



HAL
open science

Exacerbation de dichroïsme circulaire sur des métasurfaces plasmoniques pour la caractérisation de peptides antimicrobiens et autres espèces biologiques

Mathieu Nicolas

► **To cite this version:**

Mathieu Nicolas. Exacerbation de dichroïsme circulaire sur des métasurfaces plasmoniques pour la caractérisation de peptides antimicrobiens et autres espèces biologiques. Matériaux. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS259 . tel-03869601

HAL Id: tel-03869601

<https://theses.hal.science/tel-03869601>

Submitted on 24 Nov 2022

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.



Sorbonne Université

Ecole doctorale 397

Thèse effectuée à l'Institut des NanoSciences de Paris (INSP) et au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS)

Exacerbation de dichroïsme circulaire sur des métasurfaces plasmoniques pour la caractérisation de peptides antimicrobiens et autres espèces biologiques

Par Mathieu NICOLAS

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Souhir BOUJDAY et Bruno GALLAS

Soutenance prévue le 20 juin 2022

Devant un jury composé de

Guillaume Baffou	Chargé de recherche Institut Fresnel	Rapporteur
Aotmane En Naciri	Professeur Université de Lorraine	Rapporteur
Sébastien Bidault	Chargé de recherche Institut Langevin	Examineur
Nicolas Bonod	Directeur de Recherche Institut Fresnel	Examineur
Claire Fave	Directrice de Recherche Université Paris Cité	Examinatrice
Michèle Salmain	Directrice de Recherche Sorbonne Université	Examinatrice
Souhir Boujday	Professeure Sorbonne Université	Directrice de thèse
Bruno Gallas	Chargé de recherche Sorbonne Université	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse de doctorat s'est déroulée à l'Institut des NanoSciences de Paris (INSP) et au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS). Je remercie donc Massimiliano Marangolo et Hélène Pernot, respectivement directeur et directrice des entités précédemment citées, de m'avoir accueilli au sein de ces deux laboratoires. Egalement, je tiens à remercier Hakima Si-Bachir et Nadine Witkowski pour leur gestion de l'École Doctorale Physique et Chimie des Matériaux (ED 397).

Je remercie chaleureusement les membres du jury qui ont accepté de lire, de critiquer et de comprendre mon travail : Messieurs Guillaume Baffou et Aotmane En Naciri en leur qualité de rapporteurs mais aussi Mesdames Claire Fave et Michèle Salmain ainsi que Messieurs Sébastien Bidault et Nicolas Bonod en tant qu'examinatrices et examinateurs.

S'agissant des remerciements plus personnels, mes premières pensées vont bien évidemment pour Bruno et Souhir qui m'ont permis de m'épanouir pleinement durant ces trois années à Jussieu. Bruno avec qui j'ai appris une quantité indénombrable de connaissances scientifiques, professionnelles et humaines : sa présence au quotidien que ce soit pour les expériences, les discussions scientifiques ou tous les à-côtés a été sans faille. Souhir qui m'a permis de découvrir au sein de son équipe un champ des sciences dont je n'avais que trop peu connaissance : sa présence, son expertise, sa confiance et ses conseils toujours avisés ont également été infaillibles. Je les remercie donc amicalement pour leur présence, leur optimisme et leur gentillesse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Lu Zhang, post-doctorante sur le même projet pendant dix-huit mois. Lu m'a aidé à maîtriser tant de techniques de laboratoires montrées dans ce manuscrit. Elle m'a appris d'innombrables connaissances théoriques sur la biochimie qui n'était clairement pas mon sujet de prédilection en arrivant à Jussieu. Je la remercie amicalement pour tout le temps passé ensemble en ne lui souhaitant que le meilleur pour sa nouvelle vie en Suisse, en Autriche ou autre part.

Au sein de l'INSP, ma gratitude va à Willy Daney De Marcillac pour son aide pour toutes les expériences liées à l'optique, Catherine Schwob et Francis Breton sans qui la temporalité pour réaliser mon montage optique n'aurait pas été la même, Mathieu Mivelle pour tous ses conseils scientifiques et sa présence au quotidien, Dominique Demaille que je remercie chaleureusement pour son aide à propos de la lithographie, Erwan Dandeu et Loïc Becerra pour leur implication et leur aide permanente en salle blanche, Yohan Prado pour sa disponibilité infaillible quand il survient un questionnement d'ordre chimique à l'INSP, Laurent Coolen, Jean-Marc Frigerio et Agnès Maitre qui ont toujours répondu à mes questionnements et enfin Reinaldo Ribeiro Lima, Cécile Lefebvre, Sarah Berached et Aline Levallant sans qui tout aurait été plus compliqué administrativement.

Je remercie également très amicalement et sincèrement Ibrahima Soumahoro avec qui j'ai beaucoup collaboré lors de sa venue à l'INSP.

Au sein du LRS, mes remerciements vont à Antoine Miche pour son aide précieuse sur tant de techniques au laboratoire et aussi sa jeunesse (il est malgré tout remercié avec les personnes sérieuses), Vincent Humblot qui m'a appris à manier les peptides expérimentalement et théoriquement même depuis la Franche-Comté, Laetitia Valentin pour nos partages de connaissances et sa présence, Christophe Méthivier pour son aide en spectroscopie XPS et son expertise, Axel Wilson pour les impressions 3D (sans lui nombre de résultats n'auraient pas été possibles), Jean-Marc Krafft pour diverses techniques et enfin Annie Mettendorff, Isabelle Vuillaume et Aurélien Chervalier pour leur aide administrative indispensable. Je remercie amicalement bien évidemment Michèle Salmain qui, même si elle n'est pas au LRS, a toujours été disponible et m'a apporté toute son expertise en biologie.

Je tiens à remercier chaleureusement les personnes de l'Institut Fresnel qui ont participé au projet et m'ont éclairé de leurs lumières théoriques à savoir Nicolas Bonod, Brian Stout, Guillaume Demesy et Jayeeta Amboli. Les rencontres à Marseille, Porquerolles ou Rome ne m'ont pas qu'apporté du soleil.

Enfin, toujours dans le cadre professionnel, je remercie les stagiaires, doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer lors de ces trois années. Je ne peux tous les citer mais je remercie particulièrement à l'INSP Damien et Johanna pour leur humour, Yenni et Sharu que j'ai encadré avec grand plaisir en stage, Lingfei, Benoit, Zakarya, Arnaud, Guillaume, Charlie, Xingyu, Obren, Sergei, Poncia et Ye pour les repas et autres moments de détente partagés et enfin Emna et Homero pour les moments de bonne humeur dans le bureau. Au LRS, je remercie bien sûr fraternellement Fadoua, Yacine, Nadia, Vincent, Somia, David, Alexis et Médéric tous partis plus tôt que moi mais que j'ai toujours plaisir à voir et à revoir, Sunny et Corentin avec qui j'ai partagé la quasi-intégralité des trois années avec le sourire et enfin Daoming, Walid et Juan à qui je souhaite de finir leur thèse de la même manière qu'ils l'ont débuté c'est-à-dire dans la convivialité.

Je tiens à remercier P2O et Saïm dont la présence à J2S a égayé d'innombrables cafés, Amigo et déjeuners. Que mes colocataires soient gratifiés : sans eux je n'aurais pas eu le même plaisir à venir travailler chaque jour, j'en suis certain. Les lactiques, canettes et autres fraternités/sororités doivent être cités également.

Je remercie ma mère, mon père, mes deux sœurs, mon frère et mon grand-père pour leur présence et leur soutien depuis et pour toujours.

Table des matières

Liste des abréviations.....	6
Introduction générale.....	9
Chapitre 1 : Contexte et étude bibliographique	15
Partie 1. Contexte	17
1. La résistance antibactérienne : les peptides antimicrobiens comme solution ?	17
2. Quelles stratégies de greffage pour les peptides antimicrobiens ?	19
3. Les temporines : un candidat naturel.....	20
Partie 2. Des métasurfaces plasmoniques aux formes originales pour détecter la chiralité en surface..	22
1. Détecter des molécules biologiques : la résonance plasmonique de surface localisée.....	23
2. Une sensibilité à étudier : vers un facteur de mérite alternatif.....	24
3. De la nécessité d'utiliser des formes innovantes	24
4. Vers une métasurface pseudo-chirale : les nano-U	30
Partie 3. Nécessité d'une cartographie spectroscopique et polarimétrique	31
Partie 4. Financements, partenaires, publications et communications scientifiques.....	32
Chapitre 2 : Cadre théorique et simulations numériques associés aux résonateurs en U.....	37
Partie 1. Cadre théorique : vers une matrice de Mueller pour caractériser modalement les métasurfaces	39
1. La résonance plasmonique de surface localisée	39
2. Equations constitutives du champ pour un résonateur en U	40
3. Origine du dichroïsme circulaire des nanostructures	41
4. Le formalisme de Stokes-Mueller.....	43
Partie 2. Caractériser les différents modes de résonance et le champ proche : une simulation par éléments finis	45
1. Les différents modes de résonance.....	45
2. Cadre de la simulation numérique	46
3. Résultats en transmission.....	47

Partie 3. Matrices de Mueller des résonateurs en U et caractérisation au changement de milieu	50
1. Matrices de Mueller simulées en incidence oblique.....	50
2. Caractérisation de la métasurface : vers un facteur de mérite alternatif.....	53
Partie 4. Conclusion et perspectives du Chapitre.....	59
Chapitre 3 : Caractérisation expérimentale des métasurfaces étudiées.....	63
Partie 1. Elaboration des échantillons en lithographie et spectres de transmission associés.....	65
1. La lithographie électronique comme méthode de fabrication	65
2. Mesure de transmission mettant en évidence les différents modes de résonance.	68
Partie 2. Caractéristiques de la métasurface <i>via</i> sa matrice de Mueller complète dans l'air mesurée à NTNU.....	69
1. Les symétries de la matrice de Mueller : le théorème de réciprocité et le retournement temporel.....	70
2. La décomposition logarithmique.....	74
3. L'influence de la diffraction	78
Partie 3. L'ellipsométrie généralisée à l'INSP : un environnement liquide	81
1. Le milieu dans lequel est réalisé la mesure.....	81
2. Alignement d'un échantillon pour la mesure de résonateurs en U par ellipsométrie généralisée.....	82
3. Stabilité de la mesure	83
Partie 4. Caractérisation des métasurfaces dans la cellule liquide	86
1. Mesure d'une métasurface dans de l'eau	86
2. Matrices pour les différents échantillons réalisés, reproductibilité	86
3. Vers un facteur de mérite alternatif pour chaque métasurface.....	88
4. Un test en indice plus précis.....	92
Partie 5. Conclusion et perspectives du Chapitre.....	93
Chapitre 4 : Greffage des peptides sur métasurfaces. Détection de leur chiralité en surface ?	97
Partie 1. Les temporines : caractéristiques et stratégie de greffage adoptée.....	99
1. Mise en évidence des propriétés chirales et antibactériennes des temporines	99
2. Stratégie de greffage et protocole	104
Partie 2. Accès à une cinétique et à un taux de recouvrement.....	108

1.	La cinétique et différents régimes d'adsorption grâce à la QCM-D	108
2.	Utilisation de la spectroscopie de photoélectrons X.....	109
Partie 3.	Détection des temporines par ellipsométrie <i>in-situ</i>	111
1.	Un suivi spectroscopique et polarimétrique de l'adsorption.....	112
2.	Influence de l'extension du champ sur la sensibilité de la mesure.....	116
3.	Influence de la structure secondaire du peptide sur la mesure	120
Partie 4.	Conclusion et perspectives du Chapitre.....	121
Chapitre 5 : D'autres espèces biologiques d'intérêt.....		125
Partie 1.	Le cas des protéines	127
1.	Protocole expérimental pour le greffage des protéines sur or.....	127
2.	Caractérisation des métasurfaces	130
Partie 2.	Le cas des vésicules extracellulaires.....	133
1.	Protocole expérimental pour le greffage des vésicules extracellulaires sur or	133
2.	Caractérisation des métasurfaces	133
Partie 3.	Comparaison entre les molécules biologiques	135
Partie 4.	Conclusion et perspectives du Chapitre.....	136
Chapitre 6 : Un μ -polarimètre de Mueller pour cartographier polarimétriquement et spectroscopiquement.....		139
Partie 1.	Construction d'un μ -polarimètre de Mueller en transmission	142
1.	Principe général théorique pour la détermination de la matrice de Mueller d'un échantillon	142
2.	Caractéristiques expérimentales du montage	148
Partie 2.	Résultats sur le montage en transmission	150
1.	Validation de la mesure spectroscopique avec un exemple d'application à la colorimétrie : Reconstruction des couleurs grâce aux propriétés polarimétriques et aux propriétés de la caméra	150
2.	Impossibilité d'observer le plan de Fourier en transmission	156
Partie 3.	Construction d'un μ -polarimètre de Mueller en réflexion	157
1.	Principe général pour la détermination de la matrice de Mueller d'un échantillon pour un μ -polarimètre en réflexion.....	157
2.	Calibration du plan de Fourier.....	158
Partie 4.	Conclusion et perspectives du Chapitre.....	161

Conclusion générale et perspectives	163
Bibliographie	167
Annexes	181
Annexe 1	182
Annexe 2	184
Annexe 3	186
Annexe 4	187
Annexe 5	190
Annexe 6	223

Liste des abréviations

ABS : Acrylonitrile butadiène styrène

AMPs : Antimicrobial peptides

C : Densité locale de chiralité

CD : Dichroïsme circulaire

CDOA : Différence d'absorption optique circulaire

CEA : Cystéamine

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Cter : Terminaison carbonée

D : Dextrogyre

DMF : N,N-Diméthylformamide

DMPC : Dimyristoylphosphatidylcholine

DMPG : Dimyristoyl-l- α -phosphatidylglycerol

DPC : Dodecyl phosphocholine

DPBS : Tampon de phosphate de Dulbecco

FDM : Dépôt de filament fondu

FOM : Facteur de mérite

fwhm : Full width at half maximum

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

L : Lévoxyre

LCP : Polarisation circulaire gauche

LSPR : Résonance plasmonique de surface localisée

MEB : Microscope électronique à balayage

MUA : Acide 11-Mercaptoundecanoïque

MUAM : Acide 11-mercaptoundecylamine

Nter : Terminaison azotée

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS : Tampon phosphate salin

PDITC : 1,4- phenylene diisothiocyanate

PEEK : Polyétheréthercétone

PM-IRRAS : Spectroscopie IR de réflexion-absorption par modulation de la polarisation

PMMA : Polyméthacrylate de méthyle

PSA : Polarization state analyser

PSG : Polarization state generator

QCM-D : Microbalance à quartz avec mesure de dissipation

RCP : Polarisation circulaire droite

S_B : Sensibilité à l'indice de réfraction

SAM : Monocouche auto-assemblée

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SLA : Stéréolithographie laser

SPR : Résonance plasmon de surface

TFE : 2,2,2-Trifluoroéthanol

UFC : Unité de formation de colonies

UV : Ultraviolet

XPS : Spectrométrie de photoelectrons X

Introduction générale

Un objet chiral est un objet qui n'est pas superposable à son image par un miroir plan. Différents objets chiraux sont observables dans la vie quotidienne comme les ciseaux, les écrous ou encore les coquilles d'escargot. Les énantiomères correspondent aux deux configurations possibles des objets chiraux : les mains gauches et droites par exemple. D'ailleurs, étymologiquement, le mot *chiralité* provient du grec ancien *kheir* qui signifie main. Dans le monde du vivant, l'expression la plus connue de la chiralité est la présence d'atomes de carbone asymétriques. Un carbone asymétrique est un atome de carbone en configuration tétraédrique qui est lié à quatre groupements différents : deux configurations (R et S) d'arrangement dans l'espace sont alors possibles donnant lieu à deux énantiomères. Les carbones asymétriques se retrouvent dans la majorité des molécules organiques de base (sucre, acides aminés...). Si le vivant ne produit qu'un énantiomère, la chimie tend à ne produire que des solutions racémiques (mélange des deux énantiomères). Or, certains énantiomères sont toxiques, il est donc crucial de pouvoir différencier les molécules synthétisées.

A l'échelle supra-moléculaire, il se rajoute une structuration à l'échelle de la molécule appelée structure secondaire à savoir la structure tridimensionnelle adoptée par une molécule l'exemple emblématique étant la double hélice de l'ADN. Mais d'une manière générale, sous certaines conditions, les biomolécules composant le vivant possèdent également une structure secondaire : c'est le cas des peptides et des protéines.

Les biomolécules trouvent de nombreuses applications dans le secteur industriel et plus particulièrement dans le biomédical. Par exemple, la lutte contre les infections nosocomiales nécessite l'étude de peptides antimicrobiens qui ont un potentiel bactéricide tout en évitant l'antibiorésistance. Leur structure secondaire joue un rôle important dans leur activité. Par conséquent, la détection de la chiralité et de cette structure secondaire bénéficierait grandement au secteur biomédical.

Depuis le XIX^{ème} siècle et les travaux de Louis Pasteur, détecter la chiralité est réalisable en solution à l'aide de la détermination du dichroïsme circulaire qui est la grandeur d'intérêt. La détection s'effectue grâce à une méthode chiroptique : la mesure de la différence d'absorption associée à deux polarisations circulaires opposées (droite et gauche) de la lumière. Cette différence est faible, mais du fait de son importance dans la caractérisation de la chiralité des biomolécules, de nombreux appareils commerciaux ont été développés qui permettent de mesurer le dichroïsme circulaire sur des molécules en solution.

Cependant, dans de nombreux domaines, comme la biodétection ou encore la lutte contre la prolifération bactérienne nocive en milieu médical ou dans l'industrie navale, c'est l'étude de la chiralité d'espèces adsorbées sur des surfaces qui est cruciale. Pour étudier la structure secondaire d'une espèce biologique adsorbée sur une surface, aucun appareil n'existe. Ceci est dû à la faible signature optique couplée à un faible taux de recouvrement surfacique. Afin de permettre cette caractérisation, l'exacerbation du signal associé au dichroïsme circulaire des objets adsorbés est primordiale.

La détection par des méthodes optiques d'espèces biologiques, adsorbées sur des surfaces est largement étudiée en laboratoire ou en industrie. Pour cela, l'utilisation de la résonance de plasmon de surface localisée est en plein essor grâce à l'exacerbation de la réponse d'un composé biologique greffé sur une nanoparticule métallique. Des détecteurs compacts et faciles d'utilisation utilisant cette propriété existent désormais à grande échelle. Les tests antigéniques et sérologiques rapides destinés au diagnostic du COVID-19 mettent cette technique à profit : les propriétés colorimétriques des nanoparticules métalliques permettent de se passer d'un laboratoire d'analyse.

Pour détecter la chiralité en surface, l'utilisation conjointe de la résonance plasmonique de surface localisée et des propriétés polarimétriques de la lumière semble prometteuse.

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier comment la conformation de molécules biologiques au voisinage de surfaces peut modifier la réponse polarimétrique de cette surface. A cette fin, des surfaces planes pseudo-chirales (*i.e.* recouvertes de réseaux de résonateurs en U en or) ont été utilisées. Le travail effectué est présenté dans ce manuscrit qui se divise en six parties :

- Le manuscrit est introduit par une mise en contexte et un état de l'art bibliographique. Le premier Chapitre justifie le potentiel des peptides antimicrobiens. Sont également présentés les différents choix possibles de surface afin de détecter la chiralité d'espèces adsorbées en surface. La nécessité d'obtenir optiquement une information à la fois polarimétrique et spectroscopique est explicitée.
- Le deuxième Chapitre est consacré à la caractérisation théorique et numérique de métasurfaces composées de réseaux de résonateurs en U. L'origine des différents modes de résonance et du dichroïsme circulaire intrinsèque des nanostructures y est étudiée. En outre, le champ proche est calculé à l'aide de simulations par éléments finis. Enfin, la dépendance au changement de l'indice du milieu environnant des résonateurs sur leur réponse polarimétrique est décrite.
- Le troisième Chapitre permet de mettre expérimentalement en application les différentes propriétés des métasurfaces présentées au deuxième Chapitre. En particulier, les propriétés de symétrie et de sensibilité y sont présentées permettant ainsi de proposer la mise en place d'une cellule liquide pour réaliser une mesure *in-situ*.
- Le quatrième Chapitre est consacré aux résultats principaux de ce travail c'est-à-dire la modification de la réponse polarimétrique après adsorption de peptides antimicrobiens sur la surface. La caractérisation du greffage est réalisée et analysée à partir de mesures obtenues par ellipsométrie généralisée. Une discussion à propos de la détection de la structure secondaire des peptides est présentée.
- Le cinquième Chapitre présente des travaux similaires réalisés pour d'autres objets biologiques. En l'occurrence, des protéines et des vésicules extracellulaires. Une comparaison des résultats pour les différentes espèces biologiques est réalisée.
- Enfin, le sixième et dernier Chapitre présente la construction d'un μ -polarimètre de Mueller qui permettra à terme de mesurer les propriétés polarimétriques des échantillons pour tous les angles d'incidence à l'aide de l'optique de Fourier. Dans

l'état, il est présenté une première étude en transmission ainsi que le début du travail permettant l'imagerie du plan de Fourier.

Chapitre 1 : Contexte et étude bibliographique

Partie 1. Contexte

L'approche bio-inspirée qui consiste à associer des biomolécules à des surfaces pour leur conférer une activité biologique nécessite de maîtriser l'interaction et confère donc à l'étude de molécules au voisinage de surfaces un intérêt sociétal majeur. Plus particulièrement, l'étude de peptides antimicrobiens est cruciale puisqu'elle trouve des applications multiples dans la prévention des infections nosocomiales dues à la résistance antibactérienne ou dans l'industrie navale pour la lutte anti-biofilms. Dans ce qui suit, seront retracées brièvement l'origine du combat contre les bactéries et la nécessité d'étudier de nouveaux agents. Ensuite, seront abordées les différentes stratégies de greffage de ces peptides sur des surfaces. Une revue (reproduite en Annexe 5) a été publiée dans ce cadre [1]. Enfin, le choix d'étudier des temporines thiolées comme exemple de peptides antimicrobiens sera justifié.

1. La résistance antibactérienne : les peptides antimicrobiens comme solution ?

Le premier antibiotique découvert est attribué à Alexander Fleming qui aurait caractérisé « par accident » la pénicilline, dessinée sur la Figure 1, en 1928. Les premières utilisations ont eu lieu à partir des années 1940. Le prix Nobel de médecine de 1945 fut alors décerné à Ernst Boris Chain, Alexander Fleming et Howard Walter Florey pour l'utilisation de cet antibiotique dans la lutte contre des infections bactériennes. Dorothy Crowfoot en a déterminé la structure dès 1945. Des maladies, longtemps incurables, sont désormais soignées plus ou moins efficacement. De nombreux antibiotiques sont utilisés afin de guérir des infections et cela a révolutionné la médecine. Par exemple, il est maintenant possible de soigner des maladies bactériennes plus ou moins dangereuses à voie aérienne (l'angine [2], l'otite [3], la sinusite [4], la pneumonie [5] ou bien la tuberculose[6]), du tube digestif (l'ulcère [7]), à voie cutanée (l'abcès [8]) ou encore sexuellement transmissibles (la syphilis [9]).

Malheureusement, après l'apparition des antibiotiques, il advient inexorablement quelques années plus tard la résistance bactérienne à ces agents et ce à cause de la prescription à outrance et de la mauvaise utilisation de ces médicaments dans la population humaine et animale. Dès 1950, des cas de bactéries résistantes furent rapportés [10]. Depuis, ce phénomène est considéré comme un problème de santé majeur dans le monde entier. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2014 [11], publiait un rapport concernant une surveillance mondialisée nécessaire à propos de cette résistance. C'est, selon l'OMS, une menace qui pèse sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et l'inégalité de développement mondial. Il est admis que ce phénomène naturel est largement amplifié par l'utilisation et surtout le mauvais usage de ces médicaments dans la société humaine et chez l'animal. Par exemple, le traitement de pneumonies, de tuberculoses ou bien de salmonelloses se complique avec le temps et le développement de bactéries résistantes. En outre, ce fléau ne touche pas seulement le secteur médical associé

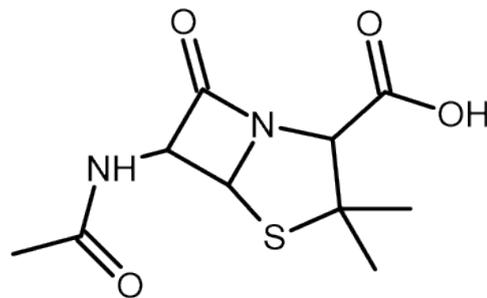


Figure 1: Formule de la pénicilline : premier antibiotique découvert au XX^{ème} siècle.

au traitement direct des infections bactériennes : une grande menace plane sur le milieu hospitalier avec la prolifération de bactéries résistantes au sein des établissements de santé. Le rapport de Santé publique France de 2017 à propos des infections nosocomiales (un nouveau rapport doit être publié en 2022) chiffre à 5 % le nombre de patients infectés dans des établissements de santé français [12] avec une majorité de personnes touchées par les micro-organismes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Sur ces infections, environ 20 % seraient concernés par des souches résistantes à certains antibiotiques connus. En novembre 2019, Santé publique France *via* un rapport éditorialisé par Céline Pulcini [13], présentait les stratégies françaises pour lutter contre cette antibiorésistance. Deux ressorts sont présentés :

- L'utilisation correcte des antibiotiques
- La prévention de l'infection et la limitation de la transmission bactérienne

Concernant le premier point, la prescription et l'utilisation des médicaments antibiotiques sont mieux cernés qu'autrefois. Entre 2000 et 2005 la consommation d'antibiotiques dans la population a diminué d'environ 10 % mais elle est désormais stable en médecine de ville (qui concerne 90 % de la prise d'antibiotiques par la population). L'exposition des animaux à ces médicaments est, quant à elle, en bonne voie puisqu'entre 2008 et 2018, une diminution de 42 % a eu lieu. Cette diminution est encourageante mais ne se répercute pas encore assez dans la prolifération de bactéries résistantes. Les pollutions environnementales, en l'occurrence des eaux de surface par des antibiotiques, semblent aussi jouer un rôle prépondérant.

