

# Réalisation et caractérisation de puces de capteurs à cristaux photoniques : Vers un dispositif de biodétection intégré

Nicolas Gaignebet

### ► To cite this version:

Nicolas Gaignebet. Réalisation et caractérisation de puces de capteurs à cristaux photoniques : Vers un dispositif de biodétection intégré. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSEI128 . tel-03199637

### HAL Id: tel-03199637 https://theses.hal.science/tel-03199637

Submitted on 15 Apr 2021

**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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSEI128

# THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de l'INSA de Lyon

### **Ecole Doctorale** N° 160 Électronique, Électrotechnique, et Automatique

Spécialité : Electronique, micro et nanoélectronique, optique et laser

> Soutenue publiquement le 11/12/2020, par : Nicolas Gaignebet

### Réalisation et caractérisation de puces de capteurs à cristaux photoniques : vers un dispositif de biodétection intégré

Devant le jury composé de :

M. CASSAN, Éric M. WEHRSPOHN, Ralf Mme LEREU, Aude M. HADJI, Emmanuel M. DUPOY, Mathieu M. POUTEAU, Patrick M. BENYATTOU, Taha Mme JAMOIS, Cécile

Professeur des Universités Professeur Chargée de Recherche Ingénieur CEA (HDR) Ingénieur CEA Ingénieur Avalun Directeur de recherche Chargée de recherche

Rapporteur Rapporteur Examinatrice Examinateur Invité Invité Directeur de thèse Co-directrice de thèse

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

### Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2016-2020

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
СНІМІЕ	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr INSA : R. GOURDON	M. Stéphane DANIELE Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon IRCELYON-UMR 5256 Équipe CDFA 2 Avenue Albert EINSTEIN 69 626 Villeurbanne CEDEX directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	<u>ÉLECTRONIQUE,</u> <u>ÉLECTROTECHNIQUE,</u> <u>AUTOMATIQUE</u> http://edeea.ec-lyon.fr Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI École Centrale de Lyon 36 Avenue Guy DE COLLONGUE 69 134 Écully Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17 gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : H. CHARLES secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	M. Philippe NORMAND UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX philippe.normand@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ http://www.ediss-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : M. LAGARDE secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie RICARD-BLUM Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Curien - 3ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tel : +33(0)4 72 44 82 32 sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	M. Hamamache KHEDDOUCI Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tel : 04.72.44.83.69 hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATÉRIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bât. Direction ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIÈRE INSA de Lyon MATEIS - Bât. Saint-Exupéry 7 Avenue Jean CAPELLE 69 621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28 jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bât. Direction mega@insa-lyon.fr	M. Jocelyn BONJOUR INSA de Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69 621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* http://ed483.univ-lyon2.fr Sec. : Véronique GUICHARD INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.72.76 veronique.cervantes@univ-lyon2.fr	M. Christian MONTES Université Lyon 2 86 Rue Pasteur 69 365 Lyon CEDEX 07 christian.montes@univ-lyon2.fr

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gsignebetp] [2020]; INSA Lyón, sous droits reservés chéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

 $5~\mathrm{mars}~2021$ 

# Remerciements

Cette thèse a constitué pour moi une étape importante, tant sur le plan professionnel que personnel. Elle est l'aboutissement de mes neuf années d'études à l'INSA de Lyon, et m'a ainsi permis de développer mes connaissances et compétences, scientifiques et humaines, au sein d'un projet qui m'a toujours motivé et tenu à cœur. Je ressors de cette expérience grandi, et prêt à me lancer avec enthousiasme vers la prochaine étape !

J'aimerais donc remercier ici toutes les personnes qui m'ont accompagné durant cette aventure. Je commencerai par remercier les membres de mon jury de thèse, pour avoir étudié mon travail avec attention et avoir assisté à ma soutenance à distance en cette période de crise sanitaire. Je tiens également à remercier mes directeurs de thèse, Taha Benyattou et Cécile Jamois, ainsi que mon mentor expérimentateur, Lotfi Berguiga, qui m'ont aidé à me développer et à grandir, m'ont apporté leur aide et leur soutien durant ces quatre années parsemées d'épreuves mais aussi de succès. J'adresse aussi mes remerciements aux partenaires du projet CLIPO, la société Avalun et le CEA-Leti, et en particulier Mathieu Dupoy avec qui j'ai eu la chance de développer des protocoles expérimentaux passionnants et motivants.

Je souhaite remercier également l'école doctorale EEA dirigée par Gérard Scorletti, et le laboratoire INL dirigé par Catherine Bru-Chevallier, pour m'avoir permis de mener à bien mon travail de thèse. Et en particulier l'équipe i-Lum (ex-Nanophotonique), l'équipe Nanobiotechnologies et notamment Yann Chevolot et Thomas Gehin avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur l'aspect bio-chimie de ma thèse, et la plateforme Nanolyon. Merci également au personnel administratif, notamment Virginie Lagarde, Annie Suslec et Sylvie Concalves au laboratoire, Patricia Langelot et Elisabeth Rey au département SGM de l'INSA de Lyon, et Marie-Christine Havgoudoukian à l'ED-EEA. Un merci tout particulier également à Fabien Mandorlo, Philippe Girard et Bruno Masenelli, pour leur soutien et la qualité de nos discussions, sur les plans scientifique, électronique et humain. Je m'estimerais heureux d'avoir acquis le quart de la moitié de vos qualités. Et un merci et non moins sincère à toutes les personnes avec qui j'ai échangé durant ces quatre années : Lydie Ferrier, Erwann Fourmond, Alain Fave, Céline Chevalier, Xavier Letartre, Tom Wood, Alexandra Apostoluk, Mustapha Lemiti, Daniel Vincent, Joëlle Grégoire, et plus généralement tous ceux que j'ai pu côtoyer de près ou de loin à l'INSA, l'UCBL et l'ECL. Vous avez été tant de sources d'enrichissement qu'il me faudrait de nombreuses pages pour tout détailler!

Mes collègues doctorants ont occupé une place centrale dans ces quatre dernières années, aussi je tiens à les remercier chaleureusement de s'être embarqués comme moi sur le navire de la thèse. Un sââlut très amical et de grosses bises à Ali « Jaffar », Benoit « Mulet », Florian « Loser », Li « Jade huā » Xiao , Michele « Trombettista », Nelly « Moulin », Zhang « Victor you're so annoying » Yu, et les plus nouveaux Alestair, Ali, Éva et Jérémy (bon courage et tenez bon!), ainsi que Benjamin « le Fragile » et Solène « Brôôôttet » malgré leur dédain manifeste pour toute forme de doctorat. Merci également aux étudiants de SGM et mes stagiaires et PFEs : ces expériences d'enseignement et d'encadrement ont été très fécondes pour moi, elles m'ont appris à mieux formaliser mes idées, et m'ont apporté le plaisir du partage des connaissances qui me tient à cœur.

Enfin je remercie tous mes amis (de l'INSA, du Sud, de Finlande et d'ailleurs...) pour leur soutien et les moments de joie qu'ils m'ont procurés, dans les hauts comme dans les bas. Et en vrac parmi mes sources d'inspiration et de culture : Science Étonnante, Mr. Phi et la Méthode Scientifique, Stephen Curry, Josef Průša, les fabricants de puzzles, OGN, Zuppi et Rubenstock... Merci à mes deux partenaires de confinement, ma minette Néfertiti (« Pâté ») et Émilie, pour m'avoir supporté dans tous les sens du terme et avoir été mon refuge de bonheur. Merci enfin à ma famille, grâce à l'ADN et l'éducation de laquelle je suis devenu celui qui écrit ces lignes avec émotion, fierté et reconnaissance.

# Table des matières

### Introduction

1	La l nem	a biodétection portative par voie optique : état de l'art et position- ement		
	1.1	Introd	uction	13
	1.2	La biodétection <i>Point-Of-Care</i> : éléments de définition		
		1.2.1	Principe de fonctionnement des capteurs d'affinité	14
		1.2.2	L'approche optique	15
	1.3	Revue	bibliographique : la biodétection optique vers le $Point-of-Care$ .	17
		1.3.1	La voie métallique : dispositifs à résonance plasmonique $\ . \ . \ .$	17
			Résonance plasmonique de surface (SPR)	17
			Résonance de plasmons de surface localisés (LSPR)	20
			Transmission optique extraordinaire (EOT) $\ldots \ldots \ldots$	22
		1.3.2	La voie diélectrique : dispositifs photoniques	24
			Interférométrie	25
			Structures diélectriques résonantes	26

9

			GMR	31
		1.3.3	Tableau récapitulatif	33
	1.4	Appro toniqu	che de la thèse : dispositif de biodétection portatif à cristaux pho- les	35
	1.5	Conclu	usion	37
2	Mic péri	ro-réfle menta	ectivité en milieu liquide : banc de mesure et méthodes ex- les	- 38
	2.1	Introd	uction	39
	2.2	Banc o	de micro-réflectivité	40
		2.2.1	Présentation générale du banc	40
		2.2.2	Caractéristiques du faisceau d'excitation	43
		2.2.3	Collecte du signal	46
	2.3	Procée	lure expérimentale	49
		2.3.1	Préparation de surface	49
		2.3.2	Préparation de la cellule fluidique	50
		2.3.3	Mesure d'indice de réfraction	52
		2.3.4	Normalisation des spectres de micro-réflectivité	54
	2.4	Stabili	té et reproductibilité	55
		2.4.1	Stabilité de la résonance en milieu liquide	55
		2.4.2	Reproductibilité de la mesure de résonance	57
	2.5	Conclu	usion	58

3	Capteurs à cristaux photoniques pour application dans la biodétection			60
	3.1	Introduction		
	3.2	Conce	ption des capteurs à cristaux photoniques	61
		3.2.1	Caractéristiques recherchées des capteurs optiques	61
		3.2.2	Conception des structures	63
		3.2.3	Comparaison avec l'état de l'art	68
	3.3	Réalis	ation expérimentale des cristaux photoniques	72
		3.3.1	Fabrication	72
		3.3.2	Caractérisation structurale	74
	3.4	Démoi	nstration expérimentale de la transduction optique	75
	3.5	3.5 Application à la détection surfacique		
		3.5.1	Détection d'une monocouche de BSA	79
		3.5.2	Sensibilité surfacique théorique	84
		3.5.3	Détection spécifique de streptavidine	88
	3.6	Conclu	usion	95
<ul> <li>4 Vers les applications « <i>Point-of-Care</i> » : spectrométrie in silicium</li> <li>4.1 Introduction</li></ul>		pplications « <i>Point-of-Care</i> » : spectrométrie intégrée sur	97	
		uction	98	
	4.2	Intégra	ation de la spectrométrie sur puce	98
		4.2.1	Principe du spectromètre intégré	99
		4.2.2	Mise en membranes des cristaux photoniques	102

		4.2.3	Conception des cristaux photoniques	104	
	4.3 Démonstration expérimentale du spectromètre intégré			109	
		4.3.1	Caractérisations structurales	109	
		4.3.2	Caractérisation optique du spectromètre intégré	114	
	4.4	4.4 Démonstration de l'imagerie sans lentille			
		4.4.1	Banc de caractérisation en transmission sans lentille	122	
		4.4.2	Visualisation du décalage spectral par caméra CMOS : analyse qualitative	123	
		4.4.3	Mesure du décalage spectral sur CPs uniques : analyse quantitative	e127	
		4.4.4	Détermination du décalage spectral sur le spectromètre intégré : méthodologie	130	
	4.5 Conclusion			132	
	Conclusions et perspectives				
$\mathbf{A}$	Simulation de la sensibilité en fonction de la forme des trous				
в	Gra	vure d	es cristaux photoniques par le PBS	139	
С	C Fonctionnalisation de surface		alisation de surface	144	
	C.1	Silanis	ation	145	
	C.2	Greffag	ge de l'ADN biotinylé	146	
D	Mét	hodes	de mesure de décalage spectral	149	
	D.1	Métho	de par ajustement numérique	149	
	D.2	Métho	de par corrélation	151	

$\mathbf{E}$	Dimensions des cristaux photoniques du spectromètre intégré			
	E.1	Dimensions des CPs visées	153	
	E.2	Lois de variations de la résonance en fonction des dimensions	156	
$\mathbf{F}$	Filt	rage par polariseurs croisés	158	
Bi	Bibliographie			

# Introduction

Les besoins en matière d'analyse moléculaire portative sont croissants, comme dans le cadre de la médecine d'urgence [1], le dépistage médical précoce [2], ou encore le contrôle sanitaire des denrées alimentaires [3]. Aujourd'hui, la plupart des tests biomédicaux et des analyses de denrées alimentaires sont opérés dans des structures centralisées telles que les hôpitaux et les laboratoires d'analyses, avec des équipements couteux et volumineux, utilisés par un personnel qualifié. Ces tests peuvent être longs, notamment à cause du temps nécessaire à la collecte de l'échantillon à étudier, son acheminement vers le centre d'analyse, sa préparation, et la transmission du résultat sur le lieu d'intervention [4].

D'autre part, le coût de ces équipements les rend peu abordables dans les campagnes ou les pays en développement, ce qui empêche l'accès aux diagnostics, et donc aux soins, à certaines populations [5]. De même, la disponibilité des tests de denrées alimentaires est limitée dans les pays en développement, où les maladies liées à l'alimentation sont plus courantes [6].

Ces besoins mènent au développement de biocapteurs performants répondant aux critères du « *Point-of-Care* » (POC), c'est-à-dire la détection sur le lieu d'intervention, que ce soit au chevet du patient, dans un cabinet de médecin, etc. Les capteurs POC ont pour objectif principal de réduire la durée nécessaire aux analyses, afin d'être en mesure de prendre une décision thérapeutique la plus rapide [7]. Le diagnostic de l'accident vasculaire cérébral ischémique aigu est un exemple d'application possible des capteurs POC, dans lequel la détection de biomarqueurs dans le sang permet une prise en charge rapide du patient [8]. Les capteurs POC pourront aussi jouer un rôle important dans le domaine du diagnostic précoce, notamment dans la détection des cancers [9]. De plus, grâce à leur mobilité ils permettront de proposer des analyses médicales dans les zones éloignées des centres hospitaliers et des laboratoires d'analyses. L'objectif de cette thèse est de développer un dispositif de détection optique compatible avec les critères du POC, et qui permette en outre de répondre aux besoins de criblage moléculaire. Ce dispositif devra être portable, rapide, bas-coût, et capable de détecter plusieurs biomolécules en parallèle avec une puce jetable, tout en présentant de bonnes performances de détection. Nous nous concentrerons sur la détection de biomolécules, mais les principes de détection d'autres espèces comme les virus ou les bactéries sont similaires, et diffèrent principalement par les dimensions des espèces recherchées et la chimie associée.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre du PROJET COLLABORATIF CLIPO (plateforme optique CLIPsable pour la biOdétection), en partenariat avec le CEA-LETI et l'entreprise AVALUN, et financé par l'Agence Nationale de Recherche (ANR).

Le présent manuscrit est divisé en quatre chapitres :

- Dans le premier chapitre, après avoir précisé notre champ d'étude, nous présenterons une revue bibliographique de la biodétection optique. Nous comparerons les caractéristiques des différentes approches décrites dans la littérature, afin de mettre en évidence leurs avantages et inconvénients pour la conception d'un capteur portatif de type *Point-Of-Care*. La fin de ce premier chapitre sera consacrée à la description de l'approche que nous avons choisi de développer dans cette thèse, qui consiste en un dispositif d'imagerie sans lentille d'une puce de cristaux photoniques en silicium. Notre stratégie se base sur la mesure du décalage spectral de la résonance de ces structures à l'aide d'un détecteur en intensité, afin de détecter la présence de biomolécules à leur surface.
- Le second chapitre est dédié à la description détaillée du banc optique que nous avons développé, dans le but de caractériser les propriétés optiques de nos cristaux photoniques en vue de leur utilisation en imagerie. Nous décrirons également les procédures de préparation des échantillons pour des mesures spectrales en milieu liquide, ainsi que les outils et méthodes que nous avons utilisés pour ces mesures. Enfin, nous déterminerons les limites de détection de ce banc optique en matière de stabilité et de reproductibilité, afin de valider sa conception pour la détection de biomolécules visée dans cette thèse.
- Dans le troisième chapitre, après avoir rappelé les caractéristiques recherchées pour nos cristaux photoniques, nous présenterons leur conception, puis leur réa-

lisation expérimentale. Nous étudierons ensuite les propriétés optiques de nos échantillons par le biais de caractérisations spectrales. Ces études mèneront à la démonstration de la détection spécifique de biomolécules à la surface des capteurs.

• Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit est consacré à la démonstration de notre dispositif d'imagerie sans lentille. Nous verrons dans un premier temps notre stratégie pour l'intégration d'une fonction de spectrométrie sur puce, qui sera basée sur la variation de la longueur d'onde de résonance des cristaux photoniques par conception. Par la suite, nous décrirons une étude préliminaire d'imagerie visant à mesurer un décalage spectral à l'aide d'une caméra CMOS. Enfin nous discuterons de l'interprétation des résultats de l'imagerie, et de la mise en œuvre de cette technique pour la détection de faibles décalages spectraux, comme ceux qui sont induits par une couche de biomolécules.

# Chapitre 1

# La biodétection portative par voie optique : état de l'art et positionnement

### Sommaire

1.1	Introduction			
1.2	La bi	La biodétection Point-Of-Care : éléments de définition		
	1.2.1	Principe de fonctionnement des capteurs d'affinité	14	
	1.2.2	L'approche optique	15	
1.3	Revue bibliographique : la biodétection optique vers le Point-of-Care			
	1.3.1	La voie métallique : dispositifs à résonance plasmonique $\ . \ .$	17	
	1.3.2	La voie diélectrique : dispositifs photoniques	24	
	1.3.3	Tableau récapitulatif	33	
1.4	Appr crista	oche de la thèse : dispositif de biodétection portatif à aux photoniques	35	
1.5	Conclusion			

### 1.1 Introduction

Les capteurs *Point-Of-Care* (POC) visent à réduire le coût et le temps des analyses biomédicales, et permettre un diagnostic rapide sur le lieu d'intervention. Ces outils pourront jouer un grand rôle en matière de santé publique, en permettant notamment le dépistage précoce de maladies telles que les cancers, ou le contrôle de l'évolution des épidémies. Ils pourront également fournir des analyses sanitaires de la nourriture, et ainsi lutter contre les maladies d'origine alimentaire.

Pour remplir ces rôles, les capteurs POC devront répondre à de nombreuses exigences. L'ergonomie est primordiale pour faciliter leur utilisation par des nonspécialistes. Le caractère portable des capteurs POC est également essentiel pour assurer leur mobilité, et ainsi permettre leur utilisation loin des centres hospitaliers et des laboratoires d'analyse, comme dans les campagnes ou les pays en développement. Cependant la portabilité ne doit pas être obtenue au détriment des performances : les capteurs POC devront présenter une bonne sensibilité, tout en offrant une réponse rapide permettant la prise de décision thérapeutique. Enfin la compatibilité avec les technologies de fabrication de masse est importante, pour diminuer le coût des équipements et des puces consommables et en permettre l'accès au plus grand nombre.

Parmi les différentes voies de recherche, les capteurs optiques constituent une approche privilégiée, car leur robustesse associée à de hautes performances de détection en font des candidats prometteurs vers les plateformes de détection POC. Ils permettent également une intégration dense de nombreux capteurs, et donc présentent un fort potentiel pour le criblage moléculaire. Dans ce chapitre, après avoir défini notre champ d'étude, nous effectuerons une revue bibliographique des différentes techniques de biodétection optique, afin de dégager les avantages et les inconvénients de chaque approche, et ainsi évaluer leur intérêt dans le contexte du POC. Enfin nous présenterons l'approche que nous avons choisie pour réaliser notre plateforme de détection.

### 1.2 La biodétection *Point-Of-Care* : éléments de définition

### 1.2.1 Principe de fonctionnement des capteurs d'affinité

De nombreuses techniques de détection reposent sur la fonctionnalisation de la surface d'un substrat, par greffage de molécules « sondes ». Les sondes ont une affinité chimique sélective avec les biomolécules à détecter, appelées « cibles ». Ces biocapteurs sont donc dits « d'affinité ». Si le substrat est mis en contact avec un analyte contenant des cibles, celles-ci sont capturées par les sondes et immobilisées sélectivement à la surface du substrat, tandis que les autres molécules éventuellement présentes dans l'analyte ne sont pas capturées. Ainsi, en mesurant la densité de molécules capturées sur la surface, on peut en déduire la concentration de l'analyte en biomolécules cibles.

Il existe aujourd'hui dans le commerce plusieurs types de capteurs d'affinité compatibles avec le POC : un premier exemple est celui des tests de grossesse, dont le but est de détecter l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) dans l'urine. Son principe de fonctionnement est illustré sur la figure 1.1a. Il s'agit d'un test immunochromatographique : l'urine contenant l'hormone cible est déposée sur un substrat absorbant (1), et migre vers une région contenant des anticorps conjugués mobiles, liés à des marqueurs colorés (2). La hCG se lie aux anticorps, et ce complexe migre vers une bande de test, où il est capturé par des anticorps immobiles, ce qui a pour effet de changer la couleur de la bande (3). Des anticorps mobiles migrent également vers une bande témoin, indiquant que le test a bien fonctionné (4). Le résultat du test est alors facilement lisible à l'œil nu [10].

Les capteurs de glucose sont un autre exemple très répandu de capteurs POC. La majorité des capteurs de glucose actuels se basent sur une détection électrochimique de type ampérométrique, et présentent une très bonne sensibilité et une bonne sélectivité, ainsi qu'un faible coût de production. Le principe général de la détection de glucose par ampérométrie est présenté sur la figure 1.1b : une électrode est recouverte d'une enzyme, la glucose oxydase (GOx), qui transforme le glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène. Celui-ci s'oxyde ensuite et libère deux électrons qui vont circuler à travers l'électrode. La mesure de ce courant permet alors de déterminer la concentration de glucose dans l'échantillon [11–13].



FIG. 1.1 : Principes de fonctionnement de deux exemples de capteurs POC grand public : (a) test immuno-chromatographique de grossesse et (b) capteur électrochimique enzymatique de glucose.

On peut également citer d'autres techniques de transduction, comme les transistors à effet de champ sensibles aux ions (ISFET, *Ion-Sensitive Field Effect Transistor*), qui convertissent les propriétés électriques d'une couche de biomolécules capturées en un signal électrique mesurable : la présence des biomolécules chargées électriquement modifie le potentiel électrique de la grille du transistor, qui à son tour influence le courant le traversant [14, 15]. Un autre principe de transduction consiste à détecter le surplus de masse apporté par les biomolécules capturées sur la surface d'un micro-levier en mesurant sa fréquence de résonance mécanique [16].

Les deux exemples illustrés ci-dessus sont déjà commercialisés du fait de leur simplicité de mise en œuvre et leur faible coût de production. Ils sont dédiés à la détection d'une biomolécule particulière, et peuvent être utilisés par le grand public grâce à leur facilité d'utilisation. Cependant ces techniques ne sont pas adaptées au développement de plateformes de biodétection POC plus génériques, pouvant détecter une large variété d'espèces biochimiques. En effet ces plateformes doivent être multiplexées, c'est-à-dire être capables d'effectuer un criblage moléculaire pour répondre aux besoins de diagnostic de maladies chez le patient, ou de contrôle sanitaire des denrées alimentaires [17].

### 1.2.2 L'approche optique

La transduction par voie optique est une alternative possible vers les plateformes de biodétection POC. Elle est compatible avec les fluides physiologiques, est insensible

# 1.2. LA BIODÉTECTION *POINT-OF-CARE* : ÉLÉMENTS DE DÉFINITION

à la force ionique de l'analyte, et permet de réaliser de nombreux tests en parallèle pour faire du criblage moléculaire. De plus les biocapteurs optiques présentent de hautes performances en matière de sensibilité et permettent une mesure rapide en temps réel [18].

Au sein des capteurs optiques d'affinité qui nous intéressent dans ce manuscrit, il existe deux méthodes principales pour détecter une couche de biomolécules. La première méthode est la détection par fluorescence, qui consiste à marquer les cibles avec des fluorophores. On mesure ensuite l'intensité de la fluorescence par imagerie, qui traduit la présence des cibles sur la surface fonctionnalisée. Cette technique est très sensible, et peut aller jusqu'à la détection d'une molécule unique [19]. Il est également possible d'effectuer de nombreuses mesures en parallèle. Cependant l'analyse par fluorescence ne permet qu'une mesure semi-quantitative, car le nombre de fluorophores attachés aux molécules cibles ne peut pas être contrôlé avec précision [18]. De plus, la présence des fluorophores peut perturber l'activité biochimique de la molécule et peut interférer dans la bioreconnaissance. D'autre part, l'analyse par fluorescence requiert une étape de préparation longue et rigoureuse de l'échantillon. Ces différentes raisons font que la fluorescence est peu adaptée à la biodétection POC.

La seconde méthode est la détection sans marquage, dont le principe général est schématisé sur la figure 1.2. Un dispositif de détection sans marquage est composé d'une surface fonctionnalisée mise en contact avec l'analyte, d'un transducteur et d'un détecteur qui délivre un signal de sortie à l'utilisateur. Au cours du processus de capture des cibles, on fait interagir un signal lumineux avec la couche de surface, ce qui modifie certaines propriétés de la lumière. Le plus souvent on souhaite mesurer la variation d'indice de réfraction induite par la capture des biomolécules au voisinage de la surface, soit par interférométrie, soit par le suivi du décalage spectral d'une résonance optique, qui constituent deux exemples de mécanismes de transduction. Un détecteur (spectral ou en intensité) permet alors de mesurer le signal lumineux après interaction avec l'analyte et fournir le signal de sortie.

La détection sans marquage présente l'avantage de ne pas nécessiter de préparation d'échantillon, et de préserver les fonctions biologiques des molécules cibles. Elle permet également une mesure quantitative en temps réel de la densité de cibles capturées. Elle est donc pertinente pour une application dans la détection POC. Il existe



FIG. 1.2 : Schéma de principe d'un biocapteur optique d'affinité.

d'autres techniques optiques, comme la mesure de la signature spectrale moléculaire [20], mais nous nous restreindrons dans cette thèse aux techniques de mesure de l'indice de réfraction, qui seront détaillées dans la partie suivante.

### 1.3 Revue bibliographique : la biodétection optique vers le *Point-of-Care*

### 1.3.1 La voie métallique : dispositifs à résonance plasmonique

### Résonance plasmonique de surface (SPR)

L'approche la plus répandue dans les capteurs optiques commerciaux exploite la résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance*, SPR). Plusieurs fabricants proposent des systèmes de détection basés sur la SPR, comme Biacore ou Corning. Il s'agit de capteurs de haute performance dédiés principalement aux laboratoires, permettant d'analyser de grandes quantités d'échantillons avec un haut rendement.

Au sein des capteurs SPR, la transduction est opérée par des plasmons de surface, qui sont les *quanta* d'une onde de densité électronique à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction de signes opposés, comme entre un métal (le plus souvent de



FIG. 1.3 : Principe de fonctionnement d'un dispositif de détection exploitant la résonance de plasmons propagatifs.

l'or) et un diélectrique. L'intensité de cette onde plasmonique décroit exponentiellement dans les deux milieux, c'est pourquoi elle est qualifiée d'« onde de surface ». Elle peut être excitée par une onde électromagnétique sous certaines conditions de polarisation, de vecteur d'onde et de fréquence. Ainsi le couplage entre l'onde électromagnétique incidente et l'onde plasmonique n'a lieu qu'à une longueur d'onde particulière pour un angle d'incidence donné. Il résulte de ce couplage une résonance plasmonique, qui induit une forte concentration du champ électrique au voisinage de la surface (typiquement quelques centaines de nanomètres), sous la forme d'une onde propagative dont la longueur d'onde est extrêmement sensible à l'indice de réfraction local [21].

On peut exploiter la SPR pour mesurer directement la présence d'une couche mince à la surface du capteur, en tirant parti de la grande sensibilité de la résonance plasmonique. Le principe général des capteurs à SPR est schématisé sur la figure 1.3 : quand la surface du diélectrique est fonctionnalisée avec les molécules sondes (1), la résonance plasmonique se manifeste par un pic d'intensité dans le spectre de réflexion. Après capture des molécules cibles (2), l'indice de réfraction au voisinage de la surface varie, et par conséquent la longueur d'onde de résonance se décale spectralement.

La sensibilité des dispositifs à SPR est très élevée, de l'ordre de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers de nanomètres par unité d'indice de réfraction  $(nm \cdot RIU^{-1})$  [22]. Un autre paramètre à prendre en compte est la largeur de la résonance, quantifiée par le facteur de qualité Q, qui intervient dans les performances de détection. Plus ce facteur est élevé, plus les résonances sont fines spectralement, et donc plus petit sera le décalage spectral minimum mesurable. Pour la SPR, le facteur de qualité est faible, typiquement de quelques dizaines.

La technique la plus classique de couplage de la lumière avec l'onde plasmonique utilise un prisme. Deux méthodes d'interrogation sont possibles : soit en mesurant le spectre de réflexion à un angle fixé, soit en mesurant l'intensité de la réflexion selon l'angle d'incidence sous excitation monochromatique. Ces deux méthodes permettent de mesurer en temps réel le décalage spectral de la résonance. Le couplage par prisme est largement utilisé dans des appareils de laboratoire du fait de sa simplicité de mise en œuvre et sa robustesse. Il est plus orienté vers des hauts rendements (en nombre de tests par jour) plutôt que vers la réduction des coûts, la miniaturisation et le multiplexage.

L'intégration de puces SPR dans des dispositifs portables est donc un point d'amélioration vers le développement de la plasmonique POC [23]. Le dispositif de Tokel *et al.*, illustré sur la figure 1.4, est un exemple d'intégration d'une puce SPR dans un boitier compact de 13.5 cm × 10 cm × 5.2 cm. Dans ce dispositif, une source LED émet un faisceau collimaté par une lentille sur la surface d'une puce fonctionnalisée. Le faisceau est ensuite réfléchi vers une caméra CMOS qui mesure l'intensité de la lumière en fonction de l'angle d'incidence. Ce système est compact et portatif, et a démontré la détection de bactéries. Cependant il nécessite un liquide d'adaptation d'indice entre la puce et le prisme, ce qui demande une manipulation lors de l'installation de la puce. L'installation de telles puces jetables reste en effet un obstacle à l'utilisation par le grand public de ce type de capteur. En outre, ce système ne permet pas le multiplexage car il ne peut opérer qu'une seule mesure par puce.

La SPR classique est peu adaptée à la détection POC du fait de son faible potentiel de miniaturisation et de multiplexage. Une des voies possibles pour contourner ces limitations consiste à imager une matrice de capteurs indépendants à la surface de la puce à l'aide d'une caméra : ce principe s'appelle la SPR par imagerie (SPRi) [25]. Au lieu de mesurer une variation d'angle ou de longueur d'onde, on mesure l'intensité de la lumière réfléchie ou transmise par la puce plasmonique illuminée par une source de fine largeur spectrale. Cette intensité varie en effet avec la variation d'indice de réfraction. La SPRi offre intrinsèquement une plus faible résolution que les dispositifs

### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉ-TECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*



FIG. 1.4 : Exemple de dispositif de détection SPR intégré dans un boitier compact de Tokel et al. : (a) et (b) plateforme de détection, (c) vue schématique de la plateforme de détection plasmonique [24].

à SPR classiques [26], mais son potentiel pour le multiplexage en fait une approche très prometteuse pour la détection POC. Nous verrons plus loin quelques exemples de dispositifs exploitant la SPRi.

#### Résonance de plasmons de surface localisés (LSPR)

Les efforts de recherche en plasmonique POC se tournent également vers les nanoparticules plasmoniques, plus faciles à exciter. Dans les nanoparticules, les plasmons ne peuvent pas se propager car les dimensions sont inférieures à la longueur d'onde de résonance. Les plasmons sont donc confinés dans les particules, comme illustré sur la figure 1.5 : on parle alors de résonance de plasmons de surface localisés (*Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR). L'utilisation de ces nanoparticules est rendue possible par l'amélioration des techniques de nano-fabrication, car la taille des particules est critique [27]. Le champ y est concentré plus près de la surface des particules par rapport à la SPR classique, la LSPR est donc moins sensible aux interactions avec le volume : la sensibilité descend à quelques centaines de nm · RIU<sup>-1</sup>. Cependant elle est plus sensible à la présence de molécules très proches de la surface, c'est-à-dire à quelques dizaines de nanomètres), ce qui est un avantage pour la détection de biomolécules. Les facteurs de qualité en LSPR sont également de l'ordre de la dizaine [22].



FIG. 1.5 : Principe de la résonance de plasmons de surface localisés (LSPR).

Le principe général de la LSPR appliqué au POC consiste à mesurer l'extinction avec un spectromètre (en utilisant une source large bande type LED) ou en intensité (avec une source monochromatique). Des méthodes alternatives par microscopie en champ sombre et par prisme permettent détecter une molécule unique, mais ne sont pas compatibles avec l'intégration POC [26, 28]. Haes et al. ont développé le premier dispositif exploitant la LSPR sur substrat vers l'utilisation en POC [29]. Dans ce dispositif, illustré sur la figure 1.6, une source blanche illumine le substrat sur lequel se trouvent les nanoparticules d'argent, et le signal transmis est collecté et analysé par un spectromètre CCD. Les nanoparticules sont fabriquées sur le substrat par dépôt à travers un masque constitué de billes de polystyrène, qui forment une couche compacte selon un réseau hexagonal. Ces particules sont ensuite fonctionnalisées pour détecter un anticorps, l'ADDL, impliqué dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Ce dispositif montre une sensibilité d'environ  $200 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$ , et a permis de détecter avec succès ces anticorps chez des patients. Par la suite, Endo et al. ont démontré la détection de multiples protéines sur une même puce grâce aux mesures spectrales successives sur 300 points fonctionnalisés individuellement, chacun ayant une surface élémentaire de 4 mm<sup>2</sup> [30]. Ces deux exemples tirent parti de l'auto-assemblage d'un réseau 2D de particules pour fabriquer les nanoparticules, mais cette technique limite les dimensions et le rapport d'aspect des particules, qui conditionnent la sensibilité de la LSPR [31].

Pour aller plus loin, on peut utiliser la lithographie électronique, qui permet une plus grande maitrise des dimensions des particules (notamment de leur rapport d'aspect)

### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉ-TECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*



FIG. 1.6 : Exemple de dispositif de détection de Haes et al. utilisant la LSPR sur des nanoparticules d'argent sur substrat [29].

et donc une augmentation de la sensibilité de la LSPR. Cette technique est exploitée pour fabriquer des structures en croix dans le dispositif de Rodríguez-Fortuño *et al* [27], pour atteindre une sensibilité volumique d'environ  $650 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ . Des puces basées sur la LSPR ont ensuite été utilisées pour détecter des biomarqueurs de cancer [32,33]. Cependant l'excitation et l'analyse de la lumière restent toujours une limitation de ce type de structures, qui requièrent généralement l'utilisation d'un objectif de microscope et d'un spectromètre, ce qui limite le potentiel de miniaturisation. Là encore, l'utilisation d'une caméra comme détecteur permet de multiplexer les puces à LSPR [34], ou l'imagerie cellulaire [35].

#### Transmission optique extraordinaire (EOT)

Une autre stratégie de multiplexage consiste à imager les puces plasmoniques en transmission, en exploitant la transmission optique extraordinaire (*Extraordinary Optical Transmission*, EOT). Ce phénomène se manifeste par une très forte intensité de transmission à travers un réseau de trous sub-longueur d'onde dans une couche métallique, lorsqu'il est illuminé à sa longueur d'onde de résonance [36]. Ainsi, Cetin *et al.* proposent le système miniaturisé illustré sur la figure 1.7, composé d'une puce supportant un réseau de nanostructures, illuminé en incidence normale par une source LED, et analysé en transmission par une caméra [37]. Chaque élément du réseau constitue

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉTECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*



FIG. 1.7 : Dispositif d'imagerie sans lentille par l'exploitation de la transmission optique extraordinaire (EOT) proposé par Cetin et al. : (a) photographie du dispositif de détection, (b) vue schématique, (c) image MEB (microscopie électronique à balayage) de la puce plasmonique et (d) simulation FDTD de l'intensité du champ au voisinage des trous [37].

un capteur individuel de  $100 \,\mu\text{m} \times 100 \,\mu\text{m}$ , qui donne lieu à une tache lumineuse sur la caméra, dont l'intensité dépend de sa longueur d'onde de résonance. Les performances optiques de ces capteurs sont élevées, avec une haute sensibilité de  $621 \,\text{nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ , et un facteur de qualité de 17.

Du fait de l'absence de lentilles afin de réduire les contraintes d'alignement, les capteurs diffractent la lumière, et donc les taches lumineuses recouvrent les taches voisines, formant ainsi des figures d'interférences. Un algorithme de reconstitution d'images est alors utilisé pour retrouver l'intensité transmise par chaque capteur individuel. Dans ce dispositif, le couplage en incidence normale autorise ainsi un fort multiplexage. Ce système de mesure a ensuite été amélioré par l'utilisation de deux sources [38]. Des systèmes similaires ont permis de détecter des bactéries [39] et des antigènes [40]. Les efforts de recherche tentent également d'exploiter des technologies existantes : en particulier des smartphones, notamment pour leur puissance de calcul, et comme éléments optiques (caméra, éclairage par flash), tout en limitant le coût et l'encombrement des dispositifs [41]. D'autres technologies peuvent être associées à un smartphone, comme les disques Blu-ray, dont les sillons jouent le rôle de réseau de diffraction et assurent le couplage de la lumière [42].

