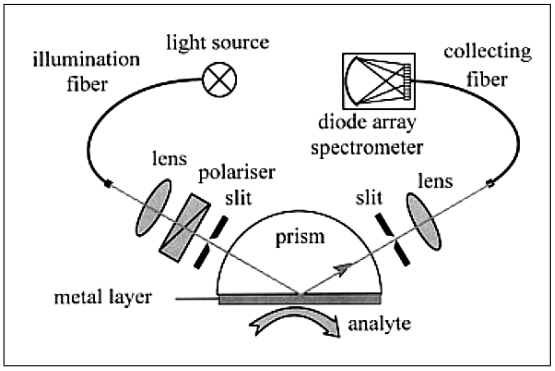


FIGURE 3.1 – **Montage d'interrogation spectrale utilisant un spectromètre.** Cette figure est tirée des résultats de Stemmler et al. [70].

De la même manière, l'utilisation d'un réseau diffractif permet de disperser le faisceau réfléchi sur un capteur à une ou deux dimensions de manière à récupérer l'information spectrale sur la résonance plasmon [71]. La Figure 3.2 présente une implémentation possible dans une configuration de Kretschmann : une ligne de lumière blanche, obtenue par l'utilisation d'une fente en entrée du montage, est dirigée après réflexion sur la biopuce vers un réseau diffractif. La séparation angulaire des composantes spectrales est alors imagée par une caméra CCD, suivant la direction orthogonale à la fente d'entrée. Cette méthode d'analyse reste par conséquent limitée à une mesure en une dimension de la biopuce (une ligne de plots sondes).

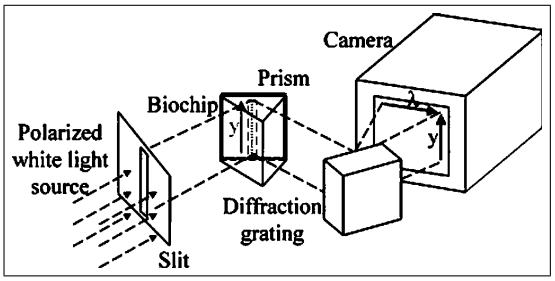


FIGURE 3.2 – **Montage d'interrogation spectrale utilisant un réseau diffractif.** Cette figure est tirée des résultats de Bardin et al. [71].

Une approche alternative consiste à utiliser la biopuce elle-même comme élément diffractant [72], ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'un spectromètre, et obtenir un prototype plus compact mais tout aussi performant (Figure 3.3). Comme pour les exemples précédents, une illumination de bande spectrale large est employée. L'excitation plasmonique est alors réalisée via un couplage par réseau (se reporter à la Figure 1.6, p. 17) sur la surface structurée de la biopuce plasmonique. Les composantes spectrales séparées spatialement sont recueillies par un détecteur à deux dimensions de type CMOS ou CCD, offrant ainsi une mesure en temps réel du profil spectral de la résonance. Comme pour la configuration précédente, la mesure permet une analyse suivant une dimension de la biopuce (soit une ligne de plots sondes). Cependant, à la différence des implémentations précédentes basées sur un couplage par prisme, la propagation du faisceau d'illumination fait intervenir un trajet à travers le milieu diélectrique, soit l'échantillon à analyser. Les variations optiques induites lors des manipulations expérimentales sont par conséquent susceptibles de perturber la mesure spectrale dans cette configuration.

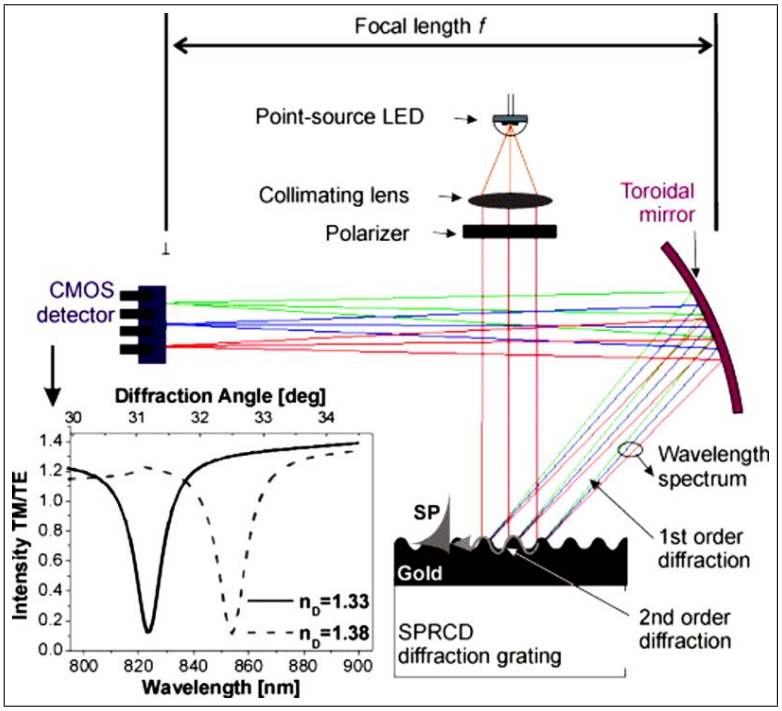


FIGURE 3.3 – **Montage d'interrogation spectrale utilisant une biopuce dispersive structurée en réseau.** Cette figure est tirée des résultats de Piliarik et al. [72].

La résolution de tels systèmes peut atteindre 10^{-7} RIU, ce qui offre une limite de détection très adaptée à l'analyse de traces [73, 74]. De plus, grâce à la large gamme spectrale des spectromètres, la dynamique de mesure est nettement supérieure à celle de l'interrogation en réflectivité. La cadence d'acquisition, quant à elle, est très satisfaisante, de quelques secondes par spectre (cette valeur est alors déterminée principalement par les performances du détecteur utilisé, ainsi que du paramétrage de la moyenne temporelle des signaux recueillis), soit une durée nettement inférieure à celle maximale autorisée vis-à-vis des applications envisagées (la limite tolérable ayant été fixée à 30 s par point de mesure).

Le seul défaut imputable à ces configurations est la perte de la capacité d'imagerie au profit de l'acquisition du profil de la résonance. Ainsi, une configuration basée sur un spectromètre ne permet malheureusement qu'une mesure mono-point. Dans le cas d'une caméra CCD ou CMOS,

l'imagerie de la biopuce reste limitée à une ligne de plots sondes, ce qui décroît considérablement le nombre d'analyses effectuées en parallèle [75, 76]. Un balayage spatial mécanique de la biopuce peut être envisagé [77], au détriment de la capacité de temps réel, mais cette mesure contraignante n'est généralement pas adoptée.

3.2 Configurations basées sur un balayage spectral

Moins répandue, la technique présentée dans ce paragraphe permet un multiplexage des données sans les contraintes d'un balayage spatial mécanique. Dans ce cas, l'interrogation spectrale est réalisée par un balayage de la longueur d'onde du faisceau incident sur la biopuce, basé sur une source de lumière blanche utilisée en combinaison avec un monochromateur. L'acquisition des images de réflectivité correspondantes par un capteur à deux dimensions placé en sortie du montage permet de reconstruire le profil de la résonance plasmon en tout point de la biopuce analysée.

Bien que la plupart des travaux publiés dans ce domaine fassent référence à un échantillonnage relativement important sur une large gamme spectrale (650 nm - 950 nm), rendant impossible toute mesure en temps réel [78, 79], un tel nombre de points de mesure n'est pas indispensable pour atteindre une résolution satisfaisante sur la position du minimum de réflectivité. Otsuki et Ishikawa [80] ont ainsi démontré des performances intéressantes à partir d'un balayage spectral de 5 longueurs d'onde (Figure 3.4).

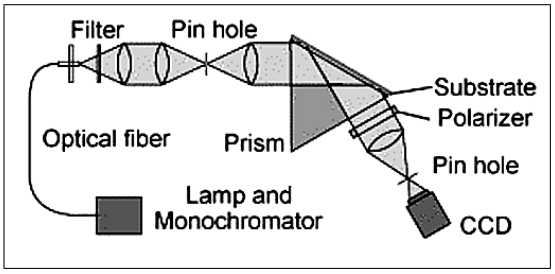


FIGURE 3.4 – **Montage d'interrogation spectrale utilisant un monochromateur.** Cette figure est tirée des résultats de Otsuki et Ishikawa [80].

Grâce à un traitement de données adapté, la résolution du système présenté sur la Figure 3.4 peut atteindre quelques 10^{-6} RIU, ce qui représente une perte d'un ordre de grandeur par rapport aux configurations citées dans le paragraphe précédent. Le faible nombre de points de mesure, associé à des conditions d'acquisition moins favorables (la durée de balayage souhaitée imposant une limite sur la moyenne temporelle des images enregistrées) serait à l'origine de l'écart observé. Cependant, la capacité d'imagerie n'est pas compromise, de même que celle de mesure en temps réel, grâce à une durée de balayage de 10 s par série de 5 longueurs d'onde (soit inférieure à la limite fixée précédemment à 30 s, représentant la valeur maximale tolérable, mais non satisfaisante). D'autre part, les performances annoncées restant équivalentes aux systèmes actuels de SPRI fonctionnant en interrogation en réflectivité, cette configuration permet donc d'envisager des applications de biodétection en temps réel, à haut débit de données.

De plus, en raison du faible nombre de longueurs d'onde incidentes nécessaires, une configuration plus compacte peut être envisagée : récemment, un système d'interrogation spectrale à 3 LEDs (diodes électro-luminescentes) a été implémenté dans le cadre de biopuces plasmoniques nanostructurées [81]. Cependant, la résolution obtenue, de l'ordre du nanomètre, soit supérieure à

10^{-4} RIU, rend ce système inadapté dans le cadre d'une biopuce conventionnelle, dans la mesure où le signal attendu est du même ordre de grandeur, voire plus faible.

Ces résultats néanmoins très prometteurs laissent entrevoir des pistes de recherche pour le développement d'un système de SPRI combinant les avantages de l'interrogation spectrale et ceux de l'interrogation en réflectivité : une optimisation de ces configurations a conduit aux résultats majeurs de ce manuscrit, présentés en détail dans la suite de cette Partie, ainsi que dans la partie III.

3.3 Autres implémentations rencontrées

D'autres implémentations, quelque peu moins conventionnelles, peuvent également être rencontrées dans la littérature. Récemment, l'usage de filtres à cristaux liquides a été référencé dans le cadre de biocapteurs nanostructurés [82] : le principe de cette mesure reste relativement semblable à la configuration précédente, utilisant un monochromateur. En effet, dans le cas du montage en transmission présenté sur la Figure 3.5, l'illumination est réalisée par une source de lumière blanche : l'interrogation spectrale du faisceau transmis par l'échantillon plasmonique est alors effectuée par un filtre à cristaux liquides dynamique. Une synchronisation avec une caméra CCD placée en sortie du montage permet l'obtention d'une série d'images à différentes longueurs d'onde. Bien que les auteurs aient rapporté des cycles de balayage de quelques minutes, incompatibles vis-à-vis la cadence d'acquisition visée, une durée de l'ordre de quelques secondes pourrait être atteinte en théorie, d'après les spécifications techniques du composant utilisé [83]. Cette procédure est donc potentiellement adaptée à des applications de biodétection nécessitant des capacités d'imagerie en deux dimensions et de mesure en temps réel.

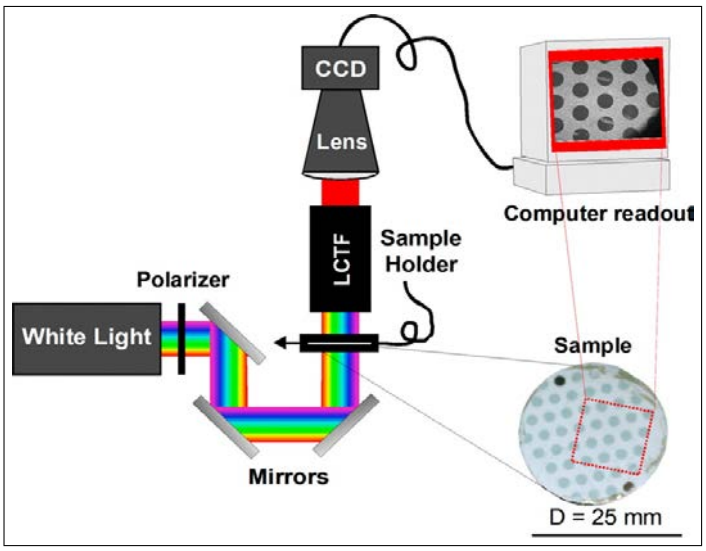


FIGURE 3.5 – **Montage d'interrogation spectrale utilisant des filtres à cristaux liquides.** Cette figure est tirée des résultats de Ruemmele et al. [82]

.

Le coût des composants utilisés décroît considérablement le potentiel industriel de cette configuration, mais le principal verrou reste la résolution des filtres à cristaux liquides, de l'ordre du nanomètre, soit une variation d'indice supérieure à 10^{-4} RIU, et donc à l'amplitude de signal maximale attendue pour une interaction ADN-ADN.

Une configuration particulièrement originale, introduite par Zheng et al. [84] offre également des performances intéressantes en termes de cadence d'acquisition. L'idée avancée consiste à disperser de manière temporelle l'information spectrale de la résonance plasmon, contrairement au cas le plus répandu où ces données sont dispersées spatialement par l'usage d'un élément diffractant (section 3.1).

L'implémentation proposée repose sur l'utilisation d'une source à impulsions ultra-courtes, permettant générer une illumination à spectre large avec une cadence élevée. Un élément dispersif est alors utilisé pour introduire un *chirp*, soit un élargissement temporel linéaire du spectre : un détecteur à haute cadence adapté (une photodiode PIN, par exemple) permet d'échantillonner le signal reçu et reconstruire le profil de la résonance plasmon. La Figure 3.6 illustre cette méthode originale, adaptée dans une configuration de Kretschmann :

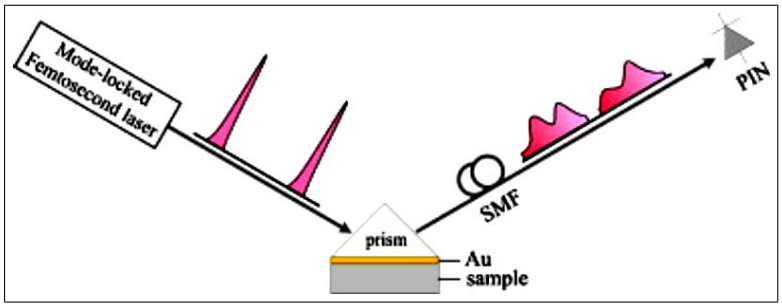


FIGURE 3.6 – **Montage d'interrogation spectrale utilisant une source à impulsions femtosecondes.** Cette figure est tirée des résultats de Zheng et al. [84].

Le choix d'une source à impulsions ultra-courtes impose malheureusement des contraintes importantes sur les différents éléments du montage, en particulier du point de vue thermique. De plus, le détecteur utilisé doit être adapté à la fréquence d'acquisition visée (de l'ordre de quelques dizaines de MHz dans le cas des travaux cités, soit un point de mesure toutes les 100 ns), ce qui est incompatible avec un système d'imagerie numérique (tel qu'une caméra CCD, par exemple), limitant ce type de capteur à une mesure mono-point.

D'autre part, il est important de noter que les données fournies par les auteurs ne permettent pas d'estimer avec précision la résolution atteinte. Une valeur inférieure à 5×10^{-5} RIU peut être avancée d'après les données expérimentales, sans certitude absolue.

3.4 Quelle configuration retenir ?

Les paragraphes précédents mettent en évidence la diversité des implémentations possibles de l'interrogation spectrale. Cette méthode de mesure a été privilégiée dans le cadre de ces travaux, en raison des performances particulièrement intéressantes offertes en comparaison avec l'interrogation en réflectivité traditionnelle. En effet, la robustesse permettant de s'affranchir des conditions expérimentales (telles que l'inhomogénéité de la biopuce et les variations d'indice des solutions injectées), la résolution et la dynamique de mesure, constituent des avantages non négligeables pour des applications de détection réelles.

Parmi les configurations étudiées précédemment, la plus répandue fait appel à l'utilisation d'un spectromètre en sortie du montage, de manière à collecter en temps réel le profil spectral de la résonance plasmonique. Bien qu'offrant une excellente résolution (10^{-7} RIU), cette méthode reste limitée à une mesure mono-point, et ne peut donc pas être employée pour des analyses

nécessitant un haut débit de données. De performances équivalentes en termes de résolution et de cadence (de l'ordre de quelques secondes par spectre), l'implémentation basée sur un réseau diffractant, associé à un détecteur à deux dimensions (caméra CCD ou CMOS), permet d'acquérir simultanément l'information spectrale relative à une ligne de plots sondes. Une alternative, utilisant une structuration en surface de la biopuce, peut également être envisagée, mais fait intervenir un trajet du faisceau d'illumination à travers l'échantillon, susceptible de perturber la mesure.

Moins répandu, le balayage spectral du faisceau d'illumination par un monochromateur permet de combiner les capacités d'imagerie en deux dimensions et de mesure en temps réel, avec une cadence d'acquisition de 10 s pour un ensemble de 5 longueurs d'onde. Bien que plus faible en comparaison avec les méthodes précédemment citées, la résolution atteinte, de l'ordre de 10^{-6} RIU, reste néanmoins équivalente à celle de l'interrogation en réflectivité. Une implémentation voisine, basée sur un filtrage spectral dynamique du faisceau provenant de l'échantillon analysé, offre des propriétés équivalentes, à l'exception d'une très mauvaise résolution (10^{-4} RIU) due à la précision spectrale du filtre à cristaux liquides utilisé.

Enfin, la configuration jugée la plus originale, basée sur une excitation femtoseconde combinée à un *chirp*, présente trop de contraintes instrumentales pour envisager une utilisation quotidienne dans le cadre des applications visées. En complément de cet aspect pratique, une caractérisation plus poussée demeure nécessaire afin de conclure avec certitude sur les performances réellement atteintes.

Pour une comparaison directe des différentes configurations étudiées, les propriétés principalement recherchées dans le cadre de ces travaux sont résumées dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 – **Sources d'illumination multi-spectrale.**

Configuration	**Imagerie en 2D**	**Mesure en temps réel**	**Résolution**	**Référence**
Spectromètre	Non	Oui	10^{-7} RIU	Stemmler et al. [70]
Réseau diffractif + Caméra CCD	Non (imagerie en 1D)	Oui	10^{-7} RIU	Bardin et al. [71]
Biopuce structurée + Caméra CMOS	Non (imagerie en 1D)	Oui	10^{-7} RIU	Piliarik et al. [72]
Source blanche + Monochromateur	Oui	Oui	10^{-6} RIU	Otsuki et al. [80]
Cristaux liquides	Oui	Oui (en théorie, non démontré par les auteurs)	10^{-4} RIU	Ruemmele et al. [82]
Source à impulsions ultra-courtes	Non	Oui	$< 5 \times 10^{-5}$ RIU (donnée approximative)	Zheng et al. [84]

Du point de vue de la problématique énoncée, les configurations décrites dans la section 3.2, basées sur un balayage spectral du faisceau incident, offrent des perspectives intéressantes pour combiner les avantages de l'interrogation spectrale à ceux de l'interrogation en réflectivité. Cependant, en raison des durées relativement importantes associées à ce mode d'illumination, le choix des longueurs d'onde incidentes doit faire l'objet d'une optimisation rigoureuse vis-à-vis des trois paramètres jugés essentiels dans le cadre des applications envisagées : la cadence d'acquisition, la résolution et la dynamique de mesure.

Les développements présentés dans la suite de cette partie rendent compte de l'implémentation d'une technique semblable d'interrogation multi-spectrale sur un banc expérimental de SPRI développé précédemment au Laboratoire Charles Fabry. En particulier, l'influence du choix des longueurs d'onde incidentes sur les performances recherchées, de même que l'optimisation du traitement de données, sont analysés en détail dans le but d'élaborer un système de mesure par SPR compétitif vis-à-vis des configurations traditionnelles présentées dans ce chapitre.

Chapitre 4

Nous avons l'imagerie, mais le temps réel ?

Sommaire

4.1 Quelques mots sur le banc expérimental 56

4.1.1 Principe de fonctionnement général 57

4.1.2 L'interrogation spectrale en temps réel 59

4.2 Reconstruction du profil de la résonance plasmon 62

4.3 Résolution et nombre de longueurs d'onde 64

4.3.1 Etude expérimentale de la résolution en interrogation multi-spectrale 64

4.3.2 Détermination des limitations du système 67

4.4 Dynamique de mesure 74

4.5 Résolution temporelle 79

L'état de l'art exposé au chapitre précédent a révélé les principales difficultés liées au développement d'un système de SPRI combinant imagerie, temps réel et interrogation spectrale. Face à cette problématique, la solution offerte par un balayage spectral des longueurs d'onde incidentes présente un potentiel particulièrement intéressant. En effet, une configuration basée sur une source blanche couplée à un monochromateur ne nécessite que peu de modifications du banc expérimental existant, et offre l'avantage d'acquérir une image en deux dimensions sans balayage spatial de la biopuce analysée. Cependant, même avec un tel système, l'interrogation spectrale requiert un mouvement mécanique, celui du réseau sélectionnant les longueurs d'onde incidentes choisies. Or, pour les applications envisagées, la durée de mesure, soit la fréquence du balayage spectral, doit rester compatible avec les cinétiques d'interactions biomoléculaires.

Le principal défi consiste par conséquent à réduire la durée de ce balayage, ce qui revient à réduire le nombre de longueurs d'onde incidentes, tout en gardant une qualité de mesure supérieure vis-à-vis de l'interrogation en réflectivité. Les performances en termes de résolution, de dynamique de mesure, qui sont les principaux atouts de l'interrogation spectrale, doivent donc être impérativement évaluées. Les développements présentés dans ce chapitre s'efforcent de répondre à cette problématique avec un esprit pratique, tourné vers les exigences des "end-users" potentiels.

4.1 Quelques mots sur le banc expérimental

Le banc SPRI ayant servi de base aux développements présentés dans ce manuscrit a été élaboré lors de précédents travaux sur la caractérisation de biopuces nanostructurées (Figure 4.1). Il s'agit d'un système bimodal, dans la mesure où il permet d'effectuer à la fois une interrogation spectrale et angulaire, et d'accéder ainsi aux propriétés plasmoniques complètes, en termes de conditions de résonances (λ, θ), pour des substrats "non-conventionnels", aussi bien que pour des films métalliques plats [85]. La Figure 4.1 schématise le dispositif expérimental utilisé : le détail et les caractéristiques techniques des différents composants sont donnés dans le paragraphe suivant.

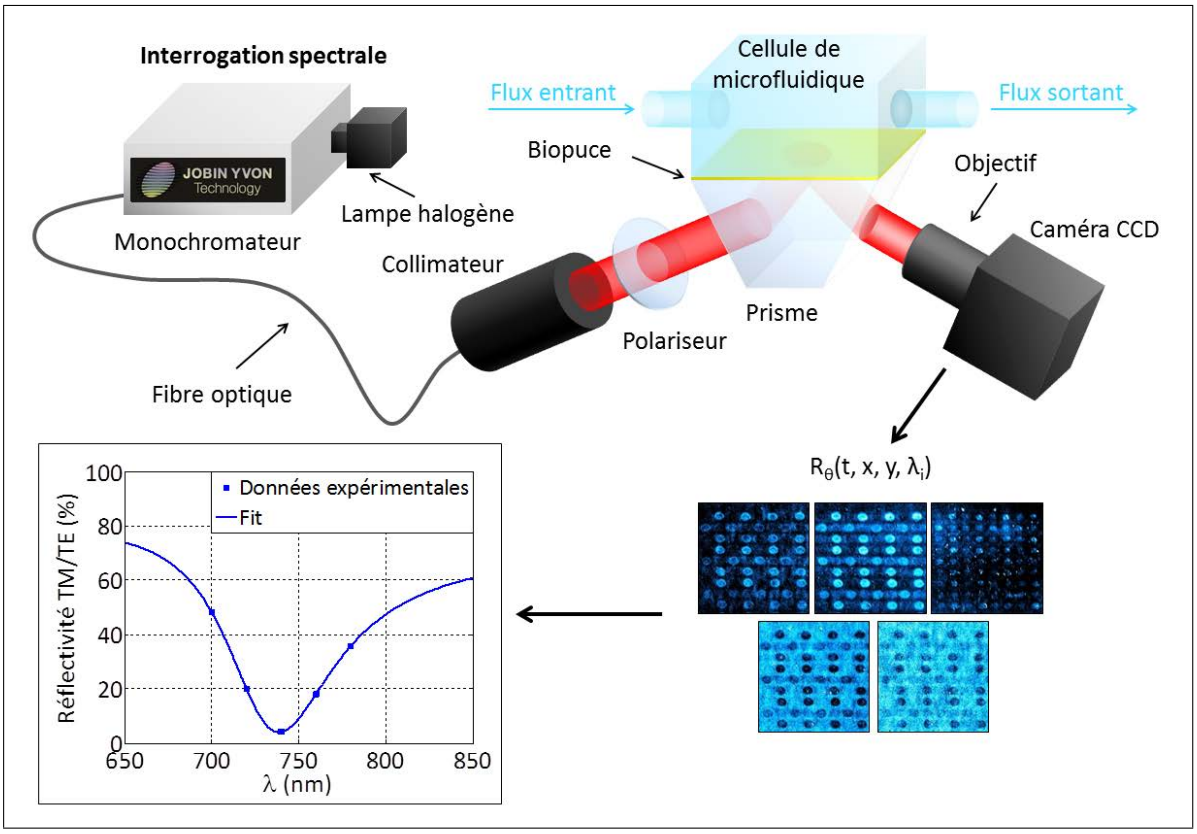


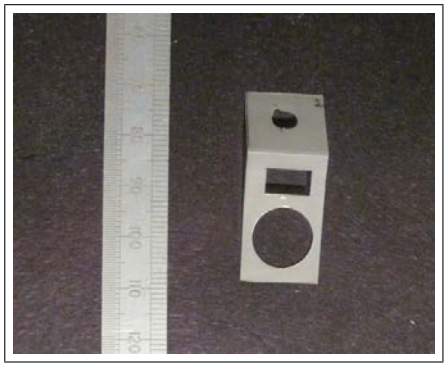
FIGURE 4.1 – **Banc expérimental de SPRI offrant une modalité d'interrogation spectrale**. L'utilisation d'une lampe halogène et d'un monochromateur permet de sélectionner la longueur d'onde incidente dans une large gamme spectrale. En sortie du système d'illumination, le faisceau est collecté par une fibre optique multimode, collimaté et polarisé linéairement. Après réflexion sur la biopuce, une lame de verre SF10 recouverte d'une couche d'adhésion de 3 nm de chrome et de 51 nm d'or, le faisceau est transmis vers une caméra CCD.

La problématique énoncée précédemment porte sur le développement d'un système de SPRI fonctionnant en interrogation spectrale. Par conséquent, la modalité d'interrogation angulaire du dispositif expérimental schématisé sur la Figure 4.1, qui repose sur un mouvement de rotation symétrique des bras "source" et "caméra", ne sera pas exploitée dans les travaux présentés dans ce chapitre. Cependant, il est important de noter que la condition de résonance des plasmons de surface attribue des rôles symétriques à la longueur d'onde et à l'angle d'incidence : les résultats obtenus dans cette partie sont donc transposables à l'interrogation angulaire (chapitre 10).

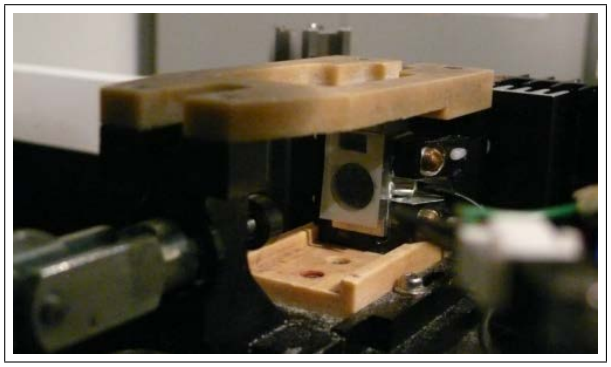
4.1.1 Principe de fonctionnement général

La modalité d'interrogation spectrale, qui sera exploitée pour les développements expérimentaux présentés dans ce chapitre, est réalisée de la manière suivante :

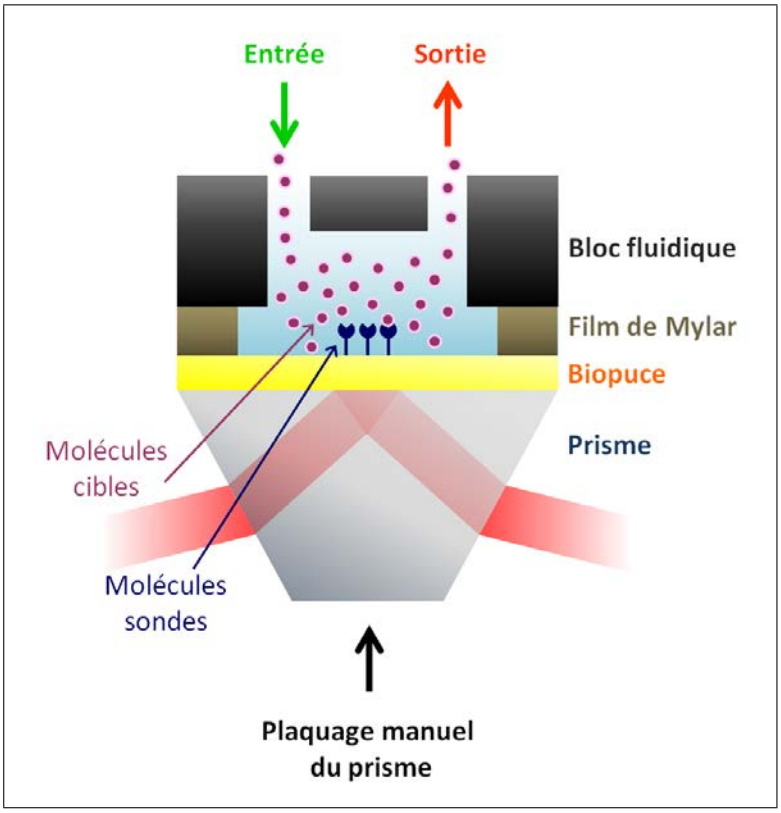
- Une **source de lumière blanche** (lampe halogène) couplée à un monochromateur (iHR 320, HORIBA Scientific) permet de sélectionner la longueur d'onde d'incidence dans la gamme 500-1500 nm. La largeur spectrale de l'illumination peut également être ajustée, par un contrôle des fentes d'entrée et de sortie de l'appareil. Ce détail est particulièrement important dans le cas présent, où la qualité de l'imagerie influence directement la résolution et la précision des mesures effectuées. La cohérence spectrale et spatiale de la source doit donc être optimisée de manière à limiter tout phénomène de speckle. Pour cette raison, la largeur spectrale est fixée à 13 nm pour la suite des développement expérimentaux. De même, la lumière en sortie du monochromateur est collectée par une fibre optique multimode de 365 μm de coeur.
- La lumière incidente est alors transmise vers un **collimateur à miroir**, permettant d'obtenir un faisceau collimaté de 1 cm de diamètre avec une divergence angulaire de 0.23 ° (valeur liée au diamètre de la fibre multimode et à la focale du collimateur).
- Un **polariseur linéaire** large bande permet de sélectionner la polarisation TM ou TE du faisceau incident sur la biopuce.
- Le couplage de l'onde incidente aux plasmons de surface de la biopuce (une lame de verre SF10 de 2 mm d'épaisseur, recouverte d'une couche d'accroche de 3 nm de chrome et de 51 nm d'or) est réalisé dans la configuration de Kretschmann, basée sur un **prisme équilatéral** en verre SF10. Une huile de couplage ($n = 1.72$) permet d'assurer la continuité de l'indice optique de cette configuration.
- Le faisceau réfléchi est capté par une **caméra CCD** (Pixelfly QE, 1392 × 1024 pixels, de dynamique égale à 18000 électrons par puits), munie d'un zoom optique permettant d'adapter la taille de la zone d'intérêt sur l'image en réflectivité de la biopuce.
- L'**angle d'incidence** peut être varié de 45 ° à 75 ° (angle interne après réfraction sur le prisme) grâce à des platines motorisées sur lesquelles sont montés les bras "source" et "caméra" du dispositif expérimental. Les expériences de caractérisation présentées dans la suite de ce manuscrit ont été réalisées à un angle d'incidence interne fixe de 55.54 °, afin d'induire un couplage plasmon dans le proche infrarouge, gamme spectrale pour laquelle la caméra présente une sensibilité optimale.
- Un **système de fluidique** (Figure 4.2) permet d'injecter les solutions souhaitées à la surface de la biopuce. Il comprend un bloc solide en titane, présentant des trous d'entrée et de sortie, contre lequel est posée une cuve de 90 μm d'épaisseur et 1 cm de diamètre, découpée dans un film de Mylar relativement souple. La biopuce plasmonique posée sur le prisme est alors plaquée contre la cellule : l'étanchéité est assurée par pression mécanique sur le bloc fluidique.
- Une **pompe péristaltique** équipée d'un dégazeur et une boucle d'injection de 200 μL permettent d'injecter les solutions souhaitées (Figure 4.3). Dans le cas des travaux présentés dans cette partie, le débit est fixé à 50 μL/min.
- Un **module Peltier** permet de réguler la température à 0.01 °C près, par un asservissement "proportionnel intégral dérivé" (communément dénommé "PID"). Dans le cas des expériences présentées dans la suite de ce manuscrit, la température de consigne a été fixée à 25 °C.



(a) **Film de Mylar découpé manuellement, assurant la fonction de cellule fluidique dans le montage expérimental.**



(b) **Photographie de la cellule fluidique utilisée dans le montage expérimental.**



(c) **Schéma du système de fluidique utilisant un film de Mylar.** Dans cette représentation de la cellule fluidique vue en section, un bloc en titane, équipé de trous d'entrée et de sortie du flux, est recouvert par un film de Mylar présentant une découpe circulaire formant la cellule fluidique.

FIGURE 4.2 – **Principe de la cellule fluidique basée sur l'utilisation d'un film souple de Mylar.**

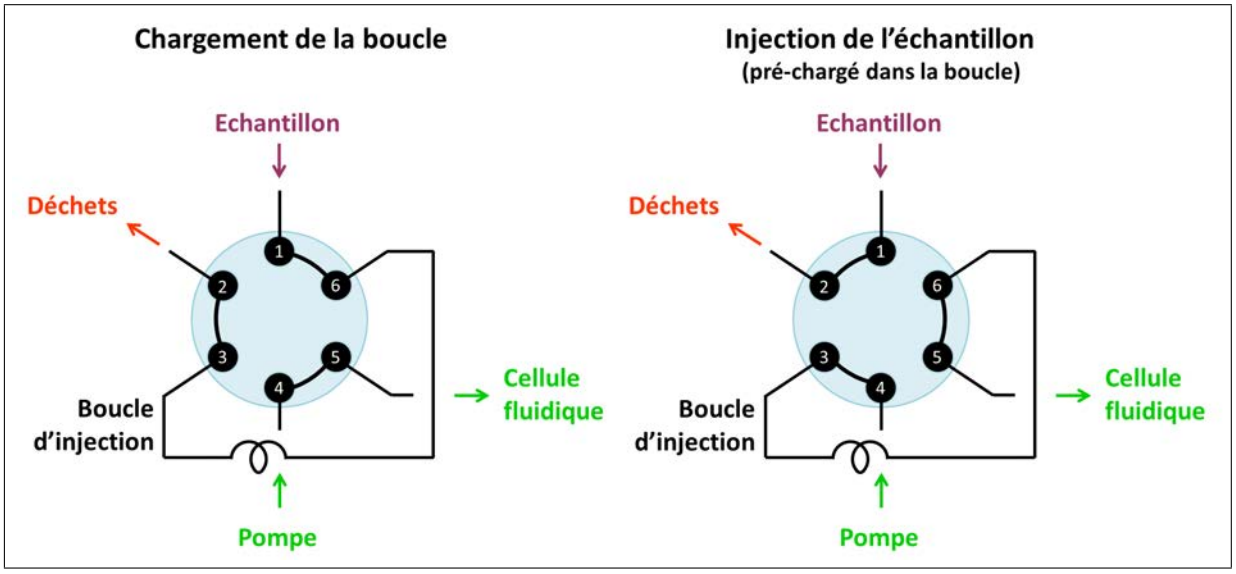


FIGURE 4.3 – **Principe de fonctionnement de la vanne d'injection utilisée dans le montage expérimental**. Un système de basculement entre les différentes entrées et sorties du flux permet l'injection des échantillons dans la cellule fluidique. Dans une première position, dite de "chargement de la boucle", la solution à analyser est pré-chargée dans une boucle de 200 μL. Le surplus est automatiquement dirigé vers la sortie "déchets" : cette étape est décorrélée de la circulation du système fluidique. Une seconde position "d'injection" est obtenue par basculement de la vanne : le milieu circulant dans le système, pompé par la pompe péristaltique, rentre alors dans la boucle et pousse l'échantillon pré-chargé vers la cellule fluidique.

Une partie des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été consacrés à l'optimisation de différents éléments intervenant dans cette chaîne de mesure. En particulier, le système de fluidique a fait l'objet d'une nette amélioration, afin d'offrir plus de robustesse et de précision. Le module d'illumination a été revu dans son ensemble, afin de permettre le développement de la méthode d'interrogation multi-spectrale, présentée dans la suite de ce chapitre.

4.1.2 L'interrogation spectrale en temps réel

Le montage initial, présenté dans le paragraphe précédent, avait été initialement développé dans le but de fournir une caractérisation complète des propriétés de résonance d'un échantillon plasmonique. Dans le cadre de ce travail, la séquence d'acquisition développée sous Labview a dû être modifiée pour inclure un nouveau mode de mesure "cinétique", permettant un balayage séquentiel et continu d'un nombre fixé de longueurs d'onde. La Figure 4.4 schématise le principe de fonctionnement de ce nouveau programme, destiné à l'implémentation de l'interrogation spectrale en temps réel.

Une fois les conditions expérimentales (θ_0, λ_i) définies, le système se positionne à l'angle d'incidence (θ_0) choisi. Les longueurs d'ondes (λ_i) sont balayées dans l'ordre croissant, en polarisation TE dans un premier temps. Pour chaque longueur d'onde, la caméra CCD enregistre l'image correspondante, obtenue par réflexion du faisceau incident sur la biopuce : ces images permettront de normaliser les signaux enregistrés par la suite. Cette série d'acquisitions marque la fin des mesures préparatoires.

A l'issue de cette première étape commence le cycle d'interrogation spectrale cinétique. La polarisation TM est sélectionnée par le polariseur, et le système débute un nouveau balayage, dans l'ordre croissant, des longueurs d'onde d'incidence. De la même manière que précédemment,

les images obtenues en réflexion sont enregistrées par la caméra. Cette procédure d'interrogation spectrale est répétée de manière cyclique, jusqu'à l'arrêt complet imposé par l'utilisateur. A titre indicatif, l'acquisition des images en polarisation TE peut également être réalisée pendant toute la durée de l'expérience, afin de compenser la dérive possible de l'intensité incidente sur l'échantillon. Comme cela sera mis en évidence par la suite, cette mesure, relativement coûteuse en temps, n'est pas indispensable : lors des développements présentés par la suite, l'interrogation spectrale en polarisation TE ne sera effectuée qu'une seule fois au début des acquisitions en mode cinétique.

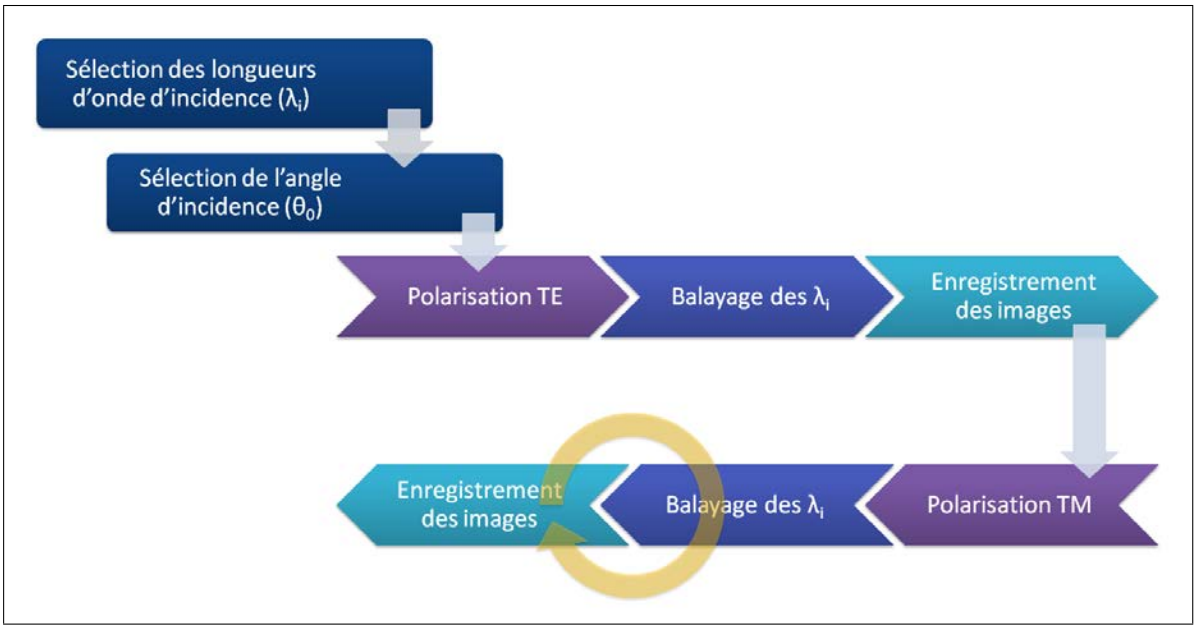


FIGURE 4.4 – **Principe de fonctionnement de l'interrogation spectrale en mode cinétique**. Après sélection des paramètres expérimentaux (angle et longueurs d'onde d'incidence), le système acquiert une première série d'images en polarisation TE. Le polariseur se place alors en polarisation TM et le monochromateur entame un balayage cyclique des longueurs d'onde d'excitation choisies. Pour chaque cycle de mesure et chaque longueur d'onde, l'image en réflexion de la biopuce est enregistrée par la caméra sur le disque dur.

A l'issue de ces mesures, l'utilisateur ne dispose que de valeurs de réflectivité discrètes réparties sur le profil de la résonance plasmon, correspondant aux longueurs d'ondes d'excitation balayées (Figure 4.5).

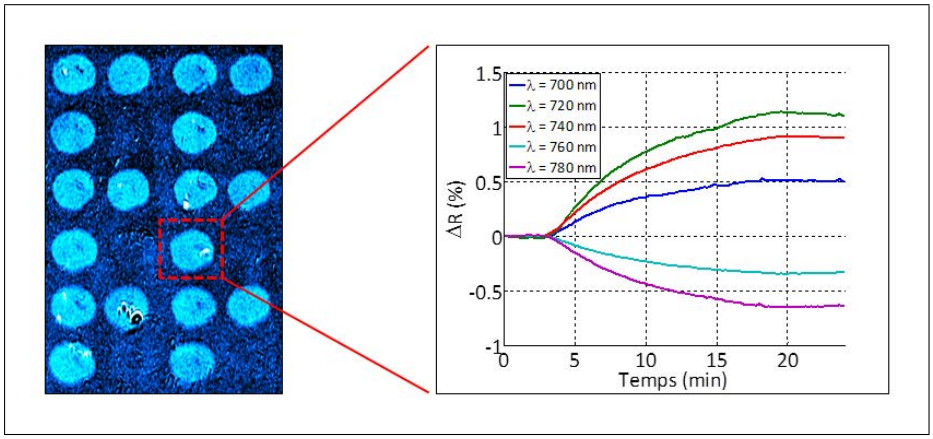


FIGURE 4.5 – **Illustration des données recueillies par la procédure d'interrogation spectrale**. Pour chacune des longueurs d'onde balayées par le monochromateur, une image (à gauche) est enregistrée par la caméra, après réflexion du faisceau incident sur la biopuce. Le signal correspondant aux différents plots-sondes déposés à la surface (apparaissant en bleu clair sur fond bleu foncé sur l'image de gauche de cette figure) peut alors être extrait en termes de réflectivité TM normalisée par la valeur hors résonance obtenue en polarisation TE (notée ΔR), en fonction du temps, pour chaque longueur d'onde d'interrogation. Un exemple de signal extrait pour l'un de ces plots est présenté à droite.

Un traitement de ces données doit donc être effectué afin de reconstruire précisément le profil de la résonance et extraire le signal en termes de décalage spectral du minimum de réflectivité, et ce en fonction du temps et en tout point de la biopuce analysée. En réalité, comme mentionné précédemment, le cycle de balayage nécessite un mouvement mécanique de la part du réseau du monochromateur, qui prend environ une seconde par longueur d'onde. Le suivi du décalage spectral sera donc échantillonné avec une fréquence qui dépend directement de la durée de ce cycle. Néanmoins, la notion de "mesure en temps réel", qui est le principal enjeu des développements présentés dans ce chapitre, est à mettre en perspective avec les vitesses des interactions biomoléculaires visées, de l'ordre de quelques dizaines de secondes pour les plus rapides.

Pour des raisons pratiques, cette procédure de reconstruction a été réalisée en post-traitement : l'interface Labview, bien que très utile pour le pilotage du dispositif expérimental, n'est cependant pas adaptée pour ce type de calcul en "temps réel". Des traitements dédiés, développés en langage C++ permettraient, si besoin, d'effectuer le traitement lié à un cycle de balayage, en temps masqué, durant l'acquisition du spectre suivant. Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, le développement a été principalement concentré sur la caractérisation et l'optimisation de cette technique d'interrogation particulière : l'implémentation d'un traitement dynamique n'a pas été jugé indispensable à cette étude.

En effet, pour être compétitive vis-à-vis de l'interrogation en réflectivité, la méthode développée doit fournir une qualité de mesure supérieure, ce qui implique une optimisation à la fois du choix des longueurs d'onde d'incidence et de l'algorithme de traitement utilisé pour déterminer la position de la résonance au cours du temps. L'étude présentée dans les paragraphes suivants montrent qu'une configuration optimale peut être atteinte, offrant d'une part d'excellentes performances en termes de résolution et de dynamique de mesure, et d'autre part une cadence d'acquisition suffisamment rapide pour extraire des informations sur les cinétiques des interactions biomoléculaires.

4.2 Reconstruction du profil de la résonance plasmon

Les capteurs plasmoniques fonctionnant en interrogation spectrale privilégient généralement l'utilisation d'un spectromètre pour suivre en temps réel le décalage du minimum de réflectivité. Dans ce cas, le profil complet de la résonance est enregistré avec un échantillonnage de l'ordre de 1 nm, ce qui correspond aux performances standard des spectromètres actuels. Il est aisé de remarquer que cette valeur reste nettement supérieure à la résolution revendiquée par ces systèmes sur la position de la résonance elle-même, de l'ordre de 1 pm dans les meilleurs cas [86]. En effet, pour atteindre ces performances, un algorithme de traitement est appliqué pour interpoler le profil de résonance enregistré et déterminer la position du minimum avec une plus grande précision.

Parmi les méthodes couramment employées, la plus simple consiste à appliquer un ajustement polynomial sur les valeurs proches de la résonance pour déterminer la position du minimum de réflectivité. De manière générale, un polynôme de degré faible (2 à 5) est suffisant pour atteindre une résolution de 10^{-7} RIU [62, 71, 72], soit la limite théorique des systèmes actuels [50].

Moins évidentes à mettre en oeuvre, les méthodes de projection linéaire [87] ou de calcul du barycentre de la résonance [88, 89] donnent également de très bons résultats, mais elles sont peu adaptées au système étudié dans cette partie, où le nombre de points de données sur le profil de résonance plasmon est relativement restreint.

D'après ces quelques exemples, une méthode de reconstruction de la résonance par un ajustement mathématique semble être la piste à privilégier dans le cas d'un nombre discret de points de mesure. Les travaux réalisés précédemment par Otsuki et al. [80], similaires à la méthode développée dans ce chapitre, utilisent un ajustement parabolique sur des valeurs de réflectivité obtenues à 5 longueurs d'onde incidentes. Bien que la résolution annoncée soit relativement satisfaisante, les expériences présentées ne permettent pas de conclure quant à la robustesse de l'algorithme choisi, en particulier dans le cas de perturbations induisant un décalage important de la résonance. Une alternative intéressante a été proposée par Kurihara et al. [90], consistant à décrire le profil asymétrique de la résonance plasmon par une fonction pseudo-Lorenztienne.

$$R(\lambda) = R_0 \times \left(1 - D \times \frac{W + A \times (\lambda - \lambda_0)}{W^2 + (\lambda - \lambda_0)^2}\right) \tag{4.1}$$

L'intérêt particulier de cette équation réside dans le fait qu'elle propose une réelle interprétation physique. Ainsi, chacun des cinq paramètres est directement lié aux conditions expérimentales de couplage de l'onde excitatrice aux plasmons de surface :

- R_0 correspond à la valeur de la réflectivité hors résonance.
- A est un paramètre lié à l'asymétrie de la résonance.
- W découle de la partie imaginaire du vecteur d'onde plasmon et détermine la largeur de la résonance.
- D décrit la profondeur de la résonance, liée à la fraction de lumière incidente absorbée par le film métallique.
- λ_0 correspond à une position effective de la résonance, qui diffère de la position réelle du minimum de réflectivité, donnée par l'Équation 4.2 :

$$\lambda_{min} = \lambda_0 - D \cdot W \left(1 - \sqrt{1 + A^2}\right) \tag{4.2}$$

Une procédure d'ajustement, basée sur la fonction décrite par l'Équation 4.1, peut alors être aisément implémentée sous Matlab pour extraire la position λ_{min} de la résonance plasmon en

tout point de la biopuce à partir des images de réflectivité obtenues suivant le protocole présenté dans le paragraphe précédent (Figure 4.4). La Figure 4.6 illustre le principe de la reconstruction du profil spectral présentée dans ce paragraphe.

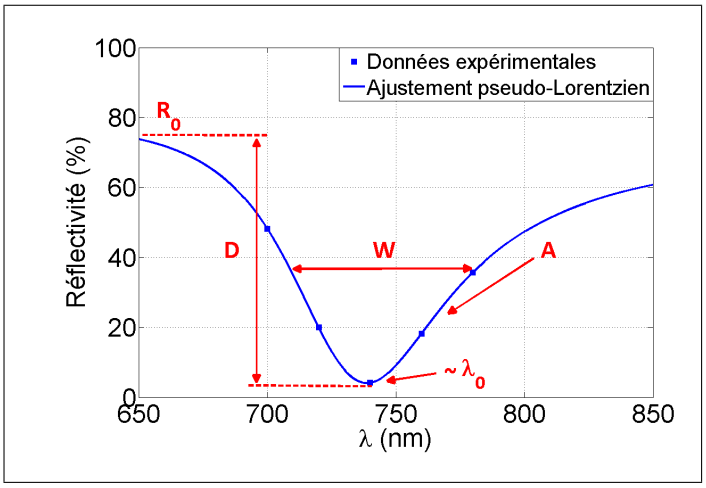


FIGURE 4.6 – **Ajustement des données discrètes issues de l'interrogation multi-spectrale par la fonction pseudo-Lorentzienne.**

Pour une lecture plus fluide de ce manuscrit, le principe de ce traitement de données ne sera pas abordé dans ce chapitre, mais une description détaillée est présentée en annexe A (p.187).

Une comparaison de cette méthode d'ajustement pseudo-Lorentzien, avec celle plus classique d'un ajustement parabolique, a été réalisée. Pour cela, une série de données a été recueillie par la procédure d'interrogation spectrale introduite précédemment. Une séquence d'injections de solutions de sucrose de concentrations différentes a ainsi été enregistrée en temps réel, dans une configuration spectrale basée sur 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm. Le signal a été extrait sur 100 régions de 41×41 pixels (correspondant à 200×200 μm) réparties arbitrairement à la surface de la biopuce (une lame d'or conventionnelle). Les deux traitements de donnés ont alors été appliqués pour reconstruire l'évolution du décalage spectral pour chacune de ces régions d'intérêt, au cours du temps. En particulier, l'amplitude de chaque saut d'indice a été mesurée par les deux méthodes. Ces résultats, présentés sur la Figure 4.7, mettent en évidence une qualité de données supérieure pour l'ajustement pseudo-Lorentzien avec une dispersion des mesures beaucoup plus réduite.

Dans le cas de cet exemple, seule la valeur de la position du minimum de réflectivité λ_{min} est extraite suite à l'ajustement par le profil pseudo-Lorentzien. Des applications plus complexes à l'étude d'échantillons absorbants tels que les chromophores pourraient également tirer avantage de ce traitement de données particulier, permettant d'extraire les paramètres A, W ou D présentant un sens physique réel. A l'inverse, les méthodes plus traditionnelles citées dans ce paragraphe se concentrent sur l'optimisation de la détermination de la position de la résonance seule, et ne permettent pas d'exploiter les informations des autres paramètres physiques liés au couplage plasmon.

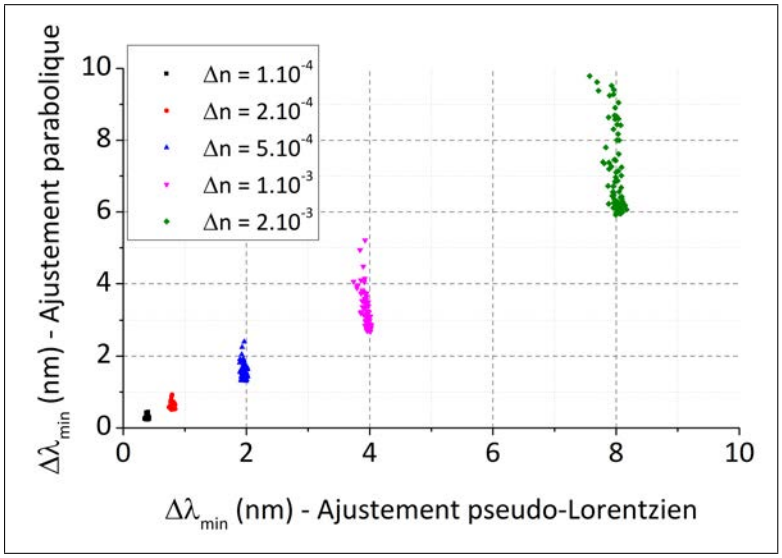


FIGURE 4.7 – **Comparaison de la qualité de l'ajustement parabolique et pseudo-Lorentzien**. Des données expérimentales correspondant à des injections de solutions d'indice croissant à la surface d'une lame d'or nu ont été traitées par les méthodes d'ajustement parabolique (présenté sur l'axe des ordonnées) et pseudo-Lorentzien (correspondant à l'axe des abscisses) pour déterminer le décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$ du minimum de réflectivité. Pour chaque saut d'indice étudié, le signal a été extrait sur 100 zones de 41×41 pixels à la surface de la biopuce. La configuration d'interrogation spectrale adoptée est basée sur 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm.

4.3 Résolution et nombre de longueurs d'onde

La fonction pseudo-Lorentzienne à 5 paramètres introduite dans le paragraphe précédent permet en principe de diminuer jusqu'à 5 le nombre de longueurs d'onde utilisées en interrogation spectrale. Comme mentionné dans le chapitre 3, il n'existe à l'heure actuelle que peu de systèmes basés sur une configuration similaire dans la littérature. En effet, la plupart des mesures en interrogation spectrale font appel à un spectromètre, qui fournit une centaine de points de données sur le profil de la résonance plasmon. Pour cette raison, l'impact du nombre de longueurs d'onde sur la détermination expérimentale de la position du minimum de réflectivité n'a pas été déterminé : l'étude menée dans ce paragraphe vise à apporter quelques éléments de réponse.

4.3.1 Etude expérimentale de la résolution en interrogation multi-spectrale

Une expérience relativement simple a été réalisée pour tenter d'établir un lien entre le nombre de longueurs d'onde balayées par le monochromateur et la résolution obtenue sur la position de la résonance plasmon. Pour cela, une série d'acquisitions a été effectuée en interrogation spectrale cinétique (décrite précédemment dans la section 4.1), avec un nombre variable de longueurs d'onde.

Ces mesures ont été réalisées sur une lame d'or, non fonctionnalisée, avec de l'eau pure comme milieu couvrant. En effet, l'intérêt de ces expériences est d'étudier la résolution du système développé en fonction de la configuration spectrale adoptée : le paramètre à évaluer est donc la précision obtenue sur la position de la résonance plasmon mesurée pour chaque ensemble de longueurs d'onde incidentes. Pour cela, il n'est pas nécessaire de faire varier l'indice du milieu diélectrique ou d'étudier des interactions biomoléculaires à la surface de la lame d'or : la résolution est directement donnée par l'écart-type des fluctuations du signal enregistré, en termes de

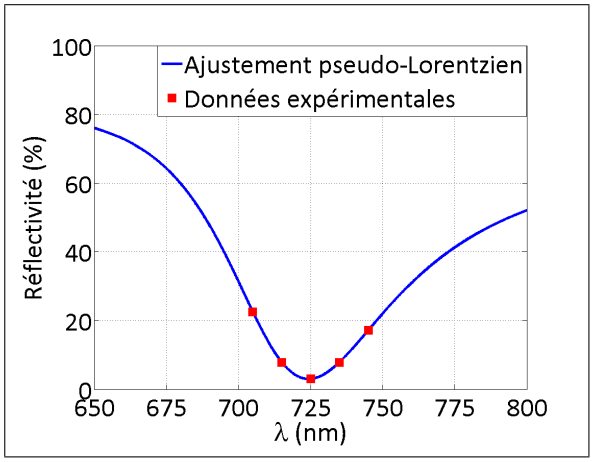
position spectrale du minimum de réflectivité (λ_{min}), au cours du temps, dans un milieu d'indice optique supposé constant.

Grâce à l'interface permettant de piloter la procédure d'interrogation spectrale cinétique, le nombre de longueurs d'onde d'incidence a été progressivement incrémenté à partir de 5 (valeur correspondant au minimum requis par l'ajustement pseudo-Lorentzien), jusqu'à 13 : au-delà, le temps de balayage a été jugé trop long pour les applications d'études de cinétiques biomoléculaires visées. Dans chaque cas, 20 points de mesure (soit 20 ensembles de N images, correspondant aux N longueurs d'ondes balayées) ont été enregistrés, afin de disposer d'une série de données suffisante pour l'extraction de l'écart-type des fluctuations temporelles.

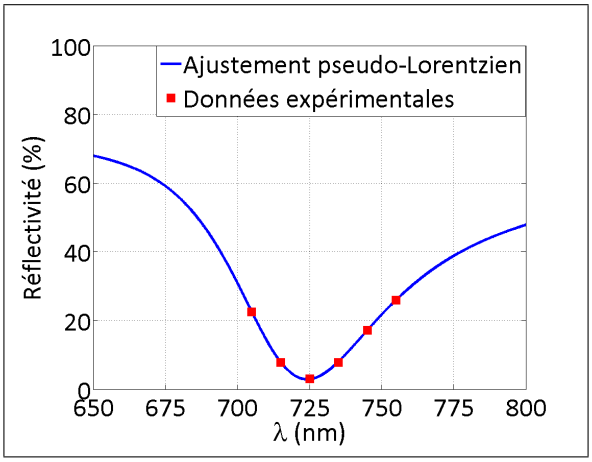
Le "peigne" spectral, soit l'ensemble des N longueurs d'onde d'interrogation, a été choisi de manière quasi-symétrique par rapport à la position de la résonance plasmon : 725 nm, pour un angle d'incidence interne de 67.2° sur un prisme de verre BK7, avec un pas de 10 nm entre chaque longueur d'onde.

- Dans le cas d'un nombre N impair, le centre du peigne spectral a été positionné à la résonance (725 nm), dans une configuration symétrique (Figure 4.8a et Figure 4.8c).
- Dans le cas d'un nombre N pair, une configuration asymétrique a été adoptée, avec $N/2-1$ longueurs d'onde positionnées à gauche de la résonance, et $N/2$ placées à droite, la longueur d'onde de numéro $N/2$ étant confondue avec la position de la résonance (Figure 4.8b et Figure 4.8d).

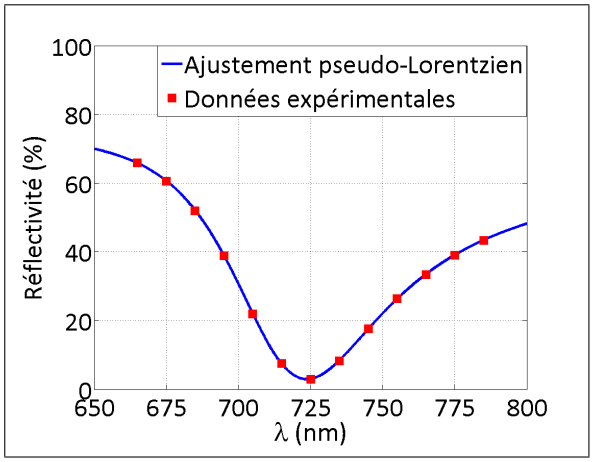
Pour chaque séquence d'acquisition ainsi réalisée, le signal, soit la position λ_{min} du minimum de réflectivité, a été déterminé par reconstruction du profil plasmon suivant les N valeurs de réflectivité réparties sur la résonance. L'amplitude des fluctuations temporelles, soit l'écart-type des valeurs ainsi obtenues pour les 20 points de mesure collectés, a été calculée sur 50 zones de 41×41 pixels (soit 200×200 μm) arbitrairement choisies sur la surface analysée pour des résultats statistiquement significatifs.



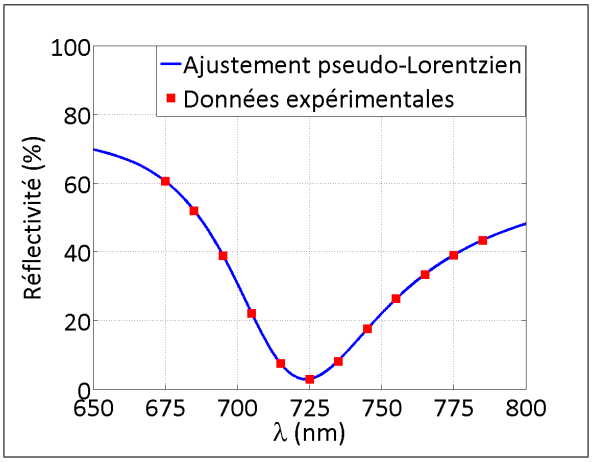
(a) **Position du peigne d'interrogation spectrale pour une configuration à 5 longueurs d'onde espacées de 10 nm.**



(b) **Position du peigne d'interrogation spectrale pour une configuration à 6 longueurs d'onde espacées de 10 nm.**



(c) **Position du peigne d'interrogation spectrale pour une configuration à 13 longueurs d'onde espacées de 10 nm.**



(d) **Position du peigne d'interrogation spectrale pour une configuration à 12 longueurs d'onde espacées de 10 nm.**

FIGURE 4.8 – **Positions choisies pour différentes configurations d'interrogation spectrale, en considérant un écartement de 10nm entre les longueurs d'onde.** Les 4 configurations "extrêmes" pour les nombres de longueurs d'onde impairs (5 et 13) et pairs (6 et 12) sont représentées à titre illustratif.

La Figure 4.9 résume les résultats de cette étude : l'évolution de la résolution expérimentale du système (soit l'écart-type des variations de la position λ_{min} de la résonance mesurée sur 20 points de mesure temporels) en fonction du nombre N de longueurs d'onde balayées en interrogation spectrale. Chaque donnée expérimentale (en bleu), correspond à la moyenne des amplitudes de fluctuations extraites sur les 50 régions d'intérêt. De même, la barre d'erreur représentée est associée à l'écart-type de ces 50 valeurs.

Afin d'évaluer précisément ces performances, des calculs théoriques (en rouge) ont été effectués sous Matlab pour modéliser le comportement du dispositif expérimental. Ces résultats, exposés plus en détail dans le paragraphe 4.3.2, supposent que les performances du système de mesure sont uniquement limitées par le bruit de photon du système de détection et le bruit thermique de la cellule fluidique.

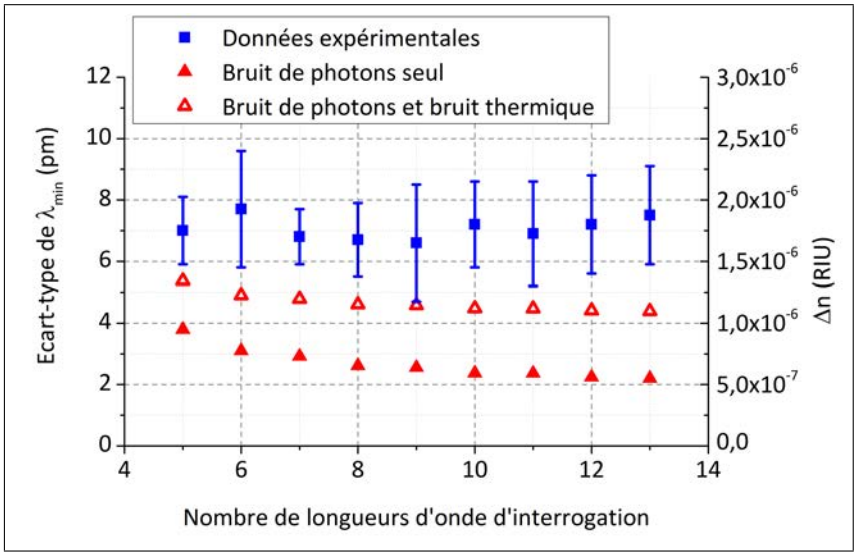


FIGURE 4.9 – **Evolution de l'écart-type du signal mesuré en interrogation spectrale en fonction du nombre de longueurs d'onde incidentes**. L'axe des ordonnées situé à droite indique la résolution équivalente en termes de variation d'indice optique correspondante. Les données expérimentales (représentées par les marqueurs carrés) ont été obtenues à partir de mesures réalisées en interrogation spectrale sur une lame d'or nu, en eau pure, avec un nombre variable de longueurs d'onde d'incidence et un pas spectral fixe de 10 nm. La barre d'erreur représente la dispersion des valeurs obtenues sur différentes zones de la surface analysée. Les simulations représentées ont été générées à partir d'une modèle théorique simple tenant compte du bruit de photon seul (en triangles pleins) ou combiné à un bruit thermique de 0.01 °C au niveau de la biopuce (triangles creux).

Ces résultats prometteurs montrent en premier lieu qu'une méthode d'interrogation multispectrale, basée sur un nombre discret de longueurs d'onde, permet d'atteindre une résolution de l'ordre de 7 pm, soit 2.10^{-6} RIU en termes de variation d'indice optique : cette valeur correspond à la limite des systèmes actuels fonctionnant en interrogation en réflectivité. La théorie permet certes d'envisager un gain en termes de résolution en augmentant le nombre de longueurs d'ondes incidentes, mais cette amélioration reste relativement faible, en particulier si la contribution du bruit thermique (correspondant aux fluctuations de température au niveau de la biopuce) est prise en compte. En effet, d'après les données présentées sur la Figure 4.9, l'écart-type du bruit de mesure sur λ_{min} obtenu avec 5 longueurs d'onde, de l'ordre de 5.4 pm, peut seulement être réduit à 4.4 pm en adoptant une configuration basée sur 13 longueurs d'onde incidentes.