Un biofilm est composé d'une colonie de micro-organismes au sein d'une matrice de substance polymérique extracellulaire qu'ils produisent [14]. Les biofilms protègent les bactéries d'un environnement parfois hostile. Certains biofilms se formant en surface lors d'une infection renforcent la résistance aux traitements : en fait des micro-organismes composants ce biofilm affectent des millions d'individus *via* des infections bactériennes [15], le plus souvent par l'intermédiaire de dispositifs médicaux implantés dans le corps [16], [17]. Pour prévenir les infections dues à des dispositifs médicaux comme les prothèses de hanche, les implants mammaires, les couronnes dentaires ou même les pansements, l'utilisation de solutions alternatives aux antibiotiques classiques permet d'éviter la formation d'un biofilm bactérien. L'*antifouling* permet de prévenir cette apparition soit en exerçant une activité antiadhésive, soit en exerçant une activité bactéricide. Les peptides antibactériens (AMPs pour Anti Microbial Peptides) possèdent les qualités requises pour exercer ces activités. Ce sont des peptides amphiphiles de petite taille (12-100 acides aminés) composant une des premières lignes de défense de nombreux organismes [18]–[20]. Dans les années 1980, le premier peptide antimicrobien fut isolé depuis la grenouille *Xenopus laevis* : la magainin qui est un peptide composé de 23 acides aminés [21]. A ce jour, la base de données sur les polymères antibactériens (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/>) liste 3273 AMPs avec 369 provenant de bactéries, 5 AMPs d'archées, 8 de protista, 22 de fungi, 361 de plantes et enfin 2424 d'animaux, la principale source d'AMPs. Ces peptides ont des propriétés anti biofilms, antiprotozoaires [22], [23], antibactériennes [24], antivirales [25], antifongiques [26], antiparasites [27], anticancéreuses [28], antioxydantes [29], chimiotactiques [30], insecticides [24] ou même curatives [31]. Le caractère généralement non spécifique du mécanisme

d'action limite l'apparition de résistance bactérienne [32]. Par exemple, après 60 ans d'utilisation clinique de la tyrothricin, aucune résistance n'a été découverte [33]. En revanche, prudence est de mise et des vérifications doivent régulièrement être réalisées pour ne pas tomber dans cet écueil [34], [35].

Afin d'utiliser des peptides antimicrobiens sur des surfaces, une réflexion sur la stratégie de greffage à adopter est nécessaire. En effet, pour prévenir l'accroissement de biofilm sur des systèmes biomédicaux, différents choix sont possibles. Ces différentes stratégies sont résumés dans une revue publiée en 2021 intitulée « Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices » [1], cette revue est en Annexe 5 du travail de thèse et elle est très brièvement résumée dans la sous partie suivante.

2. Quelles stratégies de greffage pour les peptides antimicrobiens ?

Plusieurs stratégies de greffage existent pour utiliser les propriétés des peptides antimicrobiens :

1. Une approche en chimisorption *via* une préfonctionnalisation de la surface
2. Une approche en chimisorption *via* une modification du peptide
3. Une approche en physisorption
4. Une approche couche-par-couche

Ces différentes approches sont détaillées dans la revue en Annexe 5 [1]. Les peptides antimicrobiens possèdent des propriétés prometteuses en matière de prévention contre la formation d'un biofilm et en tant que traitement antibiotique. L'approche covalente (par chimisorption) possède plus d'avantages : cette technique d'immobilisation semble être celle à utiliser. Par conséquent, dans le cadre du travail de thèse présenté ici, les biomolécules ont été greffées sur des surfaces en utilisant la chimisorption. C'est une des plus-values de ce travail de thèse : l'étude de la conformation de biomolécules **attachées de manière covalente** et non pas physisorbées ou déposées par enduction centrifuge (*spin-coating*) comme dans d'autres travaux présents de la littérature [36], [37].

3. Les temporines : un candidat naturel

Plus d'un millier de peptides antimicrobiens issus de la sécrétion de peaux de grenouilles sont étudiés depuis quelques décennies [38], [39]. Les défauts perpétuels de ces peptides sont leur



Figure 2 : Présentation de la temporine *via* (a) sa structure, (b) l'animal dont elle est originaire et (c) une des maladies qu'elle combat.

taille (souvent plus de 40 acides aminés) et leur cytotoxicité ce qui complique leur utilisation dans le domaine biomédical pour une application anti-infectieuse. Les temporines (Figure 2 (a)) sont de petits peptides antimicrobiens (famille d'AMPs allant de 8 à 17 résidus d'acides aminés) prometteurs dans le cadre de la lutte contre les infections nosocomiales. Ils ont été identifiés pour la première fois *via* les grenouilles *Rana Erythruca* [40] et *Rana Esculenta* [41]. Ces peptides permettent par exemple de combattre la *Leishmania* (Figure 2 (c)), une maladie de la peau.

Cette famille possède un effet antibactérien puissant et à large spectre contre les bactéries à Gram positif et négatif ainsi que contre les levures et parasites impliqués dans la leishmaniose [42]. Ceci se vérifie notamment pour les temporines-Sh issues de la grenouille *Pelophylax saharicus* (Figure 2 (b)). Six membres de cette famille sont connus à ce jour (Tableau 1) :

Tableau 1 : Temporines Sh connues à ce jour avec la séquence associée et le nombre de résidus.

Nom du peptide	Séquence	Nombre de résidus
Temprine-Sha	FLSGIVGMLGKLF _{amide}	13
Temprine-Shb	FLPIVTNLLSGLL _{amide}	13
Temprine-Shc	FLSHIAGFLSNLF _{amide}	13
Temprine-Shd	FLPAALAGIGGILGKLF _{amide}	17
Temprine-She	FLPALAGIAGLLGKIF _{amide}	16
Temprine-Shf	FFFLSRIF _{amide}	8

L'association de ces temporines-Sh à des surfaces doit se faire en préservant leur activité antibactérienne après greffage.

En 2014, Lombana & al. [43] ont fonctionnalisé des surfaces d'or avec des temporines Sha dans le but de créer une surface antibactérienne. Deux stratégies de greffage principales ont été utilisées et sont résumées dans la Figure 3 (reproduite depuis [43]). La première est de fonctionnaliser l'or par un thiol acide (MUA) et ensuite de greffer le peptide *via* les groupements amine NH₂ (a) La seconde est de fonctionnaliser l'or par un thiol amine (MUAM) et ensuite de greffer le peptide *via* les groupements carboxyles COOH (b). Ils concluent que plus de temporines sont greffées pour l'orientation C-terminal (Cter) que pour l'orientation N-terminal (Nter).

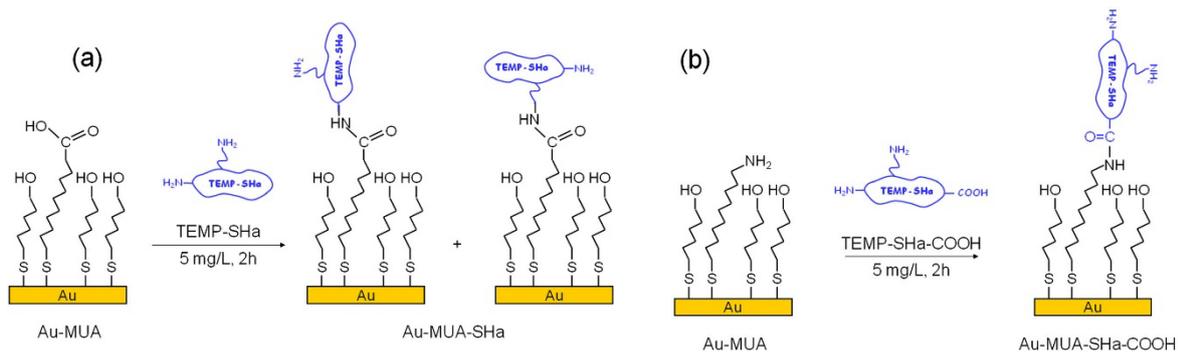


Figure 3 : Deux stratégies d'accroche des temporines Sha *via* (a) le groupement amine et (b) le groupement carboxyle (reproduite depuis [43]).

En 2018, Masurier & al. [44] ont montré la possibilité de greffer la temporine Sha *via* un groupement chimique supplémentaire sur des sites de surface spécifiques. Les auteurs ont observé des différences d'activité antibactérienne lors d'un greffage *via* un site spécifique ou un autre. La stratégie de greffage en une étape de temporine-Sha est la suivante : une surface de titane est fonctionnalisée par un groupe dime-thylhydroxysilane, dans la tentative de faire réagir directement la surface modifiée avec le peptide. Cependant, les liaisons Si-O-Ti formées peuvent être facilement hydrolysées, et donc la densité de greffage réduite après incubation. Pour réduire cet écueil, le substrat en titane a été recouvert de silice avant l'immobilisation du peptide permettant la formation de liaisons Si-O-Si à la place de Si-O-Ti. Ces nouvelles liaisons, bien que toujours hydrolysables, sont beaucoup plus fortes que Si-O-Ti. La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) a été utilisée pour confirmer la réussite du greffage et mesurer l'épaisseur du revêtement de silice et la densité de surface. Indépendamment de l'orientation des molécules greffées (greffage par Cter, Nter ou milieu de séquence), la densité surfacique moléculaire déterminée et le nombre de molécules greffées étaient similaires. Ils ont également observé une meilleure interaction avec la membrane bactérienne et donc une activité antibactérienne plus élevée lorsque le diméthylhydroxysilane est introduit en milieu de séquence, plutôt qu'en Cter ou en Nter.

En outre, en 2019, Oger & al. [45] ont publié des travaux concernant le greffage de temporines Sha sur des surfaces d'or. Ils observent que l'utilisation d'un peptide synthétique en configuration D (Dextrogyre) permet d'augmenter l'activité antibactérienne de 15 %. De plus, cet énantiomère semble réduire de près de 50 % l'adhésion bactérienne. D'autres études montrent que la chiralité associée au peptide antimicrobien influe sur l'activité antibactérienne. En 2021, Li & al. [46] ont comparé le peptide marin N6 (N6NH₂) C-terminal et son énantiomère D, ils trouvent une activité exacerbée pour l'énantiomère pur. En 2017, Mohamed & al. [47] trouvent une activité antibactérienne renforcée pour l'énantiomère D du peptide RR4 (12 acides aminés). En 2011, Huang & al. [48] démontrent également la différence d'activité entre deux énantiomères L (Lévo-gyre) et D d'un peptide antimicrobien synthétique.

Par conséquent, l'étude de la configuration en surface de peptides antimicrobiens semble être un enjeu pour mieux comprendre et appréhender cette activité antibactérienne différente suivant l'énantiomère choisi.

Les temporines possèdent une structure secondaire en hélice α et cette structure est détectable lorsque le solvant utilisé est adéquat (souvent un solvant organique ou membranomimétique). Des mesures de dichroïsme circulaire en solution dans l'ultraviolet ont permis de détecter les structures secondaires de diverses temporines-Sh dans différents solvants :

- SHa dans un mélange DMPC:DMPG (dimyristoylphosphatidylcholine: dimyristoyl-l- α -phosphatidylglycerol) 3 :1 [49],
- SHa, Shb et Shc dans des mélanges 40 % TFE (2,2,2-Trifluoroéthanol) et 80mM SDS (Dodécylsulfate de sodium) [50]
- Shd dans DMPC:DMPG 3 :1 et 80mM SDS [51]
- She dans DMPC:DMPG 3 :1 et 80mM SDS [52]
- Shf dans 80mM SDS et 120mM DPC (Dodecyl phosphocholine) [53], [54]

La structure secondaire de ces biomolécules chirales est donc détectable selon certaines conditions en solution. La détermination de la structure en hélice α de temporines SHa L et D dans du PBS (Tampon phosphate salin) et du TFE 40 % a été réalisée et est présentée dans le Chapitre 4 du manuscrit.

L'enjeu est désormais de pouvoir connaître la structure secondaire en surface après greffage.

Partie 2. Des métasurfaces plasmoniques aux formes originales pour détecter la chiralité en surface

On souhaite pouvoir détecter la structure secondaire ou *a minima* la signature de la chiralité d'une biomolécule lorsqu'elle est adsorbée sur une surface.

Actuellement, la détection s'effectue en solution en mesurant de la différence d'absorption associée à deux polarisations circulaires opposées (droite et gauche) de la lumière (comme expliqué dans l'introduction générale). Cela est su depuis le XIX^{ème} siècle : Louis Pasteur [55], à la suite des travaux d'Augustin Fresnel sur la lumière polarisée circulairement et de Jean-Baptiste Biot qui relia la déviation du plan de polarisation à la concentration d'une solution, observe que le plan de polarisation de la lumière tourne du même angle mais dans un sens opposé en fonction de l'énantiomère analysé. Tous les spectromètres CD (Dichroïsme Circulaire) utilisés actuellement utilisent ce principe pour détecter la conformation associée aux molécules mesurées. Cependant, cette méthode est limitée par la faible différence d'absorption entre deux énantiomères : de l'ordre de 10^{-3} sur un spectre d'absorption. Le signal est faible et se rapproche des limites de détection de nombreux spectromètres : plusieurs mesures consécutives sont nécessaires pour observer un signal suffisant. De surcroît, en surface, la quantité de biomolécules est limitée par un taux de recouvrement. Par conséquent, la différence d'absorption pour de la lumière polarisée circulaire droite et circulaire gauche en réflexion sur une surface fonctionnalisée par des biomolécules n'est pas suffisamment significative pour en tirer quelque conclusion sur la conformation des dites biomolécules. L'utilisation de résonateurs photoniques qui permettent d'exacerber la lumière localement permet de dépasser cet écueil. L'idée principale est d'accroître le couplage entre des molécules et la lumière et donc d'augmenter la réponse spécifique au milieu étudié. Une conséquence immédiate de l'interaction est de décaler spectralement les résonances : ce

phénomène est utilisé maintenant commercialement et nous utiliserons un appareil de ce type dans ce travail pour valider nos résultats. L'utilisation des propriétés polarimétriques afin de détecter la conformation des molécules a été proposée plus récemment et est à l'origine de ce travail.

1. Détecter des molécules biologiques : la résonance plasmonique de surface localisée

Michael Faraday évoqua en 1857 le potentiel des nanoparticules d'or [56]. En 1908, Gustave Mie explique, *via* les équations de Maxwell, la diffusion du champ électromagnétique par une sphère métallique [57]. Si le rayon d'une nanoparticule d'or est inférieur à la longueur d'onde du champ, une excitation plasmonique a lieu. Les nanoparticules d'or sont exploitées dans les applications de biodétection en raison de leur biocompatibilité, la possibilité d'y greffer des biorécepteurs/biomolécules et de leurs propriétés optiques en particulier la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) sensible à l'environnement local. En revanche, malgré toutes ces qualités, l'or possède quelques inconvénients surtout lors de son extraction des minerais. Les processus par cyanuration, amalgamation ou gravitation entraînent des problèmes environnementaux et sociétaux. Même si la surextraction de l'or est principalement due à son utilisation dans le secteur de l'orfèvrerie et de la bijouterie, une attention particulière doit être portée sur la provenance et sur les conditions de mise en circulation du métal précieux. La catastrophe de Baia Mare en 2000 en Roumanie illustre ce propos [58] ou plus récemment les morts de 38 soudanais en décembre 2021, de neuf ghanéens en juin 2021, de 15 guinéens en mai 2021 pour ne citer que ces évènements.

La LSPR correspond à l'oscillation collective des électrons libres confinés par la surface du métal après excitation par un champ électromagnétique. Les électrons sont en résonance pour une certaine longueur d'onde de la lumière incidente [59], c'est la longueur d'onde de résonance du plasmon de surface. Un dipôle électrique naît et deux effets apparaissent :

- Le champ électromagnétique local est exalté,
- L'absorption optique de la particule est maximale à la fréquence de résonance du plasmon.

En fait, c'est la négativité de la partie réelle de la permittivité diélectrique des métaux qui permet ceci : une résonance de la permittivité diélectrique dans le plan complexe des fréquences permet l'augmentation de la polarisabilité de la particule. Le champ est exacerbé au voisinage de l'antenne plasmonique donc en champ proche. En champ lointain, le spectre de diffusion comporte aussi une résonance.

La LSPR est appliquée dans de nombreux domaines [60], on peut citer à titre d'exemple :

- Les biocapteurs, la biodétection [61],
- Le photovoltaïque [62], [63],
- L'émission de photon unique [64],
- L'anti-contrefaçon [65]

En particulier, le secteur associé à la détection de biomolécules est primordial en science environnementale en médecine ou en biologie. Les détecteurs qui utilisent la résonance

plasmon de surface (SPR) sont basés sur la mesure du décalage de la résonance après l'accroche de la molécule. Grâce au confinement de l'énergie en champ proche, le décalage est exacerbé.

2. Une sensibilité à étudier : vers un facteur de mérite alternatif

Lors de la détection d'une biomolécule à l'aide du phénomène de LSPR, un décalage spectral $\Delta\lambda$ est observé. Ce décalage est causé par le changement d'indice diélectrique du milieu environnant. Pour déterminer la sensibilité d'une antenne plasmonique, la sensibilité S_B (nm.RIU^{-1}) (1) à l'indice de réfraction n est généralement utilisée dans la littérature [66].

$$S_B = \frac{d\lambda}{dn} \quad (1)$$

Cependant, la sensibilité à l'indice de réfraction d'une antenne plasmonique dépend également de la largeur à mi-hauteur $fwhm$ (full width at half maximum) de la résonance et donc Sherry & al. [67] ont défini pour la première fois en 2005 un facteur de mérite FOM (RIU^{-1}) qui prend en compte ce paramètre (2). L'idée est qu'une résonance étroite permet une meilleure sensibilité à un décalage induit par la présence de molécules à la surface des résonateurs.

$$\text{FOM} = \frac{S_B}{fwhm} \quad (2)$$

Pour des structures plasmoniques complexes pour lesquelles la résonance plasmonique n'est pas une pure lorentzienne, le facteur de mérite devient limité car il ne rend pas bien compte de la largeur réelle de la résonance. Sherry et al. [67] ont donc proposé de considérer la dérivée du signal et non plus sa largeur à mi-hauteur. Dans ce cas, on s'aperçoit que le maximum de sensibilité se situe dans une gamme spectrale où la pente de la résonance est la plus forte. Becker & al. ont alors, en 2010 [68], imaginé un facteur de mérite alternatif FOM* qui prend en compte la sensibilité S_B mais également la dérivée de l'intensité I associée à la résonance plasmonique (avec une normalisation) (3).

$$\text{FOM}^* = \left(\frac{S_B \left(\frac{dI}{d\lambda} \right)}{I} \right)_{\max} \quad (3)$$

Dans cette thèse, la détection d'une biomolécule au voisinage d'une métasurface sera réalisée lorsque le facteur de mérite sera le plus important afin d'obtenir la plus grande sensibilité. Plus précisément, un facteur de mérite alternatif bis FOM** sera considéré, celui-ci sera adapté au formalisme de Mueller. Ce FOM** est présenté dans le Chapitre 2.

Afin d'étudier non seulement la présence mais aussi la conformation de biomolécules en surface, les nanoparticules ne sont pas suffisantes. Il convient d'étudier des formes innovantes pour accéder aux propriétés chirales des biomolécules.

3. De la nécessité d'utiliser des formes innovantes

Généralement, la LSPR étudiée en recherche académique et vendue dans le commerce est obtenue avec des surfaces contenant des nanoparticules, des nano-disques ou encore des nano-bâtonnets présentant un caractère dipolaire électrique. Par exemple, des quartz nanostructurés avec des nano-disques permettent un couplage entre une expérience de

microbalance à cristal de quartz (QCM) et une détection LSPR, ils possèdent une LSPR aux alentours de 700 nm [69]. Cependant, la signature de la chiralité des biomolécules est détectable plutôt dans la partie UV (Ultraviolet) du spectre (vers 220 nm pour les temporines présentées précédemment pour caractériser le caractère α de l'hélice, dans la même zone pour le caractère en feuillet β de la bien connue β -lactoglobuline). Par conséquent, dans le domaine visible et proche infrarouge, la zone d'intérêt des détecteurs plasmoniques, la signature de cette chiralité est difficilement perceptible : la sensibilité de la détection γ est faible. De plus, la détection repose sur la mesure du décalage spectral de résonances de plasmon ce qui rend a priori la sensibilité à la chiralité impossible. La détection de la chiralité s'effectue *via* des mesures de dichroïsme circulaire. Cette détection repose sur la différence d'absorption des polarisations circulaires gauche (LCP) et droite (RCP) par une molécule chirale. Le CD est donc défini par $CD = 2 * \frac{A_{RCP} - A_{LCP}}{A_{RCP} + A_{LCP}}$ avec A_{RCP} et A_{LCP} les absorptions pour les polarisations LCP et RCP. L'interaction du champ avec le caractère chiral d'une molécule est décrit par la densité locale de chiralité \mathbf{C} de la lumière [70] [71] plutôt que l'intensité du champ :

$$\mathbf{C} = \frac{\epsilon_0}{2} \cdot \vec{E} \cdot \overrightarrow{\text{rot}}(\vec{E}) + \frac{1}{2\mu_0} \cdot \vec{B} \cdot \overrightarrow{\text{rot}}(\vec{B}) \quad (1)$$

Le lien établi entre \mathbf{C} et CD a été décrit par Tang & al. [71] et sera résumé dans le Chapitre 2 du présent manuscrit, c'est le cadre théorique utilisé pour décrire l'interaction entre les structures et les biomolécules utilisées dans le cadre de ce travail. L'asymétrie d'absorption par les molécules chirales n'étant pas de 100 %, la lumière après interaction avec des molécules chirales est généralement polarisée elliptiquement et l'ellipticité χ est reliée au CD par $\chi = 0.5 \sin^{-1}(CD)$. Les valeurs de χ mesurées sur un polarimètre sont typiquement faibles et données en mdeg. Dans la littérature, une confusion est souvent réalisée entre ellipticité et dichroïsme circulaire. Pour savoir ce qui est mesuré il faut observer l'unité à savoir mdeg pour l'ellipticité et sans unité pour le dichroïsme circulaire. Généralement, un CD en mdeg est présenté ce qui est une erreur communément acceptée.

Afin d'augmenter l'interaction de la lumière avec des molécules chirales, il a été proposé d'exacerber le paramètre \mathbf{C} en utilisant des structures photoniques donnant lieu à des champs 'superchiraux' [71]. Pour cela, l'utilisation de nanostructures de formes originales semble être une solution adéquate et ce de pair avec des méthodes de détection adaptées [72]. Dans la suite du texte, une brève revue des structures utilisables pour détecter la chiralité au voisinage de nanostructures plasmoniques sera présentée.

a) Les nanoparticules

Comme vu précédemment, le signal de dichroïsme circulaire associé à une molécule chirale est faible. Pour le renforcer, il est nécessaire d'utiliser une grande concentration en solution ou bien de renforcer la réponse optique grâce à la résonance photonique. Les nanoparticules d'or sont achirales mais peuvent présenter une réponse chirale en présence de molécules chirales dans leur environnement proche. En 2011, Slocik & al. [73] ont fonctionnalisés des nanoparticules d'or par deux peptides E5 et FlgA3 *via* une liaison de type thiol-Au. Après une mesure à l'aide d'un spectromètre CD, il est observé un renforcement du dichroïsme circulaire au niveau du plasmon de la nanoparticule. Ceci s'observe sur la Figure 4 : un signal CD

significatif apparaît après greffage vers 520 nm, c'est-à-dire à la LSPR des nanoparticules. Ici $\chi=3\text{mdeg}$ et donc $\text{CD}=10^{-4}$. Ce phénomène a aussi été décrit par des simulations numériques utilisant la théorie dipolaire et multipolaire [74], [75] ; l'absorption optique du couple nanoparticule-biomolécule est modifiée par les courants chiraux dans la nanoparticule métallique induits par le dipôle de la molécule chirale. Des résultats similaires ont été observés avec des particules de symétrie cylindrique sur lesquelles une couche de riboflavine avait été déposée [76]. Dans tous ces cas, le signal mesuré à la LSPR est de la dizaine de millidegrés (mdeg) au mieux et semble simplement reproduire le profil spectral observé en absorbance.

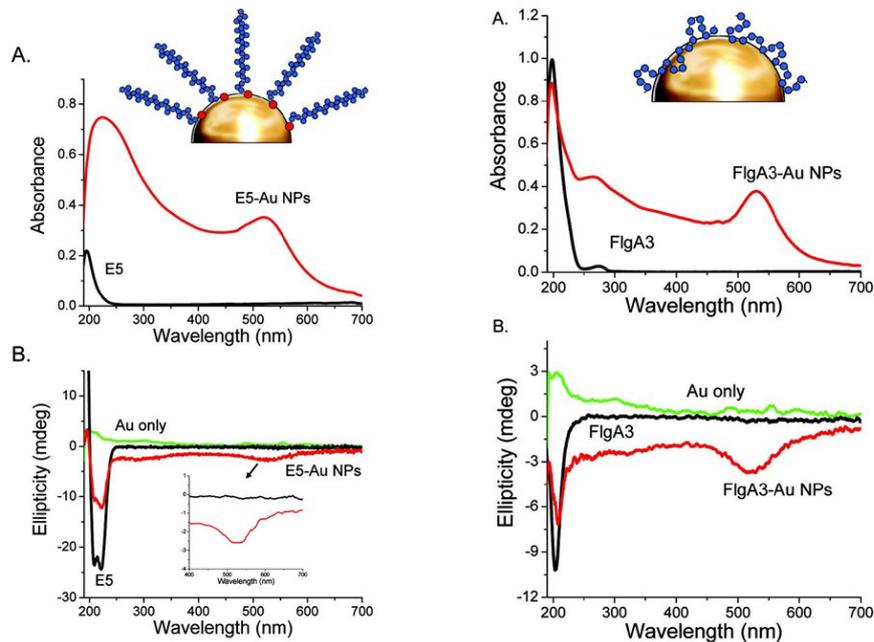


Figure 4 : Spectres d'absorption et d'ellipticité pour des nanoparticules d'or fonctionnalisées ou non par des peptides (issue de [73]).

Un résultat équivalent a été démontré par Puri & al. [77] : des nanoparticules de CdSe expriment un signal non nul de dichroïsme circulaire lorsqu'elles sont au contact de molécules chirales en l'occurrence des acides carboxyliques. L'augmentation du nombre de sites stéréocentrés en changeant d'acide renforce la signature de la chiralité : χ passe de 1mdeg à environ 10mdeg. Dans ce cas, la dépendance spectrale du CD suit les transitions interbandes du CdSe avec les oscillations caractéristiques de mesures de CD. Il est aussi possible de changer le signe du CD en changeant l'énantiomère greffé comme montré sur la Figure 5. Sur ce spectre, on observe deux mesures d'ellipticité pour deux énantiomères dérivés de l'acide tartrique. Les valeurs de CD observées sont opposées et restent dans la gamme de la dizaine de mdeg au mieux.