L'approche plasmonique est déjà commercialisée pour des capteurs à haut rendement, grâce à sa simplicité de fabrication et d'utilisation. Cependant l'usage de la SPR propagative est peu adapté aux applications POC, notamment à cause de son faible potentiel de miniaturisation et de multiplexage. Les recherches vers la plasmonique POC évoluent donc vers des dispositifs compacts visant à utiliser des composants « sur l'étagère » et des technologies pré-existantes (smartphones, Blu-ray), ce qui permet de réduire les coûts.

Du côté des éléments sensibles, les nanoparticules et nanostructures plasmoniques offrent la possibilité d'une miniaturisation grâce à l'amélioration des techniques de fabrication de ces dernières années. Elles permettent un couplage de la lumière plus facile, ce qui permet de les utiliser dans des boitiers compacts. Cependant leurs performances optiques restent encore un domaine d'amélioration. En effet, la reproductibilité des propriétés optiques est fortement dépendante des dimensions des structures, qu'il est difficile de contrôler précisément à l'échelle de la puce [43, 44]. De plus, les structures plasmoniques présentent généralement des résonances larges, avec des facteurs de qualité de l'ordre de la dizaine (ce qui correspond à une largeur spectrale de plusieurs dizaines de nanomètres), or la finesse de la résonance joue un rôle clé dans la détermination de la limite de détection des capteurs.

### **1.3.2** La voie diélectrique : dispositifs photoniques

À la différence des dispositifs plasmoniques, les biocapteurs photoniques peuvent offrir une très faible largeur de résonance, tout en présentant une bonne sensibilité. Ces très bonnes propriétés optiques font des structures photoniques une autre voie prometteuse pour la détection POC. Leur principe de fonctionnement général est illustré sur



FIG. 1.8 : Principe de fonctionnement standard des biocapteurs diélectriques.

la figure 1.8 : le champ électromagnétique est confiné dans un matériau diélectrique, comme un guide d'onde ou une structure résonante. La partie évanescente du champ interagit avec l'environnement à la surface du diélectrique, et est donc sensible à l'indice de réfraction au voisinage de la surface. Plusieurs techniques permettent ensuite d'exploiter cette interaction, elles seront abordées dans la suite de cette section.

#### Interférométrie

Une première technique consiste à quantifier la variation d'indice de réfraction en mesurant le décalage de phase entre les deux bras d'un interféromètre, l'un étant une référence et l'autre étant sensible à son environnement. L'interférométrie n'est pas à proprement parler une technique de mesure basée sur une résonance optique, mais mesure plutôt un décalage de phase sur un long chemin optique. Elle permet d'atteindre parmi les plus faibles limites de détection grâce à sa grande sensibilité [45–47]. Les capteurs interférométriques sont capables de détecter de manière sélective des virus [48] et des molécules de micro-ARN, avec une sensibilité de  $461.6 \pi \cdot \text{RIU}^{-1}$  [49]. Le multiplexage de ces capteurs est possible en fabriquant plusieurs détecteurs en parallèle, à l'exemple du dispositif de Liu *et al.*, schématisé sur la figure 1.9 [50]. Ces interféromètres font 1 µm de large pour une longueur développée totale de 7 cm.



FIG. 1.9 : Exemple de capteur interférométrique multiplexé de Liu et al [50].

Un inconvénient intrinsèque des capteurs interférométriques est qu'ils fournissent un signal ambigu (sens de variation de l'indice de réfraction impossible à déterminer), et peu sensible aux alentours des extrema de leur fonction de transmission (courbe sinusoïdale). Cela limite en général leur gamme dynamique à une variation de phase de  $\pi$ , c'est-à-dire entre deux extrema de la fonction de transmission. On peut cependant s'affranchir de ces limitations en variant de longueur d'onde d'excitation, mais cette approche complexifie l'intégration d'un système pour une application POC [51]. Une autre alternative est d'utiliser un interféromètre multimode utilisant trois mesures d'intensité dans trois sorties déphasées de 120° les unes par rapport aux autres [52]. Cette technique a été mise en œuvre expérimentalement pour mesurer des variations d'indice de réfraction entre des solutions de NaCl [53]. Cependant elle requiert un plus grand nombre de détecteurs et augmente encore les dimensions des structures, ce qui limite encore plus le potentiel de miniaturisation des dispositifs interférométriques.

#### Structures diélectriques résonantes

Les interféromètres ont besoin d'un long chemin optique pour obtenir une grande sensibilité, ce qui les rend difficile à miniaturiser. Par conséquent, pour améliorer for-



FIG. 1.10 : Exemples de structures résonantes : (a) anneau résonant [54], (b) disque résonant [59] et (c) cavité à cristal photonique [60].

tement l'interaction avec l'analyte, on a recours à des structures résonantes, telles que les anneaux [54–57] et disques résonants [58, 59], ou encore les cavités à cristaux photoniques [60–62]. La figure 1.10 représente un exemple de chacune de ces structures. Comme dans le cas des résonances plasmoniques, ces structures possèdent une longueur d'onde de résonance qui varie avec l'indice de réfraction ambiant. Par ailleurs elles peuvent fournir des résonances extrêmement fines, avec des facteurs de qualité de plusieurs milliers [47]. À titre d'exemple, on peut citer les anneaux résonnants de Janz *et al.* qui présentent une sensibilité de 110 nm  $\cdot$  RIU<sup>-1</sup> avec un facteur de qualité d'environ 30 000 [63]. D'autre part, les structures résonantes ont généralement de faibles dimensions qui les rendent compatibles avec le POC [64]. Ces avantages les placent ainsi parmi les principaux concurrents des capteurs SPR.

Le principe des anneaux résonants est d'exciter un mode de galerie dans l'anneau par le biais d'un guide d'onde, comme illustré sur la figure 1.10a. Le couplage avec le guide d'onde n'a lieu que si la longueur de l'anneau est un multiple de la longueur d'onde de la lumière. Il apparait donc des résonances à intervalles réguliers dans le spectre de transmission du guide d'onde. Les guides d'onde sont généralement excités par un faisceau focalisé sur un réseau de diffraction, qui assure le couplage entre l'extérieur et le plan de la puce, comme l'illustre la figure 1.11 [56, 57].

### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉ-TECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*



FIG. 1.11 : Principe du couplage de la lumière entre l'extérieur et le plan d'une puce de détection, à l'aide de réseaux de diffraction (illustration issue de [63]).

L'utilisation des réseaux de diffraction permet donc de relaxer les contraintes d'alignement, et d'exciter simultanément plusieurs structures. Ils ont été utilisés pour adresser 128 capteurs en parallèle sur la même puce dans le dispositif de Janz *et al.* [63], représenté sur la figure 1.12. Cependant ces réseaux de diffraction, ainsi que les guides d'onde associés, complexifient l'organisation de la puce et augmentent fortement sa taille : les anneaux résonants occupent une zone d'environ  $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  sur une puce de  $25 \text{ mm}^2$ , soit seulement 16 %.

Une autre famille de résonateurs est celle des cristaux photoniques (CPs), et notamment les CPs à deux dimensions tels que celui présenté sur la figure 1.10c [65]. Ils sont généralement constitués d'un réseau périodique de trous dans une couche mince de diélectrique de haut indice de réfraction. Les CPs possèdent plusieurs propriétés intéressantes de contrôle de la lumière : d'une part, l'arrangement périodique de l'indice de réfraction donne naissance à des bandes interdites de propagation de la lumière selon certaines directions et à certaines longueurs d'onde, similairement aux bandes interdites électroniques dans les semiconducteurs. Il est également possible de ralentir la lumière, et donc la concentrer « temporellement » dans la structure [66, 67]. D'autre part, la lumière est confinée dans le plan de la couche par réflexion totale interne et ne peut pas se propager dans la troisième dimension. Enfin, l'introduction de défauts dans le réseau périodique (par exemple en supprimant un trou ou en changeant son diamètre) permet de confiner fortement la lumière localement [60, 68].

### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉTECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*



FIG. 1.12 : Puce de détection de Janz et al., constituée de 128 capteurs à anneaux résonants adressés individuellement par des guides d'onde excités à l'aide d'un réseau de diffraction [63].

Un des premiers capteurs à CP a été développé par Lee *et al* [69]. Celui-ci, représenté sur la figure 1.13, est basé sur un CP constitué d'un réseau hexagonal de trous cylindriques (l'image du CP est donnée sur la figure 1.10c). Un trou de diamètre réduit au centre de la structure forme un défaut ponctuel qui concentre la lumière. Excité à l'aide d'un laser accordable et analysé avec un détecteur infrarouge, ce CP a pu démontrer la capture et la détection de streptavidine à l'état sec. Par la suite, d'autres groupes ont développé des capteurs à cavités à CPs en milieu liquide, propices à l'analyse d'échantillons biologiques, avec une sensibilité de  $103 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$  [70] puis de 74 nm  $\cdot \text{RIU}^{-1}$  [71].

Pour améliorer la sensibilité des capteurs, on peut tenter d'augmenter le volume d'interaction de la lumière avec l'analyte. Pour cela on peut utiliser des guides d'onde à fente, qui permettent de confiner la lumière dans la région de bas indice, c'est-à-dire dans le milieu environnant [72]. En combinaison avec un cristal photonique, on obtient un confinement spatial de la lumière grâce à la fente, et un confinement temporel grâce à l'effet de ralentissement de la lumière du CP [73–75]. La figure 1.14a représente l'exemple



FIG. 1.13 : Principe du biocapteur à cavité à cristal photonique de Lee et al. (adapté de [69]).



FIG. 1.14 : Exemples de structures résonantes dans lesquelles la lumière est fortement concentrée à au voisinage du diélectrique : (a) cristal photonique à fente de Scullion et al. [76] et (b) anneau résonant à cristal photonique de Lo et al [79].

du capteur de Scullion *et al.* [76], qui est un CP à fente d'environ  $100 \,\mu\text{m}^2$  présentant une très grande sensibilité de  $500 \,\text{nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$  avec un grand facteur de qualité de 3000, ce qui offre de très bonnes performances en détection.

Par la suite, toujours dans le but d'améliorer le volume d'interaction lumière-matière, Flueckiger *et al.* [77] puis Lo *et al.* [78] ont réuni les concepts d'anneaux résonants et de cristaux photoniques pour fabriquer des structures hybrides, dont un exemple est donné sur la figure 1.14b. Ces structures exploitent les propriétés des CPs pour contrôler la répartition de la lumière dans l'anneau résonant, afin d'augmenter le volume d'interaction avec la solution pour obtenir une meilleure sensibilité. Lo *et al.* ont ainsi obtenu une sensibilité de 248 nm · RIU<sup>-1</sup> ainsi qu'un grand facteur de qualité de 1200, avec des anneaux de 14 µm de diamètre. D'autre part, pour améliorer leur capacité de multiplexage, les structures résonantes peuvent être utilisées en série, avec des longueurs d'onde de résonance différentes, que ce soit avec des anneaux résonants [80] ou des CPs [81]. Cette technique ne réduit pas ou très peu l'encombrement des structures, mais permet de mettre en commun les sources et les détecteurs de lumière.

Les résonateurs à anneaux résonants ou à CPs présentent de très bonnes performances optiques, mais ils sont souvent utilisés dans le moyen infrarouge, dans la gamme de transparence du silicium, et donc requièrent des détecteurs onéreux pour les analyser. Une alternative est de travailler dans la gamme visible via l'utilisation d'autres matériaux, mais qui présentent l'inconvénient d'un contraste d'indice de réfraction avec la silice plus faible, ce qui limite leurs propriétés optiques. Un premier exemple est le dioxyde de titane [82], notamment utilisé pour fabriquer des capteurs à CPs par Jahns *et al.*, avec faible facteur de qualité de l'ordre de la centaine [83]. Un autre matériau possible est le nitrure de silicium, exploité par exemple par Calvo *et al.* pour la réalisation d'anneaux résonants [84]; nous détaillerons également plus loin un autre exemple de dispositif utilisant ce matériau dans des structures supportant des résonances de modes guidés.

### Résonance de mode guidé (GMR)

Pour faciliter le couplage de la lumière dans les structures, on peut utiliser une autre classe de cristaux photoniques, qui supportent des résonances de modes guidés (*Guided Mode Resonance*, GMR). Il s'agit de modes à pertes qui ont la propriété de se coupler avec une onde incidente dans la troisième dimension, similairement à un réseau de diffraction. Ces structures combinent donc l'excitation en incidence oblique et la fonction de transduction, au prix d'un facteur de qualité plus faible.

On peut trouver plusieurs exemples de capteurs à GMR dans la littérature [83, 85, 86]. Un des dispositifs les plus aboutis est celui de Triggs *et al.* [87, 88], représenté sur la figure 1.15. Pour mesurer un décalage spectral, ce dispositif utilise une matrice de motifs élémentaires résonants, dont la longueur d'onde de résonance est variée continument en modifiant le facteur de remplissage (*Filling Factor*, FF). La

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés


FIG. 1.15 : Dispositif de biodétection de Triggs et al. basé sur la résonance de mode guidé : (a) motif résonant élémentaire, (b) matrice de motifs avec un gradient du facteur de remplissage (FF), (c) résonances dans l'eau, (d) imagerie de la puce et (e) profil d'intensité de l'imagerie [88].

matrice de motifs est imagée par une caméra CMOS. Un laser de large bande spectrale associé à un monochromateur illumine la structure en incidence normale, il n'y a donc pas d'étape d'alignement précis. Ainsi il n'y a qu'une bande de motifs excitée à la résonance, ce qui se traduit par une bande lumineuse sur la caméra. Puis lorsque les motifs subissent un décalage spectral causé par la capture de biomolécules, la bande lumineuse sur la caméra se décale spatialement, ce qui est facilement mesurable. La sensibilité de ce capteur est de 137 nm  $\cdot$  RIU<sup>-1</sup> et son facteur de qualité est de 420, avec des dimensions de 500 µm × 620 µm. Ces valeurs optiques relativement faibles s'expliquent par l'utilisation du nitrure de silicium pour sa transparence dans la gamme du visible, comme nous l'avons vu plus haut. Cette gamme de longueur d'onde est nécessaire pour utiliser une caméra CMOS, mais limite les performances optiques du fait du plus faible contraste d'indice de réfraction des matériaux utilisés.

Enfin, on peut citer d'autres techniques de détection qui ne sont pas détaillées dans cette thèse, et qui pourraient constituer des voies d'amélioration de la détection dans les dispositifs diélectriques. Un premier exemple est la détection de la phase par spectroscopie à interférence réflectométrique [89], ou par l'excitation de structures multicouches [90]. Un autre exemple est la combinaison d'anneaux résonants avec la plasmonique [91], qui combine les avantages des deux méthodes pour améliorer la sensibilité, et également permettre une fonctionnalisation sélective facilitée par le contraste chimique entre le métal et le diélectrique.

#### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉTECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*

Dans cette partie, nous avons vu que les structures diélectriques permettent d'obtenir des résonances très fines avec de bonnes sensibilités. De plus, elles sont en général facilement miniaturisables du fait de leurs faibles dimensions, et offrent la possibilité de multiplexage. Ces avantages leur permettent d'entrer en compétition avec la plasmonique pour le développement de biocapteurs intégrés. Cependant les critères du POC imposent de fortes contraintes technologiques : l'utilisation de lasers accordables et de spectromètres est difficile à cause de leur coût et leur encombrement. On doit donc avoir recours à des techniques alternatives pour mesurer le décalage spectral de la résonance des structures, en préférant les détecteurs en intensité. D'autre part, la plupart des capteurs de la littérature fonctionnent dans l'infrarouge, afin d'exploiter les bonnes propriétés optiques des structures à base de silicium. Le revers de la médaille est que cela empêche l'utilisation de détecteurs en silicium bas-coût tels que les caméras CMOS. Nous avons vu également que le couplage de la lumière est un enjeu majeur : pour faciliter l'utilisation d'un dispositif POC, l'excitation des structures doit nécessiter le moins de contraintes d'alignement optique possible. De nombreux groupes utilisent des réseaux de diffraction pour coupler la lumière, mais ceux-ci sont sensibles à l'alignement du faisceau incident et à la longueur d'onde, ce qui complexifie leur intégration dans un dispositif POC. Enfin, la compatibilité de la fabrication des dispositifs avec l'industrie du silicium est un enjeu majeur, car elle permet de réduire fortement les coûts des puces.

Celles-ci doivent donc être fabriquées de préférence par photolithographie, ce qui a des conséquences sur les dimensions critiques des structures, et donc leurs performances optiques.

#### 1.3.3 Tableau récapitulatif

Le tableau 1.1 récapitule les caractéristiques des différentes technologies que nous avons décrites dans les sections précédentes.

#### 1.3. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LA BIODÉ-TECTION OPTIQUE VERS LE *POINT-OF-CARE*

Technologie (références)	Avantages	Inconvénients
Résonance plasmonique de surface (SPR) [24]	$S \sim 10^4 - 10^5 \mathrm{nm}\cdot\mathrm{RIU^{-1}}$ Maturité technologique Résonances dans le visible	$\begin{array}{c} \text{Multiplexage} \\ \text{Miniaturisation} \\ Q \sim 10 \end{array}$
Résonance de plasmons de surface localisés (LSPR) [27, 32, 33]	Densité d'intégration Résonances dans le visible $S \sim 10^2 - 10^3 \mathrm{nm}\cdot\mathrm{RIU}^{-1}$	$Q \sim 10$
Transmission optique extraordinaire (EOT) [37,38]	$S \sim 10^2 - 10^3 \mathrm{nm}\cdot\mathrm{RIU^{-1}}$ Couplage de la lumière Résonances dans le visible	$Q \sim 10$
Interférométrie [49, 50, 53]	$S \sim 500  \pi \cdot \mathrm{RIU^{-1}}$	Lecture du signal ambigu Couplage de la lumière Densité d'intégration $(D \sim 1 \mathrm{cm})$
Anneaux et disques résonants [56, 59, 63]	$Q \sim 10^5$ Densité d'intégration $(D \sim 100 \mu\text{m})$	Couplage de la lumière Résonances dans l'infrarouge
Cavité à cristal photonique (CP) [60,67]	Multiplexage Densité d'intégration $(D \sim 10 \mu\text{m})$ $Q \sim 10^3 - 10^4$ Robustesse de fabrication	Couplage de la lumière $S \sim 100  \mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$ Résonances généralement dans l'infrarouge
Cristal photonique à fentes/anneaux résonants à CP [76–78]	$S \sim 500 \mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU^{-1}}$ $Q \sim 10^3$ Densité d'intégration $(D \sim 10 \mathrm{\mu m})$	Couplage de la lumière Robustesse de fabrication en photolithographie
Résonance de mode guidé (GMR) [86,88]	Couplage de la lumière	Sensibilité moyenne $(S \sim 100 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1})$ Q = 100 Densité d'intégration $(D \sim 100 - 1000 \text{ µm})$

TAB. 1.1 : Comparatif des caractéristiques de différentes technologies de biodétection (S : sensibilité; Q : facteur de qualité, D : dimension caractéristique).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

# 1.4 Approche de la thèse : dispositif de biodétection portatif à cristaux photoniques

Nous voyons dans le tableau 1.1 qu'aucune structure ne présente simultanément une bonne sensibilité et un haut facteur de qualité, nécessaires à de bonnes performances de détection, en plus d'être excitable en incidence normale. L'approche de cette thèse va tenter de réunir ces trois avantages. Le dispositif de détection que nous proposons est schématisé sur la figure 1.16 : il s'agit d'un dispositif d'imagerie sans lentille, composé d'une source de lumière monochromatique qui excite une puce photonique, placée devant une caméra CMOS. Cette puce supporte une matrice de cristaux photoniques fonctionnalisés. On voit sur ce schéma que lorsque des biomolécules sont capturées à la surface des CPs, la lumière est transmise à travers la puce, tandis qu'aucune lumière n'est transmise si les biomolécules ne sont pas capturées.

En plus des bonnes performances optiques et de la facilité de couplage de la lumière sans étape d'alignement, cette approche permet d'effectuer de nombreuses analyses en parallèle, et donc assurer le multiplexage. D'autre part, la fabrication des capteurs est compatible avec les technologies de fabrication de la microélectronique. Ils sont fabriqués dans des plaques de silicium sur isolant (*Silicon On Insulator*, SOI), particulièrement adaptées aux structures photoniques car elles permettent de confiner la lumière dans la couche de silicium superficielle par réflexion totale.

Nous avons également vu que l'utilisation d'un laser accordable ou d'un spectromètre est à éviter dans un dispositif POC. Par conséquent, nous avons donc choisi d'utiliser un imageur CMOS pour son faible coût et sa capacité d'analyser tous les CPs en parallèle. Cela impose cependant des contraintes sur la longueur d'onde de travail, car il nous faut travailler dans la gamme de sensibilité de ces détecteurs, qui couvre le visible et proche infrarouge. Nous avons donc choisi une longueur d'onde de travail de 950 nm, qui est à la limite de la gamme d'absorption du silicium : ce choix permet à la fois de détecter le signal avec l'imageur, et de limiter l'absorption dans nos résonateurs pour conserver un haut facteur de qualité.

La conception de notre puce se base sur des concepts de l'équipe Nanophotonique du laboratoire, et exploite des modes de Bloch lents excités en incidence normale dans les CPs. Cette propriété peut être avantageusement utilisée pour concevoir notre dispositif, car elle offre la possibilité d'exciter les CPs depuis l'espace libre avec une diode électro-



FIG. 1.16 : Schéma du dispositif de biodétection : excitation en onde plane étendue d'une puce photonique supportant une matrice de cristaux photoniques, placée en dessus d'un imageur CMOS.

luminescente ou un laser. Elle permet également l'excitation en parallèle d'un grand nombre de capteurs indépendants sur la même puce, sans avoir besoin d'un réseau de guides d'ondes pour les exciter individuellement, comme c'est le cas dans le dispositif de Janz *et al* [63].

Pour aller plus loin vers l'application POC, nous proposons la réalisation d'un spectromètre intégré sur puce, toujours en utilisant l'imageur CMOS comme détecteur. Ce spectromètre intégré est constitué d'une série de CPs, dont chacun se comporte comme un élément sélectif en longueur d'onde. L'implémentation d'un spectromètre intégré présente deux avantages : d'une part elle augmente la gamme de détection, et d'autre part elle permet d'exploiter le signal de plusieurs CPs, ce qui facilite la détermination du décalage spectral et augmente la sensibilité du dispositif. Nous espérons ainsi parvenir à mesurer des variations d'indice de réfraction correspondant à la capture de différentes biomolécules cibles.

# 1.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté le principe des capteurs optiques d'affinité, visant la détection de biomolécules. En particulier, nous avons défini les critères technologiques pour une application *Point-Of-Care*, à savoir les bonnes performances optiques, la facilité d'utilisation et la compatibilité avec la production de masse. Une revue bibliographique a permis d'identifier les avantages et les inconvénients de différentes technologies, qui se divisent en deux approches principales : la résonance plasmonique à la surface de métaux, et la résonance photonique de structures diélectriques.

Nous avons vu que les enjeux majeurs des dispositifs POC concernent différents aspects : outre la sensibilité et la finesse des résonances, le couplage de la lumière hors du plan de la puce est primordial pour relaxer les contraintes d'alignement. Également, la longueur d'onde de travail détermine le type de détecteur à utiliser ; pour réduire les coûts il est pertinent de travailler dans la gamme de sensibilité des détecteurs en silicium tels que les caméras CMOS. Cette contrainte a des conséquences fortes sur les matériaux utilisés, les dimensions critiques des structures et donc leur compatibilité avec les technologies de fabrication bas-coût comme la photolithographie. Enfin le multiplexage est fortement souhaitable afin d'assurer la fonction de criblage moléculaire.

L'approche que nous proposons tente de répondre à ces défis d'intégration dans un dispositif POC. Nous avons choisi de développer une plateforme de détection sans marquage, basée sur un système d'imagerie sans lentille d'une puce photonique. Celle-ci supporte un réseau de cristaux photoniques en silicium, excitables en incidence normale par un faisceau étendu, et imagés par une caméra CMOS. Nous avons également choisi d'intégrer un système de spectrométrie sur puce, permettant d'augmenter la gamme de détection et la sensibilité du dispositif. Notre approche permet donc d'éliminer les contraintes d'alignement dans un système sans lentille, et d'analyser de nombreux capteurs indépendants en parallèle grâce à l'imagerie. Les choix des matériaux sont compatibles avec les technologies de fabrication et l'utilisation de détecteurs bas-coût. Dans la suite de ce manuscrit, après avoir présenté notre banc et nos méthodes de caractérisation optiques, nous étudierons les propriétés des CPs et leurs performances en biodétection, puis nous détaillerons ensuite leur implémentation au sein du spectromètre intégré.

# Chapitre 2

# Micro-réflectivité en milieu liquide : banc de mesure et méthodes expérimentales

## Sommaire

2.1	Intro	duction $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 39$
2.2	Banc	de micro-réflectivité 40
	2.2.1	Présentation générale du banc
	2.2.2	Caractéristiques du faisceau d'excitation
	2.2.3	Collecte du signal
2.3	Proce	édure expérimentale 49
	2.3.1	Préparation de surface
	2.3.2	Préparation de la cellule fluidique
	2.3.3	Mesure d'indice de réfraction
	2.3.4	Normalisation des spectres de micro-réflectivité
2.4	Stabi	lité et reproductibilité 55
	2.4.1	Stabilité de la résonance en milieu liquide
	2.4.2	Reproductibilité de la mesure de résonance
<b>2.5</b>	Conc	lusion

# 2.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous décrirons le banc optique, ainsi que les outils et procédures, développés dans le cadre de la thèse pour la caractérisation des capteurs à cristaux photoniques (CPs) en milieu liquide. L'objectif est de mesurer le spectre de microréflectivité de structures individuelles, afin d'étudier leurs propriétés de résonance et la sensibilité à l'indice de réfraction. Ces caractérisations spectrales permettront de valider les performances de chaque élément de notre matrice de capteurs en vue de l'application finale dans un dispositif de détection par caméra sans lentille.

Dans ce but, nous avons conçu un banc de micro-réflectivité dont le schéma de principe est présenté sur la figure 2.1. Un cristal photonique baignant dans un analyte encapsulé dans une cellule fluidique est excité en incidence normale par un faisceau lumineux. Le faisceau réfléchi par l'échantillon est collecté simultanément par un analyseur de spectre et une caméra, et le faisceau transmis est également collecté par une caméra. On obtient ainsi le spectre de micro-réflectivité du cristal, qui contient une résonance d'une largeur de l'ordre du nanomètre.

La résonance du capteur étudié subit un décalage spectral sous l'effet du changement d'indice de réfraction en passant d'un analyte à un autre, ou lors du greffage de biomolécules. Ce décalage est mesurable en comparant les spectres de micro-réflectivité dans l'état initial et dans l'état final. Afin d'obtenir une mesure significative, le banc optique doit offrir une stabilité et une reproductibilité suffisante pour détecter les faibles décalages spectraux attendus lors de la détection de biomolécules.

Dans la partie suivante, nous détaillerons le fonctionnement du banc et les différents composants optiques qui le constituent. Les caractéristiques du faisceau d'excitation seront spécifiées : l'adaptation de sa taille à celle des CPs, et le contrôle de sa polarisation pour qu'elle corresponde à celle du mode des structures. Ensuite, la procédure expérimentale mise en œuvre, comprenant le nettoyage des échantillons, l'assemblage de la cellule fluidique, et la méthode de normalisation des spectres, sera développée. Enfin, nous quantifierons la stabilité du signal et la reproductibilité de la mesure de décalage spectral des résonances.



FIG. 2.1 : Schéma de principe de la mesure : un cristal photonique baignant dans un analyte est excité par un faisceau émis par une source de lumière. Le faisceau réfléchi par le cristal est collecté d'une part par une caméra pour la visualisation, et d'autre part un analyseur de spectre pour la caractérisation spectrale. Le faisceau transmis est également collecté par une caméra.

# 2.2 Banc de micro-réflectivité

#### 2.2.1 Présentation générale du banc

Nous avons développé au cours de ce travail de thèse le banc de micro-réflectivité schématisé sur la figure 2.2, et illustré sur la figure 2.3. Le montage du banc a été supervisé par Lotfi Berguiga, et a notamment fait l'objet du Projet de Fin d'Études de Ania Pasecan (étudiante à l'INSA) au laboratoire. Nous avons fait le choix de construire un banc de réflectivité, d'une part pour pouvoir caractériser des échantillons opaques, et d'autre part car nous voulions laisser la voie de la transmission libre pour pouvoir faire évoluer le montage pour des applications en transmission, comme une visualisation

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-Iyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés



de type caméra sans lentille.

FIG. 2.2 : Schéma du banc de micro-réflectivité dans le proche infrarouge utilisé pour la caractérisation individuelle de cristaux photoniques.

Ce banc permet d'exciter un cristal photonique en incidence normale et de collecter les faisceaux transmis et réfléchi par l'échantillon. Il est constitué de plusieurs modules, représentés dans les cadres de la figure 2.2, dont le rôle est décrit dans les paragraphes ci-dessous.

**Module « Excitation » :** Une diode super-électro-luminescente (*SLED*) génère un faisceau lumineux collimaté par la lentille (*L*1) et devient un faisceau gaussien. Un contrôleur de polarisation permet d'obtenir une polarisation linéaire selon l'axe désiré. Ensuite, une partie du faisceau traverse le cube séparateur 50 : 50 (R:T)<sup>1</sup> (*BS*1) puis est réfléchie par le miroir (*M*). L'objectif (*O*1) focalise le faisceau sur l'échantillon, placé sur un jeu de platines pour l'alignement. Un plateau porte-échantillon ajustable permet d'en contrôler l'horizontalité, et une sonde

 $<sup>1.~50\,\%</sup>$  de l'intensité du faisceau est transmise, et  $50\,\%$  est réfléchie vers un cache noir.



FIG. 2.3 : Photographie du banc schématisé dans la figure 2.2.

THORLABS TSP01 mesure la température. Après réflexion, le faisceau fait le chemin inverse : re-collimation par l'objectif (O1) et réflexion par le miroir (M). Une partie du faisceau est alors réfléchie par le cube (BS1) et transmis à travers le cube (BS2) vers le module de collecte et d'analyse spectrale. Les caractéristiques du faisceau d'excitation seront présentées plus en détail dans la section suivante.

- Module « Collecte et analyse spectrale » : Le faisceau est collecté par la lentille (L2) et injecté dans un analyseur de spectre (OSA). On obtient ainsi le spectre de micro-réflectivité de l'échantillon. Les méthodes de collecte et d'analyse du spectre de micro-réflectivité seront détaillées dans la section 2.2.3.
- Modules « Visualisation » : Le faisceau est également réfléchi par le cube (BS2) vers la caméra (Cr). Le faisceau transmis à travers l'échantillon peut également être recueilli par l'objectif (O2) et imagé par la caméra (Ct). Ces caméras permettent une visualisation simultanée du faisceau et de l'échantillon, nécessaire au positionnement du premier dans le second.

#### 2.2.2 Caractéristiques du faisceau d'excitation

Dans cette section, nous détaillerons les composants du module « Excitation » de notre banc. Nous verrons comment le faisceau est mis en forme pour obtenir les caractéristiques nécessaires à l'excitation des CPs.

Pour générer le faisceau lumineux, on utilise une diode super électro-luminescente BROADLIGHTER M-Q-920-HP de marque SUPERLUM, notée (*SLED*) sur la figure 2.2. Elle est constituée de quatre LEDs dont la superposition des spectres d'émission couvre la gamme 750 à 1050 nm. La puissance totale de la source est de 3.7 mW. Elle est couplée à une fibre optique monomode, dont la taille de mode est  $\omega_{fibre-SLED} \approx 5 \,\mu\text{m}$ autour de 900 nm. En sortie de fibre, la lentille (*L*1) de distance focale 12 mm permet de collimater le faisceau en espace libre.

Pour pouvoir coupler le faisceau avec le mode du CP étudié, il doit y avoir un recouvrement spectral et spatial du faisceau et du mode. Le recouvrement spectral est assuré en choisissant la bonne longueur d'onde d'excitation. La figure 2.4a représente le spectre incident sur l'échantillon, mesuré par réflexion sur un miroir de référence placé sur le porte-échantillon. Les résonances visées étant dans la gamme 850 à 980 nm, le spectre d'excitation convient donc bien aux mesures que nous souhaitons effectuer.



FIG. 2.4 : Caractéristiques du faisceau incident sur l'échantillon : (a) spectre du faisceau de réflexion sur un miroir de référence placé sur le porte-échantillon, et (b) diagramme de polarisation, décrivant son intensité en fonction de la direction. La polarisation du faisceau est linéaire selon l'axe horizontal (axe  $\vec{X}$ ).

La polarisation du faisceau doit également correspondre à la polarisation du mode du cristal photonique. Dans notre cas, nous avons besoin d'une polarisation linéaire du champ électrique, placé selon l'axe  $\vec{X}$  par convention. Nous utilisons donc un contrôleur de polarisation, composé de trois lames (quart d'onde, demi-onde, quart d'onde) dont les orientations sont ajustées manuellement pour obtenir la polarisation désirée. Pour vérifier l'état de polarisation après réglage, on place un polariseur et un photo-détecteur après le cube (BS1). Le photo-détecteur mesure la puissance transmise à travers le polariseur dont on fait tourner l'axe de transmission. On obtient ainsi le diagramme de polarisation de la figure 2.4b. Ce diagramme est caractéristique d'un état de polarisation linéaire selon l'axe  $\vec{X}$ .

Ensuite, pour assurer le bon recouvrement spatial, la taille du faisceau doit correspondre à celle de la structure (ici 100 µm), et respecter les mêmes symétries. Dans notre cas, la structure peut être excitée par un faisceau gaussien, dont l'intensité théorique est tracée sur la figure 2.5a. Dans un faisceau gaussien, l'intensité est à symétrie axiale, elle est maximale sur l'axe de propagation du faisceau à r = 0 et décroit quand on s'en éloigne d'un rayon |r| > 0. La taille d'un faisceau gaussien est caractérisée par son rayon de gorge (*waist*), noté  $\omega_0$  : il s'agit du rayon auquel l'intensité est égale à l'intensité au centre du faisceau divisée par  $e^2$ .

Le rayon de gorge de notre faisceau est mesuré expérimentalement avec la technique de la « lame de couteau », illustrée sur la figure 2.5b : une lame de silicium clivée est régulièrement avancée pour occulter le faisceau, et un photo-détecteur mesure la puissance transmise. À partir du graphe de puissance non occultée T en fonction de la position de la lame x, on mesure le rayon de gorge  $\omega_0$  par un ajustement numérique utilisant l'équation 2.1 :

$$T(x) = 0.5 \times T_{max} \times \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2} \times (x - x_0)}{\omega_0}\right)\right) + T_{min}$$
(2.1)

Où  $T_{max}$  et  $T_{min}$  sont des constantes et  $x_0$  la position du centre du faisceau.

Le rayon de gorge est mesuré dans les deux directions orthogonales du plan  $(\vec{X}, \vec{Y})$ pour vérifier la symétrie du faisceau. Dans l'exemple de la figure 2.6, on obtient un faisceau de rayon de gorge  $\omega_0 \approx 35 \,\mu\text{m}$  selon l'axe  $\vec{X}$ , en utilisant un objectif de grossissement de 5× (ouverture numérique ON = 0.14). On obtient sensiblement le même



FIG. 2.5 : Propriétés géométriques d'un faisceau gaussien. (a) intensité d'un faisceau gaussien au niveau de la gorge (où sa taille est minimale), en fonction de la distance réduite  $\frac{r}{\omega_0}$  à l'axe de propagation du faisceau. L'insert de gauche représente l'évolution du rayon  $\omega$  du faisceau le long de son axe de propagation  $\vec{Z}$ . L'insert de droite représente l'intensité du faisceau vu en coupe au niveau de la gorge. (b) Principe de la mesure du rayon de gorge  $\omega_0$  : on déplace une lame de silicium clivée dans le faisceau, et un photo-détecteur mesure l'intensité non occultée par la lame.

résultat selon l'axe  $\vec{Y}$ , notre faisceau est donc bien symétrique. Les paramètres de l'ajustement numérique La taille du faisceau peut être ajustée en changeant le grossissement de l'objectif (O1), mais cette valeur de 35 µm convient aux mesures que nous souhaitons effectuer.

Nous avons montré ici que le faisceau gaussien incident sur l'échantillon a les caractéristiques requises pour permettre une bonne excitation des modes exploités des échantillons à étudier. La section suivante décrira les méthodes de collecte du faisceau après son interaction avec l'échantillon.