De plus, la résolution déterminée expérimentalement semble totalement indépendante du nombre de points de mesure utilisés pour reconstruire le profil de la résonance plasmon, ce qui permettrait de réduire à 5 longueurs d'onde d'incidence et atteindre ainsi la cadence d'acquisition maximale du système.

Cependant, avant d'envisager des applications de biodétection en temps réel, une caractérisation complète des performances est nécessaire pour comprendre la différence des comportements observés de manière théorique et expérimentale, et déterminer la source de bruit limitante du système développé.

4.3.2 Détermination des limitations du système

Un code relativement simple, basé sur la méthode de Rouard [21] a été implémenté pour calculer la réflectivité d'un empilement de multicouches, correspondant à la structure de la biopuce étudiée. Cette procédure permet de générer un profil spectral théorique de la résonance plasmon

correspondant à l'angle d'incidence expérimental choisi. La modélisation des limites du système de mesure consiste alors à inclure à ce calcul les sources de bruit : dans le cas le plus simple, les contributions du bruit de photons de la caméra CCD et du bruit thermique de la cellule.

Le bruit de photons

Dans un système de détection idéal (et pour un flux lumineux suffisamment important), le bruit de photons représente le bruit minimum atteignable. Dans un tel cas, pour un flux de photons $\Phi_{Photons}$ émis, le nombre de photons $N_{Photons}$ arrivant sur un pixel du détecteur durant un temps d'intégration t_{int} suit une statistique de Poisson. Le bruit de photons $B_{Photons}$, correspondant à l'écart-type associé à ces fluctuations, est alors égal à la racine carrée du signal reçu (Équation 4.3) :

$$B_{Photons} = \sqrt{N_{Photons}} = \sqrt{\Phi_{Photons} \cdot t_{int}} \tag{4.3}$$

Chaque photon incident étant converti en électrons suivant le rendement quantique η du système de détection (Équation 4.4), le nombre $N_{e^-/pixel}$ de photo-électrons ainsi générés, par pixel et par image accumulée durant le temps t_{int}, suit par conséquent la même loi statistique (Équation 4.5).

$$N_{e^-/pixel} = N_{Photons} \cdot \eta = \Phi_{Photons} \cdot t_{int} \cdot \eta \tag{4.4}$$

$$B^{e^-}_{Photons} = \sqrt{N_{e^-/pixel}} = \sqrt{\eta} \cdot B_{Photons} \tag{4.5}$$

Dans le cas d'une détection par SPR, la grandeur d'intérêt est le rapport signal à bruit des valeurs de réflectivité extraites sur le profil de la résonance. Ce rapport est donné par l'Équation 4.6 ci-dessous :

$$SNR_{Photons} = \frac{N_{e^-/pixel}}{\sqrt{N_{e^-/pixel}}} = \sqrt{N_{e^-/pixel}} \tag{4.6}$$

En pratique, les signaux $S^{gris}_{/pixel}$ mesurés par la caméra CCD sont exprimés en $2^{N_{bits}}$ niveaux de gris (Équation 4.7), pour une dynamique de $N_{e^-/puits}$ électrons par puits.

$$S^{gris}_{/pixel} = \frac{N_{e^-/pixel} \cdot 2^{N_{bits}}}{N_{e^-/puits}} \tag{4.7}$$

Le rapport signal à bruit $SNR_{Photons}$, relatif au signal $S^{gris}_{/pixel}$ exprimé en niveaux de gris, par pixel et par image moyennée, prend alors la forme de l'Équation 4.8.

$$SNR_{Photons} = \sqrt{\frac{S^{gris}_{/pixel} \cdot N_{e^-/puits}}{2^{N_{bits}}}} \tag{4.8}$$

Ce rapport peut être optimisé expérimentalement, par une intégration spatiale, sur une zone de N_{pixels} de l'image, et une moyenne temporelle, par l'accumulation de N_{images}. Ces deux procédures contribuent de manière quadratique aux performances obtenues (Équation 4.9).

$$SNR_{Photons} = \sqrt{\frac{S^{gris}_{/pixel} \cdot N_{images} \cdot N_{pixels} \cdot N_{e^-/puits}}{2^{N_{bits}}}} \tag{4.9}$$

Dans les conditions expérimentales usuelles, les différents paramètres d'acquisition prennent les valeurs données dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1 – **Paramètres utilisés lors de l'acquisition.**

Paramètre	Abbréviation	Valeur
Nombre d'images moyennées	N_{images}	4
Nombre de pixels intégrés	N_{pixels}	1681 (zone carrée de 41×41 pixels)
Nombre d'électrons par puit	$N_{e^-/puits}$	18000
Nombre de bits utilisé pour le codage des images	N_{bits}	16

L'équation précédente peut également être réécrite en séparant les paramètres spécifiques à l'acquisition (Équation 4.10).

$$SNR_{Photons} \propto \sqrt{R} \cdot P_{acquisition} \tag{4.10}$$

La réflectivité R correspond dans le cas présent au signal $S^{gris}_{/pixel}$ enregistré par le détecteur, divisé par le niveau de gris maximal ($R = \frac{S^{gris}_{/pixel}}{2^{N_{bits}}}$). Cette notation est justifiée par la normalisation des images en polarisation TM par celles TE, dont le niveau de gris est choisi proche de la saturation par le réglage du temps d'intégration t_{int} de la caméra. Le paramètre $P_{acquisition}$ est, quant à lui, un facteur dépendant des paramètres utilisés lors de l'acquisition des données ($P_{acquisition} = \sqrt{N_{images} \times N_{pixels} \times N_{e^-/puit}}$), valant 11000 dans le cas présent.

Cette expression revient à considérer une contribution $B_{Photons}$ du bruit de photons aux images de réflectivités suivant l'Équation 4.11.

$$B_{Photons} \propto \frac{R}{SNR_{Photons}} \propto \frac{\sqrt{R}}{P_{acquisition}} \tag{4.11}$$

Pour modéliser ce comportement, et calculer l'impact de ce bruit sur la précision de la position de la résonance mesurée, un tirage est généré sous Matlab de la manière suivante (Figure 4.10) :

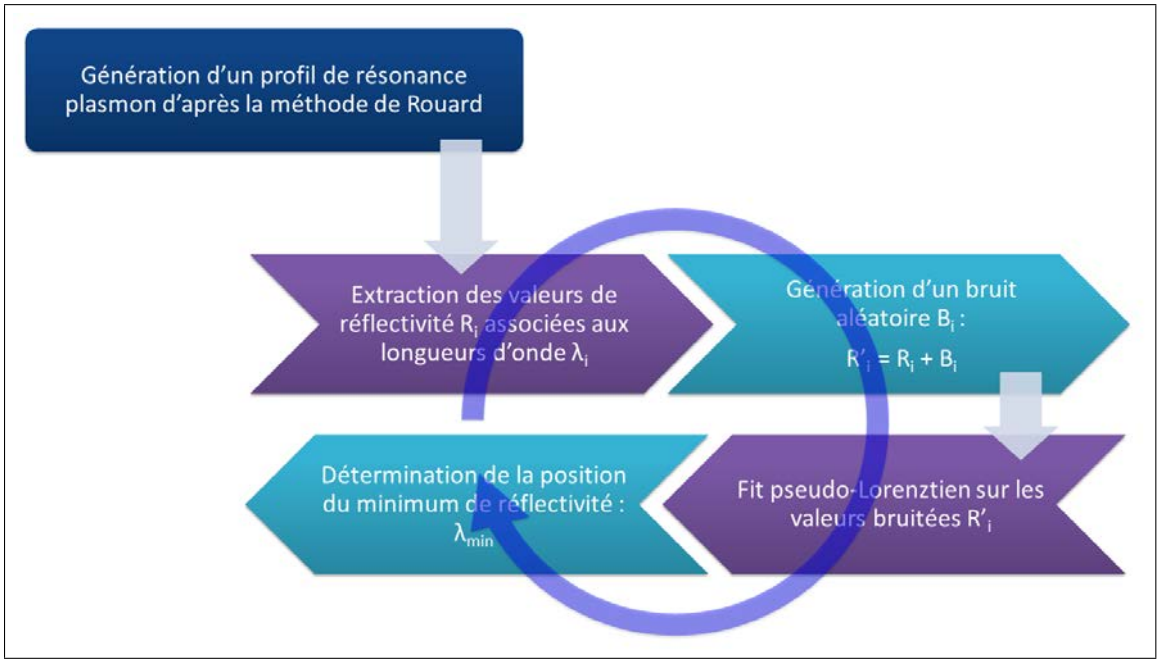


FIGURE 4.10 – **Principe du tirage aléatoire utilisé pour modéliser la contribution du bruit de photons**. Un profil spectral de la résonance plasmon est généré à partir de la méthode de Rouard. Pour chaque configuration spectrale, un ensemble de valeurs de réflectivité R_i est extrait, correspondant à l'ensemble des longueurs d'onde incidentes λ_i. Un bruit aléatoire est généré sur ces valeurs, avec une distribution statistique correspondant au bruit de photon évalué théoriquement. La reconstruction du profil de la résonance est alors effectuée en appliquant la fonction de fit pseudo-Lorentzienne sur les valeurs R'_i bruitées, afin de déterminer la position de la résonance λ_{min}. Pour chaque configuration spectrale étudiée, 10000 tirages aléatoires sont effectués afin d'atteindre une bonne précision sur l'écart-type de λ_{min}.

- Le profil théorique de la résonance plasmon est calculé par la méthode de Rouard.
- Pour chaque configuration spectrale étudiée précédemment (paragraphe 4.3.1), les valeurs de réflectivité R_i correspondant aux longueurs d'onde incidentes λ_i sont extraites.
- Une fonction de Matlab permet de générer un bruit aléatoire B_i avec une distribution gaussienne de moyenne nulle et d'écart-type égal à 1 (pour un nombre de photons incidents élevé, comme dans le présent, la statistique Poissonienne du bruit de photon peut être approximée par une loi gaussienne).
- Le bruit aléatoire est combiné à l'Équation 4.10 pour intégrer le bruit de photons aux valeurs de réflectivité R_i ($0 < R_i < 1$) théoriques :

$$R'_i = R_i + B_i \times B_{Photons} \tag{4.12}$$

$$R'_i = R_i + B_i \times \frac{\sqrt{R_i}}{P_{acquisition}} \tag{4.13}$$

Cette procédure permet ainsi de générer un ensemble de valeurs bruitées R'_i de moyennes respectives R_i et d'écarts-types $\frac{\sqrt{R_i}}{P_{acquisition}}$ correspondant au bruit de photons introduit précédemment.

- La procédure de reconstruction du profil de la résonance par la fonction pseudo-Lorentzienne (Équation 4.1) est réalisée sur les valeurs bruitées R'_i, et fournit une position λ_{min} de la résonance plasmon (Figure 4.11).

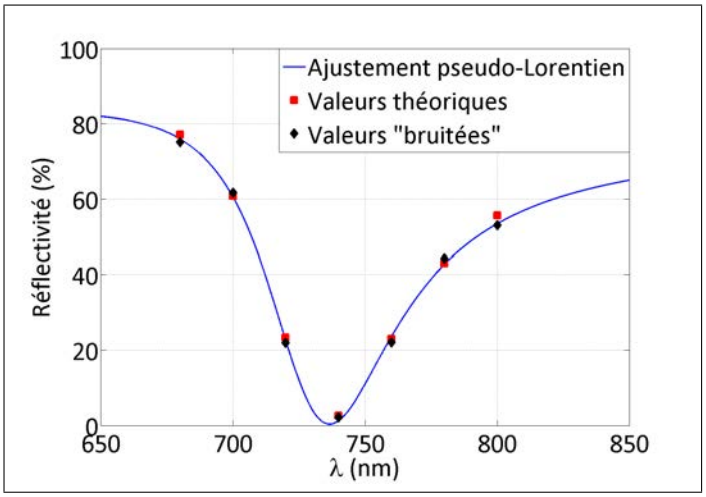


FIGURE 4.11 – **Illustration de la modélisation du bruit de photons**. Le bruit aléatoire généré sous Matlab est ajouté aux valeurs de réflectivité théoriques extraites du modèle de Rouard. La fonction de fit pseudo-Lorentzienne est alors appliquée sur les valeurs "bruitées" ainsi obtenues pour déterminer la position spectrale du minimum de réflectivité.

- Pour chaque configuration spectrale, 10000 tirages de bruit aléatoire sont effectués, afin d'obtenir une statistique suffisante pour simuler les fluctuations du signal dans des conditions expérimentales où le bruit de mesure n'est affecté que par le bruit de photons.
- La résolution sur la position de la résonance plasmon est alors donnée par l'écart-type des valeurs λ_{min} générées par les 10000 tirages.

Le résultat de ces simulations théoriques est représenté sur la Figure 4.9 étudiée précédemment (p.67). La résolution prévue dans le cas d'une limitation par le bruit de photons seul est de l'ordre de 4 pm pour une configuration spectrale à 5 longueurs d'onde ($\approx 10^{-6}$ RIU), soit une valeur deux fois plus faible que celle obtenue expérimentalement. En réalité, cette contribution n'est pas la seule à entrer en compte dans les mesures expérimentales : les variations d'indice du milieu diélectrique à la surface de la biopuce, induites par la régulation thermique de la cellule fluidique, influent également sur la résolution des mesures en interrogation multi-spectrale.

Le bruit thermique

La contribution du bruit thermique n'est pas à proprement parler un défaut du système de mesure. En effet, la régulation de la température de la cellule fluidique impose une variation limitée, mais présente, de l'indice optique de la solution en contact avec la biopuce. En ce sens, les variations du signal mesuré sont bien réelles, et affectent par conséquent la résolution obtenue en interrogation spectrale.

L'amplitude du bruit thermique se calcule aisément de manière théorique. Le programme de simulation basé sur la méthode de Rouard prend en effet en compte l'indice de l'eau (considéré comme étant le milieu diélectrique à la surface de la biopuce), dont dépend directement la position λ_{min} de la résonance plasmon. Cet indice optique est lui-même déterminé par la formule

empirique de Schiebener et al. [91], pour une température donnée. Dans le cas présent, celle-ci est régulée avec une précision de 0.01 °C (en raison de la résolution fournie par le système PID), ce qui induit une variation d'environ 4 pm ($\approx 10^{-6}$ RIU) sur la position spectrale de la résonance mesurée : une vérification expérimentale conduit à une valeur sensiblement proche, de 3.8 pm (annexe B).

Cette contribution, indépendante du bruit de photon, s'ajoute alors de manière quadratique aux résultats obtenus lors des modélisations précédentes :

$$\sigma(\lambda_{min}) = \sqrt{\sigma^2_{Photons}(\lambda_{min}) + \sigma^2_{Thermique}(\lambda_{min})} \tag{4.14}$$

La nouvelle estimation théorique de la résolution ainsi calculée est présentée sur la Figure 4.9. Ces résultats semblent plus représentatifs de la réalité mais l'écart avec les valeurs expérimentales reste néanmoins supérieur à la marge d'erreur mesurée.

Une autre source de bruit influence donc de manière non négligeable la qualité de l'interrogation multi-spectrale. Les études présentées dans le paragraphe suivant mettent en évidence la contribution du bruit de speckle, responsable de la limitation de la résolution observée expérimentalement.

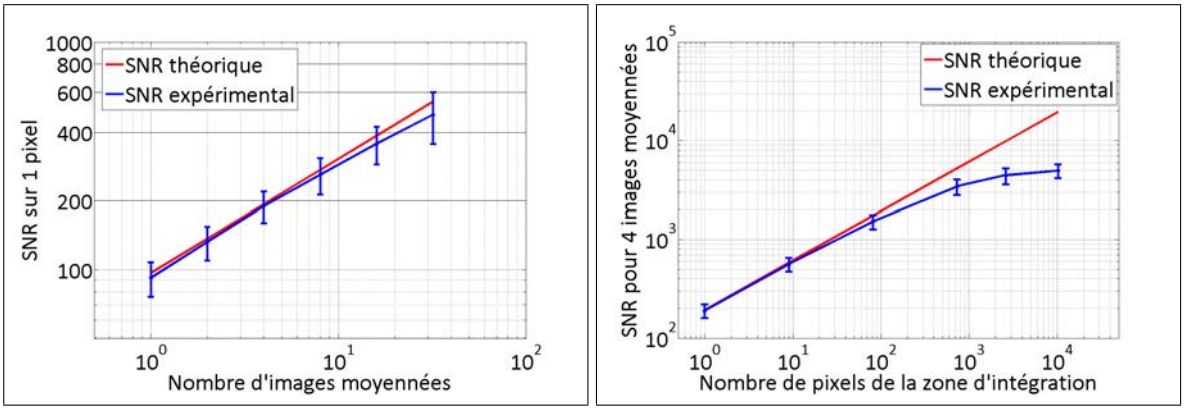
Le bruit de speckle

Les résultats exposés dans les paragraphes précédents mettent en évidence une excellente résolution de mesure en interrogation multi-spectrale. Cependant, celle-ci ne semble pas optimale dans la mesure où les performances obtenues sont inférieures à celles prédites par une estimation théorique, basée sur les contributions seules du bruit de photons sur la caméra CCD et du bruit thermique de la cellule fluidique.

Afin de caractériser plus précisément les performances du système développé, une étude a été réalisée pour déterminer son origine temporelle ou spatiale. Pour cela, une acquisition cinétique a été effectuée sur une lame d'or, en eau, dans la configuration la plus simple, à angle d'incidence et longueur d'onde fixe, choisis de manière à atteindre un signal proche de la saturation sur la caméra CCD. Le nombre d'images moyennées a été progressivement incrémenté, par intervalles de 20 points de mesure. Dans chaque cas, le rapport signal à bruit SNR a été calculé comme la moyenne du signal enregistré pour la série de 20 images, divisée par l'écart-type de ces 20 fluctuations. Pour des résultats statistiquement significatifs, le rapport SNR a été extrait sur 100 zones de N pixels réparties arbitrairement sur la surface analysée. Ce traitement a été répété en faisant varier le nombre N de pixels des 100 régions d'intérêt.

La Figure 4.12 présente les résultats ainsi obtenus : chaque point de donnée expérimentale (en bleu) résulte de la moyenne du rapport SNR calculé pour les 100 zones sélectionnées. L'écart-type est décrit par la barre d'erreur associée. La valeur théorique tracée en référence (en rouge) a été évaluée d'après l'Équation 4.10 en considérant l'intensité moyenne des régions analysées ainsi que les paramètres d'acquisition (nombre d'images moyennées et taille de chaque zone d'intégration) considérés.

Dans le cas d'une moyenne temporelle (Figure 4.12a), le rapport signal à bruit extrait sur un pixel de la caméra suit quasi-parfaitement les prédictions théoriques basées sur l'Équation 4.10. En revanche, l'étude de l'influence d'une moyenne spatiale (Figure 4.12b) met en évidence un décrochement de la courbe expérimentale lorsque la zone d'intégration augmente. Cette observation a conduit à penser qu'un phénomène de speckle pouvait être à l'origine de la limitation des performances du système.



(a) **Evolution du rapport signal à bruit sur 1 pixel, en fonction du nombre d'images moyennées par la caméra.**

(b) **Evolution du rapport signal à bruit en fonction du nombre de pixels de la zone d'intégration, pour 4 images moyennées.**

FIGURE 4.12 – **Evolution du rapport signal à bruit en fonction des moyennes spatiale et temporelle.** Ces mesures expérimentales ont été obtenues pour une fibre de 365 μm de coeur longue de 20 m.

Le speckle peut être observé de manière générale en éclairant un milieu désordonné figé par un faisceau de lumière cohérente : une figure d'intensité particulière apparaît alors sur un écran placé en champ lointain. La Figure 4.13 illustre la répartition "granuleuse" de l'intensité, caractéristique de ce phénomène d'interférence. Il est évident qu'une telle répartition inhomogène va nécessairement limiter le gain en termes de rapport signal à bruit pour une zone spatiale moyennée importante.

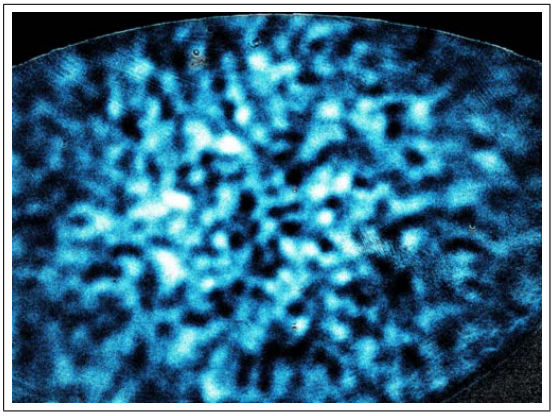


FIGURE 4.13 – **Figure de speckle observée expérimentalement sur le banc de SPRI multi-spectral.** Une fibre de 200 μm de diamètre a été utilisée en sortie du monochromateur lors de l'acquisition de cette image.

La cohérence temporelle est la première condition qui vient à l'esprit lorsque le phénomène de speckle est évoqué : en effet, il est courant d'observer des images semblables à la Figure 4.13 avec des sources laser. En réalité, seule la condition de cohérence spatiale est nécessaire : ainsi, il est possible d'obtenir une figure de speckle même en lumière blanche [92].

Dans le cas présent, la cohérence spatiale de la source est en grande partie responsable de l'apparition de la figure de speckle observée sur les images de réflectivité. En effet, cette influence a été mise en évidence en changeant la longueur et le diamètre du coeur de la fibre connectée en sortie du monochromateur : l'étude menée précédemment sur l'évolution du rapport signal

à bruit expérimental (Figure 4.12) a été répétée pour deux fibres présentant des diamètres de coeur de 200 μm et 365 μm, respectivement. Les résultats obtenus, présentés sur la Figure 4.14, mettent en évidence une limitation plus importante du rapport signal à bruit dans le cas du plus petit diamètre de coeur. L'écart entre les deux tendances théoriques (en rouge) est quant à lui simplement dû à des niveaux d'intensité moyenne légèrement différents lors de ces deux expériences. Ces observations ont ainsi conduit à l'utilisation de la fibre de 365 μm de coeur pour limiter ce phénomène d'interférence. Ce choix particulier résulte d'un compromis entre le bruit de speckle et la divergence angulaire du faisceau à la sortie du collimateur, qui peut affecter la qualité du couplage aux plasmons de surface. Différents essais ont également montré qu'il était préférable d'utiliser une fibre de grande longueur ($>$ 10 m) afin de "mélanger" les modes dans le coeur de la fibre et obtenir un éclairage plus homogène.

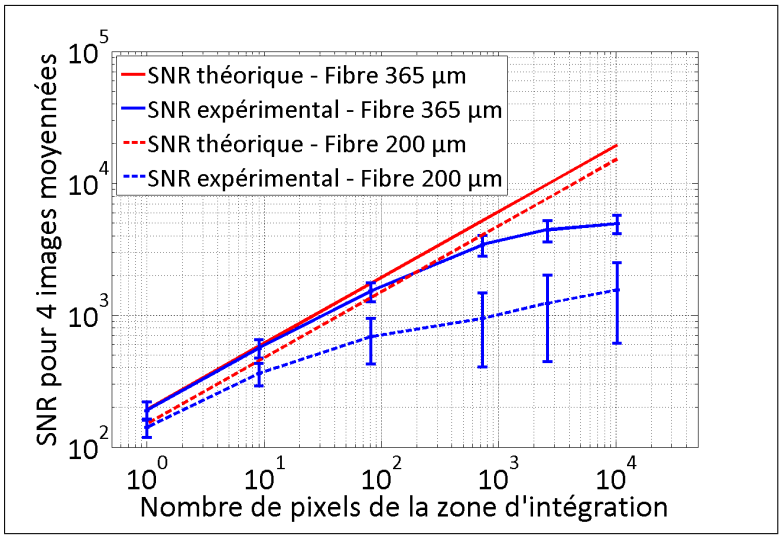


FIGURE 4.14 – **Evolution du rapport signal à bruit en fonction de la moyennes spatiale pour deux fibres optiques de 365 μm et 200 μm de coeur.** Ces données ont été obtenues pour une moyenne temporelle de 4 images.

Les expériences présentées dans le paragraphe 4.3.1 ont été réalisées dans cette configuration optimale utilisant une fibre de 365 μm de coeur. La résolution de mesure en interrogation mutli-spectrale (Figure 4.9) est, du fait du bruit de speckle, légèrement différente de celle attendue théoriquement, mais elle reste néanmoins très satisfaisante : en effet, les systèmes de SPRI basés sur l'interrogation en réflectivité vantent généralement des performances équivalentes [93], [94].

De plus, la correction de ce bruit limitant conduirait à un gain d'un facteur 2 tout au plus, ce qui ne permettrait pas d'égaler la résolution de l'ordre du picomètre annoncée par les configurations basées sur l'utilisation d'un spectromètre. De tels systèmes exploitent en effet une centaine de points de mesure sur le profil de la résonance plasmon, gagnant ainsi un ordre de grandeur en termes de résolution, ce qui est conforme aux prédictions théoriques basées sur le bruit de photons.

4.4 Dynamique de mesure

Le principal avantage de l'interrogation spectrale réside dans le fait que la sensibilité de la mesure est totalement décorrélée de l'indice du milieu couvrant, dans le cadre des applications envisagées. Ainsi, dans un système de mesure idéal, le signal délivré en réponse à l'adsorption

d'une biomolécule donnée reste identique quelles que soient les perturbations induites par l'indice de la solution injectée. Comme cela sera montré par la suite, cette propriété est particulièrement intéressante pour des conditions de détection non idéales, dans lesquelles les molécules cibles sont contenues dans un milieu complexe tel que du sérum, dont l'indice optique n'est pas connu avec précision au début de l'expérience.

En revanche, l'interrogation en réflectivité présente une dynamique de mesure restreinte, imputable au choix d'un point de fonctionnement unique qui est déterminé généralement par le tampon de course utilisé au début des expériences, bien avant l'injection des échantillons à analyser. En comparaison, le cas de l'interrogation multi-spectrale n'est pas totalement différent de ce point de vue : la gamme spectrale couverte par les 5 longueurs d'onde d'incidence choisies reste limitée, il donc est naturel d'envisager un impact sur la dynamique de mesure.

Cette propriété intrinsèque à la méthode d'interrogation choisie peut être définie comme l'intervalle des variations d'indice dans lequel toute perturbation est mesurée avec la même précision optimale (Figure 4.15). Cette notion relativement importante peut être définie comme la différence entre le décalage spectral induit par une perturbation donnée du milieu diélectrique, déterminé expérimentalement, et celui théorique. De manière implicite, cette définition suppose une sensibilité de l'onde plasmon constante, ce qui reste valable dans le cadre des perturbations envisagées. Pour cette raison, l'influence de la sensibilité (correspondant au décalage spectral mesuré pour une variation d'indice donnée, $d\lambda/dn$) ne sera pas considérée dans la suite de ce paragraphe, et l'évolution de la précision sera attribuée uniquement à la méthode d'interrogation elle-même.

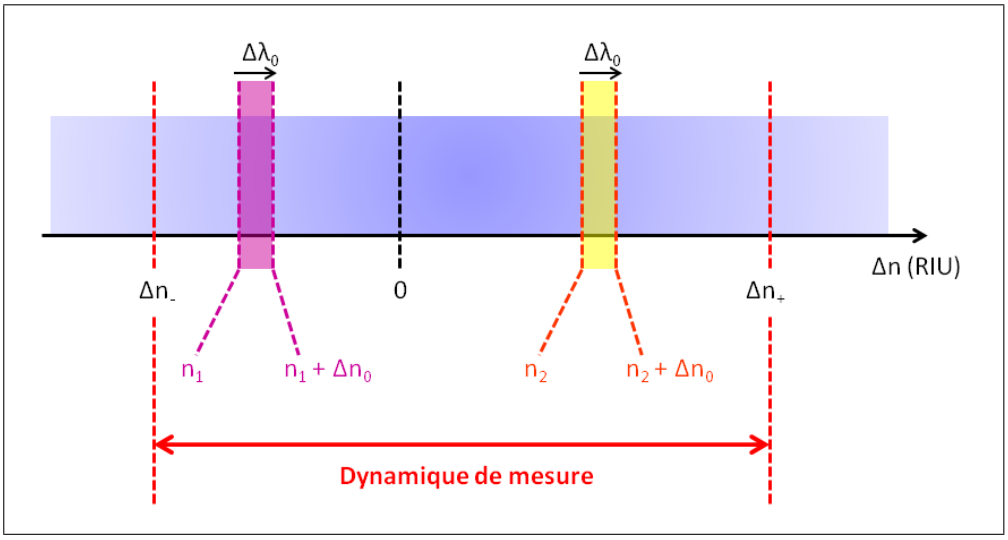


FIGURE 4.15 – **Définition de la dynamique de mesure**. Pour une méthode d'interrogation donnée, la dynamique de mesure correspond à l'intervalle des variations d'indice $[\Delta n_-; \Delta n_+]$ dans lequel toute perturbation Δn_0 est mesurée avec la même précision. Dans le cas de l'interrogation spectrale, cette variation doit se traduire par un signal mesuré $\Delta\lambda_0$ constant dans l'intervalle autorisé par la dynamique de mesure de la méthode.

Par exemple, dans le cas présent où l'interrogation multi-spectrale est la méthode d'intérêt, le décalage spectral $\Delta\lambda_0$ mesuré pour un saut d'indice Δn_0 donné doit être indépendant de l'indice n_i ($i = 1, 2$, Figure 4.15) du milieu avant la perturbation, à condition d'être dans la gamme autorisée par la dynamique de mesure. La caractérisation de cette propriété nécessite donc de considérer l'influence du décalage de la résonance plasmon, par rapport à la position fixe

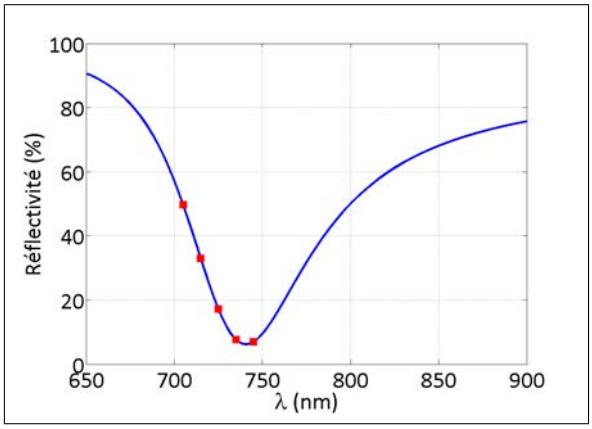
du peigne de longueurs d'onde incidentes, sur la précision des mesures réalisées dans une telle configuration. Ce décalage étant induit par une variation d'indice n_i, cette procédure renseigne alors directement sur les conditions de détection $[\Delta n_-; \Delta n_+]$ limites définissant la dynamique de mesure.

Pour des raisons pratiques, cette étude a été effectuée en considérant, à l'inverse, le décalage de la position du peigne de longueurs d'onde d'interrogation par rapport à une résonance plasmon fixe (les deux rôles étant bien entendu interchangeables dans le cadre des applications visées, pour lesquelles la sensibilité de l'onde plasmon reste constante). De manière plus concrète, le décalage spectral en réponse à une perturbation constante (notée Δn_0 sur la Figure 4.15) a été extrait pour différentes positions relatives du peigne de longueurs d'onde incidentes (représentées par les positions n_1 et n_2 sur la Figure 4.15), par rapport à une position de référence "0". Pour une première approche de la problématique, 4 configurations spectrales ont été considérées : 5 et 7 longueurs d'onde d'interrogations, et des espacements de 10 nm et 20 nm. Une nouvelle fois, le code basé sur la méthode de Rouard [21] a été mis à profit dans le cadre de cette étude.

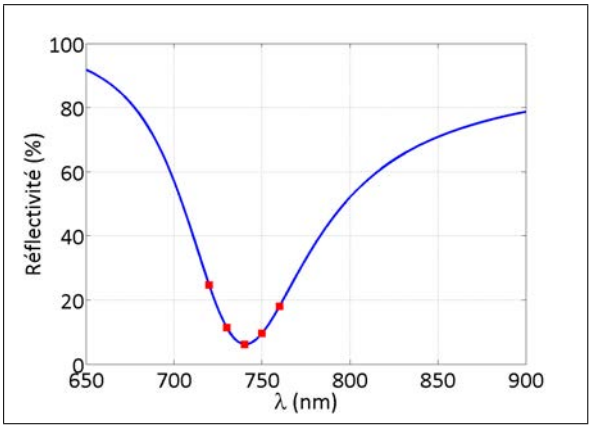
La procédure présentée ci-dessous résume les étapes principales des modélisations effectuées :

- Deux profils de résonance sont générés, correspondant respectivement à des milieux diélectriques d'indice n_{H_2O} et $n_{H_2O} + \Delta n_0$ à la surface de la biopuce. Lors de cette étude, la perturbation Δn_0 a été fixée à 2×10^{-4} RIU : cette variation d'indice permet de modéliser la perturbation induite par une interaction ADN-ADN, qui est l'une des applications visées par ces travaux.
- La position de référence "0" des deux peignes (5 et 7 longueurs d'onde) a été fixée de manière à obtenir une disposition symétrique des longueurs d'onde d'interrogation vis-à-vis du profil plasmonique correspondant au milieu d'indice n_{H_2O}. Dans cette configuration, la longueur d'onde centrale de chaque peigne spectral considéré a donc été superposée avec la résonance, les autres longueurs d'onde étant réparties par espacements réguliers de 10 nm ou 20 nm de chaque côté de cette position centrale.
- La position du peigne de longueurs d'onde incidentes est décalée progressivement de part et d'autre de la position de référence initiale, modélisant ainsi un milieu initial d'indice n différent de celui n_{H_2O} (les cas n_1 et n_2 de la Figure 4.15 permettent de se représenter le principe de ce décalage).
- De la même manière que précédemment, les valeurs de réflectivité R_i^n et $R_i^{n+\Delta n_0}$ correspondant aux longueurs d'onde λ_i incidentes choisies sont extraites sur les deux profils théoriques, et le décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$ entre les deux résonances est calculé après ajustement par la fonction pseudo-Lorentzienne (Équation 4.1).
- La précision de la mesure ainsi effectuée est évaluée par l'erreur sur le décalage déterminé par rapport à la valeur théorique, soit la différence $\Delta\lambda_{min} - \Delta\lambda_0$.
- Cette procédure est répétée en variant la position relative du peigne de longueurs d'onde λ_i vis-à-vis de la résonance du plasmon correspondant au milieu diélectrique d'indice n_{H_2O}.

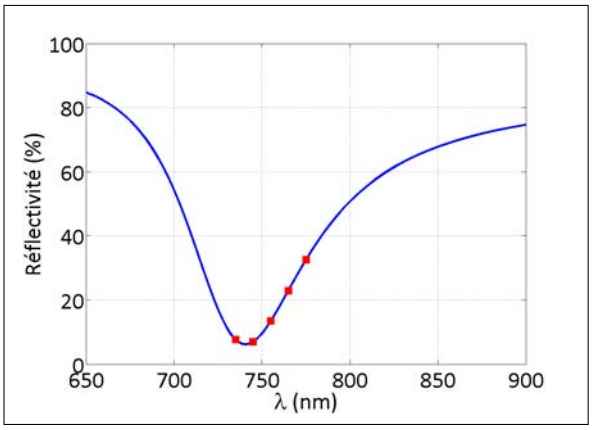
Le principe de cette étude théorique est résumé sur la Figure 4.16.



(a) **Position relative du peigne spectral décalée de 15 nm avant la résonance plasmon.**



(b) **Position relative du peigne spectral centrée sur la résonance plasmon.**



(c) **Position relative du peigne spectral décalée de 15 nm après la résonance plasmon.**

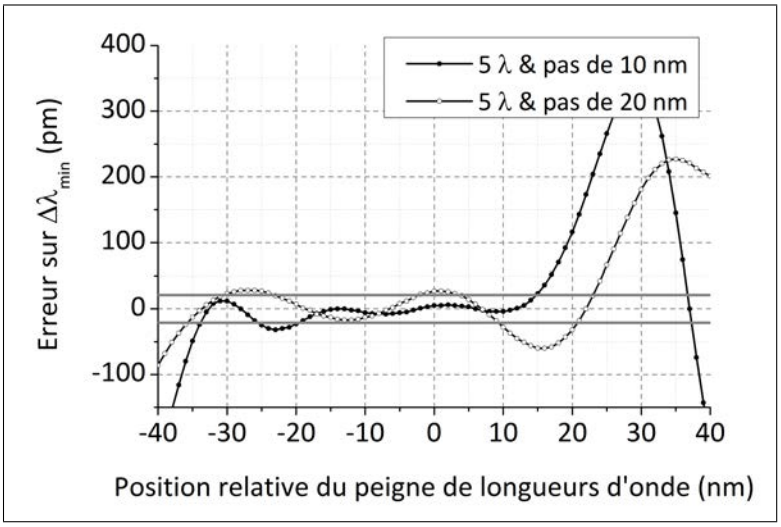
FIGURE 4.16 – **Illustration du principe de l'étude théorique de la dynamique de mesure.** Une configuration spectrale à 5 longueurs d'onde espacées de 10 nm est présentée dans cet exemple.

Ainsi, cette procédure permet de modéliser le comportement de la méthode d'interrogation multi-spectrale vis-à-vis des variations d'indice de la solution contenant les molécules cibles à détecter. En effet, chaque position relative du peigne spectral correspond à une variation d'indice du milieu diélectrique, alors que le décalage fixe entre les deux résonances n_{H_2O} et $n_{H_2O} + \Delta n_0$ représente une interaction biomoléculaire constante. Le décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$ renseigne alors directement sur la robustesse de la méthode implémentée, car dans le cas idéal il ne devrait pas dépendre des perturbations induites par le milieu n_{H_2O} contenant les biomolécules à détecter.

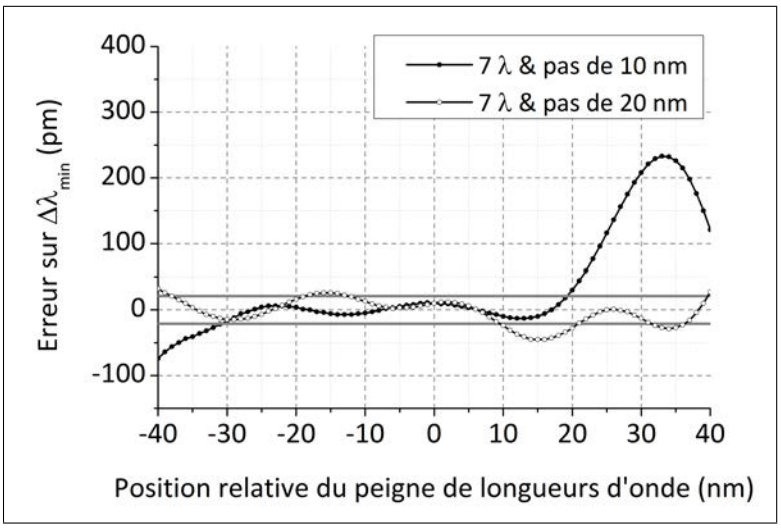
D'après les résultats obtenus dans les paragraphes précédents, cette étude a été limitée à 5 et 7 longueurs d'onde d'incidence, dans l'optique des mesures en temps réel envisagées pour le système développé. Pour chacune de ces deux configurations, l'influence du pas du peigne spectral sur la dynamique de mesure a également été évaluée, en considérant des valeurs de 10 nm et 20 nm.

La Figure 4.17 présente l'influence de la configuration spectrale (nombre de longueurs d'onde incidentes, pas spectral et position du peigne) sur la précision de la mesure. Comme évoqué précédemment, cette notion est définie comme étant la différence entre le décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$

déterminé pour une position particulière du peigne de longueurs d'onde par rapport à la résonance, et sa valeur théorique. Pour une interprétation claire de ces résultats, cette position relative, représentée en abscisse, est définie comme étant positive lorsque la résonance théorique fixe est située à une longueur d'onde plus élevée que celle correspondant au centre du peigne d'interrogation multi-spectrale. Aucun bruit n'ayant été ajouté à ces simulations, l'erreur représentée ici est exacte et due uniquement à ce décalage de la résonance par rapport au peigne de longueurs d'onde.



(a) **Dynamique de mesure avec 5 λ.**



(b) **Dynamique de mesure avec 7 λ.**

FIGURE 4.17 – **Dynamique de mesure atteinte en interrogation multi-spectrale en fonction du nombre et de l'espacement des longueurs d'onde incidentes.** En raison de la capacité de mesure en temps réel visée par les développement expérimentaux, seules les configurations spectrales à 5 et 7 longueurs d'onde incidentes ont été étudiées.

Les données présentées sur la Figure 4.17 renseignent directement sur la dynamique de mesure du système d'interrogation multi-spectrale. Celle-ci a été définie précédemment comme étant l'intervalle des variations d'indice dans lequel la précision de la mesure resterait acceptable.

Cette notion de précision est bien entendu relative et doit tenir compte du bruit de mesure du système : dans le cas présent, une tolérance de $\pm 3 \times \sigma(\lambda_{min})$, soit ± 21 pm a été définie, pour une résolution de l'ordre de 7 pm, ou 5×10^{-6} RIU (Figure 4.9 du paragraphe 4.3.1). Sur la Figure 4.17, cet intervalle de confiance est compris entre les lignes horizontales d'ordonnées ± 21 pm.

Représenté sur l'axe des abscisse, le décalage du peigne spectral par rapport à la résonance modélise quant à lui une variation d'indice (les deux grandeurs étant proportionnelles pour les amplitudes de variation considérées). Ainsi, la dynamique de mesure correspond aux valeurs de ce décalage pour lesquelles la précision (soit l'erreur sur $\Delta\lambda_{min}$) reste comprise dans l'intervalle de confiance précédemment défini. Sachant qu'une variation de 1×10^{-3} RIU induit un décalage d'environ 4 nm, la dynamique peut aisément être convertie en unités d'indice réfractif (ou RIU) par une règle de trois.

Il est important de noter que le fait de choisir un pas spectral important (par exemple, 20 nm au lieu de 10 nm), et ainsi couvrir en théorie une gamme spectrale plus large, ne permet d'augmenter que faiblement la dynamique de mesure : dans les deux cas présentés sur la Figure 4.17a par exemple, les performances obtenues sont relativement équivalentes. En revanche, le nombre de longueurs d'onde incidentes a un impact direct sur la dynamique de la mesure en interrogation multi-spectrale. Ainsi, une dynamique de 35 nm (8×10^{-3} RIU) peut être relevée pour un peigne spectral de 5 longueurs d'onde (Figure 4.17a). Comme attendu, 7 longueurs d'onde offrent une gamme de mesure plus importante : environ 50 nm d'après la Figure 4.17b, soit 1.2×10^{-2} RIU, ce qui est nettement supérieur aux performances de l'interrogation en réflectivité citées dans la littérature [95, 58], qui semblent converger vers une dynamique de l'ordre de quelques 10^{-3} RIU.

4.5 Résolution temporelle

L'étude expérimentale et théorique présentée dans le paragraphe 4.3.1 a révélé une limitation des performances par un bruit de speckle, rendant la résolution quasi-indépendante du nombre de longueurs d'onde incidentes. Le choix de la configuration à adopter en interrogation multi-spectrale repose donc principalement sur un compromis entre la dynamique de mesure et la cadence d'acquisition, qui sont deux paramètres critiques pour les applications de biodétection visées par ces développements.

Dans le cadre des expériences menées jusqu'à présent, les acquisitions ont été réalisées avec un nombre de 4 images moyennées, et un temps d'intégration de 150 ms par la caméra CCD, afin d'augmenter le rapport signal à bruit et atteindre une résolution satisfaisante (≈ 10 pm) en interrogation multi-spectrale. De ce fait, la durée correspondant à l'enregistrement d'une image moyennée peut être estimée à 600 ms. A ce résultat s'ajoute 1 s de balayage mécanique par le monochromateur : une valeur moyenne de 1.6 s définit donc la cadence maximale du système pour une longueur d'onde incidente sélectionnée. En réalité, en raison d'une compatibilité imparfaite entre les logiciels de pilotage de la caméra CCD d'une part et le programme Labview contrôlant la séquence d'acquisition complète d'autre part, cette durée est plus élevée et atteint en pratique 2 s. La durée moyenne d'un cycle d'acquisition basé sur 5 longueurs d'onde d'interrogation atteint dans ces conditions une dizaine de secondes : cette cadence reste donc compatible avec les applications de mesure en temps réel visées par ces développements.

Cette valeur reste bien entendu acceptable si le nombre de longueurs d'onde d'incidence reste faible (inférieur à 10, par exemple, afin de limiter à 20 s la durée d'un cycle d'interrogation spectrale). Cependant, il s'agit là uniquement du temps d'acquisition des images en polarisation

TM, les images en TE n'étant prises qu'un seule fois en début des expériences. Cela suppose par conséquent une bonne stabilité de la source au cours du temps. Or, les études cinétiques font généralement appel à des mesures de "self-referencing" pour limiter l'influence des fluctuations de l'intensité incidente sur la biopuce [80, 52] : dans le cas présent, cela nécessiterait un balayage continu supplémentaire en polarisation TE, et réduirait d'un facteur 2 la cadence d'acquisition. Heureusement, l'excellente stabilité de la lampe halogène, vérifiée expérimentalement, permet d'éviter cette procédure. La figure Figure 4.18 décrit la corrélation des mesures d'interrogation multi-spectrale dans le cas d'un balayage uniquememnt en polarisation TE et dans celui moins favorable d'un double balayage en TM et TE.

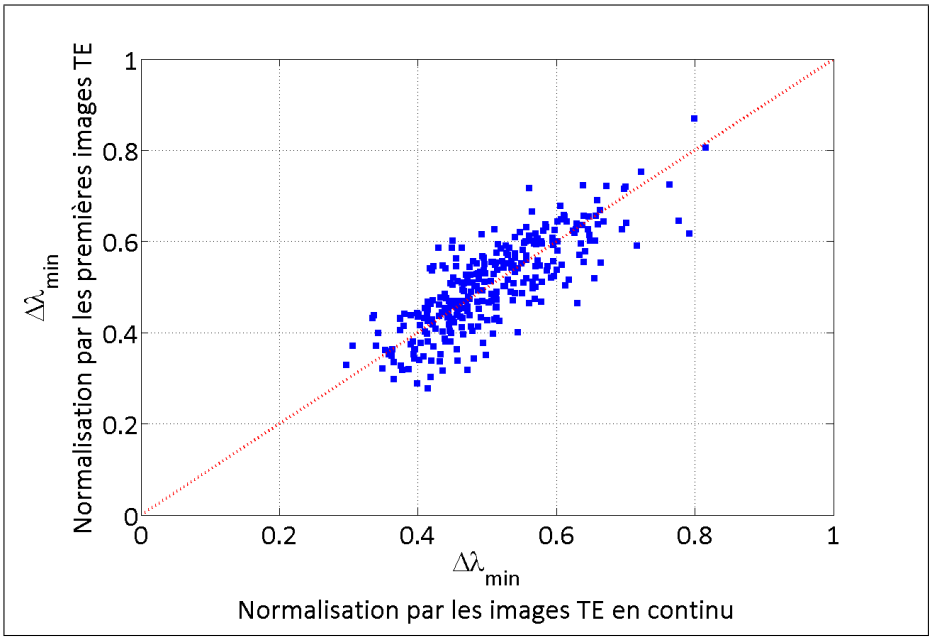


FIGURE 4.18 – **Corrélation des signaux enregistrés en interrogation multi-spectrale avec un balayage unique ou continu en polarisation TE**. Les mesures présentées ont été réalisées dans une configuration spectrale à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm, dans le cadre d'une étude d'interaction ADN-ADN. Le décalage spectral du minimum de réflectivité $\Delta\lambda_{min}$ présenté en abscisse a été extrait d'après les images en polarisation TM, normalisées par celles en polarisation TE résultant d'un balayage cyclique continu. Les données présentées en ordonnée résultent de la normalisation par un ensemble de 5 images TE unique (correspondant aux 5 longueurs d'onde incidentes choisies), enregistré au début de l'expérience.

La bonne corrélation des deux méthodes de normalisation présentées sur la Figure 4.18, évaluée par le coefficient de corrélation linéaire de Pearson, égal à 0.81, justifie le fait de ne faire qu'une seule acquisition des images en polarisation TE au début de chaque série d'expériences. Grâce à cette procédure, la durée des acquisitions reste compatible avec les applications d'analyses en temps réel envisagées, à condition bien entendu de limiter le nombre de longueurs d'onde d'incidence.

En conclusion, des peignes de 5 ou 7 longueurs d'ondes, espacées de 10 nm ou 20 nm, semblent être les configurations optimales offrant à la fois une excellente résolution, une dynamique de mesure étendue et une durée de balayage spectral compatible avec les cinétiques d'interactions biomoléculaires. L'utilisation d'un ajustement pseudo-Lorentzien pour suivre l'évolution du minimum de la résonance plasmon au cours du temps apparaît également comme étant la meilleure solution dans le cadre du traitement des données issues des acquisitions multi-spectrales.

Pour ces configurations, les performances obtenues sont proches des limites théoriques dues au bruit de photons et au bruit thermique, en dépit d'une contribution non négligeable du bruit de speckle. Cependant, un choix judicieux des conditions d'illumination (notamment celui du diamètre de coeur de la fibre) permet d'en limiter l'impact. Afin de confirmer ces hypothèses, une mise en application réelle, et en particulier une comparaison directe avec les performances de l'interrogation en réflectivité, doit être réalisée afin de valider le potentiel de cette nouvelle méthode de SPRI multi-spectrale dans le domaine de la biodétection : cette étude fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 5

Validation de l'interrogation multi-spectrale

Sommaire

5.1 Evaluation du gain en dynamique de mesure 84

5.2 Evaluation du gain en dispersion des données 85

5.3 Application à la biodétection 87

5.3.1 Quelques détails sur les aspects "chimie" et "biologie" des expériences... 87

5.3.2 Résultats des mesures de cinétiques ADN-ADN 90

5.4 Transposition à l'interrogation multi-angulaire 93

5.4.1 Evaluation de la résolution en interrogation multi-angulaire 94

5.4.2 Evaluation de la dynamique de mesure en interrogation multi-angulaire 95

Les développements expérimentaux présentés dans le chapitre précédent se sont concentrés sur l'optimisation de trois paramètres essentiels : la résolution, critère de performance souvent mis en avant dans la littérature, la cadence d'acquisition et la dynamique de mesure. La méthode d'interrogation multi-spectrale ainsi implémentée présente un potentiel relativement intéressant face aux configurations existantes de biocapteurs plasmoniques. En effet, à l'heure actuelle, les performances de systèmes alliant imagerie, interrogation spectrale et mesure en temps réel n'ont pas été réellement démontrées.

Les premières caractérisations effectuées ont mis en évidence une résolution comparable à celle des systèmes basés sur l'interrogation en réflectivité. De plus, l'avantage de l'interrogation multi-spectrale en termes de dynamique de mesure a été évalué de manière théorique, et a laissé entrevoir une certaine robustesse face aux conditions de détection envisagées.

Cependant, ces résultats prometteurs ne suffisent pas à justifier l'utilisation de cette nouvelle méthode pour des analyses réelles. Pour cela, une mise en application directe, face à l'interrogation en réflectivité, doit être effectuée. En particulier, une grande importance doit être attachée à la capacité de mesure en temps réel lors de l'optimisation du système, qui n'a, jusqu'ici, pas été démontrée.

Ce chapitre vise à approfondir la caractérisation des performances de la méthode proposée : le gain en termes de dynamique et de qualité de mesure, de même que la compatibilité du système avec les mesures de cinétiques biomoléculaires, sont soigneusement étudiés dans le but de valider expérimentalement les performances de la SPRI mutli-spectrale développée dans cette partie.

5.1 Evaluation du gain en dynamique de mesure

La dynamique de mesure de l'interrogation multi-spectrale a été estimée précédemment de manière théorique dans la section 4.4, en décalant le peigne de longueurs d'onde incidentes par rapport à un profil de résonance fixe. Expérimentalement, l'évaluation de cette propriété peut être réalisée simplement en étudiant le domaine de linéarité des signaux en réponse à l'injection de solutions d'indice optique croissant, sur un substrat. Naturellement, le même protocole doit être appliqué à l'interrogation en réflectivité pour permettre une comparaison directe de ces deux techniques.

Pour limiter tout biais, et permettre une interprétation objective, ces mesures ont été effectuées en parallèle avec les deux méthodes d'interrogation étudiées, sur un seul et même échantillon. En effet, le chapitre précédent a démontré qu'une certaine souplesse était possible dans le choix du peigne de longueurs d'onde en interrogation multi-spectrale : la configuration spectrale a donc été choisie de manière à inclure la longueur d'onde de travail optimale pour l'interrogation en réflectivité.

De manière concrète, des solutions de sucrose, de concentration croissante, ont été injectées à la suite sur une biopuce non fonctionnalisée, soit un film d'or nu. Les variations d'indice ainsi induites ($\Delta n = 1 \times 10^{-5}$ RIU à $\Delta n = 1 \times 10^{-2}$ RIU) ont été mesurées à la fois en interrogation multi-spectrale, dans une configuration à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm, et en interrogation en réflectivité. La Figure 5.1 présente les résultats de cette étude comparative extraits sur 96 zones réparties sur la surface analysée :

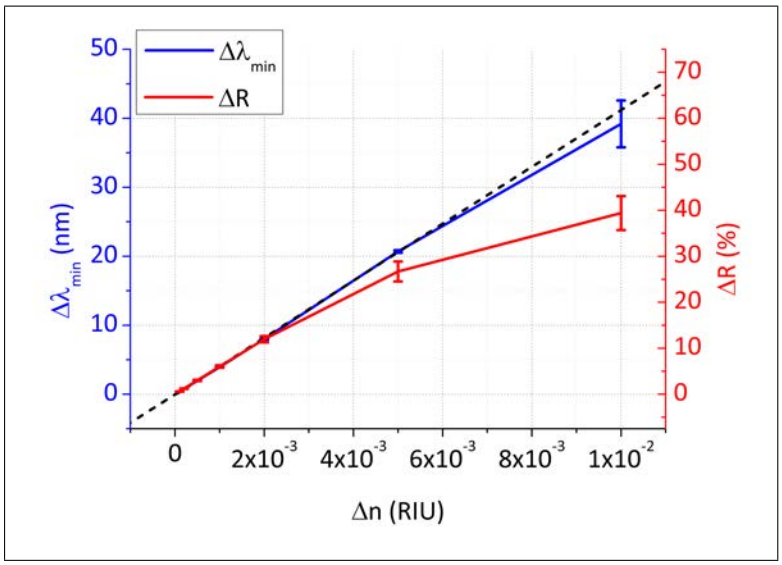


FIGURE 5.1 – **Comparaison de la dynamique de mesure en interrogation multi-spectrale et en variation de réflectivité.** Une configuration basée sur 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm a été retenue pour cette expérience.

Dans le cas de l'interrogation en réflectivité, la limitation due à un point de fonctionnement unique intervient dès une variation d'indice de 2×10^{-3} RIU. En effet, un écart supérieur à 5% par rapport à l'évolution linéaire souhaitée (représentée par la droite en traits pointillés) peut être observé à partir d'une valeur de 2.5×10^{-3} RIU, accompagné d'une dispersion des données de plus en plus élevée. En revanche, la dynamique de mesure est nettement plus étendue en interrogation multi-spectrale, jusqu'à atteindre 10^{-2} RIU. Pour cette variation limite, le décalage de la résonance plasmon devient trop important pour fournir une précision de mesure satisfaisante :

un décrochement de 5% peut alors être relevé par rapport à une réponse parfaitement linéaire. L'interpolation du profil de la résonance plasmon n'est alors plus robuste, ce qui augmente l'erreur sur la détermination de la position du minimum de réflectivité : ces résultats concordent parfaitement avec les prévisions théoriques énoncées dans la section 4.4) du chapitre précédent.

5.2 Evaluation du gain en dispersion des données

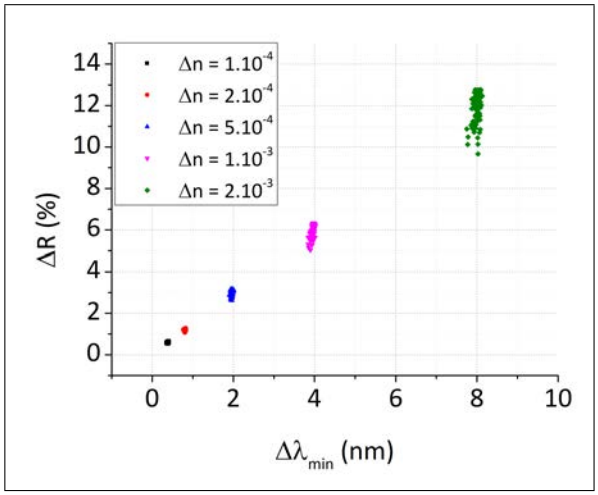
Comme évoqué dans le chapitre 2 de la partie I, l'interrogation en réflectivité offre une capacité de multiplexage qui peut être difficilement atteinte par les autres configurations de capteurs plasmoniques. Grâce à cela, une multitude d'interactions cibles-sondes peuvent être étudiées en parallèle, ce qui augmente considérablement le débit de données des analyses par SPR. Ces performances sont cependant obtenues à travers un compromis vis-à-vis de la sensibilité : en effet, le choix d'un point de fonctionnement (λ_0, θ_0) unique ne favorise pas nécessairement tous les plots sondes à la surface de la biopuce analysée, et induit une dispersion des signaux mesurés.

L'interrogation multi-spectrale permet de s'affranchir des limitations liées au choix d'un point de fonctionnement unique tout en gardant la capacité d'imagerie en deux dimensions qui rend l'interrogation en réflectivité si attractive : les expériences présentées dans ce paragraphe permettent une comparaison directe des performances de ces deux méthodes en termes de qualité de données.

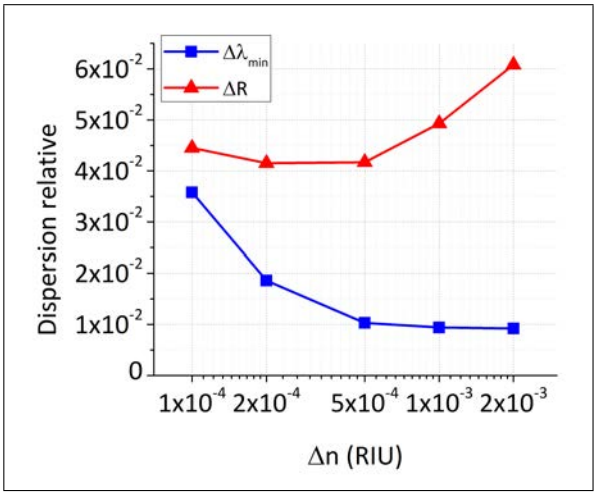
De la même manière que précédemment, les deux techniques ont été évaluées en parallèle sur un même substrat, une lame d'or non fonctionnalisée : une configuration basée sur 7 longueurs d'onde espacées de 20 nm, comprenant le point de fonctionnement optimal pour l'interrogation en réflectivité, a été adoptée lors de ces expériences. La dispersion des signaux, paramètre déterminant dans cette étude, a été calculée sur 96 zones (de 41×41 pixels) réparties sur la surface analysée. Afin de s'affranchir d'un biais possible dû à la différence de dynamique de mesure entre les deux méthodes, seules de faibles variations d'indice du milieu tampon ($\Delta n = 1 \times 10^{-4}$ RIU à $\Delta n = 2 \times 10^{-3}$ RIU) ont été considérées.

La Figure 5.2a donne un aperçu visuel de la dispersion des données enregistrées par les deux méthodes. Pour chacune des deux méthodes d'interrogation, et chaque variation d'indice considérée, l'écart-type a été extrait sur les 96 signaux enregistrés, puis normalisé par la valeur moyenne de manière à obtenir une dispersion relative permettant de comparer les deux méthodes. Le résultat de ce traitement est présenté sur la Figure 5.2b.

Les deux techniques comparées dans ce paragraphe offrent une qualité de mesure similaire dans le cas de petits signaux ($\Delta n = 1 \times 10^{-4}$ RIU) : la dispersion des données semble équivalente dans les deux cas. En revanche, une nette différence apparaît lors de l'augmentation des variations d'indice : le suivi du décalage $\Delta\lambda_{min}$ de la résonance reste indépendant de l'inhomogénéité de la surface de la biopuce et de l'indice de la solution tampon, et offre une dispersion constante, contrairement l'interrogation en réflectivité, dont la dispersion des données est considérablement amplifiée dans la gamme 1×10^{-4} - 2×10^{-3} RIU étudiée.



(a) **Dispersion expérimentale des signaux enregistrés en interrogation spectrale et en interrogation en réflectivité.**



(b) **Evolution de la dispersion relative des données en interrogation multi-spectrale et en interrogation en réflectivité, en fonction de la variation d'indice du milieu diélectrique en contact avec la biopuce.**

FIGURE 5.2 – **Comparaison expérimentale de la dispersion des données mesurées en interrogation multi-spectrale et en interrogation en réflectivité**. Une configuration basée sur 7 longueurs d'onde espacées de 20 nm a été retenue pour cette expérience.

Cette tendance peut être expliquée par les simulations présentées sur la Figure 5.3, qui retracent les réponses, en termes de variations de réflectivité, d'une biopuce plasmonique supposément homogène, aux différents sauts d'indice réalisés expérimentalement.

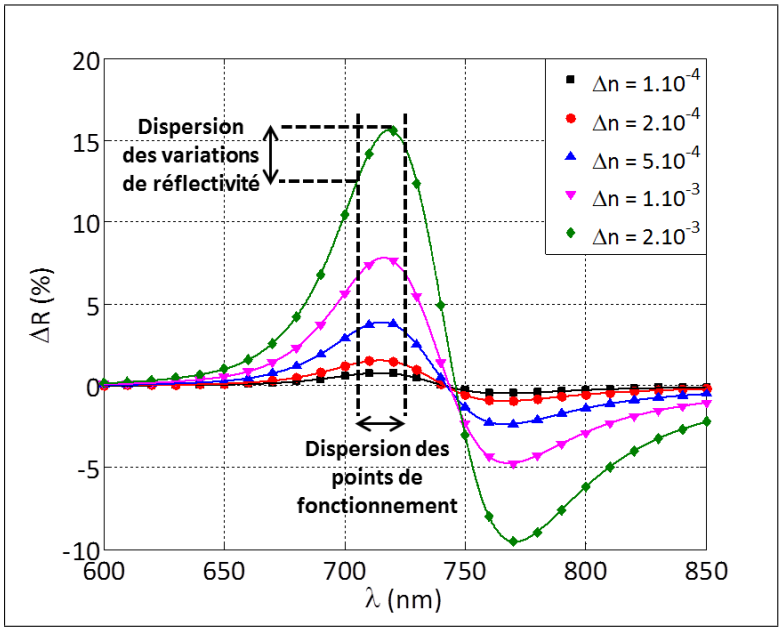


FIGURE 5.3 – **Simulation des variations de réflectivité en réponses aux sauts d'indice réalisés expérimentalement.**

En réalité, de telles conditions idéales ne peuvent être atteintes expérimentalement : l'inhomogénéité de la biopuce se traduit alors par une dispersion des variations de réflectivités, reflétant la dispersion des conditions de résonance sur la surface analysée. Celle-ci se trouve ainsi révélée par le choix d'un point de fonctionnement unique en interrogation en réflectivité. Une approche équivalente revient à considérer, à l'inverse, une biopuce parfaitement homogène, mais dont la réponse aux variations d'indice est mesurée suivant un ensemble dispersé de points de fonctionnement. La Figure 5.3 illustre cette analogie avec le comportement observé expérimentalement : pour une dispersion des points de fonctionnement constante, plus le saut d'indice est élevé, plus la dispersion des valeurs de réflectivité associées devient importante.

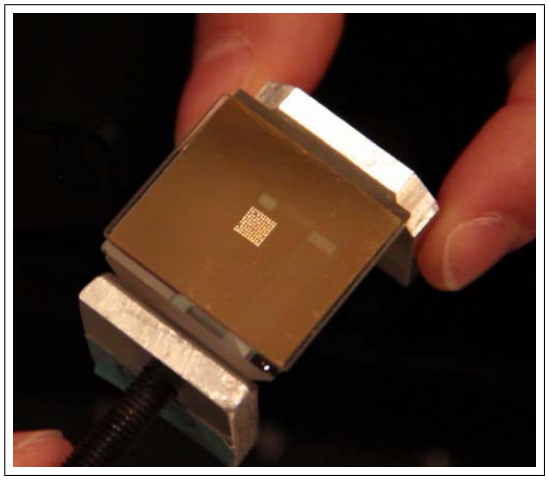
5.3 Application à la biodétection

Les caractérisations effectuées jusqu'à présent ont permis d'évaluer les performances du système d'interrogation multi-spectrale développé face aux exigences énoncées dans la partie I. Afin de confirmer le potentiel de ce nouveau dispositif en termes de biodétection et de multiplexage, une dernière étape de validation a été réalisée, consistant en une mesure en temps réel d'interactions ADN-ADN.

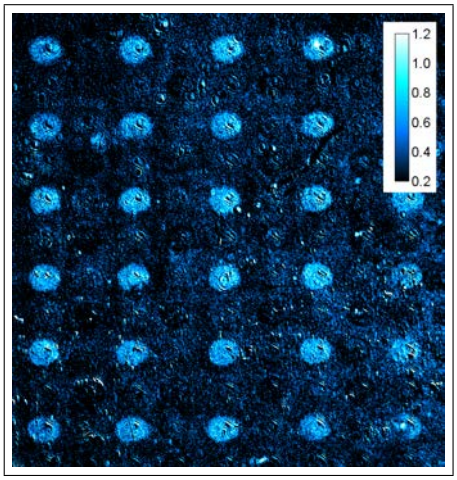
5.3.1 Quelques détails sur les aspects "chimie" et "biologie" des expériences...

La biodétection par SPR exploite la sensibilité de l'onde évanescente générée par le couplage plasmon à toute adsorption de matière à la surface d'une biopuce. Pour cette raison, la détection d'espèces biomoléculaires fait intervenir un greffage préalable de ligands récepteurs sur le film d'or : la spécificité du signal SPR est alors directement assurée par la spécificité du couple cibles-sondes, de même que par la passivation de la surface de la biopuce pour empêcher toute adsorption en-dehors des plots récepteurs.

Un protocole relativement rapide et robuste, basé sur une chimie cystéamine, a été développé précédemment au sein de l'équipe de plasmonique du Laboratoire Charles Fabry [96] : à titre indicatif, le détail de cette fonctionnalisation chimique est donné en annexe C. Cette procédure permet le dépôt de molécules sondes biotinylées : dans le cas présent, cette étape est réalisée par un spotteur commercial, muni d'une pointe creuse de 200 μm de diamètre, programmé pour réaliser une matrice de 30 plots (Figure 5.4). Dans ces conditions, deux familles de plots sont déposées sur la même biopuce : les biomolécules sondes, à une concentration optimale 5 μM, ainsi que des références, formées à partir d'une solution ne contenant pas d'ADN sonde.