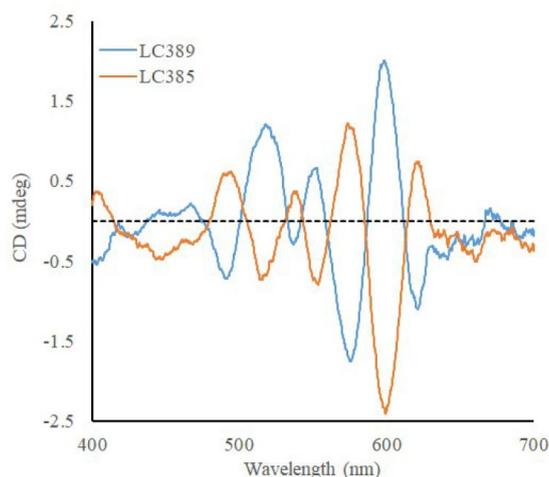


Figure 5 : CD mesuré sur des quantum dots de CdSe (Y. Prado et E. Lhuillier, INSP) fonctionnalisés par un dérivé de l'acide tartrique énantiomère pur (L. Curti et B. Fleury, IPCM) – Résultats pas encore publiés.

D'autres systèmes comprenant deux, trois ou quatre nanoparticules plasmoniques ont également été étudiés [78] et semblent permettre de renforcer le dichroïsme circulaire localement.

b) Les surfaces planes chirales

L'utilisation de surfaces plasmoniques nanostructurées avec une épaisseur plus faible que la longueur d'onde du champ sont attractives pour une application industrielle de par le potentiel de production de masse des techniques de lithographie [79]. La Figure 6 présente un exemple de quatre structures distinctes de nanostructures en or utilisées dans la littérature et qui possèdent un signal de dichroïsme circulaire non nul. Les images sont réalisées au Microscope Electronique à Balayage (MEB).

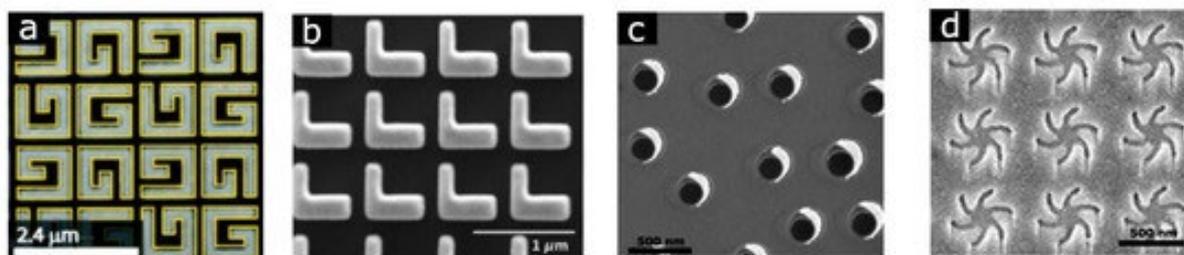


Figure 6 : Exemple de nanostructures présentant un signal CD non nul avec des réseaux (a) de nanostructures en G [80] (b) d'antennes en L [81] (c) de résonateurs en virgule (,) [82] et (d) d'objets en étoile [83] (issue de [79]).

Les métasurfaces composées d'antennes en forme de gammadion Figure 6 (a) ou étoiles Figure 6 (d), donc diffusantes de champ chiral, ont été étudiées pour sonder la chiralité d'une biomolécule [36] [84]. La détection reposait sur la mesure du décalage d'un mode plasmonique excité par de la lumière polarisée circulairement droite (RCP), $\Delta\lambda_{RCP}$, et gauche (LCP), $\Delta\lambda_{LCP}$, lors de l'adsorption de protéines. Plus précisément, la détection consistait à mesurer le décalage différentiel $\Delta\Delta\lambda = \Delta\lambda_{RCP} - \Delta\lambda_{LCP}$ caractéristique de la structure secondaire des molécules

en surface comme le montre la Figure 7. L'ellipticité mesurée est plus forte que pour les nanoparticules : χ est de l'ordre de 50 mdeg soit CD de l'ordre de 10^{-3} . Une valeur nulle est présente lorsque la molécule est achirale ou bien non structurée et un décalage compris entre 0.2 et 5 nm a lieu en présence de biomolécules chirales. Cependant, ce résultat largement considéré dans la littérature est en partie sujet à caution. Deux mesures sont ici nécessaires ce qui amène un important problème de répétabilité et d'incertitude sur la mesure. Les multiples expériences ont été réalisées après des rinçages qui ne garantissent pas non plus parfaitement la répétabilité des expériences. Enfin, il faut garder à l'esprit que le CD mesuré peut provenir des imperfections de la métasurface [85]. Par conséquent, une détection basée sur la comparaison de deux métasurfaces énantiomères est compliquée : un signal CD non nul ne veut pas dire chiralité optique [86].

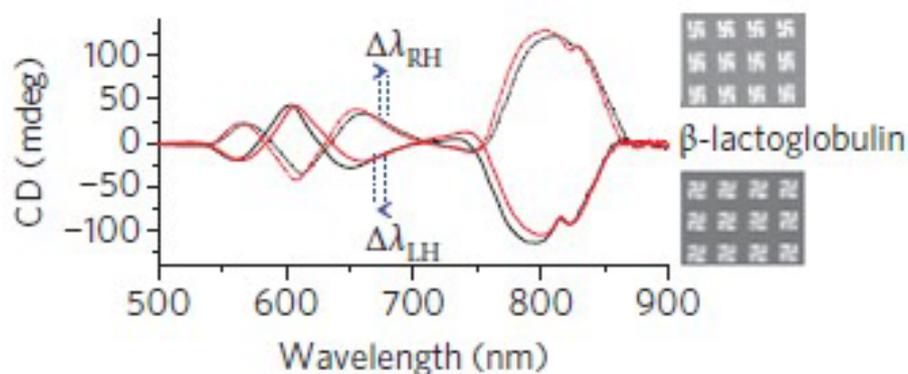


Figure 7 : Spectres CD pour des gammadions de chiralité opposée avec et sans protéine au voisinage (issue de [36]).

Pour éviter le problème des deux mesures consécutives, en 2017, un mélange racémique de gammadions recouvert de phenylalanine sous la forme de ses deux énantiomères et de son mélange racémique a été réalisé [37]. Le recouvrement est ici réalisé en évaporation thermique moléculaire pour des couches de phenylalanine d'environ 150 nm. Le mélange racémique de gammadions présente un signal nul en CD. En revanche, un signal opposé est observé suivant la chiralité de la molécule déposée comme le montre la Figure 8 avec en bleu la Phenylalanine L et en rouge la Phenylalanine D. Ce résultat probant montre bien la possibilité de déterminer la chiralité de molécules lorsqu'elles sont au voisinage d'un résonateur. On peut noter que l'ellipticité obtenue atteint des valeurs de 200 mdeg ($CD=3.5 \times 10^{-3}$) ce qui est conséquent au regard de ce qui existe dans la littérature. Les mêmes auteurs ont réalisé un travail similaire récemment avec des résonateurs diélectriques ce qui semble montrer que le point important est d'obtenir des résonances photoniques avec un caractère chiral [87], [88].

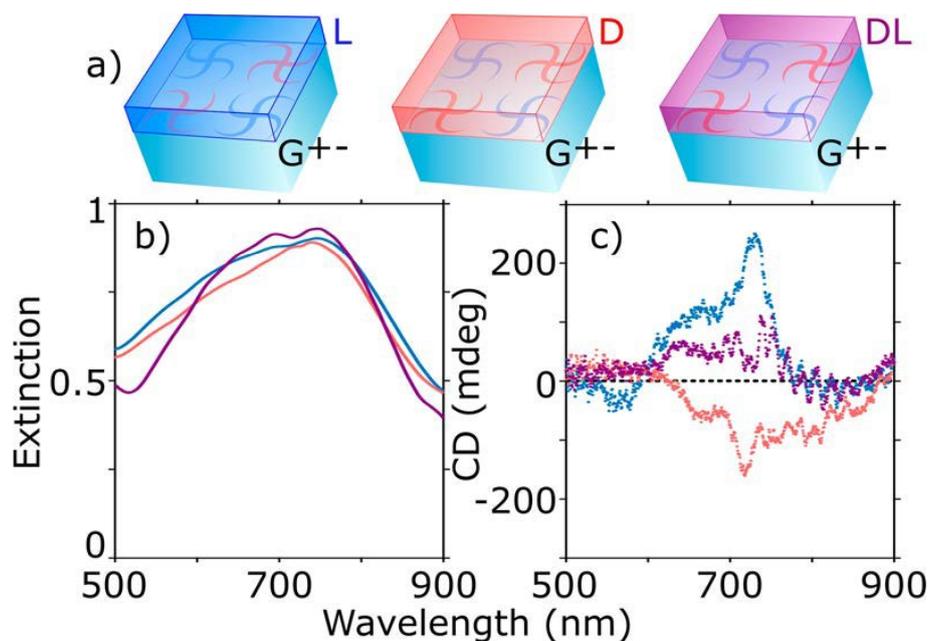


Figure 8 : Spectres (b) d'extinction et de (c) dichroïsme circulaire pour (a) différents recouvrements de gammadions par les énantiomères de la Penylalanine (issue de [37]).

La possibilité de déterminer la chiralité d'une biomolécule au voisinage d'une surface semble donc possible au regard de cet exemple (la Phenylalanine est un acide aminé donc un composant de protéine ou de peptide).

Cependant, ici la molécule est déposée et non pas accrochée chimiquement. Or, un axe de travail intéressant semble être de déterminer la structure d'une biomolécule lorsqu'elle est chimisorbée sur une surface. Ceci car dans beaucoup d'utilisations, la chimisorption est la technique à utiliser comme pour l'activité antibactérienne de peptides ou bien la détection d'antigènes. En outre, il convient d'éviter le problème des deux mesures consécutives qui peuvent compliquer l'interprétation du résultat final. La méthode utilisée lors des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit apporte des solutions à ces problèmes.

c) D'autres formes plus originales

Un des défauts des monocouches de nanostructures chirales est la limitation de l'effet chiroptique en champ lointain à cause de la faible épaisseur des matériaux. Pour remédier à cela, l'utilisation de multicouches d'objets chiraux est prometteuse.

Des mesures de dichroïsme circulaire réalisées sur des résonateurs composés de deux nanobâtonnets superposés et décalés montrent un décalage en dichroïsme circulaire suivant la chiralité de la molécule présente au voisinage du résonateur [89]. Après quatre mesures pour deux types de métasurfaces à chiralité opposée et deux énantiomères, une sensibilité différente est présente suivant la chiralité de la molécule. Des résonateurs en U en or superposés [90] permettent de faire interagir les dipôles électriques et magnétiques afin d'exacerber l'influence du couplage magnéto-électrique ou des multipôles. D'autres structures expriment ce phénomène pour des objets superposés comme des étoiles [91] ou bien deux couches d'or composées de trous superposés selon un réseau de Moiré [92].

Cependant, bien que ces structures génèrent un CD important, l'accessibilité à l'hétérostructure enterrée par des molécules reste encore difficile à concevoir.

D'autres systèmes comme des réseaux chiraux à trois dimensions [93] ou des matériaux hélicoïdaux [94] (étude théorique) sont à l'étude pour générer de la lumière chirale en champ proche afin de sonder des molécules.

Lors des trois années de cette thèse, le choix s'est porté sur des métasurfaces possédant la forme de résonateurs pseudo-chiraux : des résonateurs en U. Les raisons motivant ce choix sont énoncés dans le paragraphe suivant.

4. Vers une métasurface pseudo-chirale : les nano-U

Légèrement différent de la chiralité, la pseudo-chiralité ou la chiralité extrinsèque se trouve dans des résonateurs plasmoniques symétriques qui possèdent une LSPR ayant des contributions des moments dipolaires électriques et magnétiques couplées par couplage magnéto-électrique [95], [96]. La pseudo-chiralité peut produire un dichroïsme circulaire en champ lointain associé à un champ proche qui a les propriétés des champs superchiraux. Organiser ces résonateurs selon la même orientation permet de créer un dichroïsme circulaire macroscopique facilement mesurable en champ lointain et observable lorsque la surface est éclairée en incidence oblique [97]–[100]. La Figure 9 issue de [100] présente le dichroïsme circulaire (et non pas l'ellipticité) en fonction de l'angle d'incidence et de la longueur d'onde. On observe qu'un maximum pour le CD qui vaut alors 0.4 ($\chi=11.8^\circ$) est obtenu pour une longueur d'onde de 800 nm et un angle d'incidence de 45°

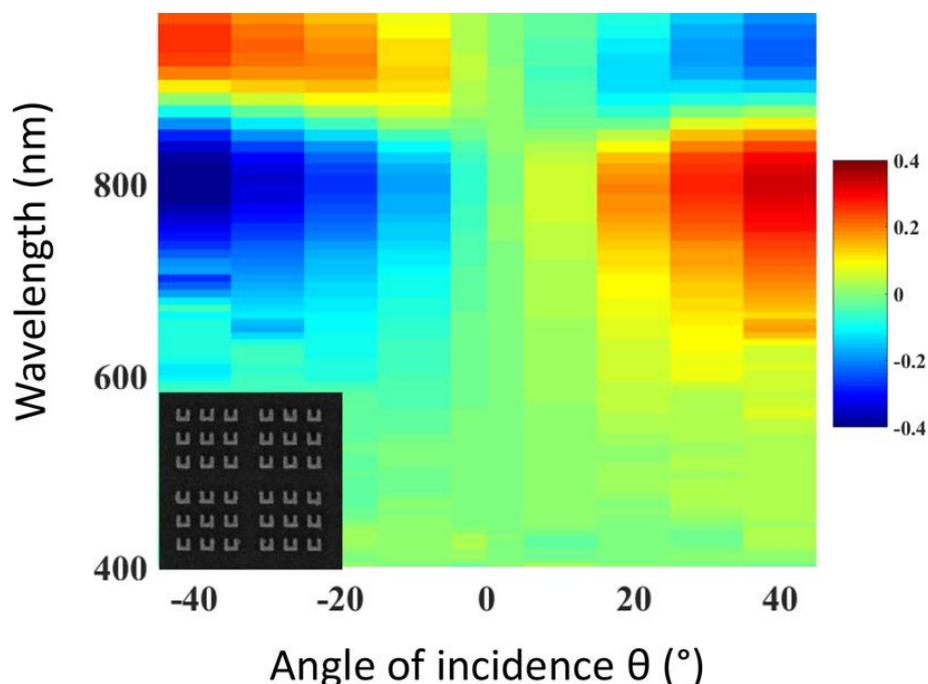


Figure 9 : Dépendance spectrale du dichroïsme circulaire en fonction de l'angle d'incidence et de la longueur d'onde pour des résonateurs en U en or. Figure reproduite de [100].

Le grand avantage de ces résonateurs par rapport aux résonateurs véritablement chiraux est que le dichroïsme circulaire mesuré change de signe lorsque la direction d'observation est inversée par rapport à la normale à la surface. Il a été montré numériquement que les

propriétés du champ proche doivent également changer de signe lorsque la direction d'illumination est inversée [101]. Cela ouvre la possibilité d'observer la différence de réponse LSPR sur le même échantillon (mêmes résonateurs, même configuration de biomolécules greffées) et donc dans les mêmes conditions expérimentales plutôt que de changer de métasurface pour sonder deux dichroïsmes opposés. C'est pourquoi la détection des propriétés chirales de biomolécules a été réalisée avec ces antennes.

Partie 3. Nécessité d'une cartographie spectroscopique et polarimétrique

Pour détecter la signature chirale de biomolécules au voisinage de surfaces, il faut détecter le dichroïsme circulaire à la longueur d'onde d'intérêt. Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser des instruments optiques qui permettent à la fois une analyse spectroscopique et polarimétrique.

Par exemple, le spectropolarimètre pour détecter le dichroïsme circulaire comme le Jasco J-815 a été utilisé lors de cette thèse pour détecter la conformation de molécules en solution. C'est l'appareil utilisé dans la littérature pour des articles précédemment cités : Slocik & al. [73] pour la détection de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des peptides ou encore Hendry & al. [36] pour la détection de métasurfaces en forme de gammadions couplées à des protéines. Ce type de mesure ne permet pas d'accéder à tous les modes de résonance des surfaces plasmoniques utilisées. En outre, une analyse fine quant à la provenance du signal CD n'est pas possible. Ceci est important dans la mesure où les imperfections des surfaces peuvent créer du CD [85] et un signal CD non nul peut être dû uniquement à la superposition des dichroïsmes et biréfringences linéaires [86]. La polarimétrie généralisée, donc la détermination de la matrice de Mueller, est alors nécessaire pour découpler ces différents effets. Pour mesurer une matrice de Mueller, plusieurs appareils existent, la principale différence entre les appareils cités est la méthode pour générer et analyser la polarisation de la lumière.

A titre d'exemple, voici quelques appareils utilisés dans la littérature pour mesurer la matrice de Mueller :

- Un ellipsomètre basé sur la rotation conjointe de deux compensateurs afin de générer et d'analyser différents états de polarisation [102], [103] : l'étude des erreurs systématiques a été grandement étudié [104]–[106].
- Un polarimètre de Mueller basé sur des modulateurs à cristaux liquides couplés à un polariseur linéaire et une lame quart d'onde [107], [108].
- Un polarimètre basé sur des modulateurs photoélastiques [109], [110].

Dans le cadre de cette thèse, le choix s'est porté sur deux instruments :

- Un ellipsomètre commercial V-VASE (J. A. Woolam) qui utilise un compensateur en entrée. Cet ellipsomètre permet de mesurer les trois premières lignes de la matrice de Mueller. L'intérêt premier de cet appareil est sa facilité d'utilisation de par son caractère commercial et le fait qu'il est présent à l'INSP. Certaines mesures ont été réalisées en Norvège au département de physique de NTNU (Norwegian University of

Science and Technology) dans l'équipe de M. Kildemo où est présent un ellipsomètre commercial qui permet de mesurer toute la matrice. Les résultats présentés sur les métasurfaces en U proviennent de ces appareils.

- Un micro-polarimètre de Mueller avec imagerie de la surface reposant sur le principe de deux lames quart d'onde tournantes en continu (inspiré de Arteaga & al. [103]) a été construit en transmission lors de la première partie de la thèse et a donné lieu à la publication d'un article scientifique [65]. Depuis ce μ -polarimètre est en train d'être monté en réflexion afin d'imager le plan de Fourier de la surface imagée.

Pour réaliser une analyse physique d'une matrice de Mueller, des décompositions permettent de résoudre certains problèmes d'interprétation [111]. En voici les principales :

- La décomposition polaire pour des matrices non dépolarisantes. $M=M_D M_R$ (ou M est la matrice déterminée, M_D la matrice d'un diatténuateur et M_R la matrice d'un retardeur) avec non commutativité de M_D et M_R [112].
- La décomposition polaire généralisée aux matrices dépolarisantes dite de Lu-Chipman. $M=M_\Delta M_R M_D$ (ou M est la matrice déterminée, M_Δ la matrice d'un dépolariseur, M_D la matrice d'un diatténuateur et M_R la matrice d'un retardeur) avec toujours la non commutativité [113].
- La décomposition en somme ou dite de Cloude $M=\lambda_1 M_1 + \lambda_2 M_2 + \lambda_3 M_3 + \lambda_4 M_4$ avec $\lambda_i > 0$ et M_i sont des matrices non-dépolarisantes [114].
- La décomposition logarithmique qui permet de séparer les effets polarisants de ceux dépolarisants. Cette décomposition a le grand avantage de garantir l'unicité des matrices trouvées [115]–[117] mais n'est applicable qu'en transmission.

La dernière décomposition est celle qui a été utilisée pour analyser certaines propriétés de la matrice notamment l'origine du dichroïsme circulaire pour savoir si il provient d'un champ chiral ou bien d'un couplage entre dichroïsmes et biréfringences linéaires [86]. Cette décomposition est présentée plus en détail dans le Chapitre 3 du manuscrit. C'est l'unicité de la décomposition qui a motivé ce choix.

La polarimétrie de Mueller trouve des applications diverses dans d'autres domaines telles que l'ophtalmologie, l'étude de tissus biologiques [118] ou bien l'anticontrafaçon [65].

Partie 4. Financements, partenaires, publications et communications scientifiques

Ce travail a été permis grâce au support et au financement de l'ANR Chiroptmol (ANR-18-CE09-0010-01).

L'Institut des Matériaux a également participé au financement de ce travail (IP/U iMAT).

Les travaux ont été menés principalement à l'Institut des Nanosciences de Paris (INSP) et au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS) à Sorbonne Université.

Divers laboratoires et institutions partenaires ont également rendu possible ce projet :

- Institut Fresnel (via l'ANR Chiroptmol)

- Institut Biologie Paris Seine (Sorbonne Université)
- Institut Parisien de Chimie Moléculaire (Sorbonne Université)
- Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques (Université Paris Cité)
- Norwegian University of Science and Technology (Trondheim, Norvège)
- Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire)
- Laboratoire Energétique Mécanique Electromagnétisme (Université Paris Nanterre)
- Labex Excellence MATISSE

Ce travail a donné lieu à deux publications scientifiques dans des revues à comité de lecture :

- M. Nicolas, I. Soumahoro, L. Zhang, G. Guida, W. Daney de Marcillac, C. Schwob, S. Boujday et B. Gallas, « Mueller micropolarimeter for color imaging of aluminum metasurfaces », *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 38, no 4, p. 1184, avr. 2021, doi: 10.1364/JOSAB.416833
- M. Nicolas, B. Beito, M. Oliveira, M. Tudela Martins, B. Gallas, M. Salmain, S. Boujday, V. Humblot, « Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices », *Antibiotics*, vol. 11, no 1, p. 13, déc. 2021, doi: 10.3390/antibiotics11010013.

Plusieurs communications scientifiques ont également été réalisées :

- Presentation orale : European Optical Society Annual Meeting (EOSAM) 13 - 17 septembre 2021, Rome, Italie, "Polarimetric properties of plasmonic metasurfaces for the characterization of adsorbed antibacterial peptides"

Mathieu Nicolas^{1,2}, *Jayeeta Amboli*³, *Lu Zhang*^{1,2}, *Catherine Schwob*¹, *Jean-Marc Krafft*², *Christophe Méthivier*², *Guillaume Demesy*³, *Brian Stout*³, *Vincent Humblot*^{2,4}, *Yenni Benkaci*¹, *Nicolas Bonod*³, *Souhir Boujday*², and *Bruno Gallas*¹

¹ Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Institut des NanoSciences de Paris, UMR 7588, 75005 Paris, France, ² Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR 7197, 75005 Paris, France, ³ Aix-Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, 13397 Marseille, France, ⁴ FEMTO-ST Institute, Université Bourgogne Franche-Comté, CNRS, UMR 6174, 25030 Besançon CEDEX, France

- Presentation orale : GdR B2i BioIngénierie des Interfaces, 21 - 22 septembre 2021, Toulouse, "Exploring the conformation of antibacterial peptides adsorbed on plasmonic metasurfaces by polarized light"

Mathieu Nicolas^{1,2}, *Lu Zhang*^{1,2}, *Catherine Schwob*², *Jean-Marc Krafft*¹, *Christophe Méthivier*¹, *Nicolas Bonod*³, *Vincent Humblot*^{1,4}, *Bruno Gallas*², and *Souhir Boujday*¹

¹ Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR 7197, 75005 Paris, France, ² Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Institut des NanoSciences de Paris, UMR 7588, 75005 Paris, France, ³ Aix-Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, 13397 Marseille, France, ⁴ FEMTO-ST Institute, Université Bourgogne Franche-Comté, CNRS, UMR 6174, 25030 Besançon CEDEX, France

- Poster : 11èmes Journées Scientifiques C'Nano-PACA 25-27 septembre 2019, "Pseudo-chiral resonators for the optical detection of chiral molecules"

Mathieu Nicolas^{1,2}, Lu Zhang^{1,2}, Willy Daney de Marcillac¹, Vincent Humblot², Christophe Piesse³, Catherine Schwob¹, Souhir Boujday², Bruno Gallas¹

¹ Sorbonne Université, CNRS, Institut des NanoSciences de Paris (INSP), 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France, ² Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France, ³ Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), 7 quai Saint-Bernard, F-75005 Paris, France

Chapitre 2 : Cadre théorique et simulations numériques associés aux résonateurs en U

Partie 1. Cadre théorique : vers une matrice de Mueller pour caractériser modalement les métasurfaces

L'objectif principal du travail ici présenté est de détecter les effets causés par la chiralité de biomolécules lorsqu'elles sont greffées sur des surfaces. Les métasurfaces utilisées correspondent à des surfaces contenant des résonateurs plasmoniques en forme de U. En effet, comme vu dans la partie introductive les différents modes de résonance associés à cette forme permettent d'accéder à plusieurs propriétés polarimétriques. Les quatre modes de résonance sont : le dipôle électrique, le dipôle magnétique, le quadropôle électrique et finalement un mode magnétique caractérisé par la présence d'un fort couplage magnéto-électrique. Ces résonances proviennent de l'oscillation d'électrons libres, confinés dans la nanostructure, excités par un champ électromagnétique. Les propriétés polarimétriques et directionnelles du champ rayonné peuvent alors être identifiées à des modes multipolaires. L'intérêt étant de générer un champ approprié pour la détection de la chiralité de molécules au voisinage des structures. Brièvement, l'origine physique de ces résonances sera expliquée. En l'occurrence, l'étude de la résonance plasmonique, des équations constitutives du champ associé aux antennes et de l'utilisation des résonateurs pour détecter la chiralité en surface poseront les bases nécessaires afin de comprendre le travail expérimental réalisé par la suite.

1. La résonance plasmonique de surface localisée

La métasurface considérée contient des résonateurs en U métallique. Il faut donc connaître les propriétés d'un métal afin d'obtenir les modes de résonances associés. En l'occurrence, l'utilisation du modèle de Drude est communément acceptée. Dans des domaines fréquentiels pour lesquels la partie réelle de la permittivité est négative, il est possible d'observer le phénomène de résonance de plasmon de surface localisée.

En considérant une nanoparticule métallique sphérique qui est en approximation un réseau de cations fixe baigné dans les électrons libres du métal qui sont seuls en mouvement, et en appliquant un champ électrique sur la particule, le « gaz » d'électrons se déplace et une polarisation induite apparaît. Un champ électrique incident oscillant impliquera une réponse des électrons qui se comporteront comme un oscillateur forcé en présence d'une force de rappel introduite par la surface. L'équation du mouvement (4) de ces électrons est la suivante :

$$\frac{d^2u}{dt^2} + \gamma \frac{du}{dt} + \omega_0^2 u = -E_0 e^{i\omega t} \quad (4)$$

Avec u le déplacement des électrons, γ l'amortissement qui dépend du libre parcours moyen des électrons entre deux collisions, ω la pulsation du champ électrique incident et $\omega_0 = k/m$ la pulsation propre du plasma d'électrons (k la force de rappel et m la masse d'un électron). La solution obtenue pour u (5) suit :

$$u(\omega) = \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma\omega} \quad (5)$$

La polarisation étant directement proportionnelle au déplacement u , une formule pour la permittivité d'un métal (6) en découle avec A un facteur caractéristique de la force de rappel.