FIG. 2.6 : Mesure du rayon de gorge du faisceau incident suivant l'axe  $\vec{X}$ , par la technique de la « lame de couteau » : (a) puissance lumineuse transmise en fonction de la position de la lame quand elle est déplacée selon l'axe  $\vec{X}$ , et (b) paramètres de l'ajustement numérique par l'équation 2.1 pour les mesures de rayon de gorge suivant les axes  $\vec{X}$  et  $\vec{Y}$ .

#### 2.2.3 Collecte du signal

Pour pouvoir aligner le faisceau dans un cristal photonique, il est nécessaire de visualiser les deux simultanément. Pour cela, la caméra (Cr) de modèle BASLER acA1300-60gmNIR<sup>2</sup> image le plan de l'échantillon. La figure 2.7 montre le faisceau au centre d'un CP, imagé par la caméra en réflexion. Le banc permet également d'imager l'échantillon en transmission.



FIG. 2.7 : Visualisation du faisceau au centre d'un CP, dont les contours sont représentés en rouge ( $100 \,\mu\text{m} \times 100 \,\mu\text{m}$ ).

<sup>2.</sup> Résolution : 1280×1024 pixels, taille de pixel : 5.3 µm, efficacité quantique : 35 % à 850 nm - 10 % à 980 nm.

En parallèle, on collecte le faisceau réfléchi par l'échantillon dans une fibre optique qui l'amène à un analyseur de spectre (OSA) de modèle ANRITSU MS9710B avec une résolution de 0.02 nm. Pour cela, le faisceau passe par les cubes séparateurs (BS1) et (BS2) puis est injecté dans une fibre optique. Celle-ci est connectée à l'analyseur de spectre, qui est interfacé sur un ordinateur par Labview pour faciliter la collecte et le traitement des données.

La figure 2.8 montre un spectre de micro-réflectivité typique de la résonance d'un cristal photonique à double période sur substrat de silicium sur isolant (SOI), dont la conception sera présentée dans le chapitre 3. Il présente un profil de Fano [92–94] bien marqué. Le minimum de réflectivité du spectre est proche de zéro, ce qui est caractéristique d'un bon couplage du mode avec le faisceau d'excitation. Le rapport signal/bruit est très bon, la puissance de la source et l'alignement des chemins optiques sont donc satisfaisants.



FIG. 2.8 : Exemple de spectre de micro-réflectivité d'un cristal photonique à double période sur substrat de silicium sur isolant, et ajustement numérique utilisant l'équation de Fano (équation 2.2).

Le spectre de la figure 2.8 peut être décrit par l'équation 2.2 :

$$R_{Fano}(\delta) = R_0 \cdot \frac{(q+\delta)^2 + P}{1+\delta^2} \quad avec \quad \delta = 2 \cdot \frac{\omega - \omega_0}{\Gamma}$$
(2.2)

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Avec  $R_0$  et P des constantes,  $\omega$  la pulsation (Hz) et  $\omega_0$  la pulsation de résonance, q le paramètre d'asymétrie de Fano,  $\Gamma$  la largeur de résonance (Hz). On peut déduire de cette équation la longueur d'onde de résonance  $\lambda_0$  et le facteur de qualité Q:

$$\lambda_0 = \frac{2\pi \cdot c}{\omega_0} \quad \text{et} \quad Q = \frac{\omega_0}{\Gamma}$$

Avec c la vitesse de la lumière. La largeur du pic de résonance est déterminée par le facteur de qualité Q: plus il est élevé, plus la résonance est fine. Le paramètre qcaractérise la forme du spectre, qui provient de l'interférence entre le mode du cristal en résonance et la réflexion spéculaire.

Un ajustement numérique du spectre permet d'extraire les paramètres de résonance ( $\lambda_0$ , Q et P). Pour ce faire, on module l'équation de Fano par un polynôme de degré 2 pour tenir compte de la réponse des couches minces composant l'échantillon. À titre d'exemple, les paramètres de l'ajustement numérique du spectre de la figure 2.8 sont consignés dans le tableau 2.1. La longueur d'onde de résonance obtenue par ajustement numérique est typiquement estimée avec un intervalle de confiance de  $\pm 0.02$  nm, et de  $\pm 3\%$  pour le facteur de qualité.

	$r\left(\lambda\right) = R_{Fano}\left(\lambda\right) \times \left(a \cdot \lambda^{2} + b \cdot \lambda + c\right)$	Intervalle de confiance typique
$\lambda_0$	$936.5\mathrm{nm}$	$\pm 0.02\mathrm{nm}$
θ	1.16	$\pm 0.01$
Q	962	$\pm 3\%$

TAB. 2.1 : Paramètres du modèle d'ajustement numérique  $r(\lambda)$  utilisé pour modéliser le spectre de la figure 2.2 : la fonction «  $R_{Fano}$  » correspond à l'équation 2.2 exprimée en longueur d'onde. Le polynôme  $a \cdot \lambda^2 + b \cdot \lambda + c$  permet de modéliser la réflectivité des couches minces composant l'échantillon par une ligne de base parabolique

Cette mesure démontre ainsi la capacité du banc pour caractériser nos échantillons, et valide donc sa conception et son montage. Maintenant que nous pouvons mesurer nos spectres de résonances, nous allons décrire les procédures de préparation les échantillons et de traitement des données.

### 2.3 Procédure expérimentale

Dans cette partie, nous décrirons les procédures expérimentales mises en œuvre pour nettoyer et préparer les échantillons. Tout d'abord, nous nettoierons la puce photonique et la rendrons hydrophile. Ensuite, nous monterons une cellule fluidique sur la puce pour permettre la caractérisation dans un milieu liquide, dont nous mesurerons l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre. Enfin, nous détaillerons le calcul de normalisation des spectres bruts mesurés.

#### 2.3.1 Préparation de surface

Nous étudions des capteurs dont la surface est sensible à la présence de biomolécules. Ils sont par conséquent également très sensibles aux résidus, impuretés et pollutions déposés lors de la fabrication ou de la manipulation. Or nous voulons assurer une bonne reproductibilité des mesures, d'une part pour la caractérisation de plusieurs cristaux photoniques identiques à l'échelle de la puce, et d'autre part pour des mesures successives dans différents milieux. Il est donc essentiel de nettoyer minutieusement les puces avant caractérisation, de manière à ce que tous les CPs se trouvent dans les mêmes conditions. Ensuite, pour assurer la bonne pénétration de l'analyte, la puce doit être rendue très hydrophile.

La procédure de préparation de l'échantillon décrite ci-dessous a été développée avec Ania Pasecan pendant son Projet de Fin d'Études.

Le nettoyage de la puce commence par un rinçage dans l'acétone puis l'éthanol, puis une oxydation dans une étuve à 300 °C pendant 45 min. On forme ainsi une couche très mince d'oxyde (< 1 nm) à la surface du silicium, sous les résidus. La puce est ensuite plongée pendant 60 s dans un bain de solution tamponnée d'acide fluorhydrique à une concentration de 12.5 % ( BOE : *Buffered Oxide Etchant*), diluée vingt fois dans l'éthanol. L'oxyde en surface est lentement dissous, et emporte avec lui les résidus de surface. Cette opération est réalisée une seule fois avant la première utilisation des puces.

La surface des puces est initialement hydrophobe. En effet, même si l'oxyde natif du silicium est par nature hydrophile, la surface est nano-structurée, ce qui augmente fortement l'hydrophobie [95]. Or nous souhaitons travailler dans des solutions polaires, comme l'eau ou l'éthanol.

Avant chaque utilisation d'une puce en milieu liquide, la surface est donc traitée pour la rendre très hydrophile. Après un bain dans l'acétone puis l'éthanol, on réalise un traitement à l'UV-ozone (120 s) qui permet de ré-oxyder légèrement la surface et créer des liaisons pendantes qui la rendent hydrophile (figure 2.9). Ce traitement est effectué sur la puce avant chaque mise en contact avec un liquide, si la surface n'est pas fonctionnalisée avec des biomolécules, auquel cas un traitement UV-ozone détruirait la fonctionnalisation. Dans ce cas, l'ajout d'un tensioactif comme le *tween 20* peut être nécessaire pour assurer la bonne pénétration de l'analyte.



FIG. 2.9 : Procédé de nettoyage avant chaque mise en milieu liquide. Un bain dans l'acétone puis l'éthanol élimine les impuretés en surface, et un traitement UV-ozone ré-oxyde légèrement la surface et la rend hydrophile en créant des liaisons pendantes, ce qui permet un bon mouillage de l'analyte.

#### 2.3.2 Préparation de la cellule fluidique

On utilise une cellule fluidique afin de travailler en milieu liquide. La cellule fluidique remplit plusieurs rôles :

- confiner l'analyte sur la puce,
- limiter son évaporation et maintenir la même concentration (en sels, éthanol...),
- protéger des poussières et des contaminants de l'air,
- offrir une surface plane et fixe propice à l'excitation des CPs et à l'imagerie, plutôt que la surface d'une goutte de liquide courbe et oscillante.

La cellule fluidique consiste en un anneau de PDMS (polydiméthylsiloxane) avec une ouverture carrée en son centre où se loge le liquide, placé sur la puce puis recouvert par une lamelle de microscope. Un schéma d'une cellule est représenté sur la figure 2.10a, et la figure 2.10b présente une photographie de l'assemblage sur une puce.



FIG. 2.10 : Cellule fluidique utilisée pour les mesures en milieu liquide : (a) coupe schématique de la cellule remplie d'analyte, assemblée sur une puce, et (b) photographie de la cellule sur la puce, sur laquelle on peut distinguer une zone carrée contenant les cristaux photoniques, contenue dans l'ouverture de l'anneau de PDMS.

Pour fabriquer l'anneau, une plaque de PDMS d'environ 1 mm d'épaisseur est découpée en un carré de 2 cm de côté, qui est percé en son centre en un carré de 1.2 cm de côté. La surface du PDMS étant légèrement poreuse, elle peut stocker des solvants et les relarguer dans l'analyte, c'est pourquoi l'anneau est stocké dans un dessicateur avant utilisation et n'est pas rincé avec des solvants. À la place, il est rincé avec l'analyte et trempé pendant plusieurs minutes dans un cristallisoir pour que l'analyte en remplisse les pores. En parallèle, une lamelle de microscope (épaisseur 150  $\pm$  20 µm) est nettoyée dans des bains d'acétone puis d'éthanol. La puce, l'anneau de PDMS et la lamelle sont

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

ensuite assemblés dans le cristallisoir rempli de l'analyte. Un échantillon de l'analyte est prélevé pour mesurer son indice de réfraction.

#### 2.3.3 Mesure d'indice de réfraction

Pour tester la sensibilité des CPs à l'indice de réfraction environnant, on utilise des solutions de référence. On mélange des solutions (par exemple de l'eau déionisée avec un solvant, ou avec du glucose) pour faire varier l'indice de manière très fine. Il est donc nécessaire de connaitre l'indice de réfraction de ces solutions.

Dans ce but, il est possible d'extrapoler les valeurs prises dans des abaques. Cependant, ces derniers sont souvent donnés à des longueurs d'onde différentes de notre longueur d'onde de travail. De plus, les modèles d'indice de réfraction en fonction de la composition de la solution sont parfois non linéaires et difficiles à mettre en œuvre, notamment pour des mélanges eau-éthanol [96].

Nous avons donc préféré mesurer directement l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre, ce qui présente l'avantage de mesurer directement la solution de travail, et d'être insensible aux éventuelles variations de composition lors de la préparation des solutions (erreur de dilution, pollution, évaporation de solvants dans l'eau, etc).

L'appareil que nous avons choisi est un réfractomètre ATR-L de marque SCHMIDT+HAENSCH stabilisé en température, effectuant sept mesures de 400 à 950 nm, ce qui nous permet d'avoir une mesure directe à notre longueur d'onde de travail. Les indices de solutions usuelles sont tracés sur la figure 2.11. La valeur d'indice de réfraction typiquement utilisée est celle à 950 nm. La précision de la mesure est de  $4 \times 10^{-5}$  RIU, ce qui est suffisant car nous souhaitons mesurer des variations d'indice de réfraction de l'ordre de  $10^{-4}$  RIU.

Les mesures d'indices de nos solutions expérimentales sont effectuées en deux temps : une première mesure d'indice de l'analyte est faite sur l'échantillon prélevé dans le cristallisoir dans lequel la cellule fluidique a été assemblée, comme indiqué plus haut. Puis la solution contenue dans la cellule est analysée après les mesures optiques, de manière à contrôler si elle a évolué en fonction de son environnement (évaporation d'un solvant, interaction avec la surface de la puce, pollution...). La comparaison des



FIG. 2.11 : Réfractomètre ATR-L de marque SCHMIDT+HAENSCH utilisé pour mesurer les indices de réfraction, et mesures pour des solutions usuelles. La gamme de travail typique des CPs est de 850 à 980 nm.

deux mesures permet de contrôler la stabilité de l'indice de la solution dans la cellule fluidique lors de la caractérisation optique de la puce à CPs.

#### 2.3.4 Normalisation des spectres de micro-réflectivité

Lors de nos caractérisations optiques, nous cherchons à mesurer la réponse spectrale  $R_{CP}(\lambda)$  de nos échantillons. Or le spectre brut de micro-réflectivité  $I_{mesure CP}(\lambda)$ mesuré n'est pas exploitable en l'état, car c'est le produit de la réponse spectrale avec le spectre du faisceau incident  $I_{incident}(\lambda)$ , comme l'indique l'équation 2.3 :

$$I_{mesure CP}\left(\lambda\right) = I_{incident}\left(\lambda\right) \times R_{CP}\left(\lambda\right) \tag{2.3}$$

Pour obtenir  $R_{CP}(\lambda)$ , il faut donc connaitre le spectre du faisceau incident. Cependant ce dernier est difficilement mesurable par une mesure classique de réflectivité sur un miroir de référence, car en changeant ainsi d'échantillon on change les conditions d'alignement du banc. En effet, l'échantillon n'étant jamais parfaitement horizontal, le faisceau réfléchi peut être très légèrement dévié de l'axe optique. Ce léger désaxement suffit à modifier l'injection du faisceau réfléchi dans la fibre de collecte de l'analyseur de spectre, ce qui a une influence sur le spectre mesuré. Pour surmonter cette difficulté, nous effectuons deux mesures supplémentaires.

Premièrement, on mesure le spectre de micro-réflectivité  $I_{\mu substrat}(\lambda)$  sur le substrat dans les mêmes conditions d'alignement. Ce spectre est le produit de la réponse spectrale du substrat  $R_{substrat}(\lambda)$  par le spectre du faisceau incident, comme l'indique l'équation 2.4 :

$$I_{\mu \, substrat}\left(\lambda\right) = I_{incident}\left(\lambda\right) \times R_{substrat}\left(\lambda\right) \tag{2.4}$$

Secondement, on mesure le spectre de réflectivité du substrat sur un banc de macro-réflectivité séparé (taille du spot  $\approx 2 \text{ mm}$ ), non sujet aux contraintes d'alignement. A partir de ces trois mesures, il est facile de déduire la réponse spectrale  $R_{CP}(\lambda)$  en utilisant la relation 2.5 :

$$R_{CP}(\lambda) = \frac{I_{mesure CP}(\lambda)}{I_{\mu \, substrat}(\lambda)} \times R_{substrat}(\lambda)$$
(2.5)

Grâce à cette technique de normalisation, il est possible de mesurer avec une plus grande rigueur la longueur d'onde de résonance de nos capteurs photoniques. Dans la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

partie suivante, nous étudierons la stabilité et la reproductibilité du banc optique, qui doivent garantir que les mesures de décalage spectral ne sont pas entachées d'erreurs dues au système de mesure.

## 2.4 Stabilité et reproductibilité

Nous utilisons le banc de caractérisation pour mesurer le décalage spectral de nos capteurs photoniques en réponse à une variation d'indice. Toute autre perturbation du spectre mesuré est donc une erreur qui entache la mesure. Parmi les perturbations possibles, on peut notamment citer la variation d'indice de réfraction du CP et de l'analyte avec la température, qu'on peut quantifier avec un suivi de la température, en connaissant l'évolution de l'indice de l'analyte grâce au réfractomètre. La stabilité du spectre d'émission de la *SLED* et de la fonction de transfert du montage sont également susceptibles d'évoluer avec la température; les vibrations mécaniques, le bruit de mesure de l'analyseur de spectre sont également sources d'instabilité et de fluctuation du spectre mesuré.

D'autre part, la mesure du décalage spectral se déduit de la comparaison de deux spectres dans deux analytes. Nous cherchons à détecter de très faibles décalages, nous sommes donc fortement dépendants de la reproductibilité des mesures, qui doivent être pratiquées dans les mêmes conditions. Or le fait de changer d'analyte dans la cellule fluidique peut introduire de la pollution qui change sa composition. La préparation et la manipulation de l'échantillon doit donc être extrêmement précautionneuse. De plus, lors de la mesure du second spectre l'échantillon doit être positionné de la même manière, et le faisceau d'excitation doit être placé rigoureusement au même endroit que lors de la première mesure. C'est pourquoi nous avons voulu quantifier la stabilité et la reproductibilité de notre système de détection, afin d'en contrôler la justesse et la précision.

#### 2.4.1 Stabilité de la résonance en milieu liquide

Nous avons dans un premier temps évalué la stabilité de la mesure de résonance dans une solution homogène. Pour cela, nous avons suivi la résonance d'un CP dans de l'eau déionisée pendant 20 min. On négligera la variation d'indice de réfraction de l'analyte avec la température, puisque les variations de température sont inférieures au dixième de degré Celsius.

Les spectres de résonance ainsi mesurés sont présentés sur la figure 2.12. On observe que la position de la résonance est très stable, tandis que des interférences périodiques sur tout le spectre semblent instables. Au niveau de la résonance, les spectres sont contenus dans une bande de  $\Delta \lambda_{gamme} \approx 0.01$  nm de largeur. On n'observe aucune dérive continue, la répartition des valeurs des résonances mesurées apparait aléatoire. Les interférences périodiques sont dues à l'effet Fabry-Perot dans l'analyte (oscillations de période  $\approx 0.3$  nm) et la lamelle de la cellule fluidique (période  $\approx 1.7$  nm). Leur instabilité est attribuée aux variations de température, même minimes, qui impactent le spectre incident et l'épaisseur des couches optiques.



FIG. 2.12 : Spectres de micro-réflectivité dans l'eau déionisée, montrant la stabilité de la mesure de la résonance sur 20 min. La résonance est contenue dans une bande de  $\approx 0.01 \text{ nm}$  de largeur. Les interférences de Fabry-Perot visibles hors de la résonance sont instables.

On peut estimer que l'impact des conditions extérieures sur la mesure de la résonance est de :

$$\delta \lambda_{stabilit\acute{e}} = \pm \Delta \lambda_{gamme} \approx \pm 0.01 \,\mathrm{nm}$$

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

#### 2.4.2 Reproductibilité de la mesure de résonance

Les mesures présentées dans cette section ont été effectuées par Mubdiul Islam Rizu (étudiant à l'ENS Cachan) pendant son stage de Master 2 au laboratoire.

Nous avons ensuite souhaité quantifier l'erreur de reproductibilité de la mesure de résonance, causée par la pollution des échantillons lors de l'assemblage des cellules fluidiques, et par les réglages du banc de caractérisation. Pour cela, nous avons mesuré le spectre de résonance d'un cristal photonique à deux reprises, selon le protocole suivant :

- 1. Mise en place d'une cellule fluidique contenant de l'eau déionisée;
- 2. mesure d'un premier spectre de micro-réflectivité;
- 3. démontage de la cellule fluidique et nettoyage de la puce;
- 4. mise en place d'une nouvelle cellule fluidique avec la même solution;
- 5. mesure du second spectre.

Si la reproductibilité de la mesure était parfaite, les deux spectres ainsi obtenus seraient identiques. La comparaison des deux mesures expérimentales nous donne donc la gamme de reproductibilité. Nous avons représenté les deux spectres d'un cristal sur la figure 2.13. On observe un très bon recouvrement des spectres, avec un décalage spectral inférieur à 0.004 nm.

Nous avons opéré ce protocole sur quinze CPs différents appartenant à la même puce afin d'obtenir une information statistique. Le décalage moyen entre deux mesures est de  $\overline{\Delta\lambda} \approx 6 \times 10^{-5}$  nm sur les quinze mesures, ce qui est négligeable; l'écart-type est de  $\sigma_{reproductibilité} = 0.03$  nm. On peut ainsi estimer que l'erreur de reproductibilité du décalage spectral est de :

 $\delta_{reproductibilit\acute{e}} = \pm \sigma_{reproductibilit\acute{e}} = \pm 0.03 \,\mathrm{nm}$ 

On y ajoute l'erreur de stabilité pour obtenir la résolution de notre capteur  $\delta\lambda$  :



FIG. 2.13 : Comparaison des spectres de micro-réflectivité d'un CP dans deux cellules fluidiques successives contenant de l'eau déionisée, montrant la reproductibilité de la mesure. Le décalage spectral entre ces deux spectres est inférieur à 0.004 nm.

 $\delta \lambda = \delta_{stabilit\acute{e}} + \delta_{reproductibilit\acute{e}} = \pm 0.04 \, \mathrm{nm}$ 

Cette valeur constitue le décalage spectral minimal que l'on peut détecter sur un cristal photonique entre deux mesures (typiquement, d'une solution par rapport à une autre, ou avant/après mise en présence de biomolécules). Compte tenu de notre objectif de détecter des décalages autour de 0.1 nm, notre stabilité et notre reproductibilité sont suffisamment bonnes pour obtenir des résultats significatifs, ce qui valide la fonctionnalité de notre banc de caractérisation.

## 2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le banc de micro-réflectivité en milieu liquide, et les procédures expérimentales rigoureuses développées pendant la thèse pour la caractérisation de nos capteurs à cristaux photoniques. Le banc optique permet d'exciter les structures en incidence normale avec un faisceau gaussien de rayon de gorge  $w_0 = 35 \,\mu\text{m}$ dont la polarisation est contrôlée, et de mesurer leur spectre de micro-réflectivité. Nous

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

avons démontré l'efficacité de l'excitation en mesurant des spectres caractéristiques de résonances de Fano.

Nous avons développé les procédures de nettoyage et de préparation de cellule fluidique pour travailler en milieu liquide. Nous avons ensuite mesuré la stabilité du signal à 0.01 nm et la reproductibilité entre deux mesures à 0.03 nm, ce qui nous permet de mesurer un décalage spectral d'une résonance jusqu'à 0.04 nm.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons l'étude des CPs individuels en matière de sensibilité à l'indice de réfraction effectuée sur ce banc optique. Les performances expérimentales de nos capteurs seront comparées à l'état de l'art. L'application à la détection de biomolécules sera également présentée.

# Chapitre 3

# Capteurs à cristaux photoniques pour application dans la biodétection

#### Sommaire

3.1	Introduction		
3.2	Conception des capteurs à cristaux photoniques 61		
	3.2.1	Caractéristiques recherchées des capteurs optiques	61
	3.2.2	Conception des structures	63
	3.2.3	Comparaison avec l'état de l'art	68
3.3	Réalis	sation expérimentale des cristaux photoniques	<b>72</b>
	3.3.1	Fabrication	72
	3.3.2	Caractérisation structurale	74
<b>3.4</b>	Démo	onstration expérimentale de la transduction optique	75
3.5	Appli	cation à la détection surfacique	79
	3.5.1	Détection d'une monocouche de BSA	79
	3.5.2	Sensibilité surfacique théorique	84
	3.5.3	Détection spécifique de streptavidine	88
<b>3.6</b>	Conc	lusion	95

# 3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, nos capteurs à cristaux photoniques doivent présenter de bonnes performances de détection, tout en étant compatibles avec l'application finale visée de lecture sans lentille, ainsi qu'une fabrication « bas-coût » avec des procédés standard de la microélectronique. Ces multiples contraintes constituent un défi important pour la conception et la fabrication de tels dispositifs.

Ce chapitre est consacré à la conception et à l'étude des performances des cristaux photoniques. Après un rappel des principales propriétés et figures de mérite qui caractérisent ces structures, nous présenterons l'architecture originale à double période qui a été mise au point pour satisfaire toutes les conditions énoncées ci-dessus, ainsi que la réalisation expérimentale des puces photoniques.

L'étude expérimentale des performances des capteurs a été menée sur le banc optique qui a été présenté dans le chapitre 2, et fera l'objet des dernières parties de ce chapitre. Deux types d'études seront présentées : nous étudierons d'abord la sensibilité des CPs à l'indice de réfraction de l'analyte environnant, afin d'en déduire la figure de mérite expérimentale de nos capteurs. Nous mesurerons ensuite la réponse des structures à la présence d'une couche mince de molécules à leur surface, dans le but de démontrer les performances de nos capteurs pour la biodétection.

### **3.2** Conception des capteurs à cristaux photoniques

#### 3.2.1 Caractéristiques recherchées des capteurs optiques

Le principe de transduction de nos capteurs est de détecter une faible variation d'indice de réfraction. Nous utiliserons donc des structures résonantes, dont le décalage spectral de la résonance permet de mesurer cette variation d'indice. L'amplitude du décalage doit être la plus élevée possible pour obtenir la plus grande sensibilité. On recherche donc des structures qui maximisent l'interaction lumière-matière, à la surface des structures, là où des biomolécules seront capturées.



FIG. 3.1 : Illustration de l'influence du facteur de qualité dans le cas d'un décalage spectral : spectres de transmission montrant une résonance à (a) faible et (b) haut facteur de qualité, avant et après décalage spectral de 1 nm, et signal différentiel correspondant (courbes bleues). Le signal différentiel maximal est de 14% pour le faible facteur de qualité (Q = 100), et de 82% pour le haut facteur de qualité (Q = 1000).

De plus, les résonances doivent être les plus fines possibles pour que leur décalage spectral se traduise en une forte variation d'intensité. Afin d'illustrer cela, nous avons reporté dans la figure 3.1 les spectres de transmission correspondant à deux résonances, pour un facteur de qualité de 100 (3.1a) et de 1000 (3.1b). Nous y avons superposé les mêmes spectres décalés de 1 nm, qui pourraient correspondre à une détection de biomolécules. Pour mieux estimer la variation de transmission liée à la biodétection, nous avons aussi tracé la différence d'intensité entre les deux spectres pour ces deux configurations. Pour le faible facteur de qualité, la variation d'intensité maximale est de  $\Delta I < 14\%$ , alors que pour le haut facteur de qualité, la variation d'intensité est 6 fois plus élevée. Aussi l'amplitude de la variation du signal est d'autant plus grande que le facteur de qualité est élevé. On peut également montrer que la variation du signal mesuré en fonction du décalage spectral est d'autant plus abrupte que le facteur de qualité est élevé, ce qui est avantageux pour la sensibilité d'un système de mesure en intensité.

Les cristaux photoniques sont des structures qui répondent à ces deux enjeux : la versatilité de leur conception permet une ingénierie de la répartition du mode, localisé proche de la surface avec un très haut facteur de qualité. Cette approche est complémentaire des structures plasmoniques, qui permettent de confiner le mode à la surface et donc de le rendre très sensible à la présence d'analytes, mais dont le facteur de qualité est plus faible, limité à quelques dizaines [31]. Pour évaluer les performances optiques de nos structures et les comparer à d'autres dispositifs de la littérature, on peut utiliser la sensibilité volumique S, exprimée en nm  $\cdot \operatorname{RIU}^{-1}$ :

$$S_v = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n}$$

Où  $\Delta n$  est la variation de l'indice de réfraction entre deux analytes, et  $\Delta \lambda$  le décalage spectral de la résonance correspondant. La sensibilité volumique caractérise donc l'amplitude du décalage spectral induit par une variation d'indice. Elle tient compte de la répartition du mode (fraction de l'intensité dans les trous), et constitue une valeur numérique simple pour comparer deux structures entre elles.

Cependant la sensibilité volumique n'est pas suffisante pour décrire les performances optiques d'un capteur, car elle ne tient pas compte du facteur de qualité Q. Il faut également tenir compte de la gamme de longueur d'onde de résonance  $\lambda_0$  : en effet, plus la longueur d'onde est faible, et plus un décalage spectral donné est significatif. Pour prendre en considération ces trois paramètres on introduit alors une nouvelle grandeur, appelée « figure de mérite » ou FOM, exprimée en RIU<sup>-1</sup> :

$$FOM = \frac{S \times Q}{\lambda_0}$$

Cette grandeur, souvent utilisée dans la littérature [22, 31], permet de comparer les performances de différents dispositifs optiques entre eux et d'en déduire leur potentiel en matière de détection optique. Nous verrons dans la section suivante comment nous avons conçu nos cristaux photoniques pour optimiser cette FOM.

#### 3.2.2 Conception des structures

La conception des structures présentées dans cette section, ainsi que les simulations numériques présentées dans cette thèse, ont été effectuées par Taha Benyattou.

Nous recherchons un mode photonique avec les meilleures performances de détection de molécules. Nous devons donc sélectionner un mode dont la répartition du champ est la plus appropriée, c'est-à-dire concentrée à l'intérieur des trous, au plus près de la surface. En outre, les résonances doivent être suffisamment fines pour maximiser la FOM. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le mode doit également être excitable en incidence normale.

Enfin, la conception des structures doit être compatible avec les technologies de fabrication à bas coût basées sur le silicium, notamment la lithographie *deep*-UV. Nous avons vu dans le chapitre 1 que nous avons choisi d'utiliser des plaques de SOI (*Silicon On Insulator*), et de travailler à une longueur d'onde autour de 950 nm. Or ce choix a des conséquences sur la conception : plus la longueur d'onde est faible, plus les dimensions des CPs sont faibles, ce qui augmente les contraintes sur la lithographie. En outre, l'épaisseur de la couche de silicium SOI doit être optimisée pour limiter les pertes par absorption vers 950 nm tout en permettant un fort confinement du mode dans la structure.

Pour obtenir une structure ayant les propriétés photoniques désirées, nous nous appuierons sur un CP constitué d'un réseau carré de trous ronds, schématisé sur la figure 3.2a. Le diagramme de bandes associé, calculé par simulation FDTD (Finite-Difference Time-Domain) est représenté sur la figure 3.3a en traits pointillés. Celui-ci est constitué de deux bandes : la bande rouge représente les modes « diélectriques », dont l'intensité est concentrée dans le silicium, et la bande verte représente les modes « d'air », dont l'intensité est concentrée dans les trous. La zone de Brillouin de ce cristal, délimitée par les points  $\Gamma$ , X et M, est également représentée en noir sur la figure 3.3b.

Le CP classique possède un mode de lumière lente<sup>1</sup> en limite de sa zone de Brillouin (« mode d'air » sur la figure 3.3a), dont l'intensité est concentrée dans les trous à l'interface avec le silicium, similairement au champ de la figure 3.4. Cela permet une forte interaction lumière-matière au voisinage de sa surface. Cependant ce mode d'air se situe au-dessous de la ligne de lumière (courbe bleue, figure 3.3a), il ne peut pas être excité en incidence normale (c'est-à-dire au point  $\Gamma$ ) et est donc inutilisable pour notre application.

En introduisant une perturbation dans le réseau cristallin, il est possible de replier le mode d'air au point  $\Gamma$ . Pour ce faire, on modifie le CP en alternant les rayons des trous

<sup>1.</sup> La vitesse de groupe d'un mode étant proportionnelle à la pente de la bande à laquelle le mode appartient, elle est nulle là où la bande est plate.



FIG. 3.2 : Illustration du concept de cristal photonique à double période dans l'exemple d'un réseau carré de trous ronds et de période a : (a)  $CP \ll$  classique » à simple période constitué de trous de rayon constant R et (b) avec une double période obtenue via l'alternance du rayon des trous,  $R_1$  et  $R_2$ , une rangée sur deux.



FIG. 3.3 : (a) Diagrammes de bandes du CP classique (pointillés) et du CP à double période (traits pleins), obtenus par simulation FDTD (Finite-Difference Time-Domain), avec les paramètres optimisés et (b) zone de Brillouin des CPs classique (en noir) et à double période (en rouge).



FIG. 3.4 : Simulation RCWA de la répartition de l'intensité du champ électrique, orienté selon l'axe de polarisation du mode  $\vec{X}$ , dans la maille élémentaire d'un cristal photonique à double période de paramètres optimisés, et excité par une onde plane : (a) vue dans le plan du cristal (coupe à mi-épaisseur), et (b) vue en coupe verticale dans un trou suivant l'axe  $\vec{Y}$  (le plan de coupe est représenté en pointillés sur la figure (a)).

 $R_1$  et  $R_2$  une ligne sur deux, comme schématisé sur la figure 3.2b. Cette perturbation a pour effet de doubler la période du cristal, et donc de diviser par deux sa zone de Brillouin, qui s'étend maintenant jusqu'au point X'. Celle-ci est représentée en rouge sur la figure 3.3b. La conséquence de cette « double période » est que les bandes sont repliées par symétrie autour du point X', comme illustré sur la figure 3.3a. Le mode d'air est ainsi replié au point  $\Gamma$ , et devient excitable en incidence normale.

Le facteur de qualité de la résonance est contrôlé par le rapport  $R_2/R_1$ . Plus ce rapport se rapproche de 1, plus le facteur de qualité augmente. Le contrôle technologique précis de ce rapport va nous permettre d'obtenir de fines résonances.

Le mode d'air possède une répartition de champ concentrée au voisinage de l'interface entre le silicium et le milieu ambiant, il est donc particulièrement indiqué pour détecter des molécules greffées à la surface du CP. La figure 3.4 représente la répartition de l'intensité du champ électrique dans une maille élémentaire du CP à double période, obtenue par simulation RCWA (*Rigourous Coupled-Wave Analysis*). Le mode est majoritairement polarisé selon l'axe  $\vec{X}$ . On peut voir sur la figure que le champ est concentré majoritairement en deux lobes à l'intérieur des trous. Nous avons donc un bon recouvrement avec le volume dans lequel des molécules peuvent être piégées. Ce mode permet ainsi une forte interaction lumière-matière et garantit une détection efficace de molécules adsorbées en surface.

Ce type de CPs a été notamment utilisé dans la thèse de Laurent Milord, en tirant parti de la concentration de la lumière à l'intérieure des trous pour fabriquer des nano-pinces optiques [97,98]

En fixant la longueur d'onde de travail à 950 nm, on peut calculer les dimensions de nos CPs. Les dimensions optimales pour obtenir un facteur de qualité voisin de 1000 sont ainsi les suivantes (pour l'architecture de la figure 3.2b) :

- période :  $a = 300 \,\mathrm{nm}$ ;
- rayons :  $R_1 = a/3 = 100 \text{ nm et } R_2 = 0.9 \times R_1 = 90 \text{ nm};$
- épaisseur de la couche de silicium SOI : 58 nm.

Afin de valider la conception de nos structures, nous avons calculé des spectres de réflectivité d'un CP excité par une onde plane par simulation RCWA. Le spectre dans l'eau déionisée  $(n_{eau DI} = 1.328)$  est représenté en bleu sur la figure 3.5. On peut y voir une résonance bien marquée avec un profil de Fano. Un ajustement numérique permet d'extraire la longueur d'onde de résonance et le facteur de qualité :

 $\lambda_{eau\,DI} = 947.6\,\mathrm{nm}$  et  $Q_{eau\,DI} \approx 1300$ 

Ce spectre confirme ainsi qu'il est possible d'exciter nos structures en milieu aqueux en incidence normale avec une bonne finesse de résonance.

On peut également calculer la sensibilité volumique des structures en simulant un autre spectre dans l'éthanol ( $n_{\acute{e}thanol} = 1.357$ ), représenté en rouge sur la figure 3.5. La résonance y est décalée spectralement de 5.8 nm par rapport à l'eau déionisée. Ce

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés


FIG. 3.5 : Spectres de réflectivité dans l'eau déionisée et l'éthanol d'un cristal photonique à double période excité par une onde plane. Dimensions (d'après le schéma de la figure 3.2b) :  $e = 58 \text{ nm}, a = 300 \text{ nm}, R_1 = a/3 = 100 \text{ nm}, R_2 = 90 \text{ nm}$  (simulations RCWA).

décalage  $\Delta \lambda$  en fonction de la variation d'indice de réfraction ambiant  $\Delta n$  nous donne ainsi la sensibilité volumique :

$$S = \frac{\Delta \lambda}{\Delta n} = 200 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$$

Ce qui nous permet de calculer notre figure de mérite :

$$FOM = 274 \,\mathrm{RIU}^{-1}$$

Ces valeurs seront comparées à celles d'autres dispositifs similaires décrits dans la littérature dans la section suivante.

### 3.2.3 Comparaison avec l'état de l'art

Pour comparer nos indicateurs de performance à la littérature, nous choisirons des références bibliographiques illustrant les principales approches de biodétection optique portable. Cependant, cette simple évaluation numérique n'est pas suffisante pour

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

évaluer le potentiel des dispositifs pour la biodétection. En effet, au delà des performances optiques, d'autres facteurs entrent en ligne de compte, comme la facilité d'émission, de couplage et de détection de la lumière, la densité d'intégration des structures et la compatibilité avec la fabrication bas-coût, qui représentent les obstacles majeurs vers le *Point-Of-Care* (POC). Ces différents points seront également discutés dans la comparaison ci-dessous.