(a) **Photographie d'une biopuce plasmonique fonctionnalisée, présentant une matrice de plots sondes à la surface.**



(b) **Image codée en variation de réflectivité de la matrice de plots sondes analysée pour une longueur d'onde incidente de 720 nm.**

FIGURE 5.4 – **Illustration de la fonctionnalisation d'une biopuce plasmonique.**

Les expériences de validation de la méthode d'interrogation multi-spectrale ont été inspirées par les précédents travaux effectués dans le groupe sur la mutation M470v responsable de la mucoviscidose [27]. Plus spécifiquement, l'interaction entre une séquence cible "mutée", notée Ta_M (en référence à l'anglais "Target with Mutated sequence") et la séquence sonde complémentaire Pr_M (correspondant à "Probe with Mutated sequence") a été étudiée pour trois solutions de tampon phosphate (notées PBS 1×, PBS 3× et PBS 5× dans l'ordre de concentration en chlorure de sodium NaCl croissant) afin de déterminer les conditions d'hybridation optimales. Dans chaque cas, la solution cible a été préparée à une concentration de 0.2 μM.

Les détails relatifs aux séquences ADN et aux produits utilisés sont résumés dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1 – **Détail des produits utilisés lors des expériences de biodétection.**

Dénomination	Description	Détail
Pr_M	Séquence ADN sonde comprenant une biotine en extrémité 5´	Biotine - 5´ TTTTTTTTTTGACCGG-TATGCGTTCTAATGGTGATT 3´
Ta_{Cal}	Séquence ADN cible servant à normaliser la dispersion de concentration des plots sondes	5´ CGCGCGCATACCGGTCAAAA 3´
Ta_M	Séquence ADN cible	5´ CTCCCATAATCACCATTAGAAGTGA 3´
PBS 1×	Tampon phosphate 10 mM	[NaCl] = 150 mM et pH = 7.2
PBS 3×	Tampon phosphate 30 mM	[NaCl] = 0.460 M et pH = 6.9
PBS 5×	Tampon phosphate 50 mM	[NaCl] = 0.77 M et pH = 6.7

Pour limiter tout biais lié à la dispersion des concentrations de spotting, une séquence de calibration, Ta_{Cal}, a été injectée en premier lieu à une concentration de 0.1 μM afin d'étalonner et corriger les différences de réactivité entre les plots-sondes [27]. Le principe de cette étape de normalisation, illustré sur la Figure 5.5, repose sur un motif précis et élaboré de la séquence sonde. En effet, celle-ci comprend tout d'abord une biotine (*Biotin*) attachée à l'extrémité 5´ permettant l'accroche de la biomolécule à la couche supérieure de neutravidine recouvrant la biopuce (dans le cas de l'exemple présenté, provenant des résultats de Hottin et al. [27], la couche supérieure de la chimie de surface est formée de streptavidine : le principe de l'adsorption est sensiblement identique). Un espaceur, formé de 10 bases thymines (*Poly-T*), est intercalé entre la biotine et la première séquence d'intérêt, complémentaire de celle Ta_{Cal} (désignées respectivement par *Calibration detection sequence* et *Calibration target*). La dernière partie de la séquence sonde (*Specific interaction sequence*) est quant à elle destinée à l'hybridation de la séquence cible Ta_M recherchée.

La différence de réactivité d'un plot sonde à l'autre, naturellement induite par une dispersion des concentrations de spotting à la surface de la biopuce, peut ainsi être corrigée par la réponse enregistrée pour la séquence Ta_{Cal}, dite "de calibration". Les données relatives à l'injection des biomolécules cibles Ta_M, présentées dans la suite de ce chapitre, résultent par conséquent de cette procédure de normalisation.

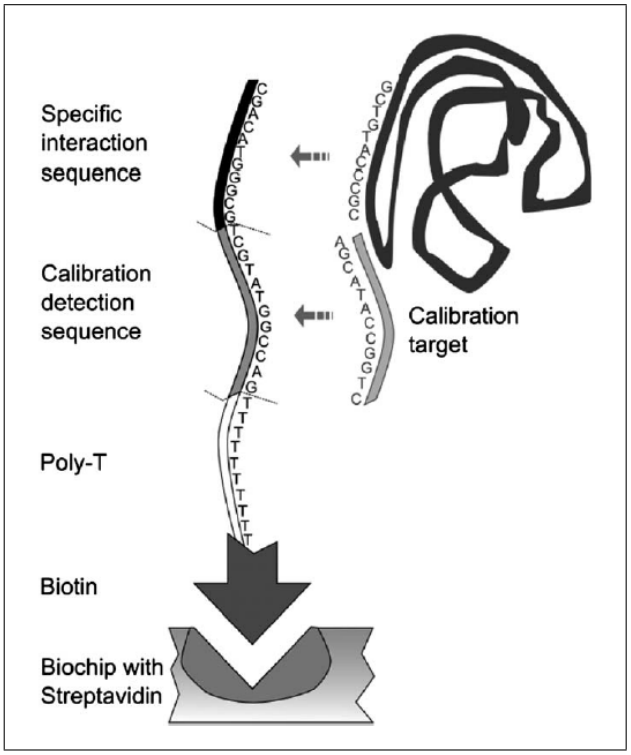


FIGURE 5.5 – **Principe de l'étape de normalisation par l'injection de la séquence Ta_{Cal}.** Une structure de la biomolécule sonde comprenant une biotine (*Biotin*) en extrémité 5´ destinée à l'adsorption sur la biopuce, un espaceur *Poly-T* constitué de 10 bases thymines, et deux séquences d'intérêt *Calibration detection sequence* et *Specific interaction sequence* a été élaborée précédemment par Hottin et al. [27] dans le but de corriger la dispersion des données induites par une différence de concentration de spotting au sein d'une même famille de plots supposés identiques. L'injection d'une première séquence *Calibration target*, avant toute expérience de biodétection, permet ainsi un étalonnage de la réactivité des plots sondes. Cette vue schématique étant tirée de travaux antérieurs aux expériences présentées, les séquences affichées sont susceptibles de différer de celles actuelles.

5.3.2 Résultats des mesures de cinétiques ADN-ADN

De la même manière que précédemment, les cinétiques ADN-ADN ont été analysées à la fois en interrogation multi-spectrale et en interrogation en réflectivité, permettant une comparaison directe entre les deux méthodes. De manière plus précise, le point de fonctionnement en interrogation en réflectivité a été déterminé dans la première solution tampon (PBS 1×), et gardé constant tout au long des expériences.

La séquence cible Ta_M a été injectée dans un premier temps en tampon PBS 1× : une fois l'état d'équilibre atteint, soit 15 min après l'injection, la surface de la biopuce a été régénérée afin de pouvoir renouveler l'analyse des cinétiques d'interaction dans les milieux tampons PBS 3× et PBS 5×. Une étape de régénération a bien entendu été effectuée suite aux expériences en PBS 3× pour décrocher les molécules cibles ayant interagi avec les molécules sondes.

La Figure 5.6 présente les signaux bruts enregistrés lors de ces expériences, par la méthode d'interrogation multi-spectrale. Les données affichées ont été recueillies sur les plots sondes Pr_M ainsi que sur ceux de référence, ne contenant aucune séquence ADN.

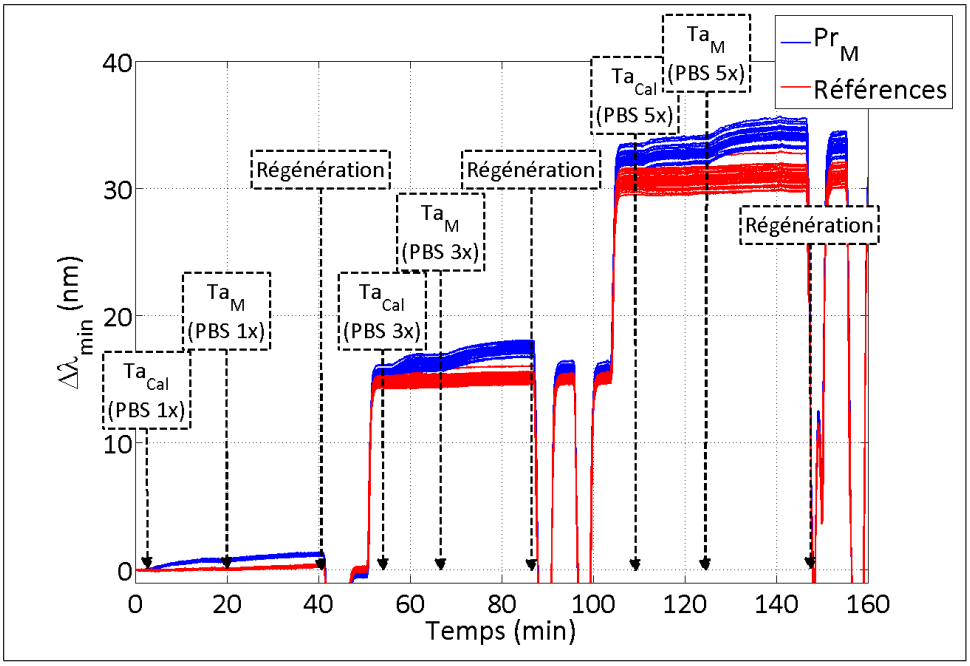


FIGURE 5.6 – **Signaux bruts recueillis en interrogation multi-spectrale lors des injections réalisées en tampon PBS 1×, 3× et 5×.** Pour une meilleure interprétation des résultats, les réponses des sondes Pr_M (en bleu) sont superposées à celles des plots de référence (en rouge). Une configuration spectrale à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm a été adoptée pour cette étude, permettant réduire à 10 s la durée des cycles d'acquisition.

En post-traitement, les signaux de l'interaction Ta_M-Pr_M ont été normalisés par la réponse de l'injection Ta_{Cal}, après soustraction des références. Les données ainsi corrigées dans chaque solution tampon, et recueillies sur une vingtaine de plots Pr_M supposés identiques, sont présentées sur la Figure 5.7. Comme mentionné dans le paragraphe décrivant le protocole de fonctionnalisation, la matrice initialement créée présente en réalité un nombre plus important de plots sondes, égal à 30. Pour plus de clarté dans la représentation des résultats, seule une vingtaine des réponses a été tracée sur la Figure 5.7.

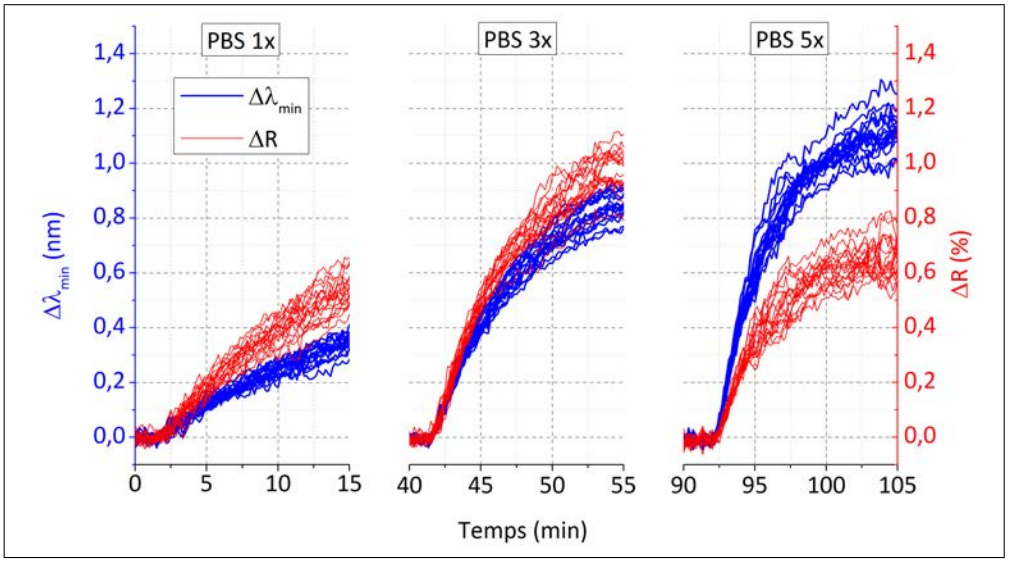


FIGURE 5.7 – **Cinétique de l'interaction entre les sondes Pr_M et les cibles Ta_M dans les solutions tampon PBS 1×, 3× et 5×, analysée avec les méthodes d'interrogation multi-spectrale (en bleu) et de variation de réflectivité (en rouge).** Une configuration spectrale à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm a été adoptée lors de cette étude.

La faible amplitude des signaux ($<$ 1 nm) présentés correspond à l'ordre de grandeur typiquement observé lors d'une expérience de biodétection, bien qu'il s'agisse ici d'un cas relativement favorable (une molécule cible de masse assez importante et parfaitement complémentaire de la sonde déposée à la surface de la biopuce). Ces résultats soulignent par conséquent la nécessité d'une résolution et d'une précision de mesure très inférieures au nanomètre pour toute technique d'interrogation spectrale.

D'autre part, une dispersion importante des cinétiques peut également être relevée : celle-ci ne provient pas du système de mesure en lui-même, mais bien des différences de réactivité et d'écoulement fluidique d'un plot sonde à l'autre. Cette observation met en évidence l'importance de disposer de nombreux réplicats d'une même molécule sonde pour extraire des résultats quantitatifs statistiquement fiables d'une expérience de biodétection, d'où l'intérêt d'un système de SPR ayant une modalité d'imagerie.

Enfin, la résolution temporelle, d'une dizaine de secondes, obtenue avec la méthode d'interrogation multi-spectrale implémentée, permet d'échantillonner très largement les cinétiques observées, conformément aux exigences énoncées précédemment.

Il apparaît de ces données une hybridation ADN-ADN favorisée par la salinité du milieu tampon. Ce résultat bien connu de la littérature s'explique par les groupements phosphates présents sur les brins d'ADN, induisant une charge globale négative, responsable d'une répulsion électrostatique entre les molécules cibles et sondes. La présence de contre-ions Na^+ dans le milieu réactif a pour effet d'écranter ces charges répulsives, favorisant ainsi l'hybridation entre les deux brins d'ADN complémentaires [97, 98]. De manière quantitative, une simulation rapide des conditions expérimentales [99] (température de 25 °C, concentration des brins d'ADN égale à 0.2μM) conduit à des énergies libres de -61.9 kJ/mol,-69.0 kJ/mol et -72.4 kJ/mol pour des concentrations de sel respectives de 150 mM, 450 mM et 750 mM, soit une réaction nettement favorisée par une salinité croissante. Or, les signaux enregistrés en interrogation en réflectivité donnent un résultat opposé, présentant une amplitude qui décroît avec la salinité.

Pour plus de clarté dans cette analyse, les signaux extraits 15 min après l'injection des cibles sont représentés sur la Figure 5.8. Afin de permettre une comparaison directe des deux méthodes d'interrogation, les valeurs ont été arbitrairement normalisées par rapport à la première interaction, dans le tampon PBS 1×.

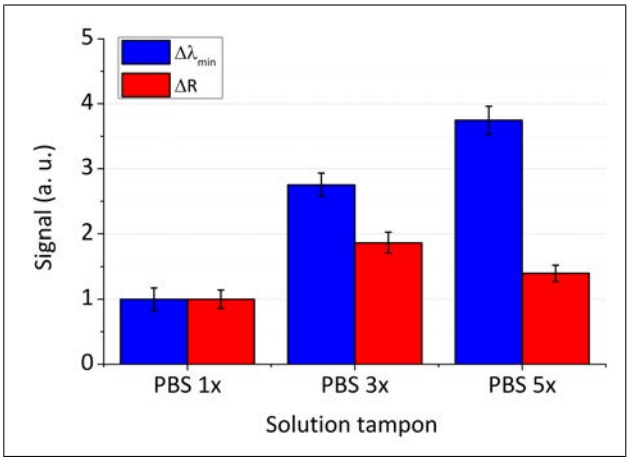


FIGURE 5.8 – **Signaux normalisés de l'interaction entre les sondes Pr_M et les cibles Ta_M dans les solutions tampon PBS 1×, 3× et 5×, extraits 15 min après l'injection des cibles en interrogation multi-spectrale (en bleu) et en variation de réflectivité (en rouge).** Une configuration spectrale à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm a été adoptée pour cette étude, permettant réduire à 10 s la durée des cycles d'acquisition. Pour les deux méthodes de mesure étudiées, la normalisation a été effectuée en divisant les valeurs extraites par celles de la première interaction, en PBS 1×.

Une diminution du signal en réflectivité est observée dès la deuxième injection de la solution cible, préparée dans un tampon de PBS 3× : la variation d'indice de la solution est alors trop importante et décale la résonance plasmon hors du domaine de linéarité de l'interrogation en réflectivité. Naturellement, cet effet se trouve amplifié lors des mesures dans le PBS 5×.

Plus robuste, la méthode de SPRI multi-spectrale permet donc d'acquérir en temps réel des informations sur les interactions biomoléculaires, avec une précision constante dans une gamme dynamique étendue. Ces résultats, validés dans le cas de l'étude relativement simple présentée dans ce paragraphe, permettent toutefois d'envisager des applications plus complexes, comme le met en évidence l'étude menée dans le chapitre 9 de la partie IV de ce manuscrit. D'autre part, les performances démontrées par l'interrogation multi-spectrale peuvent également être exploitées de manière indirecte, par la mise en place d'une procédure d'interrogation multi-angulaire.

5.4 Transposition à l'interrogation multi-angulaire

En raison de la symétrie des rôles respectifs de l'angle et de la longueur d'onde d'incidence dans l'excitation plasmonique, une transposition vers une méthode d'interrogation "multi-angulaire" peut être envisagée suite aux résultats relativement encourageants démontrés par l'interrogation multi-spectrale.

Dans cette optique, quelques résultats préliminaires ont été obtenus par des simulations analogues à celles détaillées dans le chapitre 4. Présentées dans les paragraphes suivants, les études menées constituent une première approche, théorique, de l'interrogation multi-angulaire.

5.4.1 Evaluation de la résolution en interrogation multi-angulaire

Dans un premier temps, la résolution de la méthode d'interrogation multi-angulaire proposée a été évaluée de manière théorique, pour une longueur d'onde incidente fixée à 810 nm, et un nombre d'angles d'interrogation variable, le pas angulaire étant égal à 0.1 ° dans cette première approche. Afin de modéliser la qualité de mesure, limitée par le bruit de photons seul, une démarche similaire à celle adoptée précédemment dans l'étude des performances du système utilisant un monochromateur (section 4.3, p.64) a été suivie. Dans le cadre de cette étude, les paramètres d'acquisition usuels ont été considérés, soit un nombre de 4 images moyennées, une zone d'intégration de 41×41 pixels ainsi qu'une dynamique du détecteur égale à 18000 électrons par puits.

La résolution de mesure ainsi modélisée, exprimée en termes d'erreur sur la position θ_{min} de la résonance, est représentée en triangles pleins sur la Figure 5.9. L'influence d'un bruit thermique de la cellule fluidique, estimé à 0.066 $m°$ pour une régulation de la température à 0.01 °C près, est également indiquée, en triangles creux.

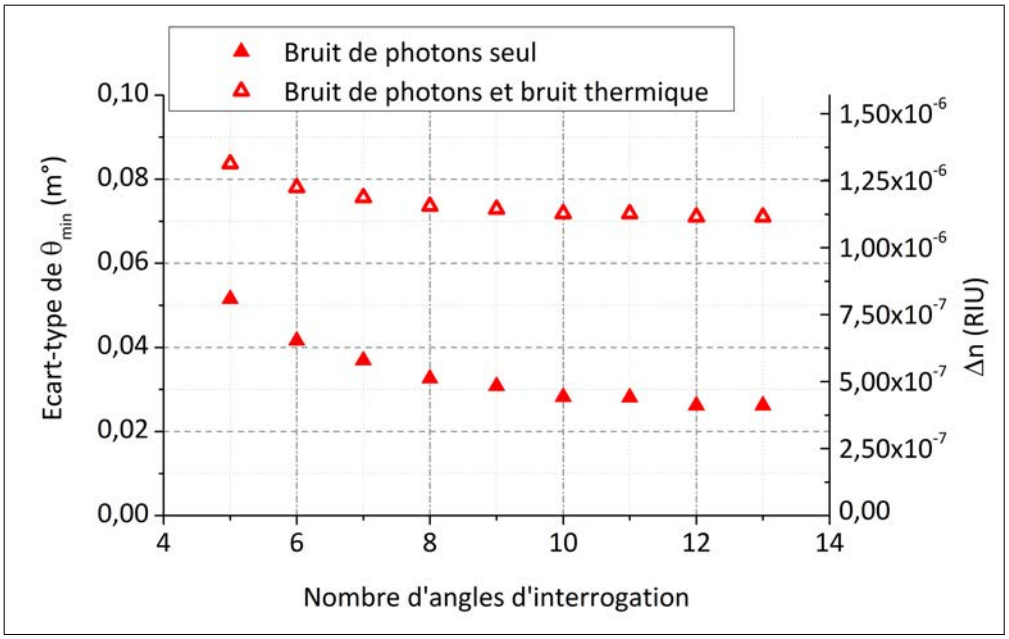


FIGURE 5.9 – **Evolution de l'écart-type du signal mesuré en interrogation angulaire en fonction du nombre d'angles choisis**. L'axe des ordonnées situé à droite indique la résolution équivalente en termes de variation d'indice optique correspondante. Les simulations représentées ont été générées à partir d'une modèle théorique simple tenant compte du bruit de photon seul (en triangles pleins) ou combiné à un bruit thermique de 0.01 °C (triangles creux).

Dans les conditions expérimentales considérées, une résolution de 0.08 $m°$ peut être atteinte avec 5 angles d'incidence, correspondant à une variation d'indice d'environ 10^{-6} RIU. La valeur obtenue est par conséquent comparable à celle déterminée précédemment en interrogation multi-spectrale, pour des paramètres d'acquisitions équivalents. En complément de cette étude théorique, une étude expérimentale demeure cependant nécessaire pour déterminer la limitation réelle du système de mesure.

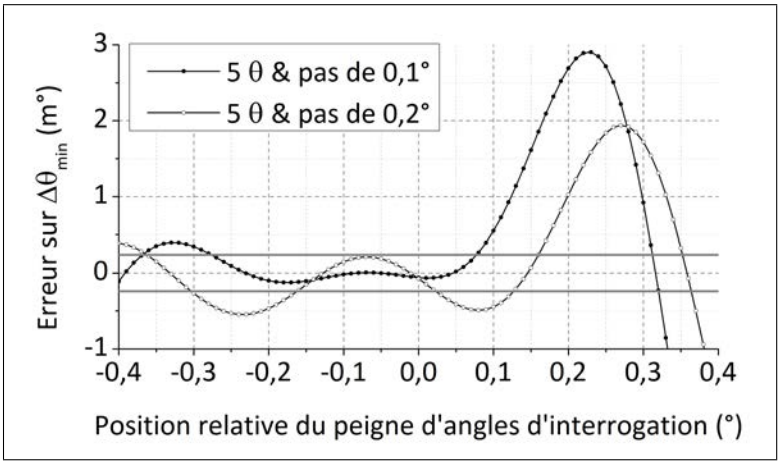
5.4.2 Evaluation de la dynamique de mesure en interrogation multi-angulaire

De la même manière, la dynamique de mesure a été évaluée théoriquement (Figure 5.10), par une procédure semblable à celle décrite dans la section 4.4, p.74. Cette propriété intrinsèque à la méthode d'interrogation choisie a été précédemment assimilée à l'intervalle des variations d'indice dans lequel la précision de la mesure resterait acceptable.

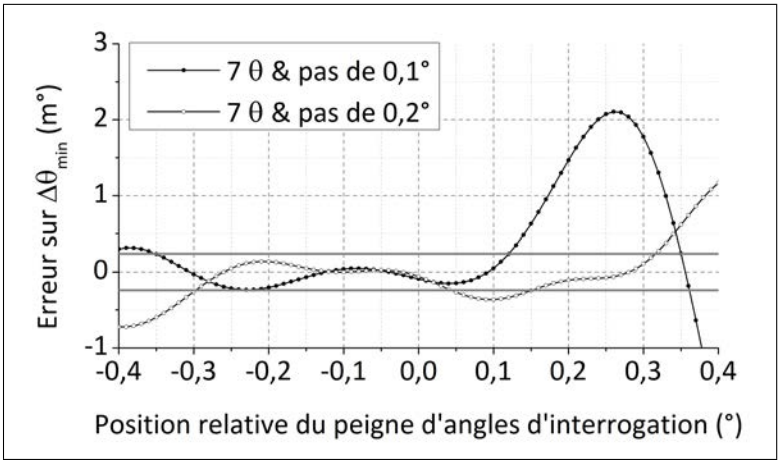
Représentée sur l'axe des ordonnées, la précision a été calculée comme la différence entre le décalage angulaire $\Delta\theta_{min}$ mesuré pour une variation d'indice donnée ($\approx 10^{-4}$ RIU), et celui théorique. Afin de tenir compte du bruit de mesure expérimental, un intervalle de confiance a été fixé à $\pm 3 \times \sigma(\theta_{min})$, où $\sigma(\theta_{min})$ représente la résolution atteinte (soit 0.08 $m°$). Sur la Figure 5.10, cet intervalle peut être visualisé directement par les lignes horizontales d'ordonnées $\pm$ 0.24 $m°$.

Les variations d'indices ont quant à elle été modélisées par un décalage entre le peigne d'angles d'incidence choisi par rapport à la position fixe d'une résonance plasmonique, correspondant à une longueur d'onde de 810 nm. Sachant qu'une variation de 1×10^{-3} RIU induit un décalage d'environ 64 $m°$, une règle de trois permet de convertir le décalage angulaire représenté sur l'axe des abscisses en variations exprimées en RIU.

A titre d'exemple, quatre configurations d'interrogation multi-angulaire, basées sur 5 (Figure 5.10a) et 7 (Figure 5.10b) angles d'incidence, espacés de 0.1° et 0.2°, ont été considérées dans cette étude.



(a) **Dynamique de mesure avec 5 θ.**



(b) **Dynamique de mesure avec 7 θ.**

FIGURE 5.10 – **Dynamique de mesure atteinte en interrogation multi-angulaire en fonction du nombre et de l'espacement des angles d'incidence.** Dans une première approche, seules les configurations à 5 et 7 angles d'incidence ont été étudiées.

D'après les critères définis, la dynamique de mesure correspond à l'intervalle du peigne d'interrogation angulaire, pour lesquels la précision de la mesure (assimilée à l'erreur sur $\Delta\theta_{min}$) reste acceptable, soit d'amplitude inférieure à $\pm$ 0.24 $m°$. La dynamique est ainsi estimée à 5.4×10^{-3} RIU et 7.5×10^{-3} RIU pour 5 (Figure 5.10a) et 7 (Figure 5.10b) angles d'incidence, respectivement, et un espacement de 0.1°. Ces valeurs, légèrement plus faibles que celles obtenues dans le cas de l'interrogation multi-spectrale ($\approx 10^{-2}$ RIU), pourraient être optimisées en modifiant l'espacement angulaire. Dans cette approche préliminaire de l'interrogation multi-angulaire, une telle étude complémentaire n'a pas été réalisée pour le moment.

Conclusion et perspectives

L'imagerie multi-spectrale est employée dans de nombreux domaines, autres que la biodétection plasmonique. En particulier, le développement de nouvelles méthodes de biopsie non invasive font appel aux informations spectrales pour établir un diagnostic : malheureusement, le couplage de ce type de mesure à l'imagerie et au temps réel n'est pas toujours évident.

Dans le cadre de la SPR, cette problématique a été résolue par l'implémentation d'une nouvelle méthode d'interrogation, basée sur un balayage multi-spectral du faisceau incident sur la biopuce. Combinée à un traitement de données adéquat, une configuration à seulement 5 longueurs d'onde offre une résolution comparable à l'interrogation en réflectivité, avec le bénéfice non négligeable d'une meilleure qualité de mesure, et une gamme dynamique plus large.

Les développements présentés dans cette partie ont été réalisés sur la base d'un banc de SPRI existant, dont la modalité d'interrogation spectrale est basée sur une lampe halogène couplée à un monochromateur. Malgré l'excellence des performances obtenues dans cette configuration, le potentiel de cette nouvelle méthode multi-spectrale reste limité, en raison du coût important et de l'encombrement d'un tel dispositif.

Pour cette raison, une étude a été initiée suite à ces premiers résultats, en vue de trouver une configuration plus simple, moins coûteuse, permettant un balayage spectral à 5 longueurs d'onde avec une précision comparable à celle d'un monochromateur. La partie III ci-après est consacrée à ces considérations pratiques, et détaille le travail d'ingéniérie effectué pour élaborer un système compact, bas coût et fiable de SPRI multi-spectrale.

Troisième partie

Source à LEDs pour l'illumination multi-spectrale

Chapitre 6

Un peu d'ingénierie...

Sommaire

6.1 Des composants pour un système d'illumination multi-spectrale à bas coût 102

6.2 Quelques considérations techniques... 103

6.3 Intégration du dispositif multi-LEDs au système de SPRI . . . 107

La méthode d'interrogation multi-spectrale introduite dans le chapitre précédent a permis de proposer un système de SPR combinant imagerie, mesure en temps réel et interrogation spectrale. De plus, une caractérisation complète des performances a révélé une qualité de mesure nettement supérieure aux configurations actuelles basées sur l'interrogation en réflectivité, qui sont traditionnellement privilégiées pour des analyses nécessitant un multiplexage des données.

Les développements expérimentaux ont été réalisés sur la base d'un banc de SPRI destiné initalement à la caractérisation angulaire et spectrale précise des propriétés plasmoniques de biopuces nanostructurées. En particulier, la présence d'une source de lumière blanche couplée à un monochromateur a permis de déterminer la configuration d'illumination optimale offrant une mesure en temps réel de la position du minimum de réflectivité plasmonique. A la différence de la majorité des prototypes d'interrogation spectrale, qui extrapolent cette valeur à partir d'une centaine de points de mesure sur le profil de la résonance plasmon, un nombre très faible de longueurs d'onde incidentes s'est avéré suffisant pour atteindre une résolution plus que satisfaisante. La configuration adoptée, basée sur 5 longueurs d'onde judicieusement choisies, ne justifie donc plus l'utilisation d'un instrument aussi complexe qu'un monochromateur, plus adapté à un balayage résolu et large bande. De plus, d'un point de vue industriel, il est peu probable qu'un tel prototype ait un succès commercial, en raison du coût et de l'encombrement de cette implémentation.

Ces réflexions, ainsi que la volonté d'exploiter le potentiel offert par ces récents résultats, ont motivé le développement d'un système d'illumination compact et bas coût, permettant d'égaler les performances obtenues avec un monochromateur en interrogation multi-spectrale. L'établissement d'un cahier des charges, ainsi que l'ingénierie déployée pour répondre aux exigences énoncées sont détaillés dans le premier chapitre de cette partie. La caractérisation des performances obtenues, abordée par la suite dans les Chapitres 7 et 8, permet de valider la robustesse du prototype ainsi développé en vue des applications de biodétection visées par les présents travaux.

6.1 Des composants pour un système d'illumination multi-spectrale à bas coût

Les caractérisations effectuées dans la partie précédente (partie II, p.55) ont mis en évidence l'importance du choix des longueurs d'onde incidentes sur la qualité des mesures en interrogation multi-spectrale. Idéalement, la source d'illumination doit fournir une peigne de 5 longueurs d'onde dans le proche infrarouge, espacées de 10 nm ou 20 nm afin de combiner vitesse d'acquisition, résolution et dynamique de mesure étendue.

Une importance particulière doit être accordée également à la présence d'un mouvement mécanique : en effet, dans le cas des travaux réalisés dans la partie II précédente, le balayage d'une longueur d'onde par le monochromateur a été effectué en 1 s, limitant considérablement la cadence de mesure. Une dispositif permettant de s'affranchir de cette contrainte est donc souhaitable pour le développement d'une nouvelle source multi-spectrale performante.

De ce point de vue, un ensemble de 5 diodes électro-luminescentes (notées LEDs dans la suite de ce manuscrit) semblent être la solution idéale : compacité, bas coût ($\approx$ 100 €), faible consommation électrique, bon rendement, et des puissances lumineuses qui ne cessent d'augmenter. Ces propriétés très avantageuses expliquent en effet l'emploi de plus en plus fréquent de ces sources lumineuses, tant dans le domaine industriel, que pour le grand public. Deux autres particularités retiennent cependant l'attention quant aux performances visées dans le cadre de ce projet : l'absence de tout mouvement mécanique, dans la mesure où la commande est réalisée par une interface électronique, et le très large choix des longueurs d'onde d'émission, allant de l'ultra-violet au proche infrarouge.

De manière similaire aux résultats exposés précédemment dans la partie II, une lampe halogène utilisée en combinaison de filtres à cristaux liquides pourrait également être envisagée. L'absence de mouvement mécanique et la rapidité du balayage spectral ainsi offert, de l'ordre de 100 ms par longueur d'onde, constitue un avantage certain pour les applications de biodétection visées. Cependant, au vu des souhaits exprimés, le prix élevé de ces composants ($\approx$ 20 k€) peut sembler rédhibitoire.

La dernière solution considérée, une lampe halogène couplée à une roue à filtres et une caméra CCD (ces deux éléments étant vendus à l'heure actuelle sous forme d'un bloc entier optimisé), affiche un prix du même ordre de grandeur ($\approx$ 20 k€). La présence d'un balayage mécanique susceptible de limiter la cadence d'acquisition constitue cependant le principal inconvénient vis-à-vis des deux autres configurations évoquées.

Cette étude rapide des solutions existant sur le marché est résumée dans le Tableau 6.1.

Tableau 6.1 – **Solutions techniques pour l'interrogation multi-spectrale.**

Solution technique	Prix approximatif	Mouvement mécanique	Exemple de fournisseur
5 LEDs	100 €	Non	Roithner
Lampe halogène + filtre à cristaux liquides	20 k€	Non	VariSpec Liquid Crystal Tunable Filters (PerkinElmer)
Lampe halogène + caméra CCD + roue à filtres	20 k€	Oui	SpectroCam (PixelTeq)

La sélection des composants retenus, les LEDs, le développement d'une source de courant adaptée et l'implémentation optique du module d'illumination ont fait l'objet d'un travail d'ingénierie, détaillé dans les paragraphes suivants, afin d'aboutir à un prototype d'interrogation multi-spectrale "plug and play", offrant une variété d'applications.

6.2 Quelques considérations techniques...

Le choix des LEDs destinées à l'illumination multi-spectrale a bien évidemment été inspiré par les résultats obtenus précédemment. Pour allier simplicité du montage et performance, une configuration basée sur 5 longueurs d'onde séparées de 10 nm a été privilégiée. De la même manière que pour les travaux réalisés dans la partie II, le choix des longueurs d'onde d'incidence a été concentré sur la gamme 700-800 nm, résultant d'un compromis entre la sensibilité de l'onde plasmonique et le rendement quantique de la caméra CCD utilisée comme détecteur.

Les spectres d'émission des 5 LEDs sélectionnées sont représentés sur la Figure 6.1.

Le Tableau 6.2 résume les principales caractéristiques de ces composants.

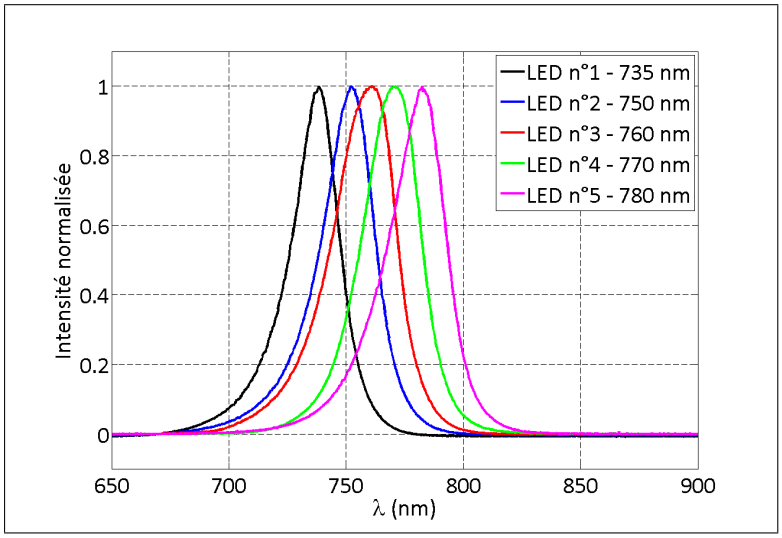


FIGURE 6.1 – **Spectres d'émission des 5 LEDs utilisées dans le dispositif d'illumination multi-spectrale.** Les mesures présentées ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre commercial (modèle USB2000+, Ocean Optics).

Tableau 6.2 – **Caractéristiques des 5 LEDs sélectionnées pour le module d'illumination multi-spectrale.**

Référence	**Caractéristiques indiquées par le fournisseur**	**Caractéristiques mesurées expérimentalement**	**Puissance radiative attendue (mW) (pour un courant d'alimentation de 50 mA)**
LED735-01AU	$\lambda_0 = 735$ nm FWHM = 30 nm	$\lambda_0 = 737.9$ nm FWHM = 23.0 nm	18
LED750-03AU	$\lambda_0 = 750$ nm FWHM = 30 nm	$\lambda_0 = 751.9$ nm FWHM = 25.6 nm	19
LED760-03AU	$\lambda_0 = 760$ nm FWHM = 30 nm	$\lambda_0 = 760.1$ nm FWHM = 30.6 nm	19
ELD770-524	$\lambda_0 = 770$ nm FWHM = 30 nm	$\lambda_0 = 770.6$ nm FWHM = 27.8 nm	14
LED780-01AU	$\lambda_0 = 780$ nm FWHM = 30 nm	$\lambda_0 = 782.4$ nm FWHM = 28.0 nm	18

De manière semblable à la configuration précédente utilisant un monochromateur, l'interrogation multi-spectrale implémentée dans cette partie est basée sur un balayage séquentiel des longueurs d'onde d'incidence. Cette procédure nécessite par conséquent une source de courants multiples commutable, ainsi qu'une interface électronique chargée de contrôler l'alimentation de chacune des 5 LEDs et permettre un basculement "on/off" commandé par ordinateur.

Deux propriétés essentielles sont particulièrement recherchées :

- Les courants délivrés doivent être réglables en intensité, de manière à s'adapter aux niveaux des puissances lumineuses émises par les différentes LEDs, ainsi qu'à la réponse spectrale de la caméra CCD.
- Les courants doivent également être suffisamment stables (± 1%) pour ne pas dégrader la qualité des mesures plasmoniques.

Une source répondant à ces critères a été développée dans le cadre de cette thèse, grâce à l'aide de Frédéric Moron au Laboratoire Charles Fabry. Le dispositif élaboré intègre un circuit imprimé existant (TLC5971, Texas Instruments), initialement destiné au contrôle des sources d'éclairage à LEDs grand public, et offrant, du moins pour un premier prototype, des performances satisfaisantes (Tableau 6.3).

Tableau 6.3 – **Caractéristiques principales du composant TLC5971 destiné au pilotage des LEDs.**

Nombre de canaux de courant réglables	**Intensité maximale délivrée sur chaque canal**	**Dispersion de l'intensité délivrée canal à canal**	**Codage de l'intensité**
12	60 mA	±1%	16 bits

L'ajout d'une connexion USB permet un pilotage du dispositif ainsi implémenté via une interface développée en langage C++ (Figure 6.2).

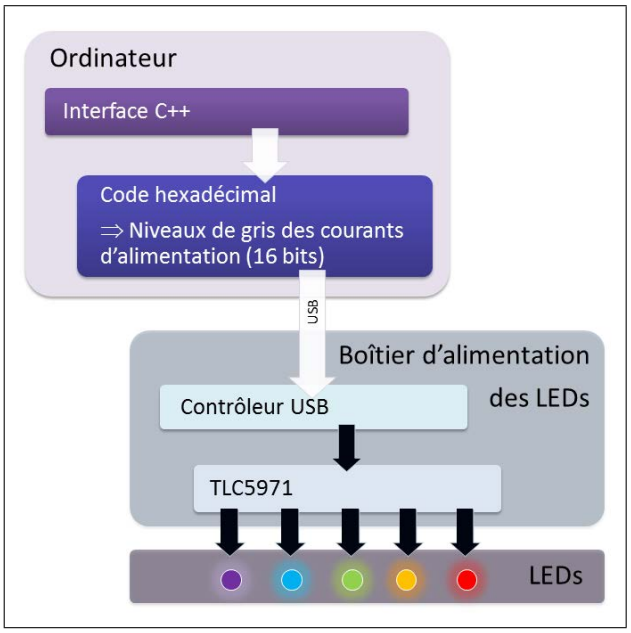


FIGURE 6.2 – **Schéma de principe de l'interface développée dédiée au pilotage des courants d'alimentation des 5 LEDs.**

L'ensemble de ce montage peut alors tenir sans encombre dans une boîte à chaussures (Figure 6.3).

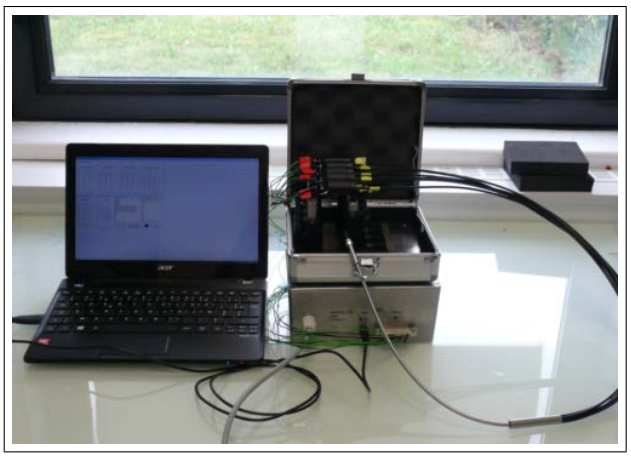


FIGURE 6.3 – **Photographie du module d'illumination multi-spectrale basé sur 5 LEDs.**

Le faible encombrement du module d'illumination multi-spectrale développé (Figure 6.3) a permis une adaptation relativement aisée sur l'un des bancs de mesure par SPRI existant au laboratoire, sans modification majeure du montage initial. Ces travaux, présentés dans la paragraphe suivant, laissent entrevoir le potentiel industriel d'un tel dispositif, offrant à un coût relativement bas une modalité d'interrogation spectrale aux systèmes actuels de mesure en variation de réflectivité.

6.3 Intégration du dispositif multi-LEDs au système de SPRI

Le principe de l'interrogation multi-spectrale a été explicité précédemment dans la partie II, section 4.1 (p.56) : le balayage des longueurs d'onde d'incidence était alors réalisé par un monochromateur, dans un montage en configuration de Kretschmann. Le dispositif expérimental exploité dans cette partie est relativement semblable, à la différence de l'illumination multi-spectrale, qui est désormais assurée par le nouveau dispositif à 5 LEDs :

- La sélection de la longueur d'onde d'illumination est réalisée via une interface électronique contrôlant l'alimentation en courant de chaque LED. Une connexion USB permet l'envoi direct d'un ordre "on" ou "off" sur chacune des 5 voies exploitées, depuis un ordinateur. Plus spécifiquement, le niveau de courant peut être réglé de manière indépendante sur chaque canal, afin d'ajuster la luminosité du faisceau issu de chaque LED.
- L'ajout de filtres interférentiels, placés devant les 5 LEDs, vise à atteindre une stabilité suffisante de l'illumination multi-spectrale, en termes de longueurs d'onde et d'intensités émises, d'une commande à l'autre. Cette optimisation primordiale pour la qualité des mesures d'interrogation plasmoniques sera détaillée dans le chapitre 7 de cette Partie.
- La lumière ainsi émise par chaque LED est directement collectée par un faisceau de 5 fibres combinées dans une configuration en nid d'abeille : l'absence d'optiques de collection à ce niveau est justifiée par la plus faible étendue géométrique des fibres ($S_{fibre} = 0.13\ mm^2$; $NA_{fibre} = 0.35$) comparée à celle des LEDs ($S_{émission} = 19.6\ mm^2$; $NA_{émission} = 0.17$). Le choix de fibres multimodes, de 400 μm de coeur, utilisées en combinaison avec un diffuseur, a été déterminé par les résultats précédents démontrant l'influence du bruit de speckle sur la qualité des mesures.
- Un polariseur linéaire (LPVIS100, Thorlabs) permet la sélection de la polarisation TM ou TE du faisceau incident sur la biopuce.
- Le faisceau polarisé TM est couplé aux plasmons de surface de la biopuce dans une configuration de Kretschmann, basée sur un prisme équilatéral en verre SF10.
- Pour chaque longueur d'onde d'excitation, une image en réflexion de la biopuce est enregistrée par une caméra CCD (Pixelfly QE, 1392×1024 pixels, de dynamique égale à 18000 électrons par puits).
- Un miroir motorisé permet un balayage angulaire du faisceau incident sur la biopuce. Dans le cas des expériences présentées par la suite, l'angle d'incidence a été ajusté à la résonance de la longueur d'onde centrale de l'illumination multi-spectrale.
- Un système de fluidique comprenant une cellule en titane de 200 μm d'épaisseur et 1 cm de diamètre, et une pompe péristaltique, permettant l'injection des solutions souhaitées à la surface de la biopuce.
- Un module Peltier permet de réguler la température à mieux que 0.1 °C près, par un asservissement proportionnel. Dans le cas des expériences présentées dans la suite de ce manuscrit, la température de consigne a été fixée à 25 °C.

La Figure 6.4 présente un schéma simplifié du dispositif expérimental ainsi implémenté.

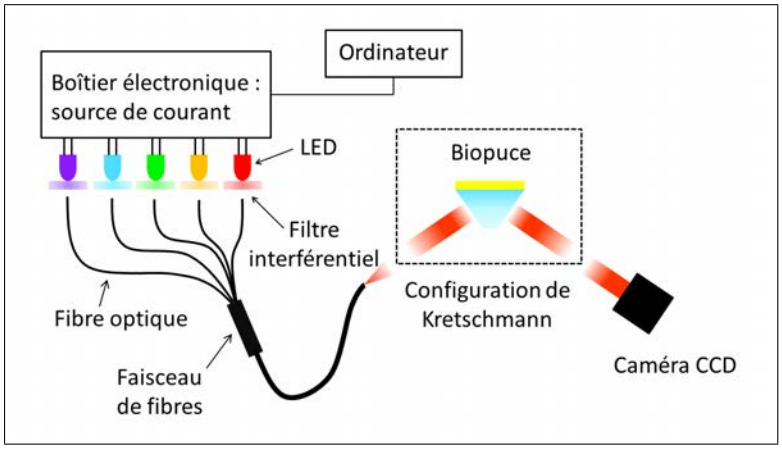


FIGURE 6.4 – **Schéma de l'implémentation du système d'illumination multi-LEDs dans un banc de SPRI conventionnel.** L'interrogation multi-spectrale est réalisée par une alimentation "on/off" cyclique des 5 LEDs, pilotée par un programme Labview. La lumière ainsi émise est collectée par un faisceau de 5 fibres optiques combinées en une seule fibre de sortie. La lumière incidente est alors dirigée vers la biopuce dans une configuration de Kretschmann, et imagé par une caméra CCD après réflexion. Le cycle de balayage "on/off est réalisé en continu pour les 5 LEDs, permettant de réaliser l'interrogation multi-spectrale en temps réel.

A l'exception du polariseur, dont la position est contrôlée manuellement, le montage schématisé sur la Figure 6.4 est entièrement automatisé, et peut être piloté depuis une interface Labview. L'interrogation multi-spectrale est alors réalisée en continu, avec une durée de 10 s par cycle de balayage des 5 LEDs, ce qui équivaut à la cadence d'acquisition précédemment obtenue avec le monochromateur. En effet, une incompatibilité entre les logiciels pilotant la caméra CCD et le programme Labview chargé de la procédure globale d'interrogation multi-spectrale conduit à une durée anormalement longue, de l'ordre de 2 s, pour l'enregistrement d'une image. Une résolution de ce problème, observé précédemment sur le banc de mesure basé sur un monochromateur (se reporter au chapitre 4, p.79), permettrait d'augmenter d'un facteur 3 la cadence d'acquisition actuelle.

Cependant, cette résolution temporelle seule ne suffit pas à rendre le prototype développé compatible avec les applications de biodétection visées par ces travaux. Des mesures complémentaires de caractérisation restent nécessaires : en particulier, une grande importance doit être accordée à la détermination du bruit limitant du système de mesure, qui impacte directement ses performances en termes de résolution. Cette étude, présentée dans le chapitre suivant, permet d'appréhender les principales difficultés liées à l'utilisation de LEDs dans le cadre de l'interrogation spectrale en SPR. De plus, les résultats obtenus dans ce cadre constituent une base intéressante pour le cahier des charges de biocapteurs potentiels exploitant cette configuration compacte.

Chapitre 7

Caractérisation et optimisation du système d'illumination multi-LEDs

Sommaire

7.1 Bruit en intensité et bruit de photon 110
7.2 Stabilité en longueur d'onde et résolution 115
7.2.1 Etude théorique 116
7.2.2 Etude expérimentale 119
7.3 Effet du combineur à fibres optiques 124

Avant de procéder à une application directe en biodétection, une première phase de tests a été effectuée afin de valider le bon fonctionnement du système de SPR implémenté dans le chapitre 6. Cette étude préliminaire a ainsi révélé des performances nettement moins satisfaisantes, en comparaison avec la configuration précédente utilisant un monochromateur. Pour cette raison, une caractérisation plus poussée a été menée dans ce Chapitre, dans le but de déterminer l'origine de ces limitations liées à la source multi-spectrale nouvellement développée. En effet, en dehors des fluctuations du signal naturellement induites par le bruit de photons, l'interrogation multi-spectrale peut également être affectée, dans le cas présent, par les variations de la source de courant, de même que par l'instabilité en longueur d'onde et en flux de la source excitatrice, conduisant à un bruit plus élevé sur le décalage spectral du minimum de réflectivité.

Parmi ces différents paramètres, la reproductibilité en longueur d'onde constitue un facteur critique. Dans le cas d'un monochromateur, cette propriété est déterminée et figure dans les spécifications de l'appareil. En effet, un tel dispositif est traditionnellement destiné à des applications de spectroscopie nécessitant un positionnement particulièrement précis en longueur d'onde. En revanche, dans le cas d'un composant moins coûteux tel qu'une LED, cette donnée ne figure pas nécessairement dans les informations fournies par le fabricant, d'où la nécessité d'une caractérisation précise préalablement à toute utilisation dans le cadre des mesures de biodétection envisagées.

De même, les précédents développements avaient été réalisés sur la base d'une lampe halogène allumée en continu : la stabilité de l'intensité émise, démontrée lors d'une caractérisation précise des performances du système implémenté (partie II, p.79), a permis de s'affranchir de toute procédure de normalisation en temps réel et ainsi réduire d'un facteur deux la durée des acquisitions. De ce point de vue, la différence avec le prototype d'illumination multi-spectrale introduit dans cette partie n'est pas négligeable, dans la mesure où le comportement des LEDs

en termes de stabilité de l'intensité face à des commutations "on/off" répétées au cours du temps est mal connu.

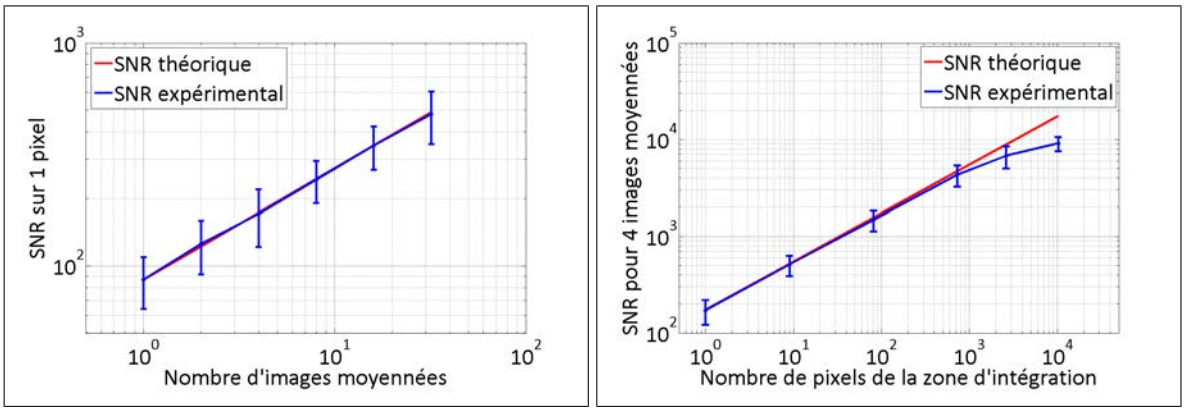
En complément de la longueur d'onde d'excitation, les conditions de résonance des plasmons de surface sont également affectées par l'angle d'incidence du faisceau lumineux sur la biopuce. Pour cette raison, la collimation doit être optimale, afin de rendre la condition d'incidence angulaire indépendante de la LED sélectionnée. Dans la configuration étudiée précédemment, l'illumination multi-spectrale était collectée par une fibre optique multimode en sortie du monochromateur, et collimatée par un système achromatique basé sur un miroir parabolique. Dans le cas présent, l'utilisation d'un faisceau de fibres en "nid d'abeille" produit un point source différent pour chaque longueur d'onde d'excitation. L'influence de cette dispersion angulaire sur les résultats de l'interrogation multi-spectrale doit donc être caractérisée de manière approfondie.

Les trois paramètres cités, soit la stabilité en longueur d'onde, celle en intensité et la dispersion multi-angulaire, représentent potentiellement les facteurs limitants des mesures exploitant le nouveau prototype d'illumination multi-spectrale. La caractérisation présentée ci-après démontre qu'une optimisation peut cependant être effectuée, afin d'atteindre des performances de mesure équivalentes à celles obtenues précédemment avec le montage utilisant le monochromateur.

7.1 Bruit en intensité et bruit de photon

Dans le cadre de l'évaluation d'un système de détection, la première caractérisation effectuée est, de manière générale, l'estimation du rapport signal à bruit. En effet, cette mesure renseigne directement sur les performances du système : dans un cas idéal (et pour un système où le flux lumineux est important), celles-ci ne sont limitées que par le bruit de photon.

Cette évaluation a été réalisée de manière parfaitement similaire aux caractérisations précédemment effectuées sur le banc muni d'un monochromateur (partie II, p.72), en étudiant l'influence des moyennes spatiale et temporelle sur le rapport signal à bruit mesuré expérimentalement, comparé à celui attendu dans le cas théorique d'une limitation par le bruit de photon seul. La Figure 7.1 présente les résultats obtenus pour l'une des LEDs du module d'illumination développé (émettant à 735 nm), lors du fonctionnement du banc de mesure en interrogation multi-spectrale.



(a) **Evolution du rapport signal à bruit sur 1 pixel, en fonction du nombre d'images moyennées par la caméra.**

(b) **Evolution du rapport signal à bruit en fonction du nombre de pixels de la zone d'intégration, pour 4 images moyennées.**

FIGURE 7.1 – **Evolution du rapport signal à bruit en fonction des moyennes spatiale et temporelle.** Les données présentées correspondent aux performances obtenues avec la LED n°1 (émettant à 735 nm).

La tendance observée rappelle le comportement observé précédemment dans le cas d'une source halogène couplée à un monochromateur : le rapport signal à bruit extrait sur un pixel correspond bien aux prédictions théoriques (Figure 7.1a), mais l'influence de la moyenne spatiale (Figure 7.1b) démontre, en revanche, la présence d'un autre phénomène limitant. Pour plus de clarté, seuls les résultats obtenus pour la LED émettant à 735 nm sont représentés sur la Figure 7.1. Des observations similaires ont bien entendu été rapportées pour les 4 autres LEDs du module d'illumination.

Une visualisation des signaux enregistrés en variation de réflectivité permet de déterminer l'origine de ce comportement. En effet, la Figure 7.2 met en évidence une très nette corrélation entre les signaux extraits sur 100 zones d'intérêt de 41×41 pixels réparties à la surface de la biopuce (bien que le montage optique considéré soit légèrement différent de celui utilisant le monochromateur, les extractions de données ont été effectuées pour un nombre de pixels identique, à l'exception des expériences de biodétection présentées par la suite, pour lesquelles le signal a été extrait directement à partir d'un masque de la matrice de plots sondes).

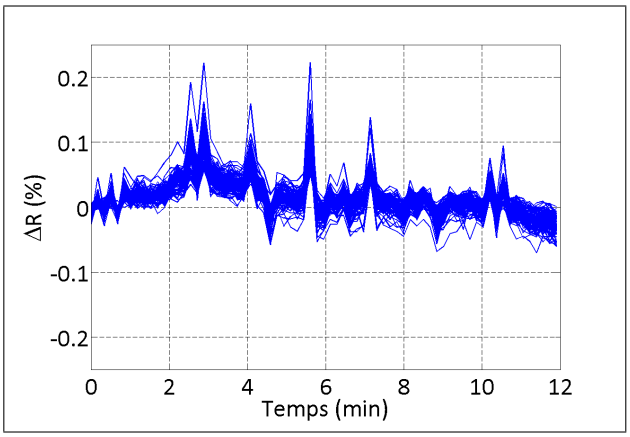


FIGURE 7.2 – **Variations de réflectivité mesurées avec la LED n°2 (750 nm).** Ces données ont été extraites sur 100 zones de 41×41 pixels d'après des mesures réalisées en interrogation multi-spectrale sur une lame d'or non fonctionnalisée, avec de l'eau comme milieu tampon.

Des variations relativement importantes en intensité peuvent être relevées sur la Figure 7.2. Les fluctuations observées étant temporelles, l'augmentation du nombre d'images moyennées est supposée améliorer le rapport signal à bruit : l'évolution présentée sur la Figure 7.1a confirme avec cette hypothèse. Caractéristique plus marquante, le bruit en intensité semble affecter de la même manière tous les points répartis spatialement à la surface de la biopuce. Par conséquent, pour un nombre d'images moyennées fixes, deux régimes peuvent être distingués :

- Dans un premier temps, lorsque la zone d'intégration du signal est faible, le bruit de photons est dominant et régit l'évolution du rapport signal à bruit : dans le cas présent, ce régime s'étend jusqu'à une surface de 1000 pixels pour un nombre de 4 images moyennées (Figure 7.1b).
- Dans un second temps, au-delà de cette taille de la zone d'intégration, les fluctuations temporelles dues au bruit de photons deviennent plus faibles que celles du bruit en intensité. Or, celui-ci étant corrélé d'une zone d'intérêt à une autre, une moyenne spatiale ne permettra donc pas d'éliminer les fluctuations associées. Pour cette raison, une saturation du rapport signal à bruit peut être observée sur la Figure 7.1b pour un nombre de pixels important.

Afin d'appréhender l'origine de ce bruit spécifique aux LEDs, il peut être judicieux de considérer directement l'évolution temporelle de l'intensité émise hors de tout phénomène de résonance plasmon. La Figure 7.3 présente le résultat d'une telle étude : l'intensité reçue par la caméra CCD, provenant de chacune des 5 LEDs, a été enregistrée durant 50 minutes. Dans cette expérience, les LEDs ont été alimentées par le module générateur de courant décrit précédemment (section 6.2), et allumées de manière séquentielle comme prévu lors d'un fonctionnement normal du système en interrogation multi-spectrale.

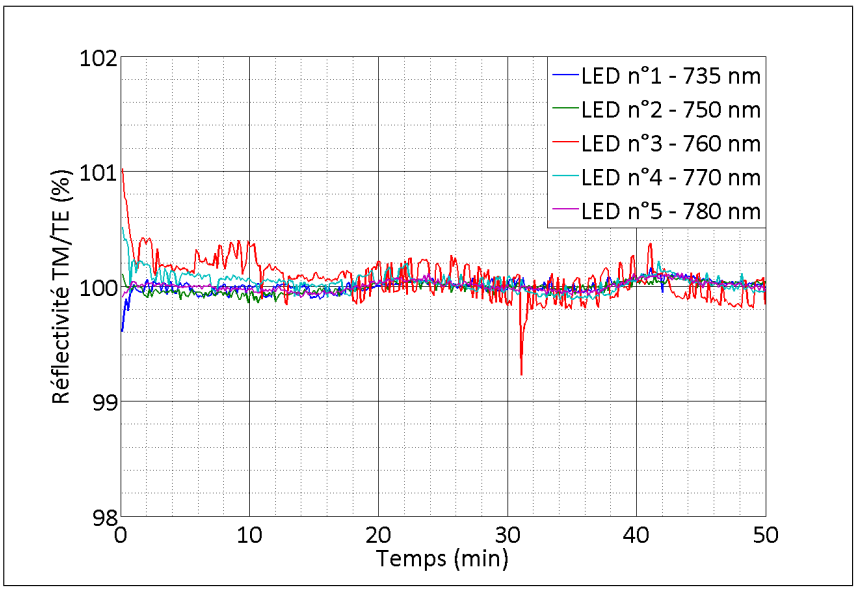


FIGURE 7.3 – **Variations de réflectivité enregistrées en polarisation TM hors résonance.** Ces données correspondent à une zone d'intégration de 41×41 pixels sur un prisme de verre SF10, ne présentant pas de résonance plasmon. Les signaux présentés ont été enregistrés lors d'une mesure en interrogation multi-spectrale. Le bruit nettement plus important observé dans le cas de la LED n°3 (760 nm) traduit très probablement un composant défectueux.

Une première caractéristique notable est la présence d'oscillations, observées à des durées

de fonctionnement longues : ces variations traduisent en réalité l'influence de la température ambiante. En effet, une corrélation peut être relevée vis-à-vis de la température de la climatisation du laboratoire : la Figure 7.4 présente l'évolution de l'intensité enregistrée pour la LED n°4 (émettant à 770 nm), superposée à celle de la température ambiante, enregistrée par une sonde thermique.

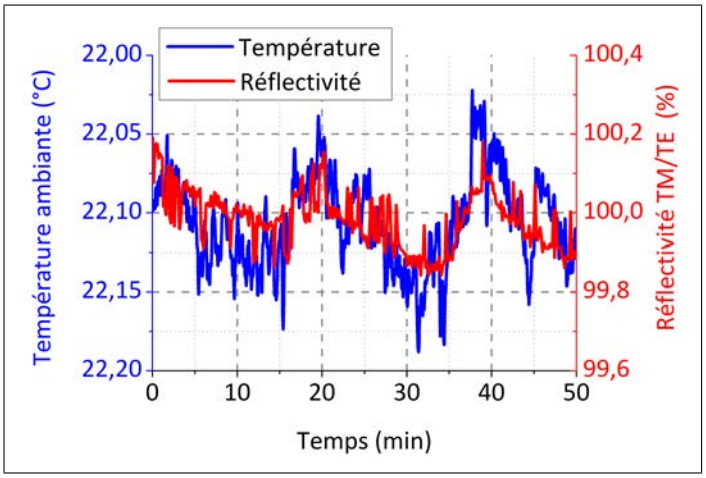


FIGURE 7.4 – **Variations de réflectivité enregistrées en polarisation TM hors résonance pour la LED n°4 (770 nm), supersposées aux fluctuations de la température ambiante.** Ces données correspondent à une zone d'intégration de 41×41 pixels sur un prisme de verre SF10, ne présentant pas de résonance plasmon. Les signaux présentés ont été recueillis lors d'une mesure en interrogation multi-spectrale. La température ambiante a quant à elle été enregistrée de manière parallèle à ces expériences, par une sonde thermique.

D'une amplitude moyenne de l'ordre de 0.1% et d'une période d'environ 20 min (Figure 7.3), les oscillations observées ne sont cependant pas problématiques pour les mesures de SPR et peuvent être aisément corrigées lors d'un post-traitement des données recueillies. En effet, ramenées à la cadence d'acquisition en interrogation multi-spectrale (10 s par point de mesure), ces fluctuations, alors inférieures à 10^{-3}%, deviennent négligeables face au bruit de photons, de l'ordre de 0.02%. Cette dernière valeur correspond au bruit de photons moyen pour les 5 LEDs, déterminé expérimentalement pour un nombre de 4 images moyennées et une zone de 41×41 pixels.

En revanche, les fluctuations d'intensité dues à l'allumage séquentiel des LEDs, de fréquence plus élevée, sont susceptibles d'affecter la qualité des mesures en interrogation multi-spectrale. D'une moyenne de 0.05% sur les 5 LEDs, le bruit observé sur ces données représente une valeur non négligeable par rapport au bruit de photon.

A l'heure actuelle, l'origine de ces variations rapides demeure incertaine : l'hypothèse la plus probable considère l'existence d'un régime transitoire lors de l'établissement du courant d'alimentation à l'allumage des LEDs. Plus précisément, les observation précédentes conduisent à penser que ce courant électrique, dont dépend le flux lumineux émis, varie de manière importante sur des échelles de temps comparables à la durée d'acquisition d'une image par la caméra CCD (soit de l'ordre de 10 à 100 ms) lors de commutations "on" des LEDs. Par conséquent, l'intensité enregistrée serait également variable d'une image à une autre, d'où le comportement observé sur la Figure 7.3). En effet, des mesures de caractérisation présentées dans la suite de ce chapitre, effectuées certes à des échelles de temps plus longues, permettent d'étayer l'hypothèse exprimée ici.