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon(0) + \frac{A}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma\omega} \quad (6)$$

La permittivité est modélisée par un oscillateur de Lorentz. Une résonance est présente et correspond à la LSPR d'une particule métallique.

L'abandon de la symétrie sphérique et l'utilisation de formes plus complexes permettent d'obtenir des résonances modales d'ordre supérieur [119]–[121]. Dans le cadre d'un résonateur en U, les résonances sont plus complexes. Il faut considérer des résonances quadrupolaires.

Ceci étant, ce bref rappel sur la plasmonique permet de montrer la dépendance lorentzienne du tenseur de permittivité diélectrique. Ce raisonnement s'applique aussi aux microcourants qui présentent des résonances donc les tenseurs magnétiques et magnéto-électriques seront également décrits par des profils lorentziens, et finalement les multipôles aussi.

L'étude des équations constitutives du champ permet de mettre en évidence l'influence des modes de résonance des résonateurs en U sur les propriétés polarimétriques détectées. Pour cela, il faut partir des équations de Maxwell en les appliquant au système considéré.

2. Equations constitutives du champ pour un résonateur en U

On considère un matériau au sein duquel il est possible, grâce à la différence entre la longueur d'onde du champ considéré, la taille des résonateurs ainsi que la distance entre eux, de moyenner les charges, courants et champs localement. Les équations de Maxwell à l'échelle microscopique associées aux champs électriques \mathbf{E} et inductions magnétiques \mathbf{B} sont le cadre d'étude. Connaissant la polarisation macroscopique électrique \mathbf{P} (moyenne des moments dipolaires microscopiques), l'aimantation \mathbf{M} (moyenne des moments magnétiques microscopiques : terme en $r\lambda$ décrivant des boucles de courants à l'échelle du résonateur), la perméabilité diélectrique du vide ϵ_0 et la perméabilité magnétique du vide μ_0 ; il est possible de définir le déplacement électrique \mathbf{D} (7) et le champ magnétique auxiliaire \mathbf{H} (8):

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (7)$$

$$\vec{H} = \frac{1}{\mu_0} \vec{B} - \vec{M} \quad (8)$$

Viennent ensuite les équations constitutives classiques (9) et (10):

$$\vec{D} = \boldsymbol{\epsilon} \vec{E} \quad (9)$$

$$\vec{B} = \boldsymbol{\mu} \vec{H} \quad (10)$$

ϵ et μ sont alors respectivement la permittivité relative et la perméabilité relative. Ces deux grandeurs sont des tenseurs 3x3 qui sont dans le cadre de matériaux homogènes anisotropes diagonalisables dans un espace de vecteurs propres.

Cependant, dans le cadre de cette thèse, le milieu considéré est un milieu bi-anisotrope c'est-à-dire qu'il existe un couplage entre les composantes électriques et magnétiques du champ. En 1979, Jaggard & al. [122] ont montré que au sein d'un milieu chiral, un couplage magnéto-électrique est présent c'est-à-dire que le champ électrique influence l'aimantation tandis que le champ magnétique influence la polarisation électrique. Il convient [123] alors d'insérer deux nouveaux tenseurs $\boldsymbol{\xi}$ et $\boldsymbol{\zeta}$ dans les équations constitutives (11) :

$$\begin{bmatrix} \vec{D} \\ \vec{B} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{\varepsilon} & \boldsymbol{\xi} \\ \boldsymbol{\zeta} & \boldsymbol{\mu} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \vec{E} \\ \vec{H} \end{bmatrix} \quad (11)$$

Si le matériau est réciproque (par opposition aux matériaux à effet Faraday, typiquement), il faut également considérer les contraintes suivantes sur les tenseurs (12) (13) et (14):

$$\boldsymbol{\varepsilon}^t = \boldsymbol{\varepsilon} \quad (12)$$

$$\boldsymbol{\xi}^t = -\boldsymbol{\zeta} \quad (13)$$

$$\boldsymbol{\mu}^t = \boldsymbol{\mu} \quad (14)$$

Généralement, ces relations sont représentées en utilisant le formalisme de Tellegen [124], [125] (15):

$$\begin{bmatrix} \vec{D} \\ \vec{B} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_0 \boldsymbol{\varepsilon}_r & -i\boldsymbol{\kappa}\sqrt{\mu_0\varepsilon_0} \\ i\boldsymbol{\kappa}\sqrt{\mu_0\varepsilon_0} & \mu_0 \boldsymbol{\mu}_r \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \vec{E} \\ \vec{H} \end{bmatrix} \quad (15)$$

On a introduit ici le paramètre de chiralité $\boldsymbol{\kappa}$ qui est un unique tenseur permettant de décrire le couplage magnéto-électrique. Ce tenseur n'est d'ailleurs pas exclusivement associé aux objets chiraux même s'il est souvent dénommé comme étant le « tenseur de chiralité ».

Ces relations constitutives peuvent être utilisées pour décrire la réponse d'un résonateur unique en forme de U montré sur la Figure 10.

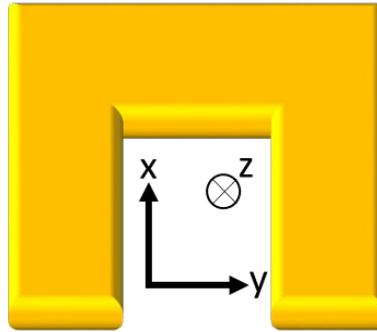


Figure 10 : Élément en U de la métasurface considérée pour la détermination des équations constitutives avec les axes associés.

Dans ce cadre, sans dispersion spatiale, les relations constitutives (16) et (17) peuvent être légitimement considérées pour notre structure [96], [97]. Cela est obtenu en s'inspirant des travaux de Marques & al. [126] et de Saadoun & al. [127] réalisés sur des résonateurs possédant la forme Ω . Les symétries demeurent effectivement identiques dans les deux cas.

$$\vec{D} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_{zz} \end{bmatrix} \vec{E} + \sqrt{\mu_0\varepsilon_0} \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -i\kappa_{yz} \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \vec{H} \quad (16)$$

$$\vec{B} = \sqrt{\mu_0\varepsilon_0} \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & i\kappa_{zy} & 0 \end{bmatrix} \vec{E} + \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & \mu_{zz} \end{bmatrix} \vec{H} \quad (17)$$

3. Origine du dichroïsme circulaire des nanostructures

Afin de détecter la chiralité de molécules en surface, l'idée principale est de générer un champ chiral exacerbé proche de la molécule. Cette molécule chirale « verra » alors ce champ et en champ lointain, il sera possible de détecter l'influence de la molécule.

La chiralité optique C représenté sur l'équation (18), introduite par Lipkin en 1964 [70], détermine le degré de chiralité d'un champ : c'est-à-dire l'asymétrie entre les lignes de champ autour de l'axe de propagation.

$$C \equiv \frac{\epsilon_0}{2} \vec{E} \nabla \vec{E} + \frac{1}{2\mu_0} \vec{B} \nabla \vec{B} \quad (18)$$

Les travaux de Tang & Cohen en 2010 [71], permettent d'exprimer le dichroïsme circulaire ou asymétrie chirale en fonction d'une partie dépendante de la structure considérée et d'une autre dépendante du champ.

En l'occurrence, une structure (ou molécule) chirale soumise à un champ électromagnétique va générer un moment dipolaire électrique \mathbf{p} et un moment dipolaire magnétique \mathbf{m} . La théorie dipolaire qui permet classiquement de relier les moments dipolaires électriques et magnétiques aux champs électriques et magnétiques est correcte pour des particules relativement symétriques. Classiquement, la relation suivante permet de définir les dipôles électriques \mathbf{p} et magnétiques \mathbf{m} induits pour un matériau bi-anisotrope avec α^{ee} , α^{mm} et α^{em} correspondant aux tenseurs de polarisabilité électrique, magnétique et magneto-électrique (19) :

$$\begin{bmatrix} \vec{p} \\ \vec{m} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha^{ee} & \alpha^{em} \\ -(\alpha^{em})^t & \alpha^{mm} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \vec{E} \\ \vec{B} \end{bmatrix} \quad (19)$$

Les tenseurs de polarisabilité sont des valeurs complexes et sont notés ici (20) :

$$\alpha^{ij} = \alpha'ij + i \alpha''ij \quad (20)$$

Le taux d'excitation de la structure (ou de la molécule) A^\pm est connu depuis 1965 et les travaux de Harris [128] (<> pour exprimer le moyennage temporel) (21):

$$A^\pm = \langle \vec{E} \vec{p} + \vec{B} \vec{m} \rangle \quad (21)$$

Il est donc possible d'exprimer le taux d'excitation uniquement en fonction des champs (en ne considérant que la partie réelle) et des tenseurs de polarisabilité (et ω la pulsation temporelle associée à la lumière incidente) (22) :

$$A^\pm = \frac{\omega}{2} (\alpha''^{ee} |E|^2 + \alpha''^{mm} |B|^2) \pm \alpha''^{em} \omega \text{Im}(E^* B) \quad (22)$$

Pour une molécule, le terme α^{mm} associé au dipôle magnétique est négligeable, de plus on reconnaît en $\omega \text{Im}(E^* B)$ et la moyenne temporelle de la chiralité optique définie en (18). On peut alors ré-exprimer (22) par (23) :

$$A^\pm = \frac{2}{\epsilon_0} (\omega U_e \alpha''^{ee} \pm \langle C \rangle \alpha''^{em}) \quad (23)$$

Avec $U_e = \frac{\epsilon_0}{4} |E|^2$ la moyenne temporelle de la densité associée à l'énergie électrique.

Finalement, on définit le facteur de dissymétrie ou bien dichroïsme circulaire $CD = 2 \frac{A^+ - A^-}{A^+ + A^-}$ tel que (24) :

$$CD = - \left(\frac{\alpha''^{em}}{\alpha''^{ee}} \right) \left(\frac{2C}{\omega U_e} \right) \quad (24)$$

Par conséquent pour avoir un CD non nul, deux conditions de non nullité sont nécessaires :

- $\left(\frac{\alpha''^{em}}{\alpha''^{ee}} \right) \neq 0$: un couplage magnéto électrique non nul pour le système considéré
- $\left(\frac{2C}{\omega U_e} \right) \neq 0$: un champ chiral

La chiralité de la molécule et de la lumière sont nécessaires pour observer du dichroïsme circulaire.

En considérant une nanostructure, la disparition du terme α^{mm} semble abusive mais la conclusion reste la même c'est-à-dire la nécessité de considérer un champ chiral et un couplage magnéto-électrique non nul pour l'antenne afin de générer du dichroïsme circulaire localement. Ainsi la biomolécule chirale sera excitée par le champ chiral généré par le résonateur en U. Ceci permettant d'observer du dichroïsme circulaire en champ lointain qui dépendra conjointement du résonateur et de la molécule. Une autre façon d'exciter les molécules chirales est *via* les gradients de champs qui existent à proximité des résonateurs [129].

Ainsi, le dichroïsme circulaire va dépendre de tous les modes de résonance associées aux structures considérées. Sur les résonateurs en U, il est possible dans une certaine mesure d'isoler chacun de ces modes spectroscopiquement et d'étudier leurs variations de réponse polarimétrique lorsqu'une molécule est présente ou non au voisinage de l'antenne.

Afin d'étudier ces modes indépendamment les uns des autres, l'utilisation de la matrice de Mueller est d'intérêt afin d'obtenir une cartographie polarimétrique d'un échantillon comme expliqué dans le Chapitre 1. Ce formalisme sera brièvement décrit dans le paragraphe suivant.

4. Le formalisme de Stokes-Mueller

Classiquement, la lumière, et donc le champ électromagnétique, est décrit *via* le formalisme de Jones. En effet, ce formalisme permet de décrire le champ et ses différentes orientations dans l'espace. Plus particulièrement tous les états de la lumière polarisée sont décrits dans cet espace complexe à deux dimensions et la réponse d'un objet à une lumière polarisée est donnée par la matrice de Jones. Les valeurs des matrices de Jones sont complexes ce qui implique en fait d'avoir sept paramètres indépendants à déterminer (à une phase arbitraire près). En outre, et surtout, la lumière non-polarisée n'est pas descriptible dans ce cadre. Enfin, il considère l'amplitude du champ et non l'intensité lumineuse qui est la quantité directement mesurée par une caméra ou un détecteur CCD par exemple. C'est pourquoi il semble intéressant ici d'utiliser le formalisme de Stokes-Mueller. Il contient une base réelle qui décrit tout type de lumière. Pour ce faire, on utilise un espace à quatre dimensions pour décrire l'intensité lumineuse comme dans l'équation (25). Le champ électromagnétique est maintenant décrit par \mathbf{S} le vecteur de Stokes.

$$\vec{S} = \begin{bmatrix} I_x + I_y \\ I_x - I_y \\ I_{45^\circ} - I_{-45^\circ} \\ I_{\sigma^+} - I_{\sigma^-} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \leftrightarrow + \updownarrow \\ \leftrightarrow - \updownarrow \\ \nearrow - \nwarrow \\ \curvearrowright - \curvearrowleft \end{bmatrix} \quad (25)$$

Il est alors possible de décrire une polarisation elliptique quelconque (S_e pour le vecteur de Stokes associé à cette polarisation est présenté sur l'équation (26)) ou ψ est l'angle de l'axe de l'ellipse et χ l'ellipticité. On retrouve l'ellipticité présentée dans le Chapitre 1 qui est reliée au dichroïsme circulaire CD tel que $CD = \sin(2\chi)$.

$$\vec{S}_e = \begin{bmatrix} 1 \\ \cos(2\psi)\cos(2\chi) \\ \sin(2\psi)\cos(2\chi) \\ \sin(2\chi) \end{bmatrix} \quad (26)$$

Enfin, la réponse d'un objet à la lumière est donnée par la matrice de Mueller qui est de dimension 4x4 afin de respecter la base choisie. Et donc, on obtient l'expression d'un vecteur de Stokes S_{trans} après transmission à travers un échantillon détenant la matrice de Mueller M_{trans} (27) :

$$\vec{S}_{trans} = M_{trans} \vec{S}_{inc} \quad (27)$$

La transition du formalisme de Jones au formalisme de Mueller est réalisée sans problèmes mais ce sans bijection. En effet, toute matrice de Mueller n'est pas forcément exprimable dans le formalisme de Jones : un échantillon qui dépolarise en partie ou totalement la lumière se représente dans le formalisme de Mueller et non pas en formalisme de Jones. Le passage de la matrice de Jones à la matrice de Mueller se fait selon les équations (28) et (29) (\otimes correspond au symbole de Kronecker) ou M est la matrice de Mueller associée à la matrice de Jones J et A la matrice de passage d'un formalisme à l'autre. Ce passage est utilisé lors du calcul de la matrice de Mueller en simulation numérique qui donne accès aux valeurs complexes des champs électromagnétiques.

$$M = A(J \otimes J^*)A^{-1} \quad (28)$$

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & -i & -i & 0 \end{bmatrix} \quad (29)$$

Dans le cas de la transmission et pour des valeurs faibles, assez pour réaliser un développement exponentiel au premier ordre, chaque élément de la matrice a une signification physique décrite par Azzam dès 1978 [130] selon la matrice donnée par l'équation (30) :

$$M = \begin{bmatrix} T_{11} & LD & LD' & CD \\ LD & T_{22} & CB & -LB' \\ LD' & -CB & T_{33} & LB \\ CD & LB' & -LB & T_{44} \end{bmatrix} \quad (30)$$

Ou ici chaque abréviation a la signification suivante :

- T_{ii} : la transmission (ou la réflexion) isotropique

- LD : le dichroïsme linéaire selon les axes 0-90 °
- LD' : le dichroïsme linéaire selon les axes 45-135 °
- LB : la biréfringence linéaire selon les axes 0-90 °
- LB' : la biréfringence linéaire selon les axes 45-135 °
- CB : la biréfringence circulaire
- CD : le dichroïsme circulaire

On voit ici un avantage supplémentaire du formalisme de Mueller dans notre cas qui est de fournir directement un accès aux paramètres qui nous intéressent, en particulier le CD (MM_{14} ou MM_{41}). On voit aussi que la matrice de Mueller donne accès aux grandeurs conjuguées d'un même effet, notées ici dichroïsme et biréfringence. Enfin, on fera attention au fait que les relations entre les éléments donnés dans l'équation (30) sont valides en transmission, en particulier certains éléments de la première ligne et de la première colonne deviennent opposés en réflexion.

Partie 2. Caractériser les différents modes de résonance et le champ proche : une simulation par éléments finis

1. Les différents modes de résonance

Les résonateurs considérés sont sujets à des phénomènes de résonance pour lesquelles le champ est exacerbé au voisinage de l'antenne métallique. Ces résonances dépendent de plusieurs facteurs :

- La longueur d'onde : il y a une dépendance spectroscopique des résonances reliées au profil lorentzien des tenseurs associés aux structures étudiées. Le champ sera exacerbé lorsque l'oscillation des électrons libres du métal sera en résonance soit magnétique, soit électrique ou bien magnéto électrique.
- La taille des résonateurs : assez naïvement, la valeur de la fréquence de résonance est directement reliée à la taille d'une antenne. Ainsi, dans le cas d'un U, la taille des bras ou de la base sera cruciale dans le positionnement des résonances sur le spectre électromagnétique de la lumière.
- La polarisation incidente de la lumière : l'orientation du champ et plus particulièrement la polarisation de ce champ joue sur la l'excitation de certaines résonances ou d'autres.

Dans le cadre de résonateurs en U, c'est bien l'oscillation des électrons libres du métal qui va permettre de faire « résonner la structure ». La Figure 11 présente schématiquement les quatre modes de résonance c'est-à-dire [96] :

- a) Un mode avec une forte contribution de type quadrupôle électrique
- b) Un mode « magnétique » avec un fort couplage magnéto-électrique
- c) Un mode électrique, principalement dipolaire électrique
- d) Un mode magnétique appelé comme cela mais qui comporte en fait un fort moment dipolaire électrique [96]

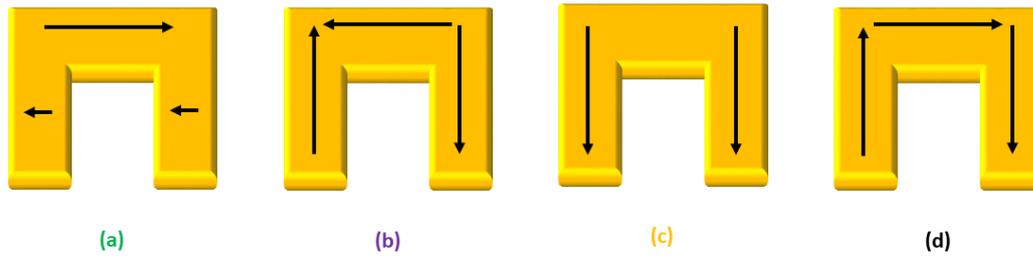


Figure 11 : Représentation des déplacements macroscopiques des électrons libres pour les résonances associées aux modes dits (a) quadrupolaire électrique (b) magnéto-électrique (c) dipolaire électrique et (d) dipolaire magnétique.

2. Cadre de la simulation numérique

Ces modes sont associées à des longueurs d'ondes et des polarisations incidentes du champ particulières. Des simulations numériques réalisées grâce à un logiciel d'éléments finis (ANSYS Electronics Suite 2020 en collaboration avec le LEME – U. Paris Nanterre) permettent de connaître la gamme spectrale ainsi que la polarisation associée à chacune de ces résonances.

Les résonateurs sont positionnés sur un substrat et plongés dans un milieu ambiant. Le métal choisi a les constantes optiques de l'or, le substrat de 1000 nm d'épaisseur a les constantes optiques de la silice et le milieu ambiant est ici l'eau ($n=1.33$, constant). La Figure 12 présente la cellule unité utilisée pour le calcul. Cette cellule fait 400 nm de côté et est rendue périodique suivant les directions x et y en utilisant des ports de Floquet comme source suivant z. Ces ports de Floquet sont situés à 1000 nm des résonateurs. Les ports de Floquet servent aussi de conditions radiatives, c'est-à-dire qu'ils ne réfléchissent pas les champs : le milieu dans lequel ils sont plongés peut être considéré comme semi-infini.

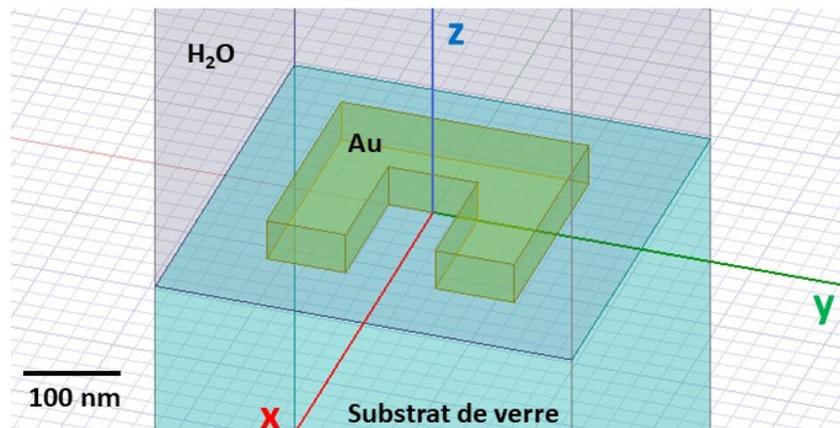


Figure 12 : Cellule unité associée à la simulation numérique réalisée sur Ansys-HFSS. L'illumination considérée est réalisée depuis le substrat de verre.

Les simulations ont été réalisées pour des résonateurs en U qui possèdent les dimensions montrées dans la Figure 13 .

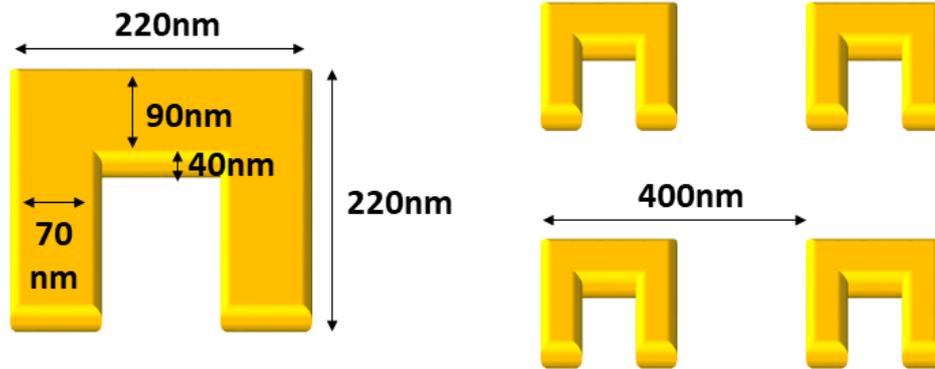


Figure 13 : (a) Dimensions du résonateur en U utilisé pour la simulation numérique, (b) les résonateurs sont placés sur un réseau carré de pas 400 nm.

Les antennes sont positionnées sur un réseau donc l'influence de la diffraction est importante. Ce qui donne des anomalies de Rayleigh [131] en l'occurrence des pics parasites dans les conditions où le réseau génère une onde diffractée se propageant parallèlement à l'interface verre/air, soit dans le verre, soit dans l'air. Afin de s'affranchir de ce souci, une des solutions, sans réaliser une interpolation ou bien un fit grossier de la courbe, est de réaliser le calcul pour différents angles d'incidence et différents pas du réseau puis de moyenner indépendamment chaque résultat. Ceci est possible dans le cas où le résultat est une intensité (ou bien un coefficient de transmission ou de réflexion associé à une intensité) car la somme cohérente des différentes intensités représente bien la résultante de la superposition incohérente de signaux qui proviendraient de différentes configurations de réseau ou de mesure. On pourra toujours arguer du fait que les imperfections de la réalisation expérimentale et de l'ouverture numérique du faisceau entre autres contribuent à conduire à la superposition incohérente de signaux provenant des zones ayant des propriétés géométriques différentes.

3. Résultats en transmission

Il est possible de tracer la transmission associée à une lumière en incidence normale avec une polarisation linéaire parallèle ou perpendiculaire aux bras du U. Ceci permet de repérer les différents modes de résonance décrits précédemment. Ensuite, pour imager ces quatre modes, il convient d'observer les cartes de champ sur la surface des résonateurs pour observer l'exacerbation du champ au voisinage des antennes. La Figure 14 montre les résultats obtenus pour les deux polarisations linéaires étudiées et en particulier comment l'effet de moyenne en intensité des réponses de différentes configuration permet de réduire la signature des anomalies de Rayleigh dans les spectres calculés.

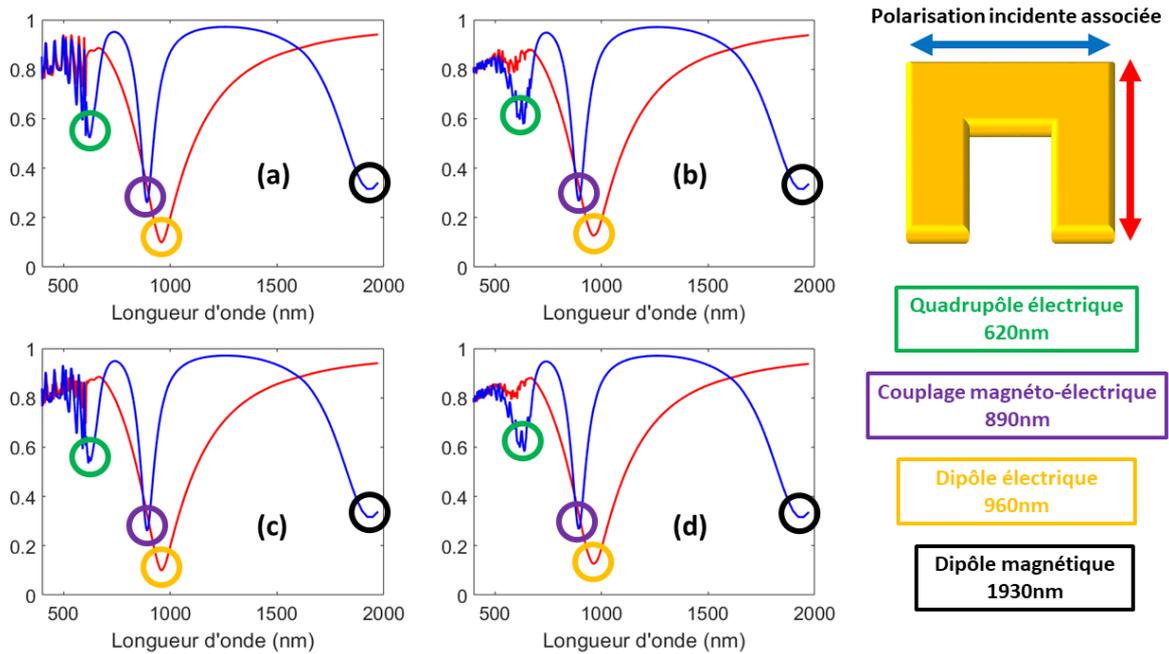


Figure 14 : Transmission simulée d'un réseau de résonateurs en U avec le résultat pour (a) un angle d'incidence de 0° et un pas de réseau de 400 nm (b) une moyenne sur 5 pas du réseau autour de la valeur centrale (360 nm, 380 nm, 400 nm 420 nm et 440 nm) (c) une moyenne sur 3 angles d'incidence autour de l'incidence normale (-2° , 0° et $+2^\circ$) et (d) une moyenne simultanée sur l'angle d'incidence et le pas du réseau. (e) présente l'orientation relative des polarisations par rapport à un résonateur ainsi que le code de couleur des modes excités.