Nous avons sélectionné et répertorié dans le tableau 3.1 les références suivantes : la revue sur la résonance plasmonique de surface (SPR) de Otte *et al.* [31]; le capteur à réseaux plasmoniques de Cetin *et al.* [37]; l'anneau à cristal photonique et l'anneau résonant conventionnel servant de témoin, développés par Lo *et al.* [78]; la cavité à CP à fente de Scullion *et al.* [76]; et les réseaux à GMR de Triggers *et al.* [88] Ces travaux reposent tous sur le décalage spectral d'un signal optique comme moyen de transduction, mais ils ont adopté différentes voies vers le POC, et nous allons comparer ci-dessous les intérêts et les inconvénients de chaque approche. Nous ne considèrerons pas ici les capteurs interférométriques, car leur principe de fonctionnement diffère des capteurs résonants, et leur taille limite fortement leur potentiel d'intégration et de multiplexage malgré leur haute sensibilité.

La SPR est la technique la plus mature, elle est utilisée dans des applications commerciales, et bénéficie de sa simplicité de fabrication et d'utilisation. Elle présente des FOMs moyennes allant de  $25 \text{ RIU}^{-1}$  à  $130 \text{ RIU}^{-1}$ , qui reposent sur de très hautes sensibilités jusqu'à  $13\,000 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ , et des faibles facteurs de qualité de quelques dizaines. Mais le potentiel de la SPR conventionnelle pour la détection POC est fortement limité par la taille et le coût des équipements.

L'approche de Cetin *et al.* tire parti de la miniaturisation de nombreux réseaux plasmoniques excitables en parallèle en incidence normale. Leur FOM de 28 RIU<sup>-1</sup> reste limitée, car leur sensibilité de 621 nm  $\cdot$  RIU<sup>-1</sup> est inférieure à la SPR conventionnelle (même si elle reste supérieure aux transducteurs diélectriques), et les résonances restent larges ( $Q \sim 30$ ). Les résonances plasmoniques dans le visible permettent cependant une détection par caméra CMOS, compatible avec une application bas-coût. La proximité des capteurs à la caméra élimine le besoin de lentilles et d'alignement optique, ce qui est essentiel pour la robustesse d'utilisation du dispositif.

Type de structure	Référence	$\frac{S}{(nm \cdot RIU)}$	-1) Q	$\lambda_0 \; ({ m nm})$	${ m FOM} \ ({ m RIU}^{-1})$
SPR conventionnelle	Otte <i>et</i> <i>al.</i> , 2010 [31]	1000 - 13000	15-9.5	600-950	25-130
Micro-réseaux plasmoniques	Cetin <i>et</i> <i>al.</i> , 2014 [37]	621	$\sim 30$	675	28
Anneau résonant témoin	Lo <i>et al.</i> , 2017 [78]	111	$\sim 35000$	1555	2498
Anneau résonant à CP	2011 [10]	248	$\sim 1200$	1625	183
Cavité à CP à fente (largeur 120 nm)	Scullion <i>et al.</i> , 2011 [76]	500 (théo- rique)	3000	1550	968
Résonance de mode guidé (GMR) dans un réseau en $Si_3N_4$	Triggs <i>et</i> <i>al.</i> , 2017 [88]	137	$\sim 420$	840	69
Cavité à CP (théorique)	Ce travail	200	1300	950	274

TAB. 3.1 : Tableau comparatif des performances optiques de différents dispositifs de biodétection. S : sensibilité volumique; Q : facteur de qualité;  $\lambda_0$  : longueur d'onde de résonance; FOM : figure de mérite

L'approche diélectrique permet d'obtenir des FOMs beaucoup plus élevées, grâce à l'utilisation de résonateurs qui présentent des facteurs de qualité beaucoup plus hauts que les dispositifs plasmoniques. Par exemple, l'anneau résonant conventionnel de *Lo et al.* présente une FOM de 2498 RIU<sup>-1</sup> grâce à un très grand facteur de qualité de ~ 35 000. En contrepartie, sa sensibilité de 111 nm · RIU<sup>-1</sup> est peu élevée à cause du faible volume d'interaction de la lumière avec l'analyte. Les auteurs ont donc ajouté un cristal photonique dans l'anneau, ce qui a pour effet d'augmenter le volume d'interaction lumière-matière et par conséquent augmenter la sensibilité de plus d'un facteur deux, au détriment du facteur de qualité qui tombe à ~ 1200, et de la FOM réduite à 183 RIU<sup>-1</sup>.

La cavité à fente dans un CP 2D de Scullion et al. présente la deuxième meilleure

FOM de notre corpus, d'une valeur de 968 RIU<sup>-1</sup>. La fente permet un fort recouvrement du mode photonique et de l'analyte, et produit une grande sensibilité de 500 nm · RIU<sup>-1</sup>, tout en conservant un fort facteur de qualité de 3000. De plus, la petite taille des capteurs permet une intégration dense de nombreux capteurs sur puce. Mais les performances de ce type de structure sont fortement dépendantes des dimensions des fentes (ici 120 nm). La reproductibilité de la lithographie *deep*-UV est donc critique pour obtenir une bonne homogénéité des performances à l'échelle de la puce.

Les transducteurs diélectriques décrits ci-dessus sont excités par des guides d'onde, dans lesquels le couplage de la lumière est difficile, ce qui reste un verrou technologique pour les dispositifs POC. D'autre part, ils utilisent le silicium comme matériau guidant, ce qui impose de travailler dans sa gamme de transparence dans l'infrarouge. Les sources et les détecteurs de lumière dans ces longueurs d'onde sont chères et difficilement intégrables, et constituent un autre obstacle majeur vers le POC.

Les réseaux à GMR en Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de Triggers *et al.* répondent à ces enjeux. Malgré une faible FOM de 69 RIU<sup>-1</sup> due à sa sensibilité et son facteur de qualité moyens (respectivement 137 nm  $\cdot$  RIU<sup>-1</sup> et 420), ce dispositif a l'avantage de ne pas nécessiter d'alignement optique, et d'acquérir l'information spectrale par une caméra en silicium. Toutefois le contraste d'indice entre le nitrure et le substrat de verre est faible, ce qui limite les performances optiques ; et d'autre part, les structures ne sont pas suffisamment miniaturisées pour offrir la possibilité d'un multiplexage.

Le système à cristaux photoniques que nous proposons répond à tous les enjeux cités précédemment : sa FOM de 274 RIU<sup>-1</sup> est bonne en comparaison avec les autres capteurs diélectriques, et excellente comparée aux capteurs basés sur la SPR. Parmi les trois dispositifs du corpus excitables en incidence normale (avec les micro-réseaux plasmoniques et les réseaux à GMR), notre système possède la meilleure FOM. Par ailleurs, on peut constater que les FOMs du corpus dépendent majoritairement du facteur de qualité, tandis que la sensibilité est toujours de l'ordre de quelques centaines de nm · RIU<sup>-1</sup>. La tendance est donc généralement de maximiser le facteur de qualité pour maximiser la FOM. Or dans notre approche, le facteur de qualité répond à des impératifs technologiques, et pourrait être largement augmenté en augmentant le rapport de rayons  $R_2/R_1$  des trous des CPs, ce qui augmenterait sensiblement leur FOM.

En ce qui concerne le système de détection global, notre approche répond à tous les critères du POC : l'excitation se fait aisément en incidence normale, avec une source de fine largeur spectrale, mais il existe des solutions utilisant des sources plus larges de type LED à très bas-coût. Le signal est mesuré avec une simple caméra CMOS sans lentilles, en parallèle sur plus de mille capteurs, ce qui constitue un atout majeur pour le multiplexage. Enfin, le compromis sur la gamme de longueur d'onde dans le proche infrarouge permet d'utiliser des matériaux entièrement compatibles avec l'industrie du silicium, et donc avec une fabrication de masse à bas-coût. Ainsi, en plus des bonnes performances optiques essentielles pour la biodétection, notre système se positionne comme une voie sérieuse pour répondre aux besoins du POC.

# 3.3 Réalisation expérimentale des cristaux photoniques

Dans cette partie, nous présentons d'abord le procédé de fabrication de nos structures, puis leur caractérisation structurale par microscopie électronique à balayage. Nous nous concentrons sur des cristaux photoniques sur substrat de silicium afin d'étudier leurs propriétés optiques, que nous étudierons par micro-réflectivité.

#### 3.3.1 Fabrication

Les échantillons ont été réalisés à Grenoble par le CEA-LETI, sous la direction de Maryse Fournier, partenaire du projet CLIPO. Certains échantillons ont été fabriqués par photolithographie *deep*-UV dans le cadre du projet, afin de démontrer la compatibilité de nos puces avec la fabrication à grande échelle. Mais dans ce chapitre nous étudierons uniquement les échantillons fabriqués en lithographie électronique. Cette technique, bien que plus coûteuse, est plus facile et rapide à mettre en œuvre pour fabriquer des motifs de très petites dimensions, et garantit ainsi la bonne performance des structures photoniques.

Les étapes de la fabrication sont schématisées sur la figure 3.6. Les puces sont fabriquées à partir de plaques SOI de 200 mm de diamètre, constituées d'une couche de silicium (couche SOI) de 220 nm d'épaisseur, sur une couche de silice enterrée (*Burried OXide*, ou BOX) de 2  $\mu$ m, elle-même sur un substrat épais de silicium (figure 3.6a).



FIG. 3.6 : Étapes de fabrication des cristaux photoniques : (a) schéma d'une plaque de SOI (Silicon on Insulator); (b) amincissement de la couche SOI par oxydation thermique et gravure chimique partielle de l'oxyde. La silice ainsi formée servira de masque dur pour la gravure du silicium sous-jacent; (c) dépôt de résine et transfert des motifs par lithographie électronique (balayage d'un faisceau d'électrons); (d) développement de la résine insolée; (e) gravure sèche du masque dur et (f) gravure sèche de la couche SOI pour former le CP. La fabrication a été réalisée avec le savoir-faire des équipes de salle blanche et de filière du CEA-LETI (Grenoble).

La couche SOI est d'abord amincie à 58 nm par oxydation thermique (figure 3.6b). Ce procédé permet de contrôler précisément l'épaisseur de la couche SOI restante après oxydation. La silice ainsi formée, après réduction de son épaisseur à 80 nm par gravure chimique, servira de masque dur pour la gravure de la couche SOI.

On dépose ensuite une couche de résine électro-sensible, puis on transfère les motifs des CPs dans la résine par lithographie électronique (figure 3.6c). Après développement de la résine insolée (figure 3.6d), on grave le masque dur par gravure RIE (*Reactive Ion Etching*, gravure ionique réactive) en utilisant un mélange de gaz  $CF_4/O_2$  (figure 3.6e). On grave ensuite le silicium de la couche SOI par gravure ICP-RIE (*Inductively Coupled Plasma*, plasma à couplage inductif) avec un mélange de gaz  $CL_2/He-O_2/HBr/CF_4$  (figure 3.6f). On obtient ainsi les motifs des CPs gravés dans le silicium.



FIG. 3.7 : Imagerie par microscopie électronique à balayage (MEB) de cristaux photoniques à double période fabriqués par lithographie électronique : (a) vue de dessus, montrant l'alternance des rayons des trous  $R_1 = 99$  nm et  $R_2 = 90$  nm (période a = 300 nm) et (b) vue en coupe inclinée à 30° illustrant la verticalité des parois des trous et leur faible rugosité (image du CEA-LETI). La période du cristal est autour de 300 nm.

#### 3.3.2 Caractérisation structurale

La figure 3.7 présente l'imagerie de nos échantillons par microscopie électronique à balayage (MEB). La figure 3.7a représente une vue de dessus d'un cristal photonique à double période. Elle montre que les trous sont régulièrement espacés, et les périodes horizontale et verticale sont égales à 300 nm. On peut reconnaitre l'alternance de rangées de grands trous de rayon moyen  $R_1 = 99$  nm et de petits trous de rayon moyen  $R_2 = 90$  nm. Les dimensions ont été évaluées par analyse statistique avec le logiciel IMAGEJ. Ces valeurs sont en accord avec les paramètres de l'architecture de base présentée dans la section 3.2.2. Nous avons également varié ces dimensions pour fabriquer une gamme de cristaux photoniques de périodes allant de 288 nm à 307 nm, en respectant les mêmes rapports rayons/période. On peut constater en outre que les trous sont légèrement polygonaux, ce qui est expliqué par la forme polygonale des motifs programmés dans le masque de lithographie.

La figure 3.7b représente une image MEB d'un cristal vu en coupe inclinée à 30°. On y voit trois couches différentes, dont deux sont gravées. La couche la plus en surface est le résidu de masque dur en silice conservé après la gravure. La couche inférieure est le silicium de la couche SOI, dans laquelle est gravé le CP, et qui repose sur la silice BOX. On peut voir que les parois des trous sont bien verticales, et de faible rugosité.

Les caractérisations structurales ont montré la bonne conformité de la forme et des dimensions des trous des CPs modulo la résolution du MEB, nous pouvons donc valider la fabrication. Dans la partie suivante, nous mesurerons la sensibilité volumique de nos capteurs en comparant leurs spectres de micro-réflectivité dans différents analytes.

# 3.4 Démonstration expérimentale de la transduction optique

Dans cette partie, nous allons mesurer expérimentalement le décalage de la longueur d'onde de résonance de nos dispositifs en fonction de l'indice de réfraction du milieu homogène ambiant. Pour cela, plusieurs analytes ont été successivement utilisés pour varier les indices. Nous avons étudié des solutions d'eau déionisée avec des solvants, puis avec du glucose.

Nous allons d'abord étudier le décalage spectral de la résonance entre l'eau déionisée et l'éthanol. La figure 3.8 représente le spectre de micro-réflectivité d'un CP dans les deux solutions. Ces spectres sont caractéristiques d'une résonance de Fano fine, avec un facteur de qualité de  $Q \approx 800$ . Leur minimum de réflectivité est très proche de 0, ce qui est témoin d'un bon couplage avec le faisceau d'excitation. On peut remarquer des oscillations sur les spectres, qui sont dues aux interférences dans la lamelle de verre de la cellule fluidique (oscillations de période d'environ 1 nm) et dans la fine épaisseur de solution dans la cellule (oscillations à plus haute fréquence, peu visibles).

En comparant les figures 3.5 et 3.8, on peut voir que les résonances expérimentales sont décalées d'une cinquantaine de nanomètres par rapport à la simulation. Ce décalage peut être expliqué par les variations de dimensions expérimentales par rapport à la conception. Premièrement, l'épaisseur du silicium de la couche SOI est plus faible que prévu; ensuite, les rayons des trous proposés dans la section 3.3.2 sont mesurés avec une incertitude de 5 nm correspondant à la taille du faisceau du MEB, à laquelle s'ajoute l'incertitude due à la binarisation des images MEB par le logiciel IMAGEJ; enfin, les traitements de surface préalables aux caractérisations optiques (oxydationdésoxydation, et UV-ozone, voir section 2.3.1 du chapitre 2) ont pour conséquence une



FIG. 3.8 : Micro-réflectivité dans l'eau déionisée et dans l'éthanol, et ajustements numériques permettant d'extraire les longueurs d'onde de résonance.

	Eau déionisée	Éthanol	Différence
Longueur d'onde de résonance	$900.1\mathrm{nm}$	$906.3\mathrm{nm}$	$\Delta\lambda=6.21\mathrm{nm}$
Indice de réfraction	$1.326\mathrm{RIU}$	$1.356\mathrm{RIU}$	$\Delta n = 0.030  \mathrm{RIU}$

TAB. 3.2 : Longueurs d'onde de résonance des spectres de la figure 3.8 et indices de réfraction des solutions mesurés au réfractomètre.

légère oxydation du silicium. Toutes ces contributions ont pour effet une diminution de la longueur d'onde de résonance.

Le spectre dans l'éthanol a une forme très semblable au spectre dans l'eau, on peut ainsi aisément extraire le décalage spectral entre les deux solutions. Les longueurs d'onde de résonance de chaque spectre sont obtenues par ajustement numérique et sont consignées dans le tableau 3.2, de même que l'indice de réfraction des solutions. Les courbes du modèle d'ajustement numérique sont superposées aux spectres expérimentaux de la figure 3.8. On déduit de ces mesures une première valeur de la sensibilité volumique du CP :

$$S_{(eau \to \acute{e}thanol)} = 207 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$$

Nous avons confirmé ce résultat en effectuant des mesures similaires dans l'eau déionisée puis dans une solution de glucose à  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sur 24 autres structures : on ob-

serve un décalage spectral moyen de 2.83  $\pm$  0.04 nm avec  $\Delta n=0.013\,12\pm0.000\,08\,{\rm RIU},$  soit une sensibilité moyenne de :

 $S_{(eau \rightarrow glucose)} = 216 \pm 8 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$ 

La sensibilité volumique mesurée expérimentalement est légèrement plus élevée que les simulations numériques présentées dans la partie 3.2. Cela peut s'expliquer par la forme légèrement carrée des trous des CPs. Nous avons en effet simulé la sensibilité volumique de CPs dans le cas extrême où les trous sont carrés, et avons montré que la sensibilité était légèrement supérieure. Cette simulation est présentée dans l'annexe A. Ce résultat permet de valider les bonnes performances des échantillons fabriqués par lithographie électronique.

Nous pouvons ensuite calculer notre figure de mérite expérimentale :

$$FOM = 192 \,\mathrm{RIU}^{-1}$$

La FOM expérimentale est du même ordre de grandeur que les simulations numériques, bien qu'elle soit pénalisée par le facteur de qualité Q, légèrement plus faible que la valeur visée. Il serait cependant facile de rehausser le facteur de qualité en corrigeant les dimensions des CPs, notamment le rapport des rayons  $R_2/R_1$ . Nos structures peuvent ainsi se positionner dans l'état de l'art comme des capteurs optiques performants, qui bénéficient en plus de la facilité de fabrication et de mise en œuvre nécessaire pour répondre aux besoins et contraintes des applications POC.

On peut également calculer la limite de détection LOD de notre système, qui est la plus petite variation d'indice optique détectable, définie comme la résolution du système divisée par sa sensibilité. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la résolution expérimentale, qui tient compte de la stabilité du signal et la reproductibilité de la mesure du décalage spectral, est de  $\delta \lambda = 0.04$  nm. On en déduit alors la LOD:

$$LOD = \frac{\delta\lambda}{S} = 1.9 \times 10^{-4} \,\mathrm{RIU}$$

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-Iyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Cette valeur de LOD pourrait être améliorée : en effet, elle est limitée par la reproductibilité de la mesure de décalage spectral, due au réalignement du faisceau après changement de l'analyte dans la cellule fluidique (voir chapitre 2, section 2.4.2). En faisant évoluer notre cellule statique vers un montage dans lequel les fluides pourraient circuler, on éliminerait ce problème de reproductibilité car le faisceau reste dans le cristal photonique pendant le changement de fluide. On deviendrait alors limité par la stabilité du signal, que nous avions mesurée à  $\delta \lambda_{stabilité} = 0.01$  nm dans le chapitre 2. La nouvelle limite de détection deviendrait donc :

$$LOD_{stabilit\acute{e}} = \frac{\delta \lambda_{stabilit\acute{e}}}{S} = 4.6 \times 10^{-5} \, \text{RIU}$$

Dans ce cas, la  $LOD_{stabilit\acute{e}}$  devient limitée par le bruit lié à la température. Ajouter un module de stabilisation thermique permettrait de diminuer l'instabilité de la mesure spectrale, et donc d'améliorer encore la limite de détection.

Il faut noter que la limite de détection « volumique » peut être utilisée pour comparer les performances de différents capteurs, au même titre que la FOM. Cependant la définition de la résolution diffère selon les auteurs [99], et surtout elle caractérise la performance de notre banc optique, et donc ne dépend pas uniquement des propriétés intrinsèques du capteur, ce qui rend la comparaison difficile. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser la FOM pour positionner nos cristaux photoniques avec la littérature.

La sensibilité volumique que nous avons mesurée dans cette partie est une première évaluation des performances de nos échantillons, mais ne suffit pas pour décrire pleinement les performances en matière de biodétection. Elle permet de comparer entre eux différents capteurs à l'aide de figures de mérite numériques simples. Elle peut également être pertinente pour des applications visant la détection de cibles volumineuses, comme des cellules ou des bactéries, car ces dernières modifient l'indice à grande distance de la surface. Ce n'est pas notre cas car les trous de nos CPs sont plus petits que la plupart des bactéries, qui ne peuvent pas pénétrer dans la zone sensible. En revanche, la détection de virus, d'une taille similaire à celle des trous, pourrait être envisagée.

Nos capteurs sont conçus pour mesurer l'adsorption de molécules à leur surface : une caractérisation des performances de détection surfacique est donc nécessaire. Dans la partie suivante, nous présenterons deux expériences de détection surfacique, qui ont pour but de quantifier le décalage spectral des résonances induit par la présence de molécules à la surface des capteurs. Nous évaluerons ainsi la sensibilité de nos structures à des phénomènes d'adsorption de molécules à l'interface entre les CPs et l'analyte.

## 3.5 Application à la détection surfacique

Dans cette partie, nous présenterons les expériences de détection de biomolécules à la surface de nos cristaux photoniques, réalisées en collaboration avec Yann Chevolot et Thomas Gehin de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies du laboratoire. Ces expériences se déclinent en deux volets : dans un premier temps, nous décrirons la détection d'une couche uniforme d'une protéine, la BSA (*Bovine Serum Albumin*, albumine de sérum bovin), sur des CPs silanisés. Cette détection non spécifique n'implique pas de reconnaissance de molécules biologiques, mais constitue un test préliminaire pour mesurer la sensibilité surfacique de nos CPs. Puis dans un second temps, nous décrirons la détection spécifique d'une autre protéine, la streptavidine, capturée sur une surface fonctionnalisée avec de la biotine, qui présente une forte affinité avec la streptavidine. Ce test représente ainsi la preuve de concept de la détection par bioreconnaissance d'une molécule organique, qui est un des objectifs principaux de cette thèse.

#### 3.5.1 Détection d'une monocouche de BSA

Dans cette section, nous présenterons l'expérience de détection d'une monocouche de BSA à la surface de nos CPs. La BSA (albumine de sérum bovin) est une protéine utilisée pour divers usages en biologie et biotechnologie. En particulier, elle sert d'agent de passivation « universel », pour empêcher l'adsorption indésirable de molécules sur une surface, grâce à sa faible interaction avec les autres protéines et son fort pouvoir couvrant. La passivation des lames de verre est une de ses principales utilisations dans l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies du laboratoire.

Nous souhaitons tirer parti de cette propriété pour évaluer la sensibilité de nos cristaux photoniques. Dans une certaine gamme de concentration, la BSA forme une monocouche relativement dense. Sa masse molaire élevée ( $M_{BSA} \approx 66 \text{ kDa}$ ) en fait une molécule volumineuse, et son indice de réfraction en couche dense est estimé entre 1.4

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

et 1.5 RIU pour une épaisseur de l'ordre du nanomètre [100]. Elle devrait donc générer une variation d'indice de réfraction suffisante pour être détectée par nos capteurs.

#### Étude de l'adsorption de la BSA dans le PBS

Nous avons préparé une solution de BSA dans un tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) de concentration standard «  $1X \gg^2$ . Il s'agit d'une solution physiologique usuelle contenant différents sels, largement utilisée pour sa compatibilité avec les molécules biologiques. Toutefois, des tests préliminaires avaient montré que le PBS grave lentement la surface du silicium des CPs, à une vitesse d'environ 1 nanomètre par jour. Ces tests sont détaillés dans l'annexe B. Cette gravure du silicium a un impact sur la longueur d'onde de résonance des CPs, qui diminue progressivement lorsque les structures sont en contact avec le PBS (cela représenterait un décalage spectral non négligeable de -0.125 nm sur une expérience de 180 min). Nous avons donc décidé de protéger la surface des échantillons en y greffant une couche de molécules de silane.

Le greffage du silane sur la surface des échantillons s'appelle la silanisation. C'est la première étape de la fonctionnalisation, qui est détaillée dans l'annexe C. Nous verrons dans la section 3.5.3 l'intérêt de la silanisation dans le procédé de fonctionnalisation complet, mais dans les paragraphes qui suivent le rôle de la couche de silane est simplement de ralentir la gravure du silicium par le PBS. Nous espérons ainsi étudier la cinétique de l'adsorption de la protéine en suivant la longueur d'onde de résonance d'un CP en temps réel.

Lorsque la BSA s'adsorbe sur un CP, l'indice de réfraction à proximité de sa surface augmente, et sa longueur d'onde de résonance augmente en conséquence. On peut donc suivre le processus d'adsorption en enregistrant le spectre de micro-réflectivité du CP au cours du temps. Nous avons donc placé un échantillon dans une cellule fluidique contenant du PBS 1X seul, puis à t = 0 dans une nouvelle cellule contenant une solution de BSA à  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dans du PBS 1X, et avons enregistré le spectre de micro-réflectivité d'un CP en temps réel dans les deux solutions. Ensuite, grâce au développement d'un algorithme d'ajustement numérique automatisé, nous en avons extrait la longueur d'onde de résonance.

<sup>2.</sup> Le PBS 1X est une solution de concentration standard ([NaCl] = 137 mM, [KCl] = 2.7 mM,  $[Na_2HPO_4] = 10 \text{ mM}$ ,  $[KH_2PO_4] = 1.8 \text{ mM}$ ). Le PBS nX a une concentration n fois supérieure.



FIG. 3.9 : Réponse optique d'un CP mis en présence d'une solution de BSA de  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dans du PBS 1X : (a) suivi temporel de la longueur d'onde de résonance et (b) spectres de micro-réflectivité dans le PBS 1X (référence, en bleu) et après saturation de l'adsorption de la BSA sur la surface du cristal (à t = 172 min, en rouge). Les ajustements numériques des spectres sont également représentés (courbes plus sombres).

Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 3.9. La figure 3.9a représente l'évolution de la longueur d'onde de résonance du CP au cours du temps. La résonance est initialement de  $\lambda_i = 934.34$  nm dans le PBS (points bleus), puis augmente progressivement jusqu'à  $\lambda_{sat} = 934.60$  nm après saturation de la surface (points rouges). Le saut entre les points bleus et rouges correspond au temps nécessaire à la mise en place de la seconde cellule fluidique et à l'alignement du banc de micro-réflectivité sur le CP. Les spectres de micro-réflectivité avant mise en présence de BSA et après saturation de la surface, ainsi que les ajustements numériques correspondants, sont représentés sur la figure 3.9b.

Le suivi de la résonance de l'échantillon permet de caractériser la cinétique de l'adsorption de la BSA : un ajustement numérique de croissance exponentielle amortie<sup>3</sup> donne une constante de temps de  $\tau \approx 15$  min. La solution utilisée se situe dans une gamme de concentration permettant théoriquement d'obtenir une monocouche de BSA; en outre, le fait qu'on atteigne la saturation de la réponse du cristal conforte l'hypothèse de la formation de la monocouche. Cette information nous permet d'estimer l'épaisseur de la couche à environ  $e_{BSA} = 1$  nm à partir de la littérature [100].

<sup>3.</sup>  $\lambda(t) - \lambda_i = \Delta \lambda \times (1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$  où  $\tau$  est la constante de temps.

En effet, les autres méthodes de mesure d'épaisseur de couches minces (microscopie à force atomique, ellipsométrie, interférométrie...) sont difficiles à mettre en œuvre sur nos échantillons, du fait de la faible épaisseur de la couche de BSA et de la structuration de la surface des CPs. Nous exploiterons cette estimation d'épaisseur pour évaluer la sensibilité surfacique des CPs dans la section 3.5.2.

#### Étude de l'adsorption de la BSA dans l'eau déionisée

Dans l'expérience ci-dessus, nous avons utilisé le PBS comme milieu de mesure, ce qui a motivé notre choix de silaniser la surface de l'échantillon pour la protéger de la gravure indésirable par la solution. Par la suite, nous avons souhaité réitérer l'expérience en mettant en œuvre la BSA dans de l'eau déionisée, pour s'affranchir complètement d'un éventuel effet de gravure du PBS. Par ailleurs, nous avons conservé les autres paramètres identiques (même concentration de BSA et surface de l'échantillon silanisée). La BSA est compatible avec l'eau déionisée [101], même si elle peut adopter une différente conformation par rapport au PBS, ce qui n'est pas gênant car on ne recherche pas de bioreconnaissance spécifique de la protéine.

Dans cette nouvelle expérience, nous avons préparé une puce dans une cellule fluidique contenant de l'eau déionisée pure, et nous avons mesuré le spectre de microréflectivité de plusieurs CPs. Nous avons ensuite installé une nouvelle cellule fluidique remplie d'une solution de BSA à  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dans de l'eau déionisée, et avons à nouveau procédé aux mesures optiques. Nous avons ainsi pu mesurer le décalage spectral sur plusieurs CPs entre l'eau déionisée pure et après saturation de la BSA, et obtenir une information statistique. Dans cette analyse, le décalage spectral est déterminé de manière précise grâce à un algorithme de corrélation développé pour cette application, dont le principe est détaillé dans l'annexe D. Cet algorithme compare deux spectres de formes très similaires et décalés spectralement, et détermine le décalage spectral par une analyse de corrélation. Seuls les spectres de micro-réflectivité parfaitement superposables ont été conservés pour l'analyse statistique, à l'exemple des spectres représentés sur la figure 3.10a. Les décalages spectraux ainsi mesurés sont reportés sur la figure 3.10b, dont l'axe des abscisses représente la position des CPs sur l'échantillon (coordonnée de la ligne).

On peut observer que tous les CPs ne montrent pas la même réponse. En par-



FIG. 3.10 : Mesure du décalage spectral entre l'eau déionisée (référence) et après saturation d'une monocouche de BSA : (a) spectres illustrant la bonne superposition des mesures et (b) décalage spectral de la résonance de 21 CPs silanisés. Les points bleus de la figure (b) sont aberrants et ne sont pas pris en compte dans le calcul des valeurs statistiques.

ticulier, les trois derniers points (représentés en bleu) ont des valeurs anormalement élevées. Ces structures ont subi un fort décalage spectral, qui pourrait être dû à une contamination locale de la surface, perturbant l'adsorption de la BSA. Nous n'avons cependant pas identifié l'origine exacte de cette contamination, car cela demanderait des analyses chimiques trop avancées. Les autres points (en rouge) sont relativement homogènes : le décalage moyen mesuré est de  $\Delta_{BSA-eauDI} = 0.44$  nm avec un écarttype de 0.10 nm. L'erreur de mesure est estimée à  $\pm 0.06$  nm. Ces valeurs sont obtenues avec un algorithme de corrélation détaillé dans l'annexe D. Les faibles variations sont attribuées d'une part à une évolution locale de l'état de surface, liée à des contaminations éventuelles induites lors de la manipulation de l'échantillon ; et d'autre part à une fluctuation de la densité de BSA adsorbée, liée à une fluctuation de la densité de silane qui pourrait être due à des variations de la rugosité des parois.

Malheureusement, nous n'avons pas pu caractériser la cinétique d'adsorption dans l'eau déionisée, car notre protocole ne permet pas de mesurer des réactions plus rapides que la dizaine de minutes. En effet, nous sommes limité par le temps nécessaire à la fermeture de la seconde cellule fluidique et au réalignement optique du faisceau sur le CP d'intérêt. La saturation de la surface a été atteinte plus rapidement dans l'eau déionisée que dans le PBS, et l'évolution temporelle n'a donc pu être mesurée avec précision. On peut supposer que l'adsorption est plus rapide à cause de la différence de conformation de la molécule. Pour étudier cette cinétique, il faudrait implémenter un montage fluidique dynamique, dans lequel on pourrait remplacer l'eau déionisée par la solution de BSA sans perdre l'alignement optique sur le CP étudié.

Le décalage spectral mesuré dans l'eau déionisée est en moyenne plus élevé que dans le PBS. Cela peut être l'indication de la gravure des CPs par le PBS, qui diminue la longueur d'onde de résonance au cours du temps, et qui n'aurait pas lieu dans l'eau. De plus, la BSA n'ayant pas la même conformation dans l'eau et le PBS, l'épaisseur et la densité de la couche peuvent être différentes dans les deux expériences. Toutefois, le décalage spectral mesuré dans le PBS (figure 3.9b) est compris dans la gamme des mesures dans l'eau déionisée, la différence de réponse peut donc être un hasard statistique, qu'on pourrait confirmer par des mesures sur de nombreux CPs dans le PBS.

En conclusion, ces deux expériences ont montré que la sensibilité surfacique des CPs était suffisante pour rendre possible la détection d'un décalage spectral significatif, tout en s'assurant qu'une monocouche de BSA se forme grâce à la mesure de cinétique. Dans la section suivante, nous mettrons en perspective cette réponse expérimentale avec des simulations numériques.

## 3.5.2 Sensibilité surfacique théorique

Nous avions mesuré dans la section 3.5.1 la sensibilité volumique de nos CPs. Bien que cette grandeur soit pratique pour comparer les performances de divers dispositifs, elle décrit le comportement du CP dans différents milieux homogènes, mais ne caractérise pas l'aptitude du CP à détecter une couche de molécules sur sa surface.

On peut définir une nouvelle grandeur plus applicative, qui quantifie le décalage spectral de la résonance induit par une couche de molécules greffées à la surface du CP, d'une densité exprimée en  $pg \cdot cm^{-2}$ . Cette sensibilité « surfacique » s'exprime alors en  $nm \cdot pg^{-1} \cdot cm^2$ . Elle permet d'évaluer plus directement la performance d'un biocapteur pour détecter des molécules. Cependant, cette grandeur n'a de sens que pour une molécule donnée, et peut difficilement être comparée avec la sensibilité à d'autres molécules, car de nombreux facteurs influencent la sensibilité surfacique sous une telle définition. Parmi ces facteurs, on peut lister :



FIG. 3.11 : Schéma de la simulation d'une couche biologique (en rouge) à la surface d'un cristal photonique vu en coupe. Dans la simulation, on fait varier l'épaisseur de la couche entre 0 et 20 nm, et l'indice de réfraction entre 1.40 et 1.50 RIU.

- le poids moléculaire de la molécule, exprimé en Dalton (Da), qui influence l'épaisseur de la couche formée;
- sa conformation, qui détermine la façon dont elle s'organise pour former une couche en surface, et dont dépend la densité et l'épaisseur;
- la disponibilité des sites d'accrochages sur la surface (densité, encombrement stérique), qui est le plus souvent fonctionnalisée pour capturer spécifiquement la molécule ciblée, etc.

Pour caractériser de manière plus générale les performances de nos structures en matière de détection surfacique, nous avons simulé la réponse du cristal photonique à l'ajout d'une couche mince homogène émulant la présence d'une couche de biomolécules. Une telle simulation permet ainsi d'estimer l'amplitude du décalage spectral lorsque la surface est recouverte par des molécules.

Nous avons simulé l'ajout d'une couche homogène d'une épaisseur et d'un indice de réfraction variables. Le schéma de la structure simulée est donné sur la figure 3.11. Les indices de réfraction choisis sont de  $n_1 = 1.40$  RIU et  $n_2 = 1.50$  RIU pour couvrir la gamme d'indices des biomolécules, notamment la BSA et la streptavidine. L'épaisseur de la couche simulée est variée entre 0 et 20 nm. Le milieu ambiant est l'eau déionisée, d'indice  $n_{eau DI} = 1.33$  RIU.

Les résultats de la simulation sont présentés sur la figure 3.12. Le décalage spectral de la résonance du cristal induit par la couche de biomolécules augmente avec l'épaisseur de la couche, et cette augmentation est d'autant plus significative que le



FIG. 3.12 : Simulation de l'impact d'une couche biologique à la surface d'un cristal photonique sur sa longueur d'onde de résonance, en fonction de l'épaisseur de la couche. L'indice de réfraction de la couche est de  $n_1 = 1.40$  RIU pour la courbe rouge, et de  $n_2 = 1.50$  RIU pour la courbe noire. Le milieu ambiant est l'eau déionisée, d'indice  $n_{eau DI} = 1.33$  RIU (simulation RCWA).

contraste d'indice de réfraction avec le milieu ambiant est élevé. Le décalage spectral est linéaire dans la gamme d'épaisseurs étudiée, avec une pente de respectivement  $a_1 = 0.25 \text{ nm} \cdot \text{nm}^{-1}$  et  $a_2 = 0.56 \text{ nm} \cdot \text{nm}^{-1}$  pour les indices  $n_1$  et  $n_2$ . On peut ainsi considérer ces pentes comme un coefficient de sensibilité surfacique si l'épaisseur de la couche est suffisamment faible, ce qui est le cas de nos couches de biomolécules. Pour une biomolécule donnée, d'indice de réfraction intermédiaire entre 1.40 et 1.50 RIU, la sensibilité surfacique attendue est donc de quelques dixièmes de nanomètres de décalage spectral par nanomètre d'épaisseur de couche dense. Si l'arrangement des molécules est peu dense, on peut soit calculer l'épaisseur équivalente en couche dense (en raisonnant à volume de molécules constant), soit considérer que l'indice effectif de la couche diminue d'autant pour se rapprocher de celui du milieu ambiant.