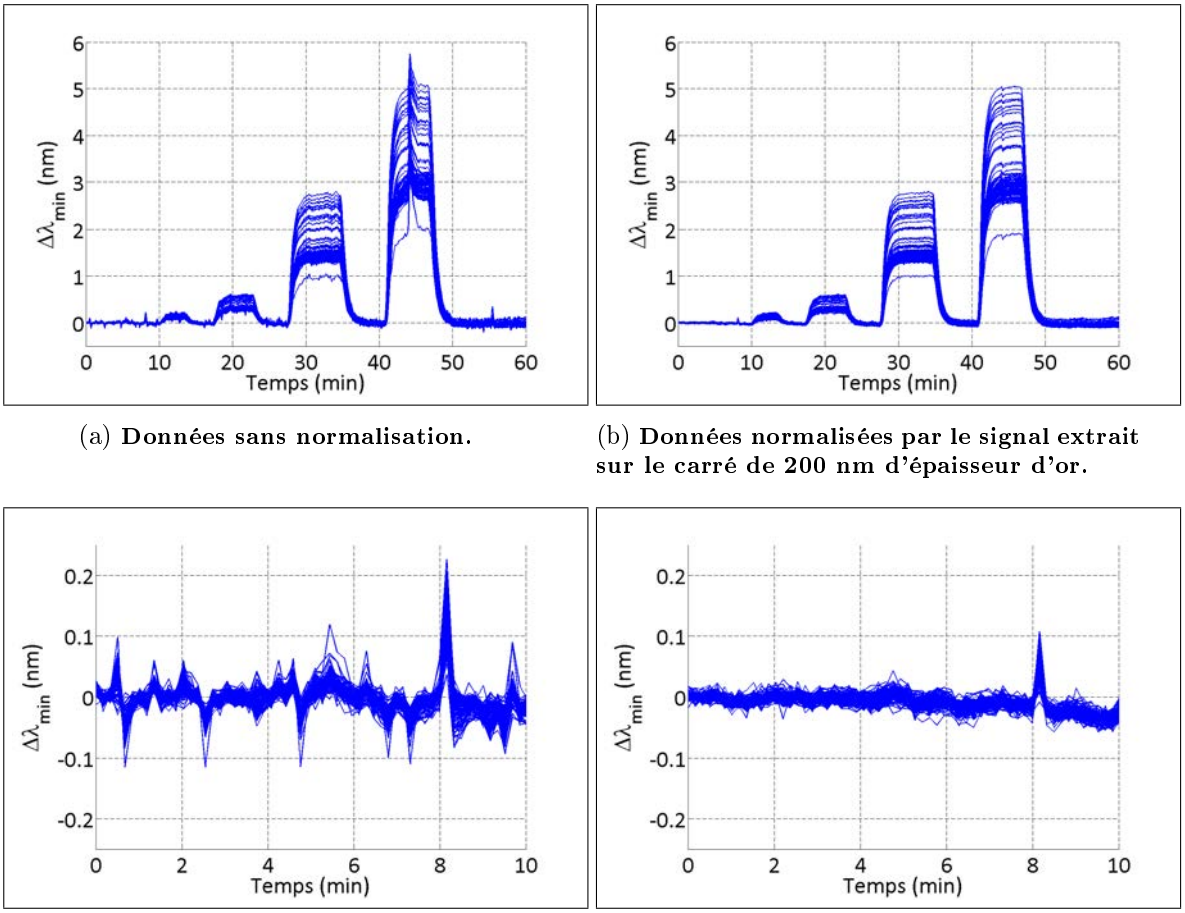
Des solutions relativement simples peuvent cependant être mises en oeuvre pour réduire la contribution de ce bruit en intensité, telle qu'une moyenne temporelle, ou encore, dans le cas des signaux provenant d'une interaction cible-sonde, par soustraction du signal extrait sur un plot de référence. Une normalisation de l'intensité incidente peut également être effectuée en temps réel, par un signal extrait sur une zone ne présentant pas de résonance en polarisation TM : Ostuki et al. [80] ont ainsi proposé l'utilisation d'une biopuce conventionnelle présentant un carré de 200 nm d'épaisseur d'or servant de référence.

Une telle expérience a été effectuée dans le cadre de ces travaux : le dépôt d'un carré d'or de 1 mm de côté et 200 nm d'épaisseur a été réalisé sur une lame d'or présentant une épaisseur de 50 nm. Une séquence d'injections de différentes solutions de sucrose a été enregistrée en temps réel en interrogation multi-spectrale. Les valeurs de réflectivité extraites sur une zone d'environ 50×90 pixels à la surface du carré ont été utilisées pour normaliser celles de 100 régions d'intérêt (41×41 pixels) réparties sur la biopuce : l'ajustement pseudo-Lorentzien a alors été appliqué à ces valeurs de réflectivité corrigées.

La Figure 7.5 illustre le gain en qualité de données ainsi obtenu, en comparaison avec un ajustement pseudo-Lorentzien effectué sur les valeurs de réflectivité brutes correspondant aux 100 régions sélectionnées.

Ainsi, une normalisation des valeurs de réflectivités avant reconstruction du profil spectral de la résonance permet de limiter les variations du signal induites par le bruit en intensité des LEDs. Ce résultat est particulièrement notable sur la ligne de base (entre 0 et 10 min), où les pics de signal de l'ordre de 100 pm (Figure 7.5c) semblent presque tous corrigés (Figure 7.5d), conduisant à des fluctuations d'une dizaine de picomètres. Bien que très efficace, cette méthode impose une contrainte non négligeable liée au dépôt du carré d'or : nécessitant une étape de fabrication supplémentaire, cette solution ne peut être employée de manière systématique pour des analyses quotidiennes, et n'a par conséquent pas été étudiée de manière plus poussée dans le cadre de ces travaux.

D'autre part, le bruit en intensité n'est pas le seul affecté par des commutations "on/off" répétées. En effet, l'instabilité en longueur d'onde de l'émission des LEDs, abordée en détail dans le paragraphe suivant, contribue également de manière significative au bruit de mesure en interrogation multi-spectrale.



(a) **Données sans normalisation.**

(b) **Données normalisées par le signal extrait sur le carré de 200 nm d'épaisseur d'or.**

(c) **Données sans normalisation (sur la ligne de base recueillie entre 0 et 10 min).**

(d) **Données normalisées par le signal extrait sur le carré de 200 nm d'épaisseur d'or (sur la ligne de base recueillie entre 0 et 10 min).**

FIGURE 7.5 – **Mise en évidence du gain en qualité de données par la méthode de "self-referencing" proposée par Otskui et al. [80].** Les signaux enregistrés correspondent à des injections de différentes solutions de sucrose à la surface d'une biopuce non fonctionnalisée, présentant une zone carrée de 200 nm d'épaisseur d'or.

7.2 Stabilité en longueur d'onde et résolution

La résolution de l'interrogation multi-spectrale est directement dépendante du bruit affectant les valeurs de réflectivité utilisées pour la reconstruction du profil de la résonance plasmon. Dans le cas présent, les contributions du bruit en intensité, observé d'un allumage à l'autre des LEDs, du bruit de photons naturellement présent, ainsi que du bruit thermique de la cellule fluidique, supposé identique au système de mesure précédent, imposent une limitation des performances du système d'interrogation multi-LEDs. En réalité, un quatrième paramètre doit être pris en compte dans cette caractérisation : l'instabilité en longueur d'onde de l'émission des LEDs, qui présente une influence non négligeable sur la qualité de la détermination de la position de la résonance. L'étude des fluctuations temporelles associées à cette contribution est présentée dans les paragraphes suivant.

7.2.1 Etude théorique

Avant de procéder à une caractérisation expérimentale de la précision en longueur d'onde de la source d'illumination multi-spectrale, une première étude théorique a été réalisée pour évaluer l'importance de ce paramètre vis-à-vis de la résolution de la mesure.

Cette contribution peut être évaluée de manière simple en exploitant de nouveau les données théoriques issues du calcul de Rouard : en première approximation, le bruit affectant l'illumination multi-spectrale est supposé identique pour les 5 LEDs. Dans ces conditions, le comportement du système de mesure peut être modélisé de la manière suivante :

- Pour chaque LED i ($i = 1$ à 5) du module d'illumination développé, les fluctuations en longueur d'onde peuvent être assimilées à une distribution gaussienne centrée sur la longueur d'onde d'émission théorique λ_i, et d'écart-type σ, considéré identique pour les 5 composants. Un tirage aléatoire généré sous Matlab permet alors d'obtenir un ensemble de 5 longueurs d'onde ${\lambda_i}^{Bruit}$ "bruitées" suivant cette statistique. Ce choix arbitraire constitue simplement une première approche du phénomène étudié, pour lequel une connaissance exacte de la statistique associée à chaque longueur d'onde d'émission ne semble pas indispensable.
- Le profil de résonance théorique est calculé par la méthode de Rouard : les valeurs de réflectivité ${R_i}^{\lambda}$ correspondant aux longueurs d'onde incidentes ${\lambda_i}^{Bruit}$ sont alors extraites.
- Un bruit en intensité est également introduit par un tirage aléatoire : le programme Matlab permet de générer un bruit ${B_i}^{I}$ suivant une distribution gaussienne de moyenne nulle et d'écart-type égal à 1. Les valeurs ${R_i}^{\lambda,I}$ intégrant cette contribution sont alors calculées en tenant compte du rapport signal à bruit déterminé expérimentalement, $SNR_I = 1/0.0005 = 2000$ (d'après les résultats des caractérisation effectuées dans la section 7.1).

$$ {R_i}^{\lambda,I} = {R_i}^{\lambda} + {B_i}^{I} \times \frac{{R_i}^{\lambda}}{SNR_I} \tag{7.1} $$

- Le bruit de photon est également approximé à une statistique gaussienne, de moyenne nulle et d'écart-type égal à la racine carrée de l'intensité considérée (il s'agit à présent des valeurs bruitées ${R_i}^{\lambda,I}$) multipliée par le facteur $P_{acquisition}$ introduit dans le chapitre 4 de la partie II (p.67), valant environ 7000 dans le cas présent. En effet, dans le banc étudié précédemment, utilisant un monochromateur, les plots sondes visibles sur les images de réflectivité correspondaient à une surface d'environ 41×41 pixels, soit 200×200 μm. Le montage optique exploité dans cette partie, légèrement différent, conduit à des zones d'intégration de 26×26 pixels, soit un rapport $P_{acquisition}$ de 7000 contre 11000 précédemment, pour une moyenne temporelle de 4 images et une dynamique de 18000 électrons par puits pour la caméra CCD. De la même manière que précédemment, un bruit aléatoire ${B_i}^{Photons}$ généré sous Matlab suivant une distribution gaussienne de moyenne nulle et d'écart-type égal à 1 est combiné à l'expression du bruit de photon (Équation 4.10, p.69) :

$$ {R_i}^{\lambda,I,Photons} = {R_i}^{\lambda,I} + {B_i}^{Photons} \times \frac{\sqrt{{R_i}^{\lambda,I}}}{P_{acquisition}} \tag{7.2} $$

- Dans les conditions expérimentales réelles, les variations des longueurs d'onde émises ${\lambda_i}^{Bruit}$ ne sont pas accessibles : pour cette raison, les valeurs de réflectivité bruitées ${R_i}^{\lambda,I,Photons}$ sont associées aux longueurs d'onde théoriques λ_i dans la reconstruction du profil de la résonance. Cette étape fait appel, comme précédemment, à la fonction pseudo-Lorentzienne introduite dans le chapitre 4 de la partie II (Équation 4.1, p.62).

- La position λ_{min} de la résonance plasmon ainsi déterminée, correspond aux bruits introduits par les tirages aléatoires des différentes contributions considérées. Pour atteindre une statistique significative, 10000 tirages sont effectués pour modéliser les fluctuations du signal dans les conditions expérimentales, supposées dépendantes du bruit de photons, du bruit en intensité, du bruit thermique et du bruit des longueurs d'onde d'émission.
- La résolution expérimentale attendue sur la position de la résonance plasmon est alors donnée par l'écart-type $\sigma_{\lambda,I,Photons}$ des valeurs λ_{min} générées par ces 10000 tirages.
- L'influence de la contribution du bruit en longueur d'onde de l'illumination multi-spectrale, paramètre recherché dans le cadre de cette étude, est évaluée en réitérant cette séquence de calcul pour différentes valeurs de bruit σ.
- Enfin, la contribution du bruit thermique, considérée comme indépendante des trois sources de bruit, est ajoutée par une somme quadratique aux résultats obtenus par ces modélisations :

$$\sigma(\lambda_{min}) = \sqrt{\sigma^2_{\lambda,I,Photons}(\lambda_{min}) + \sigma^2_{Thermique}(\lambda_{min})} \tag{7.3}$$

Dans le cas du système étudié, la contribution du bruit thermique $\sigma_{Thermique}$ de la cellule fluidique est estimée à 3.8 pm (annexe B).

Le résultat de cette modélisation est représenté sur la Figure 7.6. La résolution, évaluée comme l'erreur sur la détermination de la position de la résonance λ_{min}, est alors directement affectée par les quatre contributions considérées. Plus précisément, deux régimes peuvent être distingués : lorsque que l'amplitude des fluctuations en longueur d'onde est inférieure à 10 pm, la valeur limite est gouvernée par le bruit de photon, le bruit en intensité et le bruit thermique. Pour des variations plus importantes, la résolution augmente de manière linéaire avec le bruit en longueur d'onde, devenu prépondérant face aux trois autres contributions.

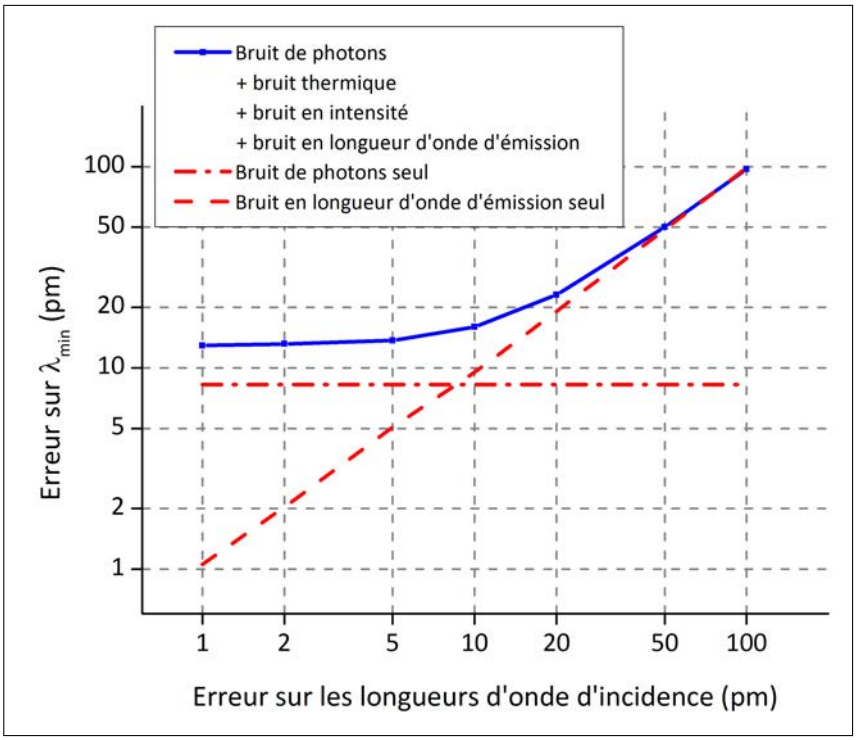


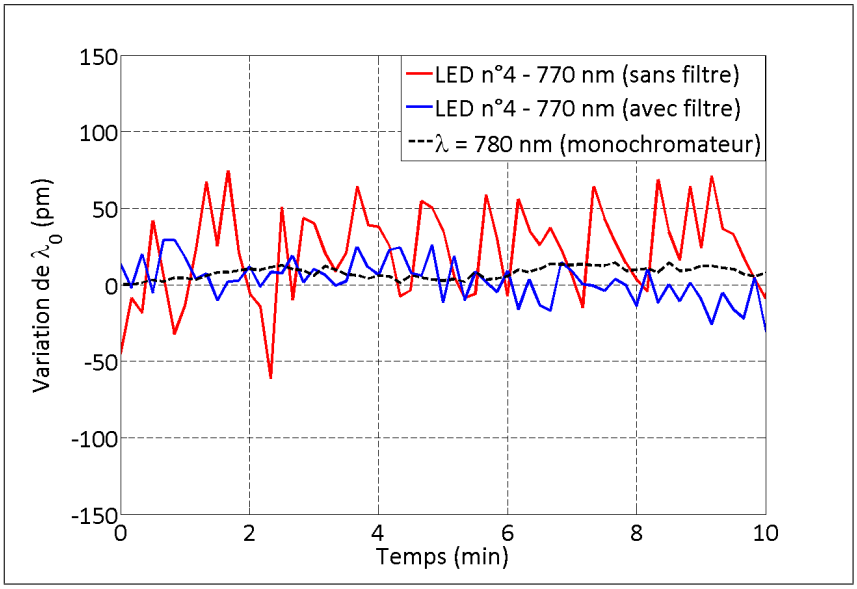
FIGURE 7.6 – **Evolution de la résolution de la mesure en interrogation multi-spectrale en fonction de l'amplitude des fluctuations des longueurs d'onde d'incidence.**

En raison de cette nette influence de la stabilité en longueur d'onde de l'émission multi-spectrale, il apparaît indispensable de caractériser en ce sens le prototype développé. Une telle étude expérimentale, présentée dans la suite de ce chapitre, met en évidence la nécessité d'une optimisation du montage pour limiter l'impact de cette contribution, et atteindre une résolution comparable à la configuration précédente, basée sur un monochromateur.

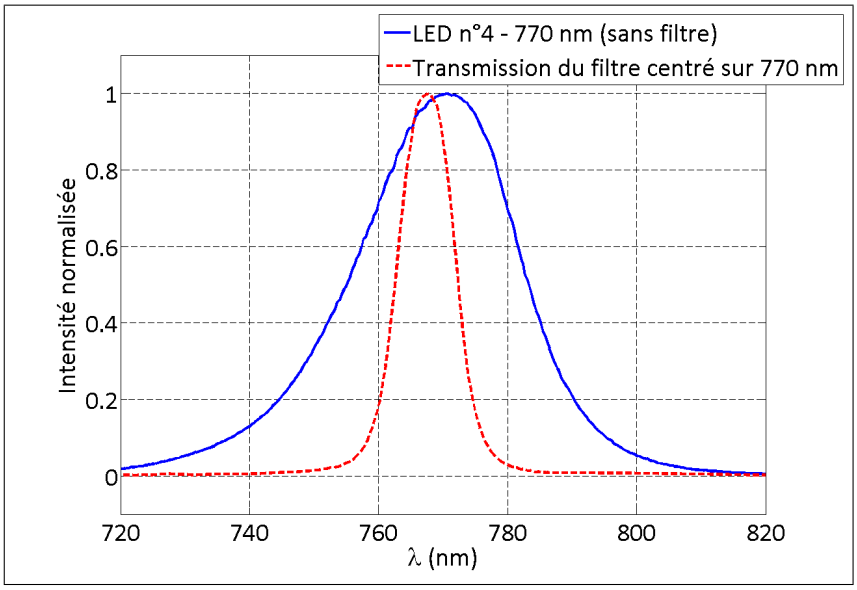
7.2.2 Etude expérimentale

La stabilité en longueur d'onde du module d'illumination peut être évaluée de manière relativement simple : en effet, seul un spectromètre présentant une gamme spectrale adaptée est nécessaire pour une telle étude. La Figure 7.7a présente l'évolution de la longueur d'onde centrale émise par une LED, mesurée en temps réel lors d'un fonctionnement normal du système en interrogation multi-spectrale, soit lors de commutations "on/off" répétées toutes les 10 s. L'acquisition des données par le spectromètre étant indépendante de cette séquence "on/off" pilotée par Labview, une cadence de mesure de 280 ms par spectre a été choisie de manière à couvrir la durée d'allumage de la LED ($\approx$ 1 s). Chaque valeur affichée correspond ainsi à la moyenne de 4 longueurs d'onde extraites sur cette période (soit 4 spectres de 280 ms $\approx$ 1 s), détectée automatiquement par post-traitement des données sous Matlab.

L'écart-type des variations obtenues, égal à 40 pm environ, est inacceptable vis-à-vis de la résolution visée : d'après les résultats des simulations théoriques, cette erreur conduirait à une résolution du même ordre de grandeur, soit 4 fois supérieure à celle obtenue dans la configuration précédente basée sur une lampe halogène couplée à un monochromateur. Une solution, proposée dans le cadre de ces développements et implémentée sur le système actuel, consiste à ajouter devant chacune des 5 LEDs un filtre interférentiel présentant une bande passante de 10 nm, centrée sur la longueur d'onde d'émission correspondante (FB740-10, FB750-10, FB760-10, FB770-10 et FB780-10, Thorlabs). Grâce à la superposition des réponses spectrales d'émission des LEDs et de transmission des filtres, illustrée par la Figure 7.7b, l'amplitude des variations peut ainsi être réduite d'un facteur 4 (Figure 7.7a), approchant la stabilité du monochromateur. Cependant, une telle implémentation induit une perte importante de flux en sortie du module d'illumination multi-spectrale, conduisant à une diminution du rapport signal à bruit pour des conditions d'acquisition équivalentes. Celle-ci peut bien entendu être compensée par une durée d'intégration plus élevée, au détriment de la cadence d'acquisition.



(a) **Stabilité en longueur d'onde de la source multi-LEDs vis-à-vis du cycle de sollicitation "on/off".** La variation de la longueur d'onde centrale d'illumination (λ_0) de la LED n°4 (770 nm) seule (en rouge) et en combinaison avec un filtre interférentiel (en bleu), est représentée au cours du temps lors d'un balayage multi-spectral cyclique continu. La stabilité du système étudié précédemment, basé sur une lampe halogène couplée à un monochromateur, est donnée (en noir) à titre de référence. Les mesures présentées ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre commercial (modèle USB2000+, Ocean Optics).



(b) **Superposition des spectres d'émission de la LED n°4 (770 nm) et de transmission du filtre FB770-10 centré sur 770 nm.** Le spectre de transmission a été calculé en divisant la réponse spectrale de l'ensemble "LED + filtre" par celle de la LED seule.

FIGURE 7.7 – **Stabilisation en longueur d'onde de la source multi-LEDs par l'utilisation de filtres interférentiels.**

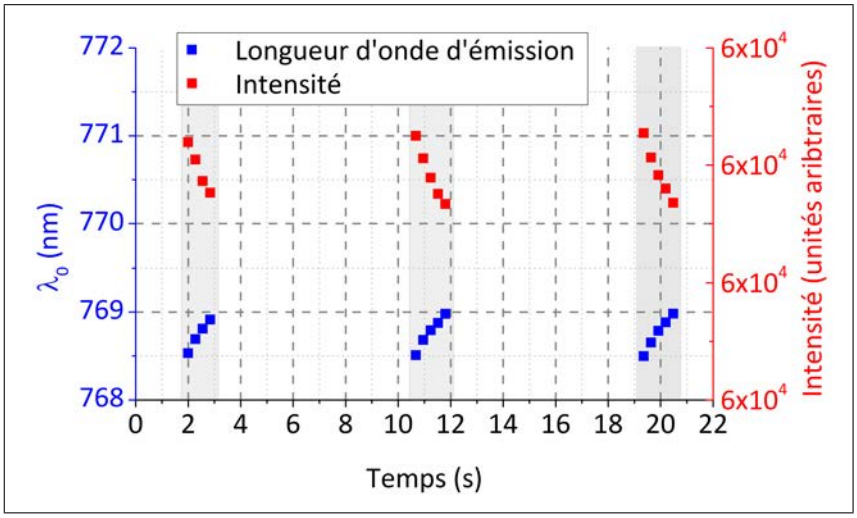
L'origine des variations présentées sur la Figure 7.7a demeure incertaine : l'ordre de grandeur observé (40 pm) correspondrait à des fluctuations du courant électrique alimentant la LED de l'ordre de 1%, égalant la dispersion des valeurs de courant d'une LED à l'autre annoncée par le fabricant (Tableau 6.3, p.105). En effet, lors de caractérisations annexes réalisées avec un spectromètre, un décalage de 80 pm vers les hautes longueurs d'onde a été observé pour une augmentation de 1 mA du courant d'alimentation (ramenée à une valeur moyenne de l'alimentation de 50 mA, une amplitude de variation de 1% conduirait ainsi à des fluctuations de 40 pm). Cependant, l'étude précédente concernant la contribution du bruit en intensité (section 7.1, p.110), a mis en évidence des dérives bien plus faibles du courant d'alimentation, de l'ordre de 0.05% .

Un effet thermique intervenant lors de la commutation "on" des LEDs pourrait être à l'origine des variations importantes en longueur d'onde observées expérimentalement : d'après les spécifications disponibles pour ces composants, un gradient de $80\,°C$ induit une diminution de 10% en intensité, de même qu'un décalage d'environ 20 nm vers les hautes longueurs d'onde de l'émission. Par conséquent, des variations de -0.05% en intensité pourraient être dues à des fluctuations de $+0.4\,°C$. Celles-ci conduiraient alors également à une instabilité de $0.4 \times 20/80 = 100$ pm en longueur d'onde, soit une valeur du même ordre de grandeur que celle déterminée précédemment.

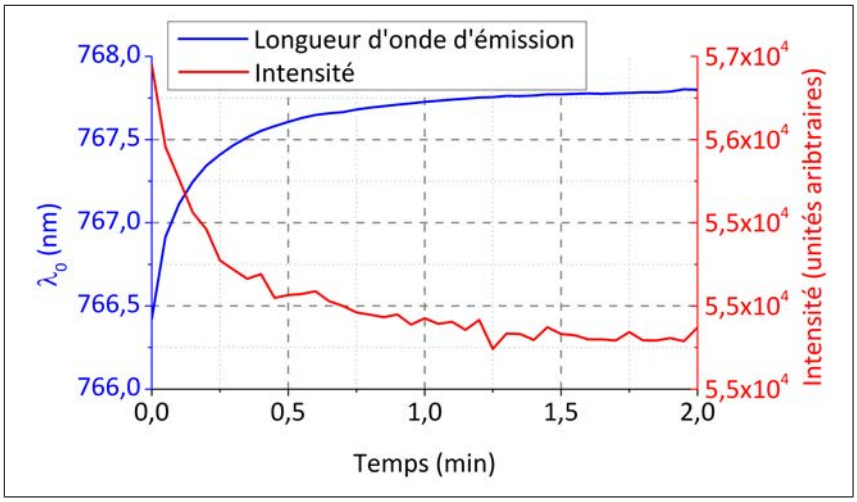
Ces considérations semblent concorder avec le comportement observé lors des commutations "on" : la Figure 7.8a présente les propriétés d'illumination, à temps court, de la LED n°4 (émettant à 770 nm), en terme de longueur d'onde et d'intensité (assimilée à la valeur maximale du spectre enregistré par le spectromètre). La diminution en intensité ainsi observée, accompagnée d'une légère augmentation de la longueur d'onde émise, traduirait ainsi une phase de chauffe rapide des LEDs à l'allumage de l'ordre de quelques degrés.

L'évolution des propriétés d'émission à plus long terme, reportée sur la Figure 7.8b, met en évidence cette phase transitoire, avant une stabilisation intervenant près de 2 min suite à l'allumage : en comparaison, l'acquisition des données, réalisée seulement 1 s après chaque commutation, a lieu par conséquent durant un régime relativement instable, d'où les fluctuations d'intensité et de longueur d'onde observées.

Comme indiqué précédemment, l'utilisation de filtres interférentiels permet de réduire l'influence de ces fluctuations indésirables de la longueur d'onde d'émission sur la précision de l'illumination multi-spectrale. Cette amélioration s'accompagne cependant d'une légère augmentation du bruit en intensité, qui atteint alors une amplitude de 0.1%. Cette observation est attribuée au produit de la transmission fixe du filtre interférentiel, par l'émission des LEDs, dont la position spectrale varie d'une commutation à l'autre. Ce décalage spectral, lissé par le filtre, se traduit alors en une variation d'intensité qui s'ajoute à celle des LEDs présente initialement. Un calcul théorique similaire à celui mené dans la section 7.1 conduit à une résolution attendue d'environ 17 pm dans ces conditions. Ainsi, en dépit de cette contribution plus importante, la précision de la mesure se trouve nettement améliorée grâce à la solution relativement simple des filtres interférentiels ; de plus, une mesure de "self-referencing" peut être aisément implémentée afin de réduire les variations d'intensité résiduelles (se reporter à la Figure 7.5, p.115).



(a) **Evolution des propriétés d'émission de la LED n°4 (770 nm) lors des sollicitations "on/off".** Les mesures réalisées durant les commutations (représentées en zones grisées) mettent en évidence une augmentation de la longueur d'onde émise (en bleu), parallèlement à une diminution de l'intensité (en rouge).



(b) **Evolution des propriétés d'émission de la LED n°4 (770 nm) à long terme après commutation "on".**

FIGURE 7.8 – **Evolution des propriétés d'émission de la LED n°4 (770 nm) à court terme, lors des sollicitations "on/off" répétées, et à long terme, après une commutation "on".** Les résultats présentés ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre commercial (modèle USB2000+, Ocean Optics).

L'émission multi-spectrale obtenue finalement avec le module d'illumination à 5 LEDs, muni de filtres interférentiels, est illustrée sur la Figure 7.9.

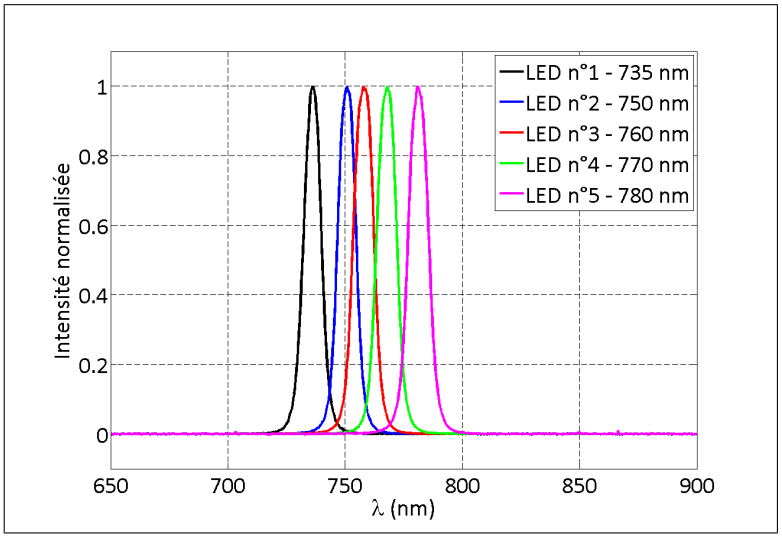


FIGURE 7.9 – **Spectres d'émission des 5 LEDs en combinaison avec un filtre interférentiel.** Les mesures présentées ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre commercial (modèle USB2000+, Ocean Optics).

Conformément aux besoins exprimés (section 6.1), le module implémenté permet de générer un peigne de 5 longueurs d'onde espacées d'environ 10 nm, avec une largeur à mi-hauteur de 10 nm également, soit des conditions d'illumination relativement proches de celles rencontrées dans la configuration basée sur un monochromateur (Tableau 7.1).

Tableau 7.1 – **Caractéristiques des 5 LEDs sélectionnées pour le module d'illumination multi-spectrale.**

Longueur d'onde mesurée sans filtre (nm)	FWHM mesurée sans filtre (nm)	Longueur d'onde mesurée avec filtre (nm)	FWHM mesurée avec filtre (nm)
737.9	23.0	736.2	7.8
751.9	25.6	750.9	8.5
760.1	30.6	758.0	9.2
770.6	27.8	767.9	9.1
782.4	28.0	781.4	9.1

La dernière étape de caractérisation du système d'illumination multi-spectrale concerne l'utilisation d'un combineur à fibres optiques : en effet, la configuration de sortie en "nid d'abeille" est relativement inhabituelle dans la littérature des biocapteurs plasmoniques. Cette particularité ne détériore pas en soi la qualité des mesures effectuées, mais nécessite néanmoins une légère correction de la procédure d'ajustement pseudo-Lorenztienne, détaillée dans le paragraphe suivant.

7.3 Effet du combineur à fibres optiques

Dans le cadre de cette étude, il peut être important de rappeler que la méthode d'interrogation multi-spectrale introduite dans ce manuscrit consiste, par définition, à mesurer le décalage spectral de la résonance, pour un angle d'incidence unique. Pour cette raison, les configurations abordées précédemment supposent toutes un point source commun aux longueurs d'onde excitatrices générant le profil de la résonance plasmon.

Or, dans le cas du système actuel, la sortie du combineur à fibres optiques utilisé (Figure 7.10a) présente une configuration en "nid d'abeille" (Figure 7.10b) : les 5 longueurs d'onde d'illumination correspondent ainsi à 5 sources lumineuses distinctes spatialement, complexifiant de ce fait l'interrogation multi-spectrale.

(a) **Photographie du combineur de fibres utilisé dans le montage d'interrogation multi-spectrale basé sur 5 LEDs.** Le combineur présenté permet de collecter la lumière issue de 7 fibres multimodes de 400 μm de coeur dans une seule fibre de sortie.

(b) **Photographie de la sortie en "nid d'abeille" du combineur de fibres utilisé dans le montage d'interrogation multi-spectrale basé sur 5 LEDs.** Les 7 fibres combinées sont associées à des points sources distincts en sortie.

FIGURE 7.10 – **Vue d'ensemble du combineur de fibres utilisé pour la collection de l'illumination multi-spectrale.**

De ce fait, cette implémentation présente une différence significative vis-à-vis de celles plus communément rencontrées dans la littérature : en effet, la séparation spatiale des points sources en sortie de la fibre unique induit un décalage angulaire des 5 faisceaux illuminant la surface de la biopuce. De manière concrète, cette dispersion se traduit par des positions angulaires, et donc également spectrales, des profils de résonance différentes de celles attendues en théorie.

La Figure 7.11 illustre le décalage ainsi observé pour les conditions de résonances des LEDs n°1 et n°3, émettant respectivement à des longueurs d'onde de 735 nm et 760 nm. Les profils plasmoniques angulaires enregistrés pour ces deux sources spectrales, représentés en traits pleins, correspondent en réalité aux conditions de résonance de deux longueurs d'onde "effectives" de 721 nm et 755 nm (tracées en traits pointillés longs, d'après les données recueillies avec le montage utilisant le monochromateur). Les profils des longueurs d'onde incidentes "réelles", 735 nm et 760 nm, en traits pointillés courts, sont quant à eux décalés de ceux des deux LEDs considérées.

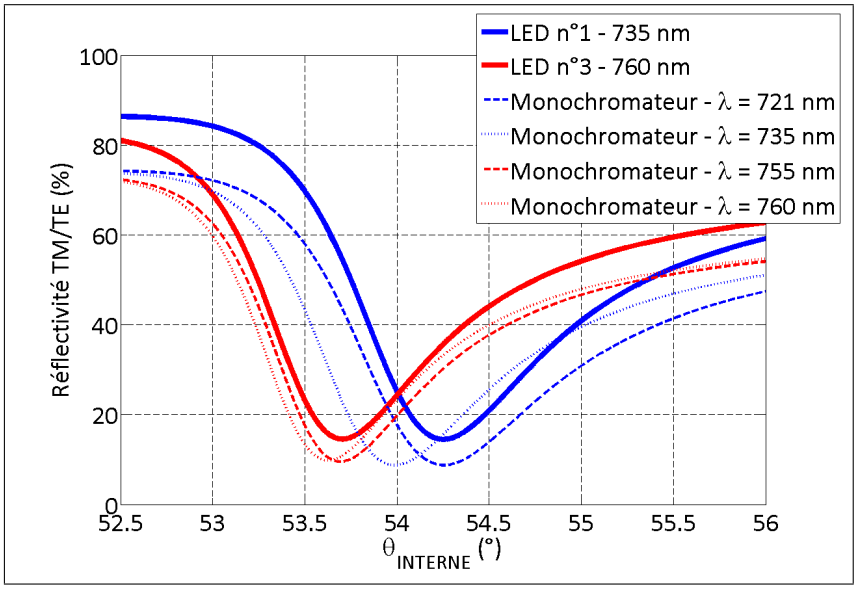


FIGURE 7.11 – **Profils plasmoniques angulaires enregistrés pour les LEDs n°1 (735 nm) et n°3 (760 nm).** Les données recueillies sur le banc basé sur une lampe halogène couplée à un monochromateur, pour les deux longueurs d'onde réelles (735 nm et 760 nm) ainsi que pour deux longueurs d'onde "effectives" correspondant aux conditions de résonance observées (721 nm et 760 nm), sont données en référence.

Le décalage angulaire des conditions de résonances, induit par la séparation spatiale des différents points sources, revient à considérer que le couplage plasmon est réalisé par 5 longueurs d'onde "effectives", qui diffèrent des longueurs d'onde d'émission des LEDs (Tableau 7.2). Celles-ci ont été déterminées de manière théorique, par la recherche des longueurs d'onde incidentes permettant de reproduire les positions des profils de résonance angulaires observés.

Tableau 7.2 – **Caractéristiques des 5 LEDs sélectionnées pour le module d'illumination multi-spectrale.**

Longueur d'onde mesurée avec filtre (nm)	Longueur d'onde "effective" (nm)
736.2	721
750.9	741
758.0	755
767.9	777
781.4	797

Ces longueurs d'onde effectives doivent impérativement être prises en compte lors de l'ajustement pseudo-Lorentzien des valeurs de réflectivité discrètes enregistrées en interrogation multi-spectrale : sans cela, le traitement fournit des résultats erronés, dus à la supposition fausse d'une condition de résonance angulaire unique. L'importance de cette correction est illustrée sur la Figure 7.12 : une séquence d'injections de solutions de sucrose, présentant des indices optiques variant de 5×10^{-5} RIU à 5×10^{-3} RIU, a été traitée en considérant soit les longueurs d'ondes

réelles ($\lambda_{réelles}$), mesurées expérimentalement, soit celles effectives ($\lambda_{effectives}$) déterminées par comparaison avec le modèle théorique issu de la méthode de Rouard.

A première vue, ni la précision ni la linéarité ne sont affectées par le choix de l'un ou l'autre des deux traitements. Seule l'exactitude de la mesure est nettement améliorée par l'utilisation des longueurs d'onde effectives : les résultats sont alors comparables à ceux obtenus avec un monochromateur (l'écart observé pour la dernière solution injectée est attribué au fait que les deux expériences ont été réalisées indépendamment l'une de l'autre, avec des solutions de sucrose différentes : une erreur de manipulation est susceptible d'avoir conduit à des variations d'indice différentes).

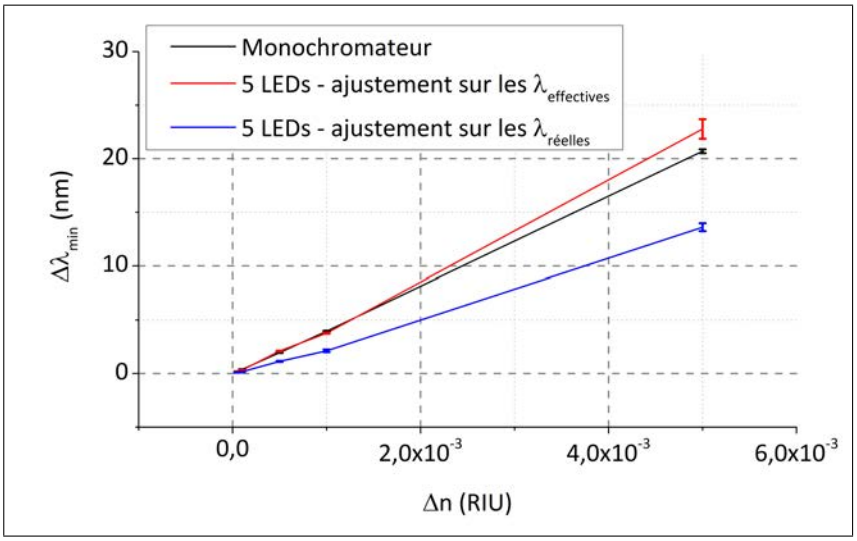


FIGURE 7.12 – **Influence de la dispersion multi-angulaire sur la précision des mesures en interrogation multi-spectrale.** Dans le cadre de ces expériences, les réponses de 100 zones de 41×41 pixels réparties aléatoirement à la surface d'une biopuce ont été enregistrées en interrogation multi-spectrale à 5 LEDs, face à des sauts d'indice croissants. Les données ainsi obtenues ont été traitées suivant la procédure d'ajustement pseudo-Lorentzien introduite précédemment, prenant en compte soit les longueurs d'ondes réelles ($\lambda_{réelles}$) émises par les LEDs (en bleu), soit celles effectives ($\lambda_{effectives}$) estimées de manière théorique (en rouge). Ces résultats ont été confrontés à des mesures similaires réalisées sur le banc basé sur une lampe halogène couplée à un monochromateur (en noir), défini comme référence.

L'influence de conditions d'incidence angulaire multiples sur le peigne de longueurs d'onde effectif obtenu est illustrée de manière claire dans le Tableau 7.2. Cette observation permet d'envisager des mesures analogues en interrogation multi-angulaire, basées sur l'utilisation de 5 LEDs identiques en entrée du combineur, au lieu de 5 longueurs d'onde différentes. Bien qu'astucieuse, cette solution n'a pas été explorée plus en détail dans cette partie.

Chapitre 8

Validation du système d'interrogation multi-LEDs et perspectives

Sommaire

8.1 Des performances en biodétection satisfaisantes 127
8.1.1 Fonctionnalisation et protocole expérimental 128
8.1.2 Résultats des mesures de cinétiques ADN-ADN 129
8.2 Et des améliorations possibles ? 130
8.2.1 Stabilité en température de la source 130
8.2.2 Collection de l'illumination multi-spectrale 133

Le domaine des biocapteurs plasmoniques présente à l'heure actuelle une grande diversité : le nombre et la variété des méthodes d'interrogation disponibles permettent ainsi d'offrir des solutions concrètes face à des demandes toujours plus exigeantes en matière de biodétection. Cependant, seules quelques configurations privilégiées sont réellement représentées au niveau industriel.

La phase d'optimisation conduisant à ce niveau de performance compétitif ne peut être réalisée sans une connaissance exacte des sources de limitation possibles du système implémenté : pour cette raison, une caractérisation poussée a été menée précédemment afin d'identifier les défauts majeurs du module d'illumination multi-spectrale. Des solutions relativement simples ont permis d'atteindre des performances comparables au système précédent basé sur une lampe halogène couplée à un monochromateur : la mise en application présentée dans ce chapitre vise à valider le prototype développé tout au long de cette partie dans le cadre d'une utilisation en biodétection. Cette démonstration ne marque cependant pas l'aboutissement de ces travaux d'instrumentation : des améliorations peuvent encore être envisagées afin de renforcer le potentiel industriel de la nouvelle méthode d'interrogation multi-spectrale.

8.1 Des performances en biodétection satisfaisantes

La validation finale du prototype développé dans cette partie a été réalisée dans le cadre des travaux précédemment cités, portant sur le diagnostic génétique de la mucoviscidose [27]. Cette étape avait été effectuée lors de la caractérisation du banc muni d'un monochromateur (chapitre 5, p.87), et a été répétée avec le module multi-LEDs dans un but de comparaison des deux systèmes. En particulier, une grande importance a été attachée au caractère multiplexe, constituant le

principal avantage revendiqué par les systèmes de SPRI conventionnels : les paragraphes suivants rendent compte des performances affichées par l'interrogation multi-spectrale à 5 LEDs dans ce cadre.

8.1.1 Fonctionnalisation et protocole expérimental

Le cas de la mutation ponctuelle intervenant sur le gène M470v a été considéré dans cette étude. Pour cela, deux séquences sondes, notées respectivement Pr_M et Pr_W (en référence à *Probe with Mutated sequence* dans le cas "muté" et *Probe with Wild sequence* dans le cas "sain") ont été déposées à la surface d'une biopuce préalablement fonctionnalisée suivant le protocole de chimie cystéamine cité précédemment [96]. Les conditions de dépôt sont restées quasiment inchangées vis-à-vis des expériences décrites dans le chapitre 5 (p.87), avec un spotteur commercial, muni d'une pointe creuse de 200 μm de diamètre, programmé pour réaliser une matrice de 25 plots à une concentration optimale de 5 μM pour les deux solutions sondes étudiées. De la même manière, des plots de références, formés à partir d'une solution ne contenant pas de biomolécules sondes, ont été déposés en parallèle sur la même biopuce.

La séquence cible a également été choisie centrée sur la mutation responsable de la mucoviscidose : notée Ta_M (soit *Target with Mutated sequence* en anglais), elle affiche une complémentarité parfaite vis-à-vis de la séquence sonde mutée Pr_M, et partielle vis-à-vis de celle saine Pr_W. De la même manière que précédemment, une séquence de calibration, Ta_{Cal}, complémentaire d'une partie commune aux deux sondes étudiées, a été injectée au début des expériences afin de corriger les différences de concentration de surface entre les plots-sondes [27], susceptibles d'induire une dispersion sur les données enregistrées par la suite (se reporter à la Figure 5.5, chapitre 5, p.90).

Une fois l'équilibre de cette réaction atteint, la solution Ta_M a été introduite à son tour dans le système fluidique. Les deux solutions cibles Ta_{Cal} et Ta_M ont été préparées à des concentrations respectives de 0.1 μM et 0.2 μM dans une solution de PBS 3×, utilisée comme tampon de course lors du suivi en temps réel de ces interactions. Dans le cadre de ces expériences, le débit des injections a été fixé à 50 μL/min.

Le Tableau 8.1 ci-dessous résume les informations relatives aux réactifs utilisés.

A ce stade, il est important de souligner le fait que les deux séquences sondes étudiées, Pr_M et Pr_W, ne diffèrent que par un seul nucléotide. Comme le mettent en évidence les résultats présentés dans le paragraphe suivant, cette mutation ponctuelle est aisément discernée lors de l'injection des cibles Ta_M.

Tableau 8.1 – **Détail des produits utilisés lors des expériences de biodétection.**

Dénomination	Description	Détail
Pr_M	Séquence ADN sonde comprenant une biotine en extrémité 5´	Biotine - 5´ TTTTTTTTTTGACCGG-TATGCGTTCTAATGGTGATT 3´
Pr_W	Séquence ADN sonde comprenant une biotine en extrémité 5´	Biotine - 5´ TTTTTTTTTTGACCGG-TATGCGTTCTAATGATGATT 3´
Ta_{Cal}	Séquence ADN cible servant à normaliser la dispersion de concentration des plots sondes	5´ CGCGCGCATACCGGTCAAAA 3´
Ta_M	Séquence ADN cible	5´ CTCCCATAATCACCATTAGAAGTGA 3´
PBS 3×	Tampon phosphate 30 mM	[NaCl] = 0.460 M et pH = 6.9

8.1.2 Résultats des mesures de cinétiques ADN-ADN

Le résultat de l'interrogation multi-spectrale réalisée suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent est représenté sur la Figure 8.1. Pour plus de clarté, seules les réponses d'une dizaine de plots de chaque sonde déposée, après soustraction des références, sont tracées.

Deux phases distinctes peuvent être observées : la première, correspondant à l'association des séquences cibles et sondes (t $<$ 15 min), met en évidence une différence de cinétique de l'hybridation entre les séquences parfaitement et partiellement complémentaires (tracées en bleu et rouge respectivement). La phase de dissociation, intervenant après le rinçage par le tampon PBS 3× (t $>$ 15 min), souligne la faiblesse de l'interaction Ta_M-Pr_W.

Les performances du système d'interrogation multi-spectrale à 5 LEDs, illustrées sur la Figure 8.1, semblent être en parfait accord avec les prévisions théoriques. D'une amplitude de 20 pm, la résolution affichée reste en effet légèrement supérieure à celle atteinte dans une configuration plus complexe, utilisant un monochromateur (partie II). Cette valeur pourrait cependant être réduite par une augmentation du nombre d'images moyennées par la caméra CCD, au détriment de la cadence d'acquisition.

Une optimisation plus efficace serait de considérer directement le phénomène limitant, à l'origine de ces observations : les fluctuations thermiques intervenant lors de la commutation "on" des LEDs, induisant une dérive des longueurs d'onde émises. Le paragraphe suivant vise ainsi à proposer quelques pistes d'amélioration possibles pour le développement d'un système de SPR multi-spectral plus efficace, compact et bas coût.

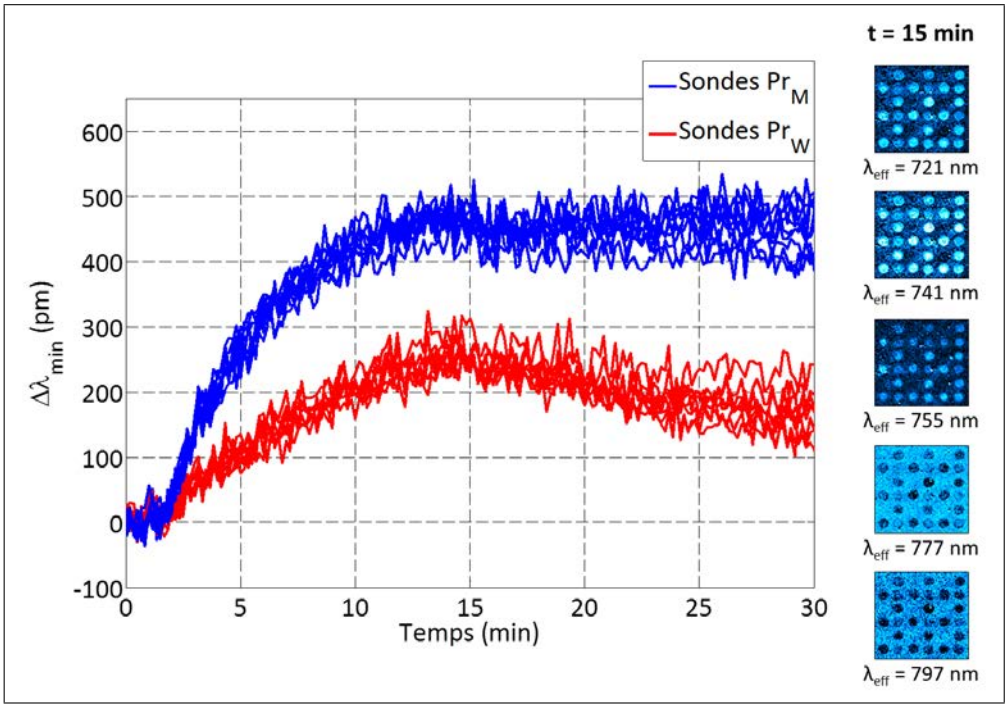


FIGURE 8.1 – **Cinétique de l'interaction entre les cibles Ta_M et les sondes Pr_M (en bleu) et Pr_W (en rouge) dans une solution de tampon PBS 3×, analysée avec le prototype d'interrogation multi-spectrale à 5 LEDs.** Pour ne pas surcharger la figure, seules les réponses d'une dizaine de plots de chaque famille sonde sont représentées.

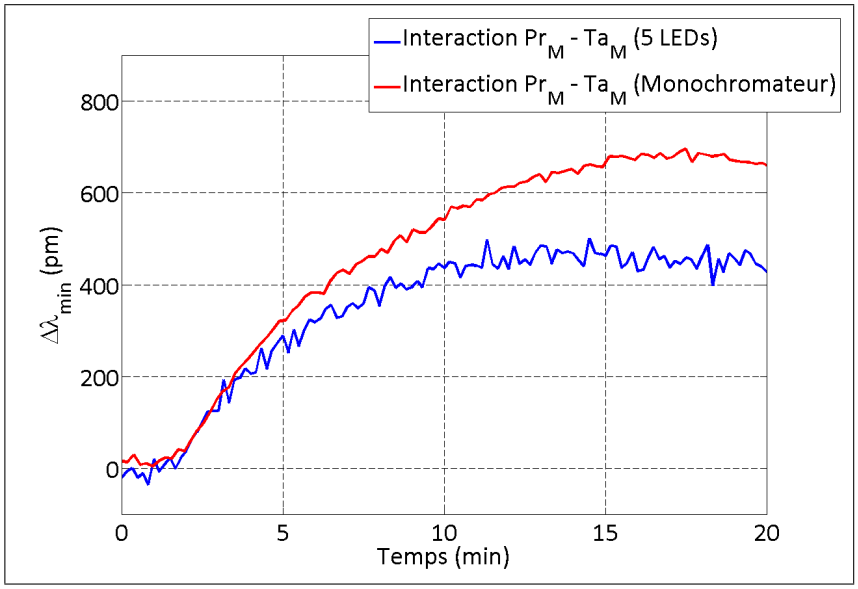
8.2 Et des améliorations possibles ?

Les caractérisations menées précédemment dans le chapitre 8 ont permis d'identifier deux aspects limitants de la configuration multi-spectrale adoptée : d'une part, l'instabilité thermique de la source à l'allumage, induisant un bruit supplémentaire sur les mesures effectuées, et d'autre part la dispersion multi-angulaire due au combineur de fibres utilisé, faussant l'exactitude des mesures effectuées.

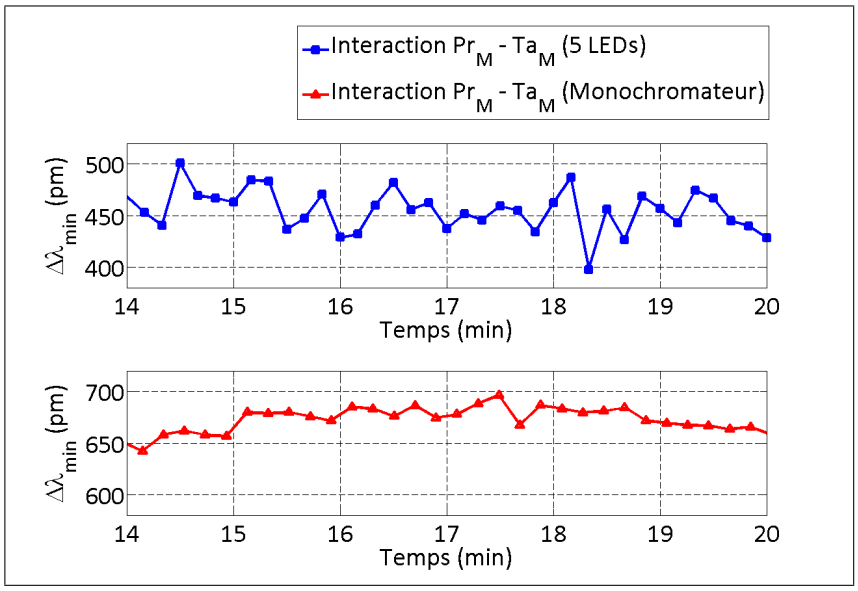
Bien que les performances obtenues restent relativement satisfaisantes, ces deux défauts indésirables pourraient être problématiques dans le cadre d'application plus complexes (partie IV). Pour cette raison, quelques recherches ont été effectuées en vue de proposer des solutions simples et efficaces : les paragraphes suivants résument les résultats de cette étude.

8.2.1 Stabilité en température de la source

Les données expérimentales présentées dans le paragraphe précédent (Figure 8.1) permettent une comparaison directe des performances du module multi-LEDs implémenté avec celles du banc muni d'un monochromateur, offrant une meilleure qualité d'illumination multi-spectrale. En effet, la même interaction $Pr_M - Ta_M$ a été analysée lors de la caractérisation de ces deux systèmes. La Figure 8.2a présente les cinétiques extraites en PBS 3× lors de ces séries de mesures. Les fluctuations du signal en termes de décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$ du minimum de réflectivité affichent un écart-type d'environ 20 pm dans le cas du nouveau dispositif d'illumination, contre 10 pm pour le monochromateur (Figure 8.2b) : cette différence est imputable à un effet thermique présent lors de l'allumage des LEDs.



(a) **Cinétique de l'interaction $Ta_M - Pr_M$ enregistrée en PBS 3× avec les bancs "monochromateur" et "multi-LEDs", recueillie sur un plot sonde de chaque biopuce.**



(b) **Amplitude des fluctuations de signal en interrogation multi-spectrale cinétique dans les systèmes "monochromateur" et "multi-LEDs", recueillie sur un plot sonde de chaque biopuce.** Les données présentées ont été extraites sur une cinétique d'interaction $Ta_M - Pr_M$ enregistrée en PBS 3×.

FIGURE 8.2 – **Comparaison de la qualité de mesure en interrogation spectrale cinétique des bancs de mesure SPR étudiés.** Les données présentées correspondent à une même interaction ADN-ADN, analysée de manière indépendante sur deux biopuces distinctes, par les deux systèmes implémentés : le banc muni d'une lampe halogène couplée à un monochromateur, et celui à 5 LEDs.

Cette instabilité a imposé l'utilisation de filtres interférentiels permettant de lisser ces fluctuations, mais induisant également une perte importante de l'intensité du faisceau incident sur

la biopuce. Une meilleure régulation de la température des LEDs permettrait de s'affranchir de l'usage de filtres interférentiels et augmenter de manière significative le rapport signal à bruit, offrant ainsi une meilleure résolution de la mesure en interrogation multi-spectrale.

Dans cette optique, une expérience relativement simple a été menée, visant à améliorer la dissipation thermique des LEDs. Un radiateur en aluminium, excellent conducteur de chaleur et matériau à bas coût, a été utilisé en combinaison avec la LED n°4, émettant à 770 nm (Figure 8.3).

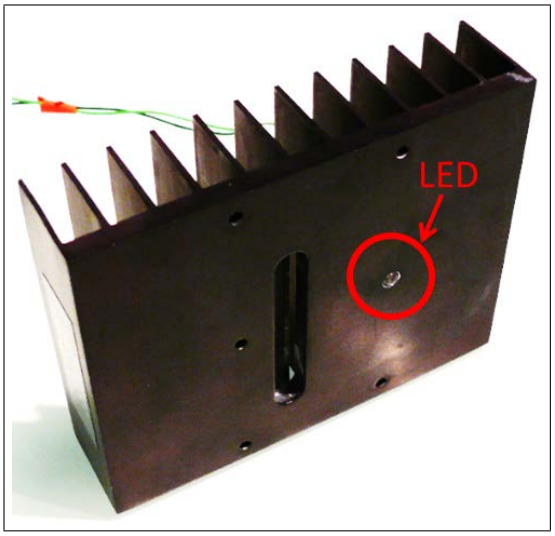
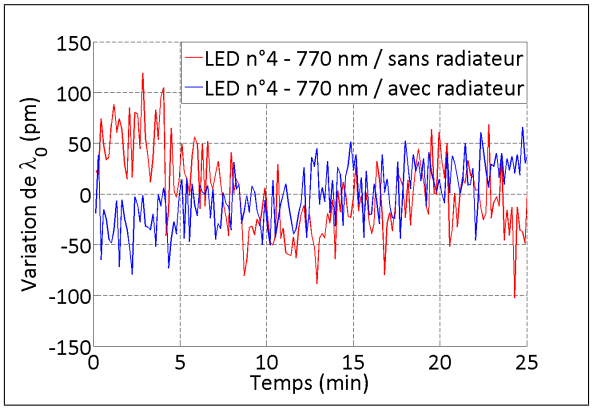


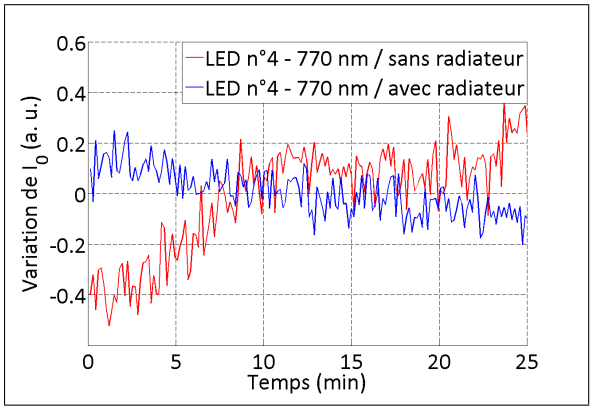
FIGURE 8.3 – **Photographie du dispositif testé pour améliorer la stabilité thermique des LEDs à l'allumage.** Un trou d'un diamètre de 5 mm a été percé dans un radiateur en alluminium, permettant d'insérer une LED enduite de pâte thermique pour favoriser la dissipation de la chaleur émise lors de l'allumage.

De la même manière que précédemment, les caractéristiques de l'émission lors d'un fonctionnement normal en interrogation multi-spectrale ont été enregistrées en temps réel à l'aide d'un spectromètre. L'évolution de la longueur d'onde centrale et de l'intensité ainsi mesurées est représentée sur la Figure 8.4.

L'observation des résultats présentés ne permet malheureusement pas de dégager une influence notable sur les fluctuations induites par les sollicitations "on/off" sur la longueur d'onde ou l'intensité émises. Cependant, une nette stabilisation des dérives à plus long terme peut être relevée. Bien qu'imparfaite, cette première tentative d'optimisation laisse espérer une amélioration possible des performances du système d'illumination multi-spectrale, par une stabilisation thermique plus efficace que celle présentée dans ce paragraphe.



(a) **Evaluation de la stabilisation en longueur d'onde de la source multi-LEDs par le radiateur en aluminium.** La variation de la longueur d'onde centrale d'illumination (λ_0) de la LED n°4 (770 nm) seule (en rouge) et encastrée dans un radiateur en aluminium (en bleu), est représentée en fonction du temps lors d'un balayage multi-spectral continu.



(b) **Evaluation de la stabilisation en intensité de la source multi-LEDs par le radiateur en aluminium.** La variation de l'intensité émise (I_0) par la LED n°4 (770 nm) seule (en rouge) et encastrée dans un radiateur en aluminium (en bleu), est représentée en fonction du temps lors d'un balayage multi-spectral continu.

FIGURE 8.4 – **Influence de la stabilisation de l'émission de l'illumination multi-spectrale par l'utilisation d'un radiateur en aluminium.** Les mesures présentées ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre commercial (modèle USB2000+, Ocean Optics).

Une meilleure régulation de la source de courant pourrait également être envisagée, afin de limiter le régime d'établissement transitoire (Figure 7.8a) supposé responsable des fluctuations de l'émission observées. Des mesures préliminaires de caractérisation, effectuées à l'aide d'un oscilloscope dans le but de déterminer les variations du courant d'alimentation lors des commutations répétées, n'ont malheureusement pas abouti à des résultats concluant.

8.2.2 Collection de l'illumination multi-spectrale

L'homogénéité de l'illumination multi-spectrale, en termes de dispersion angulaire, a été identifiée comme étant insatisfaisante lors des expériences de caractérisation précédentes. Cependant, seule une légère correction du traitement des données s'est avérée nécessaire pour tenir compte de ce défaut lors de l'ajustement pseudo-Lorentzien des valeurs de réflectivités discrètes. Cependant, certaines applications nécessitant un contrôle particulièrement précis des longueurs d'onde d'interrogation, il apparaît utile de disposer d'une autre fibre d'illumination, ne présentant pas ce problème.

La dispersion multi-angulaire du module implémenté, mise en évidence précédemment, provient de la configuration en "nid d'abeille" en sortie du combineur de fibres optiques, permettant de collecter les 5 faisceaux issus des 5 LEDs. Une solution alternative peut être proposée par l'utilisation d'un coupleur à fibres fusionnées, qui présente l'avantage d'un point source unique en sortie du coupleur et donc, de la même manière, un point source unique en entrée de la configuration de Kretschmann. Un tel dispositif, présenté sur la Figure 8.5 a ainsi été testé.

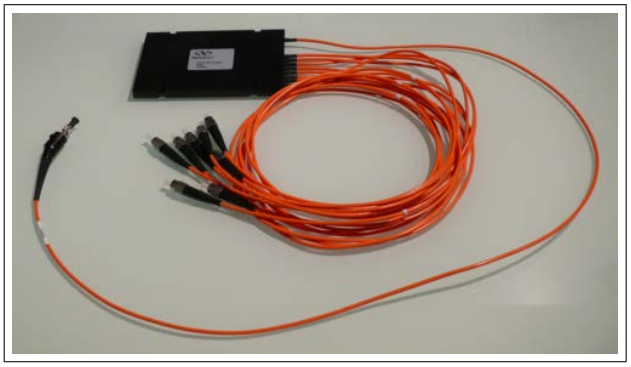


FIGURE 8.5 – **Photographie du coupleur à fibres fusionnées testé dans le cadre de l'optimisation du module d'illumination multi-spectrale.** Le modèle F-CPL-M18850 (Newport) permet de combiner jusqu'à 8 fibres multimodes en une seule fibre de sortie, pour une gamme spectrale recommandée de 800 nm à 1600 nm.

Bien que dans un tel montage, le problème de la dispersion angulaire ne se pose évidemment plus, une perte importante de flux est observée : en effet, le faible diamètre des fibres disponibles (62.5 μm) ainsi que les pertes d'insertion importantes, allant jusqu'à 11.5 dB, conduisent à des temps d'intégration du signal de plusieurs secondes par image spectrale : cette durée peut par conséquent s'avérer problématique pour des applications nécessitant le suivi de cinétiques rapides.

Conclusion et perspectives

Face à la compétitivité des systèmes de SPRI actuels, l'interrogation multi-spectrale doit relever le défi d'allier des performances avantageuses à une implémentation "user-friendly", compacte et bas coût. De ce point de vue, la configuration initiale, exploitant une lampe halogène couplée à un monochromateur, semble peu propice à s'imposer sur le marché des biocapteurs plasmoniques.

Ces considérations pratiques ont motivé le développement d'un module d'illumination spécifique, destiné à un balayage spectral de 5 longueurs d'onde incidentes à la surface d'une biopuce. En raison des exigences précises attendues en termes de résolution, des caractérisations poussées ont été effectuées afin d'évaluer la stabilité de l'illumination multi-spectrale, paramètre déterminant vis-à-vis de la qualité de mesure visée. Cette étude, menée dans le chapitre précédent, a conduit à des optimisations relativement simples, permettant d'atteindre les performances désirées : la validation du système dans le cadre d'une expérience de biodétection basée sur des interactions ADN-ADN a marqué l'aboutissement de ces travaux.

Développée récemment, la nouvelle méthode d'interrogation multi-spectrale doit encore faire ses preuves face aux configurations actuelles, en particulier dans des situations de détection plus complexes que celles considérées jusqu'à présent. Pour cette raison, la dernière partie de ce manuscrit aborde de manière plus spécifique les diverses applications susceptibles de tirer parti des performances intéressantes démontrées en termes de robustesse, précision et multiplexage des données.

Quatrième partie

Applications et perspectives

Chapitre 9

Détection de marqueurs potentiels du cancer en milieu complexe

Sommaire

9.1 Le cancer et le rôle du système ubiquitine-protéasome 140
9.1.1 La détection des marqueurs du cancer 140
9.1.2 Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome 142
9.2 Approche expérimentale de la détection de marqueurs intervenant dans le système ubiquitine-protéasome 144
9.2.1 Réactifs et fonctionnalisation 144
9.2.2 Conditions expérimentales en interrogation multi-spectrale par SPR 147
9.2.3 Déroulement de l'étude 148
9.3 Résultats 149
9.3.1 Détection des antigènes en tampon phosphate 149
9.3.2 Détection des antigènes en sérum dilué 156
9.3.3 Régénération des complexes antigène/anticorps 163
9.4 Conclusion des expériences de détection en milieu complexe et perspectives 167

La détection en milieu complexe constitue, encore à l'heure actuelle, un véritable défi pour les biocapteurs plasmoniques. Dans ce domaine particulier, une mesure rapide, précise et directe, sans purification ou amplification du matériel biologique à détecter, est chose relativement peu aisée. En effet, à la faible concentration de l'antigène recherché s'ajoute également la perturbation de la solution contenant les cibles, susceptible d'interagir de manière non-spécifique avec les molécules sondes et de s'adsorber sur la surface de la biopuce, rendant difficile l'interprétation des résultats obtenus.

Les applications réelles tel que le contrôle anti-dopage, ou encore le diagnostic, font intervenir de tels milieux : parmi les plus fréquemment rencontrés, le sérum, l'urine, les fluides dont la composition n'est pas maîtrisée et varie fortement d'un échantillon à l'autre. Pour cette raison, des stratégies d'optimisation, orientées vers une passivation de la surface et une dilution de l'échantillon à analyser, parallèlement à une amplification du signal spécifique par détection indirecte, sont généralement adoptées.

Suite aux performances prometteuses obtenues lors des travaux exposés dans les parties précédentes, des applications plus complexes ont été envisagées pour une validation en conditions réelles de la méthode d'interrogation multi-spectrale développée. Le premier chapitre de cette

partie, consacré à la détection de marqueurs potentiels du cancer dans du sérum, met ainsi en évidence les contraintes expérimentales liées à la spécificité de l'interaction cible-sonde dans une analyse directe, privilégiée dans le cadre de ces travaux. En effet, la difficulté de la distinction des interactions spécifique et non spécifique conduit fréquemment à l'utilisation de méthodes indirectes, telles que l'amplification dans une configuration "en sandwich", ou encore par compétition ou inhibition.