La Figure 14 (a) présente le résultat pour l'incidence normale et un pas de réseau de 400 nm, comme attendu l'influence des anomalies de Rayleigh est forte dans la zone du visible proche UV. Pour éviter cela, une moyenne des courbes obtenues en intensité moyennées pour différents pas du réseau (5 courbes) (Figure 14 (b)), différents angles d'incidence (3 courbes) (Figure 14 (c)) et pour ces deux paramètres ensemble (15 courbes) (Figure 14 (d)) permet de « lisser » ces pics parasites. Entre (b) et (c), la moyenne la plus efficace semble être celle associée au pas du réseau. Cependant, le choix va se porter sur la dernière courbe pour laquelle les résultats obtenus sont bien plus interprétables.

Ceci étant, le point crucial de cette Figure n'est pas là mais plutôt dans la mise en évidence de différents modes de résonance : en associant une couleur à chaque mode il est possible de les repérer sur les spectres en transmission associés à chaque polarisation.

Lorsque la polarisation est perpendiculaire aux bras latéraux du résonateur, chacun peut observer ces modes dans différentes zones du spectre :

- Le quadrupôle électrique vers 620 nm
- Le couplage magnéto-électrique vers 890 nm
- Le dipôle magnétique vers 1930 nm

En revanche pour l'autre polarisation (parallèle au bras du bas du U), le dipôle électrique est le mode principalement observé vers 960 nm ainsi qu'un mode quadrupolaire électrique beaucoup plus faiblement vers 550 nm (associé à un courant transverse dans le bras latéral

du U). Ces observations en champ lointain sont associées à une répartition du champ électrique en champ proche propre à chaque mode de résonance.

Il est possible, grâce au logiciel de calcul par éléments finis, de montrer les cartes de champ associées à ces modes de résonance. Ces cartes sont intéressantes au voisinage des résonateurs car c'est à cet endroit que les molécules à sonder seront présentes. Par conséquent, le calcul des champs électromagnétiques pour une polarisation et une longueur d'onde donnée sur une surface située au milieu du U (à 20 nm de hauteur) permet de visualiser les propriétés des modes. Par soucis de clarté, il sera montré des exacerbations de champ après normalisation par un champ E_0 calculé en l'absence de structure. La représentation de

cette exacerbation $\frac{|E|}{|E_0|} = \frac{\sqrt{E_x^2 + E_y^2 + E_z^2}}{|E_0|}$ pour chaque mode rend compte des différences en champ proche (Figure 15).

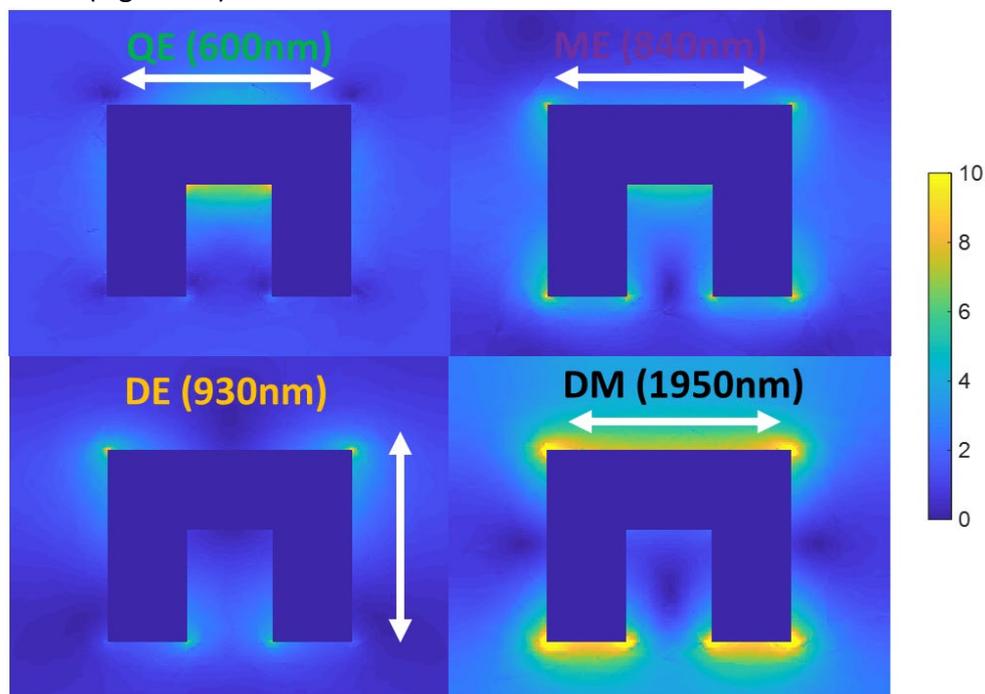


Figure 15 : Représentation de l'exacerbation du champ électrique (E/E_0) associée à chacun des modes en transmission au voisinage d'une résonateur en U avec une illumination en incidence normale.

En polarisation perpendiculaire aux bras latéraux, pour le mode associé au quadripôle électrique, le champ est exacerbé localement au niveau de la base du U alors que pour le mode associé au couplage magnéto-électrique le champ est exacerbé dans les coins du U et enfin pour le mode magnétique, il est principalement localisé au bout des bras. De même les valeurs d'exacerbation sont différentes : l'exacerbation maximale pour le mode associé au quadripôle électrique est de 9.2, celle pour le mode associé au couplage magnéto-électrique est de 10.2 et enfin celle associée au mode magnétique est de 17.3. Pour le mode électrique (généré *via* une polarisation incidente linéaire parallèle aux bras latéraux), le champ est principalement localisé dans certains coins de l'antenne avec une exacerbation maximale de 8.9.

Ces simulations permettent d'avoir une idée de la dépendance spectroscopique et polarimétrique des modes en champ proche et en champ lointain. Cependant, l'approche jusqu'ici considérée c'est-à-dire pour des polarisations incidentes uniquement linéaires n'est pas suffisante. En effet, une génération de polarisations plus complexes permettrait d'exacerber plus fortement et plus précisément ces modes. Par conséquent, l'utilisation du formalisme de Stokes-Mueller et non plus celui de Jones permet de réaliser une étude polarimétrique plus approfondie de ces modes de résonance.

Partie 3. Matrices de Mueller des résonateurs en U et caractérisation au changement de milieu

Il est possible de tracer les matrices de Mueller théoriques obtenues pour une onde réfléchie en incidence oblique sur des résonateurs en U.

1. Matrices de Mueller simulées en incidence oblique

En réalisant une simulation numérique avec les mêmes paramètres que précédemment (même cellule unité, mêmes dimensions et mêmes matériaux), une matrice de Mueller en réflexion est calculée. L'étude est réalisée en réflexion et non pas en transmission car expérimentalement pour réaliser un suivi de l'adsorption de molécules, la mesure en transmission est impossible pour cause d'encombrement stérique : la cellule liquide qui permet de mesurer les antennes n'est utilisable qu'en réflexion. Le calcul est réalisé pour un angle d'incidence de 45° car expérimentalement, c'est l'angle pour lequel les éléments MM_{14} et MM_{41} (caractéristiques du dichroïsme circulaire) sont maximaux [100]. Toujours pour réduire la signature des anomalies de Rayleigh dans les spectres calculés, 25 simulations numériques ont été réalisées et moyennées. Le Tableau 2 montre les paramètres utilisés avec en **bleu** la valeur utilisée lors des expériences et donc la valeur centrale pour la simulation numérique :

Tableau 2 : Angles d'incidence et pas du réseau utilisés lors de la simulation numérique réalisée en incidence oblique. En bleu, la valeur centrale utilisée lors du travail expérimental.

Angle d'incidence	41°	43°	45°				47°	49°	
Pas du réseau (nm)	Idem	Idem	360	380	400	420	440	Idem	Idem

Finalement, la matrice de Mueller associée est obtenue, elle est présentée sur la Figure 16. En bleu, la matrice calculée pour l'angle d'incidence de 45° et le pas du réseau de 400 nm et en rouge, la matrice moyenne des vingt-cinq simulations. Le lissage des pics associés aux anomalies de Rayleigh s'observe directement sur la Figure 16.

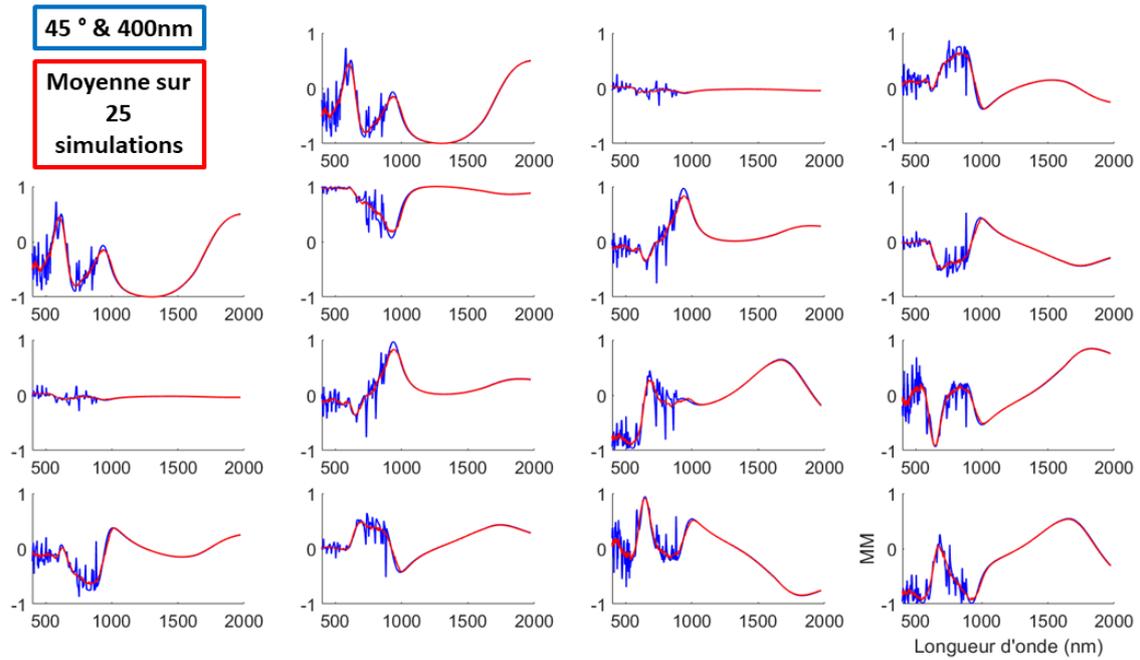


Figure 16 : Matrices de Mueller calculées grâce à la méthode des éléments finis pour un angle et un pas du réseau (en bleu, 45° et 400 nm) et pour une moyenne de 25 configurations (en rouge).

Pour plus de clarté, la Figure 17 montre la matrice après la réalisation de la moyenne et appelée « matrice de Mueller moyenne » dans toute la suite.

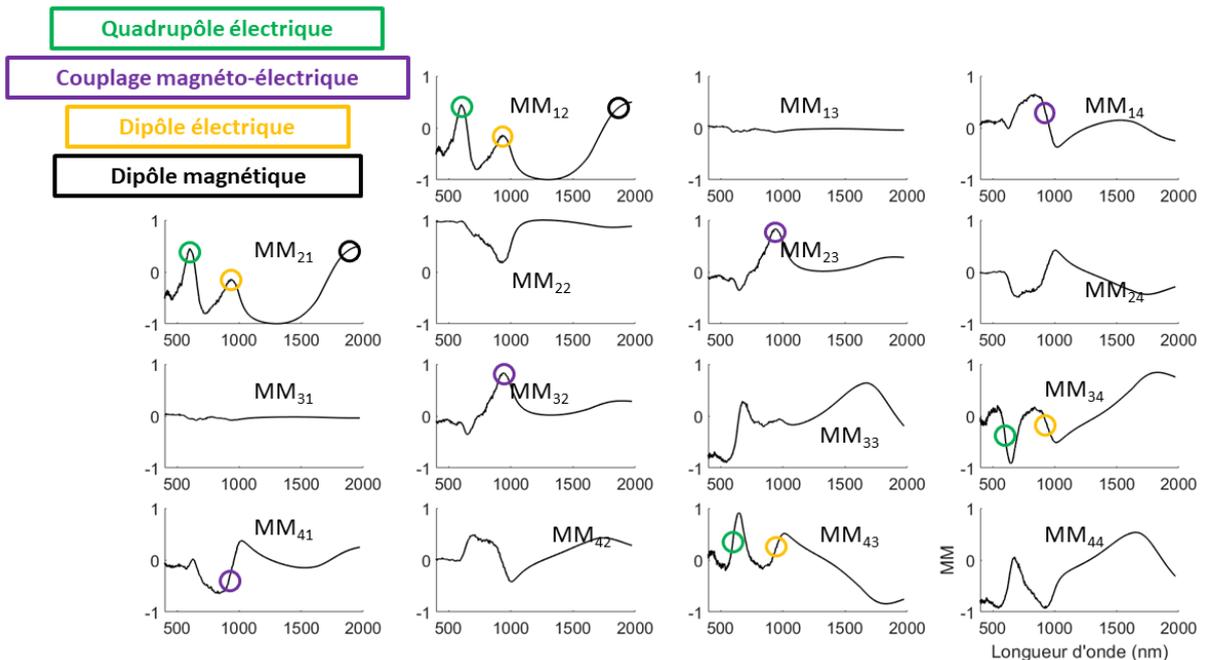


Figure 17 : Matrice de Mueller moyenne calculée à l'aide de la méthode des éléments finis pour une incidence oblique de 45° en réflexion : les structures dans les éléments de la matrice de Mueller associées aux différents modes sont repérées selon le code de couleur présenté.

Les relations de symétrie entre les éléments (équation (30)) sont obtenues et visualisables directement. Ces relations seront étudiées plus finement dans le Chapitre suivant pour des mesures expérimentales. Sur cette matrice de Mueller moyenne, les modes de résonance s'observent assez bien : les résonances trouvées en transmission sont retrouvées pour les mêmes longueurs d'ondes. Plus particulièrement, les modes sont retrouvés pour certains éléments associés aux polarisations qui permettent de les générer. Le quadripôle électrique et le dipôle électrique correspondent à des maximums de MM_{12} et MM_{21} et à des points d'inflexion de MM_{34} et MM_{43} (les éléments conjugués par Kramers-Kronig). De même, le couplage magnéto-électrique est visible sur un maximum de MM_{23} et sur une inflexion de MM_{14} . C'est attendu car en première approximation un élément associé au dichroïsme (comme MM_{12} qui est le dichroïsme linéaire) correspond à la partie imaginaire de l'indice et un autre élément associé à la biréfringence (comme MM_{34} qui est la biréfringence linéaire) correspond à la partie réelle de l'indice. Cette propriété permettra, lors des mesures, d'étudier un mode soit sur le pic d'un premier élément soit sur le point d'inflexion d'un second élément, Kramers-Kronig du premier. L'observation de la matrice permet donc de découpler les modes et de cartographier polarimétriquement et spectroscopiquement l'antenne étudiée. De plus, comme lors de l'étude en incidence normale, il est possible de représenter (Figure 18) les cartes de champ associées aux différents modes. Pour mettre en évidence le mode associé au couplage magnéto-électrique, l'onde incidente est polarisée circulairement.

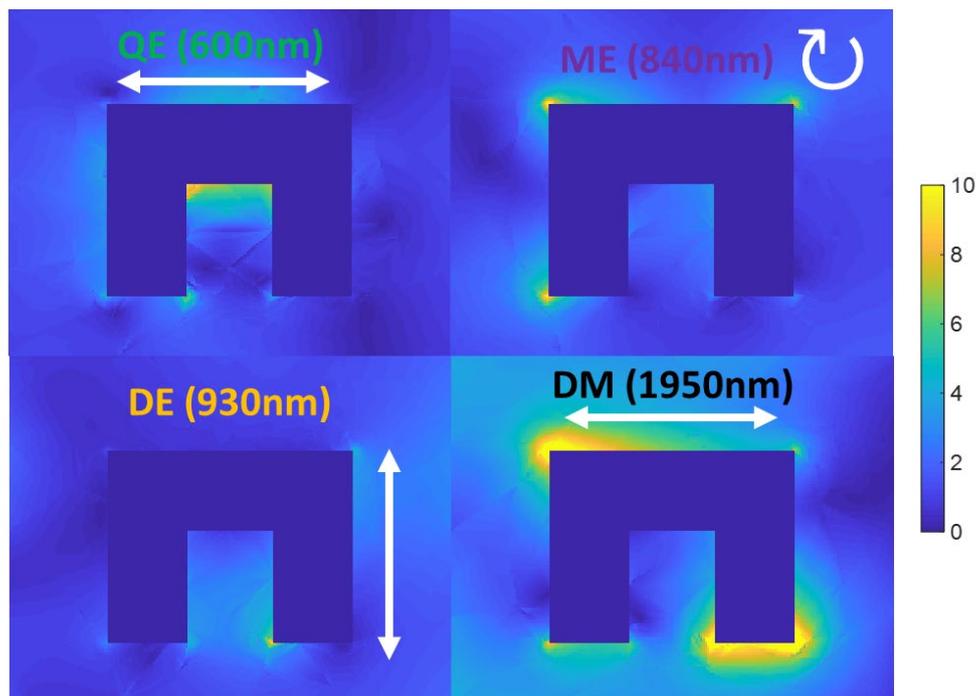


Figure 18 : Représentation du champ électrique normalisé (E/E_0) associé à chacun des modes en réflexion au voisinage d'une résonateur en U avec une illumination à 45° .

Les mêmes dynamiques qu'en incidence normale sont observables c'est-à-dire la dépendance spectroscopique et polarimétrique de la distribution d'énergie en champ proche avec des asymétries qui s'ajoutent, certaines zones devenant moins actives en incidence oblique. Les zones les plus exaltées en fonction du mode sont similaires ainsi que les valeurs d'exacerbation maximales : le champ électrique au voisinage des antennes est exacerbé d'un

facteur maximal égal à 9.2 pour le quadripôle électrique, à 10.7 pour le couplage magnéto-électrique, à 9.1 pour le dipôle électrique et enfin 21.1 pour le dipôle magnétique.

L'objectif final étant de repérer les effets de la chiralité d'une biomolécule au voisinage d'un résonateur en U, l'idée est de maximiser le dichroïsme circulaire au voisinage de l'antenne. Donc, le calcul de $\langle C \rangle = -\frac{\omega \epsilon_0}{2} \text{Im}(\vec{E}^* \cdot \vec{B})$ représentant la chiralité du champ au voisinage du résonateur plasmonique semble approprié. C est calculé pour une polarisation incidente perpendiculaire aux bras du résonateur au niveau du mode associé au couplage électromagnétique pour deux angles azimutaux opposés (90 ° et 270 °) ce qui revient à observer l'antenne selon deux angles d'incidence opposés : +45 ° et -45 °. La Figure 19 présente la chiralité $\langle C \rangle$ normalisée par $\langle C_0 \rangle$ qui correspond à la chiralité d'un champ polarisé circulairement et qui se propage dans le milieu d'étude. On voit donc que pour le mode magnéto-électrique $\langle C \rangle$ change de maxima localement en changeant l'angle d'incidence de +45 ° à -45 ° tout en maintenant le signe de $\langle C \rangle$ constant. On peut alors s'attendre à la fois à une réponse différente en dichroïsme circulaire (mesuré sur les éléments MM₄₁/MM₁₄) mais peut-être aussi dans le dichroïsme linéaire du résonateur puisque l'extrémité des bras sonde un indice différent.

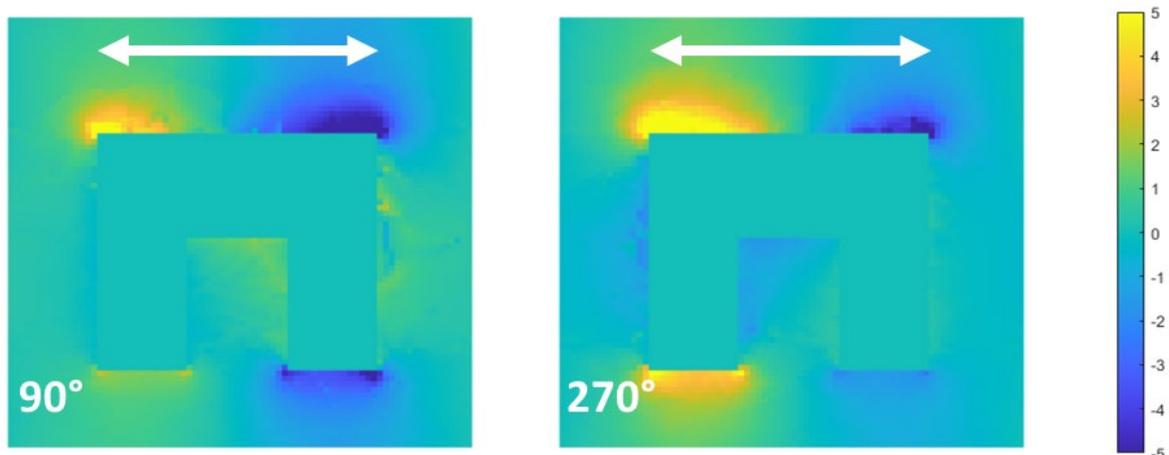


Figure 19 : Représentation de la chiralité normalisée ($\langle C \rangle / \langle C_0 \rangle$) associée au champ électromagnétique pour deux angles azimutaux de 90 ° et 270 ° ce qui est équivalent à deux directions d'illumination opposées.

2. Caractérisation de la métasurface : vers un facteur de mérite alternatif

Le greffage des molécules à la surface s'accompagne tout d'abord d'une modification de l'environnement diélectrique de la structure plasmonique.

Le milieu ambiant, et plus particulièrement son indice de réfraction, influence la position spectrale de la résonance de plasmon de surface en la décalant vers le rouge d'une valeur $d\lambda$, en supposant que la variation d'indice dn est positive, sinon le décalage est vers le bleu. Afin de quantifier l'influence du milieu sur la structure, la sensibilité en indice de réfraction $S_B = \frac{d\lambda}{dn}$ présentée dans le Chapitre 1 est un paramètre souvent utilisé dans le domaine des biocapteurs plasmoniques. Cette sensibilité permet de quantifier la performance de l'antenne *via* le décalage en longueur d'onde d'une résonance de plasmon pour une variation d'indice

donnée. Pour obtenir cette valeur, il faut donc connaître les décalages en longueur d'onde induits par le changement de milieu. On fait aussi souvent intervenir d'autres valeurs comme le facteur de mérite FOM [67], [68] qui permet d'inclure l'acuité des résonances associées.

Ceci étant dit, il est raisonnable d'étudier les antennes dans deux milieux aux indices de réfractions bien connus : l'eau et l'éthanol. Théoriquement et grâce à la simulation numérique précédente, il est possible de représenter sur la Figure 20 les deux matrices de Mueller moyennes superposées pour un milieu ambiant simulant de l'eau ($n=1.33$) ou de l'éthanol ($n=1.36$).

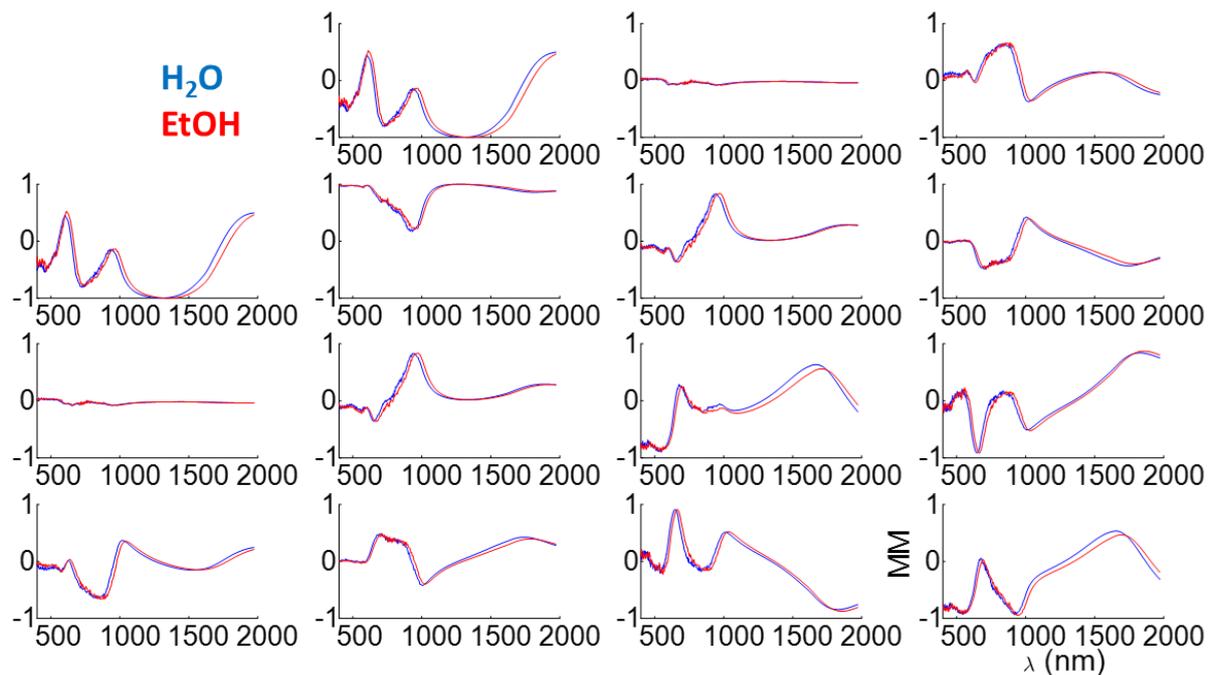


Figure 20 : Matrices de Mueller moyennes déterminées en simulation numériques pour deux indices de réfraction différents en l'occurrence ceux de l'eau (bleu) et de l'éthanol (rouge).