La simulation de la figure 3.12 permet d'estimer le décalage spectral induit par une couche de BSA, d'épaisseur  $e_{BSA} \approx 1 \text{ nm}$ : sa valeur se situe entre 0.27 et 0.62 nm pour les indices  $n_1$  et  $n_2$  respectivement. Selon l'indice de réfraction de nos couches de BSA réelles, qui dépend notamment de sa densité et que nous n'avons pas pu mesurer avec précision, on peut estimer que le décalage spectral se situera dans cette gamme de valeurs. Les mesures de décalage spectral présentées dans la section 3.5.1  $(\Delta_{BSA-eau\,DI} = 0.44 \text{ nm})$  sont en accord avec ces simulations, ce qui nous permet de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

valider la sensibilité surfacique de nos cristaux photoniques.

#### Limite de détection surfacique

La limite de détection LOD d'un capteur peut s'exprimer comme la concentration minimale de molécule détectable. Or dans de nombreuses publications, on étudie la réponse du capteur exposé à la circulation d'un analyte sur la surface sensible. La circulation du fluide ayant tendance à déplacer les molécules en surface, il s'établit un équilibre entre les molécules adsorbées et arrachées. Cet équilibre dépend notamment de la molécule étudiée et de la concentration de l'analyte, ce qui justifie la définition de la LOD ci-dessus. Ce type d'expérience n'a cependant pas été effectué pendant la thèse : nos mesures sont effectuées en milieu statique. Nous pouvons néanmoins proposer une LOD sous forme de densité surfacique minimale détectable.

Nous avons vu plus haut que la sensibilité surfacique est de  $S_{surf-min} = 0.25 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{nm}^{-1}$  dans le cas le plus pessimiste. Sachant que le plus petit décalage spectral mesurable est de  $\delta\lambda < 0.04 \,\mathrm{nm}$  dans les meilleures conditions (section 2.4.2 du chapitre 2), on peut calculer l'épaisseur minimale  $\delta e$  que l'on peut détecter avec nos CPs avec l'équation 3.1 :

$$\delta e = \frac{\delta \lambda}{S_{surf-min}} = \frac{0.04 \,\mathrm{nm}}{0.25 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{nm}^{-1}} = 0.16 \,\mathrm{nm} \tag{3.1}$$

D'après les travaux de Jachimska *et al.* [100], la masse volumique de la BSA est autour de  $1.3 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . On peut alors calculer que l'épaisseur  $\delta e$  correspond à une densité surfacique de BSA de  $21 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Dans un cas plus réaliste, où la sensibilité surfacique est intermédiaire, on peut donc supposer que l'épaisseur minimale détectable correspond à une densité surfacique de BSA inférieure ou égale à  $10 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Cette valeur est à comparer avec la littérature : par exemple, Scullion *et al.* ont obtenu une LOD de  $6 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$  avec de la streptavidine, grâce à un CP à fente [76]. Notre valeur en est proche, notre capteur se positionne ainsi à l'état de l'art de la détection optique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

#### 3.5.3 Détection spécifique de streptavidine

L'objectif de cette section est de démontrer les performances de nos capteurs à CP dans une expérience de détection spécifique, c'est-à-dire une détection basée sur l'affinité particulière entre deux biomolécules. Dans cette nouvelle expérience, la surface des capteurs est fonctionnalisée avec de la biotine (molécule sonde), qui présente une forte affinité avec la streptavidine (molécule cible). Celle-ci est donc capturée spécifiquement par les surfaces fonctionnalisées avec la biotine.

La streptavidine est une molécule volumineuse, qui peut former une couche d'épaisseur entre 2.8 et 4.1 nm dans des conditions de densité de couche optimales [102]. Comme pour l'expérience de la BSA, on cherche à former une monocouche de quelques nanomètres d'épaisseur que l'on cherche à détecter. Mais en outre, cette expérience vise la détection d'une molécule cible que l'on aura sélectivement capturée grâce à son affinité avec la molécule sonde immobilisée à la surface des CPs. Il s'agira ainsi d'une première preuve de concept en vue de l'application de criblage moléculaire visée.

Le principe de la détection spécifique est schématisé sur la figure 3.13. Le test de capture de la streptavidine (test positif) est schématisé sur la première ligne : la figure 3.13a représente la surface d'un cristal photonique fonctionnalisé avec de la biotine, dont le procédé de fonctionnalisation est détaillé dans l'annexe C. Pour fonctionnaliser une surface de silice, on a recours à des silanes comportant une fonction ester activée, leur permettant de réagir grâce à la fonction silane avec les fonctions silanol de surface et grâce à la fonction ester activée avec des fonctions amine. Il est ainsi possible de greffer sur la surface de l'échantillon de manière covalente des brins d'oligonucléotides (brins d'ADN) portant une fonction amine. Ces brins d'ADN possèdent à leur autre extrémité une fonction biotine, est destinée à interagir avec la streptavidine.

La première étape est donc le greffage d'une couche de silane. On greffe ensuite les brins d'ADN (comportant une douzaine de bases nucléiques) avec la fonction biotine à leur extrémité libre. Ces brins d'ADN, dits « biotinylés », jouent un rôle d'espacement horizontal pour permettre à la biotine d'être orientée vers l'opposé de la surface, et d'espacement vertical pour limiter l'encombrement stérique et favoriser la disponibilité de la biotine. Ils permettent également d'inclure un marqueur fluorescent, que nous exploiterons par la suite. Lorsque ce CP est mis en présence de molécules de streptavidine, celles-ci sont capturées spécifiquement par la biotine (figure 3.13b). Certaines molécules



FIG. 3.13 : Schémas des tests positif et témoin de capture spécifique de streptavidine à la surface d'un cristal photonique. Test positif : (a) CP silanisé et fonctionnalisé avec des brins d'ADN biotinylé, (b) capture de la streptavidine et adsorption non spécifique sur des brins d'ADN non biotinylés, et (c) rinçage et élimination de la streptavidine adsorbée non spécifiquement; test témoin : (d) CP silanisé et fonctionnalisé avec des brins d'ADN simples, (e) adsorption non spécifique de la streptavidine, et (f) rinçage et élimination de la streptavidine adsorbée non spécifique adsorbée non spécifique de la streptavidine, et (f) rinçage et élimination de la streptavidine adsorbée non spécifiquement.

peuvent également s'adsorber de manière non spécifique à la surface, et devraient être éliminées par rinçage (figure 3.13c).

Le test négatif (témoin) que nous avons réalisé est schématisé sur la seconde ligne : la figure 3.13d représente la surface d'un CP fonctionnalisé avec des brins d'ADN simples. Quand le CP est mis en présence de molécules de streptavidine, celles-ci s'adsorbent non spécifiquement sur sa surface (figure3.13e). Des études préliminaires avaient montré que les brins d'ADN utilisés ont un effet de passivation de surface, empêchant la streptavidine de rester adsorbée non spécifiquement sur la surface. Après rinçage (figure 3.13f), la surface du CP devrait donc vierge dans le cas idéal. Selon la fonctionnalisation de surface que l'on a élaborée, on peut ainsi capturer la streptavidine de manière spécifique pour un test positif sur les CPs « biotinylés », ou garder la surface vierge pour un témoin négatif sur les CPs non biotinylés, sensibles à une éventuelle adsorption non spécifique.

#### Préparation de l'échantillon

Nous avons utilisé un appareil de projection de micro-gouttelettes (*spotting*) pour fonctionnaliser individuellement de multiples CPs d'une même puce, comme illustré sur la figure 3.14. Ce procédé est réalisé par Thomas Gehin, dans l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies du laboratoire. Après avoir silanisé la puce (figure 3.14a), on projette des gouttelettes de solution contenant soit des brins d'ADN biotinylé, soit des brins d'ADN simple à 10 µmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dans un tampon de PBS 5X (figure 3.14b). On laisse ensuite incuber pendant une nuit à température ambiante. La puce est ensuite rincée à l'eau déionisée et séchée sous flux d'azote. Puis on la place dans une solution d'ADN simple à 2.5 µmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> pendant 1 h pour saturer les surfaces qui n'ont pas réagi avec l'ADN biotinylé (entre les CPs, ainsi que sur les sites qui n'auraient pas réagi avec l'ADN biotinylé sur les CPs), comme schématisé sur la figure 3.14c. La puce est enfin rincée et séchée sous flux d'azote. On obtient ainsi un groupe de CPs fonctionnalisés avec de l'ADN biotinylé destinés à capturer la streptavidine, et un groupe de CPs fonctionnalisés avec de l'ADN simple, qui seront donc sensibles à l'adsorption non spécifique et constitueront nos témoins négatifs.

#### Caractérisation optique

Pour notre expérience de détection spécifique, nous avons réalisé les tests positif et témoin schématisés sur la figure 3.13, sur deux CPs fonctionnalisés soit avec de l'ADN biotinylé, soit avec de l'ADN simple. Dans un premier temps, nous avons immergé la puce dans un tampon de PBS 1X, additionné d'un tensioactif qui garantit le bon mouillage des trous des CPs. Nous avons mesuré les longueurs d'onde de résonance de tous les CPs dans ce tampon, qui sert de référence. Puis, sans sécher la puce, nous avons remplacé le tampon par une solution de streptavidine à 0.1 µM dans du PBS 1X, et laissé incuber pendant 30 min. Nous avons ensuite rincé la puce avec le tampon de PBS 1X additionné de tensioactif pour détacher les éventuelles molécules de strepta-

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés



FIG. 3.14 : Cartographie schématique de l'échantillon étudié, sur lequel des lignes de CPs sont fonctionnalisées soit avec de l'ADN biotinylé, soit avec de l'ADN simple par projection de micro-gouttelettes (spotting) : (a) après silanisation, (b) après spotting de solutions d'ADN biotinylé (en rouge) et d'ADN simple (en bleu) et (c) après passivation de la surface avec une solution d'ADN simple.

vidine adsorbées à sa surface, et enfin mesuré la nouvelle résonance des CPs dans ce tampon. On obtient ainsi les spectres représentés sur la figure 3.15.

La figure 3.15a représente les spectres d'un CP fonctionnalisé avec des brins d'ADN biotinylé, avant et après mise en présence de streptavidine. Les spectres ont une forme très similaire, ce qui nous permet de mesurer un décalage spectral entre les deux avec précision. Ici, on mesure un décalage spectral significatif de sa résonance d'une valeur de  $\Delta \lambda_{capture} = 0.42 \pm 0.04$  nm. La figure 3.15b représente les spectres d'un CP témoin fonctionnalisé avec des brins d'ADN simples, et le décalage spectral mesuré est de  $\Delta \lambda_{témoin} = 0.06 \pm 0.04$  nm. Ce décalage est négligeable car dans la gamme d'incertitude de mesure, et confirme l'efficacité de la passivation par les brins d'ADN simples, qui empêchent l'adsorption non spécifique de la streptavidine sur le CP.

Ces mesures ont été répétées sur 18 CPs fonctionnalisés avec de la biotine et 16 CPs fonctionnalisés avec de l'ADN simple, répartis sur deux colonnes (voir figure 3.14). Chaque colonne contient une variante de la même architecture des CPs, avec une période de 304 nm pour la première et de 307 nm pour la seconde. Nous n'avons conservé que les



FIG. 3.15 : Spectres de micro-réflectivité de CPs fonctionnalisés dans une solution tampon de PBS 1X avant (spectres en noir) et après mise en présence d'une solution de streptavidine de concentration  $0.1 \,\mu\text{M}$  dans du PBS 1X pendant  $30 \,\text{min}$  (spectres rouge et bleu) : (a) CP fonctionnalisé avec des brins d'ADN biotinylé et (b) CP fonctionnalisé avec des brins d'ADN biotinylé et (b) CP fonctionnalisé

mesures sur lesquelles les spectres avant et après la mise en présence de streptavidine sont superposables. La figure 3.16 représente le décalage spectral mesuré sur ces CPs, en fonction de leur position sur la puce (coordonnée de la ligne, voir figure 3.14). Les données représentées en rouge correspondent à des CPs fonctionnalisés avec de l'ADN biotinylé (test positif), et celles en bleu correspondent à des CPs fonctionnalisés avec de l'ADN sans biotine (témoin négatif). Nous n'avons pas noté de différence significative entre les deux colonnes étudiées. Le décalage spectral est de  $\Delta \lambda_{positif} = 0.52$  nm en moyenne pour le test positif, dans lequel la streptavidine est capturée par les sondes de biotine à la surface des CPs. Les valeurs obtenues s'échelonnent entre 0.29 et 0.72 nm avec un écart-type de 0.13 nm : ces différences sont attribuées majoritairement à l'inhomogénéité de la distribution de la streptavidine d'un CP à l'autre, comme nous le verrons plus loin.

En revanche, le décalage spectral est de  $\Delta \lambda_{t\acute{e}moin} = 0.03$  nm en moyenne pour le groupe de témoins négatifs, ce qui est négligeable dans la gamme de reproductibilité (±0.04 nm). On peut en déduire que les contributions à un décalage positif (comme une adsorption non spécifique due à un mauvais rinçage) et négatif (comme une potentielle gravure du substrat, ou un décrochage de biomolécules de la surface) sont nulles ou s'annulent. La différence entre le test positif et le témoin de  $\Delta \lambda_{positif} - \Delta \lambda_{témoin} = 0.49$  nm



FIG. 3.16 : Décalage spectral de la résonance de CPs après mise en présence d'une solution de streptavidine à 0.1 µM pendant 30 min, par rapport à un état de référence dans un tampon de PBS 1X. Les points rouges correspondent à des CPs fonctionnalisés avec de l'ADN biotinylé, et les points bleus correspondent à des CPs fonctionnalisés avec de l'ADN simple (voir figure 3.14). Le décalage spectral moyen est respectivement de 0.52 nm et 0.03 nm. Les symboles triangulaires et carrés représentent des CPs de période 304 nm et 307 nm respectivement.

serait alors due à la capture spécifique de la streptavidine. Une analyse par fluorescence permet de confirmer l'absence d'adsorption non spécifique de la streptavidine sur nos CPs, comme présenté ci-dessous.

#### Analyse par fluorescence

Afin de permettre un contrôle indépendant de la répartition des biomolécules sur nos CPs, les biomolécules que nous avons utilisées étaient marquées de groupements fluorescents. Plus spécifiquement, nous avons utilisé de la biotine marquée avec un marqueur fluorescent Cy3 rouge et de la streptavidine avec un marqueur Cy5 vert. Une analyse de l'échantillon par fluorescence permet ainsi d'imager indépendamment la présence de biotine et de streptavidine en excitant ces marqueurs fluorescents. Sur l'image obtenue, l'intensité est ainsi proportionnelle à la densité de molécules à la surface de l'échantillon.

La figure 3.17 représente la cartographie par fluorescence de la biotine (figure 3.17a) et la streptavidine (figure 3.17b) sur l'échantillon étudié. Chaque image



FIG. 3.17 : Carte de fluorescence de (a) la biotine marquée par le marqueur Cy3 et (b) la streptavidine par (marqueur Cy5) sur une zone de 8 × 6 CPs de l'échantillon étudié. Les trois premières lignes et les trois dernières sont fonctionnalisées avec de l'ADN biotinylé, et les deux lignes centrales avec de l'ADN simple (voir figure 3.14). Les échelles de couleurs sont arbitraires.

comprend une matrice de  $8 \times 6$  éléments contenant chacun un capteur, et dont les deux lignes centrales apparaissant noires. Les éléments de la figure 3.17a sont constitués d'un grand disque correspondant à la gouttelette d'ADN biotinylé déposée lors du *spotting*, d'un carré plus intense correspondant au CP, et d'un point très intense. La plus forte intensité de la fluorescence dans la zone du CP peut s'expliquer par sa structuration, offrant plus de surface et donc de sites d'accroche sur lesquels peut se greffer l'ADN biotinylé, et par un éventuel effet d'exaltation de la structure. Le point très intense correspond à une zone fortement concentrée en ADN biotinylé, qui s'est formée sous l'effet de l'évaporation de la gouttelette de solution déposée au cours du processus de fonctionnalisation, comme schématisé sur la figure 3.17c.

On peut voir en comparant les deux images que les zones riches en biotine sont également riches en streptavidine. Les CPs fonctionnalisés avec des brins d'ADN biotinylé apparaissent intenses sur la figure 3.17b, ce qui traduit le fait que la streptavidine est effectivement capturée par la biotine. En revanche, les lignes fonctionnalisées avec des brins d'ADN simple y apparaissent noires, car la streptavidine ne peut pas s'y adsorber du fait de l'effet de passivation par l'ADN. Le rapport d'intensité de la fluorescence de la streptavidine entre les CPs fonctionnalisés avec la biotine et les CPs témoins est d'environ 50, ce qui confirme la bonne passivation des CPs témoins et l'efficacité de la capture par la biotine. On peut ainsi conclure de cette analyse par fluorescence que le décalage spectral des résonances des CPs est bien induit par la capture spécifique de la streptavidine par la biotine greffée à leur surface.

On peut noter cependant que la streptavidine ne s'est pas greffée sur les points très riches en biotine à l'intérieur des CPs. Cela peut provenir d'un encombrement stérique de la biotine, qui empêche le greffage de la streptavidine. On peut également remarquer que la position de ces points varie sur les différents capteurs, allant du centre aux extrémités des structures. Cela signifie que la densité de streptavidine varie au centre des CPs, où est effectuée la mesure optique, ce qui peut expliquer l'inhomogénéité du décalage spectral mesuré sur la figure 3.16. Ce problème pourrait être corrigé en optimisant le procédé de fonctionnalisation, notamment en réduisant le temps d'incubation de l'ADN biotinylé pour limiter le séchage de la goutte (figure 3.17c).

Dans cette expérience, nous avons utilisé des CPs fonctionnalisés avec des brins d'ADN biotinylé sur une puce, pour détecter la présence de streptavidine en mesurant un décalage spectral significatif de leurs résonances. Des CPs fonctionnalisés avec des brins d'ADN non biotinylé ont constitué un témoin négatif, et prouvé que le signal mesuré est dû à la capture de la streptavidine par la biotine. Les molécules cibles ont donc été sélectivement capturées par les sondes qui leur sont spécifiques, dont le positionnement est contrôlé par la technique de projection de micro-gouttelettes. Nous avons ainsi démontré que nos CPs sont suffisamment sensibles à leur environnement proche pour détecter le greffage de biomolécules à leur surface. Nos puces photoniques sont donc bien adaptées à l'application de criblage moléculaire visée.

# 3.6 Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre les cristaux photoniques qui constituent les éléments sensibles des capteurs développés dans ce travail de thèse. À l'aide d'une architecture à double période, nous avons obtenu une sensibilité importante de  $200 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ et un haut facteur de qualité autour de 800, qui mènent à une haute figure de mérite de  $192 \text{ RIU}^{-1}$ . Ces résultats expérimentaux sont en accord avec les simulations numériques. Nos capteurs présentent donc des performances bien supérieures aux dispositifs plasmoniques conventionnels, et à l'état de l'art des autres dispositifs utilisant l'optique intégrée, tout en offrant une facilité de couplage en incidence normale. Cette caractéristique permet d'exciter les structures et collecter le signal sans les contraintes d'alignement propres aux autres capteurs intégrés tels que les guides d'onde ou les anneaux résonants, et rend notre dispositif intégrable dans un système d'illumination planaire, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Un des résultats les plus importants de cette thèse est la détection submonocouche de molécules par notre dispositif, que nous avons décrite dans ce chapitre. Nous avons en effet démontré la détection d'une monocouche de BSA en mesurant un décalage spectral de la résonance de cristaux photoniques de 0.44 nm. Ces mesures ont permis d'évaluer une limite de détection surfacique à l'état de l'art, de l'ordre de  $10 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Nous avons ensuite démontré la capture spécifique de streptavidine sur des CPs fonctionnalisés individuellement avec de la biotine, en réalisant une série de tests positifs sur des CPs fonctionnalisés avec de l'ADN biotinylé, et de tests témoins sur des CPs passivés avec de l'ADN simple. Les décalages spectraux mesurés sont respectivement de 0.52 nm et 0.03 nm. La différence entre les deux tests a ainsi montré l'absence d'adsorption non spécifique, ce qui a ensuite été confirmé par analyse de fluorescence. Ce résultat clé permet de valider le potentiel de nos capteurs pour l'analyse biomoléculaire, et d'envisager de nouvelles expériences de détection de (bio)molécules avec ces cristaux photoniques, vers des applications concrètes dans le domaine de la santé.

# Chapitre 4

# Vers les applications « *Point-of-Care* » : spectrométrie intégrée sur silicium

## Sommaire

4.1	Introduction			
4.2	Intégration de la spectrométrie sur puce			
	4.2.1	Principe du spectromètre intégré		
	4.2.2	Mise en membranes des cristaux photoniques $\dots \dots \dots$		
	4.2.3	Conception des cristaux photoniques		
4.3	3 Démonstration expérimentale du spectromètre intégré $\ldots$ 10			
	4.3.1	Caractérisations structurales		
	4.3.2	Caractérisation optique du spectromètre intégré 114		
4.4	Démonstration de l'imagerie sans lentille			
	4.4.1	Banc de caractérisation en transmission sans lentille 122		
	4.4.2	Visualisation du décalage spectral par caméra CMOS : ana-		
		lyse qualitative		
	4.4.3	Mesure du décalage spectral sur CPs uniques : analyse quan-		
		titative		

	4.4.4	4.4.4 Détermination du décalage spectral sur le spectromètre inté-	
		gré : méthodologie $\dots \dots \dots$	
4.5	Concl	usion $\ldots \ldots 132$	

# 4.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter notre système de spectrométrie par imagerie sans lentille, qui répond aux critères de l'application *Point-of-Care* (POC) que nous visons, à savoir la portabilité, le faible coût, la facilité de mise en œuvre et la possibilité de multiplexage. Après avoir détaillé le principe et la conception de notre puce de spectrométrie, nous présenterons les caractérisations spectrales des différents capteurs qui la composent, et enfin une étude préliminaire d'imagerie sans lentille vers la détection de biomolécules.

# 4.2 Intégration de la spectrométrie sur puce

Notre système repose sur la mesure de décalage spectral par imagerie sans lentille. Il est composé d'une puce en silicium intégrant un réseau de cristaux photoniques, excités en incidence normale par une source lumineuse émettant dans le proche infrarouge. Une caméra CMOS mesure l'intensité transmise par chaque cristal. Le réseau de CPs sera appelé « spectromètre intégré » dans la suite de ce chapitre.

Le système de mesure repose sur l'intégration de la fonction de spectrométrie, c'est-à-dire que la puce transforme l'information spectrale en information spatiale, comme illustré sur la figure 4.1. La source lumineuse illumine les cristaux photoniques, dont le spectre de transmission est contrôlé par ses paramètres géométriques (période, position et taille des trous). Chaque CP joue ainsi le rôle de filtre en transmission pour une longueur d'onde particulière. Une caméra mesure ensuite l'intensité transmise par chaque structure. En échantillonnant les longueurs d'onde de résonance des CPs, on peut ainsi convertir l'image obtenue par la caméra en information spectrale.



FIG. 4.1 : Illustration du principe de spectrométrie intégrée.

#### 4.2.1 Principe du spectromètre intégré

La mesure de décalage spectral se fait en deux étapes : une première mesure d'imagerie qui correspond à l'état de référence de nos CPs, par exemple lorsqu'ils sont plongés dans de l'eau déionisée; puis une seconde mesure d'imagerie correspondant à l'état final des CPs, par exemple après greffage de biomolécules à leur surface. Pour des raisons de simplification, nous allons réaliser une explication du fonctionnement avec seulement 4 capteurs, mais le système final reproduira les mêmes principes avec davantage de capteurs.

Nous allons prendre ici l'exemple de l'imagerie d'un réseau de capteurs dont les longueurs d'onde de résonance sont échelonnées entre  $\lambda_1$  et  $\lambda_4$ , comme schématisé sur la figure 4.2. L'écart de résonance entre deux CPs consécutifs est noté  $\lambda_{inc}$ . Les CPs sont illuminés en incidence normale par une source quasi-monochromatique à la longueur d'onde incidence  $\lambda_i = \lambda_3$  pour l'imagerie dans l'état de référence. Dans cette configuration, le 3<sup>e</sup> CP est donc excité à sa résonance et transmet le maximum de lumière, tandis que les autres CPs transmettent d'autant moins de lumière que leur résonance est éloignée de  $\lambda_i$ . On notera sur cette figure que le substrat de silicium a été supprimé sous les cristaux, de manière à laisser passer la lumière : nous reviendrons sur ce point par la suite.

Pour mieux comprendre l'intensité des pixels spectraux mesurée par la ca-



FIG. 4.2 : Schéma d'un réseau de CPs dont les résonances sont échelonnées entre  $\lambda_1$ et  $\lambda_4$  par pas de  $\lambda_{inc}$ , illuminés en incidence normale par une source monochromatique, et imagés par une caméra CMOS.

méra, nous avons représenté les spectres de transmission des quatre structures sur la figure 4.3a. Ces spectres présentent un profil de Lorentz. Sous excitation quasimonochromatique à  $\lambda_i$ , l'intensité transmise par chaque cristal correspond à la valeur de leur coefficient de transmission à  $\lambda_i$ . Ainsi, dans la configuration de la figure 4.3a, le 1<sup>er</sup> CP ne transmet pratiquement pas de lumière, car sa fenêtre de transmission ne recoupe pas l'émission de la source. Les 2<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> CPs transmettent un faible signal, tandis que le 3<sup>e</sup> CP transmet l'intégralité de la lumière, car sa résonance correspond exactement à l'émission de la source.

Ensuite, la caméra mesure l'intensité transmise à travers la puce : chaque CP donne lieu à une tache lumineuse qu'on appellera un « pixel spectral ». Pour notre exemple, l'intensité des pixels spectraux est reportée sur la figure 4.3b : les quatre points échantillonnent un profil de Lorentz<sup>1</sup>, et on constate que le pic d'intensité se situe en effet sur le 3<sup>e</sup> pixel spectral. Cette courbe représente donc l'intensité des pixels spectraux pour notre mesure dans l'état de référence.

<sup>1.</sup> L'allure de la courbe correspond en réalité au produit de convolution du spectre de transmission des CPs avec le spectre d'excitation de la source, qui est un profil de Lorentz si la source est parfaitement monochromatique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés



FIG. 4.3 : Principe de l'imagerie de la puce de spectrométrie dans l'état de référence : (a) spectres de transmission des CPs (les points de couleur représentent l'intensité de la transmission sous un éclairage monochromatique à  $\lambda_i$ ) et (b) intensité des pixels spectraux mesurée par la caméra.

Pour l'imagerie dans l'état final de notre expérience, on suppose que nos CPs ont tous subi un décalage spectral de  $\Delta\lambda$ , causé par exemple par le greffage de biomolécules. Leurs nouveaux spectres de transmission sont donc décalés spectralement, comme représenté sur la figure 4.4a. Dans cette nouvelle configuration, le 2<sup>e</sup> CP a maintenant sa résonance le plus proche de la source. On trace à nouveau l'intensité de chaque pixel spectral sur la courbe grise de la figure 4.3b, sur laquelle le 2<sup>e</sup> pixel spectral est maintenant le plus intense. En superposant la courbe de la référence (courbe noire), on constate que le pic d'intensité s'est déplacé vers la gauche et que l'intensité maximale a diminué, passant de 1 à environ 0.7.

La comparaison des deux courbes de la figure 4.3b permet de mesurer le décalage spectral  $\Delta\lambda$  qu'ont subi les cristaux photoniques : le déplacement du pic d'intensité d'un pixel spectral à l'autre traduit un décalage spectral de l'ordre de l'incrément de résonance  $\lambda_{inc}$  entre les CPs. Néanmoins, on peut exploiter les niveaux d'intensité des pixels spectraux pour mesurer des décalages spectraux inférieurs à l'incrément des résonances des CPs. Pour cela, on peut utiliser un ajustement numérique : d'un point de vue mathématique, ces deux courbes décrivent deux profils de Lorentz décalés l'un par rapport à l'autre selon l'axe des abscisses, et échantillonnés par quatre points chacun. En calculant numériquement le décalage entre les deux profils, il est possible d'obtenir la valeur d'un décalage spectral inférieure à l'incrément des résonances  $\lambda_{inc}$ . La précision



FIG. 4.4 : Imagerie de la puce de spectrométrie dans l'état final : (a) spectres de transmission des CPs après décalage spectral de  $\Delta\lambda$  et (b) intensité des pixels spectraux mesurée par la caméra.

de mesure de  $\Delta\lambda$ , et donc la limite de détection LOD de notre dispositif d'imagerie, est par conséquent conditionnée par la largeur spectrale des résonances des CPs : plus la résonance est fine, et plus il est facile de mesurer de faibles valeurs de décalage spectral.

#### 4.2.2 Mise en membranes des cristaux photoniques

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, nous avons choisi de travailler dans le proche infrarouge, aux alentours de 950 nm. Cela nous permet tout à la fois de fabriquer les CPs dans des plaques de SOI (*Silicon On Insulator*), et d'utiliser une caméra CMOS standard pour la détection. Cependant nous souhaitons mesurer le signal optique transmis à travers les CPs, or le substrat épais de silicium est un obstacle à la lumière infrarouge. Nous avons donc choisi de supprimer localement ce substrat, pour former des structures membranaires, comme schématisé sur la figure 4.5. Cette stratégie offre plusieurs avantages :

- permettre l'imagerie en transmission des CPs à travers une puce silicium normalement opaque (signal « blanc »);
- éliminer la transmission non désirée à travers les zones entre les CPs (fond « noir »);



FIG. 4.5 : Vue en coupe schématique des cristaux photoniques membranaires sur la puce de spectrométrie : un puits circulaire sous chaque CP permet à la lumière de traverser la puce, tandis que le substrat épais de silicium élimine la transmission à travers les zones entre les CPs.

• limiter les interférences entre CPs voisins.

Pour réaliser cette ouverture, un puits circulaire est gravé sous les cristaux par un procédé de gravure ionique réactive profonde type procédé Bosch.<sup>2</sup> Cette opération est effectuée par les équipes de salle blanche et de filière du CEA-LETI à Grenoble, de même que la fabrication des CPs, qui est identique au procédé que nous avons détaillé dans la section 3.3.1 du chapitre 3.

La formation de membranes s'accompagne d'une fragilisation mécanique, qui contraignent leur taille maximale. Par contre l'intensité de la lumière transmise augmente avec leur taille; on a donc abouti à la taille optimale des CPs de 100 µm de côté, avec des puits sous-jacents de 100 µm de diamètre. Des tests préliminaires ont montré que ces membranes résistent mécaniquement à tout le procédé de fonctionnalisation de surface. De plus, afin d'empêcher la coalescence des gouttes déposées lors de l'étape de *spotting* tout en préservant une bonne densité du réseau de CPs, l'espacement entre les structures a été choisi à 200 µm. Les gouttelettes étant projetées avec une précision de l'ordre de la dizaine de micromètres, cela laisse suffisamment de latitude pour qu'elles ne fusionnent pas.

Maintenant que nous avons déterminé la taille optimale des structures membranaires, nous allons maintenant détailler la conception des cristaux photoniques pour réaliser notre spectromètre intégré.

<sup>2.</sup> Ce procédé consiste en une gravure isotrope alternative et cyclique.
Grandeur	Valeur	Commentaire	Paramètre technologique clé	
Longueur d'onde de travail	$pprox 950\mathrm{nm}$	Compatibilité avec technologie SOI et détecteur CMOS	Dimensions des motifs (période, rayons, épaisseur)	
Incrément des résonances	$2\mathrm{nm}$	Limité par la reproductibilité technologique de la position des résonances	Décalage des petits trous $s$	
Facteur de qualité	1000	Largeur spectrale minimale pour qu'au moins un CP soit à sa résonance	Rapport des rayons $R_2/R_1$	
Gamme spectrale	920 à 970 nm	Couvre la gamme de reproductibilité des dimensions des CPs et de la source $(\pm 25 \text{ nm})$	Période des motifs $a$	
Nombre de CPs	32	Échelonnage des résonances sur la gamme spectrale	Taille de la puce	

TAB. 4.1 : Cahier des charges de la conception des cristaux photoniques composant la puce de spectrométrie.

#### 4.2.3 Conception des cristaux photoniques

Nous allons dresser le cahier des charges des cristaux photoniques composant notre puce de spectrométrie, puis nous détaillerons la stratégie mise en œuvre pour le dimensionnement des structures. Nous nous appuierons sur les structures que nous avions présentées dans la section 3.2.2 du chapitre 3, et nous les adapterons pour réaliser un réseau de capteurs constituant un spectromètre intégré. Les grandeurs clés du cahier des charges sont résumées dans le tableau 4.1, et seront détaillées dans les paragraphes suivants.

Comme nous l'avons rappelé dans la section précédente, la longueur d'onde de travail se situe dans le proche infrarouge autour de 950 nm, avec pour conséquence des contraintes technologiques fortes sur la fabrication des CPs, notamment pour l'étape de lithographie. La maitrise précise des dimensions des structures constitue ainsi un enjeu majeur dans le développement de notre système de mesure. Pour répondre à cette problématique, nous utiliserons les caractéristiques géométriques appropriées des CPs , qui permettront d'ajuster finement la position des résonances sur une large gamme

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

spectrale tout en étant compatible avec les contraintes technologiques.

L'imagerie du spectromètre intégré repose sur la maitrise des résonances des CPs, qui doivent être espacées d'un incrément constant en longueur d'onde. Nous avons choisi un incrément de 2 nm, pour pouvoir mesurer des décalages spectraux de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètre, qui pourraient correspondre à la détection de biomolécules. Le choix de cet incrément est influencé par deux facteurs : plus cet incrément est petit, meilleure est la résolution spectrale; mais d'autre part il est limité par le contrôle technologique sur la position des résonances. Or nous visons dans cette thèse un écart-type de l'ordre de 0.5 nm sur l'incrément des résonances, qui sera fonction des aléas technologiques. C'est pourquoi nous avons choisi un incrément de 2 nm, qui offre une bonne résolution spectrale tout en restant technologiquement réalisable.

La largeur à mi-hauteur des spectres de transmission des CPs doit être dans l'idéal du même ordre de grandeur que l'incrément des résonances, afin qu'au moins un pixel spectral soit allumé dans n'importe quelle configuration. D'autre part, des résonances fines améliorent la sensibilité au décalage spectral, comme nous l'avons vu dans la section 3.2.1 du chapitre précédent. On aboutit à un bon compromis avec un facteur de qualité de 1000, qui produit une largeur de résonance de l'ordre du nanomètre.

Enfin, la gamme couverte par le spectromètre intégré doit être suffisamment large pour encaisser la variabilité de deux éléments : d'une part la longueur d'onde d'émission de la source se situe dans une gamme de reproductibilité d'environ  $\pm 15$  nm ; d'autre part les dimensions des CPs sont susceptibles de subir des altérations lors de la fabrication, ce qui pourrait décaler leurs résonances de  $\pm 10$  nm. Le compromis entre la taille de la puce et la gamme de longueur d'onde couverte mène à la disposition suivante : une puce de 1 cm composée de 32 structures espacées en longueur d'onde de 2 nm avec un espacement de 200 µm entre chaque élément, couvrant la gamme 920 à 970 nm. Ces valeurs sont choisies pour la réalisation d'une preuve de concept dans le cadre de cette thèse.

#### Dimensionnement des cristaux photoniques

Afin de concevoir nos cristaux photoniques, nous allons modifier l'architecture de base présentée dans le chapitre 3, rappelée sur la figure 4.6a. Ces CPs sont constitués



FIG. 4.6 : Architecture des CPs : (a) à double période (alternance du rayon des trous,  $R_1$  et  $R_2$ ) et (b) avec introduction du déplacement des petits trous (paramètre s).

d'un réseau carré de trous ronds avec une alternance de rayons  $R_1$  et  $R_2 < R_1$ . Les paramètres de base sont : période a = 300 nm, grand rayon  $R_1 = 100$  nm et petit rayon  $R_2 = 0.9 \times R_1 = 90$  nm. Pour modifier la longueur d'onde de résonance de structures photoniques, on peut jouer sur les paramètres structuraux (période et taille des motifs) en tirant parti de la loi d'échelle, conséquence des équations de Maxwell. Celle-ci stipule que si on multiplie les dimensions des structures par un certain facteur d'échelle, la longueur d'onde de résonance sera également multipliée par le même facteur. On peut également trouver dans la littérature une méthode alternative qui consiste à accorder la résonance en changeant le facteur de remplissage, c'est-à-dire le rapport de la taille des motifs par rapport à leur période [86, 88]. La variation du facteur de remplissage peut être obtenue soit en variant les dimensions des motifs visées, soit en variant la dose d'exposition lors de l'étape de lithographie.

On rappelle qu'on souhaite utiliser la photolithographie à terme, pour son faible coût. Or la variation des résonances repose sur la maitrise technologique des dimensions des motifs, et n'est pas applicable dans notre cas car nos motifs sont à la limite de résolution de notre appareil de lithographie. La variation de dose n'est pas possible non plus en photolithographie. En outre il est difficile de conserver le facteur de qualité constant en variant les dimensions des motifs. Nous avons donc écarté cette stratégie, pour favoriser un procédé de fabrication plus reproductible et compatible avec la photolithographie *deep*-UV.