Un format de détection directe, sans marquage, en milieu complexe, peut cependant être réalisé, grâce à l'utilisation combinée d'une autre technique apportant la spécificité recherchée. Cette problématique fait l'objet du second chapitre de cette partie, consacré au projet interdisciplinaire ANR PIRANEX destiné au développement d'un nouvel instrument bimodal alliant la biodétection par SPRI à l'identification par spectroscopie Raman.

9.1 Le cancer et le rôle du système ubiquitine-protéasome

Le cancer représente actuellement la première cause de mortalité chez l'homme, atteignant près de 30% des décès recensés [100]. Caractérisée par une multiplication cellulaire anormalement importante au sein du corps humain, cette pathologie peut être causée par une combinaison néfaste de facteurs innés (tels qu'une prédisposition génétique), ou des facteurs comportementaux et environnementaux, tel que le tabagisme, le régime alimentaire, l'exposition au soleil ou la pollution. La complexité des mécanismes déclencheurs rend difficile le diagnostic à un stade précoce, dans le cas le plus commun, où aucune prédisposition particulière ne justifie un suivi médical régulier. Or, une prise en charge rapide offre une chance non négligeable d'endiguer l'évolution de la maladie en évitant la migration des cellules tumorales et la formation de métastases, permettant un traitement plus ciblé, et par conséquent moins lourd, pour le patient.

La compréhension des comportements à l'échelle protéique, régulant les fonctions cellulaires primaires, telles que la différenciation et l'apoptose, constitue une voie de recherche active dans le domaine de l'oncologie. En particulier, l'identification de biomolécules spécifiques de cette prolifération anormale de cellules "du soi" représente un défi à la fois pour un diagnostic précis, mais également pour un traitement médicamenteux ciblé, et par conséquent plus efficace. A ce jour, seuls quelques "marqueurs" du cancer ont été validés par l'administration américaine *Food and Drug Administration*, connue sous l'acronyme *FDA*, en vue de ces utilisations. De nombreux marqueurs potentiels font, à l'heure actuelle, l'objet de caractérisations étendues : le paragraphe suivant en résume les principaux rencontrés.

9.1.1 La détection des marqueurs du cancer

Maladie du génome, le cancer fait intervenir une mutation, héritée ou induite par l'environnement, responsable d'une surexpression de facteurs oncogènes, codant pour la prolifération cellulaire, ou à l'inverse, d'une inhibition des fonctions régulatrices de l'organisme. Ces deux causes conduisant à une croissance anormales de cellules dites "du soi", le diagnostic associé à cette pathologie est relativement peu aisé.

La nécessité d'une détection ciblée a motivé la recherche de "marqueurs" du cancer, soit des espèces biomoléculaires surexprimées par l'organisme atteint, témoins de cette activité cellulaire incontrôlée. Ces biomarqueurs pouvant être présents à des taux anormaux bien avant la formation de tumeurs détectables, cette approche ouvre ainsi la voie à un diagnostic plus précoce de la maladie. De manière générale, en raison de la dispersion des concentrations présentées d'un individu à l'autre, une combinaison de plusieurs antigènes doit être traquée pour une évaluation spécifique et précise de la pathologie.

Grâce à la compréhension des mécanismes tumoraux, bon nombre de marqueurs potentiels ont pu être identifiés (Tableau 9.1) : le cas du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) en constitue un exemple concret [101]. En effet, les besoins d'oxygénation et d'alimentation liés au développement du cancer conduisent de manière générale à une production importante de ces protéines favorisant la vascularisation : de ce fait, la formulation de molécules anti-angiogéniques constitue une voie thérapeutique ciblée particulièrement intéressante. De même, la mutation de la protéine p53 est également très représentée : anti-oncogène, à l'inverse du VEGF, elle devient inactive, voir oncogène sous forme mutée. N'assurant plus sa fonction de régulation, elle peut également favoriser une prolifération cellulaire anormale [102]. Stabilisée par cette anomalie, la protéine p53 tend alors à s'accumuler dans l'organisme atteint : son dosage constitue un indicateur utile dans le cadre du dépistage du cancer. De manière semblable, un taux stérique élevé de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), impliqué dans l'adhésion cellulaire, conduit dans certains cas à un diagnostic positif [103].

D'autres marqueurs potentiels, plus spécifiques, sont également rencontrés, tels que le récepteur des facteurs de croissance épidermiques humains (HER2), associé au cancer du sein [104]. Protéine transmembranaire intervenant dans la signalisation des mécanismes intracellulaires à l'origine de la prolifération cellulaire, sa surexpression est généralement de mauvais pronostic pour les patients. Chez l'homme, le dosage de l'antigène prostatique spécifique (PSA) permet le dépistage du cancer le plus fréquent, celui de la prostate [105].

Tableau 9.1 – **Exemples de marqueurs potentiels de cancers.**

Désignation	**Nom complet**	**Fonction**	**Cancer associé**
VEGF	*Vascular endothelial growth factor* ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	Protéine favorisant la néoangiogénèse (vascularisation des tumeurs)	Divers cancers associés (pancréas, ovaires, poumon, rein...)
p53		Facteur de transcription régulant l'apoptose et la prolifération cellulaire	50% des cancers présentent une protéine p53 mutée
CEA	*Carcinoembryonic antigen* ou antigène carcino-embryonnaire	Glycoprotéine intervenant dans l'adhésion cellulaire	Cancer colorectal
HER2	*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* ou récepteur des facteurs de croissance épidermiques humains	Protéine favorisant la prolifération cellulaire	Cancer du sein
PSA	*Prostate-Specific Antigène* ou antigène prostatique spécifique	Protéine sécrétée par les cellules épithéliales de la prostate	Cancer de la prostate

Ces quelques exemples constituent une infime proportion des biomarqueurs potentiels identifiés à l'heure actuelle. De manière similaire, la plupart résultent de l'amplification d'un gène muté, donnant lieu à la surproduction d'une protéine non-fonctionnelle, qui n'est cependant pas dégradée par l'organisme. Cette observation a conduit à suspecter un dysfonctionnement du système de dégradation, régulant la demi-vie et la fonctionnalité des espèces biomoléculaires intervenant dans le cycle cellulaire : l'identification du rôle de l'ubiquitine dans ce processus particulier, par les lauréats du Prix Nobel de Chimie en 2004, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose, a ainsi initié le développement de nouvelles méthodes de diagnostic et de traitement thérapeutique ciblé du cancer.

9.1.2 Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome

Element central de l'homéostasie cellulaire, l'ubiquitine est une protéine formée de 76 acides aminés, dont la particularité est d'être présente dans toutes les cellules de l'organisme. Jouant le rôle d'un marqueur, cette biomolécule permet l'identification d'une protéine dénaturée, non fonctionnelle ou devenue obsolète, destinée au protéasome 26S, complexe enzymatique assurant la dégradation de l'espèce ciblée.

Le dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome (UPS) dans l'élimination de protéines anormales engendre, à long terme le développement de pathologies sévères, telles que les maladies neuro-dégénératives [106]. Cependant, l'action essentielle de cette voie de dégradation demeure la protéolyse contrôlée de protéines régulatrices, présentant elles-mêmes un rôle central dans le contrôle des différents processus cellulaires, et étant, du fait de leur fonction, relativement instables. De ce fait, l'implication du système UPS dans le développement du cancer a fait l'objet de recherches étendues : plusieurs mécanismes ont ainsi pu associés à l'amplification de facteurs oncogènes ou, à l'inverse, à la dégradation de protéines inhibitrices de la prolifération cellulaire. Les principaux dérèglements conduisant au développement de cette pathologie sont présentés dans les paragraphes suivants.

Principe général de la dégradation intracellulaire

Le principe de fonctionnement du système ubiquitine-protéasome (UPS) peut être illustré de manière relativement simple par la Figure 9.1. Dans une première étape, une enzyme de la classe E1, dite "d'activation" (*ubiquitin-activating enzyme*), se lie à l'ubiquitine via une réaction d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate (AMP) et pyrophosphate inorganique (PPi), apportant l'énergie nécessaire à cette liaison. Dans un second temps, une enzyme de "conjugaison" (*ubiquitin-conjugating enzyme*) de la classe E2, transfère l'ubiquitine à une enzyme E3 ligase assurant la fixation de l'ubiquitine sur la protéine cible. Ainsi, la spécificité de l'ubiquitylation repose principalement sur la famille E3, chargée du recrutement du substrat : à l'heure actuelle, plus de 1000 enzymes ubiquitine-ligases ont été identifiées.

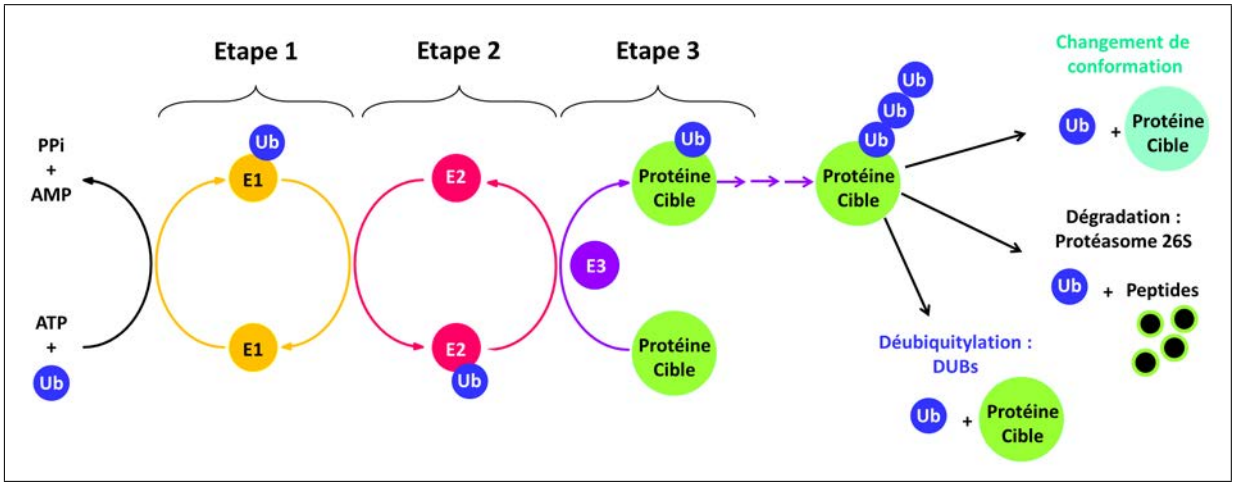


FIGURE 9.1 – **Principe de fonctionnement du système ubiquitine-protéasome.** La dégradation des protéines par la voie ubiquitine-protéasome fait intervenir 3 familles d'enzymes ubiquitaires, communément appelées E1, E2 et E3. Dans une première étape, une enzyme de la classe d'activation E1 se lie à la protéine cible par une réaction d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate (AMP) et pyrophosphate inorganique (PPi). Une seconde étape fait intervenir le transfert de l'ubiquitine sur une enzyme de conjugaison E2. La dernière étape, basée sur l'action d'une enzyme ligase E3, associe le substrat ciblé et l'ubiquitine, en vue d'une dégradation par le protéasome 26S, ou d'une modification des fonctionnalités de la protéine marquée. La régulation du processus UPS est assurée par des enzymes de déubiquitylation (DUBs), permettant le recyclage de l'ubiquitine.

Présentée ici de manière succincte, l'ubiquitylation est en réalité un processus relativement complexe. Le site de fixation de l'ubiquitine, de même que la formation de chaînes de topologie différentes à la surface de la protéine marquée conduisent à des issues variées, telles que la dégradation, un changement de conformation menant à un transport membranaire, une régulation de la transcription ou encore une réparation de l'ADN.

Les différentes voies d'action du système UPS font elles-mêmes l'objet d'une régulation par des enzymes de "déubiquitylation", notées DUBs en référence à l'anglais *deubiquitinating enzymes* (Figure 9.1). Par clivage de la liaison à la protéine marquée, ces espèces permettent le recyclage de l'ubiquitine, mais peuvent également jouer un rôle antagoniste et empêcher la dégradation de la biomolécule ciblée par le protéasome.

Le dysfonctionnement possible du système UPS à ces différents niveaux du cycle de dégradation intracellulaire conduit à une variété de phénotypes associés au cancer. Quelques exemples, présentés dans le paragraphe suivant, visent à donner un aperçu des voies d'action thérapeutique actuellement envisagées.

Le système UPS et le cancer

Parmi les mutations oncogènes affectant la cascade enzymatique UPS, celles touchant les ligases de la famille E3 sont particulièrement étudiées [107]. En effet, en raison de leur haute spécificité, ces enzymes permettent d'envisager une action médicamenteuse ciblée, et de ce fait plus efficace. L'enzyme E3 nommée MDM2, surexprimée dans 10% à 20% des tumeurs malignes, constitue un exemple concret d'un dysfonctionnement intervenant à ce niveau dans le processus de dégradation cellulaire. Dans un cas pathologique, la protéine MDM2 inhibe l'activité régulatrice de la protéine p53 (communément appelée "gardien du génome") dont elle est la principale ligase. Cette inhibition peut intervenir à différents niveaux : par une liaison directe, par marquage en

vue d'une dégradation par le protéasome 26S, ou par transport hors du noyau cellulaire. Ainsi, une concentration élevée de cette enzyme est généralement associée à une activité métastatique accrue et une progression rapide de la maladie.

De la même manière, une surexpression de certaines enzymes de la classe E2 conduit également à un développement cellulaire incontrôlé. Particulièrement documentée, l'amplification du facteur de transcription anti-apoptotique NF-κB est ainsi liée à la dégradation de sa protéine inhibitrice IκBα par les enzymes UBC12, présentant alors une activité anormale [108]. Intervenant à un autre niveau du cycle cancéreux, la surexpression des protéines E2 nommées UBE2A et UBE2B stabilise quant à elle le facteur oncogène β-caténine codant pour l'adhésion cellulaire [109].

Enfin, les enzymes dites de "déubiquitylation" représentent également une voie de recherche active, à la fois pour le diagnostic et le traitement ciblé du cancer. Parmi les plus caractérisées, celle UBP14, également impliquée dans la régulation de la protéine β-caténine [110], est associée à un mauvais pronostic d'adénocarcinome en cas d'expression anormale [111]. De même, les enzymes de déubiquitylation UCHL1 et UCHL3, surexprimées lors du dysfonctionnement du système UPS [112], représentent potentiellement des marqueurs d'un cancer du sein invasif [113].

L'analyse des antigènes intervenant à différentes étapes de la cascade enzymatique constitue par conséquent un enjeu important du diagnostic du cancer, mais également de son traitement, à travers l'identification précise des mécanismes de la dégradation cellulaire par voie UPS [114, 115]. Les travaux présentés dans la suite de ce chapitre, consacrés à la biodétection en milieu complexe, s'inscrivent dans cette problématique de santé actuelle.

9.2 Approche expérimentale de la détection de marqueurs intervenant dans le système ubiquitine-protéasome

L'interrogation multi-spectrale offre une robustesse de mesure particulièrement adaptée à la variété des conditions de détection rencontrées dans des applications réelles. Démontrée précédemment dans le cas d'une solution tampon contrôlée, cette propriété a pu être testée en milieu complexe grâce à la contribution du Dr. Damjana Kastelic du Centre Allemand de Recherche sur le Cancer (DKFZ ou *Deutsches Krebsforschungszentrum*) à Heidelberg. De manière plus concrète, les performances de la méthode proposée ont été évaluées dans le cadre de la détection multiplexe de marqueurs potentiels issus du système UPS, et présents dans du sérum humain. Sur la base de 4 couples antigènes-anticorps, des résultats préliminaires intéressants ont ainsi pu être obtenus : détaillée dans la suite de ce chapitre, cette étude laisse entrevoir le potentiel de l'interrogation multi-spectrale pour des analyses avancées dans le domaine biomédical.

9.2.1 Réactifs et fonctionnalisation

L'évaluation des performances de l'interrogation multi-spectrale en conditions de détection réelles a été concentrée sur l'étude de 4 marqueurs potentiels du cancer, intervenant dans le système de dégradation UPS. Deux enzymes appartenant à la classe E2 et catalysant la liaison covalente de l'ubiquitine à la protéine ciblée, UBC12 et UBE2A, ainsi que deux protéases assurant sa régénération par clivage de cette liaison, UBP14 et UCHL3, ont été sélectionnées dans le cadre de cette étude.

Matériel biologique

Les quatre antigènes d'intérêt, nommés UBC12, UBP14, UBE2A et UCHL3, ont été fournis par le DKFZ, accompagnés de quatre anticorps monoclonaux spécifiques, provenant de souris. D'un poids moléculaire de l'ordre de 60 kDa, les espèces cibles sont parfaitement compatibles avec une détection par SPR. Les anticorps associés présentent quant à eux un poids moléculaire égal à 150 kDa.

A titre indicatif, les caractéristiques des espèces biomoléculaires en présence sont résumées dans le tableau Tableau 9.2.

Tableau 9.2 – **Antigènes et anticorps du système UPS utilisés lors des expériences de biodétection en milieu complexe.**

Désignation	Nom complet	Fonction	Commentaire
UBC12	*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 M*	Antigène	Enzyme de classe E2, codée par le gène UBE2M, catalysant la liaison covalente entre la protéine NEDD8, analogue de l'ubiquitine, et la protéine cible à dégrader
UBP14	*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14*	Antigène	Protéase entraînant le clivage de la liaison entre l'ubiquitine et la protéine cible
UBE2A	*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A*	Antigène	Enzyme de classe E2, codée par le gène UBE2A, catalysant la liaison covalente entre l'ubiquitine, et la protéine cible à dégrader, et intervenant dans la réparation de séquences ADN endommagées
UCHL3	*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3*	Antigène	Protéase régulant la concentration cellulaire de l'ubiquitine par interaction avec les précurseurs de l'ubiquitine et les protéines ubiquitinylées
αUBC12	Anticorps monoclonal anti-UBC12		Anticorps hautement spécifique, pas de réactivité observée vis-à-vis des autres antigènes
αUBP14	Anticorps monoclonal anti-UBP14		Légère affinité observée pour UCHL3 et UBC12
αUBE2A	Anticorps monoclonal anti-UBE2A		Légère affinité observée pour UCHL3
αUCHL3	Anticorps monoclonal anti-UCHL3		Anticorps hautement spécifique, pas de réactivité observée vis-à-vis des autres antigènes

En complément des réactifs biologiques énoncés ci-dessus, un lot de sérum humain aliquoté a également été livré dans le cadre de cette application.

Chimie de surface et dépôt des sondes

La fonctionnalisation de 4 biopuces plasmoniques a été effectuée au sein de HORIBA Scientific, suivant un protocole basé sur une chimie POE (*Polyethylen Oxide* ou Poly(oxyde d'éthylène)) - NHS (N-Hydroxysuccinimide) [116].

Le dépôt des molécules sondes a par la suite été réalisé au Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique. Les 4 anticorps spécifiques des marqueurs potentiels UPS (αUBC12, αUBP14, αUBE2A et αUCHL3) ont été déposés à une concentration de 5 μM dans une solution de tampon phosphate (10 mM phosphate, 2.7 mM de chlorure de potassium et 137 mM de chlorure de sodium) et de Bétaïne (1.5 M) sur la surface activée des biopuces. Des plots d'anticorps αOvalbumine et IgG de souris, destinés au contrôle positif et négatif, respectivement, ont été déposés dans des conditions identiques. De la même manière que précédemment, un spotteur commercial, muni d'une pointe creuse de 200 μm de diamètre, a été utilisé au cours de cette étape : une matrice de 6×6 plots sondes a ainsi été générée, comprenant 6 réplicats de chaque anticorps.

Comme le met en évidence la Figure 9.2, présentant une image en réflectivité de l'une des biopuces placée dans le banc de mesure par SPR, un comportement inhabituel a été décelé pour les anticorps αUBE2A lors cette procédure. En effet, alors que le contraste de résonance plasmon entre la surface passivée et les plots αUBC12, αUBP14, αUCHL3, αOvalbumine et IgG est relativement net, indiquant le dépôt de matériel biologique, la présence des sondes αUBE2A semble plus qu'incertaine. Cette observation ayant été notée sur chacune des 4 biopuces, mais également lors d'un dépôt direct réalisé à l'aide d'une pipette, une incompatibilité entre la chimie de surface et la solution contenant ces espèces sondes est probablement à l'origine de ce phénomène. Dans le cadre de ces expériences préliminaires, cette hypothèse n'a cependant pas pu être vérifiée à ce jour.

La présence d'une légère traînée accompagnant certains plots peut également être constatée sur la Figure 9.2, indiquant un mauvais réglage de la hauteur de la pointe survenu durant la procédure de spotting. Ce défaut ne compromet cependant en rien la qualité du dépôt : en effet, d'après l'amplitude des signaux recueillis par la suite pour le couple ovalbumine/αOvalbumine (contrôle positif utilisé comme référence dans le cadre de ces expériences), aucune dégradation des interactions antigène/anticorps n'a été dénotée.

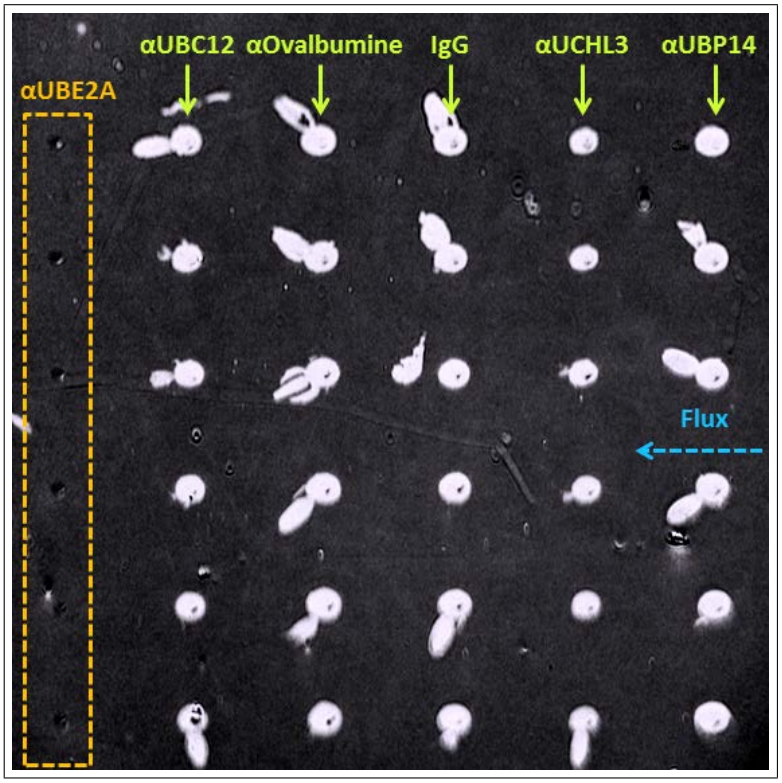


FIGURE 9.2 – **Image en réflectivité de la matrice des plots d'anticorps réalisée dans le cadre de l'étude des marqueurs potentiels UPS.** Les anticorps αUBC12, αUBP14, αUBE2A et αUCHL3, spécifiques des 4 marqueurs potentiels recherchés, ont été déposés à une concentration de 5 μM sur la surface fonctionnalisée de la biopuce. Des anticorps anti-ovalbumine (αOvalbumine) et IgG de souris ont également été introduits dans la matrice comme contrôles positif et négatif, respectivement.

Tampon de course et régénération

Un tampon phosphate standard (*Phosphate Buffered Saline* ou PBS, 10 mM), présentant des concentrations respectives de chlorure de potassium et chlorure de sodium égales à 2.7 mM et 137 mM, et un pH de 7.4 à 25 °C, a été utilisé lors de ces expériences.

Une solution de glycine (acide aminoacétique) a été employée comme solution de régénération, mélangée à de l'acide chlorhydrique (HCl) pour atteindre un pH égal à 2.

9.2.2 Conditions expérimentales en interrogation multi-spectrale par SPR

L'affinité des différents couples antigène/anticorps a été évaluée en interrogation multi-spectrale, dans une configuration à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm (sauf mention contraire explicite). Le banc expérimental muni d'une lampe halogène couplée à un monochromateur, ayant servi de base aux développements exposés précédemment dans ce manuscrit (partie II), a été utilisé dans ce cadre, en raison de travaux menés en parallèle sur le prototype de bas coût (partie III) au moment de cette étude. Les cinétiques présentées dans la suite de ce chapitre ont été enregistrées à une cadence de 0.1 Hz, et moyennées sur l'ensemble des 6 réplicats sondes après soustraction des contrôles négatifs.

De manière semblables aux expériences de biodétection abordées précédemment (chapitre 5, partie II), la température de la cellule fluidique a été fixée à 25 °C, et régulée avec une précision de 0.01 °C. Le débit de circulation a quant à lui été réglé à 50 μL/min.

9.2.3 Déroulement de l'étude

La détection des marqueurs potentiels UBC12, UBP14, UBE2A et UHL3 précédemment cités, en sérum, constitue l'application finale visée dans le cadre de ce chapitre. Cette problématique a été abordée de manière graduelle, en quatre étapes, destinées à évaluer d'une part la stabilité des espèces biomoléculaires en présence, et d'autre part le caractère spécifique et non-spécifique des interactions étudiées, ainsi que la capacité de régénération de ces biopuces.

De manière plus concrète, cette procédure d'analyse a été menée comme suit :

1. Une première étape de caractérisation a été effectuée en milieu contrôlé (tampon phosphate habituel) : une série d'injections de concentration croissante a été réalisée pour chacun des antigènes, sur une même biopuce, afin d'évaluer l'amplitude des signaux d'interaction antigène/anticorps, ainsi que la limite de détection pour chacune des espèces recherchées. En particulier, cette expérience a mis en évidence la nécessité d'une solution de régénération adaptée afin d'éviter la dégradation des plots d'anticorps au cours des expériences.
2. Dans un deuxième temps, le saut d'indice induit par l'injection de sérum seul a été évaluée sur une biopuce non fonctionnalisée, mais passivée par un dépôt de BSA (*Bovine Serum Albumin*, albumine provenant du sérum de bovin). Comme évoqué précédemment (section 1.3 du chapitre 1, partie I), la différence d'indice optique entre le milieu contenant les cibles et le tampon de course constitue une limitation importante de la détection directe par SPR. Pour cela, différentes dilutions ont été testées afin de déterminer la concentration de sérum maximale compatible avec la limite de détection de la méthode d'interrogation implémentée. L'adsorption non-spécifique attendue a également pu être mesurée lors de cette expérience.
3. Ces premiers résultats ayant permis les conditions expérimentales pour la détection en milieu complexe, l'injection des antigènes sélectionnés a été réalisée dans du sérum dilué, et mesurée en temps réel par interrogation multi-spectrale.
4. Une quatrième et dernière caractérisation annexe a été consacrée à l'étude de différentes solutions visant à la régénération des complexes antigène/anticorps formés, sans dégradation de la réactivité des espèces sondes déposées à la surface de la biopuce.

La Figure 9.3 résume sous forme schématique l'articulation de ces différentes étapes.

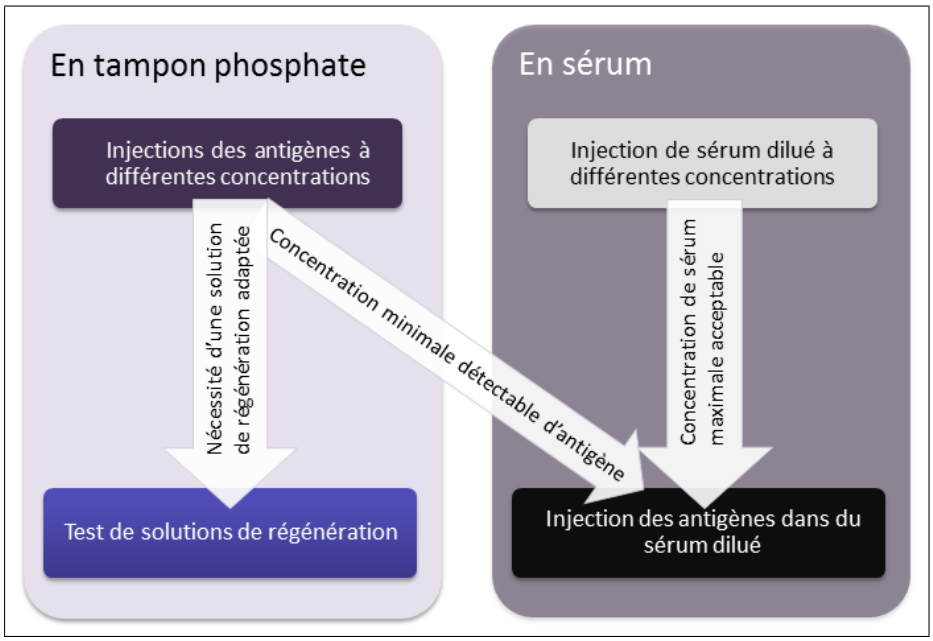


FIGURE 9.3 – **Représentation schématique du déroulement des expériences de détection en milieu complexe.** Une première analyse a été effectuée en tampon phosphate afin de vérifier l'affinité des différents couples antigène/anticorps en présence. Cette caractérisation a ainsi permis d'évaluer la limite de détection des espèces cibles étudiées. La nécessité d'une régénération adaptée a également été mise en évidence lors de ces travaux, conduisant à une étude menée de manière annexe sur ce sujet. La détection des cibles en sérum a été abordée dans un premier temps par l'étude de la concentration de sérum maximale mesurable en interrogation multi-spectrale. Sur la base de ces données, une expérience finale de détection en milieu complexe a été réalisée.

Présentées de manière détaillée dans le paragraphe suivant, ces expériences soulignent tout particulièrement la difficulté de la détection en milieu complexe et l'obtention de signaux d'interaction spécifiques.

9.3 Résultats

La détection de marqueurs du cancer en sérum constitue une application relativement nouvelle et ambitieuse dans le contexte des développements instrumentaux introduits dans les parties précédentes de ce manuscrit. Pour cette raison, les analyses présentées dans les paragraphes suivants relèvent d'expériences exploratoires dont le but est simplement, dans un premier temps, l'étude des performances de la méthode d'interrogation multi-spectrale implémentée, en milieu complexe.

9.3.1 Détection des antigènes en tampon phosphate

L'analyse préliminaire des interactions antigène/anticorps en tampon phosphate a été menée de manière séquentielle, par l'enchaînement d'une série d'injections de chaque marqueur potentiel considéré. En raison de la réactivité croisée affichée par les anticorps αUBE2A et αUBP14 (Tableau 9.2, p.145), l'ordre des antigènes a été défini de la manière suivante : UBC12, UCHL3, UBE2A, puis UBP14.

Pour chacun des 4 marqueurs potentiels ci-dessus, une séquence d'injections a été envisagée, de manière à couvrir une gamme de concentrations permettant la détermination de la limite de détection. Les solutions correspondantes, présentées dans le Tableau 9.3, ont été préparées par dilution en cascade de solutions mères à 1 mg/mL dans le tampon de course, une solution de PBS contenant 0.05% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) : cette composition particulière a été définie en prévision des régénérations nécessaires entre chaque injection, susceptibles d'affecter la qualité de la passivation de la surface.

Pour plus de clarté, le détail complet de cette série de mesures est donnée en annexe D. Les numéros présentés dans le Tableau 9.3 correspondent ainsi à un ordre d'injection "relatif" à un même antigène, et diffèrent de l'ordre "absolu" des injections réalisées.

Tableau 9.3 – **Ordre des injections réalisées en tampon phosphate sur la première lame fonctionnalisée.** Le numéro des injections présenté renvoie à l'ordre relatif au sein d'une même série de mesure, correspondant à un antigène donné, et ne tient pas compte de l'injection de blanc (tampon de course) en début d'expérience, ni des régénérations intervenant après chaque échantillon cible.

Numéro de l'injection (relatif)	**Concentration massique**	**Concentration molaire correspondante**
1	5 μg/mL	80 nM
2	5 ng/mL	80 pM
3	50 ng/mL	800 pM
4	500 ng/mL	8 nM
5	5 μg/mL	80 nM
6	20 μg/mL	320 nM

Chaque solution cible préparée suivant le Tableau 9.3 a été injectée pendant 4 min, puis rincée par le tampon de course pendant 6 min. Cette injection a été directement suivie d'une régénération de la biopuce, visant à décrocher les espèces cibles adsorbées avant le passage de l'échantillon suivant. Cette étape particulière a été effectuée par l'injection d'une solution de glycine/HCl (acide chlorhydrique) à pH 2 pendant 1 min, suivie d'un rinçage de 3 min.

Observations

Un contrôle positif, réalisé en début d'expérience par l'injection d'une solution d'ovalbumine (10 μg/mL), ayant confirmé la bonne qualité des conditions expérimentales, la séquence d'injections a été initiée comme prévu par l'antigène UBC12. Détecté à une concentration de 5 μg/mL, le marqueur potentiel a été réintroduit suivant la gamme de dilution détaillée précédemment (Tableau 9.3). Cette séquence d'injections a permis d'évaluer la limite de détection en tampon phosphate, estimée ici à 500 ng/mL pour un signal $\Delta\lambda_{min}$ égal à 0.07±0.02 nm , soit une concentration de 8 nM. Ce résultat est illustré par la Figure 9.4, qui présente l'évolution du signal enregistré en interrogation multi-spectrale pour les injections n °5 , 9 et 11, correspondant à des concentrations respectives de 5 μg/mL, 50 ng/mL et 500 ng/mL (la liste complète des injections est présentée dans la section D.1 de l'annexe D). Dans chaque cas, l'évolution du signal recueilli en interrogation multi-spectrale correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après

soustraction des contrôles négatifs. Les cinétiques relatives aux autres concentrations étudiées, de même que les signaux d'interaction correspondants, sont donnés dans la section D.1 de l'annexe D.

En raison des signaux relativement faibles et perturbés enregistrés lors de ces expériences, les courbes présentées dans ce chapitre ainsi que dans l'annexe D ont été lissées par un ajustement polynomial (méthode disponible sous Matlab). Ce traitement ayant été effectué uniquement pour une meilleure clarté des figures, les valeurs quantitatives données par la suite ont été extraites directement sur les signaux bruts, non lissés.

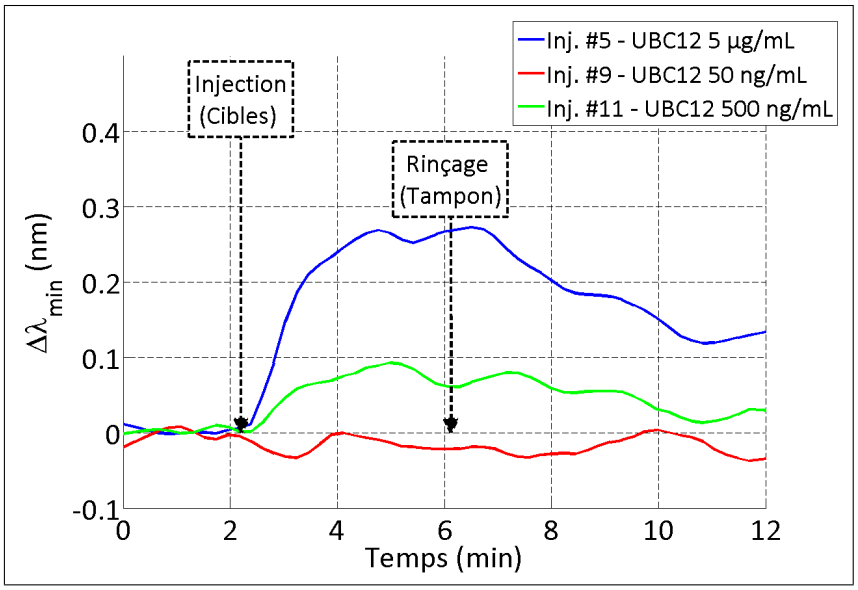
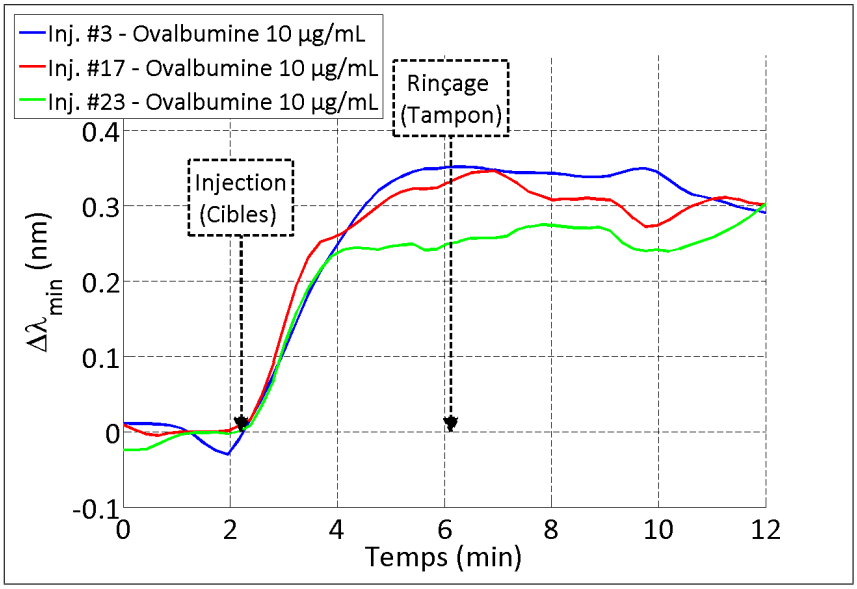
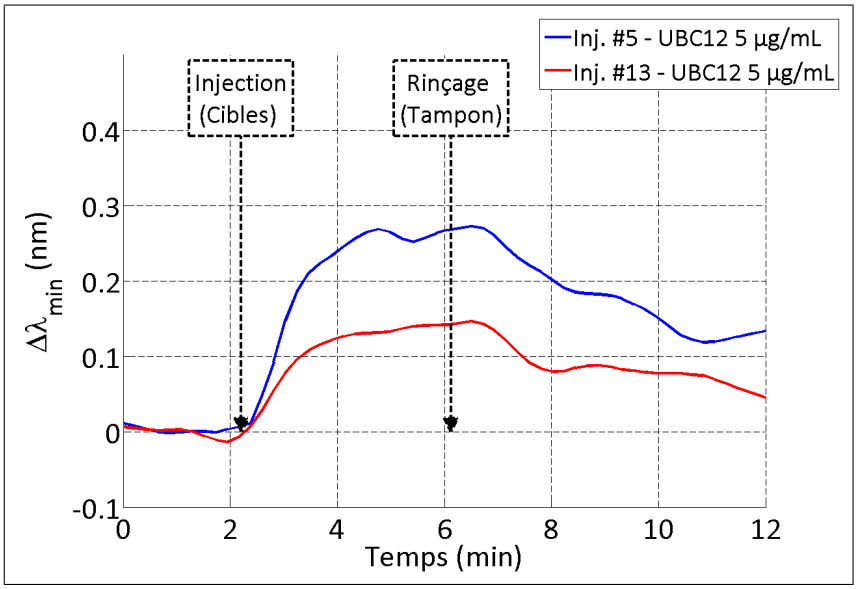


FIGURE 9.4 – **Cinétiques superposées des injections de l'antigène UBC12 n°5 (5 μg/mL), n°9 (50 ng/mL) et n°11 (500 ng/mL).** Chacune des courbes de cinétique présentée correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

En revanche, aucun des trois marqueurs potentiels restants n'a pu être détecté par la suite à une concentration égale, de 5 μg/mL. Dans le cas de l'antigène UBE2A, cependant, ce résultat n'est que peu surprenant étant donné la probable absence d'anticorps αUBE2A à la surface de la biopuce, explication avancée lors de la procédure de spotting. L'absence de signal relatif aux antigènes UCHL3 et UBP14 a quant à elle été attribuée aux régénérations ayant précédé l'injection des deux espèces, au nombre de 9 et 16 respectivement. Cette hypothèse, confortée par les cinétiques extraites de la séquence d'injections UBC12, est illustrée sur la Figure 9.5, représentant la réponse enregistrée pour une même concentration, répétée après un certain nombre de régénérations, dans le cas de l'ovalbumine (Figure 9.5a) et de l'antigène UBC12 (Figure 9.5b). Dans chaque cas, l'évolution du signal recueilli en interrogation multi-spectrale correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.



(a) **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine n°3, 17 et 23 (10 μg/mL).** Ces mesures ont été réalisées après un nombre de régénérations égal à 1, 8 et 11, respectivement.



(b) **Cinétiques superposées des injections de l'antigène UBC12 n°5 et 13 (5 μg/mL).** Ces mesures ont été réalisées après un nombre de régénérations égal à 2 et 6, respectivement.

FIGURE 9.5 – **Mise en évidence de la dégradation des anticorps αUBC12 par la régénération répétée de la biopuce.**

Pour plus de clarté, les signaux extraits en interrogation multi-spectrale 4 min après chaque injection considérée, sont représentés sur la Figure 9.6. La contribution de chaque famille de sondes est évaluées par la moyenne et l'écart-type associées aux 6 réplicats, après soustraction des contrôles négatifs.

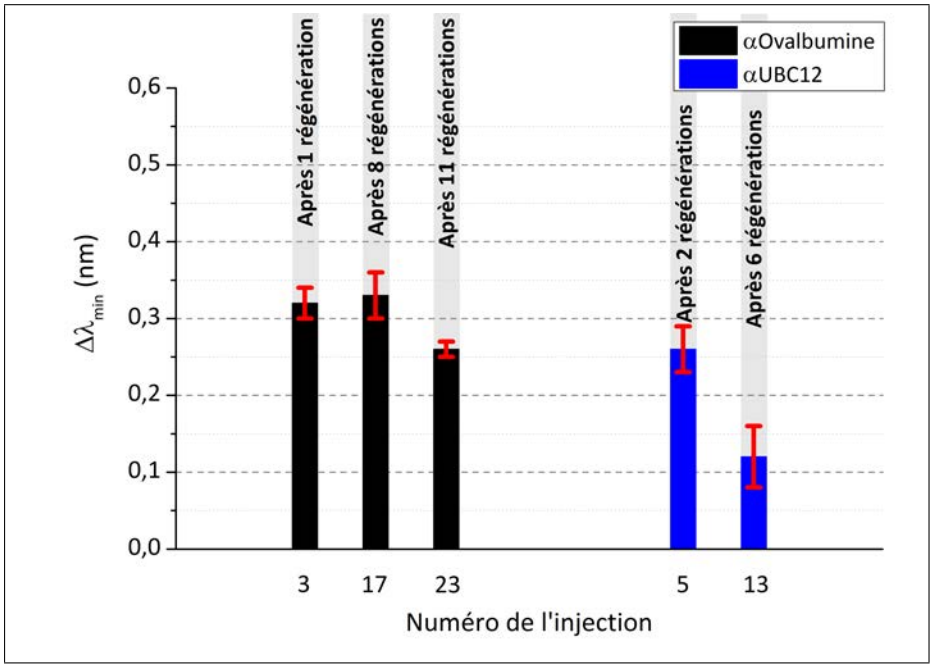


FIGURE 9.6 – **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors de l'injection d'ovalbumine et du marqueur potentiel UBC12.** Les solution cibles d'ovalbumine et de l'antigène UBC12 ont été préparées à des concentrations respectives de 10 μg/mL et 5 μg/mL en PBS. Les données présentées correspondent aux signaux recueillis 4 min après chaque injection, moyennés sur les 6 réplicats sondes de la famille d'anticorps spécifique. L'erreur est associée à l'écart-type calculé sur les 6 valeurs.

Alors que le couple ovalbumine/αOvalbumine affiche un signal d'interaction constant au cours des cycles d'injection/régénération, le complexe UBC12/αUBC12 semble en revanche affecté par les régénérations répétées : une diminution du signal d'un facteur 2, relevée sur ces données, semble indiquer une détérioration de l'anticorps αUBC12 sous l'action de la glycine.

Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement par une analyse complémentaire, menée sur l'une des trois lames fonctionnalisées restantes. Les injections de solutions cibles d'ovalbumine, ainsi que des marqueurs potentiels UBC12, UCHL3 et UBP14, ont été réalisées à la suite, sans régénération (Tableau 9.4).

Tableau 9.4 – **Ordre des injections réalisées en tampon phosphate sur la deuxième lame fonctionnalisée.**

Numéro de l'injection	Solution injectée	Concentration massique	Concentration molaire
1	Blanc (tampon de course)		
2	Ovalbumine (contrôle positif)	10 μg/mL	160 nM
3	UBC12	5 μg/mL	80 nM
4	UCHL3	5 μg/mL	80 nM
5	UBP14	5 μg/mL	80 nM

Le résultat de cette expérience, présenté comme la moyenne sur les 6 réplicats de chacune des sondes considérées, après soustraction des contrôles négatifs, est illustré sur la Figure 9.7.

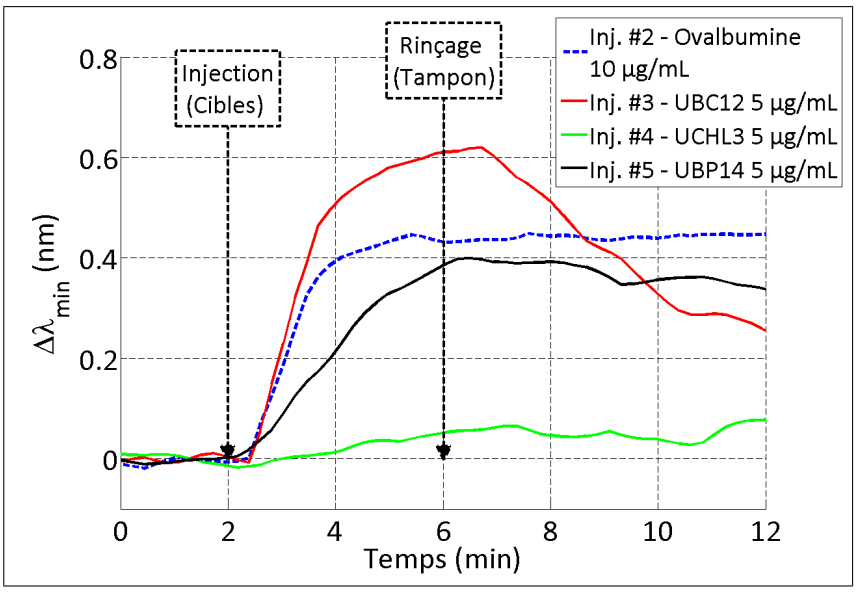


FIGURE 9.7 – **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine à 10 μg/mL (n°2), et des marqueurs potentiels UBC12 (n°3), UCHL3 (n°4) et UBP14 (n°5) à 5 μg/mL.**

Les valeurs recueillies 4 min après chacune de ces injections, sont données sur la Figure 9.8. De la même manière que précédemment, chaque famille de sondes est représentée par la moyenne et l'écart-type calculés sur les 6 réplicats, après soustraction des contrôles négatifs.

Cette fois, la détection de l'antigène UBP14 à une concentration de 5 μg/mL est possible, ce qui démontre une nette influence de la régénération par la solution de glycine/HCl. Une augmentation du signal généré à l'injection du marqueur potentiel UBC12, par rapport à celui enregistré lors de la première expérience après 2 régénérations, peut également être notée, conduisant à la même conclusion. En revanche, l'absence de signal observée une nouvelle fois dans le cas de l'antigène UCHL3 indique probablement une perte de réactivité des anticorps αUCHL3 lors du dépôt sur la surface fonctionnalisée de la biopuce.

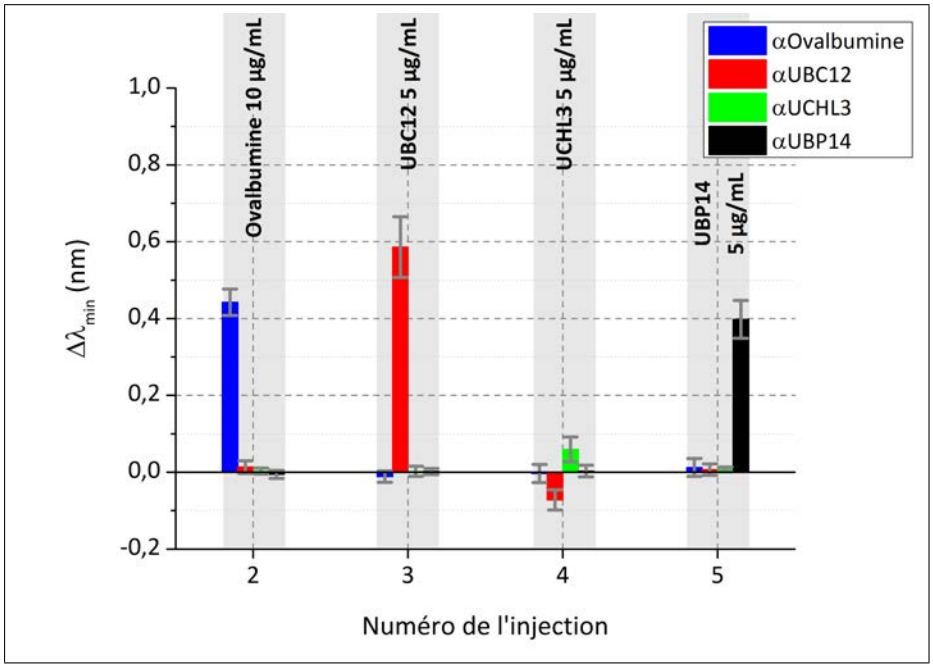


FIGURE 9.8 – **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors de l'injection d'ovalbumine et des marqueurs potentiels UBC12, UCHL3 et UBP14.** La solution cible d'ovalbumine a été préparée à 10 μg/mL en PBS. Les solutions des antigènes UBC12, UCHL3 et UBP14 ont été injectées à une concentration de 5 μg/mL. Les données présentées correspondent aux signaux recueillis 4 min après l'injection des cibles, moyennés sur les 6 réplicats sondes de chaque famille d'anticorps. L'erreur est associée à l'écart-type calculé sur les 6 valeurs.

Suite à ces résultats, des injections complémentaires ont été réalisées pour évaluer la limite de détection de l'antigène UBP14, estimée dans le cas présent à 500 ng/mL pour un signal $\Delta\lambda_{min}$ de 0.04±0.01 nm. Cette valeur, qui équivaut à une concentration de 8 nM, égale ainsi la limite de détection déterminée précédemment pour l'antigène UBC12. L'obtention de ce résultat est illustré par la Figure 9.9, qui retrace les cinétiques enregistrées pour les injections n°7 , 9 et 11, soit pour des concentrations respectives de l'antigène de 5 μg/mL, 500 ng/mL et 50 ng/mL. Dans chaque cas, le signal représenté correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

Les données complètes relatives à cette série de mesure sont présentées en annexe D (section D.1, p.203).

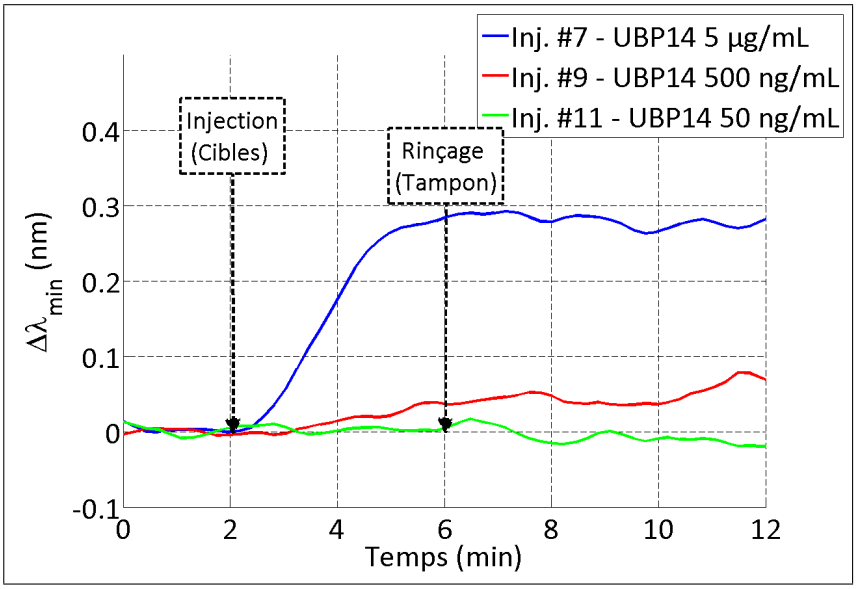


FIGURE 9.9 – **Cinétiques superposées des injections du marqueur potentiel UBP14 n°7 (5 μg/mL), n°9 (500 ng/mL) et n°11 (50 ng/mL).** Chacune des courbes de cinétique présentée correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

Conclusion

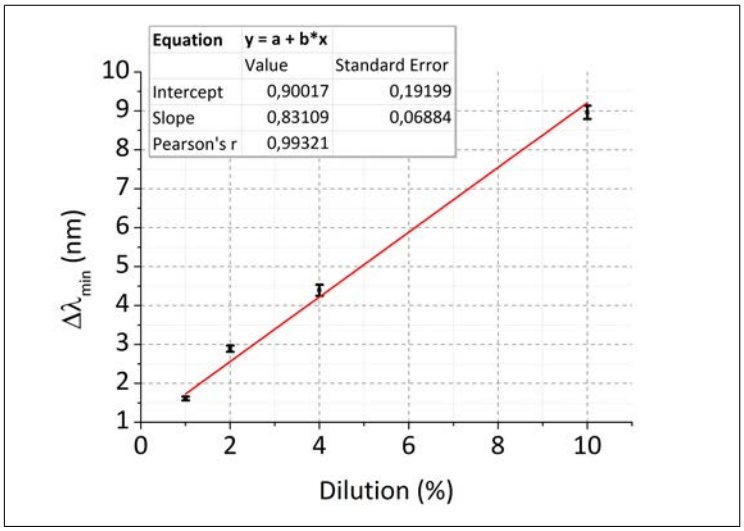
La première série d'expériences, réalisée en tampon phosphate, a permis d'évaluer qualitativement la réactivité des complexes antigène/anticorps mis en jeu dans le cadre de cette étude. Une limite de détection a ainsi pu être déterminée pour les antigènes UBC12 et UPB14, égale à 500 ng/mL (soit 8 nM) dans les deux cas (se reporter à l'annexe D). En revanche, aucune interaction n'a pu être détectée pour les complexes UCHL3/αUCHL3 et UBE2A/αUBE2A, indiquant un perte de réactivité lors du dépôt des anticorps sur la surface fonctionnalisée. Une dégradation de la qualité des anticorps αUBC12 et αUBP14 a été également été observée sous l'effet d'injections répétées d'une solution de glycine/HCl à pH 2, destinée à la régénération de la biopuce lors des expériences.

Suite à l'obtention de ces résultats, l'étude a été redirigée plus spécifiquement sur les couples UBC12/αUBC12 et UBP14/αUBP14, seuls ayant démontré une réactivité lors des mesures effectuées en tampon phosphate. D'une part, les performances de détection en conditions complexes ont été évaluées par l'injection des deux espèces cibles en sérum dilué. D'autre part, des solutions de glycine à différents pH ont été testées afin de déterminer les conditions de régénération optimales dans le cadre de cette application particulière. Les paragraphes suivants rendent compte du déroulement de ces deux séries expériences.

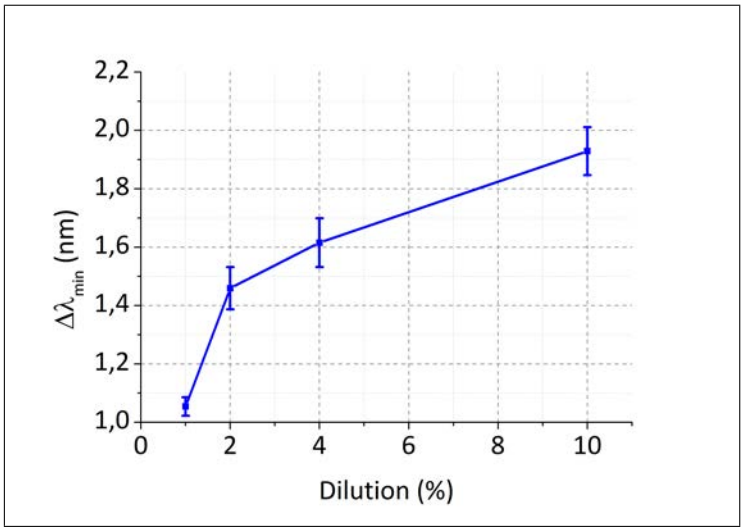
9.3.2 Détection des antigènes en sérum dilué

La problématique de détection en milieu complexe a été abordée en deux étapes distinctes. Dans un premier temps, le comportement du sérum seul a été évalué sur une lame d'or ne présentant pas d'anticorps, passivée par une couche de BSA. En particulier, la variation de signal induite par la différence d'indice optique par rapport au tampon de course (PBS contenant 0.05% de BSA) a été évaluée pour différentes concentrations de sérum (préparées par dilution en cascade de la solution mère dans le tampon phosphate), dans le but de déterminer la dilution minimale compatible avec la dynamique de mesure de l'interrogation multi-spectrale. Le degré d'adsorp-

tion non spécifique a également été estimé, par mesure du signal rémanent après rinçage de la surface par le tampon de course. Les résultats de cette étude préliminaire, extraits et moyennés sur 4 régions de 41×41 pixels réparties sur la surface analysée, sont présentés sur la Figure 9.10.



(a) **Evolution du décalage spectral induit par l'injection de sérum en fonction du degré de dilution.**



(b) **Evolution du décalage spectral associé à l'adsorption non spécifique suivant l'injection de sérum dilué, en fonction du degré de dilution.**

FIGURE 9.10 – **Evolution des décalage spectraux induits respectivement par la variation d'indice et l'adsorption non spécifique de solutions de sérum dilué.** Une série d'injections de sérum dilué à 1%, 2%, 4% et 10% dans une solution de PBS contenant 0.05% de BSA a été enregistrée en interrogation multi-spectrale. Le décalage spectral induit par la variation d'indice des solutions, par rapport au tampon de course, a été extrait 2 min après chaque injection. Le signal rémanent associé à l'adsorption non spécifique des espèces biomoléculaires présentes dans le sérum a été extrait 8 min après chaque injection. Une lame d'or passivée par de l'albumine (BSA) a été utilisée comme substrat lors de cette expérience.

Du fait de la configuration multi-spectrale adoptée (5 longueurs d'onde espacées de 20 nm), le décalage spectral maximal mesurable avec une précision satisfaisante est de l'ordre de 30 nm, correspondant à une dilution de 30% de sérum (Figure 9.10a). Pour la suite des expériences envisagées, faisant intervenir les marqueurs potentiels UBC12 et UBP14, le degré de dilution du sérum a été fixé à 20%, de manière à se placer en-dessous de la limite autorisée par la dynamique de mesure.

Dans de telles conditions, l'amplitude attendue de l'adsorption non spécifique des composants du sérum dilué semble être au minimum de 2 nm (Figure 9.10b), soit un facteur 4 en comparaison des valeurs d'interaction spécifique des complexes UBC12/αUBC12 et UBP14/αUBP14 évaluées précédemment ($\approx$ 0.5 nm). En effet, l'évolution non linéaire du signal non-spécifique rémanent ne permet pas d'extrapoler une valeur précise pour une dilution de 20% du sérum. Les injections, réalisées de manière séquentielle sur la même lame, en ont peu à peu saturé la surface, rendant peu exploitables les résultats obtenus.

Les solutions cibles correspondant aux deux marqueurs potentiels ont été préparées à 2 μg/mL et 5 μg/mL : en raison de la complexité des conditions de détection, des concentrations plus faibles n'ont pas été envisagées.

Une configuration spectrale de 7 longueurs d'onde espacées de 20 nm, conduisant à une cadence d'environ 20 s par point de mesure, a également été adoptée, exceptionnellement, pour cette expérience.

Le déroulement de la seconde partie de cette étude, réalisée sur la troisième lame fonctionnalisée avec les anticorps spécifiques des antigènes UBC12 et UBP14, est résumé sur la Figure 9.11. Après la mise en circulation du tampon de course (PBS), une première injection du contrôle positif (solution d'ovalbumine à 10 μg/mL en PBS), a permis de contrôler la qualité des conditions expérimentales.

Le sérum dilué a alors été injecté seul, dans le but de passiver la surface, et bloquer tout site d'interaction non spécifique lors des injections ultérieures. Cette approche a été inspirée par les observations des résultats présentés sur la Figure 9.10b, pour lesquels une saturation avait été relevée après 4 injections de sérum à dilutions inférieures à 10% : une concentration plus élevée (20%) a été supposée permettre une passivation suffisante. Pour cette raison également, le tampon PBS a été préparé sans BSA.

Cette injection a été directement suivie de celles des antigènes UBC12 et UBP14 en sérum. Après une régénération de la surface analysée (glycine/HCl, pH 2), les trois solutions cibles (ovalbumine, UBC12 et UBP14) ont été réintroduites, à la suite l'une de l'autre. Dans chaque cas, l'injection a été réalisée pendant 4 min, et suivie par un rinçage du tampon de course pendant 6 min. La solution de régénération de la biopuce a quant à elle été injectée pendant 1 min, puis rincée pendant 3 min par le PBS.

De manière similaire aux résultats exposés précédemment, les cinétiques enregistrées lors de cette série de mesure, représentées sur la Figure 9.11 correspondent à la moyenne des 6 réplicats sondes déposés pour chaque famille d'anticorps considérée (sans soustraction des contrôles négatifs) : dans le cas présent, les sondes αUBC12 et αUBP14, spécifiques des marqueurs potentiels du cancer, ainsi que celles servant de contrôle positif (αOvalbumine) et négatif (IgG). Le signal extrait sur une zone de la biopuce ne présentant pas d'anticorps est également représenté en comparaison.

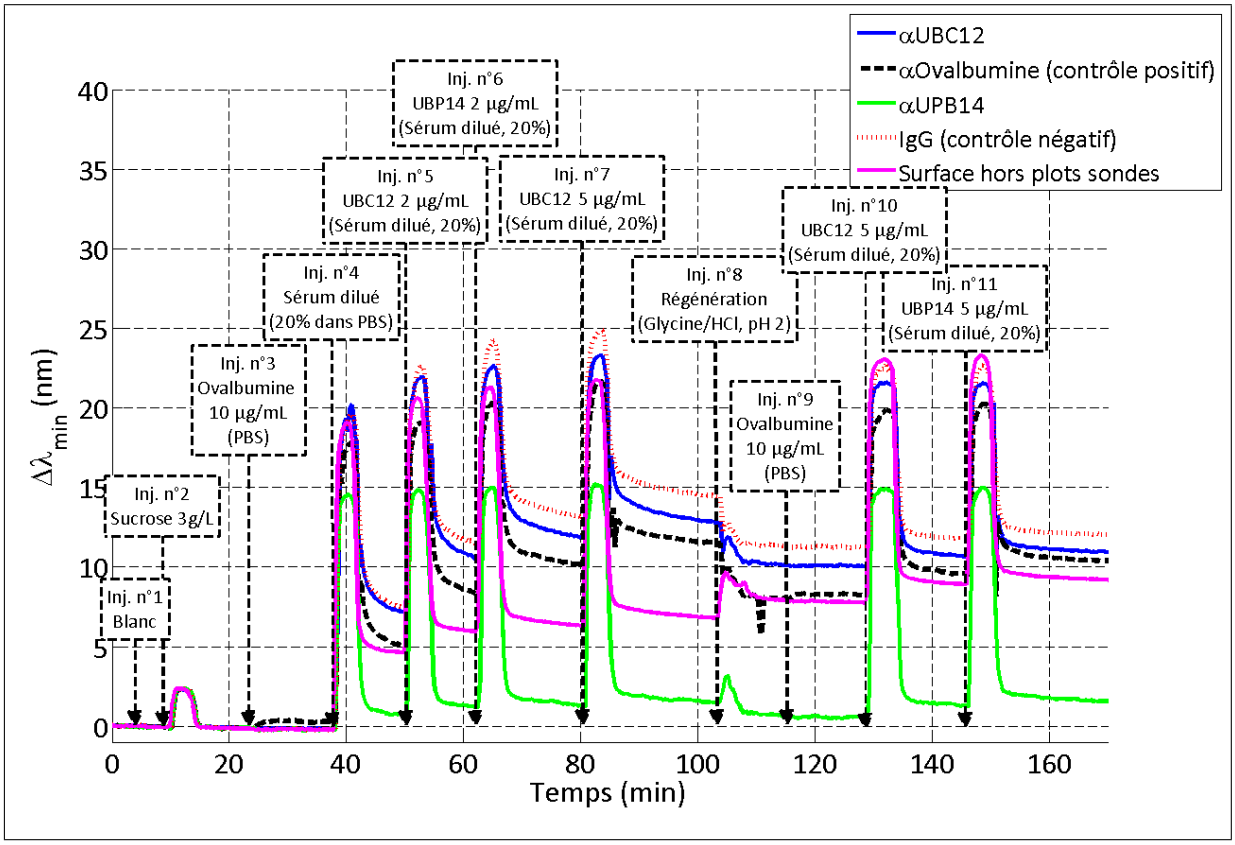


FIGURE 9.11 – **Cinétiques des injections réalisées en sérum dilué sur la troisième lame fonctionnalisée.** Les données représentées correspondent aux signaux bruts, sans soustraction des contrôles négatifs.

Pour plus de clarté, le détail de ces expériences, de même que les observation rapportées, sont détaillées en annexe D (section D.2, p.213).

Observations

L'adsorption non spécifique pour la surface fonctionnalisée par la chimie seule peut être estimée d'après le signal rémanent sur une région d'intérêt prise hors des plots sondes. De l'ordre de 5 nm après l'injection de sérum dilué, l'amplitude de signal non spécifique est supérieure à celle relevée sur les anticorps αUBP14 ($\approx$ 1 nm) : cette observation démontre que le dépôt de sondes permet de bloquer de manière efficace la surface de la biopuce, la rendant inaccessible aux espèces contenues dans le sérum.

En revanche, les contrôles négatifs (IgG), de même que les anticorps αOvalbumine et αUBC12 présentent un signal non spécifique plus élevé (de 5 à 8 nm). Ce cas de figure n'avait pas été envisagé lors des expériences préliminaires, où seule une lame d'or passivée par une couche de BSA avait été testée. Ces données conduisent à penser que des espèces biochimiques inconnues dans le sérum interagissent fortement avec ces anticorps, rendant particulièrement laborieuse la détection des antigènes UBC12 et UBP14 dans ces conditions.

Cette remarque peut être aisément justifiée par l'analyse des signaux extraits après rinçage par le tampon de course pour chaque injection réalisée. La Figure 9.12 présente le décalage spectral ainsi mesuré entre deux positions de la résonance plasmon prises respectivement 2 min avant l'injection considérée, puis 8 min après, soit dans le même milieu (PBS) dans les deux cas. Pour

les 4 familles d'anticorps, chaque donnée représentée correspond à la moyenne des 6 réplicats d'une même sonde ; la dispersion associée est quant à elle évaluée par l'écart-type calculé sur les 6 valeurs. Dans le cas des données prises hors des sondes, les statistiques sont évaluées sur 12 régions d'intérêt réparties sur la biopuce, chacune de taille équivalente à un plot d'anticorps.