Le décalage est clairement observable, à titre d'exemple, l'élément MM_{12} le démontre (Figure 21 (a)). Qualitativement, le décalage spectral semble augmenter avec la longueur d'onde. Par la suite, dans cette partie, par soucis de clarté seul l'élément MM_{12} sera montré, la matrice moyenne complète pour chacun des résultats est en Annexe 1.

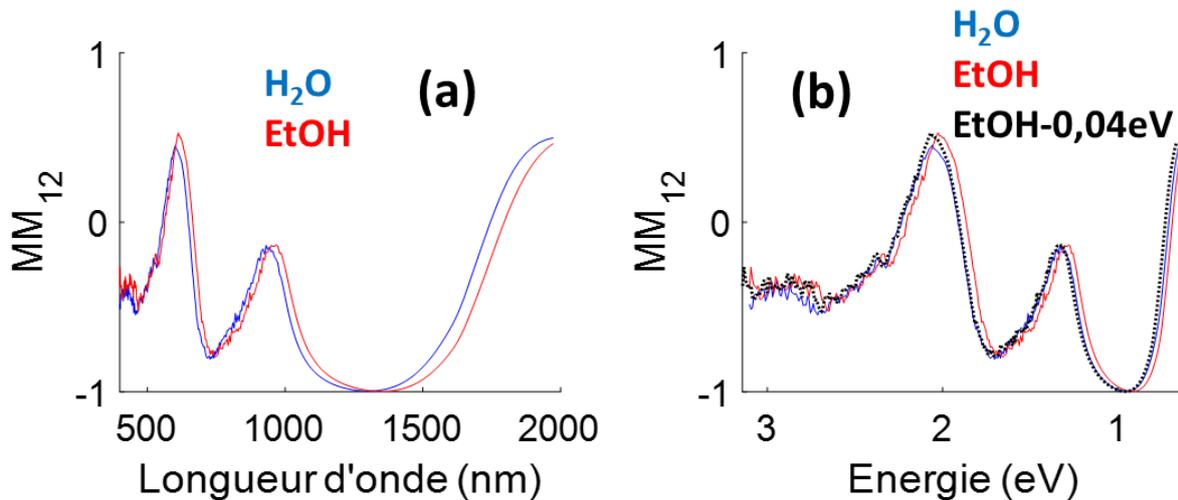


Figure 21 : (a) Élément MM_{12} de la matrice de Mueller moyenne en fonction de la longueur d'onde (nm) pour deux indices de réfraction différents en l'occurrence ceux de l'eau (bleu) et de l'éthanol (rouge) et (b) Élément MM_{12} en fonction de l'énergie (eV) pour l'eau (bleu), l'éthanol (rouge) et la courbe de l'éthanol (pointillés noirs) après une translation constante en énergie de 0.04eV.

Vient ensuite la détermination du décalage spectral associé à chaque longueur d'onde. Lorsque l'on trace MM_{12} en fonction de l'énergie Figure 21 (b), il semble que le décalage soit constant en énergie (du moins jusqu'à 800 nm) ce qui conduit à choisir une variation linéaire du décalage en longueur d'onde. En choisissant une évolution linéaire pour le décalage, des dynamiques pour $\Delta\lambda(\lambda)$ sont observables pour chacun des éléments. Ce décalage est bien croissant en fonction de la longueur d'onde. L'exemple montré pour l'élément MM_{12} est présenté sur la Figure 22. Afin de déterminer ce décalage, les courbes ont été lissées en plus d'être moyennées par la simulation. En appliquant un décalage linéaire, les courbes se superposent.

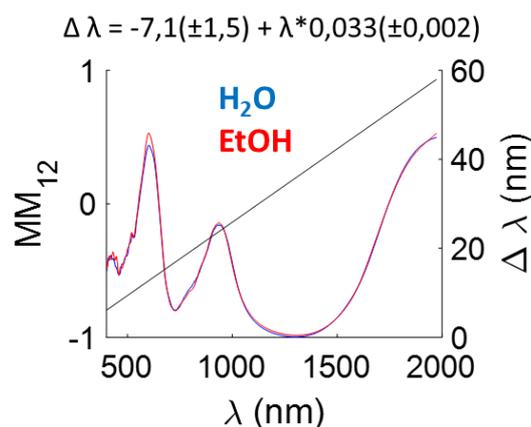


Figure 22 : Superpositions des courbes de MM_{12} calculées numériquement pour un milieu ambiant avec un indice de l'eau et de l'éthanol après application d'un décalage spectral linéaire pour la courbe obtenue pour l'éthanol. Le décalage appliqué en fonction de la longueur d'onde est présenté par la courbe en noir. L'équation de la droite avec les intervalles de confiance à 95 % est présenté également au-dessus du graphique.

L'équation de droite associée est $\Delta\lambda = -7.1(\pm 1.5) + 0.033(\pm 0.002)\lambda$. Les barres d'erreur correspondent à un intervalle de confiance de 95 % calculé à l'aide de la matrice jacobienne du fit. Il est possible de réaliser ce fit pour chacun des éléments de la matrice et les équations obtenues sont résumés dans les tableaux suivants (Tableau 3 pour les équations de droite et Tableau 4 pour les intervalles de confiance associés au fit):

Tableau 3 : Décalages spectraux calculés à partir des matrices de Mueller moyennes obtenues numériquement pour l'eau et l'éthanol après ajustement par une variation linéaire.

	MM ₁₂ $\Delta\lambda = -7.1 + 0.033\lambda$	MM ₁₃ $\Delta\lambda = -20.7 + 0.051\lambda$	MM ₁₄ $\Delta\lambda = -9.5 + 0.033\lambda$
MM ₂₁ $\Delta\lambda = -7.1 + 0.03\lambda$	MM ₂₂ $\Delta\lambda = -0.8 + 0.020\lambda$	MM ₂₃ $\Delta\lambda = -5.3 + 0.031\lambda$	MM ₂₄ $\Delta\lambda = -11.3 + 0.036\lambda$
MM ₃₁ $\Delta\lambda = -1.5 + 0.020\lambda$	MM ₃₂ $\Delta\lambda = -5.6 + 0.032\lambda$	MM ₃₃ $\Delta\lambda = -3.8 + 0.028\lambda$	MM ₃₄ $\Delta\lambda = 6.2 + 0.016\lambda$
MM ₄₁ $\Delta\lambda = -9.7 + 0.033\lambda$	MM ₄₂ $\Delta\lambda = -10.3 + 0.034\lambda$	MM ₄₃ $\Delta\lambda = 6.1 + 0.017\lambda$	MM ₄₄ $\Delta\lambda = -8.6 + 0.034\lambda$

Tableau 4 : Intervalles de confiance à 95 % sur le fit pour le décalage spectral associées aux courbes pour l'eau et l'éthanol.

Erreur sur Ordonnée à l'origine / Coefficient directeur	MM ₁₂ $\pm 1.5 / \pm 0.002$	MM ₁₃ $\pm 0.4 / \pm 0.001$	MM ₁₄ $\pm 2.7 / \pm 0.004$
MM ₂₁ $\pm 1.5 / \pm 0.003$	MM ₂₂ $\pm 4 / \pm 0.005$	MM ₂₃ $\pm 3.3 / \pm 0.004$	MM ₂₄ $\pm 2.1 / \pm 0.003$
MM ₃₁ $\pm 3.2 / \pm 0.006$	MM ₃₂ $\pm 3.3 / \pm 0.004$	MM ₃₃ $\pm 2.7 / \pm 0.004$	MM ₃₄ $\pm 1.6 / \pm 0.003$
MM ₄₁ $\pm 2.7 / \pm 0.004$	MM ₄₂ $\pm 2 / \pm 0.003$	MM ₄₃ $\pm 1.6 / \pm 0.003$	MM ₄₄ $\pm 2.3 / \pm 0.003$

On observe tout d'abord que les variations observées sont symétriques par rapport à la diagonale de la matrice de Mueller, ce qui est attendu suite aux relations de symétries entre les éléments de la matrice de Mueller. Les coefficients directeurs des droites sont proches et valent approximativement 0.03 mais diffèrent légèrement selon l'élément observé. La grande différence qui s'observe pour les ordonnées à l'origine est en partie certainement due à des corrélations croisées entre la pente et l'ordonnée à l'origine. On notera cependant des différences significatives des pentes pour les éléments MM₃₄ et MM₄₃ d'une part et MM₂₂ d'autre part. Pour MM₂₂ il est très possible que les variations spectrales ne soient pas assez marquées pour que la pente soit bien déterminée pour la partie infrarouge du spectre. Pour MM₃₄ et MM₄₃ par contre, les valeurs de décalage sont significativement plus faibles que pour les autres éléments. Nous n'avons pas d'explication bien claire pour expliquer l'origine de cette observation. Cette estimation de décalage est faite sur chaque élément de la matrice de Mueller moyenne pour toute les longueurs d'ondes, on ne peut donc empêcher que certaines erreurs dans un sens à certaines longueurs d'ondes en compensent d'autres à d'autres

longueur d'onde. Une autre lecture consiste à regarder autour d'un mode quel est le décalage observé en fonction de l'élément de matrice.

Par exemple, le décalage spectral à 600 nm est de 12.7 nm pour MM_{12} , de 10.3 nm pour MM_{14} et de 15.8 nm pour MM_{34} . Chaque mode de résonance est associé à un décalage qui lui est propre. De même, au niveau du point d'inflexion associé au mode du quadrupôle électrique sur MM_{34} , le décalage est de 15.8 nm alors que pour le point d'inflexion associé au mode du couplage magnéto-électrique sur MM_{23} , le décalage est de 20.7 nm. Ces différences sont supérieures au barres d'erreurs associées.

Par soucis de vérification, en appliquant le même décalage partout, les courbes ne se superposent pas ce qui assure la faible influence de corrélations croisées pendant le fit.

On notera une absence de symétrie pour les éléments MM_{13} et MM_{31} de la matrice : ceci est dû aux faibles variations de ces éléments ce qui rend le fit difficile.

La dépendance spectroscopique et polarimétrique se répercute sur la sensibilité associée à la métasurface. Cette sensibilité à l'indice de réfraction, $S_B = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n}$, est déterminée en prenant en compte le décalage spectroscopique ainsi que le caractère dispersif du milieu considéré, c'est à dire la dépendance en longueur d'onde des indices de réfraction de l'eau et de l'éthanol. La Figure 23 présente donc la sensibilité à l'indice de réfraction pour l'élément MM_{12} de la matrice.

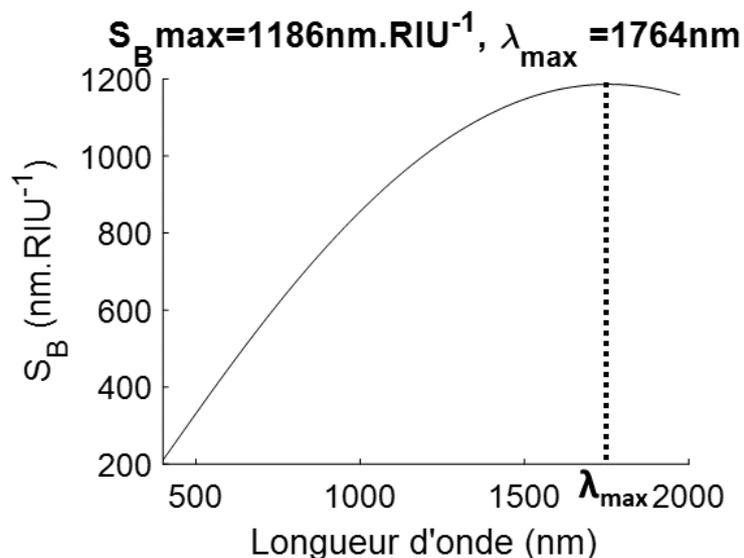


Figure 23 : Sensibilité S_B associée à l'élément MM_{12} de la matrice en fonction de la longueur d'onde du champ incident.

$S_{B\text{max}}$ correspond à la valeur maximale de sensibilité, elle est ici de $1186 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ et elle est atteinte pour $\lambda = \lambda_{\text{max}} = 1764 \text{ nm}$. Il est également possible de résumer dans le Tableau 5 les résultats obtenus pour la matrice entière.

Tableau 5 : Valeurs de sensibilité maximale et longueur d'onde de cette valeur pour les éléments de la matrice de Mueller.

S_{Bmax} (nm.RIU ⁻¹)	1186	1615	1128
λ_{max} (nm)	1764	1828	1785
1186	807	1166	1195
1764	1684	1743	1806
792	1164	1046	834
1704	1743	1723	1530
1132	1158	843	1180
1785	1785	1530	1764

Une sensibilité est associée à chaque longueur d'onde et chaque élément de la matrice. Un maximum est atteint entre 1500 nm et 1850 nm suivant l'élément considéré. La valeur maximale est bien différente. Par exemple, elle est de 1186 nm.RIU⁻¹ pour MM₁₂ et 834 nm.RIU⁻¹ pour MM₃₄.

L'objectif final est de choisir des zones sur la matrice où les variations de la matrice de Mueller sont significatives lorsque l'indice change au voisinage de chaque résonateur. Par exemple, il semble approprié de se placer sur un point d'inflexion et non sur un maximum local afin d'observer l'évolution d'un mode.

Comme décrit dans le Chapitre 1, j'utiliserai un Facteur de Mérite adaptée à la matrice de Mueller dont je rappelle la définition : $FOM^{**} = S_{\lambda} * \frac{dMM}{d\lambda}$. La sensibilité de la métasurface est bien prise en compte ainsi que l'acuité de la résonance. Cette fois, les extremums de FOM^{**} correspondent aux zones d'intérêt de la métasurface : c'est-à-dire les zones (spectroscopiques et polarimétriques toujours) où l'expérimentateur souhaite mesurer afin de détecter le plus efficacement l'environnement diélectrique. En l'occurrence, dans le cadre des recherches menées dans cette thèse : le décalage spectral induit par le greffage de biomolécules sera étudié dans les zones où le facteur de mérite alternatif correspond à un extremum local. La dérivée de la matrice est calculée après un lissage de la courbe afin d'éviter les problèmes de discontinuité dues aux bruits de la simulation et de la mesure. *Via* les simulations numériques, FOM^{**} est observable sur la Figure 24 pour un réseau de résonateurs en U pour les éléments MM₁₂ et MM₃₄.

Le graphe est bruité lorsque l'on se rapproche de la zone UV du spectre : les anomalies de Rayleigh sont toujours présentes autour de 500 nm et le calcul de la dérivée induit certaines discontinuités. Cependant, des extremums locaux sont clairement observables pour ces éléments. L'idée est d'observer les décalages spectraux au niveau des modes de résonance des résonateurs en U. Ici, la zone verte correspond au quadripôle électrique et la zone jaune au dipôle électrique. On remarque que les modes de résonance correspondent à des valeurs faibles de facteur de mérite alternatif pour MM₁₂ alors que ce sont des extremums locaux pour MM₃₄, ceci est attendu dans la mesure où sur la matrice les résonances sont positionnées sur les extremums de MM₁₂ et les points d'inflexion de MM₃₄ (relations de Kramers-kronig). Par conséquent, l'observation de la modification du signal peut être réalisée au niveau de MM₃₄ pour les modes associés au quadripôle électrique et au dipôle électrique. Ceci montre un intérêt de la mesure de la matrice de Mueller qui est de rapporter la sensibilité maximum

au niveau des résonances et non pas de leur point d'inflexion grâce à la détermination des valeurs conjuguées, MM_{12} et MM_{34} ici.

Les expériences et l'interprétation associées sont réalisées au sein de ce cadre : c'est-à-dire que pour chaque mesure effectuée, une calibration $H_2O/EtOH$ doit être effectuée et ensuite après en avoir déduit une sensibilité S_B , les zones d'intérêt où sont observables les modes sujets à étude sont déterminées grâce au facteur de mérite alternatif. Il faut réaliser cette calibration pour chaque expérience pour éviter le problème de non reproductibilité entre les différentes expériences même si dans les faits les gammes spectrales (ce sera vu par la suite) restent les mêmes et heureusement.

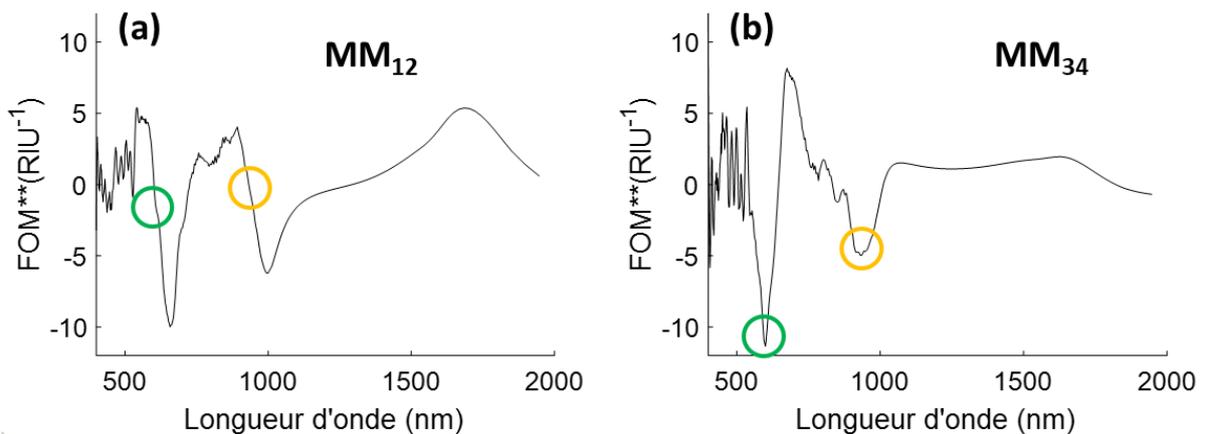


Figure 24 : Facteurs de mérite alternatifs déterminés pour les éléments (a) MM_{12} et (b) MM_{34} en fonction de la longueur d'onde. La position spectrale des différents modes de résonance sont représentés suivant le code couleur habituel.

Partie 4. Conclusion et perspectives du Chapitre

L'étude théorique des métasurfaces en U a permis de caractériser l'origine du dichroïsme circulaire associé à ces résonateurs.

Quatre modes de résonance ont été mis en évidence à l'aide d'une simulation numérique par éléments finis. Un mode en particulier, celui associé au couplage magnéto-électrique, induit au dichroïsme circulaire et semble être le mode le plus intéressant pour obtenir des informations sur la structure secondaire de biomolécules adsorbées.

L'influence du changement de milieu au voisinage d'un résonateur a été étudié. Il induit un décalage des résonances de la métasurface qui se reflète dans le décalage des spectres des éléments de la matrice de Mueller. Ce décalage augmente linéairement avec la longueur d'onde. Le choix des gammes spectrales les plus favorables pour quantifier le décalage, et la modification potentielle des variations spectrales associées aux modes de la métasurface, se fait via le facteur de mérite. Un facteur de mérite alternatif adapté aux matrices de Mueller a également été présenté.

Après avoir décrit théoriquement et numériquement les métasurfaces utilisées dans ce travail, il faut maintenant se préoccuper de la réalisation expérimentale et des résultats optiques

obtenus avec ces surfaces. La caractérisation sera faite en suivant le protocole établi grâce à ce travail numérique :

1. Mesure des matrices de Mueller dans l'eau et l'éthanol
2. Détermination du facteur de mérite alternatif
3. Greffage du peptide et suivi sur les zones d'intérêt prédéterminées

Chapitre 3 : Caractérisation expérimentale des métasurfaces étudiées

Partie 1. Elaboration des échantillons en lithographie et spectres de transmission associés

Les échantillons composés de U en or sont réalisés dans la salle blanche de l'INSP. Le processus expérimental ainsi que des mesures de transmission permettant de caractériser les modes déjà présentés dans le Chapitre 2 seront présentés dans cette partie.

1. La lithographie électronique comme méthode de fabrication

La réalisation des métasurfaces composées de U en or est réalisée en lithographie électronique dans la salle blanche de l'INSP. Toutefois, au début de la thèse, certaines surfaces ont été réalisées dans la salle blanche du Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques de l'Université Paris Cité pour des raisons d'entretien de matériel au sein de la salle blanche de l'INSP.

Le protocole utilisé est grandement inspiré de travaux précédents au sein du laboratoire et même au sein de l'équipe. Pour réaliser un échantillon, il faut procéder à ces différentes étapes qui sont schématisées sur la Figure 25 :

1. Un substrat de silice fondue (9x9mm² de surface et 1mm d'épaisseur) est rincé (1 minute sous Ultrasons dans de l'acétone puis rinçage à l'Isopropanol), séché à l'azote sec puis mis sous plasma d'oxygène à une puissance de 30W pendant 5 minutes.
2. Un revêtement par centrifugation (spin-coating), avec un Polos Spin 150 i, de Polyméthacrylate de méthyle (PMMA) pendant 30 secondes à 4000 tours par minutes est réalisé pour obtenir une couche d'environ 150 nm d'épaisseur de résine après recuit à 150 °C pendant 15 min. Cette résine sera la résine insolée par les électrons.
3. Un autre revêtement, d'environ 40 nm, obtenu dans les mêmes conditions de spin-coating mais recuite 1 min à 90 °C, d'Electra92. Cette résine conductrice permet d'éviter les effets de charge lors de l'exposition au canon à électrons.
4. L'exposition est réalisée sur un microscope électronique à balayage (MEB Zeiss Supra 40) associé à un système de lithographie électronique (Raith Elphy Quantum) avec un diaphragme de condenseur de 10 µm, une tension accélératrice de 20 keV, et un courant d'environ 20 pA. Une dose de 150 µC.cm⁻² a été utilisée. Le grandissement utilisé de 490x permet de réaliser des zones de 100 µm de côté maximum avec une résolution suffisante pour nos échantillons. Afin de réaliser des surfaces plus importantes, des zones sont faites les unes à côté des autres. Le déplacement mécanique de notre platine porte-échantillon ne permet pas un raccordement de champ précis et les zones lithographiées ont été espacées de 5 µm afin d'éviter tout recouvrement entre les résonateurs tout en maintenant une densité de résonateurs satisfaisante.
5. Après l'exposition, la résine d'Electra est retirée grâce à de l'eau déionisée pendant 1 minute. L'étape de développement afin de révéler les zones exposées se déroule pendant une exposition à un mélange 1:3 de méthylisobutylcétone et d'isopropanol

pendant 50 secondes, avant un bref rinçage à l'isopropanol pendant 30 secondes suivi d'un séchage à l'azote sec.

6. Ensuite, à l'aide d'un évaporateur par effet Joule Vinci PVD-4E, une épaisseur de 5 nm de Titane (couche d'accroche), est déposé avant une épaisseur de 40 nm d'or. Il est crucial ici de faire attention aux angles de dépôt sous peine d'obtenir des dimensions différentes pour les bras des U. Pour éviter ce genre de mésaventure, il est nécessaire de positionner l'échantillon le plus en face possible des sources de métaux déposés.
7. Enfin, une dernière étape, afin d'enlever la résine (*lift-off*) et donc de laisser le couple Titane/Or uniquement au niveau des zones exposées électriquement, comprend une période de deux heures durant laquelle l'échantillon baigne dans de l'acétone à 40 °C puis quelques secondes d'Ultrasons toujours dans le même milieu. Après un dernier rinçage à l'isopropanol et séchage à l'azote sec, l'échantillon est prêt.

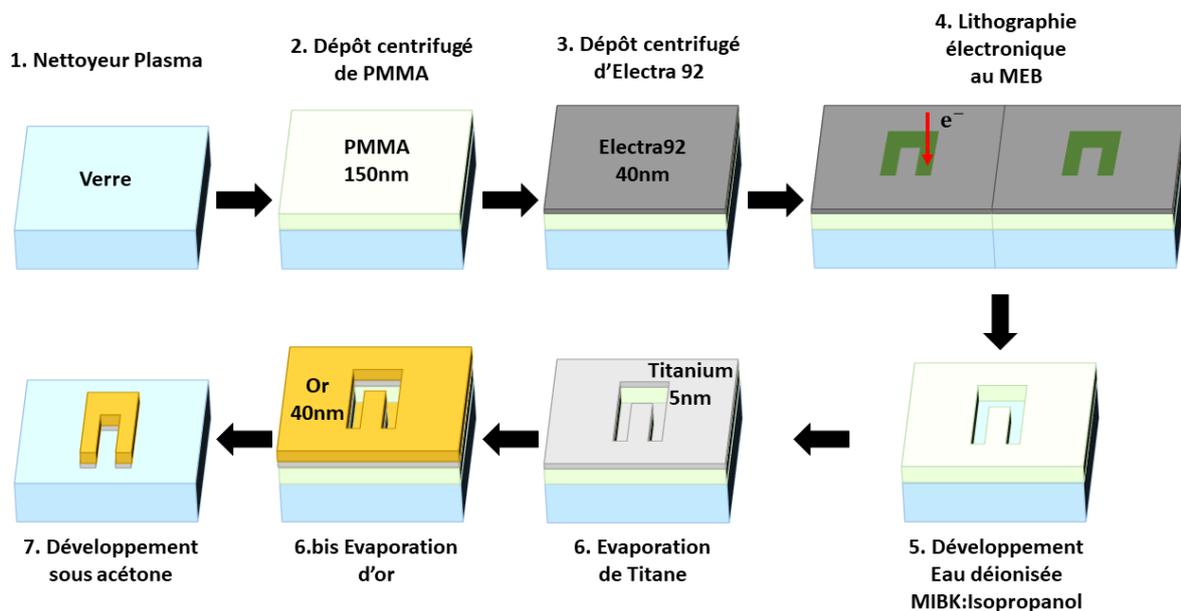


Figure 25: Schémas illustrant le processus de lithographie.

La Figure 26 comprend deux photographies réalisées au microscope optique avec un grandissement x10 après l'étape de développement (a) (étape 5) et après l'étape de révélation (b) (étape 7). Chaque petit carré fait 100 μm de côté, les décalages d'alignement liés au déplacement mécanique de la platine sont bien visibles. Il est important de noter que les décalages sont latéraux mais pas angulaires.