Pour lever cette limitation, nous avons adopté une stratégie originale dans laquelle on décale la position des petits trous pour des incréments fins, comme illustré sur la figure 4.6b. On fait également varier la période a pour réaliser des grands incréments de résonance en utilisant la loi d'échelle. Afin de déterminer les dimensions



FIG. 4.7: Évolution de la résonance des cristaux photoniques en fonction des paramètres structuraux : (a) décalage de la résonance en fonction du décalage s par rapport au cas s = 0 (avec la période de base a = 300 nm) et (b) résonance en fonction de la période a (avec s = 0 et en conservant les rapports rayons/période constants). Les symboles des graphes sont issus de simulations RCWA. Les courbes bleue et rouge représentent respectivement des ajustements numériques linéaire et polynomial d'ordre 2.

des CPs du spectromètre intégré, nous nous sommes appuyés sur les résultats de simulations RCWA (*Rigourous Coupled-Wave Analysis*) présentés sur la figure 4.7. Ces simulations investiguent la longueur d'onde de résonance en fonction de ces paramètres structuraux, en conservant les rapports rayons/période constants.

La figure 4.7b représente l'évolution de la résonance des CPs sur une large gamme spectrale en fonction la période, avec s = 0. La longueur d'onde de résonance augmente linéairement, avec un coefficient de  $2.56 \text{ nm} \cdot \text{nm}^{-1}$ . Nous allons donc procéder par incréments de période de 4 nm entre 288 et 307 nm, pour obtenir des incréments de résonance de 10 nm dans la gamme 920 à 970 nm.

Pour incrémenter plus finement la résonance, nous allons exploiter le décalage spectral engendré par le décalage s des petits trous, dont l'évolution est représentée sur la figure 4.7a. Cette courbe représente le décalage spectral par rapport au cas s = 0, qui augmente proportionnellement au carré de s. Par exemple, on peut obtenir un décalage spectral de 2 nm en passant d'un décalage s de 0 à 16 nm, puis à 23 nm, etc. Pour chaque période, on augmente ainsi progressivement le décalage des petits trous pour réaliser cinq incréments de 2 nm.

$\begin{array}{l} \textbf{Décalage } s \\ \textbf{(nm)} \rightarrow \end{array}$	0	16	23	28	33	37
Période 288 nm :	920	922	924	926	928	930
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
Période $292 \mathrm{nm}$ :	930 (G)	932 (H)	934 (I)	$\begin{array}{c} 936\\ (\mathrm{J}) \end{array}$	938 (K)	940 (L)
Période 296 nm :	940	942	944	946	948	950
	(M)	(N)	(O)	(P)	(Q)	(R)
Période 300 nm :	950	952	954	956	958	960
	(S)	(T)	(U)	(V)	(W)	(X)
Période 304 nm :	960	962	964	966	968	970
	(Y)	(Z)	(AA)	(BB)	(CC)	(DD)
Période 307 nm :	970 (EE)	$972 \\ (FF)$	-	-	-	-

TAB. 4.2 : Longueur d'onde de résonance des 32 CPs du spectromètre intégré en fonction de leur période et leur décalage s. Les lettres entre parenthèses sont les noms attribués aux CPs.

On aboutit alors aux dimensions répertoriées dans le tableau 4.2, et détaillées dans l'annexe E. On rappelle que les rayons sont proportionnels à la période, avec  $R_1 = a/3$  et  $R_2 = 0.3 \times a$ . Nous avons également représenté graphiquement les incréments de résonance sur la figure 4.8. Nous avons fait en sorte que la résonance du dernier CP d'une période coïncide avec celle du premier CP de la période suivante, par exemple pour les CPs F et G. Nous avons en effet souhaité contrôler la robustesse de notre conception en vérifiant qu'on retrouve la même résonance, que ce soit en changeant la période ou le décalage s.

Notre méthode d'ajustement fin de la résonance repose donc sur des leviers technologiques judicieux : il est plus facile de contrôler précisément le positionnement des trous que de contrôler leur rayon. Combiner les variations de période et de décalage des petits trous nous permet une maitrise précise des résonances sur une large gamme spectrale, avec un procédé technologiquement robuste malgré les faibles dimensions des motifs. C'est ce que nous allons contrôler dans la partie suivante grâce à des caractérisations structurales, puis optiques.

## 4.3. DÉMONSTRATION EXPÉRIMENTALE DU SPECTROMÈTRE INTÉGRÉ



FIG. 4.8 : Longueurs d'onde de résonance visées le long du spectromètre intégré.

# 4.3 Démonstration expérimentale du spectromètre intégré

Dans cette partie, nous présenterons les caractérisations structurales, puis les caractérisations spectrales des cristaux photoniques constituant le spectromètre intégré, afin de valider leur conception et leur réalisation expérimentale. Le procédé de fabrication est identique à celui décrit dans la section 3.3.1 du chapitre 3, qui utilise la lithographie électronique. Il comprend en plus l'ouverture de la face arrière sous les CPs, afin de les mettre en membrane.

#### 4.3.1 Caractérisations structurales

La mise en membrane des CPs permet à la lumière infrarouge de traverser la puce, mais apporte une fragilisation mécanique. Nous avons donc d'abord vérifié la bonne tenue des membranes au procédé de fabrication, en les observant au microscope optique. La figure 4.9 représente une zone de  $3 \times 4$  CPs carrés de  $100 \,\mu\text{m} \times 100 \,\mu\text{m}$  espacés de  $200 \,\mu\text{m}$ , en vue de dessus. On peut distinguer les puits circulaires creusés dans le substrat de silicium sous les CPs, qui débouchent sur les structures comme attendu. Toutes les membranes ont résisté aux différentes étapes de fabrication et sont intactes. On précisera ici que les CPs d'une même colonne sont identiques, tandis que



FIG. 4.9 : Imagerie au microscope optique de CPs membranaires vus de dessus.

leur longueur d'onde de résonance visée augmente de gauche à droite pour former le spectromètre intégré. Cette image nous permet de valider le dimensionnement de la taille et l'espacement CPs, qui sont robustes mécaniquement, et le succès de l'ouverture du substrat de silicium.

Nous avons ensuite observé tous les CPs d'un spectromètre intégré par microscopie électronique à balayage (MEB), afin de contrôler la qualité et les dimensions des motifs. Nous avons reporté trois images de structures représentatives sur la figure 4.10. La figure 4.10a représente un CP de période visée  $a_A = 288$  nm avec un décalage des petits trous de  $s_A = 0$ . Cette image confirme la bonne qualité des trous des CPs, qui sont bien définis et régulièrement espacés; on peut noter que les trous sont toujours légèrement polygonaux, comme nous l'avions déjà vu dans le chapitre 3.

La figure 4.10b représente une structure similaire mais agrandie d'un facteur d'échelle d'environ 104 % : la période visée est de  $a_S = 300$  nm, avec toujours avec un décalage  $s_S = 0$ . La figure 4.10c représente un CP de même période  $a_X = 300$  nm, avec cette fois un décalage visé  $s_X = 37$  nm, soit la valeur maximale que nous avons utilisée. Cette image illustre le décalage de la position des trous, qui permet un réglage fin de la résonance. On peut remarquer que même avec un paramètre s élevé, c'està-dire quand les petits trous sont au plus proche des grands trous, on n'observe pas de déformation visible liée aux effets de proximité lors de la lithographie. Enfin, la figure 4.10d représente l'image de la figure 4.10c binarisée par le logiciel IMAGEJ; nous nous servirons de ce type d'image pour mesurer les dimensions des CPs.



FIG. 4.10 : Imagerie par MEB de cristaux photoniques membranaires fabriqués par lithographie électronique : (a) CP A de période  $a_A = 288 \text{ nm}$  et décalage des petits trous  $s_A = 0$ , (b) CP S de période  $a_S = 300 \text{ nm}$  et décalage  $s_S = 0$ , (c) CP X de période  $a_X = 300 \text{ nm}$  et décalage visé  $s_X = 37 \text{ nm}$  et (d) image du CP X binarisée par le logiciel IMAGEJ. Les traits pointillés rouges matérialisent des lignes régulières espacées d'une période, et les jaunes représentent le milieu des rangées de petits trous décalés.

Nous avons mesuré les dimensions des structures à l'aide d'une analyse statistiques des images MEB par le logiciel IMAGEJ, et les avons consignées dans les tableaux 4.3. Le tableau 4.3a contient les valeurs des rayons et de périodes : pour le rendre plus lisible, nous avons seulement reporté les moyennes des dimensions de tous les CPs partageant les mêmes valeurs visées, par exemple les CPs A à F qui ont une période de 288 nm. On peut voir que les rayons mesurés sont systématiquement plus grands que prévu dans la conception d'environ 6 nm : cet agrandissement est attribué à une dose de lithographie trop importante, qui aurait surexposé les motifs. On notera un agrandissement supplémentaire des rayons des CPs S à X qui sont plus grands d'environ 8 nm par rapport aux dimensions visées. Nous pensons que ce défaut local est dû à un effet d'interférences dans la résine lors de la lithographie, car il apparait uniquement pour la période  $a_{S-X} = 300 \text{ nm}$  sur toutes les puces étudiées; il pourrait donc être facilement corrigé par conception. En revanche, les rapports de rayons  $R_2/R_1$  sont conformes aux valeurs visées. On notera que les rayons sont mesurés avec une précision minimale de 5 nm, qui correspond à la taille du faisceau du MEB, à laquelle s'ajoute l'incertitude due à la binarisation des images MEB.

Quant aux périodes mesurées, elles sont régulièrement incrémentées de 4 nm. Cependant elles sont en moyenne 0.5 % plus élevées que prévu : cela peut s'expliquer par la légère déformation mécanique des membranes, sous l'effet de la relaxation des contraintes internes dans la couche de silice (BOX) de la plaque SOI, comme schématisé

	CPs	6 .	A - F	G -	·L	M - F	R S-	X Y -	DD
-	$R_1$ visé (	(nm)	96	9'	7	99	10	0 10	1
	$R_1$ mesuré	é (nm)	103	10	4	105	10	8 10	7
-	$R_2$ visé (	(nm)	86	8'	7	89	90	) 91	 1
-	$R_2$ mesuré	ė (nm)	93	95	5	96	98	3 98	3
:	a visé(r	nm)	288	29	2	296	30	0 30	4
-	a mesuré	(nm)	289	29	4	298	30	1 30	5
				(	(a)				
	CPs	A, G	В, І	H	С, І	I	), J	Е, К	F, L
s v	isé (nm)	0	10	6	23		28	33	37
s me	suré (nm)	1	1'	7	26		31	36	40
$s \cos$	rrigé (nm)	-0.1	14	4	23		28	32	37
					(b)				

TAB. 4.3 : Dimensions des CPs du spectromètre intégré, mesurées par analyse statistique d'images MEB : (a) rayons et périodes moyens des CPs de même période, et (b) moyenne du décalage des petits trous s pour les CPs partageant le même s visé. Le s corrigé tient compte de la légère déformation des trous par les effets de proximité.

sur la figure 4.11a. L'imagerie par microscopie confocale, réalisée au CEA-LETI et présentée sur la figure 4.11b, montre que les membranes sont légèrement bombées, avec une flèche  $f = 3.3 \,\mu\text{m}$  au centre. À cet endroit les membranes s'étirent, ce qui explique les périodes plus élevées (les images MEB sont prises au centre). Cette déformation n'avait pas observée sur les CPs sur substrat dans le chapitre 3. Un autre facteur à prendre en compte est la calibration du MEB, qui peut induire une légère erreur de mesure.

Le tableau 4.3b contient les valeurs des décalages s des petits trous que nous avons mesurés. Là encore, nous avons moyenné les valeurs de s de tous les CPs partageant les mêmes valeurs visées. Par exemple, les CPs A, G, M, S, Y, et EE doivent avoir un décalage nul. On peut constater que les valeurs mesurées suivent bien l'évolution parabolique visée dans la conception ; cependant elles sont toutes supérieures aux valeurs visées d'environ 9%. Pour expliquer cet agrandissement, nous avons étudié la forme



FIG. 4.11 : Déformation des membranes : (a) coupe schématique d'un CP, illustrant la relaxation des contraintes de compression internes du BOX et (b) imagerie au microscope confocal réalisée par le CEA-LETI, montrant la topologie d'une membrane, avec une flèche  $f = 3.3 \,\mu\text{m}$ .

des trous sur les images MEB par analyse statistique. Il apparait que les trous sont légèrement allongés dans la direction verticale, comme schématisé sur la figure 4.12, et ce d'autant plus que le décalage s est élevé. Cet allongement, difficilement visible à l'œil nu sur les images, est attribué aux effets de proximité lors de la lithographie. En effet, l'allongement des trous déplace leur barycentre d'une distance de  $s_1 = (\alpha - 1) \times R_1$ et  $s_2 = (\beta - 1) \times R_2$  respectivement pour les grands et les petits trous, avec  $\alpha$  et  $\beta$  leurs rapports d'aspect.

Il est possible de quantifier cet allongement grâce à notre analyse d'images MEB pour corriger les valeurs de *s* mesurées, en leur enlevant les contributions des effets de proximité. Les valeurs corrigées sont consignées dans la dernière ligne du tableau 4.3b, et correspondent bien aux valeurs visées. Cette observation permettra d'ajuster la conception des trous pour la fabrication de nouveaux lots d'échantillons, en aplatissant légèrement les trous pour compenser les effets de proximité.

Les caractérisations structurales que nous venons de présenter montrent que les échantillons sont conformes à la conception. Nous avons mis en lumière de faibles variations de dimensions par rapport aux valeurs visées : les rayons des trous sont légèrement plus grands, tandis que les décalages des petits trous sont légèrement plus élevés. Nous allons étudier l'impact de ces variations dans les caractérisations spectrales de la section suivante.



FIG. 4.12 : Illustration du décalage s apparent des petits trous : l'élongation des trous ajoute un décalage additionnel au décalage visé.  $\alpha$  et  $\beta$  sont respectivement les rapports d'aspect des grands et des petits trous.

#### 4.3.2 Caractérisation optique du spectromètre intégré

À la suite des caractérisations structurales, nous avons effectué des caractérisations spectrales des capteurs composant le spectromètre intégré afin de contrôler leurs propriétés optiques, en vue de leur utilisation en imagerie. La figure 4.13 représente l'évolution de la résonance des CPs membranaires de périodes visées entre 288 nm et  $307 \,\mathrm{nm}$ , pour les dispositifs avec un décalage des petits trous visé s = 0 (CPs A, G, M, etc.). La figure 4.13a représente les spectres de micro-réflectivité des CPs, tandis que la figure 4.13b représente la longueur d'onde de résonance obtenue par ajustement numérique, en fonction de la période expérimentale. Les résonances sont régulièrement incrémentées entre 882.9 nm et 936.5 nm et augmentent linéairement avec la période, comme le montre l'ajustement numérique linéaire (courbe bleue), conformément à la simulation. L'incrément de résonance moyen est de 10.7 nm entre CPs consécutifs, pour 10 nm visés. Les facteurs de qualité des résonances sont en moyenne de  $Q \approx 1000$ , avec un écart-type de 14%, ce qui est conforme aux valeurs attendues. On notera que le CPS ne suit pas la tendance linéaire et n'a pas été inclus dans l'ajustement numérique de la figure 4.13b : en effet, les caractérisations structurales de la section précédente ont montré que ses trous sont anormalement plus grands (voir tableau 4.3a), ce qui a pour conséquence un abaissement de sa résonance par rapport aux autres CPs.

Nous avons ensuite représenté les données similaires pour des CPs de même période, avec différentes valeurs de s, sur la figure 4.14. La figure 4.14a représente



FIG. 4.13 : Évolution de la longueur d'onde de résonance dans l'eau déionisée en fonction de la période, avec décalage des petits trous s = 0 : (a) spectres de micro-réflectivité et (b) longueurs d'onde de résonance obtenues par ajustement numérique.

les spectres de micro-réflectivité dans l'eau déionisée des CPs M à R, tandis que la figure 4.14b représente les longueurs d'onde de résonance en fonction du décalage des petits trous s mesuré. Là encore, les résonances sont régulièrement incrémentées entre 905.9 nm et 916.5 nm, ce qui correspond à un incrément moyen entre deux CPs consécutifs de 2.1 nm, pour 2 nm visés. On constate que les incréments sont moins réguliers; nous quantifierons plus loin la régularité des incréments sur toute la gamme du spectromètre intégré. On retrouve cependant l'augmentation parabolique de la résonance avec le décalage s sur l'ajustement numérique de la figure 4.14b, ce qui est conforme aux simulations.

On peut remarquer que certains spectres de la figure 4.14a présentent des résonances doubles, comme le spectre du CP P : nous avons attribué ce phénomène aux imperfections géométriques des trous (forme et rugosité), ce qui a ensuite été confirmé par une simulation FDTD. Cela montre que le dédoublement de la résonance est un problème mineur qui peut être résolu en optimisant le procédé de fabrication.



FIG. 4.14 : Évolution de la longueur d'onde de résonance en fonction du décalage des petits trous s, pour la période a = 296 nm : (a) spectres de micro-réflectivité et (b) longueurs d'onde de résonance obtenues par ajustement numérique.

#### Impact de la mise en membrane sur les propriétés optiques

Nous avons décrit précédemment la déformation des CPs due à leur mise en membrane. Cette déformation a des conséquences sur leurs propriétés optiques. D'une part, pour les caractérisations en micro-réflectivité avec un faisceau focalisé, la membrane se comporte comme un miroir convexe qui change légèrement l'angle d'ouverture du faisceau, comme illustré sur la figure 4.15a. Elle peut également dévier le faisceau de son axe si celui-ci n'est pas parfaitement centré sur la membrane. Cela rend plus difficile l'injection de la lumière réfléchie par les CPs dans la fibre optique de l'analyseur de spectre, et surtout cela réduit la quantité de lumière reçue, et donc diminue le rapport signal/bruit.

D'autre part, pour les futures caractérisations en imagerie où la puce sera illuminée en incidence normale par une source étendue, la déformation des membranes pose un problème de couplage des CPs. En effet, comme le centre des membranes se trouve plus haut que les bords, l'onde plane incidente atteint d'abord le centre puis progressivement les bords avec un retard de phase, comme illustré sur la figure 4.15b. Cela implique que l'onde n'est pas reçue en phase sur toute la surface du CP, ce qui pourrait gêner le couplage de la lumière. Ce phénomène ne s'est cependant pas révélé



FIG. 4.15 : Impact de la déformation des membranes sur la caractérisation optique : (a) élargissement et déviation du faisceau en micro-réflectivité et (b) déphasage entre le centre et le bord en excitation en onde plane (OSA : analyseur de spectre).

problématique pour les premiers tests en imagerie présentés plus loin dans ce manuscrit. Il pourrait être résolu soit en corrigeant la déformation des membranes, soit en adaptant la conception des CPs pour optimiser le couplage.

#### Échelonnage des résonances du spectromètre intégré

Les longueurs d'onde de résonance expérimentales de tous les CPs du spectromètre intégré sont reportées sur la figure 4.16. On peut constater que les résonances du spectromètre intégré augmentent linéairement sur une gamme allant de 882.9 nm à 938.8 nm. La pente moyenne des résonances, calculée par ajustement numérique linéaire (en excluant les CPs S à X), est de 1.8 nm par CP, soit 9 % plus élevée que la pente attendue de 1.68 nm. Ce faible écart est dû à des incréments de périodes légèrement trop élevés : en effet l'incrément moyen induit par le changement de période est de 10.8 nm pour 10 nm visés, ce qui pourrait être la conséquence de la discrétisation des motifs de la lithographie, qui sont définis au nanomètre près. L'écart pourrait être compensé en diminuant les différentes valeurs du décalage des petits trous.

En revanche, l'incrément moyen des résonances au sein d'une période est de 2.1 nm, ce qui est conforme à la valeur visée de 2 nm. Pour calculer cette moyenne, nous n'avons pris en compte que les CPs consécutifs d'une même période, et n'avons pas compté les incréments entre le dernier CP d'une période et le début de la suivante



FIG. 4.16 : Longueurs d'onde de résonance visées et mesurées expérimentalement sur les CPs d'un spectromètre intégré. Les symboles en étoile représentent l'extrapolation des résonances à partir des dimensions des CPs.

(par exemple l'incrément entre les CPs F et G n'est pas compté). La valeur expérimentale est légèrement plus élevée que la valeur visée du fait des décalages des petits trous légèrement trop grands, ce que nous avons étudié dans la section précédente (voir tableau 4.3b).

D'autre part, l'écart-type de ces incréments est supérieur à 0.8 nm. Cependant la répartition des incréments est irrégulière, car les résonances des CPs A à F sont moins marquées et donc sujettes à des fluctuations plus importantes. Cela est dû à un rapport signal/bruit plus faible dans la gamme spectrale correspondant aux spectres des premiers CPs, qui rend l'ajustement numérique utilisé pour déterminer les résonances moins précis. Ainsi, si l'on exclut les CPs A à F, l'écart-type de l'incrément est réduit à environ 0.6 nm. Cela signifie que nous avons un contrôle technologique de l'incrémentation des résonances à moins d'un nanomètre près sur une large gamme spectrale de près de 60 nm, ce qui constitue un résultat important de la thèse.

On peut observer sur la figure 4.16 que les résonances expérimentales du spectromètre intégré subissent un décalage constant vers le bleu d'environ -35 nm par rapport aux valeurs visées. Pour expliquer ce décalage, nous devons revenir aux mesures des dimensions des structures de la section précédente. Nous avons vu que les rayons des trous sont plus grands que les valeurs visées d'environ 6 nm, et de 2 nm supplémentaires pour les CPs S à X. Nous avons pu quantifier l'impact des variations de dimensions sur les résonances à l'aide de lois de variations issues de simulations RCWA, similaires à celles de la figure 4.7. Ces lois sont données dans l'annexe E, ainsi que le détail du calcul des extrapolations. Nous avons superposé les résultats de ces extrapolations aux mesures optiques sur la figure 4.16 (symboles en étoile). On peut y voir que les extrapolations sont proches des mesures optiques, ce qui indique que l'agrandissement des trous serait la cause principale du décalage de -35 nm observé. Ces extrapolations ont ensuite été confirmées par une nouvelle simulation RCWA de la réflectivité d'une structure, dont les motifs sont importés à partir d'une image MEB. La source du décalage de -35 nm semble donc être la taille des trous, et une simple correction de la conception des structures ou de la dose de lithographie permettrait de rehausser les résonances aux valeurs visées.

#### Homogénéité et reproductibilité des résonances

Maintenant que nous avons confirmé expérimentalement l'incrémentation des résonances du spectromètre intégré, nous allons étudier l'homogénéité du décalage spectral induit par un changement d'indice de réfraction, également important pour l'utilisation de notre puce en imagerie. La figure 4.17a représente les spectres de microréflectivité du CP X dans l'eau déionisée et dans l'éthanol, qui présentent une variation d'indice de  $\Delta n = 0.030$  RIU. Le décalage spectral entre les deux spectres est mesuré par l'algorithme de corrélation (voir annexe D) et vaut 5.5 nm pour ce CP, ce qui correspond à une sensibilité d'environ  $S_X = 183 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$ . Nous avons procédé de la même manière pour le reste du spectromètre intégré, et nous avons consigné leur sensibilité sur la figure 4.17b. La sensibilité est en moyenne de 186.6 nm  $\cdot$  RIU<sup>-1</sup>, ce qui est légèrement plus faible que les valeurs présentées dans le chapitre 3, mais toutefois conforme aux simulations numériques de la section 3.2.2. En outre, l'écart-type des décalages spectraux mesurés est de  $0.3 \,\mathrm{nm}$ , soit 6% de la valeur moyenne de  $5.6 \,\mathrm{nm}$ . Cet écart-type est d'un ordre de grandeur supérieur à l'incertitude due à la stabilité et la reproductibilité de la mesure de décalage spectral, il est donc attribué à la reproductibilité des propriétés optiques des CPs. Cette étude montre la bonne homogénéité du décalage spectral, et par conséquent de la sensibilité des CPs (écart-type inférieur à 6%), et constitue un



FIG. 4.17: Étude de l'homogénéité de la longueur d'onde de résonance et du décalage spectral entre l'eau déionisée et l'éthanol sur un spectromètre intégré : (a) exemple des spectres de réflectivité du CP X dans l'eau déionisée et l'éthanol, et (b) sensibilité des CPs.

résultat important pour le fonctionnement du spectromètre intégré en imagerie.

Nous avons également étudié la reproductibilité de la position de la résonance, et de la sensibilité à l'échelle de la puce, qui sont indispensables pour la fonction de multiplexage que nous visons. En effet, pour pouvoir opérer la détection de plusieurs molécules en parallèle sur plusieurs spectromètres intégrés, il est nécessaire que les CPs possèdent des propriétés optiques identiques. Dans ce but, nous avons caractérisé 32 cristaux photoniques identiques réalisés sur la même puce, et avons reporté les résultats sur la figure 4.18. La longueur d'onde de résonance des structures dans l'eau déionisée est en moyenne de 936.8 nm, avec un écart-type de 0.5 nm. La position de la résonance est donc très homogène sur toute la puce, et les faibles variations sont attribuées aux fluctuations de la fabrication et à la reproductibilité de la mesure optique, ce qui est cohérent avec les fluctuations des incréments le long du spectromètre intégré. Nous avons ensuite mesuré le décalage spectral sur 16 de ces CPs entre l'eau déionisée et l'éthanol : la valeur moyenne est de 5.8 nm avec un écart-type de 0.1 nm. Cela correspond à une sensibilité de  $192 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{RIU}^{-1}$  avec un écart-type inférieur à 2 %. La réponse des CPs à l'indice de réfraction est donc très homogène à l'échelle de la puce, ce qui est indispensable pour le multiplexage.

Nous avons présenté les caractérisations spectrales des cristaux photoniques fa-



FIG. 4.18 : Position des résonances de la colonne EE dans l'eau déionisée et sensibilité entre l'eau et l'éthanol.

briqués par lithographie électronique, ayant permis de valider la conception de notre puce à spectromètre intégré. L'incrémentation simultanée de la période des structures et du déplacement des petits trous *s* permet un échelonnage des résonances sur une large gamme supérieure à 50 nm. Nous avons également démontré la bonne reproductibilité de la position des résonances des CPs, ainsi que de leur sensibilité. Le décalage systématique des résonances vers le bleu est corrélé aux caractérisations structurales par MEB, et peut être facilement corrigé en adaptant le masque de lithographie. Nous pouvons donc mettre en œuvre notre puce photonique dans un dispositif d'imagerie sans lentille, dans le but de mesurer un décalage spectral avec une caméra CMOS.

#### 4.4 Démonstration de l'imagerie sans lentille

Dans cette partie, après avoir présenté le dispositif d'imagerie sans lentille que nous avons utilisé pour caractériser nos échantillons, nous présenterons une étude préliminaire d'imagerie qui constitue une première approche de la mesure de décalage spectral avec notre puce de spectrométrie intégrée.



FIG. 4.19 : Schéma de principe du dispositif d'imagerie sans lentille, composé d'une source monochromatique étendue, deux polariseurs croisés de part et d'autre de la puce photonique, et une caméra CMOS.

#### 4.4.1 Banc de caractérisation en transmission sans lentille

Le banc de caractérisation utilisé est schématisé sur la figure 4.19. Il a été développé au CEA-LETI par Mathieu Dupoy. Il est composé d'une source monochromatique émettant un faisceau étendu, qui traverse un polariseur puis illumine en incidence normale la totalité de la surface de la puce photonique, placée sur un porte-échantillon amovible. Le faisceau transmis à travers la puce passe ensuite à travers un analyseur de polarisation perpendiculaire à celle du polariseur, et est enfin imagé par la caméra CMOS. Les polariseurs croisés permettent de filtrer le signal de fond, et transmettre uniquement le faisceau rayonné par les CPs : le principe du filtrage par polariseurs croisés est détaillé dans l'annexe F.

Une photographie du dispositif est donnée sur la figure 4.20. La source utilisée est une diode laser QLD-920-50S de QPHOTONICS, émettant autour de 912 nm à température ambiante, avec une largeur spectrale inférieure à 2 nm. La caméra est une daA1600-60um de marque BASLER, qui possède une efficacité quantique > 5% dans la gamme d'intérêt. La puce est placée au plus près de la caméra, à une distance d'environ 3 mm limitée par l'épaisseur de la cellule fluidique. On notera que comme nous travaillons en transmission, l'utilisation de puces à CPs membranaires transparents est nécessaire. La taille du dispositif est d'environ 10 cm de haut pour  $5 \times 5$  cm de base.



FIG. 4.20 : Photographie du dispositif d'imagerie sans lentille.

#### 4.4.2 Visualisation du décalage spectral par caméra CMOS : analyse qualitative

Cette section porte sur la validation expérimentale du banc d'imagerie sans lentille schématisé sur la figure 4.19. Pour cette validation, nous avons effectué plusieurs mesures en imagerie en faisant varier l'indice de réfraction. Pour cela nous avons utilisé des solutions de glucose de concentrations croissantes de 0 à  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , et avons imagé la puce pour chaque concentration. Entre chaque expérience, la cellule est remplie avec de l'eau déionisée pour s'assurer que l'échantillon revient dans les conditions initiales avant d'utiliser la solution suivante. Nous espérons ainsi voir expérimentalement le décalage spectral induit à l'aide de la caméra.

Les images de la puce dans les différentes solutions (de 0 à  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) sont reportées sur la figure 4.21. On peut voir sur chaque image une matrice de taches relativement circulaires : ce sont les pixels spectraux, que nous avons délimités par des lignes blanches, et qui sont associés aux CPs de la puce. Chacune des 16 lignes visibles sur l'image représente une portion d'un spectromètre intégré (entre les colonnes G et CC), et chaque colonne est composée de CPs de conception identique. Les colonnes présentent logiquement une intensité quasi-homogène, car les CPs baignent dans la même solution. C'est pourquoi nous parlerons de colonne par la suite, pour désigner tous les CPs de la puce supportant une résonance identique.



FIG. 4.21 : Imagerie de la puce dans des solutions de glucose de différentes concentrations dans l'eau déionisée : (a) eau pure, (b)  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , (c)  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  et (d)  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Les lignes blanches délimitent les pixels spectraux correspondant aux CPs de la puce.

Sur chaque image, la colonne la plus intense contient les structures dont la résonance est la plus proche de la longueur d'onde d'émission de la source. C'est le cas par exemple de la colonne X dans l'eau déionisée (figure 4.21a). Par suite, plus la résonance des CPs est éloignée de la longueur d'onde d'émission de la source, plus l'intensité des pixels spectraux correspondants est faible.

Par ailleurs, au fur et à mesure que la concentration en glucose augmente, les résonances de tous les CPs se décalent vers les hautes longueurs d'onde. Par conséquent l'intensité des pixels spectraux de la colonne X diminue progressivement de la première à la dernière image. En revanche, les résonances des colonnes plus à gauche se rapprochent de la longueur d'onde d'excitation : la colonne W devient ainsi la plus intense sur la figure 4.21d. Cela confirme qualitativement le bon fonctionnement de notre dispositif.

On peut enfin remarquer que les pixels spectraux sont légèrement plus grands

que les mailles de la grille qui les délimitent, ce qui signifie que les pixels spectraux sont perturbés par leurs voisins. Cela correspond à de la diaphotie (*crosstalk*) entre les CPs. En effet, la puce est éloignée d'environ 3 mm de la caméra, or des expériences préliminaires ont montré qu'à cette distance, le faisceau lumineux issu de chaque CP s'élargit et devient plus grand que la période entre les CPs, ce qui cause la diaphotie. Ce problème pourra être corrigé en optimisant l'épaisseur de la cellule fluidique.

Pour visualiser de manière plus rigoureuse l'évolution de l'intensité des pixels spectraux avec l'indice de réfraction, nous avons représenté sur la figure 4.22 la répartition de l'intensité des pixels spectraux d'une ligne choisie arbitrairement, pour les différentes solutions de glucose. Pour obtenir ce graphe, nous avons normalisé l'intensité des pixels spectraux de chaque image en éliminant le signal de fond, et en compensant numériquement la diaphotie entre CPs voisins. Plusieurs observations qualitatives peuvent être notées, en écho avec les remarques des paragraphes précédents :

- 1. la colonne la plus intense est la colonne X dans l'eau déionisée;
- 2. au fur et à mesure que la concentration en glucose augmente, le pic d'intensité se déplace vers la gauche, et son intensité maximale diminue;
- 3. de plus, un autre pic apparait, centré sur la colonne R;
- 4. pour toutes les concentrations, alors que le pic d'intensité est étalé sur son côté gauche, il existe un fort contraste entre les colonnes X et Y, cette dernière étant presque complètement éteinte alors que la colonne X est très intense.

Ces mesures peuvent être expliquées par les mesures spectrales présentées sur la figure 4.23 : elle rappelle l'évolution de la résonance le long du spectromètre intégré dans l'eau déionisée (courbe bleue), similairement à la figure 4.16. Nous y avons en plus superposé le spectre d'excitation de la source lumineuse, ce qui permet de visualiser le recouvrement de la gamme d'excitation avec la gamme de transmission des CPs. Sur cette figure, on voit que le CP dont la résonance est la plus proche du spectre d'excitation est bien le CP X dans l'eau déionisée, ce qui explique que le pic d'intensité des pixels spectraux soit sur la colonne X.

De plus, quand la concentration en glucose augmente, l'indice de réfraction ambiant augmente également, et avec lui les longueurs d'onde de résonance des capteurs.



FIG. 4.22 : Évolution de l'intensité des pixels spectraux de la ligne 2 pour chaque solution de glucose.



FIG. 4.23 : Évolution des longueurs d'onde de résonance mesurées dans l'eau déionisée le long d'une ligne de la puce étudiée (courbe bleue), et extrapolation des résonances dans les différentes solutions de glucose.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

Concentration en glucose $(\mathbf{g} \cdot \mathbf{L}^{-1})$	0	50	100	200
Indice de réfraction (RIU)	1.3258	1.3312	1.3368	1.3483
Décalage spectral théorique (nm)	0.0	1.1	2.1	4.2

TAB. 4.4 : Indice de réfraction des solutions utilisées, et décalage spectral théorique pour une sensibilité de  $186.6 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ .

Nous avons consigné les indices de réfraction des solutions utilisées dans le tableau 4.4, ainsi que les décalages spectraux attendus. Avec ces données, nous avons tracé l'extrapolation de la résonance des CPs dans les différentes solutions de glucose sur la figure 4.23 (courbes en pointillés). Ainsi, plus l'indice de réfraction augmente, plus les résonances augmentent, et tous les CPs à gauche de la colonne Y se rapprochent de la gamme d'excitation. Cela explique le déplacement vers la gauche du pic d'intensité sur la figure 4.22. En particulier, la résonance de la colonne R constitue un décrochement et est anormalement élevée, ce qui explique le pic d'intensité des pixels spectraux correspondants. Enfin, le contraste entre les colonnes X et Y est la conséquence de l'écart élevé entre les résonances de ces CPs. Alors que la résonance de la colonne X est proche de la longueur d'onde d'excitation, celle de la colonne Y est éloignée, celle-ci ne transmet donc pas de lumière. Nous avons ainsi pu interpréter qualitativement les résultats de l'imagerie.

## 4.4.3 Mesure du décalage spectral sur CPs uniques : analyse quantitative

Après ces observations qualitatives, nous pouvons mener une analyse quantitative de l'évolution de l'intensité d'un seul pixel spectral, afin de déterminer le décalage spectral. Nous avons représenté l'intensité théorique du pixel spectral en fonction du décalage spectral sur la figure 4.24 (en gris). Cette courbe, que nous appellerons « courbe de calibration », correspond au produit de convolution du spectre d'excitation de la source avec le spectre de transmission des CPs.<sup>3</sup> Grâce à cette courbe, nous pouvons retrouver l'évolution du décalage spectral à partir des mesures de l'intensité du pixel spectral.

<sup>3.</sup> La courbe grise de la figure 4.24 a été calculée à partir du spectre de la source mesuré expérimentalement.

#### 4.4. DÉMONSTRATION DE L'IMAGERIE SANS LENTILLE



FIG. 4.24 : Méthode de mesure du décalage spectral à partir des variations d'intensité d'un CP unique (exemple du CP 2X).

Parmi les différentes colonnes d'intensité non nulle, une colonne en particulier semble la plus indiquée pour cette analyse : la colonne X. En effet, c'est la seule colonne dont l'intensité décrit un pic, tandis que celle des autres colonnes est soit toujours croissante, soit toujours décroissante (voir figure 4.22). Cela indique que le pic d'intensité a été atteint entre deux solutions de glucose, ce qui nous donne une estimation de l'intensité maximale atteignable par les pixels spectraux, et donc permet de normaliser l'intensité expérimentale par rapport à la courbe de calibration. Dans la suite de notre calcul, nous pourrons considérer que l'intensité maximale est atteinte dans la solution de glucose à  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nous avons placé les valeurs d'intensité du pixel spectral 2X sur la courbe de calibration de la figure 4.24, et avons déduit l'écart spectral correspondant. Il suffit ensuite de comparer entre elles les valeurs obtenues pour en déduire le décalage spectral entre les différentes solutions. Nous avons ensuite répété la même opération pour quinze autres CPs de la colonne X, et avons tracé le résultat de ces interpolations sur la figure 4.25.