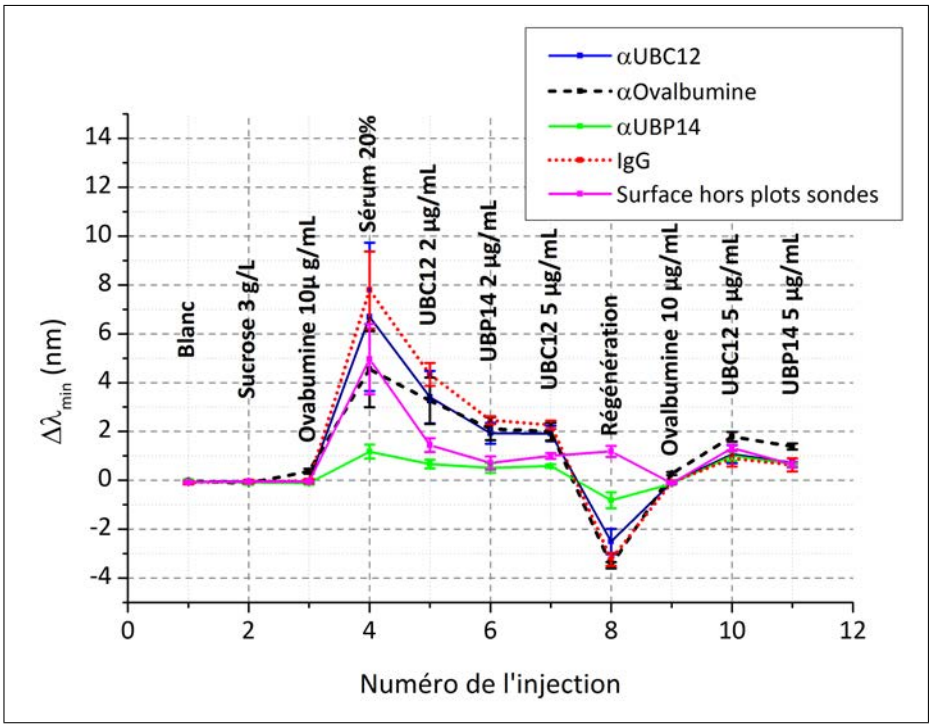


FIGURE 9.12 – **Evolution du décalage spectral rémanent au cours des injections réalisées sur la troisième lame fonctionnalisée.** Défini comme la différence entre les positions de la résonance plasmon mesurées 2 min avant chaque injection considérée, et 8 min après, le décalage spectral rémanent représenté correspond à la moyenne. La dispersion associée résulte quant à elle de l'écart-type calculé sur les 6 valeurs.

L'adsorption importante relevée sur les plots des sondes IgG, censés être des contrôles négatifs, durant la première phase d'injections (n° de l'injection < 8) rend peu aisée l'extraction d'un signal spécifique associé à la formation du complexe UBC12/αUBC12. De même, l'interaction UBP14/αUBP14 peut difficilement être interprétée dans un tel contexte.

La faible amplitude des signaux, observée durant la seconde phase d'injection, traduit quant à elle une régénération incomplète de l'adsorption non spécifique des composants du sérum dilué.

Conclusion

Les résultats de cette étude préliminaire en milieu complexe ne permettent malheureusement pas l'extraction d'un signal spécifique associé aux couples antigène/anticorps étudiés. Bien que les performances de détection dans de telles conditions n'aient pu être évaluées, les cinétiques enregistrées démontrent toutefois la possibilité de réaliser une mesure en interrogation spectrale et en temps réel, en sérum dilué, à condition de disposer d'anticorps hautement spécifiques afin de limiter l'adsorption non désirée d'autres espèces présentes sur les plots sondes.

Cet aspect indissociable de la détection en milieu complexe doit également être traité avec une attention particulière, car l'extraction d'un signal relatif à l'interaction recherchée repose sur une évaluation précise de cette contribution non spécifique. Une solution intéressante, dénommée "Single Surface Referencing" et illustrée sur la Figure 9.13, a été proposée dans ce cadre par Špringer et al. [117].

Dans le cadre de ces travaux, mais également de manière générale dans les applications de biodétecion plasmonique, l'approche par "Dual Surface Referencing" considérée consiste à greffer, sur la biopuce, une molécule sonde spécifique de l'antigène (notée Ab) d'une part, et d'autre part un ligand non spécifique servant de contrôle négatif (noté Ab_R). Or, une différence de réactivité des deux espèces sondes vis-à-vis des composants du milieu complexe peut conduire à des amplitudes de signal non spécifiques différentes (Figure 9.12), entraînant une correction faussée des données associées au couple antigène/anticorps recherché, et donc une évaluation incorrecte du signal spécifique ainsi déterminé.

A la différence de cette méthode commune, l'approche proposée par "Single Surface Referencing" repose sur l'utilisation d'une seule et même sonde (notée Ab), greffée sur la surface fonctionnalisée de la biopuce. Un système de fluidique adapté est alors utilisé pour injecter simultanément l'échantillon à analyser tel quel dans un canal de détection (*Detection channel*), et le même échantillon saturé avec l'anticorps Ab spécifique de l'antigène recherché dans un second canal de référence (*Reference channel*). De cette manière, le signal détecté dans le premier cas correspond à l'adsorption de l'antigène (*Analyte*) et celle non-spécifique des autres composants du milieu complexe (CCS) ; dans le second canal, seule la contribution non spécifique (CCS) est détectée. Cette méthode vise ainsi à évaluer de manière plus précise l'amplitude de l'adsorption non désirée des espèces présentes dans l'échantillon complexe.

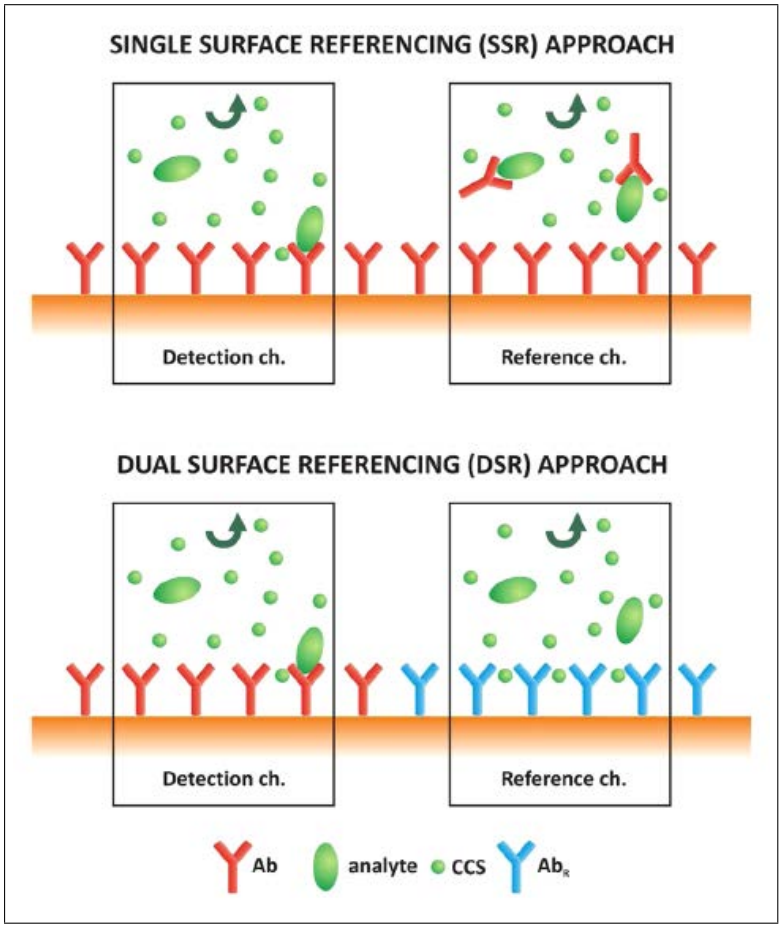


FIGURE 9.13 – **Principe des méthodes dénommées "Single Surface Referencing" et "Dual Surface Referencing".** Traditionnellement, l'estimation de la contribution non spécifique du milieu complexe contenant les molécules cibles est évalué par "Dual Surface Referencing", méthode présentée sur la partie basse de la figure. Dans ce cas, la surface de la biopuce est greffée à la fois avec des anticorps spécifiques de l'espèce recherchée, et des ligands ne présentant au contraire aucune affinité pour les molécules cibles. L'extraction du signal spécifique sur les plots sondes est alors réalisée par soustraction des données enregistrées sur les plots de contrôle négatif. Présenté sur la partie haute de la figure, l'alternative "Single Surface Referencing" utilise une surface commune, fonctionnalisée avec l'anticorps spécifique *Ab* de l'antigène recherché. L'échantillon à analysé est alors divisé en deux : l'une de ces parties est alors saturée avec ce même anticorps en solution. Les deux échantillons ainsi obtenus sont injectés dans deux canaux de fluidique distincts et analysés de manière parallèle, permettant ainsi d'évaluer précisément l'adsorption non spécifique sur les mêmes anticorps sondes déposés à la surface de la biopuce. Les données présentées proviennent des résultats publiés par Špringer et al. [117].

Offrant une distinction plus précise des interactions spécifique et non spécifique, la méthode proposée repose en particulier sur un système de fluidique multi-canaux, qui nécessite, dans le cas présent, une modification majeure du banc expérimental. D'autre part, cette méthode conduirait à une consommation deux fois plus importante des bioréactifs, dont les quantités sont souvent limitées. Par conséquent, des solutions alternatives doivent être envisagées pour la poursuite de ces travaux de détection en milieu complexe.

Une solution classique, consistant en une injection de sérum dilué en début d'expérience, a été adoptée lors de ces expériences. Peu efficace, cette méthode a conduit à une saturation des plots sondes. En effet, cette étape ne peut produire le résultat escompté sans une haute spécificité des

anticorps utilisés. Cette remarque aborde l'un des aspects les plus importants de la biodétection : la sélection et l'optimisation des ligands utilisés pour la capture des molécules recherchées. Loin d'être évidente, cette problématique requiert un travail long et fastidieux, dédié non seulement à l'étude de la spécificité, mais également à la stabilité des espèces biomoléculaires sélectionnées face aux conditions expérimentales. En effet, le comportement inhabituel noté précédemment dans le cas des anticorps αUBE2A illustre parfaitement les difficultés rencontrées lors du passage d'un système fonctionnel en solution, à une perte de réactivité à l'adsorption sur une surface.

D'autre part, en raison de la prédominance des interactions non spécifiques mise en évidence lors de ces travaux préliminaires, une expérience complémentaire pourrait être menée afin de déterminer la concentration de sérum maximale compatible avec la détection d'un signal spécifique précis. Une telle étude nécessiterait des injections de cibles répétées, à différents degrés de dilution de sérum, d'où l'importance d'une solution de régénération efficace et ne dégradant pas la qualité des anticorps. Cette étude finale, réalisée dans le cadre de cette application, est présentée dans le paragraphe suivant.

9.3.3 Régénération des complexes antigène/anticorps

La dégradation des anticorps immobilisés sous l'effet de la solution de régénération utilisée (glycine/HCl, pH 2) a été mise en évidence lors des premières caractérisations en milieu tampon. Or, en raison des faibles volumes de réactifs disponibles, et des optimisations nécessaires restant à effectuer dans le cadre de cette étude, une régénération adaptée doit impérativement être utilisée afin de pouvoir envisager une série de mesures sur une même biopuce.

En réponse à cette problématique, des expériences complémentaires ont été menées sur la quatrième lame fonctionnalisée, dans le but de déterminer les conditions de régénération optimales pour les deux complexes antigène/anticorps étudiés, UBC12/αUBC12 et UBP14/αUBP14. De manière plus concrète, des solutions de glycine préparées à des pH acides (par l'ajout d'acide chlorhydrique, HCl) et basiques (par l'ajout de soude, NaOH) ont été introduites suite à des injections d'ovalbumine ainsi que des marqueurs potentiels UBC12 et UBP14, effectuées en tampon phosphate (PBS, 10 mM).

L'alternance des séquences d'interaction/régénération ainsi réalisées est résumée dans le Tableau 9.5.

Pour une lecture plus fluide de ce manuscrit, le déroulement de cette série de mesures finale est détaillé dans l'annexe D (section D.3, p.215).

Tableau 9.5 – **Résumé des étapes de régénération réalisées sur la quatrième lame fonctionnalisée.**

Etape de régénération	Solution de régénération	Commentaire
0		Première injection des cibles : ovalbumine (10 μg/mL), UBC12 (2 μg/mL) et UBP14 (d'abord à 2 μg/mL, puis à 5 μg/mL afin d'obtenir un signal d'interaction suffisamment élevé ; les injections ultérieures ont été réalisées directement à 5 μg/mL).
1	3 injections de glycine/HCl (pH 4), puis 3 injections de glycine/NaOH (pH 9)	Faible effet de régénération observé après les 3 premières injections (glycine/HCl, pH 4). Les injections de glycine/HCl (pH 9) ont été réalisées à la suite sans réintroduction des cibles.
2	2 injections de glycine/HCl (pH 3)	Effet de régénération satisfaisant observé. Les cibles ont été injectées à la suite pour évaluer la reproductibilité des signaux d'interaction.
3	2 injections de glycine/HCl (pH 3)	Effet de régénération satisfaisant observé. Les cibles ont été injectées à la suite pour évaluer la reproductibilité des signaux d'interaction.
4	2 injections de glycine/NaOH (pH 10)	Faible effet de régénération observé. L'injection des solutions d'ovalbumine et de l'antigène UBC12 ayant conduit à des signaux d'interaction relativement faibles, l'antigène UBP14 n'est pas injecté.
5	2 injections de glycine/NaOH (pH 10)	Faible effet de régénération observé. L'injection de la solution d'ovalbumine ayant conduit à des signaux d'interaction très faibles, la série de mesure est arrêtée.

Observations

La qualité des différentes régénérations a été évaluée par la reproductibilité du signal d'interaction enregistré avant et après chaque régénération, et ce pour chacun des complexes antigène/anticorps considérés. Cette valeur, extraite 4 min après l'injection des solutions cibles sur les plots sondes correspondants, a été moyennée sur les 6 réplicats disponibles ; la dispersion a quant à elle été assimilée à leur écart-type.

Le résultat ainsi obtenu est représenté sur la Figure 9.14.

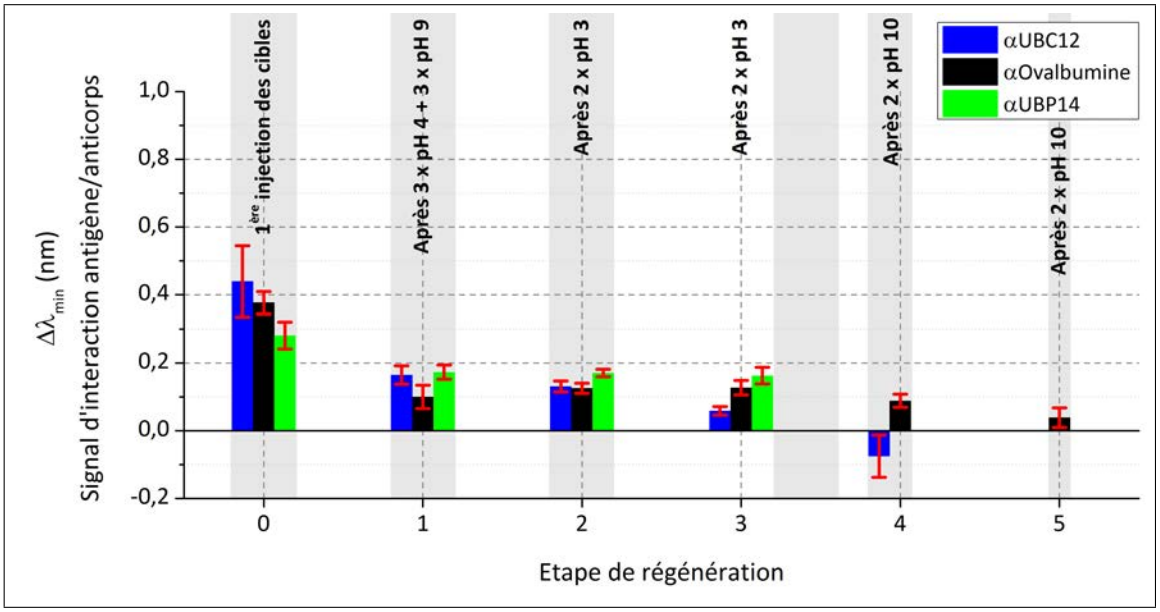


FIGURE 9.14 – **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors de l'injection d'ovalbumine et des marqueurs potentiels UBC12 et UBP14, après différentes solutions de régénération.** La solution cible d'ovalbumine a été préparée à 10 μg/mL en PBS. Les solutions des antigènes UBC12, UCHL3 et UBP14 ont été injectées à une concentration de 5 μg/mL. Les données présentées correspondent aux signaux recueillis 4 min après l'injection des cibles, moyennés sur les 6 réplicats sondes de chaque famille d'anticorps spécifique. L'erreur est associée à l'écart-type calculé sur les 6 valeurs.

Une même tendance générale peut être relevée pour les trois couples antigène/anticorps étudiés d'après ces données : une baisse importante du signal d'interaction après la première étape de régénération (une perte d'un facteur 2 environ peut être estimée pour le complexe UBP14/αUBP14, contre des facteurs 3 et 4 respectivement pour ceux UBC12/αUBC12 et ovalbumine/αOvalbumine), suivie d'une stabilisation relativement satisfaisante au cours de la série de régénérations à pH 3. Le comportement observé traduit en premier lieu une régénération inefficace par les solutions préparées à pH 4 et 9, illustrée par la cinétique relevée sur les plots d'anticorps αUBP14, après soustraction des contrôles négatifs (Figure 9.15). Moyennée sur les 6 réplicats sondes, cette évolution indique simplement un léger effet de rinçage : l'injection suivante de l'antigène conduit en effet à un signal d'interaction nettement moins intense.

D'autre part, une dégradation des plots d'anticorps par ces deux premières solutions de pH 4 et 9 peut être suspectée. En effet, malgré la bonne reproductibilité des mesures durant la séquence de régénération à pH 3 (à l'exception du complexe UBC12/αUBC12 qui affiche une baisse de signal, et ce après la deuxième série d'injections à pH 3), cette solution ne parvient pas à reproduire l'amplitude d'interaction atteinte lors de la toute première injection des cibles, comme le met en évidence la cinétique d'interaction du complexe UBP14/αUBP14, représentée sur la Figure 9.16, après soustraction des contrôles négatifs et moyenne des 6 réplicats sondes.

Une efficacité partielle de la solution à pH3 peut également être envisagée d'après l'évolution observée sur la Figure 9.16. Une expérience complémentaire permettrait de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

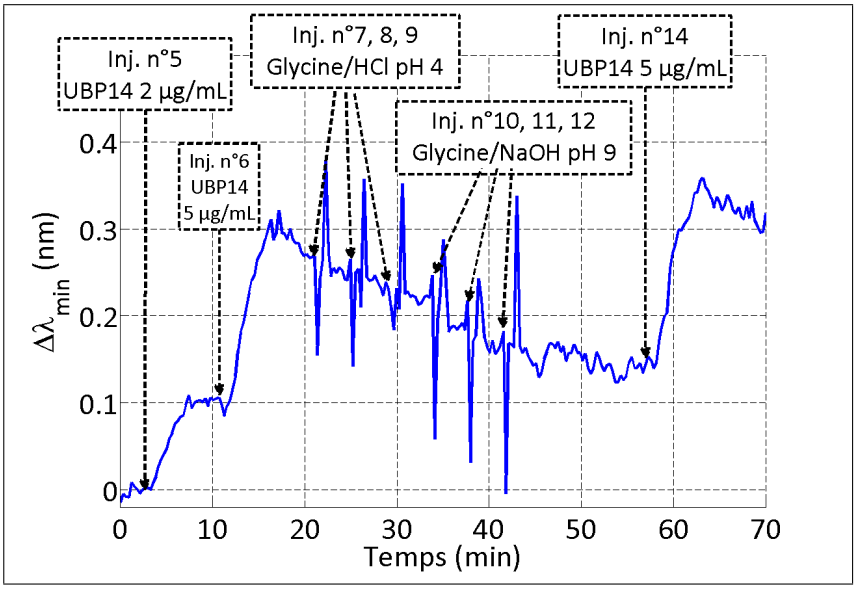


FIGURE 9.15 – **Cinétique complète des injections du marqueur potentiel UBP14 n°5 (2 μg/mL), n°6 (5 μg/mL) et n°14 (5 μg/mL).** La courbe présentée correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

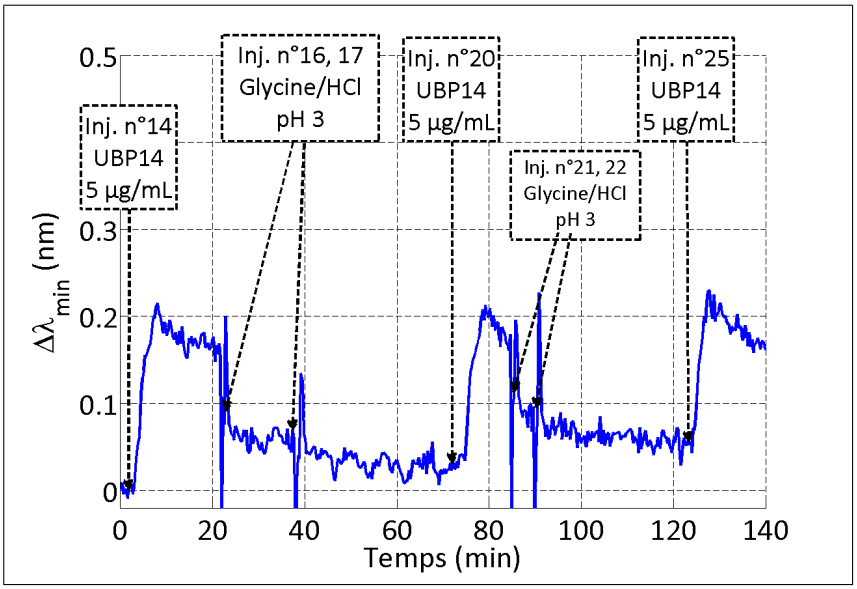


FIGURE 9.16 – **Cinétique complète des injections du marqueur potentiel UBP14 n°14, n°20 et n°25 (5 μg/mL).** La courbe présentée correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

Enfin, les résultats relatifs à la régénération à pH 10 démontrent également une certaine inefficacité, voire une tendance à dégrader la qualité des anticorps greffés sur la surface de la biopuce. Cette observation conduit à penser que l'utilisation d'une solution basique (de pH 9 ou 10) serait à éviter absolument pour cette application : une expérience complémentaire demeure cependant nécessaire pour étudier cette supposition.

Conclusion

La solution basée sur un mélange de glycine/HCl à pH 3 semble fournir les meilleurs résultats en termes de reproductibilité des mesures. Cependant, il est important de noter que le signal d'interaction enregistré suite aux deux régénérations ainsi effectuées est plus faible que lors de la première injection des cibles, en début d'expérience. Il est probable que les injections réalisées à pH 4 et 9 aient dégradé la réactivité des anticorps. Pour cette raison, une caractérisation complémentaire devrait être envisagée afin de confirmer la compatibilité de la solution sélectionnée vis-à-vis des espèces biomoléculaires en présence, ainsi que son efficacité de régénération, dans un premier temps en tampon phosphate, puis dans un second temps en sérum dilué.

9.4 Conclusion des expériences de détection en milieu complexe et perspectives

L'étude préliminaire exposée dans ce chapitre a été motivée par les résultats obtenus lors des développements expérimentaux présentés précédemment (partie II et partie III). La robustesse affichée par la méthode d'interrogation multi-spectrale implémentée a en effet permis d'envisager des applications de biodétection en milieu complexe, nécessitant une dynamique de mesure plus étendue que celle offerte par l'interrogation en réflectivité.

Afin d'évaluer les performances de cette nouvelle technique en conditions dites "réelles", une étude concrète, dédiée à la détection multiplexe de marqueurs potentiels du cancer en sérum, a pu être envisagée grâce à la contribution du Dr. Damjana Kastelic du Centre de Recherche Allemand sur le Cancer, situé à Heidelberg. Quatre antigènes intervenant dans le système de ubiquitine-protéasome (UPS en référence à l'anglais *Ubiquitin-Proteasome System*) ont ainsi été analysés dans le cadre de ces travaux. Notés respectivement UBC12, UBP14, UBE2A et UCHL3, ces composés enzymatiques assurent la dégradation des protéines, et jouent par conséquent un rôle primordial dans la régulation des activités cellulaires. Le dysfonctionnement du système UPS étant susceptible de conduire à un comportement cancéreux, ces espèces constituent des cibles particulièrement intéressantes à la fois pour le diagnostic et le traitement par chimiothérapie.

La problématique de détection de ces antigènes en milieu complexe a été abordée de manière graduelle. Une première étape de caractérisation en milieu phosphate a permis d'évaluer la réactivité des anticorps spécifiques αUBC12, αUBP14, αUBE2A et αUCHL3 vis-à-vis des marqueurs potentiels recherchés, ainsi que la limite de détection de ces espèces dans ces conditions contrôlées. Cette expérience a également mis en évidence une sensibilité des anticorps au dépôt en surface, ainsi qu'à la régénération de la biopuce.

Suite à ces premiers résultats, l'étude a été concentrée sur les complexes UBC12/αUBC12 et UBP14/αUBP14, seuls ayant conduit à des réponses satisfaisantes. Une seconde étape de caractérisation a été menée en milieu complexe, par injection des deux antigènes en sérum dilué. L'absence d'un signal détectable a été attribué à la prédominance de l'adsorption non spécifique, rendant difficile l'interprétation des données issues des plots d'anticorps αUBC12 et αUBP14 vis-à-vis des contrôles négatifs.

En vue des expériences complémentaires envisagées à ce stade, une série de mesures supplémentaire a été réalisée dans le but de déterminer les conditions de régénération optimales, compatibles avec les anticorps sondes utilisés dans le cadre de cette application. Des résultats prometteurs ont ainsi été obtenus pour une solution de glycine/HCl à pH 3.

L'affinité des espèces sondes αUBC12, αUBP14, ainsi que celles IgG servant de contrôle négatif, vis-à-vis des composants du sérum, constituent une limitation importante à la détection

spécifique des antigènes étudiés. De ce fait, en dépit des performances de robustesse de la méthode d'interrogation spectrale, offrant une solution instrumentale adaptée à une telle analyse en milieu complexe, la présence des espèces cibles n'a pu être détectée en sérum dilué. Les expériences présentées dans ce chapitre constituent cependant une première approche de la détection en milieu complexe, et des analyses complémentaires restent nécessaires pour mener à terme cette étude. La mise en place d'une méthode passivation plus efficace de la biopuce, la recherche d'une solution de régénération adaptée, ainsi que l'évaluation des performances de détection des biomarqueurs potentiels pour des dilutions de sérum plus faibles (1% à 10% par exemple) constituent les axes de travail actuellement envisagés.

Chapitre 10

SPRI et SERS : le projet ANR PIRANEX

Sommaire

10.1 Principe général **170**
10.2 Quelques mots sur la spectroscopie Raman exaltée de surface . **171**
10.2.1 La diffusion Raman 171
10.2.2 L'effet SERS 173
10.3 Modélisation des échantillons nanostructurés et validation expérimentale **173**
10.3.1 Validation d'un substrat commun 174
10.3.2 Etudes préliminaires des propriétés plasmoniques 177
10.4 Conclusions des résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet ANR PIRANEX **181**

L'étude d'échantillons réels, abordée dans le chapitre précédent, a mis en évidence les limites de la SPR face à l'identification spécifique des espèces cibles en milieu complexe. En effet, la spécificité est assurée à l'heure actuelle par la fonctionnalisation chimique de la biopuce, en particulier à travers le choix des ligands sondes permettant de capturer les biomolécules cibles recherchées. Or, la complexité de l'échantillon étudié conduit très souvent à la présence d'interactions non spécifiques importantes, d'où un recours de plus en plus répandu à une analyse complémentaire apportant une signature caractéristique de l'espèce adsorbée sur la biopuce.

Une telle spécificité de biodétection peut ainsi être obtenue par couplage avec la spectrométrie de masse (MS ou *Mass Spectrometry*). Bien établie à l'échelle industrielle [118], cette méthodologie est basée sur une analyse en deux étapes. Dans un premier temps, l'adsorption de matériel biologique est détectée par SPR ; dans un second temps, la biopuce est transférée à un module de détection par MS, dans lequel les espèces capturées sont identifiées sans ambiguïté par leur réponse spectrale propre [119].

Récemment, une approche alternative a été initiée suite aux performances intéressantes démontrées par la spectroscopie Raman exaltée de surface (communément appelée SERS en référence à *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). Basée sur une amplification de l'émission spectrale des espèces cibles par structuration de surface du substrat, cette technique relativement nouvelle permet d'atteindre d'une part la spécificité recherchée, et d'autre part une sensibilité exaltée la rendant particulièrement adaptée à l'analyse de biomolécules présentes à l'état de traces.

Ces considérations pratiques ont conduit à la naissance du projet ANR PIRANEX (ANR-12-NANO-0016), destiné à l'élaboration d'un instrument bimodal combinant une mesure par SPR à une identification par effet SERS. Rassemblant divers partenaires de la recherche et de l'industrie, spécialistes de physique, chimie et biologie, cette problématique annonce de manière implicite des contraintes expérimentales extrêmement variées : optimisation d'un substrat structuré commun aux mesure SPR et SERS, développement d'un protocole de fonctionnalisation chimique adapté, recherche d'une configuration instrumentale répondant au cahier des charges des deux techniques combinées, validation du prototype final sur des bio-modèles pré-établis... Présentée brièvement dans ce chapitre, l'étude menée sur la nanostructuration des substrats vise à décrire l'état d'avancement de ce projet interdisciplinaire.

10.1 Principe général

Une vue schématique du prototype, visé dans le cadre du projet ANR PIRANEX, est représentée sur la Figure 10.1. Une base instrumentale, constituée d'une source monochromatique de type LED éclairant une biopuce plasmonique dans la configuration de Kretschmann et d'une caméra CCD, permet l'enregistrement du signal SPR en temps réel. Les cinétiques des interactions biomoléculaires sont alors accessibles en tout point du substrat analysé. Dans une seconde étape, les coordonnées des plots sondes ayant exprimé un signal spécifique sont transférées au module SERS, placé au-dessus de la biopuce : le déplacement du faisceau laser incident dans le plan horizontal permet un balayage de la surface et l'acquisition de la signature Raman des espèces cibles adsorbées sur les plots d'intérêt sélectionnés.

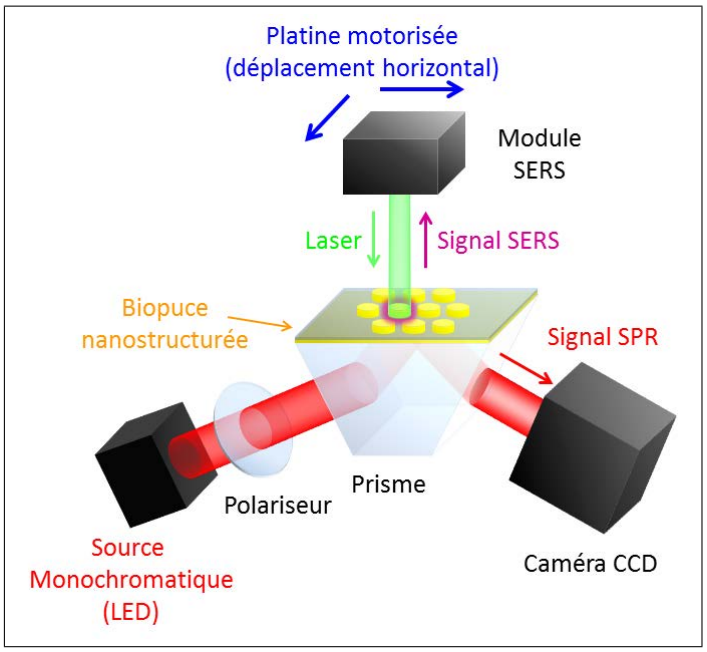


FIGURE 10.1 – **Principe simplifié de l'instrument bimodal combinant une mesure SERS et SPR.** Dans la configuration instrumentale envisagée, la partie inférieure du montage est consacrée à la mesure SPR. Dans la configuration de Kretschmann, une biopuce, placée sur un prisme, est illuminée par une source monochromatique (LED). Le signal est recueilli en temps réel et sur toute la surface analysée par une caméra CCD. La partie supérieure du prototype, constituée du module SERS, est exploitée après détection spécifique par SPR : le point de focalisation du laser excitateur est déplacé dans le plan de la biopuce jusqu'aux plots sondes d'intérêt. La mesure Raman permet alors l'identification précise des espèces cibles adsorbées.

Outre les contraintes expérimentales évidentes liées à l'assemblage de deux techniques distinctes en un seul et même instrument, la problématique majeure posée par le projet ANR PIRANEX réside dans l'utilisation d'une biopuce commune. En effet, ce substrat particulier doit présenter des propriétés plasmoniques adaptées d'une part à la détection de traces par une lecture SPR conventionnelle, et d'autre part à l'exaltation du phénomène Raman, destiné à produire la signature spécifique des biomolécules adsorbées. Pour cette raison, une nanostructuration adaptée de la surface de la biopuce a été envisagée.

L'optimisation de la configuration du substrat vis-à-vis de ces contraintes est actuellement réalisée en deux étapes principales. En premier lieu, des simulations effectuées au Laboratoire Charles Fabry permettent de déterminer l'influence des différents paramètres de la nanostructuration. Dans un second temps, la fabrication des échantillons jugés optimaux, effectuée par l'Institut d'Electronique Fondamentale, intervenant dans le projet ANR PIRANEX, permet une caractérisation expérimentale des propriétés plasmoniques attendues. Les résultats relatifs à cette étude, présentés dans les paragraphes suivants, rendent compte des difficultés techniques liées à cette problématique particulière.

10.2 Quelques mots sur la spectroscopie Raman exaltée de surface

Au coeur du projet ANR PIRANEX, la spectroscopie Raman exaltée de surface, communément désignée par l'acronyme *SERS* (en référence à *Surface Enhanced Raman Scattering*), représente une méthode analytique couramment employée pour l'identification des molécules présentes au sein d'un échantillon. Afin d'appréhender les défis posés par le couplage de cette technique à celle de SPR, quelques données relatives au phénomène de diffusion Raman et à son application expérimentale sont présentées de manière succincte dans la suite de ce paragraphe.

10.2.1 La diffusion Raman

Mise en évidence en 1928 par Chandrashekhara Venkata Râman [120], la diffusion Raman repose sur une interaction lumière-matière, entre un faisceau de lumière monochromatique en incidence sur un échantillon et des molécules présentes dans ce milieu. Plus précisément, ce phénomène fait intervenir un échange d'énergie, correspondant à l'absorption d'un photon incident, suivie d'une diffusion élastique (Rayleigh) et inélastique, de type Stokes et anti-Stokes (Figure 10.2).

Dans une telle configuration, la majeure partie de la lumière est rediffusée à la fréquence excitatrice ν_0 (diffusion de Rayleigh) : l'énergie incidente absorbée induit l'excitation des molécules constituant l'échantillon vers un niveau vibrationnel virtuel $E_{virtuel}$, puis une désexcitation radiative vers le niveau fondamental E_0.

Cependant, une légère fraction de photons incidents peuvent être ré-émis à une fréquence optique plus faible : ce cas particulier correspond à la diffusion Stokes, pour laquelle les molécules se désexcitent vers un état vibrationnel v_1 différent de celui fondamental v_0. La fréquence diffusée est alors décalée d'une quantité ν_S de celle initiale : ce décalage spectral est représentatif des niveaux vibrationnels, et donc de la structure de l'échantillon analysé.

De manière similaire, l'absorption de la lumière incidente peut intervenir à un niveau vibrationnel v_1 : la désexcitation vers l'état fondamental v_0 s'accompagne alors d'une émission radiative à une fréquence plus élevée $\nu_0 + \nu_S$: il s'agit de la diffusion anti-Stokes.

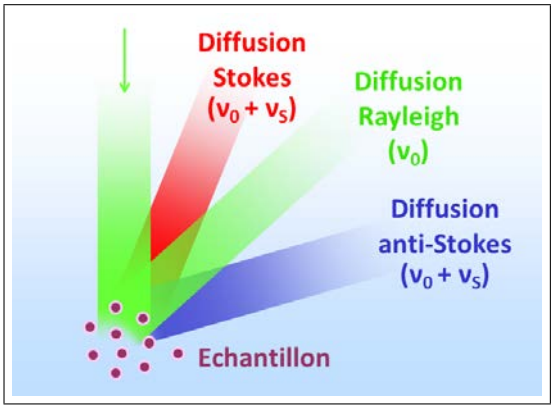
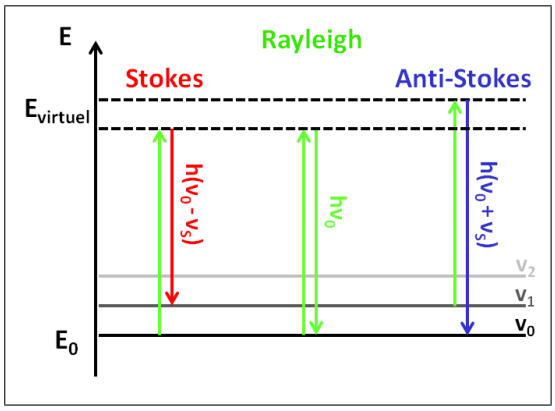
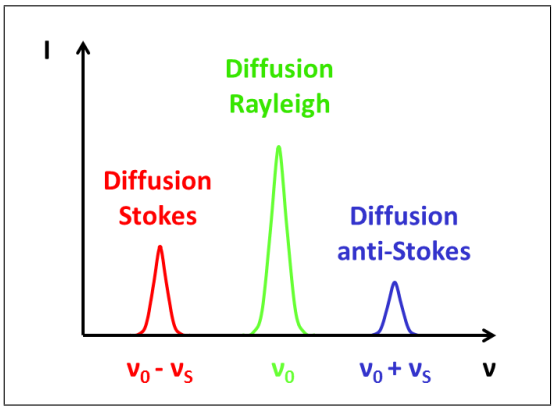


FIGURE 10.2 – **Illustration du principe de la diffusion Raman.** Un faisceau incident sur un échantillon est majoritairement diffusé de manière élastique (diffusion de Rayleigh), soit à la fréquence optique d'excitation. Une diffusion inélastique, de type Stokes ou anti-Stokes, peut également être observée à des fréquences respectivement plus faibles et plus élevées par rapport à celle incidente.

Ainsi, l'acquisition du spectre de diffusion offre une information qualitative et quantitative sur la structure de l'échantillon étudié, à travers l'amplitude et la position des bandes Stokes et anti-Stokes. Le principe de la caractérisation Raman, qui peut être appliquée à l'analyse de tout matériau solide, liquide ou gazeux, est illustré sur la Figure 10.3.



(a) **Illustration de la diffusion Raman par un diagramme énergétique simplifié.**



(b) **Spectre typique observé lors de la diffusion Raman.**

FIGURE 10.3 – **Principe physique du phénomène de diffusion Raman.** Un faisceau lumineux monochromatique, en incidence sur un échantillon donné, est majoritairement diffusé à la fréquence optique ν_0 initiale. Il s'agit de la diffusion Rayleigh, correspondant à l'excitation des molécules constituant le milieu étudié, depuis un état vibrationnel fondamental v_0 vers un état vibrationnel virtuel, suivie d'une désexcitation radiative vers l'état de départ. Une infime partie des photons peut cependant être diffusée à une fréquence plus faible, décalée d'une quantité ν_S par rapport à la fréquence excitatrice. Cette diffusion "Stokes" correspond à une désexcitation vers un niveau vibrationnel v_1 plus élevé que celui fondamental v_0. Un cas de diffusion "anti-Stokes" peut également être observé, lorsque l'excitation intervient directement à partir du niveau vibrationnel v_1 : la fréquence optique émise est alors plus élevée que celle incidente d'une quantité ν_S.

Bien que porteuse d'une information précise sur la composition de l'échantillon analysé, la spectroscopie Raman souffre d'une limitation relativement importante, liée à un signal utile extrêmement faible. En effet, alors que la majeure partie du faisceau incident est ré-émise à la fréquence optique d'excitation, seul un photon sur 10^7 est diffusé par les phénomènes Stokes

et anti-Stokes. La détection de molécules à l'état de traces nécessite par conséquent une amplification de la signature spectrale d'intérêt : l'exaltation par effet de surface, présentée dans le paragraphe suivant, permet ainsi d'atteindre un gain de signal suffisant pour cette application.

10.2.2 L'effet SERS

Introduite en 1974 par Fleischmann et al. [121], la spectroscope Raman exaltée de surface repose sur l'excitation de modes plasmoniques localisés au sein de substrats nanostructurés. Dans une configuration typique (Figure 10.4), les molécules constituant l'échantillon analysé sont adsorbées sur une biopuce plasmonique structurée. De la même manière que pour le cas conventionnel présenté dans le paragraphe précédent, un faisceau monochromatique est utilisé pour sonder les niveaux vibrationnels des cibles ainsi déposées. Cependant, dans ce cas précis, le champ électromagnétique incident est amplifié par couplage aux plasmons de surface localisés sur les nanostructures, conduisant à une augmentation de l'effet Raman. De même, les émissions Stokes et anti-Stokes, se produisant à proximité des "points chauds" de la biopuce, bénéficient de la même amplification et génèrent un signal spécifique 10^4 à 10^{11} fois plus important [122].

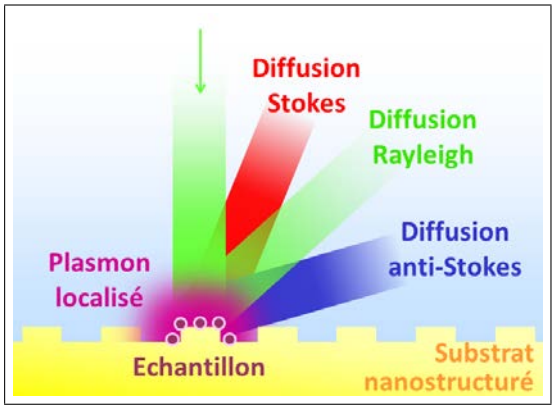


FIGURE 10.4 – **Illustration du principe de la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS).** L'amplification de la diffusion inélastique est obtenue par couplage du faisceau incident aux plasmons de surface localisés sur un échantillon nanostructuré. L'adsorption de molécules cibles aux points d'exaltation du champ électromagnétique permet une amplification des émissions de type Stokes et anti-Stokes.

Une sensibilité permettant une caractérisation à l'échelle de la molécule unique peut ainsi être atteinte [123], d'où un usage répandu dans le cadre d'analyse de traces [124]. L'intérêt de cette méthode pour le projet ANR PIRANEX découle naturellement de cette propriété particulière.

La combinaison des techniques de caractérisation SPR et SERS, rendue possible par l'exploitation d'un phénomène physique commun, nécessite une optimisation rigoureuse de la structuration du substrat supportant les modes plasmoniques localisés. Cet aspect central du projet est abordé de manière théorique et expérimentale dans le paragraphe suivant.

10.3 Modélisation des échantillons nanostructurés et validation expérimentale

Du fait de ses activités de recherche étendues en plasmonique, le Laboratoire Charles Fabry dispose d'une plateforme de simulation dédiée à la modélisation des propriétés optiques de substrats nanostructurés. En particulier, un code hybride, combinant les avantages de la méthode

modale de Fourier et de celle des éléments finis, a récemment été implémenté dans le cadre de la nano-/micro- structuration en deux dimensions des biopuces [125]. Etendu depuis à l'étude de motifs en trois dimensions, ce code permet d'accéder aux profils angulaires et spectraux de la résonance, de même qu'à la distribution du champ électromagnétique, renseignant sur la portée de l'exaltation plasmonique. La simulation des propriétés de l'exaltation Raman, menée de manière parallèle, ne sera pas abordée dans ce chapitre.

10.3.1 Validation d'un substrat commun

Dans le cadre du projet ANR PIRANEX, la structure de biopuce envisagée est une matrice de plots cylindriques (définis par leur hauteur h_2, leur diamètre D et leur période Λ) déposés sur un film d'or uniforme d'épaisseur h_1 (Figure 10.5). L'illumination est alors réalisée à travers un prisme de verre d'indice n_b, par un faisceau incident formant un angle θ par rapport à la surface structurée, et un angle azimutal Φ par rapport à la direction perpendiculaire à la périodicité.

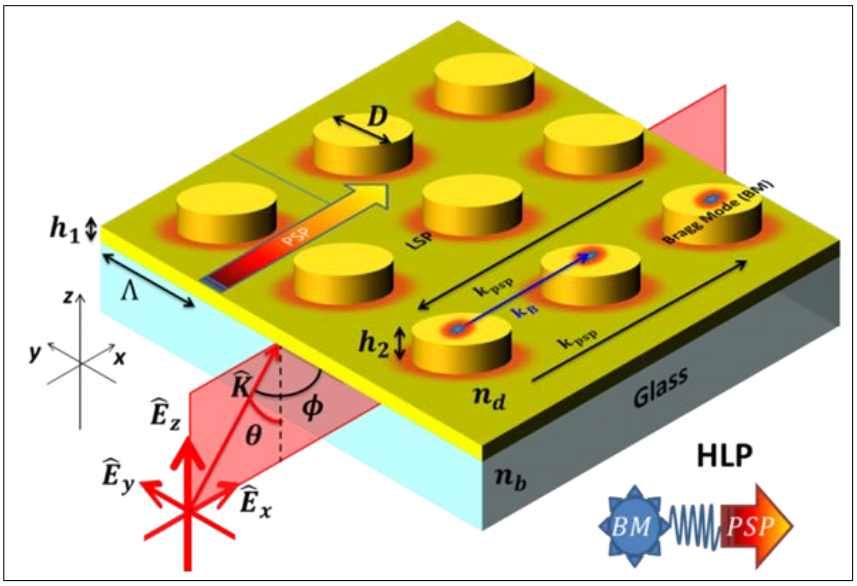


FIGURE 10.5 – **Structuration en motifs cylindriques périodiques étudiée dans le cadre du projet ANR PIRANEX.** Les paramètres relatifs aux motifs, soit l'épaisseur h_1 du film d'or, le diamètre D, la hauteur h_2 et la période Λ, peuvent être ajustés de manière à optimiser la sensibilité de la biopuce plasmonique ainsi obtenue. Les résultats présentés proviennent des résultats de Sarkar et al. [126].

Dans une telle configuration, trois modes plasmoniques peuvent être générés [126] :

- Un mode de Bragg noté *BM* (ou *Bragg Mode*), induit par la périodicité des motifs, pour lequel le champ électrique est localisé sur la partie supérieure des cylindres.
- Un mode plasmon localisé (*Localized Surface Plasmon* ou *LSP*), dépendant de la forme des nanostructures (diamètre, hauteur), localisé à leur base.
- Un mode dit "couplé" ou *HLP* (en référence à la désignation *Hybrid Lattice Plasmon*), résultant du couplage entre le plasmon propagatif (*PSP* ou *Propagating Surface Plasmon*) excité à la surface du film d'or et le mode de Bragg *BM*.

Dans une configuration jugée optimale (pour des valeurs de h_1 et h_2 égales à 30 nm, un diamètre D de 80 nm et une période Λ de 200 nm), ces trois modes plasmoniques peuvent être excités dans la gamme spectrale 500 nm - 1000 nm pour un angle d'incidence θ choisi de 71.1 ° (angle interne pour un prisme de verre BK7). La Figure 10.6 présente la confrontation des simulations effectuées sur la base de ces paramètres par Mitradeep Sarkar, en thèse au Laboratoire Charles Fabry (LCF), face aux résultats expérimentaux obtenus sur une biopuce nanostructurée (suivant ces mêmes paramètres), réalisée par Jean-François Bryche à l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF), et caractérisée par Aurore Olivéro (LCF).

Le profil spectral de la réflectivité (TM/TE), obtenu expérimentalement avec le banc de caractérisation angulo-spectral (partie II) démontre clairement l'existence des trois modes plasmoniques prédis par les simulations numériques.

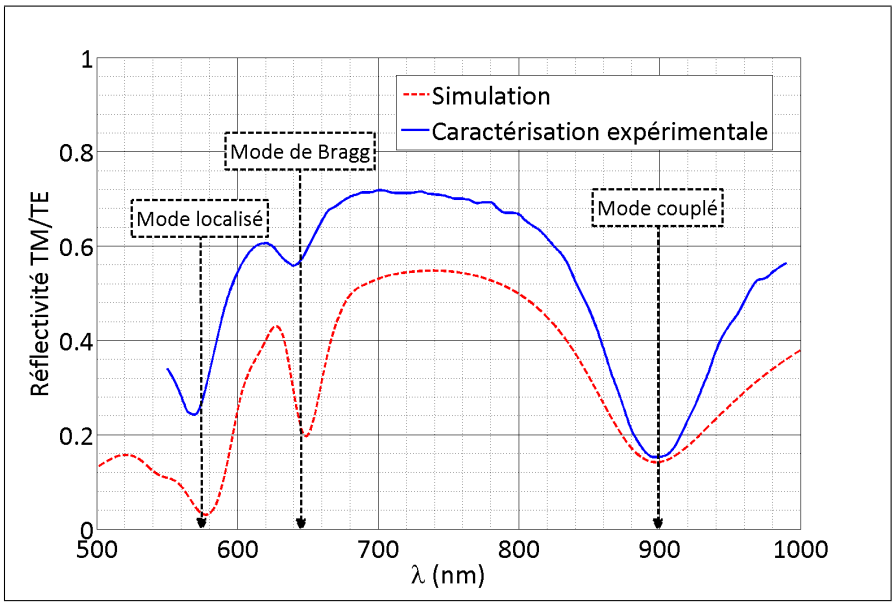


FIGURE 10.6 – **Profil spectral de résonance pour un angle d'incidence de 71.1 ° sur un prisme de verre BK7.** Une épaisseur de 30 nm commune au film d'or et aux cylindres, un diamètre de 80 nm et une période de 200 nm ont été considérés lors des simulations et de la fabrication de la biopuce. Les résultats théoriques et expérimentaux ont été obtenus respectivement par Mitradeep Sarkar et Aurore Olivéro, doctorants au Laboratoire Charles Fabry.

La Figure 10.7 montre une image de microscopie électronique à balayage des nanostructures correspondantes, fabriquées par lithographie à faisceaux d'électrons.

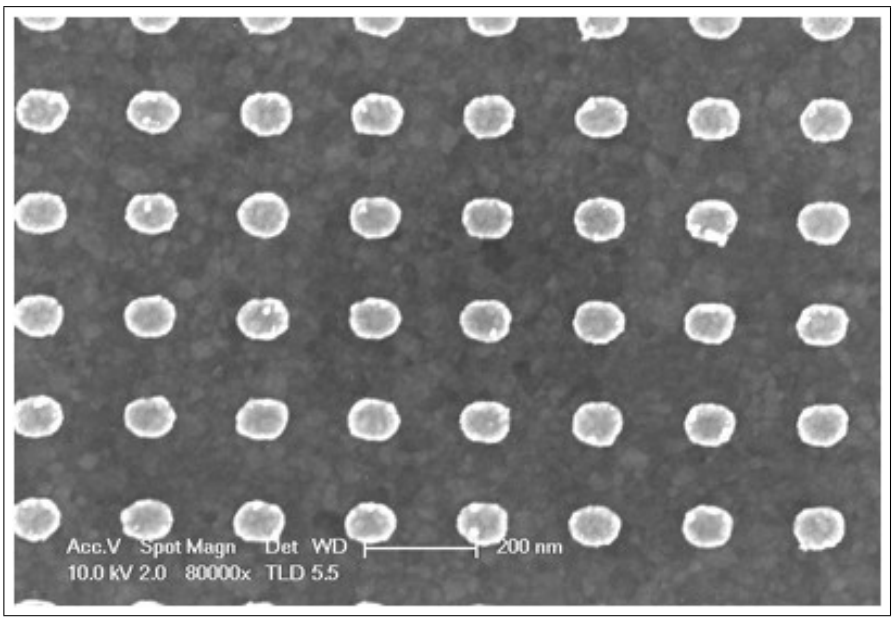


FIGURE 10.7 – **Image de microscopie électronique à balayage d'un échantillon nanostructuré.** Une épaisseur de 30 nm commune au film d'or et aux cylindres, un diamètre de 80 nm et une période de 200 nm ont été considérés lors de la fabrication de la biopuce. Cette caractérisation a été réalisée par Jean-François Bryche (IEF).

Parallèlement à ces premières caractérisations plasmoniques, des mesures SERS ont été réalisées au laboratoire de Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT) par Raymond Gillibert. L'exaltation Raman a été mise en évidence dans le cadre de la détection du thiophénol, pour trois couples diamètre-période différents, notés 200-300, 200-350 et 200-400 (chaque dimension étant exprimée en nanomètres). La comparaison des signatures spécifiques associées et celle enregistrée sur un film d'or plat (*flat gold layer*) est présentée sur la Figure 10.8.

En premier lieu, l'absence de signal détectable, dans le cas d'un film métallique plat, démontre la nécessité d'une structuration de la surface à l'échelle de la centaine de nanomètres afin de générer un signal Raman mesurable. D'autre part, dans le cas des nanostructures métalliques étudiées ici, un signal SERS important est généré pour le thiophénol, d'autant plus élevé que la période des motifs est faible.

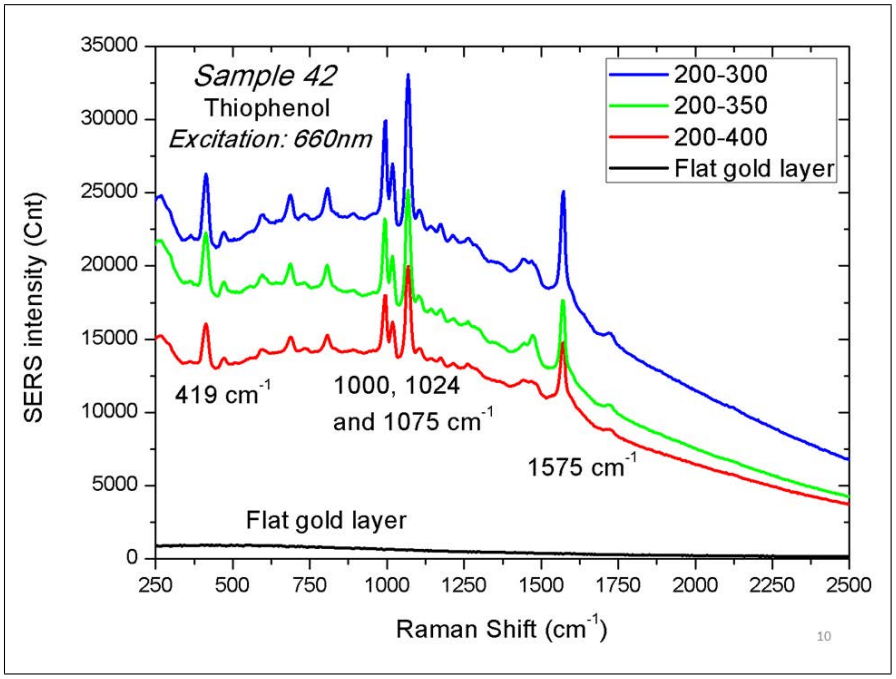


FIGURE 10.8 – **Signaux SERS enregistrés dans le cas du thiophénol, adsorbé sur trois échantillons nanostructurés différents.** Trois couples diamètre-période ont été caractérisés dans cette étude, notés 200-300, 200-350 et 200-400 d'après les dimensions exprimées en nanomètres. Le signal détecté pour l'adsorption du thiophénol sur un film d'or plat (*flat gold layer*) est représenté à titre de référence. Les caractérisations présentées ont été réalisées par Raymond Gillibert (CSPBAT).

Ces résultats encourageants marquent ainsi une première étape de validation de la structuration choisie, constituée de nanocylindres déposés sur d'un film d'or de 30 nm, dans le cadre de la recherche d'un substrat commun aux mesures SPR et SERS. Les observations rapportées permettent également d'envisager une étude complémentaire des propriétés plasmoniques de telles biopuces : quelques caractérisations préliminaires, réalisées au Laboratoire Charles Fabry, sont présentées dans la suite de ce paragraphe.

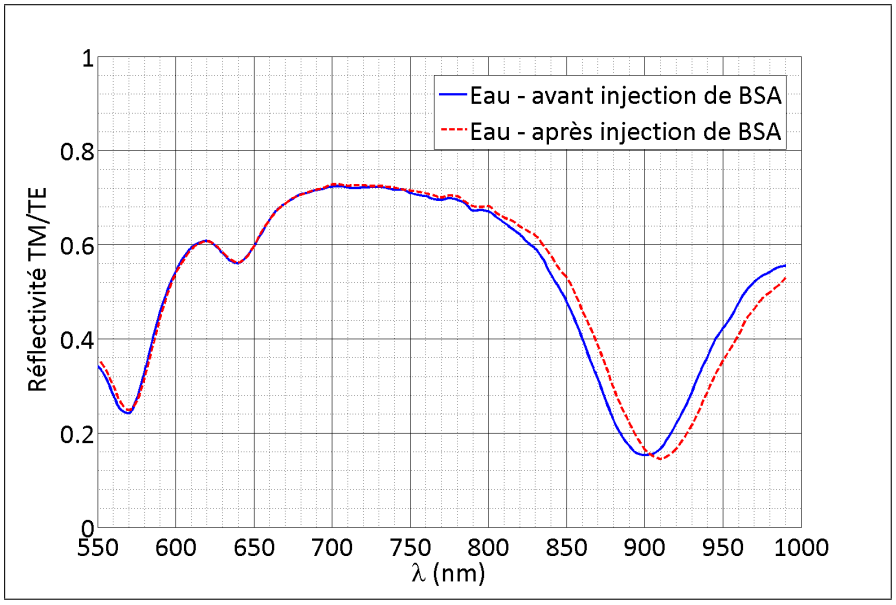
10.3.2 Etudes préliminaires des propriétés plasmoniques

Présentant des propriétés semblables au plasmon propagatif conventionnel, le mode couplé est fortement affecté par les modifications du milieu diélectrique couvrant. Plus précisément, le confinement du champ électrique associé, sur les nanocylindres, présente une portée limitée (≈ 30 nm), adaptée à la détection d'évènements biomoléculaires se produisant au voisinage immédiat des structures. De ce fait, l'optimisation des différents paramètres étudiés, soit les hauteurs h_1 et h_2 du film d'or et des cylindres, leur diamètre D ainsi que la période Λ de l'arrangement, est effectuée vis-à-vis de la sensibilité de ce mode particulier. De manière plus concrète, deux propriétés sont à différencier dans cette étude :

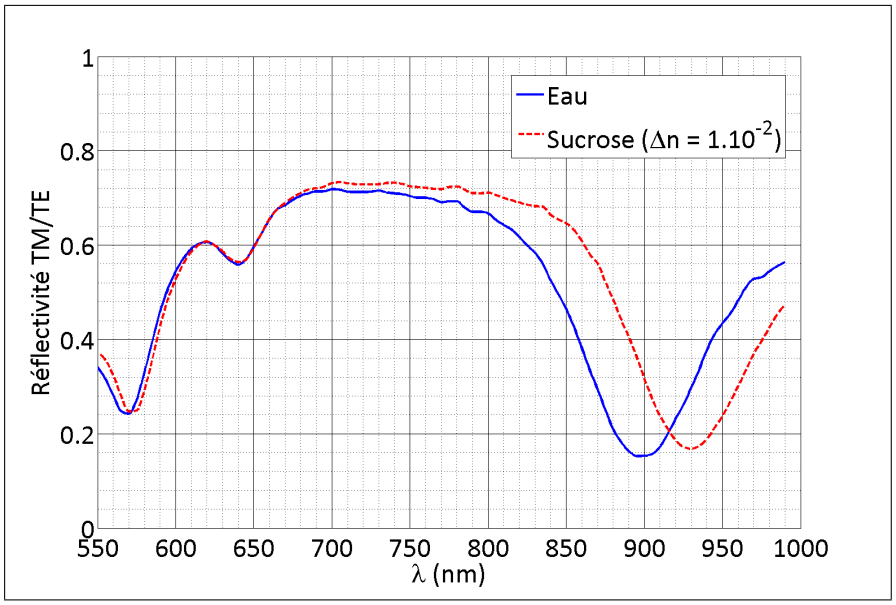
- La sensibilité du mode couplé à l'adsorption d'une couche biologique, qui doit être maximale.
- La sensibilité aux variations d'indice du milieu couvrant, dont l'amplitude doit être minimisée pour rendre la biodétection indépendante des fluctuations de température du milieu couvrant ou des variations de concentration de la solution contenant les espèces cibles recherchées.

Dans le cas de la structure présentée précédemment ($h_1 = h_2 = 30nm$, $D = 80$ nm et $\Lambda = 200$ nm), ces deux contributions ont été déterminées expérimentalement, en interrogation spectrale, pour un angle d'incidence fixe de 71.1 °). En effet, en raison du plus faible contraste de résonance observé en comparaison avec un plasmon propagatif conventionnel sur un film d'or plat, ce type de mesure (ou son analogue, l'interrogation angulaire) doit être privilégié face à l'interrogation en réflectivité. Les développements expérimentaux réalisés précédemment dans le cadre de la méthode d'interrogation multi-spectrale prennent de ce fait une signification nouvelle dans ce projet.

La sensibilité du mode couplé à l'adsorption d'une couche biologique a ainsi été évaluée dans le cas de l'albumine (*BSA* ou *Bovine Serum Albumin*), en étudiant la position spectrale du mode localisé dans l'eau, avant et après injection de BSA à 1 mg/mL en tampon phosphate. De même, la sensibilité aux variations d'indice du milieu diélectrique a été estimée d'après le décalage spectral induit par un saut d'indice de 10^{-2} RIU. Les résultats obtenus lors de ces caractérisations expérimentales sont présentées sur la Figure 10.9.



(a) **Décalage spectral du mode couplé observé pour l'adsorption d'une monocouche de BSA.** Le profil spectral plasmonique a été enregistré en eau, avant et après injection d'une solution de BSA (albumine) préparée à 1 mg/mL en tampon phosphate.



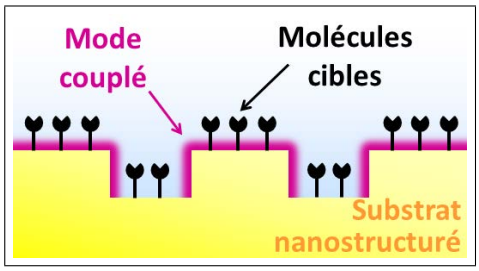
(b) **Décalage spectral du mode couplé observé pour un saut d'indice de 10^{-2} RIU.** Le profil spectral plasmonique a été enregistré en eau, puis dans une solution de sucrose présentant une différence d'indice optique de 10^{-2} RIU par rapport à l'eau.

FIGURE 10.9 – **Etude de la sensibilité du mode couplé à l'adsorption de matériel biologique et à la variation d'indice du milieu couvrant.** La structure étudiée ($h_1 = h_2 = 30$ nm, $D = 80$ nm et $\Lambda = 200$ nm) a été analysée en interrogation spectrale, à un angle d'incidence fixe de 71.1 ° (angle interne pour un prisme de verre BK7). Les résultats présentés ont été obtenus par Aurore Olivéro, doctorante au Laboratoire Charles Fabry.

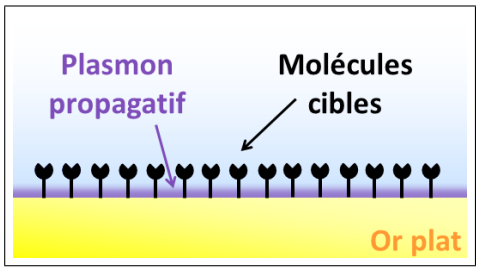
Des sensibilités respectives de l'ordre de 3 nm/nm (soit le décalage spectral observé par nanomètre de couche biologique adsorbée) et 3000 nm/RIU (soit le décalage observé par unité d'indice

réfractif) peuvent être estimées d'après ces résultats. En comparaison, les valeurs obtenues pour une biopuce conventionnelle (or plan) sont quant à elles estimées à 4 nm/nm et 4000 nm/RIU à 750 nm.

Ainsi, la biopuce nanostructurée étudiée, pour laquelle d'excellentes performances en SERS ont été démontrées précédemment, peut être également utilisée en SPR. Bien qu'aucune amélioration, en termes de signal plasmonique, n'ait été observée au premier abord par rapport à une puce conventionnelle, il est important de souligner que dans le cas du mode couplé, seule la contribution des molécules adsorbées sur les cylindres est significative (Figure 10.10a). En effet, l'accrochage de matériel biologique sur la partie d'or plan située entre les nanocylindres n'induit pas de décalage de la résonance, en raison de la très faible amplitude du champ électrique à cet endroit. En revanche, dans le cas d'une biopuce conventionnelle, toutes les espèces accrochées contribuent de manière équivalente au signal enregistré (Figure 10.10b).



(a) **Sensibilité locale du mode couplé à l'adsorption de biomolécules sur la biopuce.**



(b) **Sensibilité étendue du plasmon propagatif à l'adsorption de biomolécules sur la biopuce.**

FIGURE 10.10 – **Différence des surfaces sondées par le mode couplé, dans le cas d'une biopuce structurée, et du plasmon propagatif, dans le cas d'une biopuce conventionnelle.**

De ce fait, une quantité moindre de molécules cibles est nécessaire dans le cas d'une biopuce structurée pour produire un signal comparable à celui enregistré pour un film d'or plat. Les applications de détection de molécules présentes à l'état de traces peuvent donc tirer profit d'une telle configuration, à condition de limiter l'adsorption des molécules cibles aux points chauds de la structure (les cylindres, dans le cas présent). Cette localisation peut être réalisée par le dépôt d'une couche de silice : une chimie orthogonale, basée sur les affinités différentes des matériaux en présence, permet alors le greffage des molécules sondes aux endroits désirés (Figure 10.11).

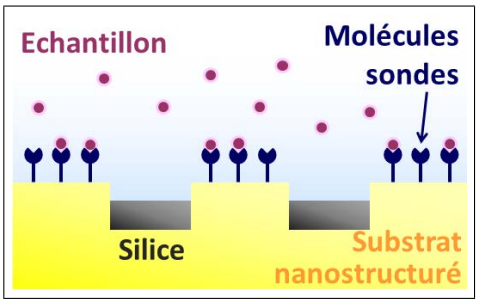


FIGURE 10.11 – **Principe de la localisation des molécules sondes et cibles sur les nanocylindres.** Un dépôt de silice permet de bloquer les parties d'or plat ne contribuant pas au signal SPR correspondant au mode localisé. L'utilisation d'une fonctionnalisation chimique orthogonale permet le greffage des molécules sondes sur les cylindres d'or disponibles.