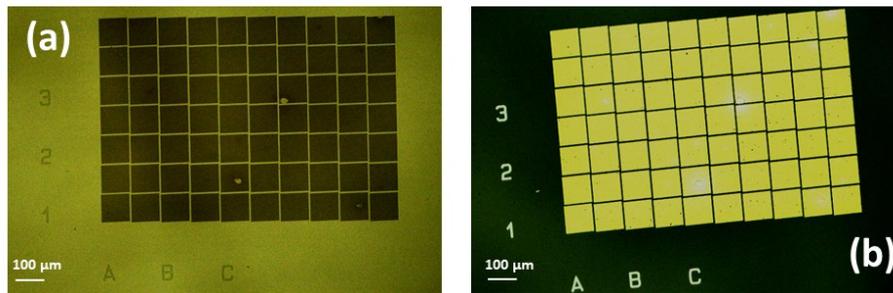


Figure 26 : Photographies réalisées au microscope optique avec un grandissement x10 après les étapes (a) de développement et (b) de lift-off. Les lettres et nombres sont simplement des repères réalisés lors de la lithographie.

La Figure 27 ((a),(b) et (c)) montre des images MEB réalisées après une lithographie électronique. Quatre grandissements sont ici montrés. L'échantillon montré présente une métasurface composée de 10x7 patches qui font chacun $95 \mu\text{m}^2$ (afin de ne pas dépasser la zone d'écriture de champ de la machine utilisée). Les U font 220 nm de hauteur et 220 nm de largeur les bras eux font 70 nm et la base fait 90 nm comme montré Figure 27 (d). Il faut noter que l'organisation des résonateurs n'est pas un réseau carré. En effet, afin de limiter la signature des anomalies de Rayleigh dans les spectres optiques, j'ai introduit un désordre pseudo-aléatoire dans les positions de chaque résonateur. Ce désordre a été obtenu en déplaçant de façon aléatoire chaque résonateur dans sa cellule de $400 \text{ nm} \times 400 \text{ nm}$ tout en évitant qu'ils ne se touchent. Ce point sera abordé plus précisément ultérieurement.

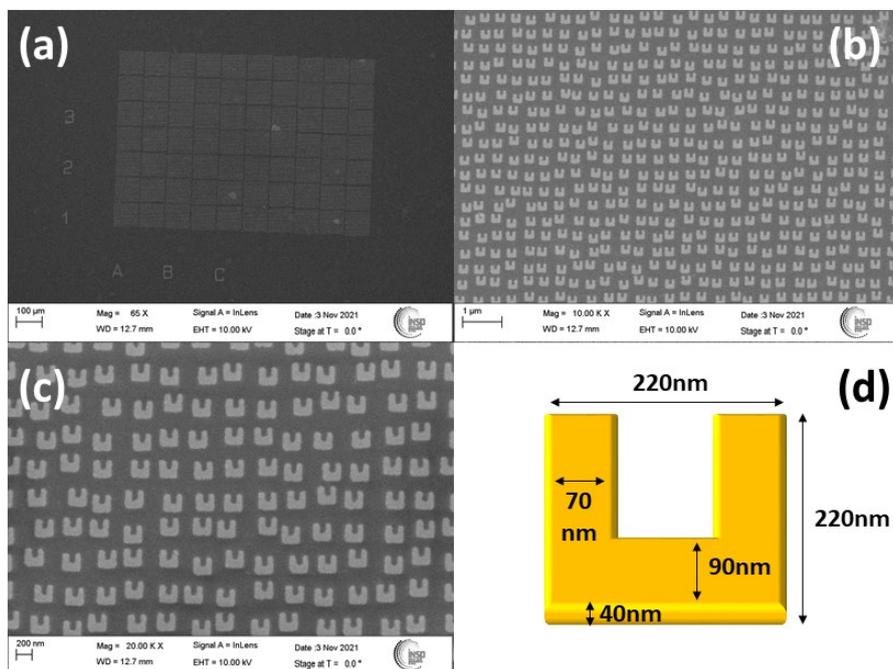


Figure 27 : Images MEB d'un échantillon réalisé par lithographie électronique. Différents grandissements sont ici montrés (a) X65 (b) X10.000 et (c) X20.000. (d) Dimensions d'un U (théorique c'est à dire donnée au logiciel de lithographie électronique).

Après avoir expliqué la méthode de réalisation des surfaces lithographiées, leurs différentes caractéristiques vont être étudié en l'occurrence les courbes de transmission pour différentes

polarisations afin de mettre en évidence relativement facilement les différents modes de résonance. Ensuite, les matrices de Mueller des échantillons mesurées en ellipsométrie généralisée seront discutées et notamment la sensibilité associée à ces métasurfaces.

2. Mesure de transmission mettant en évidence les différents modes de résonance

Il a été vu précédemment que les différents modes de résonance de la surface considérée étaient à la fois dépendants de la longueur d'onde et de la polarisation incidente. Cette dépendance spectroscopique et polarimétrique peut être mise en valeur à l'aide d'un simple spectre de transmission. Pour ce faire, en utilisant un microscope optique couplé à deux spectromètres CCD Avantes (un pour la gamme 400-1100 nm et un pour la gamme 1000-1600 nm), il est possible d'obtenir les courbes de transmission souhaitées. Les deux spectromètres sont nécessaires afin d'étudier une large gamme spectrale ce qui permet d'observer les quatre modes de résonance recherchés. La Figure 28 montre les spectres obtenus pour les deux polarisations étudiées. Une goutte d'eau a été préalablement déposée sur la surface des résonateurs pour mesurer dans ce milieu. Pour cette expérience, un polariseur linéaire est placé en entrée au niveau de la source lumineuse et positionné manuellement ce qui donne une incertitude sur la position du plan de polarisation par rapport à l'antenne étudiée. Cependant, ici, ce n'est pas la précision qui est recherchée mais uniquement la mise en évidence des modes de résonance et la méthode manuelle suffit amplement.

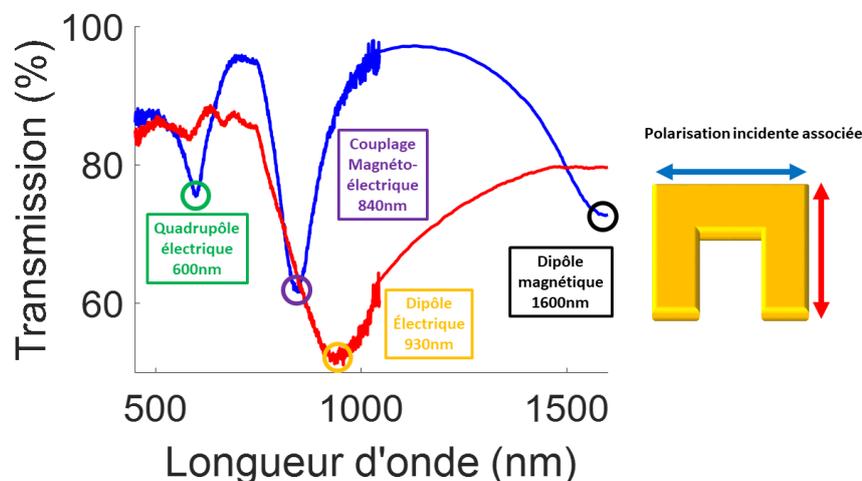


Figure 28 : Spectre de transmission d'une métasurface composé de U La transmission est donné pour deux polarisations incidentes en l'occurrence en rouge parallèle aux bras du U et en bleu perpendiculaire aux bras du U.

Quatre modes de résonance spectroscopiques et polarimétriques sont bien visibles sur le spectre mesuré. En l'occurrence :

- La quadrupôle électrique aux alentours de 600 nm (visible en polarisation horizontale et faiblement en polarisation verticale)
- Le couplage magnéto-électrique aux alentours de 840 nm (visible uniquement en polarisation horizontale)

- Le dipôle électrique aux alentours de 930 nm (visible uniquement en polarisation verticale)
- Le dipôle magnétique aux alentours de 1600 nm (visible en polarisation horizontale et faiblement en polarisation verticale)

Il est alors possible de superposer les courbes théoriques et expérimentales (Figure 29):

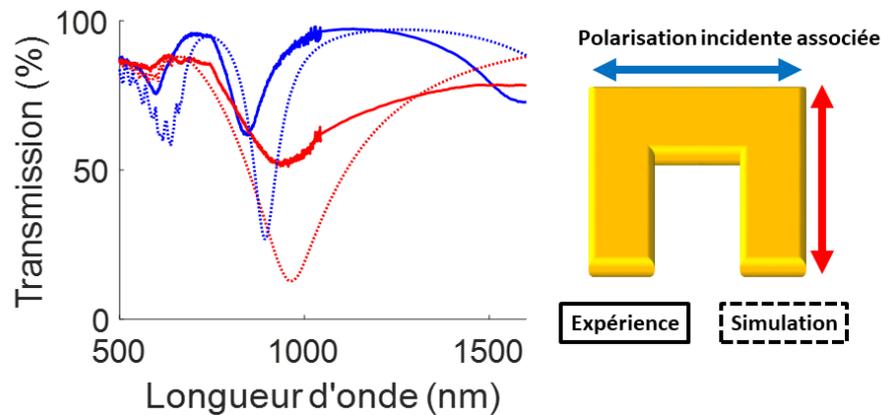


Figure 29 : Comparaison des courbes de transmission obtenues expérimentalement (lignes pleines) et en simulation numérique (lignes pointillées) pour deux polarisations linéaires incidentes.

Les mêmes tendances sont observées, c'est-à-dire les modes de résonance sont visibles pour les mêmes polarisations et dans les mêmes zones spectroscopiques. Les hiérarchie d'amplitudes et de largeurs à mi-hauteur sont bien respectées. En revanche, la simulation numérique a tendance à décaler les résonances dans le rouge. Ceci s'observe particulièrement pour le mode associé au dipôle magnétique. Cependant les calculs sont faits sans prendre en compte la couche d'accroche et les dimensions sont les dimensions nominales. L'accord reste très satisfaisant.

Afin de caractériser les métasurfaces composées de U, le formalisme de Mueller est utilisé pour des raisons abordées dans les Chapitres 1 et 2. La partie suivante traitera de la caractérisation complète de ces métasurfaces en analysant une matrice de Mueller mesurée en ellipsométrie généralisée.

Partie 2. Caractéristiques de la métasurface *via* sa matrice de Mueller complète dans l'air mesurée à NTNU

Au cours de son post-doctorat à l'INSP et au LRS, Lu Zhang a réalisé une série de mesures à NTNU en Norvège dans le cadre d'une collaboration avec Morten KILDEMO. L'appareil utilisé est un ellipsomètre J.A. Woollam RC2-VVASE, avec deux compensateurs tournants. Il permet de mesurer toute la matrice de Mueller dans la gamme 190 nm- 1800 nm. Les échantillons étaient très similaires à ceux que j'ai présenté jusqu'ici et contenaient des résonateurs en U. Les mesures réalisées à différents azimuts permettent de rendre compte de plusieurs paramètres associés à la métasurface :

- Les symétries de la matrice de Mueller

- Les propriétés polarimétriques de la surface qui seront déterminées ici grâce à la décomposition logarithmique qui permet d'accéder à l'origine du dichroïsme circulaire
- L'influence de la diffraction

1. Les symétries de la matrice de Mueller : le théorème de réciprocité et le retournement temporel

L'objectif des mesures réalisées dans le cadre de ce travail est d'observer, ou non, une certaine signature dans les variations spectrales des éléments de la matrice de Mueller lorsque l'on change le milieu environnant les résonateurs. En conséquence, il est convenient de partir d'un système symétrique afin d'en observer les modifications. Certaines symétries entre les éléments de la matrice seront utilisées afin de réaliser un alignement reproductible lors du travail expérimental. Une première origine des symétries provient des contraintes imposées par le théorème de réciprocité qui induit certaines relations entre les éléments de la matrice. Les relations dépendent en l'occurrence de la topographie des résonateurs [132] ainsi que des symétries des tenseurs constitutifs [133]. Des travaux réalisés en 2012 au sein de l'équipe à l'INSP [97] ont résumé ces relations en fonction de l'angle azimutal et de la dispersion spatiale. Ici, l'angle azimutal considéré est de 90 ° afin d'obtenir les relations suivantes entre les éléments pour une mesure en réflexion :

- $MM_{12}=MM_{21}$
- $MM_{13}=MM_{31}$
- $MM_{23}=MM_{32}$
- $MM_{14}=-MM_{41}$
- $MM_{24}=-MM_{42}$

La symétrie de la matrice de Mueller n'est obtenue que lorsque le plan de symétrie de la matrice des U sera parallèle au plan d'incidence de polarisation du champ électromagnétique (ie azimut de 0 °, 90 °, 180 ° ou 270 °) comme montré sur la Figure 30 pour un azimut de 90 °.

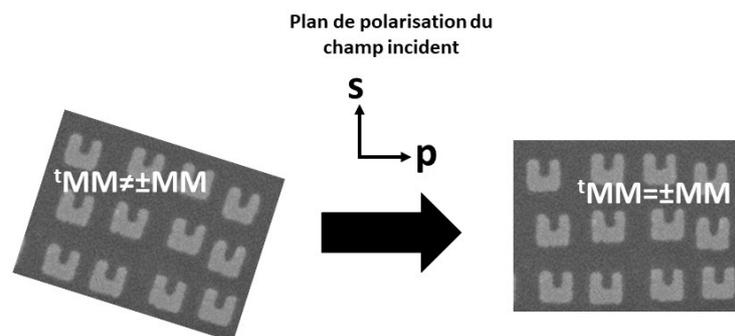


Figure 30 : Schéma montrant l'influence de l'angle azimutal sur la symétrie de la matrice de Mueller associé à un résonateur en U. L'image de droite correspond à un azimut de 90 °.

Des mesures permettent d'étudier plus précisément ces symétries. Un angle d'incidence de 50 ° a été choisi avec une gamme spectrale allant de 400 à 1500 nm. Les échantillons ont été placés sur un support permettant de réaliser la mesure pour tous les angles azimutaux en conservant l'angle d'incidence constant. L'angle azimutal choisi va de 0 ° à 360 ° par un pas de 2.5 °. La matrice de Mueller mesurée est représentée Figure 31.

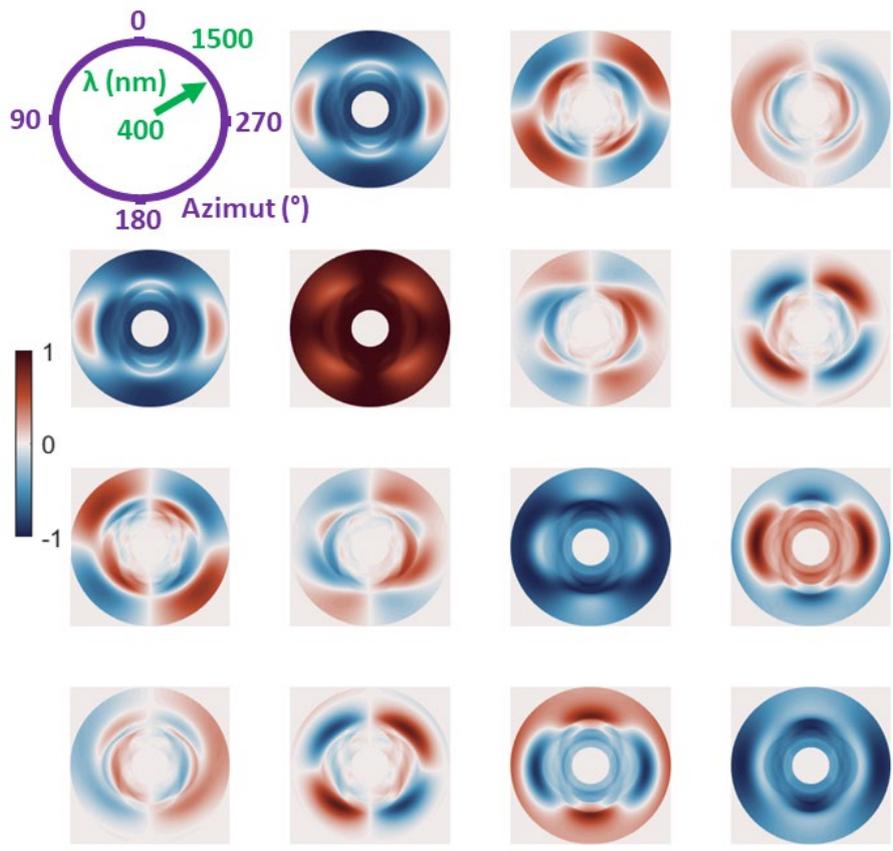


Figure 31 : Matrice de Mueller pour différents azimuts et longueurs d'onde en réflexion pour un angle d'incidence de 50 °.

Il est possible de vérifier les symétries attendues. En observant $MM_{ij} \pm MM_{ji}$, les symétries sont obtenues pour certains azimuts et pas d'autres. Ceci se voit bien sur la Figure 32 où par exemple pour $MM_{14} + MM_{41}$, la nullité est obtenue pour les azimuts 90 ° et 270 ° (ligne blanche sur la figure). Ceci s'observe assez rapidement pour tous les éléments.

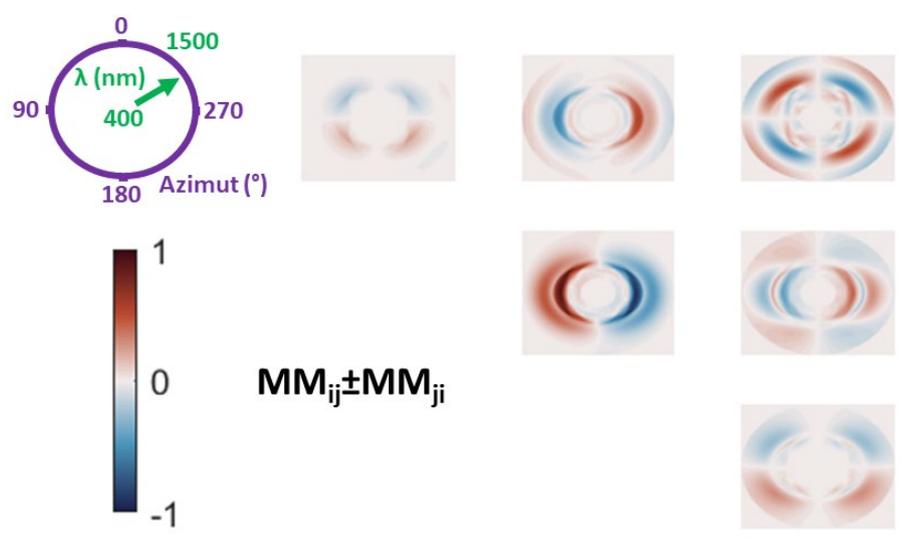


Figure 32 : $MM_{ij} \pm MM_{ji}$ pour différents azimuts et longueurs d'onde.

Une seconde origine des symétries entre les éléments de la matrice de Mueller provient du théorème de retournement temporel qui permet d'obtenir la relation suivante pour tous les angles azimutaux ϕ : $M_{ij}(\phi) = \pm M_{ji}(\phi + \pi)$ (ceci revient à observer l'échantillon selon deux angles d'incidence opposés). La Figure 33 illustre cette propriété à partir de la matrice de la Figure 31. Seule la première diagonale et les éléments au-dessus sont présentés puisque ceux sous la diagonale sont parfaitement égaux à leur symétrique. Attention, les valeurs obtenues, et donc les échelles de couleur, sont comprises entre -0.05 et +0.05 contrairement à la Figure 31 afin de rendre visible les variations résiduelles. Cette propriété se vérifie sur toute la matrice cette fois et quel que soit l'azimut. On peut prendre ces variations résiduelles comme une limite de précision sur les éléments de la matrice de Mueller. Elles trouvent leur origine principalement dans la difficulté à aligner parfaitement l'échantillon sur la platine de rotation automatique utilisée pour ces mesures. En particulier, on pensera à l'eucentricité de la rotation, à l'alignement des lentilles de focalisation et à de la dépolarisation (largeur spectrale, ouverture angulaire du faisceau focalisé).

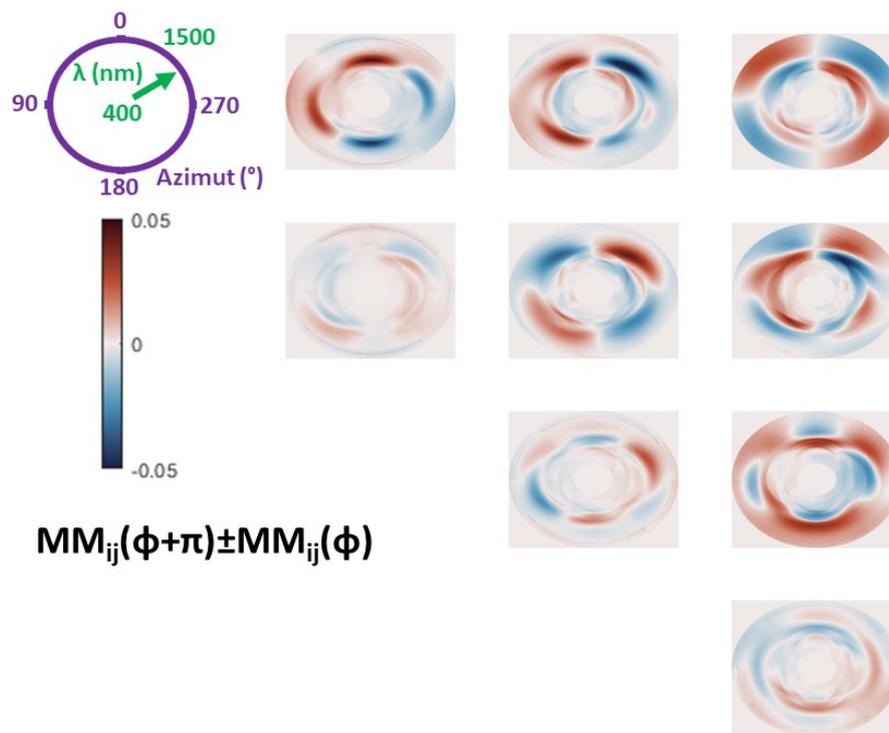


Figure 33 : Matrice montrant les symétries par retournement temporel. Représentation de $MM_{ij}(\phi + \pi) \pm MM_{ij}(\phi)$ pour différents azimuts et longueurs d'onde. Attention aux échelles de couleurs qui sont $[-0.05 \ 0.05]$ et pas $[-1 \ 1]$ comme pour la matrice de Mueller de la Figure 31.

L'observation des propriétés de symétrie et de retournement temporel est réalisé sur la Figure 34 ou est représenté la même mesure que précédemment mais pour des azimuts fixés. Il est ici représenté les couples des éléments (a) MM_{14}/MM_{41} et (b) MM_{24}/MM_{42} de la matrice pour les azimuts de 90° et 270° . Les symétries de la matrice de Mueller données au début de cette section ne sont pas observées. On verra juste après qu'une origine très probable se trouve dans les légères asymétries des résonateurs eux-mêmes. En revanche, la symétrie imposée par le retournement temporel est bien respectée (dans les incertitudes acceptées). C'est particulièrement visible sur MM_{24} et MM_{42} .

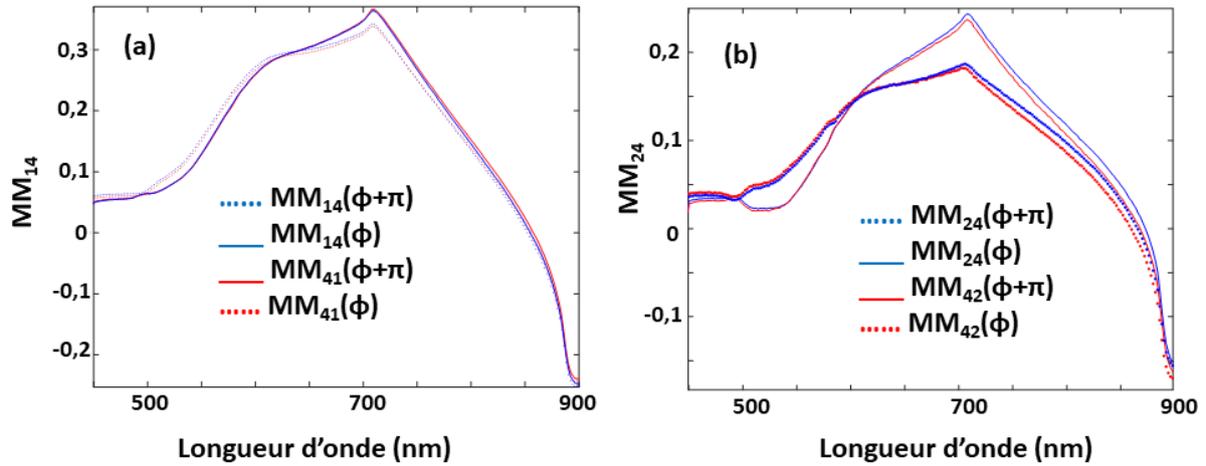


Figure 34 : Eléments (a) MM_{14}/MM_{41} et (b) MM_{24}/MM_{42} pour un échantillon avec l'air comme milieu ambiant pour deux azimuts en l'occurrence 90° et 270° .

L'absence de symétrie attendue par réciprocity de la matrice trouve son origine dans la fabrication des métasurfaces. Les U obtenus en lithographie électronique ne sont jamais parfaits ce qui induit fatalement une certaine dissymétrie dans la matrice de Mueller même sans molécules. Par exemple, un bras peut être plus petit de quelques nm par rapport à un autre ce qui ne se voit pas au MEB. Une simulation numérique réalisée avec HFSS présentant la matrice de Mueller pour un réseau de résonateurs possédant un bras inférieur à un autre de 4 nm pour deux angles azimutaux de 90° et 270° montrent que l'on perd la symétrie souhaitée entre les éléments de la matrice comme le montre la Figure 35. Les symétries attendues $MM_{ij}(90^\circ) = \pm MM_{ij}(270^\circ)$ ne sont plus présentes. Ceci se voit bien pour les éléments supposément égaux comme MM_{13}/MM_{31} ou bien MM_{23}/MM_{32} .