On peut constater que le décalage spectral mesuré est linéaire, et reproductible d'un CP à l'autre, ce qui montre que le comportement des CPs est bien homogène. La pente moyenne des points de la figure 4.25, correspondant théoriquement à la sensibilité des CPs, est d'environ  $50 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ , contre  $200 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$  attendus. Cet écart est important, mais ce calcul repose sur un certain nombre d'approximations qui peuvent causer une erreur de mesure significative : premièrement, nous avons supposé que le



FIG. 4.25 : Mesure du décalage spectral subi par les CPs de la colonne X par rapport à l'eau déconisée, en utilisant la technique décrite sur la figure 4.24.

maximum d'intensité des pixels spectraux était atteint pour la concentration de glucose à  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , ce qui n'est probablement pas le cas dans la réalité. De plus, la diaphotie entre les CPs est source d'erreur, même si nous avons tenté de la compenser numériquement.

Enfin, la température n'était pas contrôlée dans cette expérience, ce qui engendre une grande incertitude sur le décalage spectral mesuré : d'une part, le spectre d'excitation émis par la source se décale spectralement de  $0.3 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{^oC^{-1}}$  sous l'effet de fluctuations thermiques, il est donc susceptible de varier de plusieurs nanomètres en l'absence de contrôle de la température. D'autre part, l'indice de réfraction de l'eau déionisée diminue de  $-10^{-4} \,\mathrm{RIU} \cdot \mathrm{^oC^{-1}}$  quand la température augmente [103]. Ces deux composantes s'ajoutent pour sous-estimer le décalage spectral si la température augmente, ce qui a probablement été le cas puisque le dispositif d'imagerie subit l'échauffement de la source et celui de l'électronique de la caméra. Par exemple, une variation de 5 °C engendrerait un décalage supplémentaire de  $-1.5 \,\mathrm{nm}$  dû à la variation du spectre d'excitation, et de  $-0.1 \,\mathrm{nm}$  dû à la variation d'indice de la solution. La combinaison de toutes ces sources d'erreur permettrait ainsi d'expliquer le trop faible décalage spectral mesuré dans cette première expérience d'imagerie.

Nous pouvons néanmoins estimer la limite de détection LOD de notre système,

sous l'hypothèse que l'erreur de mesure est uniquement due à la variation de température. Cela revient à considérer qu'on mesure un décalage spectral plus faible qu'attendu, mais avec la sensibilité des CPs déterminée plus haut par les mesures spectrales, soit 186.6 nm  $\cdot$  RIU<sup>-1</sup>. Sous cette hypothèse, la *LOD* est le décalage spectral minimum mesuré expérimentalement, soit la valeur de 0.2 nm entre l'eau déionisée et la solution de glucose à 50 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. Nous pouvons donc bien mesurer un décalage spectral plus faible que l'incrément des résonances de 2 nm, grâce à l'analyse des niveaux d'intensité des pixels spectraux.

La LOD correspond ainsi à une variation minimale d'indice de réfraction de  $\delta n_{min} = 1.1 \times 10^{-3}$  RIU, soit une valeur seulement 5 fois supérieure à celle obtenue en micro-réflectivité dans le chapitre 3. Cette limite de détection est comparable à l'état de l'art des capteurs par imagerie ( $4 \times 10^{-3}$  RIU pour Cetin *et al.* [37] et  $2.37 \times 10^{-4}$  RIU pour Triggs *et al.* [88]). Elle est suffisante pour détecter des biomolécules d'après l'étude réalisée dans le chapitre précédent, avec une densité minimale détectable d'environ 50 ng · cm<sup>-2</sup>.

# 4.4.4 Détermination du décalage spectral sur le spectromètre intégré : méthodologie

Nous avons présenté une méthode d'analyse sur un seul CP, qui constitue un « pixel » élémentaire de notre spectromètre intégré. Cette approche pourra être étendue à l'analyse de l'ensemble des CPs du spectromètre intégré. En effet, il est possible de mesurer le décalage spectral entre deux images en traçant l'intensité des pixels spectraux en fonction de la répartition de leurs résonances. Nous avons donc représenté sur la figure 4.26 de tels graphiques, avec les données théoriques sur la figure 4.26a et les données expérimentales sur la figure 4.26b<sup>4</sup>. Or on peut montrer que cette intensité suit également la courbe de calibration, en fonction de la longueur d'onde de résonance des CPs, et que cette courbe se déplace avec le décalage spectral.

Nous avons représenté la courbe de calibration dans l'eau déionisée (courbe continue bleue) et dans la solution de glucose à  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (courbe marron). On pourrait facilement mesurer le décalage spectral subi par les CPs entre ces deux courbes par

<sup>4.</sup> L'origine de l'axe des abscisses est arbitraire, seule l'échelle est importante. Nous avons choisi de représenter l'incrément des résonances des CPs par rapport au premier CP.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés



FIG. 4.26 : Représentation de l'intensité des pixels spectraux en fonction de l'incrément de la résonance des CPs par rapport au premier CP : (a) données théoriques et (b) données expérimentales pour la ligne 2.

ajustement numérique, qui est ici de 4.5 nm. Or ce décalage spectral est difficilement mesurable avec les seuls points correspondant aux pixels spectraux (symboles), car ils sont trop peu nombreux pour échantillonner correctement la courbe de calibration de chaque solution, ce qui rendrait l'ajustement numérique imprécis. Cela est encore plus évident sur les données expérimentales de la figure 4.26b : dans notre expérience, il est pratiquement impossible d'associer la courbe de calibration aux courbes d'intensité expérimentales. Les raisons principales en sont : les points de données sont trop peu nombreux, la position des résonances est soumise à une incertitude (environ 0.6 nm, voir section 4.3.2), et enfin la diaphotie perturbe les données.

Deux solutions pourraient permettre d'améliorer la mesure du décalage spectral sur une ligne complète selon cette technique : premièrement, échantillonner la courbe de calibration avec plus de points, c'est-à-dire avoir plus de CPs dont la résonance est proche de celle de la source. Cela permettrait de mieux décrire la courbe de calibration, et donc d'améliorer la sensibilité de la mesure du décalage spectral. Secondement, mesurer l'intensité des CPs en temps réel en variant continument l'indice de réfraction de l'analyte, pour pouvoir suivre l'évolution temporelle de chaque CP. La première solution pourrait être implémentée en diminuant l'incrément des résonances du spectromètre intégré, tandis que la seconde nécessite une cellule fluidique dynamique permettant la circulation des fluides. En optimisant le dispositif de détection, ces deux solutions pourraient être mises en œuvre et permettraient une lecture du décalage spectral précise.

En conclusion de cette partie, nous avons démontré la mesure d'un décalage spectral de l'ordre du dixième de nanomètre avec un simple dispositif d'imagerie sans lentille. Ce travail sera suivi de futures expérimentations dans des conditions mieux contrôlées, qui permettront d'augmenter la résolution, la robustesse et la reproductibilité du dispositif de mesure. Notamment, la diminution de l'incrément de la résonance entre CPs consécutifs, *via* l'optimisation de la conception du spectromètre intégré, permettrait d'augmenter la résolution; d'autre part, dans le système d'imagerie lui-même, la circulation de fluides dans la cellule fluidique permettrait une mesure en temps réel, plus robuste. De plus, la distance entre la puce et la caméra peut être diminuée, afin de diminuer fortement la diaphotie entre les CPs. Enfin, le contrôle de la température est primordial, afin de garantir que les conditions expérimentales sont constantes tout au long de l'expérience, et reproductibles d'une expérience à l'autre. Mais malgré toutes les limitations que nous avons évoquées, cette expérience préliminaire a démontré le potentiel de notre dispositif d'imagerie pour mesurer de faibles variations d'indice de réfraction.

#### 4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons d'abord présenté notre stratégie de mesure d'un décalage spectral avec un dispositif d'imagerie sans lentille. Ce dispositif repose sur l'illumination en incidence normale d'une puce de spectrométrie intégrée, comportant un réseau de capteurs à cristaux photoniques dont les longueurs d'onde de résonance sont échelonnées sur une large gamme spectrale dans le proche infrarouge. Nous avons détaillé la conception des structures, qui permet un contrôle technologique précis et robuste des incréments de résonances.

Nous avons ensuite validé expérimentalement la conception des capteurs par des caractérisations structurales et spectrales. Celles-ci ont confirmé l'incrémentation régulière des résonances de 2 nm avec un écart-type de 0.5 nm, sur une gamme de plus de 50 nm. Une étude sur des structures identiques a également validé la bonne reproductibilité du décalage spectral en réponse à un changement d'indice de réfraction, avec un écart-type de 1.4%.

Nous avons enfin mis en œuvre une puce de spectrométrie intégrée dans un dispositif d'imagerie sans lentille. Ces mesures ont démontré l'obtention d'une information spectrale à partir d'images prises par une caméra CMOS dans des solutions de glucose de différentes concentrations. Elles ont permis d'extraire un décalage spectral des résonances des capteurs de 0.2 nm, avec une limite de détection LOD à l'état de l'art, d'une valeur de  $1.1 \times 10^{-3}$  RIU, soit une densité de biomolécules à la surface du capteur d'environ  $50 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Néanmoins, en considérant toutes les pistes d'optimisation que nous avons identifiées, cette LOD pourrait être largement optimisée afin de détecter des variations d'indice de réfraction plus faibles de l'ordre de  $10^{-4}$  RIU, et par conséquent des quantités plus faibles de biomolécules. Ces études préliminaires ont ainsi validé le principe du dispositif de détection qui fait l'objet de ce chapitre, et appellent un travail d'optimisation vers une application dans la détection de biomolécules.

## Conclusion générale et perspectives

#### Conclusion

Dans cette thèse, nous avons réalisé un dispositif de biodétection par voie optique, compatible à la fois avec une application de criblage biomoléculaire et une utilisation en *Point-Of-Care.* Ce système, qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet, intègre une puce de capteurs à cristaux photoniques dans un dispositif compact d'imagerie sans lentille. Les capteurs à cristaux photoniques sont basés sur un *design* à double période, ce qui permet d'une part une excitation en incidence normale par un faisceau étendu, et d'autre part des performances optiques appropriées à la biodétection. Ces performances optiques sont obtenues grâce à la localisation du champ électromagnétique au voisinage de l'interface avec le milieu environnant. Nous nous sommes intéressés aux deux principaux défis liés à ce système : la démonstration des performances des capteurs pour la détection de couches biomoléculaires, et la mise en œuvre de ces capteurs au sein d'une plateforme optique sans lentille avec une lecture directe en intensité, par un imageur CMOS.

Nous avons montré que nos capteurs présentent une bonne sensibilité volumique de  $200 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$  dans différentes solutions de glucose, et un haut facteur de qualité d'environ 800, en accord avec les simulations numériques. Ces valeurs donnent une figure de mérite expérimentale de 192  $\text{RIU}^{-1}$ , supérieure à l'état de l'art des dispositifs optiques intégrés. Ensuite, nous avons démontré expérimentalement la détection d'une monocouche de BSA adsorbée à la surface des CPs. Nous en avons déduit la limite de détection surfacique de nos capteurs, qui est de 10 ng  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>, ce qui est comparable à l'état de l'art. Nous sommes allés plus loin en fonctionnalisant nos capteurs avec des sondes de biotine, et avons démontré la capture spécifique et la détection d'une monocouche de streptavidine grâce à des mesures spectrales couplées à un contrôle par

fluorescence. Cette démonstration constitue un des résultats phare de la thèse.

Par la suite, nous avons souhaiter mettre en œuvre ces capteurs au sein d'une plateforme de détection sans lentille, avec lecture directe sur un imageur CMOS. Nous avons donc proposé l'intégration de la fonction de spectrométrie sur la puce, par le biais d'un échelonnage fin et contrôlé des longueurs d'onde de résonance des capteurs. Cet échelonnage est obtenu en variant la période et le décalage d'une rangée de trous sur deux, ce qui permet de balayer une grande gamme spectrale de 60 nm tout en réalisant des incréments de résonance très fins de 2 nm. Les résultats expérimentaux de caractérisation structurale et optique ont mis en évidence une très bonne reproductibilité et une bonne homogénéité des dispositifs, ce qui valide la conception du spectromètre intégré.

Nous avons ensuite effectué des mesures au sein d'un module d'imagerie sans lentille, dont l'encombrement d'environ  $10 \times 5 \times 5$  cm est compatible avec les critères du *Point-of-Care*. Le principe de fonctionnement du système a été validé en utilisant différentes solutions de glucose. Après une analyse de la variation d'intensité de capteurs individuels mesurée par imagerie, nous avons présenté les éléments de méthode pour mesurer le décalage spectral avec le spectromètre intégré. Lors d'une première démonstration, nous avons obtenu une première évaluation de la limite de détection de  $1.1 \times 10^{-3}$  RIU, ce qui correspondrait à une densité de biomolécules d'environ  $50 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Nous avons montré que l'optimisation du dispositif permettrait de descendre la limite de détection autour de  $1 \times 10^{-4}$  RIU. Cette valeur est à l'état de l'art des dispositifs similaires. Cette démonstration de l'imagerie sans lentille constitue ainsi l'aboutissement de ce travail de thèse.

#### Perspectives

Les perspectives directes de ce travail se situent principalement dans le domaine des capteurs photoniques et de l'imagerie sans lentille. Sur le plan technologique, la conception de cristaux photoniques proposée dans cette thèse est compatible avec une fabrication par photolithographie *deep-UV*. Cette technique de photolithographie permet d'envisager la fabrication de masse de dispositifs à cristaux photoniques. Cela ouvre des perspectives dans de nombreux domaines où le coût de production est un enjeu.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

#### CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Un champ important qui n'a pas été abordé dans cette thèse est l'intégration d'un circuit microfluidique sur la puce photonique. Cette fonctionnalité permettra d'effectuer des mesures dynamiques de première importance pour la biodétection, ainsi que d'améliorer la limite de détection. Mais elle sera surtout indispensable à terme, car elle aura pour rôle d'acheminer les fluides biologiques depuis le lieu de collecte vers les éléments sensibles de la puce. L'implémentation d'un circuit microfluidique constituera ainsi une étape importante vers une application concrète de nos dispositifs.

Une des perspectives importantes de cette thèse est le criblage moléculaire. Les puces ont été conçues pour ce criblage, *via* la fabrication de nombreux spectromètres intégrés sur une faible surface. Nous avons fait un premier pas en démontrant la détection spécifique d'une protéine, la streptavidine. Il reste alors à étendre cette étude à la détection simultanée de plusieurs marqueurs biologiques dans des milieux complexes, qui se rapprochent des conditions d'analyse réelles. De telles démonstrations pourront trouver un intérêt bien au-delà d'une utilisation en *Point-of-Care*, et pourraient toucher des domaines allant de l'analyse environnementale à la recherche pharmaceutique.

À la suite de la démonstration de l'imagerie sans lentille, un travail d'ingénierie est nécessaire pour réaliser un outil robuste et versatile. Ce travail couvre des enjeux concrets comme le contrôle de la température, mais peut s'étendre jusqu'à des fonctionnalités telles que l'apprentissage automatique (*machine learning*) pour l'analyse des données. La prochaine étape sera la réalisation d'un prototype opérationnel, qui sera transférable industriellement.

## Annexe A

# Simulation de la sensibilité en fonction de la forme des trous

Comme on peut le constater sur les images MEB de la figure A.1, la forme des trous de nos cristaux photoniques est polygonale, en raison de la forme polygonale des motifs programmés dans le masque de lithographie utilisé lors de la fabrication des échantillons. Pour étudier l'impact de la forme des trous sur la sensibilité volumique, nous avons réalisé une simulation comparative d'un CP à double période de période a = 300 nm avec des trous carrés de côté  $c = 2 \cdot a/3$  et des trous circulaires de diamètre c.

Les résultats de cette simulation sont représentés sur la figure A.2 : elle représente l'évolution de la longueur d'onde de résonance d'un CP en fonction de l'indice de réfraction ambiant, dans le cas où les trous sont ronds (courbe rouge) et carrés (courbe noire). La sensibilité autour de l'indice de réfraction de l'eau (n = 1.33 RIU) est de  $S_{\circ} = 200 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$  pour les trous ronds, et de  $S_{\Box} = 219 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$  pour les trous carrés, soit une valeur supérieure de 10 %. Pour nos CPs, la forme des trous réelle étant entre ces deux cas extrêmes, nous pouvons estimer que la sensibilité sera une valeur intermédiaire.

On peut noter que l'écart constant entre les deux courbes d'environ 50 nm s'explique par la différence du taux de remplissage du milieu ambiant dans le cristal (15.8% pour des trous ronds, 20.1% pour des trous carrés) : plus cette fraction est élevée, plus la longueur d'onde de résonance est faible.



FIG. A.1 : Imagerie par microscopie électronique à balayage (MEB) vu de dessus d'un cristal photonique à double période fabriqués par lithographie électronique (rayons des trous  $R_1 = 99$  nm et  $R_2 = 90$  nm (période a = 300 nm).



FIG. A.2 : Simulation comparée de la longueur d'onde de résonance d'un CP à double période de période a = 300 nm avec des trous carrés de côté c = 2a/3 et circulaires de diamètre c, en fonction de l'indice de réfraction du milieu ambiant (TR : taux de remplissage du milieu ambiant).

### Annexe B

## Gravure des cristaux photoniques par le PBS

Dans cette annexe, nous allons mettre en évidence la lente gravure de nos cristaux photoniques par la solution de PBS (tampon phosphate salin) utilisée pour mettre en solution les biomolécules. Cet effet a d'abord été observé expérimentalement en mesurant en temps réel le spectre de micro-réflectivité d'un CP<sup>1</sup> dans une solution de PBS pendant 90 min. Ces spectres sont représentés sur la figure B.1, ainsi que l'évolution de la longueur d'onde de résonance du CP au cours du temps, mesurée par un algorithme d'ajustement numérique avec un modèle de Fano (courbe noire sur la figure B.1b).

On peut constater sur cette figure que la longueur d'onde de résonance diminue au cours du temps, avec une vitesse d'environ  $-0.19 \,\mathrm{nm} \cdot \mathrm{h}^{-1}$ . Sur cette expérience de 90 min, on observe donc une diminution d'environ 0.3 nm. Nous avons également mesuré le décalage spectral des spectres au cours du temps par rapport au premier spectre mesuré, à l'aide de l'algorithme de corrélation présenté dans l'annexe D, et cette mesure apporte des résultats similaires.

Deux facteurs peuvent expliquer cette diminution de la longueur d'onde de résonance : soit l'indice de réfraction de la solution diminue, soit les dimensions du CP évoluent. Malheureusement, nous n'avons pas mesuré l'indice de réfraction de la solution avant et après les mesures optiques, nous ne pouvons pas exclure une évolution

<sup>1.</sup> Nettoyé selon la procédure décrite dans la section 2.3.1.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés


FIG. B.1 : Dérive de la longueur d'onde résonance d'un CP dans le PBS due à la gravure de la structure : (a) spectres de micro-réflectivité et (b) suivi de la longueur d'onde de résonance au cours du temps, mesurée par ajustement numérique avec un modèle de Fano (courbe noire), et décalage spectral de la résonance par rapport au premier spectre, mesuré par l'algorithme de corrélation détaillé dans l'annexe D (courbe rouge).

de celui-ci. Cependant, nous avons pu comparer des images MEB (Microscopie Électronique à Balayage) de CPs avant et après exposition à la solution de PBS, présentées sur la figure B.2.

La figure B.2a représente un CP avant exposition, et la figure B.2b après 18 jours d'exposition au PBS. On peut observer que le rayons des trous a considérablement augmenté. Une analyse statistique sur une quarantaine de trous de chaque variété montre une augmentation de 99 nm à 115 nm pour les petits trous, et de 109 nm à 126 nm pour les grands trous, soit une augmentation d'environ 15 %. D'autre part, la période du cristal reste inchangée. Le CP a donc été gravé, c'est-à-dire que l'oxyde natif et le silicium sous-jacent ont été dissous dans la solution. Le mécanisme de gravure envisagé est une dissolution de la silice par les ions contenus dans le PBS, puis une oxydation du silicium mis à nu par l'eau, formant ainsi une nouvelle couche de silice, qui à son tour se dissout.

Pour estimer l'impact de ces changements de dimensions sur la longueur d'onde de résonance, nous avons utilisé une extrapolation basée sur les simulations de la longueur d'onde de résonance en fonction des paramètres structuraux (rayons des trous



FIG. B.2 : Images MEB comparatives d'un échantillon avant et après exposition à une solution de PBS 1X, illustrant la corrosion sous l'effet des ions contenus dans la solution : (a) avant exposition au PBS 1X et (b) après exposition au PBS 1X pendant 18 jours.

et période), qui avaient été utilisées pour déterminer le *design* des CPs lors de leur conception (voir annexe E).

En première approximation, on peut estimer que la variation de longueur d'onde de résonance devrait être d'environ -35 nm sous l'effet de l'agrandissement des trous. On devrait donc observer une diminution d'environ 0.12 nm sur une expérience de 90 min. Cette valeur extrapolée est certes plus faible que la valeur expérimentale de 0.3 nm, mais nous n'avons pas d'information sur la linéarité de la gravure au cours du temps. Comme la solution de PBS n'est pas renouvelée, la gravure de la silice peut être plus rapide au début de l'exposition au PBS (au moment de la mesure optique) et diminuer avec le temps, en raison de l'accumulation des produits de réaction qui ralentissent celle-ci. On peut donc conclure que la surface des CPs a été gravée au cours de l'expérience, et cette gravure est la cause principale de la diminution de la longueur d'onde de résonance.

Le comportement de la silice dans le PBS a été étudié dans les travaux de John A. Rogers *et al* [104–106]. Ces publications étudient le comportement de la silice thermique comme barrière de protection pour des dispositifs de type « électronique biodégradable » (en anglais : *transient electronics*) implantables dans le corps humain, et qui ont la propriété de se dissoudre en un temps contrôlé dans un milieu aqueux. Dans la référence [105], les auteurs montrent que la silice thermique se dissout effectivement dans le PBS, à une vitesse de l'ordre de  $10^{-2}$  nm · jour<sup>-1</sup> à 22 °C dans le PBS 1X. Cette vitesse est deux ordres de grandeur en dessous de la vitesse de gravure que nous avons déterminée expérimentalement (environ 1 nm · jour<sup>-1</sup>). Cependant, notre étude porte sur de la silice sous forme d'oxyde natif moins dense que la silice thermique, sur



FIG. B.3 : Spectres de micro-réflectivité d'un CP avant (courbe noire) et après exposition à l'eau déionisée pendant 17 jours (courbe rouge).

des surfaces ayant subi la gravure des trous. On peut donc supposer que la vitesse de dissolution de notre silice est plus élevée.

### Contrôle dans l'eau déionisée

Pour aller plus loin, afin de confirmer que la gravure observée est bien causée par le PBS, nous avons également comparé la longueur d'onde de résonance d'un CP similaire avant et après exposition à de l'eau déionisée pendant 17 jours. Les spectres de micro-réflectivité de ce CP sont représentés sur la figure B.3. On peut voir que la résonance est identique sur les deux spectres. D'autre part, nous avons contrôlé que l'indice de réfraction de l'eau déionisée n'avait pas évolué entre les deux mesures, ce qui assure qu'aucun effet de gravure n'aurait été compensé par une variation d'indice. On peut conclure de ces deux arguments que les dimensions des CPs n'ont pas évolué, et que l'eau déionisée n'a pas d'effet de gravure sur l'échantillon. Le PBS semble donc responsable de la gravure mise en évidence sur la figure B.2.

On peut conclure de cette étude que le PBS a une influence sur la longueur d'onde de résonance des CPs qui y sont exposés à cause d'un effet de gravure qui modifie leurs dimensions. Sur des temps d'expositions assez courts, cette gravure a une influence négligeable sur la mesure optique. Cependant, si le décalage spectral dû à la gravure du CP est du même ordre de grandeur que le décalage spectral que l'on souhaite originalement mesurer, cet effet de gravure peut être problématique. Une des solutions possibles pour éviter ce problème est d'utiliser de l'eau déionisée à la place du PBS quand c'est possible, ou de protéger la surface, par exemple avec une couche de silane (voir annexe E).

## Annexe C

# Fonctionnalisation de surface

Dans cette annexe, nous décrirons le procédé de fonctionnalisation des cristaux photoniques. L'objectif de ce procédé est de fonctionnaliser la surface des structures avec de l'ADN biotinylé, pour permettre la capture spécifique de molécules de streptavidine. La fonctionnalisation de la surface est effectuée selon un protocole issu d'un procédé standard applicable aux substrats de verre et de silicium (plein ou poreux) avec oxyde natif, développé dans l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies du laboratoire [107]. Ce procédé se base sur la chimie des silanes, qui sont particulièrement adaptés à la fonctionnalisation de la silice. On leur greffe des brins d'ADN présentant une molécule de biotine à leur extrémité, qui constitue la molécule « sonde » destinée à la capture de la streptavidine, qui est la molécule « cible ». Ce couple est très utilisé dans la littérature, car il présente plusieurs avantages pour une preuve de concept de biodétection :

- l'affinité entre ces deux molécules est forte : leur interaction est une des plus fortes interactions non-covalentes connues (constante de dissociation de la réaction B - S  $\xrightarrow{dissociation}$  B + S :  $K_d \approx 1 \times 10^{-15} \,\mathrm{mol} \cdot \mathrm{L}^{-1}$ ), le complexe biotinestreptavidine est donc stable et difficile à briser;
- la streptavidine a un fort poids moléculaire ( $M_{streptavidine} = 52.8 \text{ kDa}$ ), elle est donc volumineuse et induit une forte variation locale de l'indice de réfraction, ce qui maximise le signal mesurable par notre capteur.

La figure C.1 schématise les étapes successives de la fonctionnalisation, qui seront détaillées dans la suite de cette annexe. Les échantillons sont d'abord nettoyés puis oxydés



FIG. C.1 : Procédé de fonctionnalisation des cristaux photoniques : (a) nettoyage, (b) silanisation, (c) acidolyse, (d) activation et (e) greffage de l'ADN biotinylé.

par traitement UV-ozone, afin de préparer la surface (a). Ils sont ensuite silanisés en phase gazeuse selon un procédé développé dans le laboratoire [107] (b). Le silane ainsi greffé à la surface est ensuite déprotégé par acidolyse (c), puis activé par réaction avec du N-hydroxysuccinimide (NHS) pour former l'ester de NHS (d). Enfin, des microgouttelettes d'une solution contenant des brins d'ADN modifiés avec un groupe amine et porteurs de la biotine sont projetées individuellement sur chaque CP de l'échantillon. Le groupe amine réagit avec l'ester de NHS (e), ce qui permet aux brins d'ADN de se greffer au silane. Les CPs sont ainsi fonctionnalisés individuellement avec de la biotine.

### C.1 Silanisation

Le procédé commence avec un nettoyage de la surface : l'échantillon est oxydé dans une étuve à 300 °C pendant 45 min puis désoxydé dans une solution de BOE à 12.5 % diluée 20 fois dans l'éthanol pour éliminer les impuretés en surface. La surface est ensuite oxydée dans un ozoneur sous flux d'oxygène pendant 30 min pour rendre la surface riche en liaisons Si–OH (fonctions silanol), sur lesquels se grefferont les chaines de silane. Enfin, l'échantillon est déshydraté dans une étuve sous vide à 140 °C pendant 2h, avant d'être silanisé.

Ensuite, la première étape de la fonctionnalisation consiste en la formation d'une couche dense d'un silane, le *tert*-butyl-11-(dimethylamino)silylundecanoate, ou TD-



FIG. C.2 : Molécule de tert-butyl-11-(dimethylamino)silylundecanoate monofonctionnel (TDSUM) utilisée pour greffer les molécules sondes à la surface des échantillons.

SUM, à la surface des puces. Cette molécule, schématisée sur la figure C.2, est un silane monofonctionnel : à une extrémité de la chaine carbonée, un groupement silyle permet à la molécule de réagir avec une liaison Si-OH disponible à la surface de l'échantillon, tandis que l'autre extrémité est protégée par un groupe *tert*-butyle.

Il existe deux méthodes pour greffer la couche de silane : la méthode d'imprégnation en phase liquide, où l'échantillon est plongé dans un bain de pentane contenant le TDSUM, et la méthode en phase gazeuse que nous utiliserons. Bien que la méthode d'imprégnation en phase liquide produise une couche de silane généralement plus dense, la méthode de silanisation en phase gazeuse produit des résultats plus reproductibles, et est plus compatible avec l'industrialisation. Elle consiste en la vaporisation de TDSUM liquide dans une étuve à  $8 \times 10^{-2}$  mbar à 140 °C pendant environ 15 h. Le silane se condense sur l'échantillon et réagit avec les liaisons Si–OH disponibles. L'échantillon est ensuite rincé au tétrahydrofurane puis au dichlorométhane. La surface est alors recouverte de molécules de silane, dont l'extrémité libre est toujours protégée.

### C.2 Greffage de l'ADN biotinylé

Nous allons maintenant décrire l'étape de greffage des molécules sondes sur un échantillon silanisé, constituant la deuxième étape de la fonctionnalisation. Elle consiste à modifier l'extrémité libre de la molécule de silane, protégée un groupe *tert*-butyle, en remplaçant celui-ci par la molécule d'intérêt. Une fois que la couche de silane est formée, son extrémité libre doit être déprotégée pour la rendre disponible à la réaction de greffage d'un brin d'ADN. On procède à une acidolyse de l'ester carboxylique par un bain d'acide formique glacial pendant 7 h à température ambiante. Le groupement de protection *tert*-butyle est éliminé, et la fonction acide carboxylique en bout de chaine du silane est désormais active. On effectue ensuite une estérification du groupe carboxyle dans une solution de N-hydroxysuccinimide (NHS) et N-N'-diisopropylcarbodiimide, pour obtenir un ester de NHS pouvant réagir avec un groupe amine. Puis on rince l'échantillon au tétrahydrofurane puis au dichlorométhane.

On projette ensuite des micro-gouttelettes d'une solution contenant des brins d'ADN biotinylés individuellement sur chaque CP, comme schématisé sur la figure C.3. Cette technique, également appelée « *spotting* », est couramment utilisée pour réaliser des biopuces (*microarrays*). De cette manière, l'ADN biotinylé est greffé uniquement sur les cristaux, et l'espace entre les cristaux est laissé vierge.

Nous avons utilisé une solution de PBS 5X contenant  $2 \mu mol \cdot L^{-1}$  d'ADN biotinylé, à laquelle on a ajouté  $1.5 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  de bétaïne pour ralentir l'évaporation de la gouttelette et prolonger le temps de réaction. Le volume projeté sur chaque cristal est d'environ 2 nl. Le groupement amine des brins d'ADN biotinylé réagit avec l'ester de NHS présent à la surface de l'échantillon. Une incubation d'environ 2 h à température ambiante sous 60 % d'humidité relative permet le greffage des brins d'ADN biotinylé. Après rinçage au PBS additionné d'un tensioactif facilitant le décrochage des molécules adsorbées à la surface de la puce, puis à l'eau déionisée, on obtient des cristaux photoniques fonctionnalisés avec la biotine, utilisables dans une expérience de bio-reconnaissance de la streptavidine.



FIG. C.3 : Schéma de la fonctionnalisation individuelle des CPs par projection de micro-gouttelettes d'une solution contenant des brins d'ADN biotinylé à la surface d'un échantillon silanisé.

# Annexe D

# Méthodes de mesure de décalage spectral

Un des défi expérimentaux de la thèse a été la mesure précise du décalage spectral des résonances de cristaux photoniques, en comparant deux spectres de microréflectivité mesurés dans différentes conditions expérimentales. Les décalages attendus dans cette thèse sont typiquement de l'ordre du dixième de nanomètre pour la détection de biomolécules (voir section 3.5 du chapitre 3). Cette valeur représente environ 10 % de la largeur spectrale des résonances, ce qui est faible et rend difficile la mesure précise du décalage spectral. Cela signifie que nous avons besoin de méthodes de mesure de décalage spectral les plus précises possibles pour limiter les incertitudes. Dans cette annexe, nous allons présenter succinctement une première méthode de mesure basée sur des ajustements numériques, puis une seconde méthode basée sur un algorithme de corrélation.

### D.1 Méthode par ajustement numérique

Une première méthode pour obtenir la valeur du décalage spectral est d'effectuer des ajustements numériques successivement sur les deux spectres, avec un modèle basé sur l'équation de résonance de Fano, rappelée ci-dessous (équation D.1) :

$$R_{Fano}(\delta) = R_0 \cdot \frac{(q+\delta)^2 + P}{1+\delta^2} \quad avec \quad \delta = 2 \cdot \frac{\omega - \omega_0}{\Gamma}$$
(D.1)

Avec  $R_0$  et P des constantes,  $\omega$  la pulsation (Hz) et  $\omega_0$  la pulsation de résonance, q le paramètre d'asymétrie de Fano,  $\Gamma$  la largeur de résonance (Hz). Ce modèle est affiné pour prendre en compte les oscillations observables sur nos spectres de microréflectivité<sup>1</sup>. Après ajustement numérique sur les données expérimentales, on peut déduire de ce modèle la longueur d'onde de résonance  $\lambda_0$  et le facteur de qualité Q pour chacun des spectres :

$$\lambda_0 = \frac{2\pi \cdot c}{\omega_0} \quad \text{et} \quad Q = \frac{\omega_0}{\Gamma}$$

On peut enfin extraire le décalage spectral en soustrayant les deux valeurs de  $\lambda_0$ ainsi obtenues. Cette méthode s'applique bien quand les spectres de micro-réflectivité sont bien décrits par l'équation de notre modèle, comme dans l'exemple des spectres 1 et 2 tracés sur la figure D.1a. Cependant elle manque de précision quand la qualité de l'ajustement est faible, comme dans le cas des spectres 3 et 4, représentés sur la figure D.1b. Sur cette figure, on peut en effet constater que les ajustements numériques ne décrivent pas correctement les données expérimentales (en particulier sur le spectre 3), ce qui rend impossible la détermination précise de la position de la résonance.

<sup>1.</sup> Voir chapitre 2, section 2.4.1 : ces oscillations sont dues à l'effet Fabry-Perot dans l'analyte (oscillations de période  $\approx 0.3 \text{ nm}$ ) et la lamelle de notre cellule fluidique (période  $\approx 1.7 \text{ nm}$ ).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-Iyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés



FIG. D.1 : résultats d'ajustements numériques de spectres de micro-réflectivité avec un modèle basé sur l'équation de Fano : (a) bonne qualité et (b) mauvaise qualité d'ajustement.

### D.2 Méthode par corrélation

Nous avons donc développé une deuxième méthode de mesure du décalage spectral basée sur un algorithme de corrélation, pour les cas où l'ajustement numérique ne donne pas de résultats satisfaisants. L'algorithme se base sur la comparaison de deux spectres de formes superposables : il décale le second spectre en cherchant à le superposer au premier, et le décalage spectral  $\Delta\lambda$  retourné par l'algorithme est celui optimise la superposition, comme l'illustre l'exemple de la figure D.2, qui reprend les mêmes spectres que la figure D.1b.

Sur la figure D.2b, on peut constater que si on décale le spectre 4 de la valeur  $\Delta \lambda$  déterminée par l'algorithme (spectre tracé en vert), celui-ci se superpose bien au spectre 3 dans la zone d'intérêt, c'est-à-dire au voisinage de la résonance.

Avec cette méthode, on ne mesure donc plus individuellement la longueur d'onde de résonance des deux spectres, mais on mesure directement le décalage spectral. Cela offre l'avantage de ne pas nécessiter de modèle mathématique pour décrire des spectres, en plus de proposer une mesure robuste à condition que les spectres aient la même forme.



FIG. D.2 : Mesure du décalage spectral entre les spectres de la figure D.1b par notre algorithme de corrélation : (a) spectres de micro-réflectivité expérimentaux et (b) détermination du décalage optimal  $\Delta\lambda$  du spectre 4 pour correspondre au spectre 3.

# Annexe E

# Dimensions des cristaux photoniques du spectromètre intégré

Cette annexe récapitule les dimensions visées des cristaux photoniques composant notre spectromètre intégré. La comparaison des valeurs visées et expérimentales des CPs permet d'extrapoler leur longueur d'onde de résonance, à l'aide de lois de variation issues de simulations RCWA. Ces lois nous ont permis d'expliquer les caractérisations optiques présentées dans la section 4.3.2 du chapitre 4.

### E.1 Dimensions des CPs visées

L'architecture des CPs est rappelée sur la figure E.1, et les dimensions visées de chaque CP sont répertoriées dans le tableau E.2. Comme détaillé dans la section 4.2.3 du chapitre 4, la variation des paramètres structuraux permet d'échelonner les résonances des CPs par incréments de 2 nm sur la gamme spectrale 920 à 972 nm.



FIG. E.1 : Architecture des cristaux photoniques composant le spectromètre intégré : structure à double période (alternance du rayon des trous  $R_1$  et  $R_2$ ) avec déplacement des petits trous s.