Le principe de cette procédure, développée par l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) dans le cadre du projet ANR PIRANEX, est basé sur l'utilisation de deux molécules distinctes, présentant des affinités spécifiques vis-à-vis des deux matériaux de la biopuce. Ainsi, la formation de couches auto-assemblées différentes sur l'or et la silice peut être obtenue par cette méthode. Un choix judicieux du groupement fonctionnel des molécules sondes permet alors un greffage ciblé sur les nanocylindres.

Validée par Francisco Palazon (en thèse à l'INL) à l'échelle macroscopique et microscopique, cette technique de chimie orthogonale est actuellement en cours de caractérisation sur les biopuces nanostructurées.

10.4 Conclusions des résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet ANR PIRANEX

Relativement ambitieux, le projet ANR PIRANEX adresse une multitude de défis technologiques. L'implémentation d'un système bimodal, combinant une biodétection par SPR à une identification par SERS, fait intervenir différents partenaires spécialisés en instrumentation, nanostructuration, fonctionnalisation chimique et applications biologiques pour répondre aux contraintes expérimentales posées.

A l'heure actuelle, la possibilité d'utilisation d'un substrat plasmonique commun a pu être validée. Une caractérisation de la chimie de surface développée de manière parallèle a également fourni des résultats prometteurs. L'étape suivante, indispensable pour démontrer les avantages offerts par la nanostructuration de surface pour la détection de traces, consiste à passiver une partie de la biopuce par un dépôt de silice. Cette procédure constitue un aspect important des recherches effectuées au sein de l'Institut d'Electronique Fondamentale.

Menés de manière indépendante, les développements instrumentaux ont également été initiés. Ces travaux, qui s'inscrivent dans le cadre de la thèse d'Aurore Olivéro, visent à satisfaire les contraintes liées à l'assemblage de deux techniques distinctes, en particulier par l'optimisation du montage optique et du système de fluidique, permettant la combinaison recherchée des lectures SPR et SERS sur une même biopuce.

Conclusion générale

Face aux exigences particulières du domaine de la biodétection, nécessitant une mesure rapide, précise, et multiplexe d'interactions biomoléculaires, les capteurs plasmoniques incarnent sans conteste une solution avantageuse. Combinant une mesure sans marquage, en temps réel, avec un débit de données élevé, ces systèmes sont désormais bien établis sur le marché industriel face aux techniques telles que la fluorescence.

A l'heure actuelle, différents modes de lecture peuvent être implémentés afin de collecter le signal issu de la transduction optique, basée sur le phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR). Parmi les plus courants, l'interrogation en réflectivité offre une détection multiplexe permettant l'étude de plus d'une centaine d'interactions en parallèle sur une même biopuce. Cependant, en raison de la configuration adoptée, cette méthode souffre de deux limitations impactant directement la qualité de mesure dans des conditions de détection complexes : la dispersion des données et la dynamique restreinte, toutes deux associées au choix d'un point de fonctionnement unique en termes de longueur d'onde et d'angle d'incidence sur la biopuce plasmonique.

Par une mesure directe du décalage de la résonance, les modes d'interrogation angulaire et spectrale constituent des alternatives relativement intéressantes, et affichent une résolution et une dynamique de mesure nettement supérieures. Cependant, la plupart de ces systèmes restent limités à un très faible nombre d'analyses en parallèle, à l'exception de quelques prototypes fonctionnant en interrogation angulaire, dont la cadence reste par ailleurs imposée par un mouvement de balayage mécanique. L'équivalent spectral de telles configurations n'est en revanche pas représenté à l'échelle industrielle.

Ces observations ont ainsi motivé le développement d'une nouvelle méthode d'interrogation multi-spectrale, visant à répondre aux exigences de précision et de dynamique de mesure posées par de nombreuses applications, tout en gardant des propriétés d'acquisition, en termes de résolution temporelle et de débit de données, équivalentes à l'interrogation en réflectivité. Pour cela, plusieurs critères de performance ont été définis : une résolution de 10^{-6} RIU, une dynamique de l'ordre de 10^{-2} RIU, ainsi que la présence d'un dispositif d'imagerie en deux dimensions, et une cadence d'acquisition inférieure à 30 s par point de mesure pour des études de cinétiques de quelques minutes.

Initié par la société HORIBA Scientific, ce projet a été mené en étroite collaboration avec le Laboratoire Charles Fabry, disposant d'un banc de mesure par SPR adapté à l'étude envisagée. Offrant la possibilité de réaliser un balayage spectral, grâce à l'utilisation d'une lampe halogène combinée à un monochromateur, ce dispositif expérimental a permis de réaliser une caractérisation précise de l'influence de la configuration spectrale choisie, soit l'ensemble des longueurs d'onde d'interrogation pour un angle d'incidence fixe, sur la qualité de mesure du décalage spectral de la résonance. En raison du faible nombre de longueurs d'onde considéré lors de ces expériences, un traitement de données adapté a été utilisé en conséquence : un ajustement

pseudo-Lorentzien, permettant une reconstruction relativement précise du profil spectral de la résonance plasmonique.

Résultat marquant de cette étude, la résolution est apparue comme étant quasi-indépendante du nombre de longueurs d'onde incidentes choisies. En effet, une analyse poussée des sources de limitation du système a conduit à l'observation d'un bruit de speckle à l'origine du comportement observé. Malgré cette contribution, la résolution atteinte avec seulement 5 longueurs d'onde espacées de 10 nm, de l'ordre de 7 pm ou 2.10^{-6} RIU en termes de variations d'indice optique, a permis de répondre favorablement aux critères définis.

La dynamique de mesure a quant à elle démontré une dépendance au nombre de longueurs d'onde incidentes. Evaluée à de manière théorique à 8×10^{-3} RIU pour 5 longueurs d'onde, et confirmée expérimentalement, cette performance a ainsi permis de répondre de manière positive aux critères avancés. Parallèlement, une qualité de mesure supérieure par rapport à l'interrogation en réflectivité a également été mise en évidence, par une étude comparative de la dispersion des données.

Enfin, le choix d'une configuration de balayage spectral à 5 longueurs d'onde a permis de satisfaire aux deux dernières exigences exprimées. D'une part, la capacité d'imagerie en deux dimensions de la biopuce a été gardée intacte, et d'autre une cadence d'acquisition de 10 s par point de mesure a pu être atteinte. Une mise en application à l'étude d'une interaction ADN-ADN a ainsi permis de valider les performances de la méthode d'interrogation multi-spectrale développée, face à celle plus classique de l'interrogation en réflectivité.

Suite à ces premiers résultats encourageants, le projet a été orienté vers le développement d'une nouvelle source multi-spectrale à base de 5 diodes électro-luminescentes (LEDs). Moins coûteux et nettement plus compact qu'un monochromateur, un tel dispositif constitue en en effet une solution technique bien plus attractive à l'échelle industrielle. Grâce à l'implémentation d'une source de courant commutable adaptée, un prototype a pu être aisément intégré à un banc de mesure par SPR existant, sans nécessiter de modification du montage.

Une première caractérisation ayant mis en évidence des performances inférieures à celles obtenues avec un monochromateur, une étude des limitations possibles du système a été menée. Les résultats obtenus ont ainsi conduit à l'observation d'un bruit temporel en intensité, affectant de manière corrélée toute la surface de la biopuce. Plus problématiques encore, les fluctuations en longueur d'onde de l'illumination multi-spectrale ont été attribuées à un régime de chauffe transitoire des LEDs lors de la commutation.

Une solution simple a cependant pu être mise en oeuvre pour réduire ces variations affectant sensiblement la qualité de mesure. L'utilisation de 5 filtres interférentiels, présentant une bande passante de 10 nm, a ainsi permis de limiter à une dizaine de picomètres les fluctuations spectrales des LEDs, et d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 pm, soit 5×10^{-6} RIU. Parallèlement à cette optimisation, une correction particulière des données recueillies par ce dispositif a également dû être adoptée, en raison des conditions d'incidence angulaire différentes des 5 LEDs.

Le système obtenu, combinant comme souhaité l'imagerie en deux dimensions à une résolution temporelle suffisante (une cadence de 10 s par point a été démontrée), a pu être validé par la mesure en cinétique d'une interaction ADN-ADN. Malgré les performances relativement satisfaisantes affichées par le prototype implémenté, des améliorations restent envisagées à ce jour pour stabiliser l'émission des LEDs et tenter d'atteindre une résolution plus proche de 10^{-6} RIU. Par exemple, l'utilisation de "shutters" électro-mécaniques, placés devant les 5 LEDs allumées en continu, permettrait de s'affranchir des dérives importantes observées à l'allumage. D'autre part, la réponse rapide de ces systèmes, de l'ordre de la dizaine de millisecondes, resterait parfaitement compatible vis-à-vis de la résolution temporelle visée par ce dispositif d'interrogation

multi-spectrale.

Afin d'exploiter les performances nouvellement démontrées par la méthode d'interrogation multi-spectrale introduite lors de ces travaux, une dernière série d'expériences applicatives a été effectuée. L'un des principaux avantages de la méthode résidant dans la plus grande dynamique de mesure autorisée, une étude a ainsi été menée en conditions complexes.

Grâce à la collaboration du Dr. Damjana Kastelic du Centre de Recherche Allemand sur le Cancer, les performances de mesure en sérum dilué ont pu être testées pour deux marqueurs potentiels du cancer, UBC12 et UBP14, intervenant dans le système de dégradation cellulaire ubiquitine-protéasome. Dans une première approche, la limite de détection a été évaluée en tampon phosphate : une valeur de 500 ng/mL a ainsi été déterminée dans les deux cas.

Dans un second temps, la détection a été réalisée en sérum dilué à 20% en tampon phosphate. Malheureusement, en raison du haut niveau d'interaction non spécifique relevé, à la fois sur les plots de sondes spécifiques et ceux servant de contrôle négatif, aucune donnée significative n'a pu être extraite. Des expériences complémentaires restent par conséquent nécessaires afin de valider la méthode implémentée en conditions d'analyse réelles. L'injection des biomarqueurs potentiels sélectionnés dans un sérum plus dilué (de 1% à 10%), combinée à une passivation plus efficace de la biopuce, constitue l'une des pistes de recherche envisagées.

Dans ce but, une dernière étude a été menée afin de déterminer les conditions de régénération optimales, permettant la désorption des biomolécules cibles de la surface de la biopuce, sans affecter l'activité des espèces sondes greffées. Parmi les différentes solutions testées, un mélange de glycine et d'acide chlorhydrique à pH 3 semble relativement prometteur, mais nécessiterait une expérience de validation supplémentaire. Une telle étude est en cours de planification à l'heure actuelle.

A l'instar de ces expériences, la méthode d'interrogation multi-spectrale implémentée offre des perspectives variées. L'intégration de ce mode de mesure SPR est actuellement en cours d'étude dans le cadre du projet ANR PIRANEX, destiné au développement d'un système bimodal associant la SPR à la spectroscopie Raman exaltée de surface. Ces travaux, réalisés dans le cadre de la thèse d'Aurore Olivéro, doivent en particulier répondre aux contraintes instrumentales liées à ces deux méthodes de lecture.

Enfin, l'intégration relativement aisée d'un module compact, tel que celui développé sur la base de 5 LEDs, à un banc de mesure SPR existant a été démontrée dans ce manuscrit. Ce résultat permet d'envisager la commercialisation d'un module d'illumination multi-spectral "plug and play" à bas coût, apportant les avantages de l'interrogation spectrale à une base expérimentale d'interrogation en réflectivité.

Annexe A

Extraction et traitement des données en interrogation multi-spectrale

Element central de la méthode d'interrogation multi-spectrale développée, l'extraction et l'ajustement des données de réflectivités discrètes permet la reconstruction du profil spectral de la résonance plasmon. Cette procédure, indispensable à la détermination de la position du minimum de réflectivité, est détaillée dans cette annexe.

A.1 Principe général

Le traitement des données issues de l'interrogation multi-spectrale est réalisé en 4 étapes consécutives, implémentées au sein d'un code développé sous Matlab :

1. Dans un premier temps, l'utilisateur spécifie le répertoire des données contenant les dossiers des images de réflectivité enregistrées en polarisation TM et TE. Un fichier texte contenant les informations relatives à la configuration spectrale adoptée, enregistré lors des expériences, est lu automatiquement.
2. Dans un deuxième temps, la création d'une image "masque" binaire permet de définir l'ensemble des pixels constituant chaque plot sonde.
3. Une fois ces régions d'intérêt déterminées, le masque est appliqué à chaque image de réflectivité enregistrée au cours du temps. Cette étape génère ainsi une matrice à trois dimensions, dont chaque élément renvoie à la valeur de réflectivité TM normalisée par celle TE associée à un plot sonde pour une longueur d'onde incidente donnée, et un instant précis de la cinétique d'interrogation multi-spectrale.
4. A partir de cette matrice de données, un ajustement pseudo-Lorentzien est appliqué à chaque ensemble de N valeurs de réflectivité correspondant aux N longueurs d'onde choisies (définies automatiquement lors de la première étape), pour un instant et un plot donné. Cette étape produit ainsi une matrice à deux dimensions, contenant les positions spectrales de la résonance plasmon associées à un plot sonde et à un instant précis de la cinétique enregistrée.

Pour plus de clarté, le déroulement de ce traitement est résumé sur la Figure A.1.

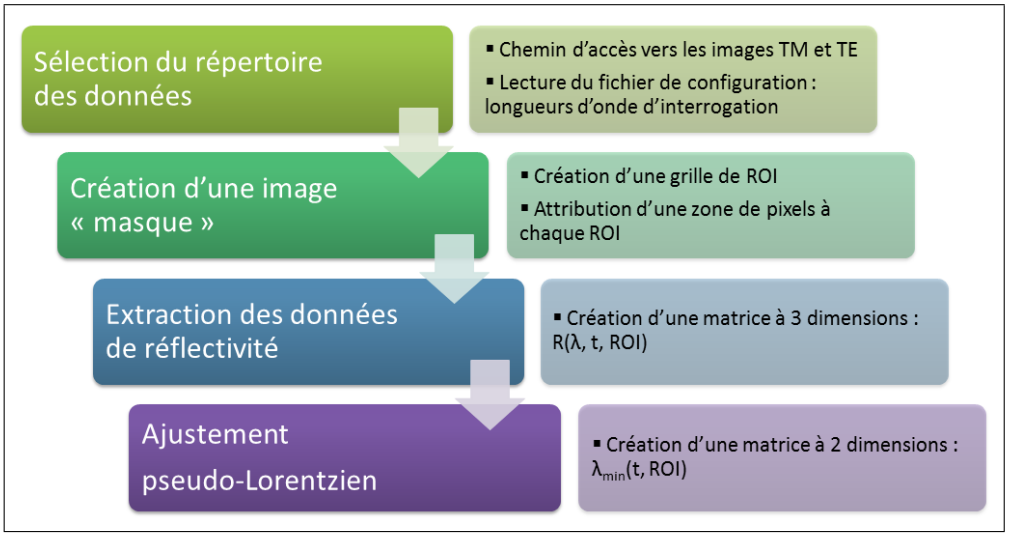


FIGURE A.1 – **Principe du code d'extraction des données enregistrées en interrogation spectrale développé sous Matlab.** Après lecture des paramètres d'acquisition dans le fichier de configuration, un masque est créé de manière à associer des zones de pixels (ROI) des images en réflectivité aux plots sondes. Une fois cette étape terminée, commence l'extraction des données, par la création d'une matrice à trois dimensions $R(\lambda, t, ROI)$ contenant les valeurs de réflectivité TM/TE associées aux longueurs d'onde incidentes, aux plots sondes et aux temps de prise des images. Sur la base de ces résultats, un ajustement pseudo-Lorentzien est appliqué à chaque ensemble de valeurs de réflectivité discrètes correspondant à une ROI et un instant de mesure donnés. La matrice à deux dimensions ainsi créée, $\lambda_{min}(t, ROI)$, contient alors les valeurs des positions de la résonance plasmon, au cours du temps, pour chaque plot sonde de la biopuce.

Présenté de manière succincte, le traitement de données repose sur deux étapes majeures : la création d'une image "masque" permettant l'extraction des valeurs de réflectivité correspondant à chaque plot sonde, ainsi que l'ajustement pseudo-Lorentzien, élément central de la méthode d'interrogation multi-spectrale développée. Quelques précisions relatives à ces deux étapes importantes sont apportées dans les paragraphes suivants.

A.2 Création de l'image "masque"

Le principe de la création de l'image "masque" servant à l'extraction des valeurs de réflectivité est illustrée sur la Figure A.2. L'idée principale de ce traitement repose sur la génération d'une matrice binaire, de taille égale à celle des images enregistrées lors de la procédure d'interrogation multi-spectrale (1392×1024 pixels), dont les éléments de valeur 1 sont associés au pixels d'intérêt, soit ceux appartenant aux plots sonde étudiés. Le fond des images analysées, est quant à lui associé à la valeur 0.

L'obtention du masque est réalisée par un seuillage, destiné à distinguer les pixels "significatifs", ayant exprimé un signal suffisamment élevé face à l'adsorption de matériel biologique, de ceux "non significatifs". En raison de la différence de réactivité qui peut être observée entre les plots sondes, un seuil "mobile", dont la valeur s'adapte automatiquement à chaque région d'intérêt analysée, est utilisé.

Cette procédure est réalisée en plusieurs étapes successives, détaillées dans la suite de ce paragraphe.

A.2.1 Définition des paramètres de la matrice

Dans un premier temps, l'utilisateur crée, à partir de la pile de données disponibles, une image de variation de réflectivité (TM/TE) qui servira de base à la création de l'image masque. Le plus fréquemment, une différence entre deux images prises avant et après une interaction biomoléculaire est effectuée, de manière à générer un contraste suffisant pour distinguer les plots sondes du reste de la biopuce. Dans le cas présent, cette procédure est justifiée par l'injection d'une séquence Ta_{Cal} commune à tous les plots sondes en début d'expérience : dans un cas différent, une image de variation de réflectivité en réponse à un saut d'indice pourrait être utilisée.

Après définition de la structure de la matrice (en termes du nombre de lignes et de colonnes des plots, et de la position des sondes et des références), l'utilisateur est invité à définir manuellement les quatre plots extrêmes sur l'image de réflectivité préalablement choisie. Le calcul des coordonnées des autres plots est alors réalisé automatiquement par le programme.

A.2.2 Seuillage

Dans un deuxième temps, une zone de $N_x \times N_y$ pixels (les valeurs de N_x et N_y pouvant être ajustées suivant le grandissement optique qui a été utilisé lors des expériences, mais étant généralement de l'ordre de 30 à 50 pixels) est attribuée à chacun des plots déterminés précédemment. La sélection des pixels significatifs au sein de chaque région d'intérêt (ROI) ainsi définie est alors réalisée de la manière suivante :

- Pour les plots de référence, la valeur de tous les pixels de la (ROI) correspondante est fixée à 1.
- Pour les plots sondes, l'utilisateur définit un seuil "absolu" S, à partir duquel sera calculé un seuil "relatif" à chaque ROI. Pour cela, un histogramme de la valeur ΔR des pixels est tout d'abord calculé sur chaque zone attribuée à un plot sonde. Un ajustement gaussien, utilisé en première approximation, permet de déterminer la valeur S_{ROI} la plus fréquente, correspondant à la position du maximum de l'histogramme en termes de variation de réflectivité ΔR. Une valeur de seuil relatif $S \times S_{ROI}$ est alors appliquée à tous les pixels de la ROI considérée : tous les pixels affichant une variation ΔR supérieure au seuil relatif prennent la valeur 1, les autres étant fixés à 0.

L'image "masque" ainsi obtenue est réutilisée par la suite pour l'extraction des valeurs de réflectivité associées à chaque plot de la matrice : cette étape est abordée dans le paragraphe suivant.

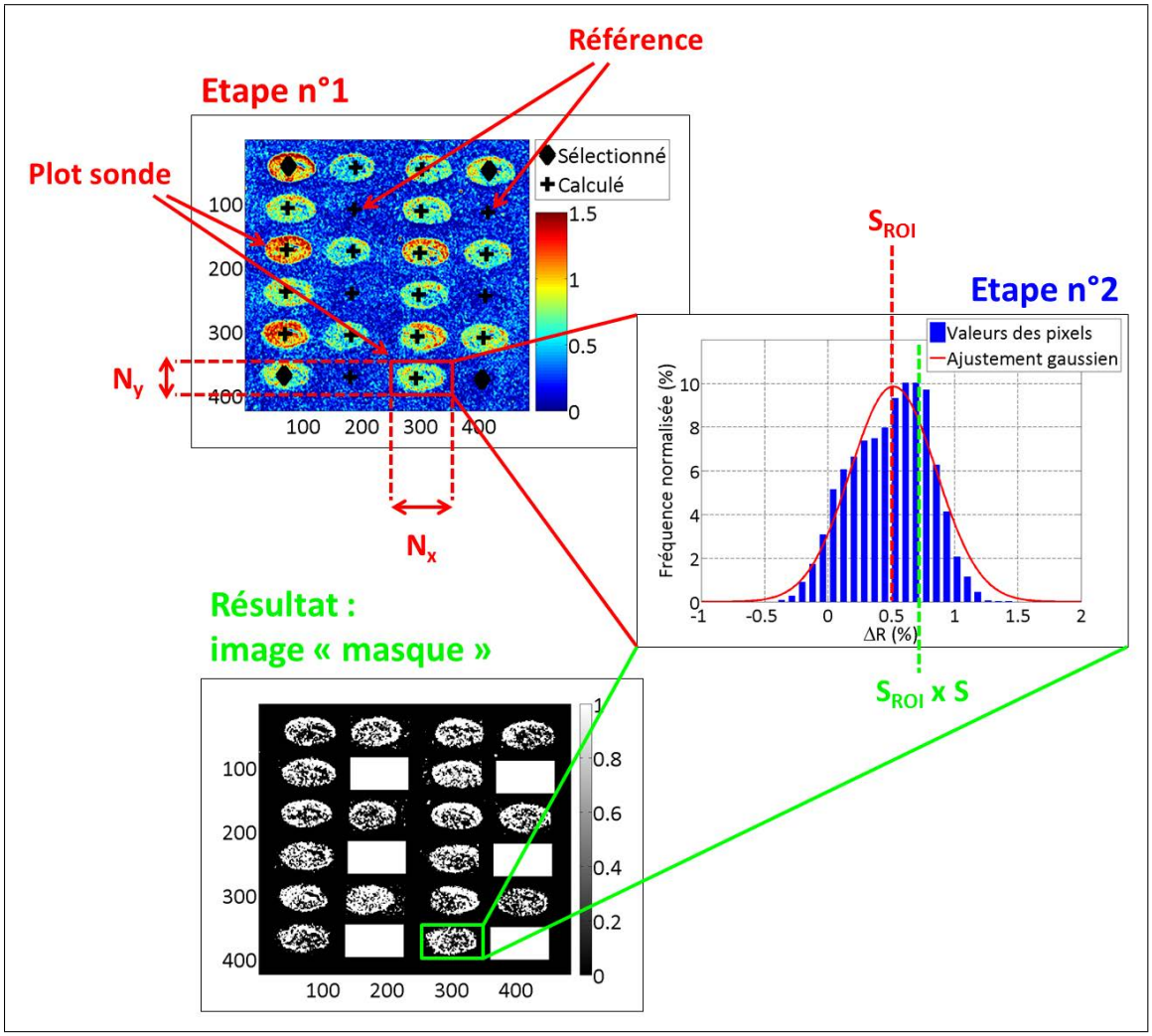


FIGURE A.2 – **Principe de la procédure de création de l'image "masque".** Après définition de la matrice de la biopuce analysée sur une image de variation de réflectivité, une zone de N_x et N_y pixels est attribuée à chaque plot. Pour les références, les valeurs de la région d'intérêt (ROI) sont fixées à 1. Dans le cas des plots sondes, une histogramme des valeurs des pixels est calculé pour chaque ROI : le seuil relatif à appliquer correspond alors au produit d'un seuil "absolu" S, défini par l'utilisateur, par un seuil "relatif" S_{ROI} correspondant à la valeur maximale de l'histogramme. Les pixels ayant une valeur supérieure à celle $S \times S_{ROI}$ sont alors fixés à 1, les autres ayant une valeur nulle. L'image masque ainsi créée peut être utilisée par la suite pour l'extraction des données.

A.2.3 Extraction des valeurs de réflectivité

D'après les étapes préliminaires effectuées précédemment, chaque plot (sonde ou référence) a été associé à une ROI $N_x \times N_y$ pixels. Une image "masque" a également été créée afin de ne sélectionner que les pixels significatifs de chaque ROI. Basée sur ces informations, l'extraction des valeurs de réflectivité (Figure A.3) est réalisée par une double boucle, à la fois sur les longueurs d'onde incidentes et le numéro des images de réflectivité (directement lié au temps de la mesure cinétique) :

- Pour une longueur d'onde λ donnée, le programme extrait la première image enregistrée en polarisation TM. L'image TE correspondante, dont l'acquisition est réalisée en début d'expérience, avant le balayage spectral cinétique, est utilisée pour la normalisation. L'image

de réflectivité (TM/TE) ainsi obtenue est alors multipliée par l'image masque : l'image résultante permet l'extraction de la valeurs de réflectivité associée à chaque sonde, par une moyenne des valeurs des pixels significatifs de la ROI correspondante.

- La réitération de cette procédure pour les images de réflectivité TM suivantes, ainsi que pour les autres longueurs d'ondes incidentes choisies lors de l'expérience, permet la création d'une matrice de données $R(\lambda, t, ROI)$ contenant les valeurs de réflectivité associées à chaque ROI au cours du temps, et pour chaque longueur d'onde d'interrogation.

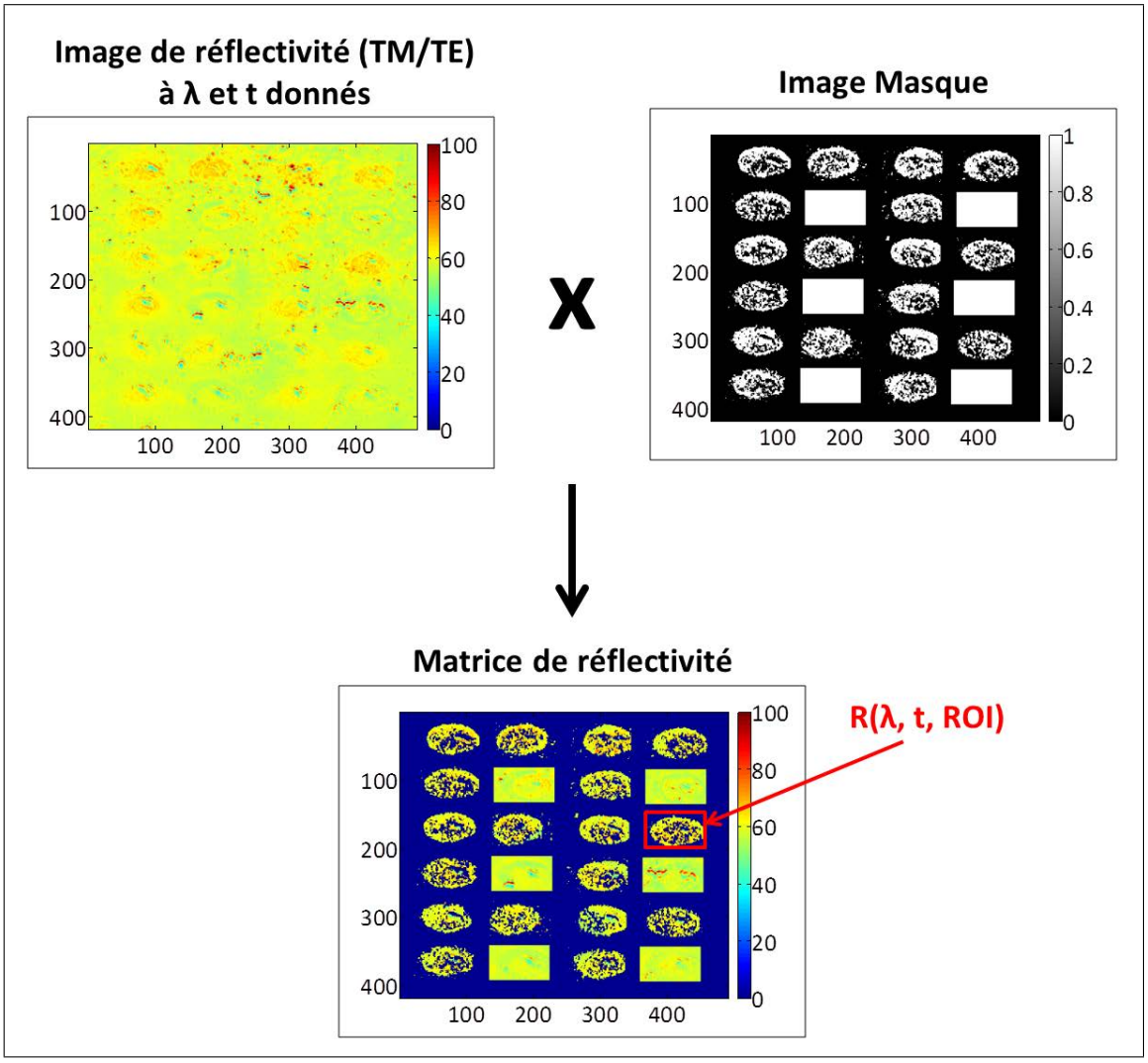


FIGURE A.3 – **Principe de l'extraction des valeurs de réflectivité.** Après génération de l'image "masque", le programme parcourt le fichier contenant les données enregistrées lors de l'expérience. Chaque image en polarisation TM est tout d'abord normalisée par celle TE correspondante (soit à la même longueur d'onde incidente, prise en début d'expérience), puis multipliée par l'image "masque". La valeur de réflectivité $R(\lambda, t, ROI)$ associée à chaque plot de la biopuce pour une longueur d'onde et un temps (ou numéro d'image) donnés, est calculée par la moyenne des valeurs des pixels "significatifs" de la ROI correspondante.

A.3 Ajustement pseudo-Lorentzien

Les valeurs de réflectivité discrètes contenues dans la matrice $R(\lambda, t, ROI)$ permettent de reconstruire le profil de la résonance, par un traitement adapté. Dans le cadre de ces travaux, un ajustement pseudo-Lorentzien est utilisé (Équation A.1).

$$R(\lambda) = R_0 \times \left(1 - D \times \frac{W + A \times (\lambda - \lambda_0)}{W^2 + (\lambda - \lambda_0)^2}\right) \tag{A.1}$$

Les cinq paramètres apparaissant dans l'Équation A.1 sont directement liés aux conditions expérimentales de couplage de l'onde excitatrice aux plasmons de surface. Contrairement aux méthodes plus courantes, la fonction utilisée ici présente donc une réelle signification physique.

Le principe de l'extraction de la valeur λ_{min} de la position du minimum de réflectivité reste relativement simple (Figure A.4). Pour chaque point expérimental (t, ROI), un vecteur $R(\lambda)$ des valeurs de réflectivités discrètes peut être extrait à partir de la matrice de données $R(\lambda, t, ROI)$. L'ajustement pseudo-Lorentzien est alors appliqué afin de retracer le profil spectral de la résonance plasmon. La position du minimum, détectée automatiquement par le programme, est enregistrée dans une matrice $\lambda_{min}(t, ROI)$. Ainsi, l'évolution du décalage spectral de la résonance est accessible en fonction du temps, et en tout point de la biopuce analysée.

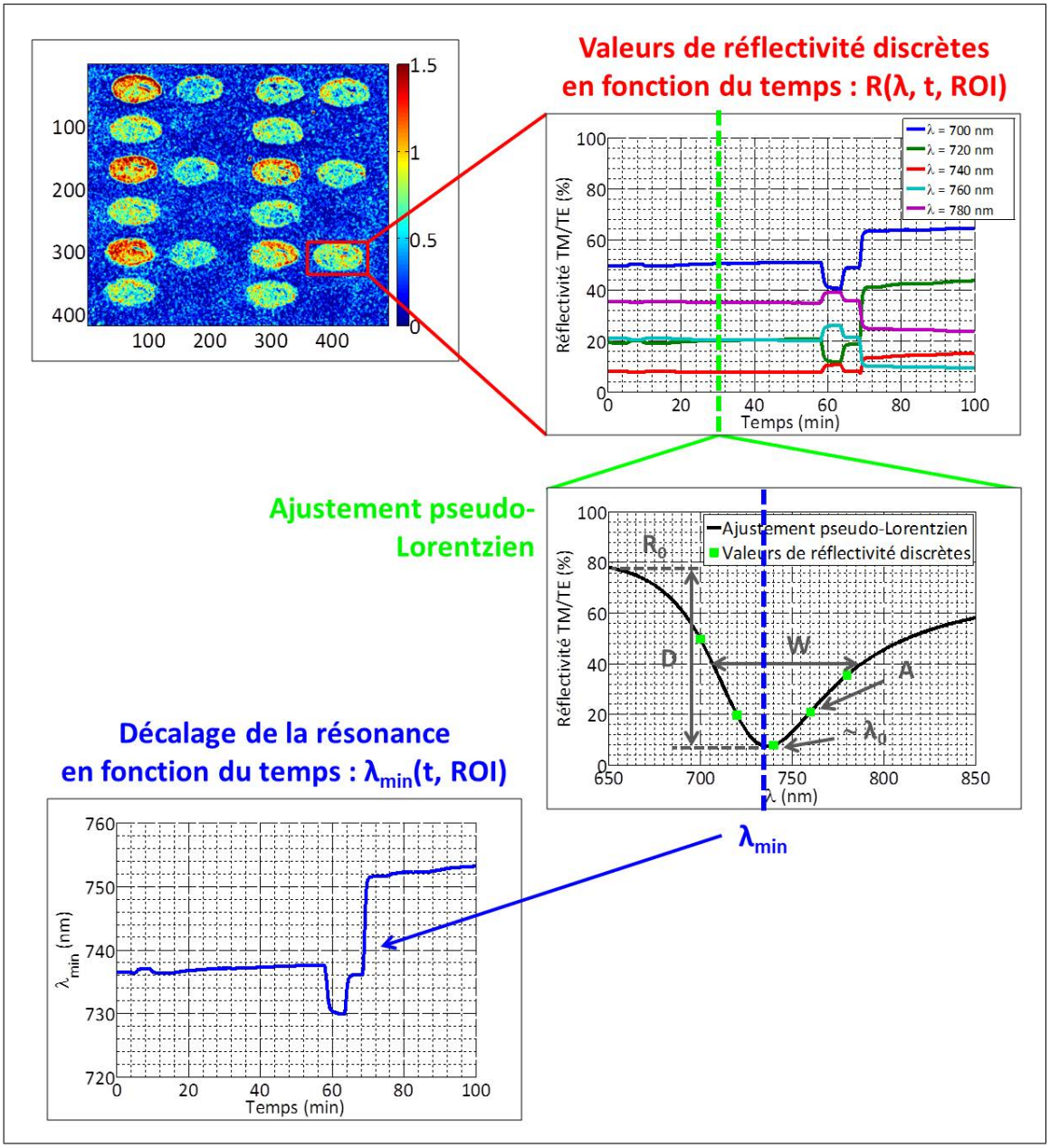


FIGURE A.4 – **Principe de l'extraction de la position de la résonance par ajustement pseudo-Lorenztien.** Après extraction des valeurs de réflectivité discrètes sous la forme d'une matrice $R(\lambda, t, ROI)$, chaque vecteur de valeurs $R(\lambda)$ associée à une ROI et un temps donnés fait l'objet d'une reconstruction pseudo-Lorentzienne. La position du minimum λ_{min}, déterminée automatiquement, est sauvegardée dans une matrice $\lambda_{min}(t, ROI)$. L'évolution du décalage de la résonance plasmon peut alors être étudiée pour chaque ROI, en fonction du temps.

Annexe B

Caractérisation du bruit thermique en interrogation multi-spectrale

Affectant de manière directe l'indice optique du milieu diélectrique en contact avec la biopuce, le bruit thermique doit impérativement être pris en compte lors de la caractérisation des performances des systèmes de SPR.

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, cette contribution a été évaluée expérimentalement sur un banc de SPR basé sur une lampe halogène couplée à un monochromateur, introduit dans la partie II. Un protocole relativement simple a été adopté : le signal issu de l'interrogation multi-spectrale a été enregistré au cours du temps, parallèlement à des changements de consigne du module Peltier permettant de réguler la température du milieu diélectrique en contact avec la biopuce, de l'eau dans le cas de cette expérience.

Plus précisément, une configuration à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm a été choisie, offrant une précision et une dynamique adaptée à l'amplitude des variations étudiées. Le signal ainsi obtenu a été extrait puis moyenné sur 100 régions de 41×41 pixels. Exprimé en termes de l'opposé du décalage spectral du minimum de réflectivité $-\Delta\lambda_{min}$, le résultat de ce traitement est corrélé à la température mesurée par une sonde thermique en contact avec la cellule fluidique Figure B.1). En effet, l'indice optique du milieu diélectrique évoluant en sens inverse de la température, une augmentation de la consigne du module Peltier induit un décalage spectral négatif en interrogation multi-spectrale.

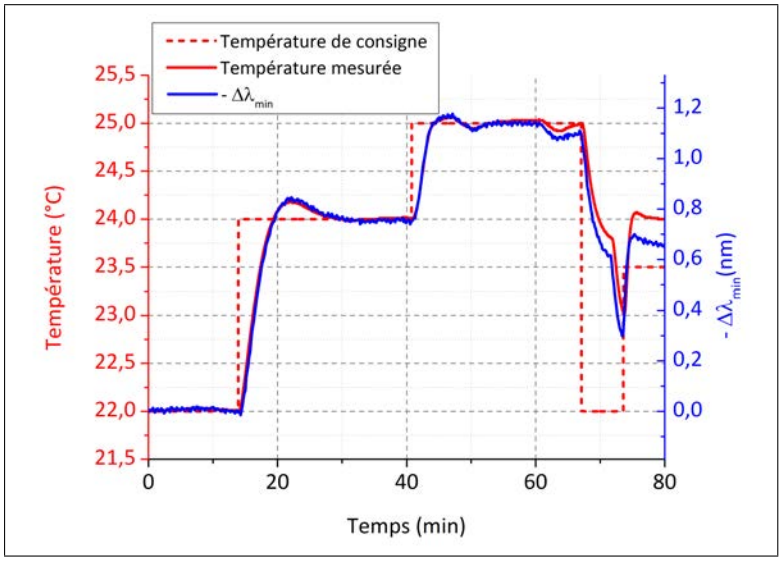


FIGURE B.1 – **Mesure expérimentale des variations de signal en interrogation multi-spectrale, induites par un changement de consigne du module Peltier régulant la température de la cellule fluidique.** Le signal enregistré en interrogation multi-spectrale, basée sur une configuration à 5 longueurs d'onde espacées de 20 nm, a été moyenné sur 100 régions de 41×41 pixels réparties à la surface d'une biopuce en or recouverte d'eau. Le résultat obtenu, exprimé en termes de décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$ de la résonance, a été tracé au cours du temps, parallèlement à la variation de la température de consigne du module Peltier, et de celle effective mesurée par une sonde thermique en contact avec la cellule fluidique.

D'après cette caractérisation, une augmentation de température de 2 °C est associée à une variation de - 0.76 nm du minimum de réflectivité plasmon, soit une variation d'indice optique d'environ $10^{-3} RIU/°C$. Une régulation à 0.01 °C du module Peltier induit donc des fluctuations d'une amplitude de 3.8 pm sur le décalage spectral $\Delta\lambda_{min}$ de la résonance.

Annexe C

Fonctionnalisation des biopuces et interactions ADN-ADN

Une fonctionnalisation chimique des biopuces a été élaborée précédemment [96] au Laboratoire Charles Fabry, dans le cadre des activités de recherche portant sur les biocapteurs plasmoniques. Le protocole correspondant, détaillé dans cette annexe, a été utilisé dans le cadre des études d'interaction ADN-ADN effectuées dans les Parties II et III de ce manuscrit.

C.1 Protocole de fonctionnalisation chimique des biopuces

Les quantités indiquées dans les paragraphes suivants permettent la fonctionnalisation de 4 lamelles d'or, constituant les biopuces plasmoniques, en parallèle.

Solvants et réactifs

Le détail des produits utilisés dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit est donné dans le Tableau C.1.

Quelques conseils et astuces...

- Toujours utiliser de l'eau ultrapure provenant du purificateur, jamais de l'eau du robinet.
- Faire attention à l'éthanol, il en existe 2 types : l'éthanol non purifié et l'éthanol dit "Normapur" qui contient une très faible quantité d'eau. Il est impératif d'utiliser ce dernier pour la fonctionnalisation "cystéamine" qui est très sensible à l'eau.
- Pour les différentes phases de rinçage, utiliser des bains plutôt que des rinçages à la pissette qui laissent des traces sur les lamelles.
- Lors des différents bains, plonger / ressortir lentement les lames.
- Pour sécher les lamelles aux différentes étapes de la chimie, les poser à la verticale et attendre environ 5 min. Ne pas utiliser l'air comprimé qui n'est pas filtré.
- Pour les bains d'éthanol, de DMF, les étapes de cystéamine et de PDC + DMF + Pyridine, un rinçage préalable des récipients et ustensiles avec les solvants correspondants est conseillé (éthanol ou DMF).

Tableau C.1 – **Liste des réactifs utilisés.**

Produit	Référence	Fournisseur
Ethanol ("Normapur", 99.8%)	20821.296	VWR International
β-Mercaptoethylamine (cystéamine)	M9768-5G	Sigma Aldrich
p-Phenylene diisothiocyanate (PDC)	258555-5G	Sigma Aldrich
N,N-Dimethylformamide (DMF)	D4551-500ML	Sigma Aldrich
Pyridine	360570-500ML	Sigma Aldrich
Solution tampon pH 9.0 (20 °C)	456101-500ML	Sigma Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	P4417-50TAB	Sigma Aldrich
Neutravidine	31000	Thermo Scientific
Bovine Serum Albumin (BSA)	A7030-10G	Sigma Aldrich
Bétaïne	B0300-5VL	Sigma Aldrich

C.1.1 Protocole de nettoyage des lames d'or

1. Passer les lamelles au nettoyeur plasma (O_2, 0.6 mbar pendant 10 min).
2. Nettoyer chaque bêcher et éprouvette avec de l'eau pure et bien sécher.
3. Préparer la solution de nettoyage : dans une éprouvette, verser 5 mL de H_2O_2 (Hydrogène peroxyde), et 15 mL d'eau pure. Recouvrir les lamelles d'or avec la solution de nettoyage (H_2O_2 / H_2O) et chauffer à 70 °C pendant 10 min jusqu'à la formation de petites bulles.
4. Eteindre le chauffage, attendre 5 min et rincer les lames avec de l'eau pure (2 bains de 5 min).
5. Laisser tremper les lamelles pendant 5 min dans l'éthanol pur (Normapur) : bain de « transition » entre l'eau et l'éthanol qui sera utilisé dans la prochaine étape.
6. Laisser tremper les 2 petites lamelles dans un bêcher d'éthanol pur (Normapur) pendant 1h environ pour éliminer les résidus organiques.

C.1.2 Protocole de chimie cystéamine

1. Prendre le flacon de cystéamine dans le frigo (4 °C).
2. Peser 4.5 mg de cystéamine sur la balance dans une petite coupelle plastique.
3. Verser les 4.5 mg de cystéamine dans 30 mL d'éthanol (Normapur) dans un bêcher sec ; mélanger jusqu'à dissolution de la poudre dans l'éthanol (agitateur magnétique).

4. Prendre un récipient en verre ; déposer les 4 lamelles d'or nettoyées (en faisant attention à mettre la face couverte d'or en haut !).
5. Verser la solution de cystéamine sur les 4 lamelles et fermer hermétiquement le récipient avec du téflon recouvert de papier aluminium pour éviter l'oxydation des thiols par la lumière.
6. Laisser les lamelles dans la solution 12h environ.
7. Remettre le flacon de cystéamine sous argon (boîte à gants) avant de le ranger au frigo.

La suite de la préparation doit se faire en salle de chimie sous la hotte aspirante.

8. Nettoyer les 4 lamelles d'or avec de l'éthanol (2 bains de 5 min), puis avec de l'eau pure (2 bains de 5 min) et laisser sécher (poser les lames à la verticale contre un support et chasser rapidement les gouttes à l'aide d'une pissette propre et vide pour accélérer le séchage).
9. Peser 100 mg de PDC dans un bêcher recouvert de papier aluminium.
10. Déposer le récipient avec le PDC sous la hotte et y verser une solution composée de 22.5 mL de DMF et 2.5 mL de Pyridine (solvants rangés dans les placards sécurisés sous la hotte).
11. Verser la solution jaune de PDC dans le mélange DMF/Pyridine dans un récipient en verre avec les 4 lamelles d'or. Fermer hermétiquement le récipient avec du téflon recouvert de papier aluminium.
12. Laisser réagir pendant 2h sous la hotte.
13. Après 2h, vider la solution de DMF/Pyridine dans la poubelle à solvant. Nettoyer les 4 lamelles avec du DMF (2 bains de 5 min), puis de l'éthanol (2 bains de 5min) et un dernier nettoyage avec de l'eau pure (2 bains de 5 min). Laisser sécher sécher (poser les lames à la verticale contre un support et chasser rapidement les gouttes à l'aide d'une pissette propre et vide pour accélérer le séchage).

La suite de la préparation ne nécessite plus de manipulation sous hotte et peut être réalisée au laboratoire.

14. Préparation de la solution de neutravidine : prendre dans le congélateur ($-20\,°C$) un petit tube de neutravidine à 500 μg/mL et attendre que le produit décongèle. Ajouter 40 μL de solution tampon à pH = 9 pour obtenir une solution à 250 μg/mL, agiter. Chaque solution permet de fonctionnaliser 2 lamelles.
15. Déposer 30 μL de la solution de Neutravidine sur chaque lamelle d'or. Recouvrir chaque lamelle avec une lamelle de plastique (nettoyage préalable de la lamelle en plastique avec de l'éthanol et de l'eau), faire attention à ne pas laisser de bulles. Laisser réagir 40 min environ.
16. Après avoir enlevé les lamelles en plastique des lamelles d'or, les nettoyer avec la solution tampon à pH = 9 (2 bains de 5 min).
17. Préparation de la solution de BSA (Bovine Serum Albumine) : peser 2 mg de BSA et ajouter 2 mL de solution tampon à pH = 9.
18. Ajouter la solution de BSA sur les 4 lamelles (environ 100 μL pour chaque lamelle jusqu'à couvrir complètement la lamelle). Laisser réagir 10 min environ.

19. Nettoyer les lamelles avec la solution tampon (2 bains de 5 min) d'abord puis à l'eau pure (2 bains de 5 min). Laisser sécher. Les lamelles sont maintenant prêtes pour l'immobilisation des sondes biotinylées.

C.1.3 Préparation des solutions de spotting

Pour deux lamelles préalablement fonctionnalisées, préparer 10 μL de chaque solution sonde (en-dessous de cette valeur, l'aiguille ne prélèvera pas correctement la solution) suivant le protocole détaillé dans le Tableau C.2.

Tableau C.2 – **Préparation des solutions sondes.**

	Solution sonde	**Solution de référence**
Solution sonde mère	V (μL)	/
Eau	6 - V μL	6 μL
PBS 100 mM	1 μL	1 μL
Bétaïne (5 M)	3 μL	3 μL

Le volume "V" des sondes à prélever est défini par l'utilisateur suivant la concentration initiale de la solution mère et celle finale souhaitée, pour le volume final considéré, soit 10 μL dans le cas présenté (concentration initiale $\times$ volume à prélever = concentration finale $\times$ volume final).

C.2 Séquences ADN cibles et sondes

Le Tableau C.3 résume les informations relatives aux séquences d'oligonucléotides utilisées lors des expériences de biodétections présentées dans ce manuscrit.

Tableau C.3 – **Détail des séquence ADN utilisées lors des expériences de biodétection.**

Dénomination	**Description**	**Détail**
Pr_M	Séquence ADN sonde comprenant une biotine en extrémité 5´	Biotine - 5´ TTTTTTTTTTGACCGG-TATGCGTTCTAATGGTGATT 3´
Pr_W	Séquence ADN sonde comprenant une biotine en extrémité 5´	Biotine - 5´ TTTTTTTTTTGACCGG-TATGCGTTCTAATGATGATT 3´
Ta_{Cal}	Séquence ADN cible servant à normaliser la dispersion de concentration des plots sondes	5´ CGCGCGCATACCGGTCAAAA 3´
Ta_M	Séquence ADN cible	5´ CTCCCATAATCACCATTAGAAGTGA 3´

Annexe D

Données expérimentales de la détection de marqueurs du cancer en milieu complexe

La problématique de détection des marqueurs potentiels UBC12, UBP14, UBE2A et UCHL3 a été abordée en trois étapes. Une première caractérisation des complexes antigène/anticorps étudiés a été réalisée en tampon phosphate. Une deuxième série de mesures a été effectuée suite aux résultats obtenus, en sérum dilué. Une troisième expérience complémentaire a été effectuée dans le but d'améliorer la qualité de la régénération utilisée dans le cadre de cette application. Les principaux résultats expérimentaux obtenus lors de ces expériences préliminaires sont présentés dans cette annexe.

D.1 Détection des antigènes en tampon phosphate

Les paragraphes suivants rendent compte des expériences réalisées en tampon phosphate, constituant une première approche de la détection des antigènes sélectionnés.

D.1.1 Première série d'expériences

Le déroulement de la première série de mesures réalisée en tampon phosphate, est résumée dans le Tableau D.1. En raison du nombre important d'injections envisagées, ces expériences ont été réparties sur deux jours consécutifs.

Tableau D.1 – **Ordre des injections réalisées sur la première lame fonctionnalisée, dans le cadre de la détection des antigènes en tampon phosphate.**

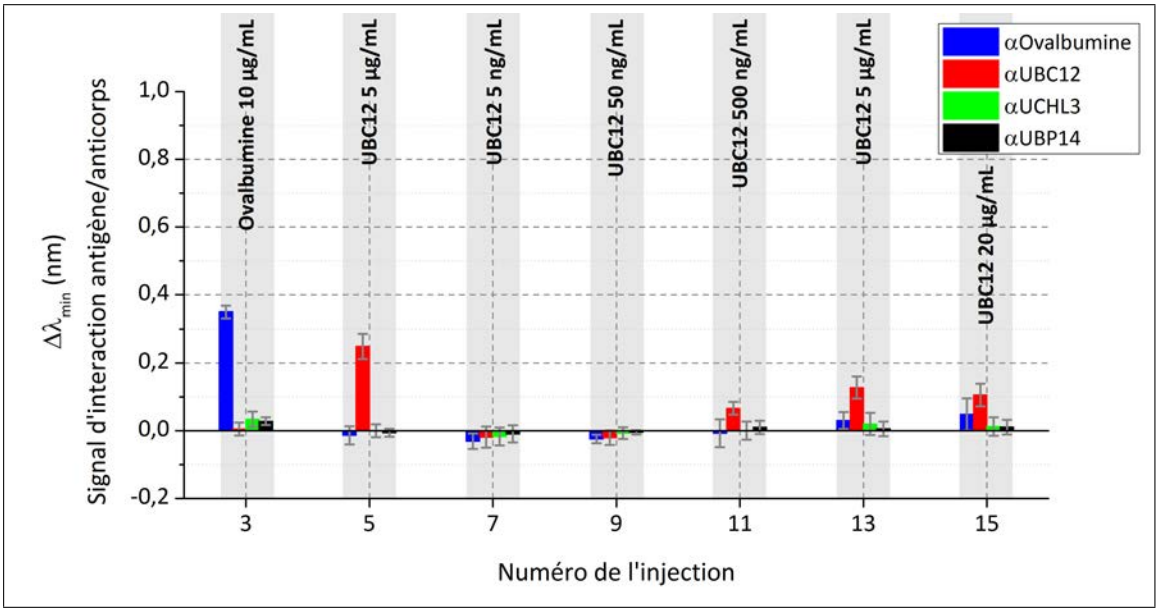
Numéro de l'injection	Solution injectée	Concentration injectée
1	Glycine/HCl (pH 2)	
2	Blanc	
3	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
4	Glycine/HCl (pH 2)	

suite du tableau à la page suivante

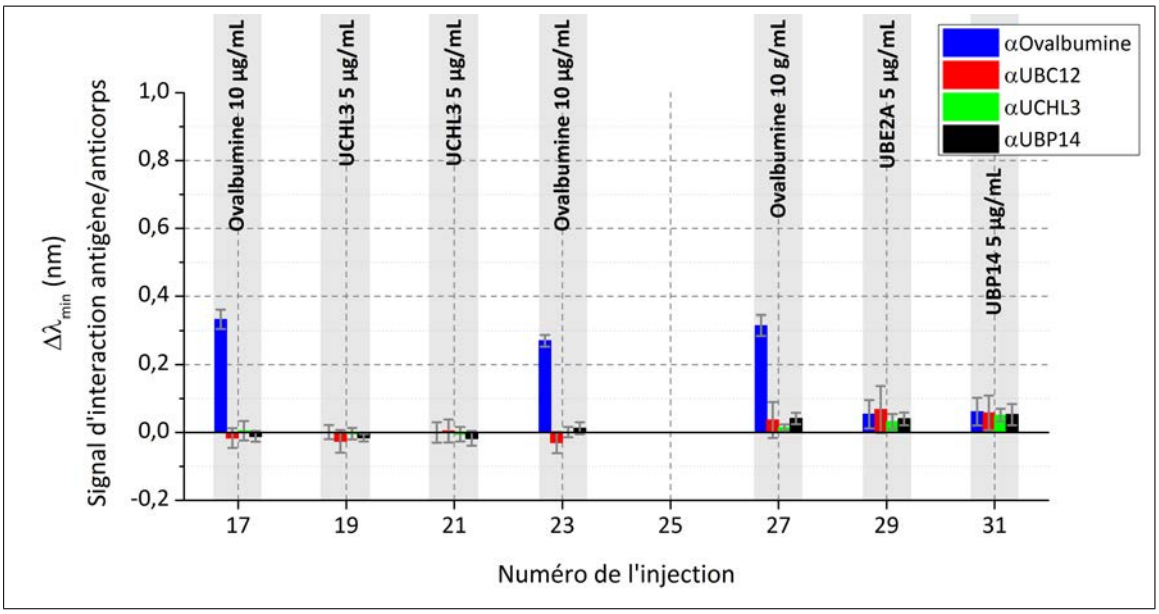
suite du tableau de la page précédente

Numéro de l'injection	**Solution injectée**	**Concentration injectée**
5	UBC12	5 μg/mL (80 nM)
6	Glycine/HCl (pH 2)	
7	UBC12	5 ng/mL (80 pM)
8	Glycine/HCl (pH 2)	
9	UBC12	50 ng/mL (800 pM)
10	Glycine/HCl (pH 2)	
11	UBC12	500 ng/mL (8 nM)
12	Glycine/HCl (pH 2)	
13	UBC12	5 μg/mL (80 nM)
14	Glycine/HCl (pH 2)	
15	UBC12	20 μg/mL (320 nM)
16	Glycine/HCl (pH 2)	
17	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
18	Glycine/HCl (pH 2)	
19	UCHL3	5 μg/mL (80 nM)
20	Glycine/HCl (pH 2)	
21	UCHL3	5 μg/mL (80 nM)
22	Glycine/HCl (pH 2)	
23	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
24	Glycine/HCl (pH 2)	
25	Glycine/HCl (pH 2)	
26	Blanc	
27	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
28	Glycine/HCl (pH 2)	
29	UBE2A	5 μg/mL (80 nM)
30	Glycine/HCl (pH 2)	
31	UBP14	5 μg/mL (80 nM)
32	Glycine/HCl (pH 2)	

Les signaux extraits en interrogation multi-spectrale 4 min après chaque injection considérée, sont représentés sur la Figure D.1. La contribution de chaque famille de sondes est évaluée par la moyenne et l'écart-type associées aux 6 réplicats, après soustraction des contrôles négatifs.



(a) **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et du marqueur potentiel UBC12, lors de la première série de mesures en tampon phosphate.**



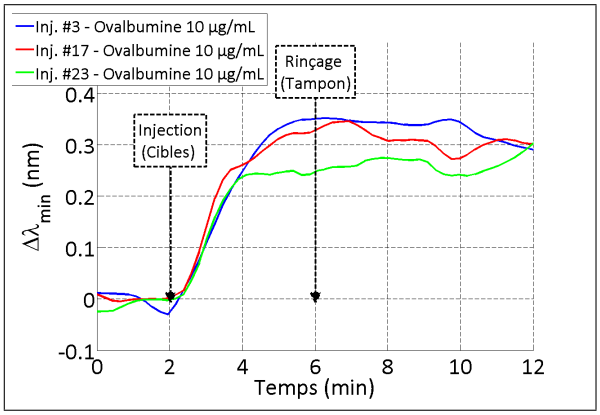
(b) **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et des marqueurs potentiels UCHL3, UBE2A et UBP14, lors de la première série de mesures en tampon phosphate.**

FIGURE D.1 – **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et des marqueurs potentiels UBC12, UCHL3, UBE2A et UBP14, lors de la première série de mesures en tampon phosphate.** Les données présentées correspondent aux signaux recueillis 4 min après l'injection des cibles, moyennés sur les 6 réplicats sondes de chaque famille d'anticorps. L'erreur est associée à l'écart-type calculé sur les 6 valeurs.

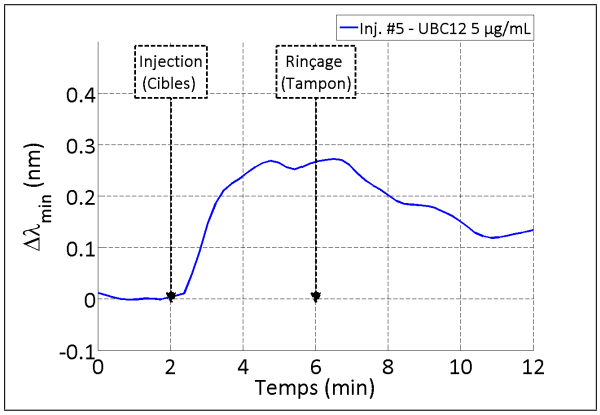
En raison d'une mauvaise manipulation de la vanne d'injection lors de cette expérience, la solution cible n°15 (UBC12, 20 μg/mL) a été rincée 1 min après avoir été introduite dans la

cellule fluidique. Par conséquent, le signal correspondant à cette interaction n'est pas exploitable.

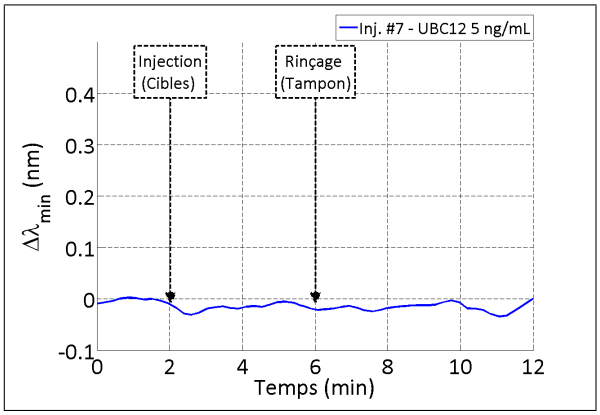
Les cinétiques extraites pour la série d'injections du marqueur potentiel UBC12, seul antigène ayant été détecté lors de cette expériences, sont représentées sur la Figure D.2. Les réponses enregistrées pour le contrôle positif (ovalbumine, 10 μg/mL) sont indiquées à titre de référence. Dans chaque cas, l'évolution du signal recueilli en interrogation multi-spectral correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.



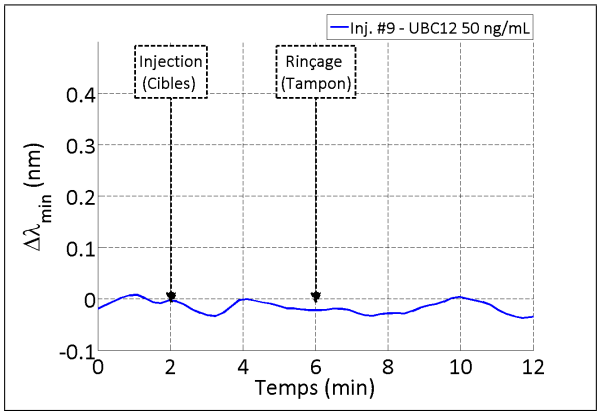
(a) **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine n°3, 17 et 23 (10 μg/mL).**



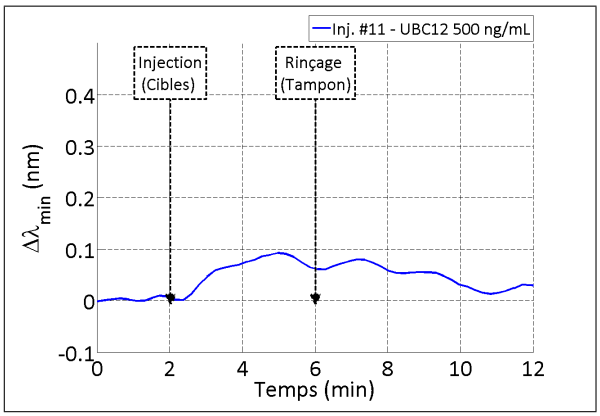
(b) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°5 (5 μg/mL).**



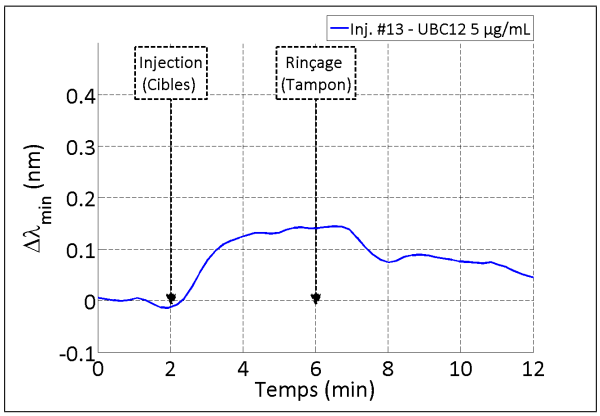
(c) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°7 (5 ng/mL).**



(d) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°9 (50 ng/mL).**



(e) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°11 (500 ng/mL).**



(f) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°13 (5 μg/mL).**

FIGURE D.2 – **Cinétiques enregistrées pour la série d'injections du marqueur potentiel UBC12 lors de la première expérience réalisée en tampon phosphate.** Les données présentées correspondent à la moyenne des signaux extraits sur les 6 réplicats sondes, après soustraction des contrôles négatifs. La réponse du contrôle positif (ovalbumine) est indiquée à titre de référence.

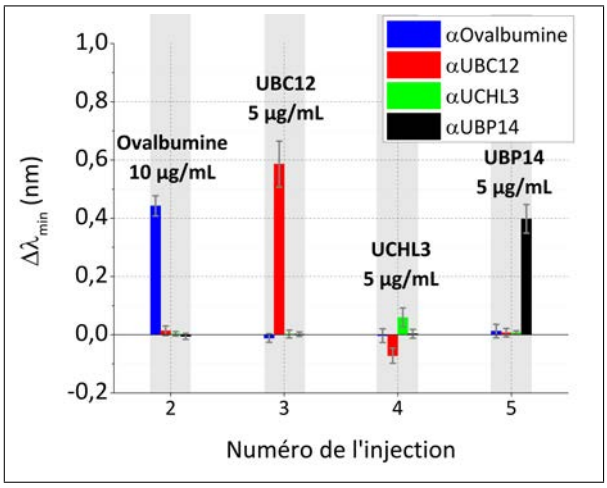
D.1.2 Deuxième série d'expériences

Le déroulement de la deuxième série de mesures réalisée en tampon phosphate, est résumée dans le Tableau D.2.

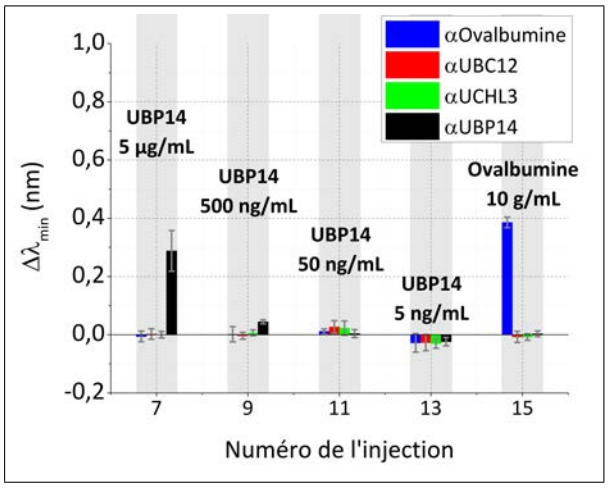
Tableau D.2 – **Ordre des injections réalisées sur la deuxième lame fonctionnalisée, dans le cadre de la détection des antigènes en tampon phosphate.**

Numéro de l'injection	Solution injectée	Concentration injectée
1	Blanc	
2	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
3	UBC12	5 μg/mL (80 nM)
4	UCHL3	5 μg/mL (80 nM)
5	UBP14	5 μg/mL (80 nM)
6	Glycine/HCl (pH 2)	
7	UBP14	5 μg/mL (80 nM)
8	Glycine/HCl (pH 2)	
9	UBP14	500 ng/mL (8 nM)
10	Glycine/HCl (pH 2)	
11	UBP14	50 ng/mL (800 pM)
12	Glycine/HCl (pH 2)	
13	UBP14	5 ng/mL (80 pM)
14	Glycine/HCl (pH 2)	
15	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
16	Glycine/HCl (pH 2)	
17	UBC12	1.5 μg/mL (24 nM)
18	Glycine/HCl (pH 2)	
19	UBC12	500 ng/mL (8 nM)
20	Glycine/HCl (pH 2)	
21	UBC12	200 ng/mL (3.2 nM)
22	Glycine/HCl (pH 2)	
23	UBC12	50 ng/mL (800 pM)
24	Glycine/HCl (pH 2)	
25	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)
26	Glycine/HCl (pH 2)	

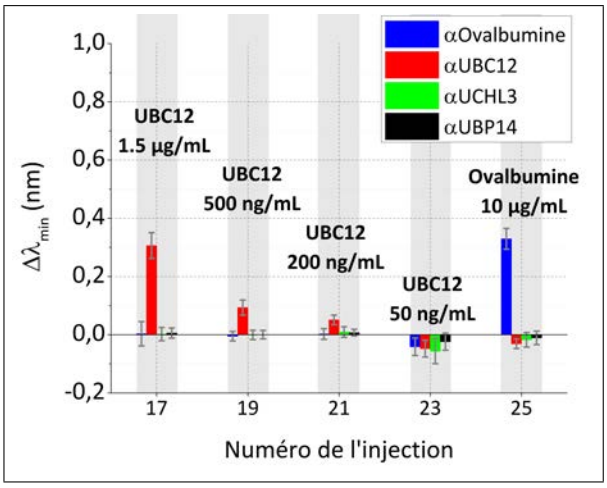
Les signaux extraits en interrogation multi-spectrale 4 min après chaque injection considérée, sont représentés sur la Figure D.3. La contribution de chaque famille de sondes est évaluées par la moyenne et l'écart-type associées aux 6 réplicats, après soustraction des contrôles négatifs.