	$\begin{array}{c} \textbf{Résonance} \\ \textbf{visée} \\ \lambda_{res} \ (nm) \end{array}$	<b>Période</b> <i>a</i> (nm)	Grand rayon $R_1 (nm)$	$\begin{array}{c} \textbf{Petit} \\ \textbf{rayon} \\ R_2 \ (nm) \end{array}$	$\begin{array}{c} {\bf D\acute{e}calage}\\ {\bf petits\ trous}\\ s\ ({\rm nm}) \end{array}$
CP A	920	288	96	86	0
CP B	922	288	96	86	16
CP C	924	288	96	86	23
CP D	926	288	96	86	28
CP E	928	288	96	86	33
CP F	930	288	96	86	37
CP G	930	292	97	87	0
СР Н	932	292	97	87	16
CP I	934	292	97	87	23
CP J	936	292	97	87	28
CP K	938	292	97	87	33
CP L	940	292	97	87	37

TAB. E.2 : Dimensions des cristaux photoniques au sein du spectromètre intégré.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

	Résonance visée	Période	Grand rayon	Petit rayon	Décalage petits trous
	$\lambda_{res} (\mathrm{nm})$	a (nm)	$R_1 (\mathrm{nm})$	$R_2 (\mathrm{nm})$	<i>s</i> (nm)
CP M	940	296	99	89	0
CP N	942	296	99	89	16
CP O	944	296	99	89	23
CP P	946	296	99	89	28
CP Q	948	296	99	89	33
CP R	950	296	99	89	37
CP S	950	300	100	90	0
CP T	952	300	100	90	16
CP U	954	300	100	90	23
CP V	956	300	100	90	28
CP W	958	300	100	90	33
CP X	960	300	100	90	37
CP Y	960	304	101	91	0
CP Z	962	304	101	91	16
CP AA	964	304	101	91	23
CP BB	966	304	101	91	28
CP CC	968	304	101	91	33
CP DD	970	304	101	91	37
CP EE	970	307	102	92	0
CP FF	972	307	102	92	16

TAB. E.3 : Dimensions des cristaux photoniques au sein du spectromètre intégré (suite).

### E.2 Lois de variations de la résonance en fonction des dimensions

Nous avons présenté une analyse statistique des images MEB des structures dans la section 4.3.1 du chapitre 4. Nous allons détailler ici le calcul du décalage spectral induit par les variations de dimensions, à l'aide des lois de variation de la résonance issues de simulations RCWA, et données par les équations E.1 à E.3 :

$$\Delta\lambda_{R_1} = -1.57 \times \Delta\left(\frac{2R_1}{a}\right) \times a_0 \tag{E.1}$$

$$\Delta \lambda_{R_2} = -0.816 \times \Delta \left(\frac{2R_1}{a}\right) \times \Delta \left(\frac{R_2}{R_1}\right) \times a_0 \tag{E.2}$$

$$\Delta \lambda_a = 2.56 \times \Delta a \tag{E.3}$$

Où  $a_0 = 300$  nm est la période de l'architecture de base. Ces lois ont été utilisées dans le chapitre 4 pour extrapoler les longueurs d'onde de résonance des CPs à partir de leurs dimensions mesurées expérimentalement (voir section 4.3.2 et figure 4.16). Un exemple d'extrapolation pour le CP X de la figure 4.16 est donné dans le tableau E.4. On précisera que l'impact du décalage s suit la loi d'évolution présentée dans la section conception du chapitre 4 (figure 4.7). La résonance de ce CP est visée à 960 nm et mesurée expérimentalement à 920.0 nm, soit un écart de  $\Delta \lambda_{exp} = -40.0$  nm. L'extrapolation montre que cet écart est majoritairement dû au rayon  $R_1$  trop grand; et la somme des contributions des différents écarts de dimensions de  $\Delta \lambda_{extrap} = -37.4$  nm permet de retrouver la valeur expérimentale.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

	Visé (nm)	Expérimental (nm)	Écart (nm)	Impact sur la résonance
a	300	301	+1	$\Delta \lambda_a = +3.7 \mathrm{nm}$
$R_1$	100	108.7	+8.7	$\Delta\lambda_{R_1} = -42.9\mathrm{nm}$
$R_2$	90	98.3	+8.3	$\Delta \lambda_{R_2} = -0.2\mathrm{nm}$
s	37	40	+3	$\Delta\lambda_s = +2.0\mathrm{nm}$
$\lambda_{res}$	960.0	920.0	-40.0	
Total				$\Delta \lambda_{extrap} = -37.4 \mathrm{nm}$

TAB. E.4 : Exemple d'extrapolation de la longueur d'onde de résonance d'un CP à partir de ses dimensions mesurées expérimentalement à partir d'images MEB.

# Annexe F

# Filtrage par polariseurs croisés

Dans le dispositif d'imagerie sans lentille présenté dans le chapitre 4, on utilise des polariseurs croisés afin de filtrer la portion du spectre lumineux hors de la résonance. Cette annexe détaille l'intérêt de ce filtrage pour avoir le meilleur rapport signal/bruit en imagerie.

Nous avons vu dans le chapitre 3 que le spectre de réflexion de nos CPs présente un profil de Fano; par conséquent, le spectre de transmission correspond également à un profil de Fano, tel que celui représenté en bleu sur la figure F.1. Or dans un tel profil, l'intensité au voisinage de la résonance varie peu par rapport à l'intensité hors résonance, et par conséquent le contraste d'intensité entre le signal utile (autour de la résonance) et le signal de fond est faible.

Ce profil de Fano est le résultat de l'interférence entre un mode continu et un mode discret à la résonance. Ici, le mode continu est la partie du faisceau incident qui traverse la structure, et le mode discret est le faisceau rayonné par le cristal. L'intensité de ce dernier présente un profil de Lorentz (courbe rouge sur la figure F.1), décrit par l'équation F.1 :

$$T_{Lorentz}(\lambda) = \frac{T_0}{1 + \left(2Q \times \frac{\lambda - \lambda_0}{\lambda_0}\right)^2}$$
(F.1)

Où  $T_0$  est une constante,  $\lambda_0$  est la longueur d'onde de résonance et Q est le facteur de qualité. Dans ce profil, l'intensité est proche de zéro partout en dehors de la



FIG. F.1 : Comparaison des profils de Fano et de Lorentz de même facteur de qualité Q = 1000.

résonance. Le contraste entre le signal utile et le signal de fond est donc élevé, ce qui est avantageux pour notre système de mesure.

Le faisceau rayonné par le CP est polarisé suivant les directions privilégiées de la structure, en l'occurrence le champ électrique  $\vec{E}_{CPs}$  est parallèle aux rangées de trous de même rayon, comme nous l'avons vu dans le chapitre 3. Pour améliorer le contraste et donc le rapport signal/bruit, on peut tirer parti de cette polarisation avec un système de filtrage du mode continu en configuration de polariseurs croisés, similairement à la technique de microscopie en lumière polarisée [108]. Dans cette configuration, on excite les CPs avec un faisceau dont le champ électrique  $\vec{E}_{inc}$  est polarisé à -45° par convention. On dispose le cristal de telle manière que  $\vec{E}_{CPs}$  soit à 0°, c'est-à-dire à 45° de la polarisation du faisceau incident, ce qui assure le couplage entre les deux. À ce stade, le faisceau transmis à travers le CP présente un profil de Fano. On place ensuite un polariseur à 45° : celui-ci va absorber le signal continu  $\vec{E}_{inc}$  polarisé à -45°, et transmettre la projection de  $\vec{E}_{CPs}$  sur son axe de transmission. On obtient ainsi un faisceau  $\vec{E}_{out}$  polarisé à 45°, présentant un profil de Lorentz, plus propice à un bon rapport signal/bruit.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2020LYSEI128/these.pdf © [N. Gaignebet], [2020], INSA Lyon, tous droits réservés

# Bibliographie

- [1] A. S. John and C. P. Price, "Benefits of point-of-care testing in the Emergency Department," p. 9.
- [2] B. Hayes, C. Murphy, A. Crawley, and R. O'Kennedy, "Developments in Pointof-Care Diagnostic Technology for Cancer Detection," *Diagnostics*, vol. 8, June 2018.
- [3] J. R. Choi, K. W. Yong, J. Y. Choi, and A. C. Cowie, "Emerging Point-of-care Technologies for Food Safety Analysis," *Sensors*, vol. 19, p. 817, Jan. 2019.
- [4] B. Reddy, U. Hassan, C. Seymour, D. C. Angus, T. S. Isbell, K. White, W. Weir, L. Yeh, A. Vincent, and R. Bashir, "Point-of-care sensors for the management of sepsis," *Nature Biomedical Engineering*, vol. 2, pp. 640–648, Sept. 2018.
- [5] M. Zarei, "Advances in point-of-care technologies for molecular diagnostics," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 98, pp. 494–506, Dec. 2017.
- [6] S. Gustafson, "Making food safer in developing countries | Food Security Portal," Nov. 2018.
- [7] S. Vashist, "Point-of-Care Diagnostics : Recent Advances and Trends," *Biosensors*, vol. 7, p. 62, Dec. 2017.
- [8] D. Harpaz, E. Eltzov, R. C. Seet, R. S. Marks, and A. I. Tok, "Point-of-Care-Testing in Acute Stroke Management : An Unmet Need Ripe for Technological Harvest," *Biosensors*, vol. 7, p. 30, Aug. 2017.
- [9] K. Haney, P. Tandon, R. Divi, M. R. Ossandon, H. Baker, and P. C. Pearlman, "The Role of Affordable, Point-of-Care Technologies for Cancer Care in Low- and

Middle-Income Countries : A Review and Commentary," *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine*, vol. 5, pp. 1–14, 2017.

- [10] K. M. Koczula and A. Gallotta, "Lateral flow assays," *Essays in Biochemistry*, vol. 60, pp. 111–120, June 2016.
- [11] A. Heller and B. Feldman, "Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management," *Chemical Reviews*, vol. 108, pp. 2482–2505, July 2008.
- [12] E.-H. Yoo and S.-Y. Lee, "Glucose Biosensors : An Overview of Use in Clinical Practice," Sensors, vol. 10, pp. 4558–4576, May 2010.
- [13] H. Lee, Y. J. Hong, S. Baik, T. Hyeon, and D.-H. Kim, "Enzyme-Based Glucose Sensor : From Invasive to Wearable Device," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, no. 8, p. 1701150, 2018.
- [14] M. Yuqing, G. Jianguo, and C. Jianrong, "Ion sensitive field effect transducerbased biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 21, pp. 527–534, Sept. 2003.
- [15] C.-S. Lee, S. K. Kim, and M. Kim, "Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing," *Sensors*, vol. 9, pp. 7111–7131, Sept. 2009.
- [16] E. Timurdogan, B. E. Alaca, I. H. Kavakli, and H. Urey, "MEMS biosensor for detection of Hepatitis A and C viruses in serum," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, pp. 189–194, Oct. 2011.
- [17] Y. Song, Y.-Y. Huang, X. Liu, X. Zhang, M. Ferrari, and L. Qin, "Point-ofcare technologies for molecular diagnostics using a drop of blood," *Trends in biotechnology*, vol. 32, pp. 132–139, Mar. 2014.
- [18] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets : A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 620, pp. 8–26, July 2008.
- [19] F. Ma, Y. Li, B. Tang, and C.-y. Zhang, "Fluorescent Biosensors Based on Single-Molecule Counting," Accounts of Chemical Research, vol. 49, pp. 1722–1730, Sept. 2016.

- [20] A. Tittl, A. Leitis, M. Liu, F. Yesilkoy, D.-Y. Choi, D. N. Neshev, Y. S. Kivshar, and H. Altug, "Imaging-based molecular barcoding with pixelated dielectric metasurfaces," *Science*, vol. 360, pp. 1105–1109, June 2018.
- [21] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 54, no. 1, pp. 3–15, 1999.
- [22] B. Špačková, P. Wrobel, M. Bocková, and J. Homola, "Optical Biosensors Based on Plasmonic Nanostructures : A Review," *Proceedings of the IEEE*, vol. 104, pp. 2380–2408, Dec. 2016.
- [23] P. Singh, "SPR Biosensors : Historical Perspectives and Current Challenges," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 229, pp. 110–130, June 2016.
- [24] O. Tokel, U. H. Yildiz, F. Inci, N. G. Durmus, O. O. Ekiz, B. Turker, C. Cetin, S. Rao, K. Sridhar, N. Natarajan, H. Shafiee, A. Dana, and U. Demirci, "Portable Microfluidic Integrated Plasmonic Platform for Pathogen Detection," *Scientific Reports*, vol. 5, Aug. 2015.
- [25] D. Wang, J. Loo, J. Chen, Y. Yam, S.-C. Chen, H. He, S. Kong, and H. Ho, "Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors," *Sensors*, vol. 19, p. 1266, Mar. 2019.
- [26] M. Soler, C. S. Huertas, and L. M. Lechuga, "Label-free plasmonic biosensors for point-of-care diagnostics : a review," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 19, pp. 71–81, Jan. 2019.
- [27] F. J. Rodríguez-Fortuño, M. Martínez-Marco, B. Tomás-Navarro, R. Ortuño, J. Martí, A. Martínez, and P. J. Rodríguez-Cantó, "Highly-sensitive chemical detection in the infrared regime using plasmonic gold nanocrosses," *Applied Physics Letters*, vol. 98, p. 133118, Mar. 2011.
- [28] J. Cao, T. Sun, and K. T. Grattan, "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors : A review," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 195, pp. 332–351, May 2014.
- [29] A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. Van Duyne, "Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, pp. 2264–2271, Feb. 2005.

- [30] T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, H. M. Hiepa, D.-K. Kim, Y. Yonezawa, K. Nakano, and E. Tamiya, "Multiple Label-Free Detection of Antigen-Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip," *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 6465–6475, Sept. 2006.
- [31] M. A. Otte, B. Sepúlveda, W. Ni, J. P. Juste, L. M. Liz-Marzán, and L. M. Lechuga, "Identification of the Optimal Spectral Region for Plasmonic and Nanoplasmonic Sensing," ACS Nano, vol. 4, pp. 349–357, Jan. 2010.
- [32] S. S. Aćimović, M. A. Ortega, V. Sanz, J. Berthelot, J. L. Garcia-Cordero, J. Renger, S. J. Maerkl, M. P. Kreuzer, and R. Quidant, "LSPR Chip for Parallel, Rapid, and Sensitive Detection of Cancer Markers in Serum," *Nano Letters*, vol. 14, pp. 2636–2641, May 2014.
- [33] O. Yavas, S. S. Aćimović, J. Garcia-Guirado, J. Berthelot, P. Dobosz, V. Sanz, and R. Quidant, "Self-Calibrating On-Chip Localized Surface Plasmon Resonance Sensing for Quantitative and Multiplexed Detection of Cancer Markers in Human Serum," ACS Sensors, vol. 3, pp. 1376–1384, July 2018.
- [34] J. A. Ruemmele, W. P. Hall, L. K. Ruvuna, and R. P. Van Duyne, "A Localized Surface Plasmon Resonance Imaging Instrument for Multiplexed Biosensing," *Analytical chemistry*, vol. 85, pp. 4560–4566, May 2013.
- [35] K. Wang, L. Jiang, F. Zhang, Y. Wei, K. Wang, H. Wang, Z. Qi, and S. Liu, "Strategy for In Situ Imaging of Cellular Alkaline Phosphatase Activity Using Gold Nanoflower Probe and Localized Surface Plasmon Resonance Technique," *Analytical Chemistry*, vol. 90, pp. 14056–14062, Dec. 2018.
- [36] T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff, "Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays," *Nature*, vol. 391, pp. 667–669, Feb. 1998.
- [37] A. E. Cetin, A. F. Coskun, B. C. Galarreta, M. Huang, D. Herman, A. Ozcan, and H. Altug, "Handheld high-throughput plasmonic biosensor using computational on-chip imaging," *Light : Science & Applications*, vol. 3, p. e122, Jan. 2014.
- [38] A. F. Coskun, A. E. Cetin, B. C. Galarreta, D. A. Alvarez, H. Altug, and A. Ozcan, "Lensfree optofluidic plasmonic sensor for real-time and label-free monitoring of

molecular binding events over a wide field-of-view," *Scientific Reports*, vol. 4, May 2015.

- [39] J. Gomez-Cruz, S. Nair, A. Manjarrez-Hernandez, S. Gavilanes-Parra, G. Ascanio, and C. Escobedo, "Cost-effective flow-through nanohole array-based biosensing platform for the label-free detection of uropathogenic E. coli in real time," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 106, pp. 105–110, May 2018.
- [40] C. Escobedo, Y.-W. Chou, M. Rahman, X. Duan, R. Gordon, D. Sinton, A. G. Brolo, and J. Ferreira, "Quantification of ovarian cancer markers with integrated microfluidic concentration gradient and imaging nanohole surface plasmon resonance," *The Analyst*, vol. 138, no. 5, p. 1450, 2013.
- [41] X. Wang, T.-W. Chang, G. Lin, M. R. Gartia, and G. L. Liu, "Self-Referenced Smartphone-Based Nanoplasmonic Imaging Platform for Colorimetric Biochemical Sensing," *Analytical Chemistry*, vol. 89, pp. 611–615, Jan. 2017.
- [42] H. Guner, E. Ozgur, G. Kokturk, M. Celik, E. Esen, A. E. Topal, S. Ayas, Y. Uludag, C. Elbuken, and A. Dana, "A smartphone based surface plasmon resonance imaging (SPRi) platform for on-site biodetection," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 239, pp. 571–577, Feb. 2017.
- [43] S. Unser, I. Bruzas, J. He, and L. Sagle, "Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing : Current Challenges and Approaches," *Sensors*, vol. 15, pp. 15684– 15716, July 2015.
- [44] J. Liu, M. Jalali, S. Mahshid, and S. Wachsmann-Hogiu, "Are plasmonic optical biosensors ready for use in point-of-need applications?," *The Analyst*, vol. 145, no. 2, pp. 364–384, 2020.
- [45] M. Estevez, M. Alvarez, and L. Lechuga, "Integrated optical devices for lab-on-achip biosensing applications : Integrated optical biosensors," *Laser & Photonics Reviews*, vol. 6, pp. 463–487, July 2012.
- [46] A. Fernández Gavela, D. Grajales García, J. C. Ramirez, and L. M. Lechuga, "Last Advances in Silicon-Based Optical Biosensors," *Sensors*, vol. 16, p. 285, Mar. 2016.

- [47] G. Pitruzzello and T. F. Krauss, "Photonic crystal resonances for sensing and imaging," *Journal of Optics*, vol. 20, p. 073004, July 2018.
- [48] A. Ymeti, J. Greve, P. V. Lambeck, T. Wink, van Hövell, Beumer, R. R. Wijn, R. G. Heideman, V. Subramaniam, and J. S. Kanger, "Fast, Ultrasensitive Virus Detection Using a Young Interferometer Sensor," *Nano Letters*, vol. 7, pp. 394– 397, Feb. 2007.
- [49] Q. Liu, K. W. Kim, Z. Gu, J. S. Kee, and M. K. Park, "Single-channel Mach-Zehnder interferometric biochemical sensor based on two-lateral-mode spiral waveguide," *Optics Express*, vol. 22, p. 27910, Nov. 2014.
- [50] Q. Liu, Y. Shin, J. S. Kee, K. W. Kim, S. R. Mohamed Rafei, A. P. Perera, X. Tu, G.-Q. Lo, E. Ricci, M. Colombel, E. Chiong, J. P. Thiery, and M. K. Park, "Mach–Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 71, pp. 365–372, Sept. 2015.
- [51] S. Dante, D. Duval, B. Sepúlveda, A. B. González-Guerrero, J. R. Sendra, and L. M. Lechuga, "All-optical phase modulation for integrated interferometric biosensors," *Optics Express*, vol. 20, p. 7195, Mar. 2012.
- [52] R. Halir, L. Vivien, X. Le Roux, D.-X. Xu, and P. Cheben, "Direct and Sensitive Phase Readout for Integrated Waveguide Sensors," *IEEE Photonics Journal*, vol. 5, pp. 6800906–6800906, Aug. 2013.
- [53] R. J. J. van Gulik, B. M. de Boer, and P. J. Harmsma, "Refractive Index Sensing Using a Three-Port Interferometer and Comparison With Ring Resonators," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 23, pp. 433–439, Mar. 2017.
- [54] K. D. Vos, I. Bartolozzi, E. Schacht, P. Bienstman, and R. Baets, "Silicon-on-Insulator microring resonator for sensitive and label-free biosensing," *Optics Express*, vol. 15, pp. 7610–7615, June 2007.
- [55] G. Yang, I. M. White, and X. Fan, "An opto-fluidic ring resonator biosensor for the detection of organophosphorus pesticides," *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 133, pp. 105–112, July 2008.

- [56] M. Iqbal, M. A. Gleeson, B. Spaugh, F. Tybor, W. G. Gunn, M. Hochberg, T. Baehr-Jones, R. C. Bailey, and L. C. Gunn, "Label-Free Biosensor Arrays Based on Silicon Ring Resonators and High-Speed Optical Scanning Instrumentation," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 16, no. 3, pp. 654–661, 2010.
- [57] C. A. Barrios, "Integrated microring resonator sensor arrays for labs-on-chips," Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 403, pp. 1467–1475, June 2012.
- [58] R. W. Boyd and J. E. Heebner, "Sensitive disk resonator photonic biosensor," *Applied Optics*, vol. 40, p. 5742, Nov. 2001.
- [59] S. M. Grist, S. A. Schmidt, J. Flueckiger, V. Donzella, W. Shi, S. Talebi Fard, J. T. Kirk, D. M. Ratner, K. C. Cheung, and L. Chrostowski, "Silicon photonic micro-disk resonators for label-free biosensing," *Optics Express*, vol. 21, p. 7994, Apr. 2013.
- [60] M. R. Lee and P. M. Fauchet, "Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection," *Optics Express*, vol. 15, no. 8, p. 4530, 2007.
- [61] B. T. Cunningham, "Photonic Crystal Surfaces as a General Purpose Platform for Label-Free and Fluorescent Assays," *Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 15, pp. 120–135, Apr. 2010.
- [62] W. Chen, K. D. Long, J. Kurniawan, M. Hung, H. Yu, B. A. Harley, and B. T. Cunningham, "Planar Photonic Crystal Biosensor for Quantitative Label-Free Cell Attachment Microscopy," *Advanced Optical Materials*, vol. 3, pp. 1623–1632, Nov. 2015.
- [63] S. Janz, D.-X. Xu, M. Vachon, N. Sabourin, P. Cheben, H. McIntosh, H. Ding, S. Wang, J. H. Schmid, A. Delâge, J. Lapointe, A. Densmore, R. Ma, W. Sinclair, S. Logan, R. MacKenzie, Q. Liu, D. Zhang, G. Lopinski, O. Mozenson, M. Gilmour, and H. Tabor, "Photonic wire biosensor microarray chip and instrumentation with application to serotyping ofEscherichia coliisolates," *Optics Express*, vol. 21, p. 4623, Feb. 2013.

- [64] P. Steglich, M. Hülsemann, B. Dietzel, and A. Mai, "Optical Biosensors Based on Silicon-On-Insulator Ring Resonators : A Review," *Molecules*, vol. 24, p. 519, Jan. 2019.
- [65] J. D. Joannopoulos, S. G. Johnson, J. N. Winn, and R. D. Meade, *Photonic Crystals : Molding the Flow of Light (Second Edition)*. Princeton University Press, Oct. 2011.
- [66] T. Baba, "Slow light in photonic crystals," Nature Photonics, vol. 2, pp. 465–473, Aug. 2008.
- [67] S. Chakravarty, Y. Zou, W.-C. Lai, and R. T. Chen, "Slow light engineering for high Q high sensitivity photonic crystal microcavity biosensors in silicon," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 38, p. 170, Dec. 2012.
- [68] Yi Zou, S. Chakravarty, D. N. Kwong, Wei-Cheng Lai, Xiaochuan Xu, Xiaohui Lin, A. Hosseini, and R. T. Chen, "Cavity-Waveguide Coupling Engineered High Sensitivity Silicon Photonic Crystal Microcavity Biosensors With High Yield," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 20, pp. 171–180, July 2014.
- [69] M. R. Lee and P. M. Fauchet, "Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection," *Optics Express*, vol. 15, no. 8, p. 4530, 2007.
- [70] D. Dorfner, T. Zabel, T. Hürlimann, N. Hauke, L. Frandsen, U. Rant, G. Abstreiter, and J. Finley, "Photonic crystal nanostructures for optical biosensing applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 3688–3692, Aug. 2009.
- [71] Yi Zou, S. Chakravarty, D. N. Kwong, Wei-Cheng Lai, Xiaochuan Xu, Xiaohui Lin, A. Hosseini, and R. T. Chen, "Cavity-Waveguide Coupling Engineered High Sensitivity Silicon Photonic Crystal Microcavity Biosensors With High Yield," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 20, pp. 171–180, July 2014.
- [72] V. R. Almeida, Q. Xu, C. A. Barrios, and M. Lipson, "Guiding and confining light in void nanostructure," *Optics Letters*, vol. 29, p. 1209, June 2004.

- [73] C. F. Carlborg, K. B. Gylfason, A. Kaźmierczak, F. Dortu, M. J. Bañuls Polo, A. Maquieira Catala, G. M. Kresbach, H. Sohlström, T. Moh, L. Vivien, J. Popplewell, G. Ronan, C. A. Barrios, G. Stemme, and W. van der Wijngaart, "A packaged optical slot-waveguide ring resonator sensor array for multiplex labelfree assays in labs-on-chips," *Lab Chip*, vol. 10, no. 3, pp. 281–290, 2010.
- [74] M. Scullion, T. Krauss, and A. Di Falco, "Slotted Photonic Crystal Sensors," Sensors, vol. 13, pp. 3675–3710, Mar. 2013.
- [75] L. Kassa-Baghdouche and E. Cassan, "Mid-infrared refractive index sensing using optimized slotted photonic crystal waveguides," *Photonics and Nanostructures -Fundamentals and Applications*, vol. 28, pp. 32–36, Feb. 2018.
- [76] M. Scullion, A. Di Falco, and T. Krauss, "Slotted photonic crystal cavities with integrated microfluidics for biosensing applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 27, pp. 101–105, Sept. 2011.
- [77] J. Flueckiger, S. Schmidt, V. Donzella, A. Sherwali, D. M. Ratner, L. Chrostowski, and K. C. Cheung, "Sub-wavelength grating for enhanced ring resonator biosensor," *Optics Express*, vol. 24, p. 15672, July 2016.
- [78] S. M. Lo, S. Hu, G. Gaur, Y. Kostoulas, S. M. Weiss, and P. M. Fauchet, "Photonic crystal microring resonator for label-free biosensing," *Optics Express*, vol. 25, p. 7046, Mar. 2017.
- [79] S. M. Lo, S. Hu, G. Gaur, Y. Kostoulas, S. M. Weiss, and P. M. Fauchet, "Photonic crystal microring resonator for label-free biosensing," *Optics Express*, vol. 25, p. 7046, Mar. 2017.
- [80] X. Jiang, J. Ye, J. Zou, M. Li, and J.-J. He, "Cascaded silicon-on-insulator doublering sensors operating in high-sensitivity transverse-magnetic mode," *Optics Letters*, vol. 38, p. 1349, Apr. 2013.
- [81] S. Pal, A. R. Yadav, M. A. Lifson, J. E. Baker, P. M. Fauchet, and B. L. Miller, "Selective virus detection in complex sample matrices with photonic crystal optical cavities," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 44, pp. 229–234, June 2013.
- [82] X. Wang, M. Fujimaki, and K. Awazu, "Photonic crystal structures in titanium dioxide (TiO2) and their optimal design," *Optics Express*, vol. 13, no. 5, p. 1486, 2005.

- [83] S. Jahns, M. Bräu, B.-O. Meyer, T. Karrock, S. B. Gutekunst, L. Blohm, C. Selhuber-Unkel, R. Buhmann, Y. Nazirizadeh, and M. Gerken, "Handheld imaging photonic crystal biosensor for multiplexed, label-free protein detection," *Biomedical Optics Express*, vol. 6, p. 3724, Oct. 2015.
- [84] M. Calvo, S. Guerber, G. Beaudin, M. Canva, P. R. Romeo, C. Baudot, F. Bœuf, P. G. Charette, R. Orobtchouk, and S. Monfray, "Ring resonator designed for biosensing applications manufactured on 300 mm SOI in an industrial environment," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 58, p. SBBE02, Apr. 2019.
- [85] Y. Nazirizadeh, U. Bog, S. Sekula, T. Mappes, U. Lemmer, and M. Gerken, "Lowcost label-free biosensors using photonic crystals embedded between crossed polarizers," *Optics Express*, vol. 18, p. 19120, Aug. 2010.
- [86] K. Bougot-Robin, W. Cao, S. Li, H. Benisty, and W. Wen, "A multispectral resonant waveguide nanopatterned chip for robust oil quality monitoring," *Sensors* and Actuators B : Chemical, vol. 216, pp. 221–228, Sept. 2015.
- [87] G. J. Triggs, Resonant Grating Surfaces for Biosensing. PhD thesis, May 2016.
- [88] G. J. Triggs, Y. Wang, C. P. Reardon, M. Fischer, G. J. O. Evans, and T. F. Krauss, "Chirped guided-mode resonance biosensor," *Optica*, vol. 4, p. 229, Feb. 2017.
- [89] S. Rau, U. Hilbig, and G. Gauglitz, "Label-free optical biosensor for detection and quantification of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in milk without any sample pretreatment," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 406, pp. 3377–3386, May 2014.
- [90] A. L. Lereu, M. Zerrad, A. Passian, and C. Amra, "Surface plasmons versus Bloch surface waves : Towards optimized imaginary index-based ultra-sensitive optical sensors," p. 5, 2017.
- [91] M. Calvo, Study and Manufacturing of Biosensors Based on Plasmonic Effects and Built on Silicon. PhD thesis, INSA Lyon, 2020.
- [92] U. Fano, Effects of Configuration Interaction on Intensities and Phase Shifts -PhysRev.124.1866. 1961.

- [93] M. Galli, S. L. Portalupi, M. Belotti, L. C. Andreani, L. O'Faolain, and T. F. Krauss, "Light scattering and Fano resonances in high-Q photonic crystal nano-cavities," *Applied Physics Letters*, vol. 94, p. 071101, Feb. 2009.
- [94] M. F. Limonov, M. V. Rybin, A. N. Poddubny, and Y. S. Kivshar, "Fano resonances in photonics," *Nature Photonics*, vol. 11, pp. 543–554, Sept. 2017.
- [95] H. M. Shang, Y. Wang, K. Takahashi, G. Z. Cao, D. Li, and Y. N. Xia, "Nanostructured superhydrophobic surfaces," *Journal of Materials Science*, vol. 40, pp. 3587–3591, July 2005.
- [96] R. Belda, J. Herraez, and O. Diez, "A study of the refractive index and surface tension synergy of the binary water/ethanol : influence of concentration," *Physics* and Chemistry of Liquids, vol. 43, pp. 91–101, Feb. 2005.
- [97] L. Milord, E. Gerelli, C. Jamois, A. Harouri, C. Chevalier, P. Viktorovitch, X. Letartre, and T. Benyattou, "Engineering of slow Bloch modes for optical trapping," *Applied Physics Letters*, vol. 106, p. 121110, Mar. 2015.
- [98] L. Milord, Dispositifs Photoniques Innovants Pour Le Piégeage Optique Cavité Étendue à Double Période et Structure Hybride Cristal Photonique-Nano Antenne. PhD thesis, INSA Lyon, 2015.
- [99] "Technical Note 102 : SPR Sensitivity and Detection Limit." http ://biosensingusa.com/technical-notes/technical-note-102-spr-sensitivitydetection-limit/.
- [100] B. Jachimska, K. Tokarczyk, M. Łapczyńska, A. Puciul-Malinowska, and S. Zapotoczny, "Structure of bovine serum albumin adsorbed on silica investigated by quartz crystal microbalance," *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 489, pp. 163–172, Jan. 2016.
- [101] S. Aldrich, "Bovine Serum Albumin Datasheet," Mar. 2020.
- [102] A. Schmidt, J. Spinke, T. Bayerl, E. Sackmann, and W. Knoll, "Streptavidin binding to biotinylated lipid layers on solid supports. A neutron reflection and surface plasmon optical study," *Biophysical Journal*, vol. 63, pp. 1385–1392, Nov. 1992.

- [103] A. N. Bashkatov and E. A. Genina, "Water refractive index in dependence on temperature and wavelength : a simple approximation," pp. 393–395, Oct. 2003.
- [104] S.-K. Kang, S.-W. Hwang, H. Cheng, S. Yu, B. H. Kim, J.-H. Kim, Y. Huang, and J. A. Rogers, "Dissolution Behaviors and Applications of Silicon Oxides and Nitrides in Transient Electronics," *Advanced Functional Materials*, vol. 24, pp. 4427– 4434, July 2014.
- [105] H. Fang, J. Zhao, K. J. Yu, E. Song, A. B. Farimani, C.-H. Chiang, X. Jin, Y. Xue, D. Xu, W. Du, K. J. Seo, Y. Zhong, Z. Yang, S. M. Won, G. Fang, S. W. Choi, S. Chaudhuri, Y. Huang, M. A. Alam, J. Viventi, N. R. Aluru, and J. A. Rogers, "Ultrathin, transferred layers of thermally grown silicon dioxide as biofluid barriers for biointegrated flexible electronic systems," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, pp. 11682–11687, Oct. 2016.
- [106] Y. K. Lee, K. J. Yu, Y. Kim, Y. Yoon, Z. Xie, E. Song, H. Luan, X. Feng, Y. Huang, and J. A. Rogers, "Kinetics and Chemistry of Hydrolysis of Ultrathin, Thermally Grown Layers of Silicon Oxide as Biofluid Barriers in Flexible Electronic Systems," ACS Applied Materials & Interfaces, vol. 9, pp. 42633–42638, Dec. 2017.
- [107] M. Phaner-Goutorbe, V. Dugas, Y. Chevolot, and E. Souteyrand, "Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols : A comparative study," *Materials Science and Engineering : C*, vol. 31, pp. 384–390, Mar. 2011.
- [108] R. Weaver, "Rediscovering Polarized Light Microscopy," p. 6, Oct. 2003.



### FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

#### NOM : GAIGNEBET

DATE de SOUTENANCE : 11/12/2020

Prénom : Nicolas

TITRE : Réalisation et caractérisation de puces de capteurs à cristaux photoniques : vers un dispositif de biodétection intégré

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2020LYSEI128

Ecole doctorale : Electronique, Electrotechnique, Automatique et traitement du signal (EEA)

Spécialité : Electronique, micro et nanoélectronique, optique et laser

RESUME : Les besoins en matière d'analyse moléculaire portative sont croissants, comme dans le cadre de la médecine d'urgence, le dépistage médical précoce, ou encore le contrôle sanitaire des denrées alimentaires. Ces besoins mènent au développement de biocapteurs performants répondant aux critères du « Point-of-Care » (POC), c'est-à-dire la détection sur le lieu d'intervention, que ce soit au chevet du patient, dans un cabinet de médecin, etc. Les capteurs POC ont pour fonction principale de réduire la durée nécessaire aux analyses, afin d'être en mesure de prendre une décision thérapeutique la plus rapide. De plus, grâce à leur mobilité ils permettent de proposer des analyses médicales dans les zones éloignées des centres hospitaliers et des laboratoires d'analyses.

L'objectif de cette thèse est de développer un dispositif de détection optique compatible avec les critères du POC et permettant de répondre aux besoins en termes de criblage moléculaire dans ce type d'analyses. Afin de répondre à ces critères, ce dispositif devra être portable, rapide, bas-coût, et capable de détecter plusieurs biomolécules en parallèle avec une puce jetable, tout en présentant de bonnes performances de détection. L'approche présentée dans ce manuscrit consiste en un dispositif d'imagerie sans lentille, utilisant une puce de cristaux photoniques en silicium, avec une illumination en incidence normale par une source lumineuse bas-coût.

Les résultats phare de cette thèse sont d'une part la démonstration d'une détection spécifique de biomolécules à l'aide de nos capteurs à cristaux photoniques, et d'autre part la démonstration de puces à cristaux photoniques intégrant une fonction de spectrométrie pour une application de détection en imagerie sans lentille compatible avec les critères du POC.

MOTS-CLÉS : Nanophotonique, biocapteur sans marquage, *Point-of-Care*, cristal photonique, imagerie sans lentille.

Laboratoire (s) de recherche : Institut des Nanotechnologies de Lyon - UMR5270

Directeur de thèse: Taha Benyattou

Président de jury :

Composition du jury :

M. CASSAN, Éric	Professeur des Universités	Rapporteur
M. WEHRSPOHN, Ralf	Professeur	Rapporteur
Mme LEREU, Aude	Chargée de Recherche	Examinatrice
M. HADJI, Emmanuel	Ingénieur CEA (HDR)	Examinateur
M. DUPOY, Mathieu	Ingénieur CEA	Invité
M. POUTEAU, Patrick	Ingénieur Avalun	Invité
M. BENYATTOU, Taha	Directeur de recherche	Directeur de thèse
Mme JAMOIS, Cécile	Chargée de recherche	Co-directrice de thèse