(a) **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et des marqueurs potentiels UBC12, UCHL3 et UBP14, lors de la deuxième série de mesures en tampon phosphate.**



(b) **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et du marqueur potentiel UBP14, lors de la deuxième série de mesures en tampon phosphate.**

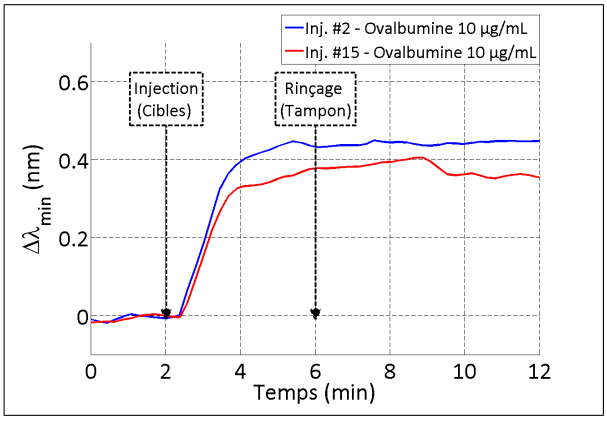


(c) **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et du marqueur potentiel UBC12, lors de la deuxième série de mesures en tampon phosphate.**

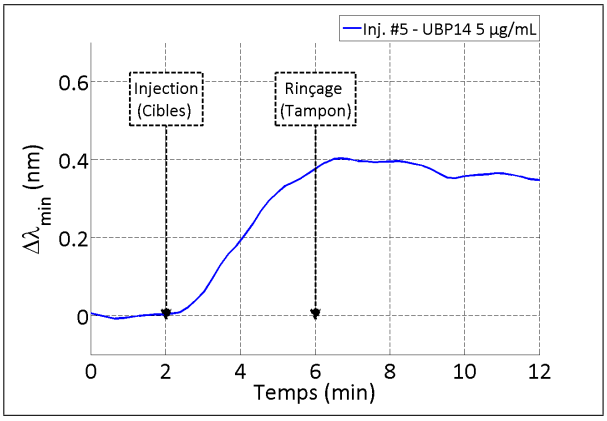
FIGURE D.3 – **Signaux d'interaction antigène/anticorps enregistrés lors des injections d'ovalbumine et des marqueurs potentiels UBC12, UCHL3 et UBP14, lors de la deuxième série de mesures en tampon phosphate.** Les données présentées correspondent aux signaux recueillis 4 min après l'injection des cibles, moyennés sur les 6 réplicats sondes de chaque famille d'anticorps. L'erreur est associée à l'écart-type calculé sur les 6 valeurs.

Les cinétiques extraites pour la série d'injections de l'antigène UBP14 sont représentées sur la Figure D.4. Les réponses enregistrées pour le contrôle positif (ovalbumine, 10 μg/mL) sont indiquées à titre de référence. Dans chaque cas, l'évolution du signal recueilli en interrogation multi-spectral correspond à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

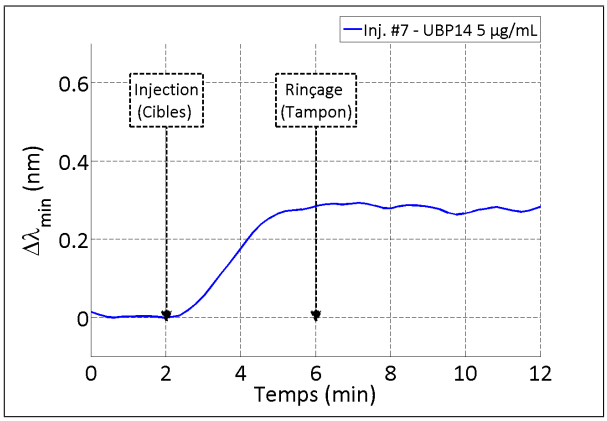
Les cinétiques extraites pour la série d'injections du marqueur potentiel UBC12, réalisée au cours de cette deuxième expérience en tampon phosphate, sont représentées sur la Figure D.5. De la même manière que précédemment, les résultats tracés correspondent à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs. Les réponses enregistrées pour le contrôle positif (ovalbumine, 10 μg/mL) sont également indiquées à titre de référence.



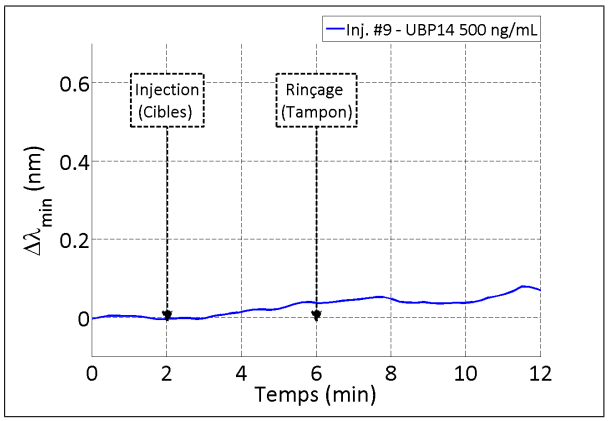
(a) **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine n°2 et 15 (10 μg/mL).**



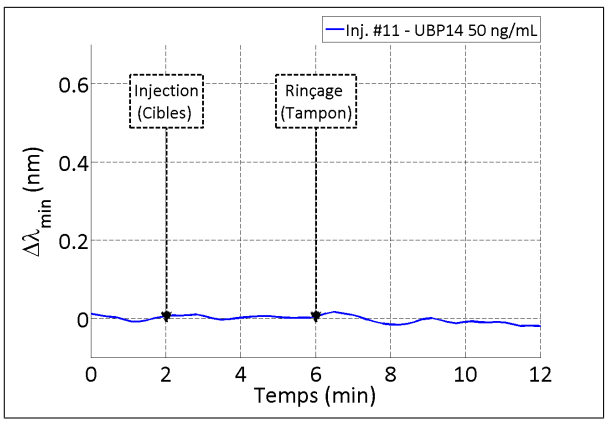
(b) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBP14 n°5 (5 μg/mL).**



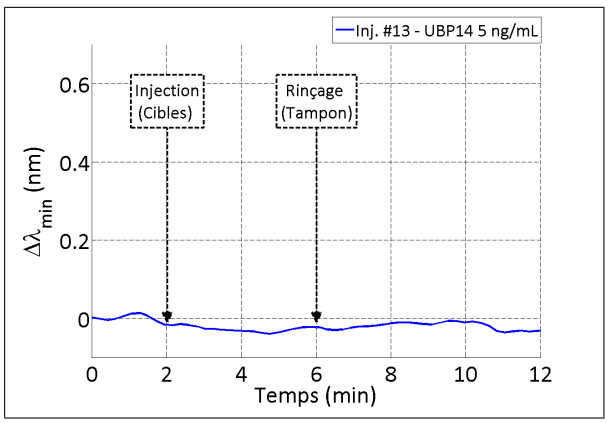
(c) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBP14 n°7 (5 μg/mL).**



(d) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBP14 n°9 (500 ng/mL).**

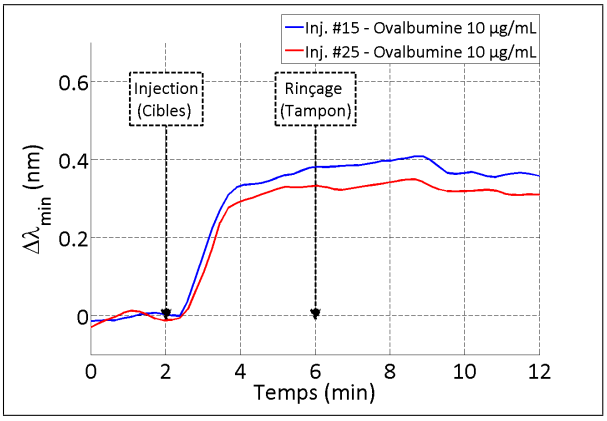


(e) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBP14 n°11 (50 ng/mL).**

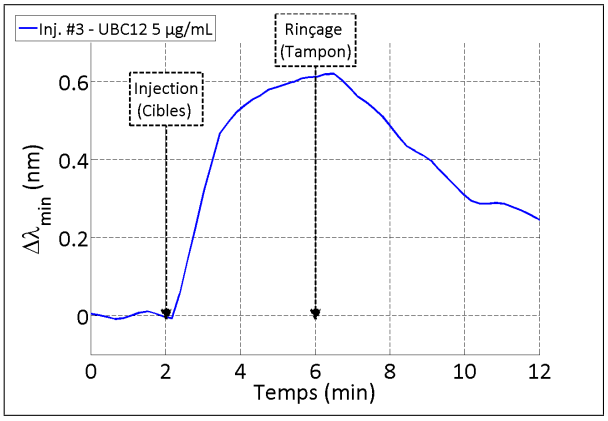


(f) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBP14 n°13 (5 ng/mL).**

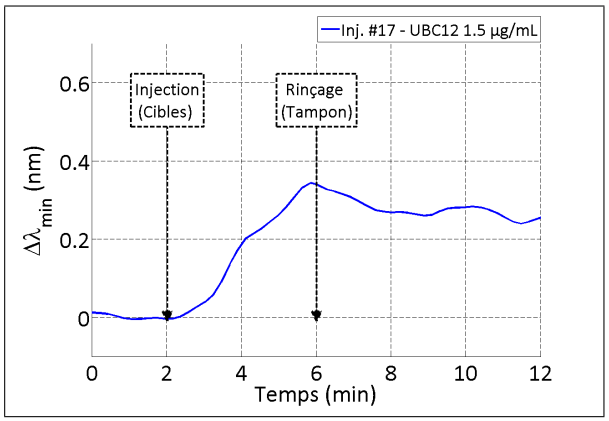
FIGURE D.4 – **Cinétiques enregistrées pour la série d'injections du marqueur potentiel UBP14 lors de la deuxième expérience réalisée en tampon phosphate.** Les données présentées correspondent à la moyenne des signaux extraits sur les 6 réplicats sondes, après soustraction des contrôles négatifs. La réponse du contrôle positif (ovalbumine) est indiquée à titre de référence.



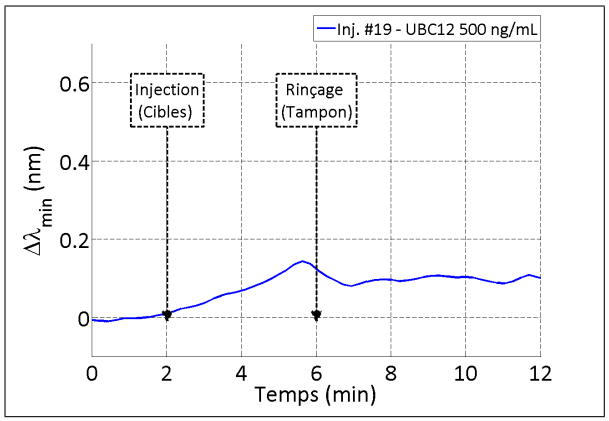
(a) **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine n°15 et 25 (10 μg/mL).**



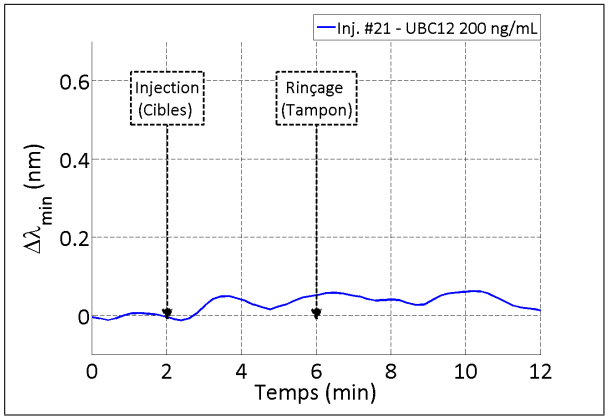
(b) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°3 (5 μg/mL).**



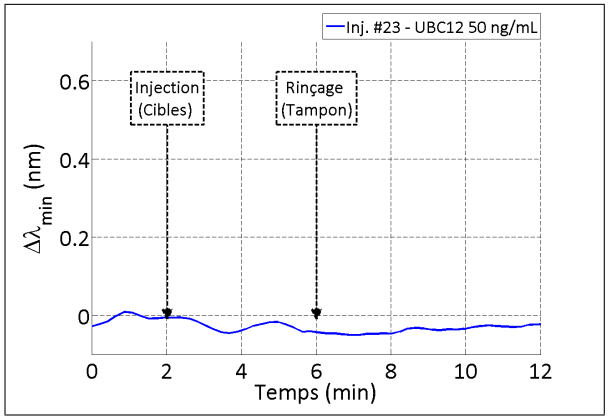
(c) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°17 (1.5 μg/mL).**



(d) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°19 (500 ng/mL).**



(e) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°21 (200 ng/mL).**



(f) **Cinétique de l'injection de l'antigène UBC12 n°23 (50 ng/mL).**

FIGURE D.5 – **Cinétiques enregistrées pour la série d'injections du marqueur potentiel UBC12 lors de la deuxième expérience réalisée en tampon phosphate.** Les données présentées correspondent à la moyenne des signaux extraits sur les 6 réplicats sondes, après soustraction des contrôles négatifs. La réponse du contrôle positif (ovalbumine) est indiquée à titre de référence.

D.2 Détection des antigènes en sérum dilué

Les paragraphes suivants rendent compte des expériences réalisées en sérum dilué, constituant une première approche de la détection des antigènes sélectionnés en milieu complexe.

Tableau D.3 – **Ordre des injections réalisées sur la troisième lame fonctionnalisée, dans le cadre de la détection des antigènes en sérum dilué.**

Numéro de l'injection	Solution injectée	Concentration injectée	Commentaire
1	Blanc		Tampon de course.
2	Sucrose	3 g/L	Saut d'indice servant à contrôler la bonne sensibilité de la méthode d'interrogation multi-spectrale.
3	Ovalbumine (contrôle positif)	10 μg/mL (160 nM)	Milieu contenant les cibles : PBS.
4	Sérum dilué	20%	
5	UBC12	2 μg/mL (32 nM)	Milieu contenant les cibles : sérum dilué à 20%. Adsorption non spécifique importante sur tous les plots sondes sauf αUBP14.
6	UBP14	2 μg/mL (80 nM)	Milieu contenant les cibles : sérum dilué à 20%. Adsorption non spécifique importante sur tous les plots sondes sauf αUBP14.
7	UBC12	5 μg/mL (80 nM)	Milieu contenant les cibles : sérum dilué à 20%. Adsorption non spécifique importante sur tous les plots sondes sauf αUBP14.
8	Glycine/HCl (pH 2)		Solution de régénération. Etant donné l'absence d'interaction sur les sondes αUBP14, l'antigène n'a pas été réinjecté à une concentration plus élevée (5 μg/mL).
9	Ovalbumine (contrôle positif)	10 μg/mL (160 nM)	Milieu contenant les cibles : PBS.
10	UBC12	5 μg/mL (80 nM)	Milieu contenant les cibles : sérum dilué à 20%. Adsorption non spécifique importante sur les plots αOvalbumine.
11	UBP14	5 μg/mL (80 nM)	Milieu contenant les cibles : sérum dilué à 20%. Adsorption non spécifique importante sur les plots αOvalbumine.

La Figure D.6 permet d'illustrer les observations relevées lors de cette expérience.

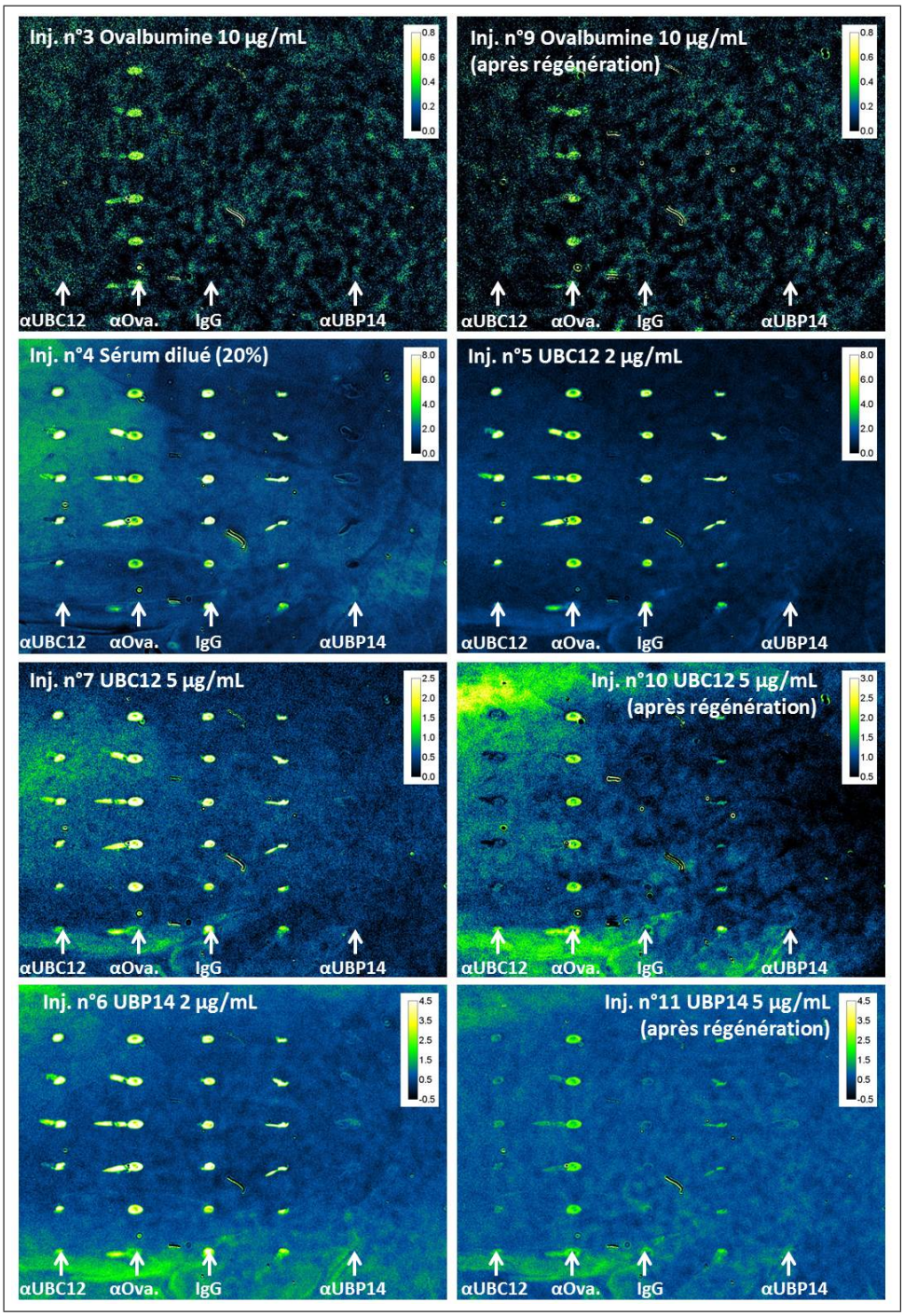


FIGURE D.6 – **Images de la biopuce enregistrées lors des injections en sérum, codées en variation de réflectivité.** Les données présentées correspondent à une différence de réflectivité prise 2 min avant chaque injection considérée, et 8 min après, en PBS, pour une longueur d'onde d'illumination de 720 nm. Le contraste observé entre la surface de la biopuce et les plots sondes est dû en grande partie au décalage des résonances plasmon associées (le minimum de réflectivité étant proche de 720 nm pour le fond) ; cependant, une adsorption non spécifique nettement plus importante a été relevée sur les plots sondes en comparaison avec le reste de la biopuce.

D.3 Régénération des complexes antigène/anticorps

Le déroulement de cette série de mesures finale est résumée dans le Tableau D.4.

Tableau D.4 – **Ordre des injections réalisées sur la quatrième lame fonctionnalisée, dans le cadre de l'optimisation de la régénération des complexes antigène/anticorps.**

Numéro de l'injection	Solution injectée	Concentration injectée	Commentaire
1	Blanc		Tampon de course
2	Sucrose	3 g/L	Saut d'indice servant à contrôler la bonne sensibilité de la méthode d'interrogation multi-spectrale
3	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)	Contrôle positif ; signal d'amplitude attendue.
4	UBC12	2 μg/mL (32 nM)	Signal d'amplitude attendue.
5	UBP14	2 μg/mL (80 nM)	Signal de faible amplitude ; nécessite une injection à plus haute concentration (5 μg/mL).
6	UBP14	5 μg/mL (80 nM)	Signal d'amplitude attendue.
7, 8, 9	Glycine/HCl **pH = 4**		Léger effet de régénération noté pour les couples Ovalbumine/αOvalbumine et UBP14/αUBP14. Aucun effet observé pour UBC12/αUBC12 : pour cette raison, les solutions cibles n'ont pas été réinjectées avant la solution de régénération suivante.
10, 11, 12	Glycine/NaOH **pH = 9**		Léger effet de régénération observé.
13	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)	Contrôle positif ; signal d'amplitude plus faible par rapport à l'injection n°3.
14	UBP14	5 μg/mL (80 nM)	Signal d'amplitude plus faible par rapport aux injections n°5 et 6.
15	UBC12	2 μg/mL (32 nM)	Signal d'amplitude plus faible par rapport à l'injection n°4.
16, 17	Glycine/HCl **pH = 3**		La régénération semble efficace.
18	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)	Contrôle positif ; signal d'amplitude comparable à l'injection n°13.

suite du tableau à la page suivante

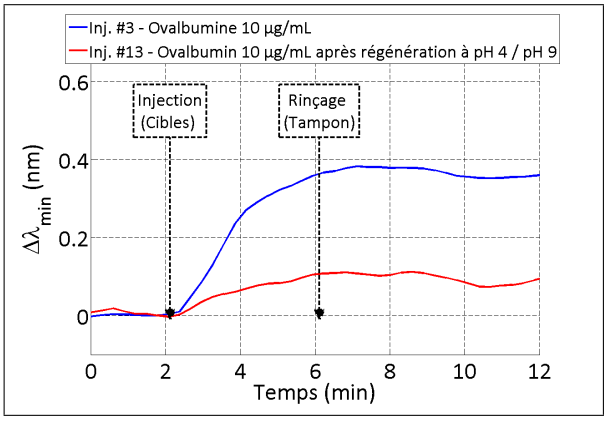
suite du tableau de la page précédente

Numéro de l'injection	**Solution injectée**	**Concentration injectée**	**Commentaire**
19	UBC12	2 μg/mL (32 nM)	Signal d'amplitude comparable à l'injection n°15.
20	UBP14	5 μg/mL (80 nM)	Signal d'amplitude comparable à l'injection n°14.
21, 22	Glycine/HCl **pH = 3**		La régénération semble efficace.
23	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)	Contrôle positif ; signal d'amplitude comparable à l'injection n°18.
24	UBC12	2 μg/mL (32 nM)	Signal d'amplitude comparable à l'injection n°19.
25	UBP14	5 μg/mL (80 nM)	Signal d'amplitude comparable à l'injection n°20.
26, 27	Glycine/NaOH **pH = 10**		Léger effet de régénération observé.
28	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)	Contrôle positif ; signal d'amplitude très faible.
29	UBC12	2 μg/mL (32 nM)	Pas d'interaction détectée.
30, 31	Glycine/NaOH **pH = 10**		En raison des faibles signaux observés lors des injections n°28 et 29, l'antigène UBP14 n'est pas réintroduit pour éviter une décongélation/recongélation inutile des aliquots de solution mère restants, stockés à −24 °C.
32	Ovalbumine	10 μg/mL (160 nM)	Contrôle positif ; signal d'amplitude très faible : fin de la séquence d'injections.

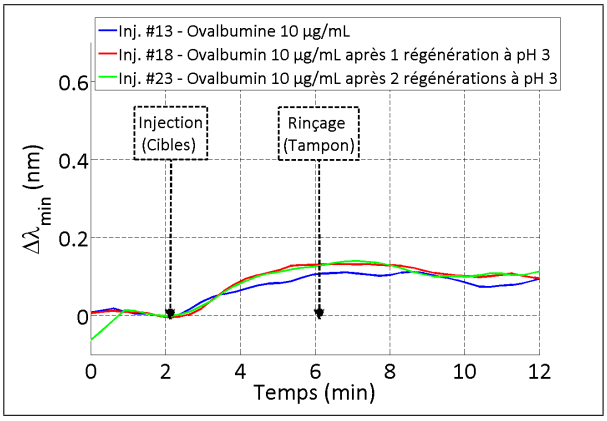
L'influence des différentes conditions de régénération est illustrée par la Figure D.7. Les cinétiques extraites dans le cas du contrôle positif (ovalbumine) ainsi que des marqueurs potentiels UBC12 et UBP14 correspondent, comme précédemment, à la moyenne des 6 réplicats sondes, calculée après soustraction des contrôles négatifs.

Dans le cas de l'antigène UBP14, les deux premières injections (n°5 à 2 μg/mL, et n°6 à 5 μg/mL) sont tracées à la suite afin de mettre en évidence la perte de signal après régénération à pH 4 et pH 9.

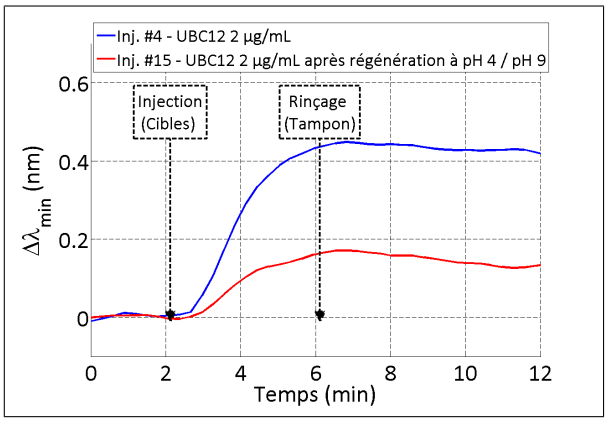
En raison de l'absence de résultats sur les deux couples UBC12/αUBC12 et UBP14/αUBP14, les régénérations à pH 10 ne sont pas présentées.



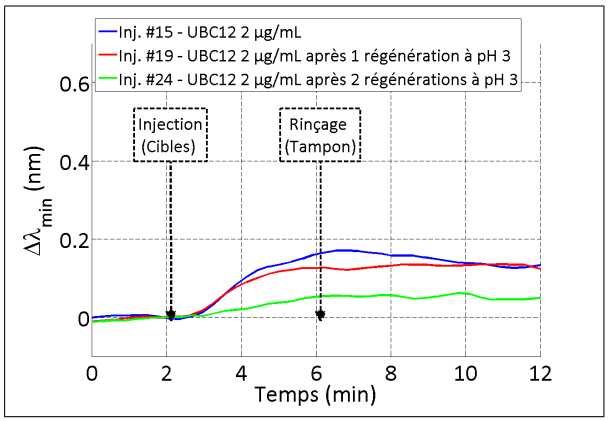
(a) **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine n°3 et 13 (10 μg/mL).**



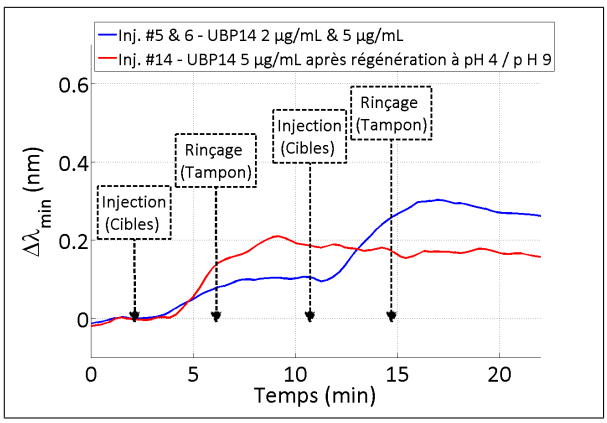
(b) **Cinétiques superposées des injections d'ovalbumine n°13, 18 et 23 (10 μg/mL).**



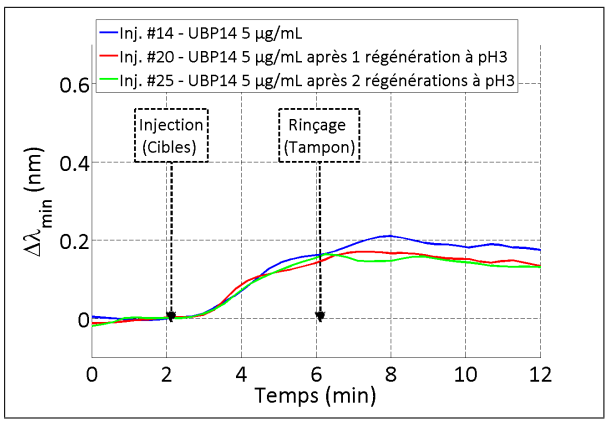
(c) **Cinétiques superposées des injections de l'antigène UBC12 n°4 et 15 (2 μg/mL).**



(d) **Cinétiques superposées des injections de l'antigène UBC12 n°15, 19 et 24 (2 μg/mL).**



(e) **Cinétiques superposées des injections de l'antigène UBP14 n°5 (2 μg/mL), 6 (5 μg/mL) et 14 (5 μg/mL).**



(f) **Cinétiques superposées des injections de l'antigène UBP14 n°14, 20 et 25 (5 μg/mL).**

FIGURE D.7 – **Cinétiques enregistrées pour le contrôle positif (ovalbumine) et les marqueurs potentiels UBC12 et UBP14 lors des expériences de régénération.** Les données présentées correspondent à la moyenne des signaux extraits sur les 6 réplicats sondes, après soustraction des contrôles négatifs.

Bibliographie

[1] Nadezhda A. Karaseva and Tatyana N. Ermolaeva. A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food. *Talanta*, 93(0) :44 – 48, 2012.

[2] Po Wang, Xijiao Li, Zong Dai, Xiaoyong Zou, and Xiguang Han. An efficient electrochemical method for direct screening of the mutation status of DNA base in oligonucleotides. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 201(0) :222 – 227, 2014.

[3] Yukichi Horiguchi, Seigo Miyachi, and Yukio Nagasaki. High-Performance Surface Aoustic Wave Immunosensing System on a PEG/Aptamer Hybridized Surface. *Langmuir*, 29(24) :7369–7376, 2013.

[4] Elisângela M. Linares, Claudio S. Pannuti, Lauro T. Kubota, and Stefan Thalhammer. Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 41(0) :180 – 185, 2013.

[5] Stefano Mariani and Maria Minunni. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pages 1–21, 2014.

[6] Liangcheng Zhou, Fei Ding, Hao Chen, Wei Ding, Weihua Zhang, and Stephen Y. Chou. Enhancement of immunoassay's fluorescence and detection sensitivity using three-dimensional plasmonic nano-antenna-dots array. *Analytical Chemistry*, 84(10) :4489–4495, 2012.

[7] Andrew C. Hatch, Jeffrey S. Fisher, Armando R. Tovar, Albert T. Hsieh, Robert Lin, Stephen L. Pentoney, David L. Yang, and Abraham P. Lee. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab on a Chip*, 11 :3838–3845, 2011.

[8] Affymetrix. `www.affymetrix.com/`. Online ; Accessed : 2014-09-02.

[9] J. Christof M. Gebhardt, David M. Suter, Rahul Roy, Ziqing W. Zhao, Alec R. Chapman, Srinjan Basu, Tom Maniatis, and X. Sunney Xie. Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells. *Nature Methods*, 10(5) :421–426, 2013.

[10] Martin Nirschl, Florian Reuter, and Janos Vörös. Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis. *Biosensors*, 1(3) :70–92, 2011.

[11] Jiří Homola. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews*, 108(2) :462–493, 2008.

[12] Marta Sánchez-Paniagua López, Gloria Frutos Cabanillas, M. Jesús Lobo Castañón, and Beatriz López-Ruiz. Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosensors and Bioelectronics*, 62(0) :350 – 356, 2014.

[13] Biacore Life Sciences (GE Healthcare). `https://www.biacore.com/`. Online ; Accessed : 2014-09-02.

[14] Ibis Technologies. `www.ibis-spr.nl/`. Online ; Accessed : 2014-09-02.

[15] HORIBA Scientific. `http://www.horiba.com/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/`. Online ; Accessed : 2014-09-02.

[16] Robert W. Wood. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philosophical Magazine Series 6*, 4(21) :396–402, 1902.

[17] Ugo Fano. The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces. *Journal of the Optical Society of America*, 31(3) :213–222, Mar 1941.

[18] Andreas Otto. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik*, 216(4) :398–410, 1968.

[19] Erich Kretschmann and Heinz Raether. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforschung*, 23 A :2135, 1968.

[20] 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, Université Paris XI, Orsay, 2004.

[21] Pierre Lecaruyer, Emmanuel Maillart, Michael Canva, and Jannick Rolland. Generalization of the Rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance. *Applied Optics*, 45(33) :8419–8423, Nov 2006.

[22] Ye-Yung Teng and Edward A. Stern. Plasma radiation from metal grating surfaces. *Physical Review Letters*, 19 :511–514, Aug 1967.

[23] Simona Scarano, Marco Mascini, Anthony P.F. Turner, and Maria Minunni. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5) :957 – 966, 2010.

[24] Lidija Malic, Teodor Veres, and Maryam Tabrizian. Nanostructured digital microfluidics for enhanced surface plasmon resonance imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5) :2053 – 2059, 2011.

[25] Xiaodi Su, Ying-Ju Wu, and Wolfgang Knoll. Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(5) :719 – 726, 2005.

[26] Almira Ramanaviciene, Natalija German, Asta Kausaite-Minkstimiene, Jaroslav Voronovic, Justina Kirlyte, and Arunas Ramanavicius. Comparative study of surface plasmon resonance, electrochemical and electroassisted chemiluminescence methods based immunosensor for the determination of antibodies against human growth hormone. *Biosensors and Bioelectronics*, 36(1) :48 – 55, 2012.

[27] Jérôme Hottin, Julien Moreau, Alain Bellemain, and Michael Canva. Biochip data normalization using multifunctional probes. *Analyst*, 137 :3119–3125, 2012.

[28] Maria L. Ermini, Stefano Mariani, Simona Scarano, Daniele Campa, Roberto Barale, and Maria Minunni. Single nucleotide polymorphism detection by optical DNA-based sensing coupled with whole genomic amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3) :985–993, 2013.

[29] Hana Šípová and Jiří Homola. Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids : A review. *Analytica Chimica Acta*, 773(0) :9 – 23, 2013.

[30] Roberta D'Agata, Giulia Breveglieri, Laura M. Zanoli, Monica Borgatti, Giuseppe Spoto, and Roberto Gambari. Direct detection of point mutations in nonamplified human genomic DNA. *Analytical Chemistry*, 83(22) :8711–8717, 2011.

[31] Hana Vaisocherová, Veronika Ševců, Pavel Adam, Barbora Špačková, Kateřina Hegnerová, Andres de los Santos Pereira, Cesar Rodriguez-Emmenegger, Tomáš Riedel, Milan Houska, Eduard Brynda, and Jiří Homola. Functionalized ultra-low fouling carboxy- and hydroxy-functional surface platforms : functionalization capacity, biorecognition capability and resistance to fouling from undiluted biological media. *Biosensors and Bioelectronics*, 51(0) :150 – 157, 2014.

[32] Yildiz Uludag and Ibtisam E. Tothill. Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification. *Analytical Chemistry*, 84(14) :5898–5904, 2012.

[33] Jenny Carlsson, Camilla Gullstrand, Gunilla T. Westermark, Johnny Ludvigsson, Karin Enander, and Bo Liedberg. An indirect competitive immunoassay for insulin autoantibodies based on surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4) :876 – 881, 2008.

[34] Alice Schlichtiger, Claudia Baier, Meng-Xin Yin, AndrewB. Holmes, Makiko Maruyama, Ralf Strasser, Ulrich Rant, Markus Thaler, and PeterB. Luppa. Covalent attachment of functionalized cardiolipin on a biosensor gold surface allows repetitive measurements of anticardiolipin antibodies in serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1) :275–285, 2013.

[35] Vincent Chabot, Yannick Miron, Michel Grandbois, and Paul G. Charette. Long range surface plasmon resonance for increased sensitivity in living cell biosensing through greater probing depth. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 174(0) :94 – 101, 2012.

[36] Masaei Horii, Hiroaki Shinohara, Yasunori Iribe, and Masayasu Suzuki. Living cell-based allergen sensing using a high resolution two-dimensional surface plasmon resonance imager. *Analyst*, 136 :2706–2711, 2011.

[37] Takaaki Hiragun, Yuhki Yanase, Kazuhiro Kose, Tomoko Kawaguchi, Kazue Uchida, Shinji Tanaka, and Michihiro Hide. Surface plasmon resonance-biosensor detects the diversity of responses against epidermal growth factor in various carcinoma cell lines. *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1) :202 – 207, 2012.

[38] Pierre Berini. Long-range surface plasmon polaritons. *Advances in Optics and Photonics*, 1(3) :484–588, 2009.

[39] Milan Vala, Rudolf Robelek, Markéta Bocková, Joachim Wegener, and Jiří Homola. Real-time label-free monitoring of the cellular response to osmotic stress using conventional and long-range surface plasmons. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1) :417 – 421, 2013.

[40] Alastair W. Wark, Hye Jin Lee, and Robert M. Corn. Long-range surface plasmon resonance imaging for bioaffinity sensors. *Analytical Chemistry*, 77(13) :3904–3907, 2005.

[41] Radan Slavík and Jiří Homola. Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 123(1) :10 – 12, 2007.

[42] Yi Wang, Wolfgang Knoll, and Jakub Dostalek. Bacterial pathogen surface plasmon resonance biosensor advanced by long range surface plasmons and magnetic nanoparticle assays. *Analytical Chemistry*, 84(19) :8345–8350, 2012.

[43] Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, Robert C. Mucic, and James J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592) :607–609, 1996.

[44] Laurent Lermusiaux, Alexandra Sereda, Benjamin Portier, Eric Larquet, and Sébastien Bidault. Reversible switching of the interparticle distance in DNA-templated gold nanoparticle dimers. *ACS Nano*, 6(12) :10992–10998, 2012.

[45] Kathryn M. Mayer and Jason H. Hafner. Localized surface plasmon resonance sensors. *Chemical Reviews*, 111(6) :3828–3857, 2011.

[46] Laurent Feuz, Magnus P. Jonsson, and Fredrik Höök. Material-selective surface chemistry for nanoplasmonic sensors : Optimizing sensitivity and controlling binding to local hot spots. *Nano Letters*, 12(2) :873–879, 2012. PMID : 22257106.

[47] Todd M. Squires, Robert J. Messinger, and Scott R. Manalis. Making it stick : convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature Biotechnology*, 26(4) :417–426, 2008.

[48] Marek Piliarik, Lucie Párová, and Jiří Homola. High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5) :1399 – 1404, 2009.

[49] J. Treviño, A. Calle, J.M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, and L.M. Lechuga. Single- and multi-analyte determination of gonadotropic hormones in urine by surface plasmon resonance immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 647(2) :202 – 209, 2009.

[50] Marek Piliarik and Jiří Homola. Surface plasmon resonance (SPR) sensors : approaching their limits ? *Optics Express*, 17(19) :16505–16517, Sep 2009.

[51] Hélène Chardin, Karen Mercier, Chiraz Frydman, and Nathalie Vollmer. Surface plasmon resonance imaging : A method to measure the affinity of the antibodies in allergy diagnosis. *Journal of Immunological Methods*, 405(0) :23 – 28, 2014.

[52] Marek Piliarik and Jiří Homola. Self-referencing SPR imaging for most demanding high-throughput screening applications. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 134(2) :353 – 355, 2008.

[53] Timothy M. Chinowsky, Michael S. Grow, Kyle S. Johnston, Kjell Nelson, Thayne Edwards, Elain Fu, and Paul Yager. Compact, high performance surface plasmon resonance imaging system. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9–10) :2208 – 2215, 2007.

[54] Charles T. Campbell and Gibum Kim. SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials*, 28(15) :2380 – 2392, 2007.

[55] Boutheina Cherif, André Roget, Christian L. Villiers, Roberto Calemczuk, Vincent Leroy, Patrice N. Marche, Thierry Livache, and Marie-Bernadette Villiers. Clinically related protein–peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging. *Clinical Chemistry*, 52(2) :255–262, 2006.

[56] Jiří Homola, Ivo Koudela, and Sinclair S. Yee. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers : sensitivity comparison. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 54(1–2) :16 – 24, 1999.

[57] Jing Guo, P. Donald Keathley, and Jeffrey T. Hastings. Dual-mode surface-plasmon-resonance sensors using angular interrogation. *Optics Letters*, 33(5) :512–514, 2008.

[58] J. Bianca Beusink, Angelique M.C. Lokate, Geert A.J. Besselink, Ger J.M. Pruijn, and Richard B.M. Schasfoort. Angle-scanning SPR imaging for detection of biomolecular interactions on microarrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(6) :839 – 844, 2008.

[59] Milan Vala, Karel Chadt, Marek Piliarik, and Jiří Homola. High-performance compact SPR sensor for multi-analyte sensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 148(2) :544 – 549, 2010.

[60] Bio-Rad. `https://www.biorad.com/`. Online ; Accessed : 2014-09-13.

[61] Marco Frasconi, Monica Mazzarino, Francesco Botrè, and Franco Mazzei. Surface plasmon resonance immunosensor for cortisol and cortisone determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(8) :2151–2159, 2009.

[62] Olivier R. Bolduc, Ludovic S. Live, and Jean-François Masson. High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta*, 77(5) :1680 – 1687, 2009.

[63] Hana Vaisocherová, Vitor M. Faca, Allen D. Taylor, Samir Hanash, and Shaoyi Jiang. Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7) :2143 – 2148, 2009.

[64] Marek Piliarik, Markéta Bocková, and Jiří Homola. Surface plasmon resonance biosensor for parallelized detection of protein biomarkers in diluted blood plasma. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4) :1656 – 1661, 2010.

[65] GWC Technologies. `http://www.gwcinstruments.com/gwcSPR100.htm/`. Online ; Accessed : 2014-12-12.

[66] Andrei V. Kabashin and Petr I. Nikitin. Surface plasmon resonance interferometer for bio- and chemical-sensors. *Optics Communications*, 150(1–6) :5 – 8, 1998.

[67] Andrei V. Kabashin, Sergiy Patskovsky, and Alexander N. Grigorenko. Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing. *Optics Express*, 17(23) :21191–21204, 2009.

[68] Liu Junfeng, Ding Xiang, Yu Xinglong, and Wang Dongsheng. Data analysis of surface plasmon resonance biosensor based on phase detection. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 108(1–2) :778 – 783, 2005.

[69] BiOptix. `http://www.bioptixinc.com/products/`. Online ; Accessed : 2014-12-12.

[70] Ivo Stemmler, Andreas Brecht, and Gunter Gauglitz. Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 54(1–2) :98 – 105, 1999.

[71] Fabrice Bardin, Alain Bellemain, Gisèle Roger, and Michael Canva. Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7) :2100 – 2105, 2009.

[72] Marek Piliarik, Milan Vala, Ivo Tichý, and Jiří Homola. Compact and low-cost biosensor based on novel approach to spectroscopy of surface plasmons. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(12) :3430 – 3435, 2009.

[73] Veronika Koubová, Eduard Brynda, Ludmila Karasová, Jiří Škvor, Jiří Homola, Jakub Dostálek, Petr Tobiška, and Jiří Rošický. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 74(1–3) :100 – 105, 2001.

[74] Sonia Herranz, Markéta Bocková, María Dolores Marazuela, Jiří Homola, and María Cruz Moreno-Bondi. An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(6) :2625–2634, 2010.

[75] Kateřina Hegnerová, Markéta Bocková, Hana Vaisocherová, Zdena Krištofiková, Jan Říčný, Daniela Řípová, and Jiří Homola. Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 139(1) :69 – 73, 2009.

[76] Fátima Fernández, Kateřina Hegnerová, Marek Piliarik, Francisco Sanchez-Baeza, Jiří Homola, and M.-Pilar Marco. A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4) :1231 – 1238, 2010.

[77] Xinyuan Chong, Le Liu, Zhiyi Liu, Suihua Ma, Jun Guo, Yanhong Ji, and Yonghong He. Detect the hybridization of single-stranded dna by parallel scan spectral surface plasmon resonance imaging. *Plasmonics*, 8(2) :1185–1191, 2013.

[78] Soichi Otsuki, Kaoru Tamada, and S. Wakida. Wavelength-scanning surface plasmon resonance imaging. *Applied Optics*, 44(17) :3468–3472, Jun 2005.

[79] Xiangyi Fang, Chunlong Liu, Xiaoli Cheng, Yaoling Wang, and Yucong Yang. A spectral imaging array biosensor and its application in detection of leukemia cell. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 156(2) :760 – 764, 2011.

[80] Soichi Otsuki and Mitsuru Ishikawa. Wavelength-scanning surface plasmon resonance imaging for label-free multiplexed protein microarray assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(1) :202 – 206, 2010.

[81] Giulia Cappi, Enrico Accastelli, Vera Cantale, Maria A. Rampi, Luca Benini, and Carlotta Guiducci. Peak shift measurement of localized surface plasmon resonance by a portable electronic system. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 176(0) :225 – 231, 2013.

[82] Julia A. Ruemmele, W. Paige Hall, Laura K. Ruvuna, and Richard P. Van Duyne. A localized surface plasmon resonance imaging instrument for multiplexed biosensing. *Analytical Chemistry*, 85(9) :4560–4566, 2013.

[83] PerkinElmer. `http://www.perkinelmer.com/`. Online ; Accessed : 2014-09-14.

[84] Zheng Zheng, Yuhang Wan, Xin Zhao, and Jinsong Zhu. Interrogation of surface plasmon resonance sensors using temporally stretched ultrashort optical pulses. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 133(2) :671 – 676, 2008.

[85] Mohamed Nakkach, Aurélien Duval, Buntha Ea-Kim, Julien Moreau, and Michael Canva. Angulo-spectral surface plasmon resonance imaging of nanofabricated grating surfaces. *Opt. Lett.*, 35(13) :2209–2211, 2010.

[86] Kristýna Pimková, Markéta Bocková, Kateřina Hegnerová, Jiří Suttnar, Jaroslav Čermák, Jiří Homola, and Jan E. Dyr. Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1—a protein marker of myelodysplastic syndromes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1) :381–387, 2012.

[87] Timothy M. Chinowsky, Linda S. Jung, and Sinclair S. Yee. Optimal linear data analysis for surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 54(1–2) :89 – 97, 1999.

[88] Kari Kukanskis, Jerome Elkind, Jose Melendez, Tiffany Murphy, Gregory Miller, and Harold Garner. Detection of DNA hybridization using the TISPR-1 surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Biochemistry*, 274(1) :7 – 17, 1999.

[89] Carsten Thirstrup and Weiyong Zong. Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 106(2) :796 – 802, 2005.

[90] Kazuyoshi Kurihara, Kaori Nakamura, and Koji Suzuki. Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 86(1) :49 – 57, 2002.

[91] Peter Schiebener, Johannes Straub, Johanna M. H. Levelt Sengers, and John S. Gallagher. Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 19(3) :677–717, 1990.

[92] Robert A. Sprague. Surface roughness measurement using white light speckle. *Applied Optics*, 11(12) :2811 – 2816, 1972.

[93] Timothy M. Chinowsky, Scott D. Soelberg, Paul Baker, Nathaneal R. Swanson, Peter Kauffman, Anthony Mactutis, Michael S. Grow, Robert Atmar, Sinclair S. Yee, and Clement E. Furlong. Portable 24-analyte surface plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9–10) :2268 – 2275, 2007.

[94] Marek Piliarik, Hana Vaisocherová, and Jiří Homola. Towards parallelized surface plasmon resonance sensor platform for sensitive detection of oligonucleotides. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 121(1) :187 – 193, 2007.

[95] Bryce P. Nelson, Timothy E. Grimsrud, Mark R. Liles, Robert M. Goodman, and Robert M. Corn. Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays. *Analytical Chemistry*, 73(1) :1–7, 2001.

[96] Jolanda Spadavecchia, Julien Moreau, Jérôme Hottin, and Michael Canva. New cysteamine based functionalization for biochip applications. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 143(1) :139 – 143, 2009.

[97] Julia Fuchs, Jean-Bernard Fiche, Arnaud Buhot, Roberto Calemczuk, and Thierry Livache. Salt concentration effects on equilibrium melting curves from DNA microarrays. *Biophysical Journal*, 99(6) :1886–1895, 2010.

[98] Damion Irving, Ping Gong, and Rastislav Levicky. DNA surface hybridization : Comparison of theory and experiment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(22) :7631–7640, 2010. PMID : 20469913.

[99] The DINAMelt Web Server. `http://mfold.rna.albany.edu//?q=DINAMelt/Two-state-melting`. Online ; Accessed : 2014-09-23.

[100] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. `http://www.inserm.fr/thematiques/cancer/enjeux/enjeux-medicaux`. Online ; Accessed : 2014-10-02.

[101] Masabumi Shibuya. Vascular endothelial growth factor and its receptor system : physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*, 153(1) :13–19, 2013.

[102] Patricia A. J. Muller and Karen H. Vousden. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 15(1) :2–8, 2013. 10.1038/ncb2641.

[103] Mie Grunnet and Jens B. Sorensen. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer*, 76(2) :138 – 143, 2012.

[104] Sara A. Hurvitz, Yufang Hu, Neil O'Brien, and Richard S. Finn. Current approaches and future directions in the treatment of her2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 39(3) :219 – 229, 2013.

[105] Andrew J. Armstrong, Mario A. Eisenberger, Susan Halabi, Stephane Oudard, David M. Nanus, Daniel P. Petrylak, A. Oliver Sartor, and Howard I. Scher. Biomarkers in the management and treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *European Urology*, 61(3) :549 – 559, 2012.

[106] Min Jae Lee, Jung Hoon Lee, and David C. Rubinsztein. Tau degradation : The ubiquitin–proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Progress in Neurobiology*, 105 :49–59, 2013.

[107] Lindsey N. Micel, John J. Tentler, Peter G. Smith, and Gail S. Eckhardt. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis : novel targets for anticancer therapies. *Journal of Clinical Oncology*, 31(9) :1231–1238, 2013.

[108] Ioannis A. Voutsadakis. Ubiquitin- and ubiquitin-like proteins-conjugating enzymes (E2s) in breast cancer. *Molecular Biology Reports*, 40(2) :2019–2034, 2013.

[109] Karli Rosner, Shreelekha Adsule, Brittany Haynes, Evangelia Kirou, Ikuko Kato, Darius R. Mehregan, and Malathy P.V. Shekhar. Rad6 is a potential early marker of melanoma development. *Translational Oncology*, 7(3) :384 – 392, 2014.

[110] Hwajin Jung, Byung-Gyu Kim, Won Hee Han, Jing Hoon Lee, Je-Yeol Cho, Won Sang Park, Madelon M. Maurice, Jin-Kwan Han, Min Jae Lee, Daniel Finley, and Eek-hoon Jho. Deubiquitination of dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. *Oncogenesis*, 2 :e64, 2013.

[111] Ning Wu, Cong Liu, Chong Bai, Yi-Ping Han, William C. S. Cho, and Qiang Li. Over-Expression of Deubiquitinating Enzyme USP14 in Lung Adenocarcinoma Promotes proliferation through the Accumulation of beta-Catenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6) :10749–60, 2013.

[112] Ying Fang, Da Fu, and Xi-Zhong Shen. The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1806(1) :1 – 6, 2010.

[113] Yasuo Miyoshi, Satoshi Nakayama, Yasuhiro Torikoshi, Satoshi Tanaka, Hideki Ishihara, Tetsuya Taguchi, Yasuhiro Tamaki, and Shinzaburo Noguchi. High expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 and -L3 mRNA predicts early recurrence in patients with invasive breast cancer. *Cancer Science*, 97(6) :523–529, 2006.

[114] Daniela Hoeller and Ivan Dikic. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*, 458(7237) :438–444, 2009.

[115] Wei Du and Qi-bing Mei. Ubiquitin-proteasome system, a new anti-tumor target. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(2) :187–188, 2013.

[116] Sophie Bellon, William Buchmann, Florence Gonnet, Nathalie Jarroux, Marielle Anger-Leroy, François Guillonneau, and Regis Daniel. Hyphenation of surface plasmon resonance imaging to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry by on-chip mass spectrometry and tandem mass spectrometry analysis. *Analytical Chemistry*, 81(18) :7695–7702, 2009.

[117] Tomáš Špringer, Markéta Bocková, and Jiří Homola. Label-free biosensing in complex media : A referencing approach. *Analytical Chemistry*, 85(12) :5637–5640, 2013.

[118] HORIBA Scientific. `http://www.horiba.com/us/en/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/spr-ms-coupling/`. Online ; Accessed : 2014-09-23.

[119] Fabien Remy-Martin, Marven El Osta, Geraldine Lucchi, Rabah Zeggari, Therese Leblois, Sophie Bellon, Patrick Ducoroy, and Wilfrid Boireau. Surface plasmon resonance imaging in arrays coupled with mass spectrometry (SUPRA–MS) : proof of concept of on-chip characterization of a potential breast cancer marker in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(2) :423–432, 2012.

[120] Chandrasekhara Venkata Raman. A new radiation. *Indian Journal of physics*, 2 :387–398, 1928.

[121] Martin Fleischmann, Patrick J. Hendra, and A. James McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2) :163 – 166, 1974.

[122] Dana Cialla, Anne März, René Böhme, Frank Theil, Karina Weber, Michael Schmitt, and Jürgen Popp. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) : progress and trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1) :27–54, 2012.

[123] Samuel L. Kleinman, Emilie Ringe, Nicholas Valley, Kristin L. Wustholz, Eric Phillips, Karl A. Scheidt, George C. Schatz, and Richard P. Van Duyne. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of crystal violet isotopologues : Theory and experiment. *Journal of the American Chemical Society*, 133(11) :4115–4122, 2011.

[124] Michael P. Cecchini, Vladimir A. Turek, Jack Paget, Alexei A. Kornyshev, and Joshua B. Edel. Self-assembled nanoparticle arrays for multiphase trace analyte detection. *Nature Materials*, 12(2) :165–171, 2013.

[125] Mitradeep Sarkar, Maha Chamtouri, Julien Moreau, Mondher Besbes, and Michael Canva. Introducing 2D confined propagating plasmons for surface plasmon resonance sensing using arrays of metallic ribbons. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 191(0) :115–121, 2014.

[126] Mitradeep Sarkar, Mondher Besbes, Julien Moreau, Jean-Francois Bryche, Aurore Olivéro, Grégory Barbillon, Anne-Lise Coutrot, Bernard Bartenlian, and Michael Canva. Hybrid plasmonic mode by resonant coupling of localized plasmons to propagating plasmons in a Kretschmann configuration. *ACS Photonics*, 2015. accepted.

Remerciements

Si vous êtes arrivés jusqu'à cette page, accrochez-vous, la fin de ce (long !) manuscrit est proche !

C'est en tant que docteure que je rédige aujourd'hui ces derniers paragraphes. Je remercie naturellement les membres de mon jury de thèse, à commencer par mes deux rapporteurs, Wilfrid Boireau et Paul Charette, le président, Thierry Livache, ainsi que mes examinateurs, Sandrine Lévêque-Fort et Patrick England, pour leurs remarques judicieuses, leurs conseils avisés... et surtout leur gentillesse lors des échanges que nous avons pu avoir suite à ma soutenance.

Comme vous l'avez sans doute constaté, je me suis appliquée, jusqu'à présent, à utiliser un ton relativement neutre pour exposer les développements réalisés... tout simplement parce que les résultats présentés n'auraient pu être obtenus sans l'aide des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces trois années et qui m'ont guidée, tout au long de ma thèse. J'espère pouvoir leur rendre, par ces quelques paragraphes, toute la gratitude que je ressens à leur égard.

Michael, je crois très sincèrement que l'on peut difficilement faire mieux comme directeur de thèse ! Je me souviens de la première fois où je t'ai rencontré, lorsque je suis venue au laboratoire suite à l'annonce de thèse que j'avais reçue par mail. Etant naturellement assez timide, je me rappelle avoir été tout de suite très à l'aise en ta compagnie : je pense que tous tes doctorants seraient d'accord avec moi sur le fait que tu es quelqu'un de très chaleureux. J'ai toujours eu le sentiment que je pouvais compter sur toi s'il y avait le moindre problème : tu fais toujours passer les intérêts de tes doctorants avant toute chose. Ce climat très sécurisant a été très bénéfique : je sais malheureusement que certains de mes camarades en thèse n'ont pas eu la même chance que moi. De tout coeur, je te remercie pour ces trois années en ta compagnie.

Julien... je crois que je ne pourrais jamais t'exprimer tous mes remerciements en quelques lignes ! Si je regarde le chemin que j'ai parcouru depuis que j'ai commencé ma thèse, je crois avoir fait d'énormes progrès et ce grâce à toi ! Tu es tout simplement brillant, et tu as cette modestie, cet amour de l'enseignement qui font qu'il est très agréable d'apprendre à tes côtés. Jamais je ne t'ai vu refuser d'aider l'un des doctorants de l'équipe : au contraire, tu acceptes volontiers de donner un coup de main, toujours avec le sourire, et avec cette patience exemplaire dont tu as le secret ! Je dirais que cette pédagogie est réellement ancrée en toi : tu sais guider, encourager, et amener les gens toujours plus loin, naturellement. Ce n'est pas pour rien que je progresse régulièrement en course à pied ! Merci pour ces trois années passées dans la bonne humeur (malgré les expériences qui ne marchent pas toujours comme on le souhaite...), merci pour tout !

Emmanuel, tu complètes tout simplement cette équipe de choc, en apportant une vision plus pragmatique de la recherche appliquée. Je te remercie très sincèrement pour ton implication tout au long de ma thèse : tu t'es toujours montré bienveillant, disponible, prêt à m'apporter ton aide si nécessaire. Travailler avec toi a été extrêmement enrichissant, et je ne sais honnêtement pas ce qui m'impressionne le plus : la qualité de ton travail et ta volonté d'aller au fond des choses, ou ta patience exemplaire pour me transmettre cette démarche et me faire avancer. Par certains côtés, tu incarnes la personne que je souhaite devenir lorsque je me projette dans l'avenir... si un jour je m'en approche, je serai très fière de moi !

Aurore... la meilleure des co-bureau, tu m'as supportée dans le meilleur et surtout dans le pire ! Tu as veillé sur moi pendant ma rédaction, tu t'es assurée que je mange mes cinq fruits et légumes par jour (j'aurais préféré manger cinq chocolats) ! J'ai passé une excellente année en ta compagnie, j'ai énormément appris, et je dois avouer que tu m'impressionnes chaque jour par tes qualités. Tu es une personne exceptionnelle et je suis heureuse d'avoir pu faire un bout de chemin avec toi. Je te souhaite tout le meilleur pour ta thèse, mais au vu de tout le travail que tu as accompli jusqu'à présent, je dois avouer que je ne me fais aucun souci pour toi.

Antoine, je suis très sincèrement désolée de ne pas avoir été très présente lors de ta période sombre de "stagiaire"... j'espère que tu n'es pas ressorti (trop) traumatisé par cette expérience ! Merci pour ta compagnie et les discussions lors des pauses café ! Et merci pour ton courage, car c'est toi qui t'es sacrifié pour m'accompagner courir au début de ma thèse ! (J'ai encore froid aux oreilles en repensant aux sorties en plein hiver). Il ne me reste plus qu'à te souhaiter bon courage pour la fin de ta thèse... la période de rédaction t'attend, mais je suis sûre que tu arriveras à franchir ce cap difficile ! Et bonne chance pour ton triathlon ! ! !

Mitradeep, quand je pense à toi je te vois toujours avec le sourire. Chaleureux, bienveillant, généreux, tu es toujours de bon conseil et c'est un réel plaisir de t'écouter parler de tout. Je me souviens en particulier de notre vol Paris-San Francisco... où je ne me suis pas du tout ennuyée à tes côtés ! Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, et j'espère pour toi une belle carrière dans la recherche et à Paris !

Flavie, je regrette de ne pas avoir pu passer plus de temps avec toi, tu es une personne très attachante ! Merci pour toutes les discussions "de fille" avec ton petit accent marseillais, merci pour ta bonne humeur communicative ! J'espère très sincèrement que nous garderons contact !

Nathalie (dite la "petite"), mais quelle énergie ! Je ne te connais malheureusement pas autant que je le souhaite, mais je suis impressionnée par ta motivation dans toutes les choses que tu entreprends... et quel talent de chanteuse ! Je crois que je me souviendrai toujours de ta petite représentation avec Aurore, c'était tout simplement magnifique !

Karen (Perronet), je te remercie pour ta gentillesse et ton aide spontanée tout au long de ma thèse. Je garde de nos échanges un souvenir très agréable... je dois également t'avouer que j'ai toujours été très impressionnée par ta force de caractère, j'espère arriver à m'affirmer aussi bien dans ma future carrière !

Alain (Bellemain), tu es parti en retraite au début de ma thèse, mais nous avons réussi à garder contact et j'ai eu la chance de te revoir lors de ma soutenance. J'ai été très touchée par ta gentillesse, et je te remercie chaleureusment pour ta contribution à ces travaux !

Nathalie (Westbrook), nous n'avons malheureusement eu que peu d'échanges mais tu n'as jamais hésité à me faire partager tes conseils. Je te remercie pour ta disponibilité et ton aide au cours de ma thèse.

Arnaud, je n'ai pas eu la chance de te connaître autant que je le souhaite, et pourtant tu t'es toujours montré très avenant à mon égard. Merci pour ta présence qui contribue au climat très chaleureux du groupe !

Jonas, Jean-François et Raymond, j'ai été malheureusement moins disponible à la fin de ma thèse et je regrette d'avoir eu peu d'occasions pour vous connaître. Je vous souhaite à tous les trois une bonne continuation de votre thèse et beaucoup de bonheur dans votre vie personnelle !

Nicolas, Maha et Mas, j'espère que vous avez trouvé votre voie après la thèse. Je vous remercie de m'avoir accueillie très chaleureusement à mon arrivée dans le groupe, je suis heureuse de vous avoir eus à mes côtés dans cette aventure !

Frédéric, tu n'as pas hésité à t'impliquer dans ces travaux et à me consacrer du temps, que ce soit pour résoudre des problèmes techniques ou pour échanger des idées... un grand merci pour ton aide !

Alain (Aide), je te remercie pour ta disponibilité et ta contribution aux développements instrumentaux !

Je remercie très chaleureusement les membres du Laboratoire Charles Fabry qui m'ont donné, à un moment ou un autre, un coup de pouce ou un conseil : Minh Châu, Nathalie (Lebas), André, Anne-Lise, Mondher... merci à vous !

Je souhaiterais remercier également toutes nos excellentes stagiaires, Marine (Roué), Anaïs, Alison et Marine (Boulade), pour leur dynamisme et leur contribution à ces travaux !

Karen (Mercier), je te remercie pour ta gentillesse, tes conseils, ta disponibilité et ton aide tout au long de ma thèse. J'ai énormément apprécié travailler avec toi, et j'ai beaucoup appris grâce à nos échanges. Je te souhaite beaucoup de bonheur et d'épanouissement dans ta vie professionnelle et personnelle (et j'en profite pour souhaiter la bienvenue au petit Nolan !).

Fatima, je te t'ai (très) souvent sollicitée pour tes conseils et ton aide, et je te remercie pour ta patience d'ange. Tu as toujours pris le temps pour me donner un coup de main, avec le sourire. Merci pour tout !

Geoffrey, je te remercie très sincèrement pour ton aide lors de mes expériences, pour ta disponibilité et ta bonne humeur ! Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, et surtout beaucoup de victoires au rugby !

Je tiens à remercier de tout coeur le reste de l'équipe de HORIBA Scientific : Cécile, Géraldine, Chiraz, Elodie, Denis, Tanh-Liêm, Michèle... et tous ceux avec qui j'ai eu la chance d'interagir durant ma thèse, et qui m'ont tous réservé un accueil très chaleureux à mon arrivée. Un grand merci à vous !

Je remercie également tous les acteurs du projet ANR PIRANEX, je suis heureuse d'avoir pu prendre part à ce projet à vos côtés.

Enfin, je remercie mes amis, ma famille, et toutes les personnes que j'aurais oublié de citer, qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse ! Merci !

Résumé

Dépistage du VIH, test de grossesse, mais également surveillance des eaux, analyse de contaminants agro-alimentaires : la biodétection est au coeur des problématiques de santé actuelles. Dans ce contexte, les biocapteurs plasmoniques connaissent depuis quelques années un essor particulièrement important : de plus en plus de sociétés, telles que HORIBA Scientific, proposent des prototypes commerciaux, destinés tant à des utilisateurs du domaine de la recherche que de l'industrie.

Basée sur le phénomène de résonance des plasmons de surface (communément appelé SPR) la biodétection plasmonique repose sur l'extrême sensibilité d'une onde évanescente se propageant à l'interface entre un film d'or, la biopuce, et le milieu diélectrique couvrant, siège des interactions biomoléculaires étudiées. De manière plus concrète, toute adsorption de matériel biologique se produisant à cette interface entraîne une modification importante des propriétés optiques d'un faisceau de lumière réfléchi par la biopuce : le principe de transduction par SPR consiste alors à mesurer directement ces variations. A l'heure actuelle, différents modes d'interrogation, offrant des performances intéressantes, mais également des limitations propres à chaque configuration.

Pour répondre aux exigences de précision et de dynamique de mesure posées par de nombreuses applications, un développement théorique et instrumental, présenté dans ce document, a été initié dans le but de proposer un nouveau un nouveau mode d'interrogation des biopuces plasmoniques : l'interrogation multi-spectrale. Les résultats obtenus par cette technique ont été exploités pour concevoir et réaliser une source multi-spectrale à base de LEDs, particulièrement avantageuse vis-à-vis des configurations existant à l'heure actuelle. La caractérisation du système développé dans le cadre du diagnostic génétique (mucoviscidose) et celui du cancer, ouvre la voie à une nouvelle génération de biocapteurs performants, compacts et de coût relativement raisonnable, présentant un potentiel industriel certain.

Abstract

Biodetection is at the core of the current health concerns, as shown through the variety of applications to HIV screening, food contaminant analysis or water quality monitoring. In this field, plasmonic biosensing is a well-established label-free technique on the market : commercial systems from HORIBA Scientific are currently available for both research and industrial users.

Based on the surface plasmon resonance (SPR) phenomenon, plasmonic biodetection uses the high sensitivity of an evanescent wave propagating along a metallic film (forming the biochip) and the surrounding dielectric medium interface. More specifically, the adsorption of biomolecules onto the metal surface induces a strong change in the optical properties of a light beam reflected by the biochip : the main principle of plasmonic transduction consists in measuring these physical changes. Several interrogation techniques have therefore been developed to access such optical information, but they fail in meeting the most demanding user requirements for precise, real-time, high-throughput measurement.

Initiated by these issues, the instrumentation work presented in this document has led to the development of a novel SPR interrogation technique, referred to as multi-spectral interrogation. Moreover, the promising results obtained have been pushed forward to propose a multi-spectral illumination system based on LEDs, providing attractive performances compared to existing configurations. The biosensing potential of the developed system, demonstrated through applications to genetic diagnosis and cancer detection, opens the door to a new generation of compact, high-performance, low-cost SPR sensors.