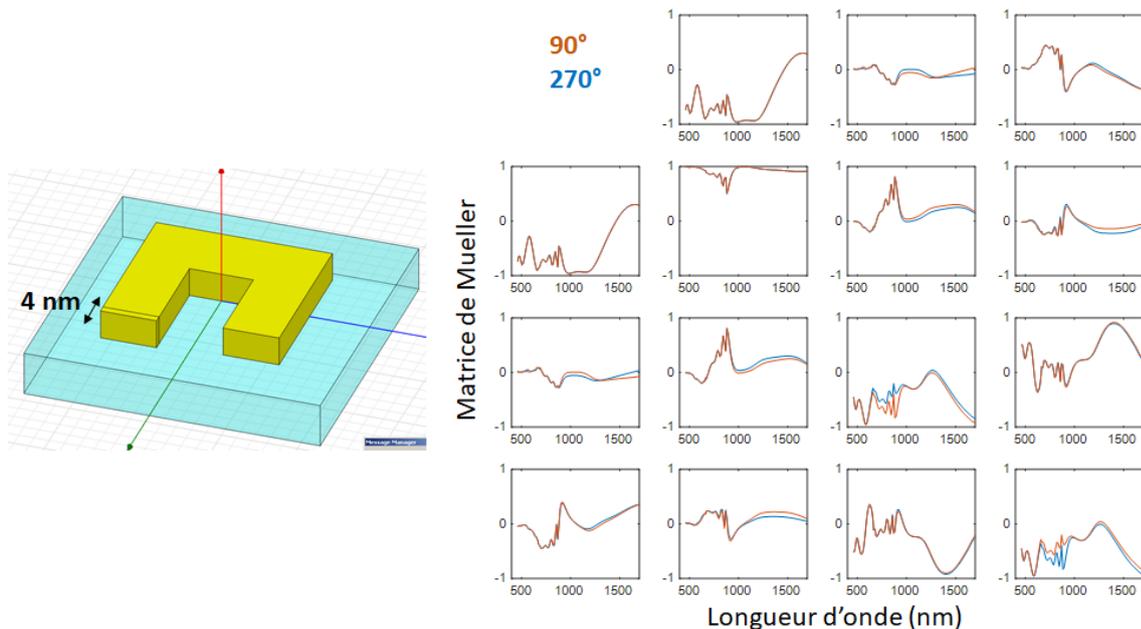


Figure 35 : Matrice de Mueller pour un réseau de résonateurs possédants un bras plus petit que l'autre de 10 nm. En rouge, la matrice à un azimut de 90° et en bleu la matrice à un azimut de 270° .

On imagine que dans le cas d'une métasurface composée de ces résonateurs asymétriques, les tenseurs constitutifs ne sont plus diagonaux dans le repère Cartésien (x,y,z). Un tenseur avec une symétrie triclinique pourrait décrire cette métasurface. En conséquence, les symétries proposées par considération de réciprocité, ne s'appliquent plus dans ce cas.

La logique initiale était de fonctionnaliser la métasurface avec les molécules biologiques d'intérêt puis de réaliser la même mesure aux deux azimuts et d'observer si une dissymétrie apparaissait de par la présence de molécules chirales. Ceci est en fait irréalisable pour cette étude car les métasurfaces possèdent des matrices non parfaitement symétriques et d'une mesure à l'autre la reproductibilité de l'alignement n'est pas totalement respectée en tout cas pas suffisamment pour pouvoir comparer deux mesures. Par contre, en utilisant la propriété du retournement temporel, il semble suffisant de mesurer les antennes à un seul azimut, la comparaison de réponse entre deux azimuts opposés s'obtient en comparant deux éléments symétriques.

Cette dernière considération est cruciale puisqu'elle permet d'envisager un suivi du greffage in-situ grâce à l'utilisation d'une cellule liquide qui ne permet pas facilement de changer les conditions de mesure.

2. La décomposition logarithmique

Une hypothèse des surfaces pseudo-chirales est leur chiralité justement, ce qui veut dire que la mesure de MM_{14} ou MM_{41} reflète une activité optique et n'est pas simplement une combinaison de diatténuation et retard linéaire (Chapitre 1). En 1977, Azzam [130] a proposé un formalisme matriciel différentiel pour les milieux optiquement anisotropes linéaires. A la suite, différents travaux [115]–[117] ont permis d'analyser une matrice de Mueller en séparant les effets polarisants de ceux dépolarisants afin d'en obtenir une interprétation plus fine. Il faut considérer une équation différentielle linéaire de propagation pour une matrice de Mueller $M(z)$ (ou z est la direction de propagation de la lumière) telle que :

$$\frac{dM(z)}{dz} = mM(z) \quad (31)$$

m est ici la matrice différentielle qui est décomposable en deux parties : une symétrique (m_m) (32) et une antisymétrique (m_u) (33) en utilisant la métrique de Minkowski $G = \text{diag}(1, -1, -1, -1)$ telle que :

$$m_m = \frac{1}{2}(m - Gm^T G) \quad (32)$$

$$m_u = \frac{1}{2}(m + Gm^T G) \quad (33)$$

Dans les faits, pour calculer m_m et m_u , il convient de calculer le logarithme de M , L , qui est proportionnel à m *via* la distance d traversée par la lumière à travers le milieu (34).

$$md = \log(M) = L \quad (34)$$

Si le milieu est uniformément dépolarisant et que ses propriétés sont uniformément distribués suivant d alors m est indépendant de z et donc il est possible d'étudier L et non plus m [116]. Il vient alors L_m (35) et L_u (36) :

$$L_m = \frac{1}{2}(L - GL^T G) = \begin{bmatrix} 0 & LD & LD' & CD \\ LD & 0 & CB & LB' \\ LD' & -CB & 0 & -LB \\ CD & -LB' & LB & 0 \end{bmatrix} \quad (35)$$

$$L_u = \frac{1}{2}(L + GL^T G) = \begin{bmatrix} 0 & \Delta LD & \Delta LD' & \Delta CD \\ \Delta LD & \alpha_1 & \Delta CB & \Delta LB' \\ \Delta LD' & \Delta CB & \alpha_2 & \Delta LB \\ \Delta CD & \Delta LB' & \Delta LB & \alpha_3 \end{bmatrix} \quad (36)$$

L_m contient les propriétés polarimétriques intrinsèques du matériau (en l'occurrence les valeurs moyennes), en particulier le CD est séparé des effets de diatténuation (LD,LD') et retardation (LB, LB') linéaires. Par ailleurs, cette décomposition est unique mais n'est applicable qu'en transmission. La matrice L_u , en revanche correspond aux incertitudes de ces propriétés, celles-ci proviennent de la dépolarisation. Les α_i sont les absorptions anisotropiques après soustraction de l'absorption isotropique α .

Il faut retenir que si M est la matrice d'un matériau parfaitement polarisant (ie qui ne dépolarise pas) alors $L_u=0$.

En l'occurrence, ce modèle de décomposition a été appliqué à une mesure réalisée en transmission avec un angle d'incidence de 15 °. La matrice de Mueller est présentée sur la Figure 36 où les symétries habituelles sont présentes.

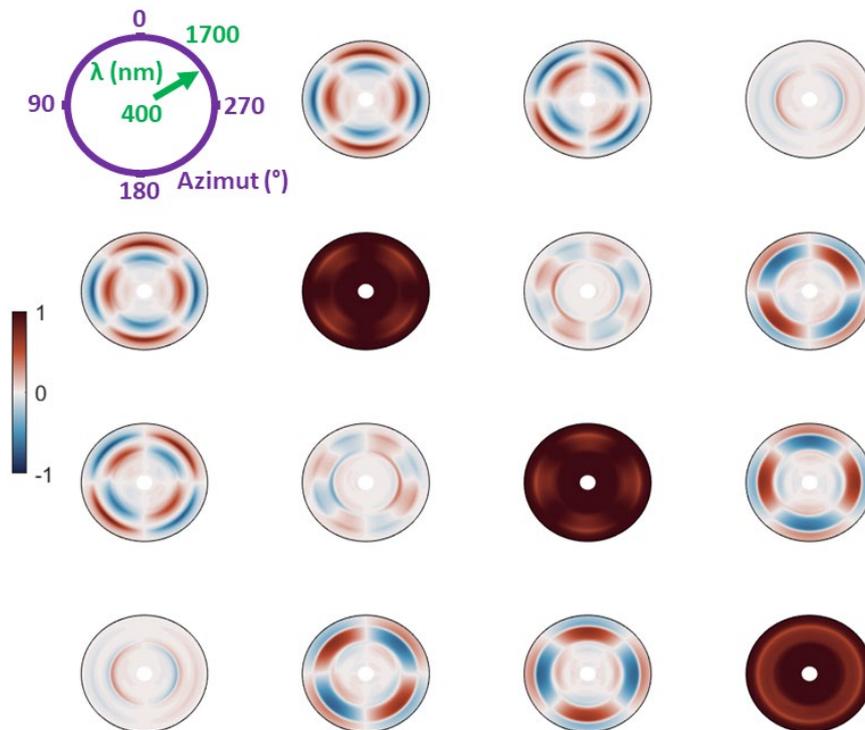


Figure 36 : Matrice de Mueller d'un échantillon composé de résonateurs en U mesuré en transmission avec un angle d'incidence de 15 °.

Ensuite, il est possible de représenter L_m Figure 37 et L_u Figure 38. Au regard des valeurs associées à L_m , les valeurs les plus élevées sont les dichroïsmes et biréfringences linéaires.

Pour obtenir une valeur de dichroïsme circulaire plus importante, il faudrait travailler à un angle d'incidence plus élevé mais la décomposition logarithmique ne serait sans doute plus valide. En outre les incertitudes dues à la dépolarisation sont généralement de l'ordre de quelques 10^{-3} (à part pour MM_{32}/MM_{23} ou c'est un peu plus important) ce qui assure une interprétation non abusive de la mesure. On remarquera qu'on retrouve l'ordre de grandeur des valeurs résiduelles trouvées pour les symétries de retournement temporel.

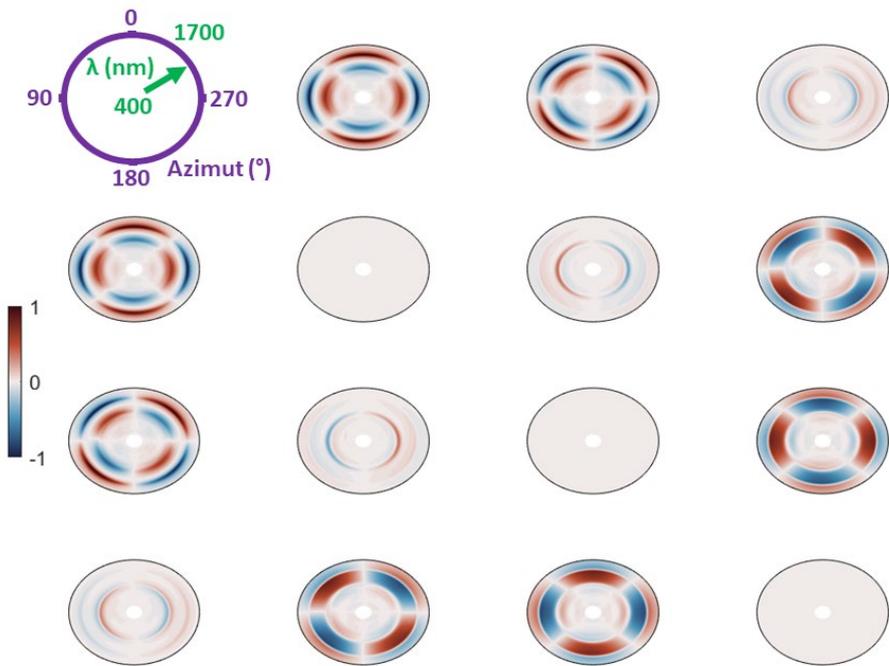


Figure 37 : Partie antisymétrique L_m de la décomposition logarithmique de la matrice de Mueller de la Figure 36.

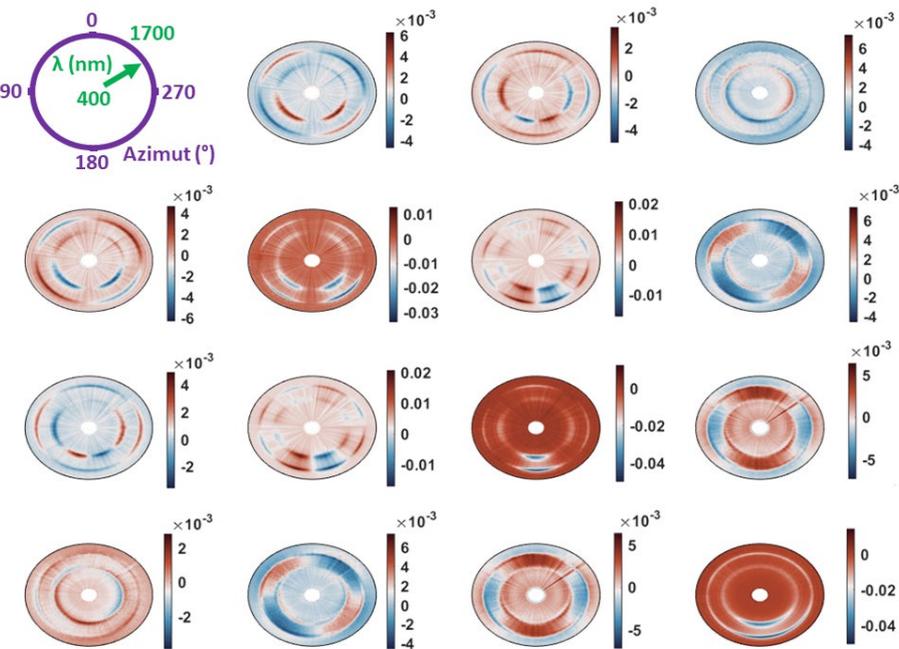


Figure 38 : Partie symétrique L_u de la décomposition logarithmique de la matrice de Mueller de la Figure 36. Attention aux échelles qui sont différentes pour chaque élément.

Principalement, les matrices L_m et L_u permettent de calculer des grandeurs qui nous intéressent tout particulièrement à savoir la polarisation et la différence d'absorption optique circulaire (CDOA).

La polarisation P (Equation (37)), déduite des valeurs de la première colonne (ou la première ligne) de la matrice de L_m , nous informe sur la capacité du matériau à polariser la lumière. Une polarisation nulle correspond à un élément qui ne polarise absolument pas de la lumière non polarisée, c'est le cas de tous les retardeurs purs, une lame quart d'onde par exemple, mais aussi d'un dépolariseur pur. *A contrario*, une polarisation de 1 correspond à un élément qui polarise parfaitement la lumière, c'est le cas d'un polariseur linéaire par exemple.

$$P = \sqrt{LD^2 + LD'^2 + CD^2} \quad (37)$$

Dans le cas des résonateurs en U, la Figure 39 (a) montre celle-ci. Elle est égale en moyenne à 0.23 ce qui montre le caractère relativement polarisant de la métasurface avec une contribution importante des effets de retard à la réponse optique, puisque la dépolarisation est négligeable (Figure 38).

Enfin et c'est le résultat le plus important issu de cette décomposition logarithmique, il est possible de calculer une différence d'absorption optique circulaire (CDOA). Celle-ci est classiquement définie telle que (38) :

$$\text{CDOA classique} = \frac{I_{\text{LCP}} - I_{\text{RCP}}}{\frac{1}{2}(I_{\text{LCP}} + I_{\text{RCP}})} \quad (38)$$

C'est la grandeur qui est mesurée par exemple lors d'une mesure sur un spectromètre de dichroïsme circulaire commercial comme ceux notamment utilisés en biologie. Cependant, dans cette grandeur, il n'y a pas que du dichroïsme circulaire pur. En effet le retard induit par l'échantillon entraîne une valeur non nulle de CDOA. Cette influence du retard est présente dans les grandeurs LD' , LB , LD et LB' . En 2019, Wilson & al. [86] montrent qu'il est possible de calculer une CDOA apparent (39) et une CDOA issue de la retardance (40). La comparaison des deux valeurs obtenus permet de conclure sur l'origine de la différence d'absorption détectée. Ceci permet de savoir si on observe une différence d'absorption entre les composantes circulaire droite et circulaire gauche de la lumière car du dichroïsme circulaire est présent ou si elle est uniquement due aux propriétés retardantes de la métasurface.

$$\text{CDOA apparent} = \frac{1}{2}(CD + LD' * LB - LD * LB') \quad (39)$$

$$\text{CDOA issue de la retardance} = \frac{1}{2}(LD' * LB - LD * LB') \quad (40)$$

La Figure 39 (b) montre la CDOA apparente et la Figure 39 (c) montre la CDOA issue de la retardance. Au regard de l'échelle associée à chaque figure il est directement visible qu'un facteur 10 est présent entre les deux valeurs. Ceci justifie que la CDOA observée est majoritairement due à du dichroïsme circulaire et donc certainement à un champ chiral généré localement par la structure pseudo-chirale. Ceci veut aussi dire qu'il est possible d'associer l'élément MM_{41} de la matrice de Mueller au dichroïsme circulaire au sens CDOA.

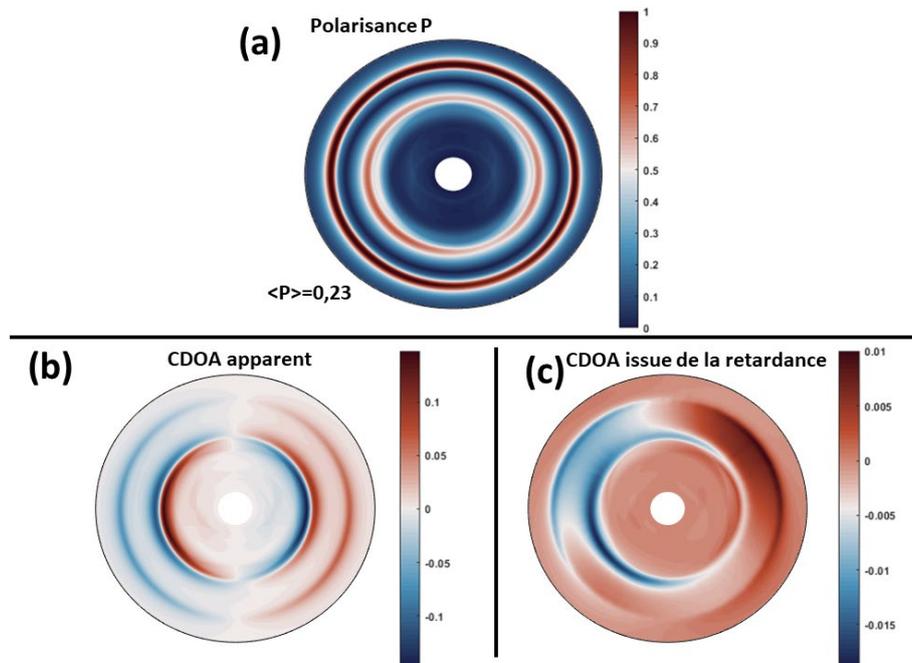


Figure 39 : Propriétés déduites de L_m avec (a) la polarisation (b) la CDOA apparent et (c) la CDOA issue uniquement des caractéristiques retardantes.

3. L'influence de la diffraction

En faisant le choix de considérer des antennes positionnées sur un réseau. Les différentes structures sont couplées et ainsi la réponse spectroscopique des échantillons s'en trouve modifiée. En particulier, la diffraction se manifeste sous la forme des anomalies de Rayleigh, c'est-à-dire des variations très localisées et importantes des propriétés optiques qui ont lieu lorsque les conditions d'angle d'incidence et de longueur d'onde permettent de coupler l'onde incidente à un mode propagatif diffracté se propageant parallèlement à la surface (soit le long de l'interface résonateurs/substrat, soit résonateurs/air). Ces anomalies qui sont généralement non souhaitées sont évitables ou tout du moins réduites en simulation numérique en moyennant différents angles d'incidence et pas du réseau (Chapitre 2). C'est-à-dire que la réponse spectroscopique est moyennée pour plusieurs angles et plusieurs pas. Dans le cadre expérimental, ce travail serait long pour la variation de l'angle d'incidence et impossible pour la variation du pas du réseau.

Sur les mesures réalisées par Lu Zhang, les anomalies de Rayleigh sont bien reconnaissables sous la forme de structures circulaires. La Figure 40 montre l'élément MM_{34} de la matrice mesurée en réflexion pour différents azimuts et longueurs d'onde à un angle d'incidence de 50° dans l'air. La position des anomalies de Rayleigh d'ordres $\langle 1,0,0 \rangle$, $\langle 1,1,0 \rangle$ et $\langle 1,1,1 \rangle$ a été calculée pour montrer la concordance entre les pics observés expérimentalement et la position théorique des anomalies. On a supposé un réseau carré de pas et deux indices possibles en l'occurrence $n=1.45$ pour le verre et $n=1.00$ pour l'air. Les discontinuités observées sur l'élément de la matrice se superposent parfaitement avec les lignes calculées. La méthode utilisée est équivalente à celle montrée dans la littérature par l'équipe de Morten KILDEMO [131].

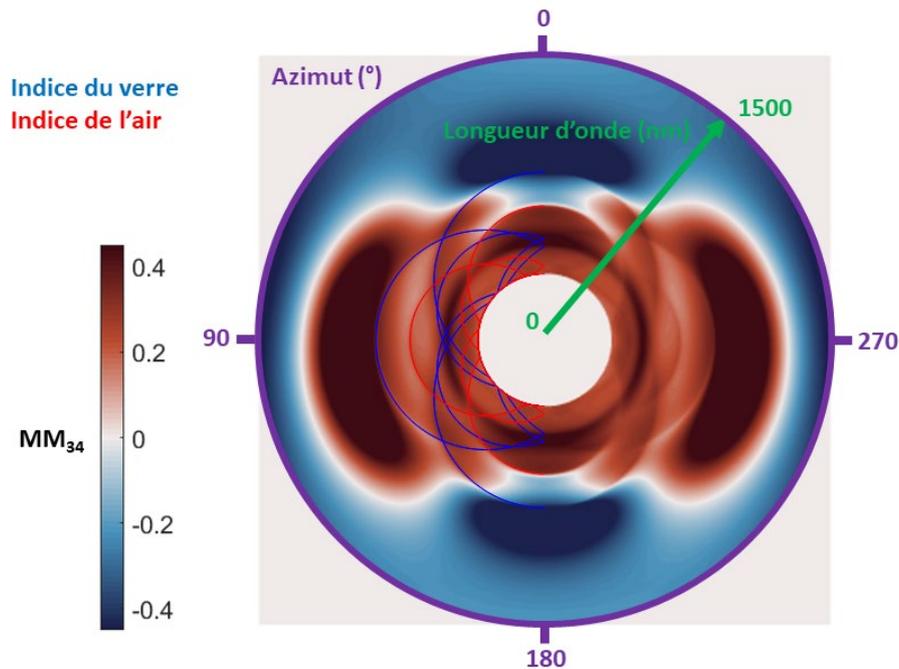


Figure 40 : Elément MM_{34} de la matrice de Mueller mesuré pour différents azimuts et longueurs d'onde, les anomalies de Rayleigh calculés théoriquement pour l'air (en rouge) et le verre (en bleu) sont superposés.

Afin de réduire l'influence de la diffraction et des pics trop brutaux non souhaités dans les spectres, les derniers échantillons réalisés l'ont été en déplaçant aléatoirement la position des U sur à partir des positions prédéterminées par un réseau. Ceci permet alors de minimiser certains pics de diffraction dans les signaux obtenus et donc un traitement de donnée fastidieux et complexe pour s'astreindre de l'influence de la diffraction. La Figure 41 montre les différents cas possiblement réalisables en lithographie électronique : (a) un réseau régulier, (b) un réseau avec un désordre pseudo-aléatoire et (e) des U avec un désordre en position complètement aléatoire (mais orientés et sans recouvrement). Dans ce dernier cas, le taux de recouvrement atteignable sur la surface n'est que de 77 %. Des patches réguliers (c) et pseudo-aléatoires (d) ont ainsi été réalisés avec ce taux de recouvrement. Pour des raisons de comparaison et de niveau de signal, j'ai préféré utiliser des réseaux ordonnés ou pseudo-aléatoires (que j'appellerai aléatoire par la suite).

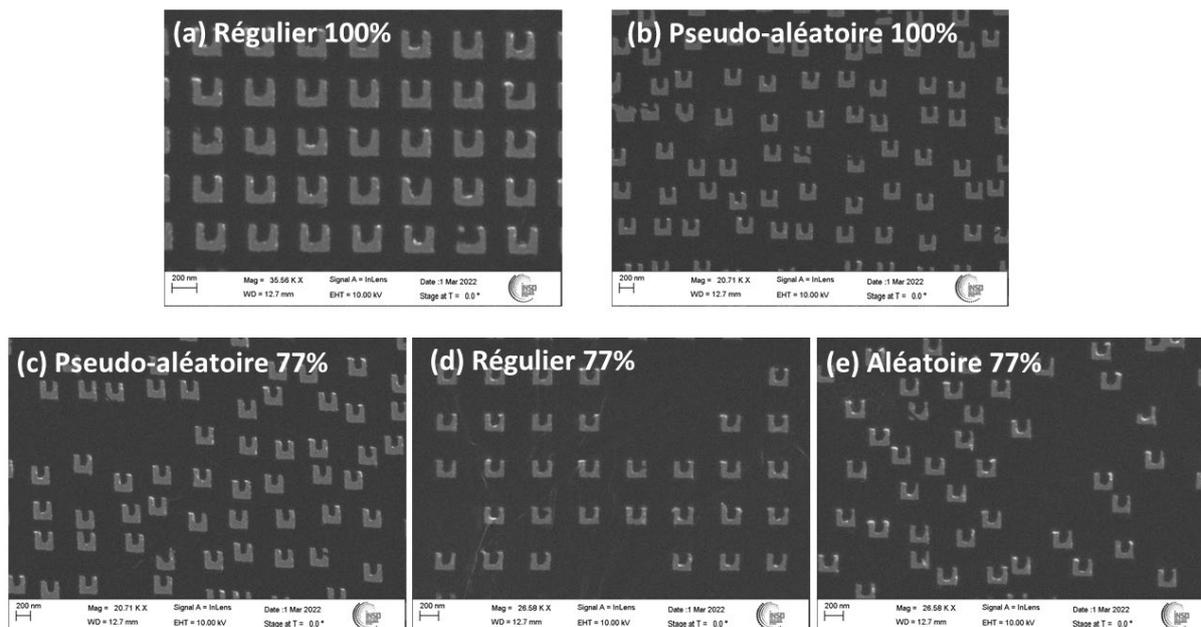


Figure 41 : Images MEB d'échantillons réalisés en lithographie électronique pour un réseau de positionnement des résonateurs en U (a) régulier (recouvrement 100 %), (b) pseudo-aléatoire (recouvrement 100 %), (c) pseudo-aléatoire (recouvrement 77 %), (d) régulier (recouvrement 77 %) et (e) aléatoire (recouvrement 77 %).

Le positionnement aléatoire permet de réduire l'influence des anomalies de Rayleigh, c'est observable sur la Figure 42. Sur l'élément MM_{12} de la matrice de Mueller un pic dû à la diffraction est clairement visible autour de 500 nm pour l'échantillon ordonné (Figure 42 (a)) tandis qu'il disparaît pour l'échantillon désordonné (Figure 42 (b)). La présence de ces anomalies de Rayleigh rend difficile l'interprétation des données. La réduction de l'influence de la diffraction est cruciale pour déterminer des décalages spectraux (autour de 500 nm ici).

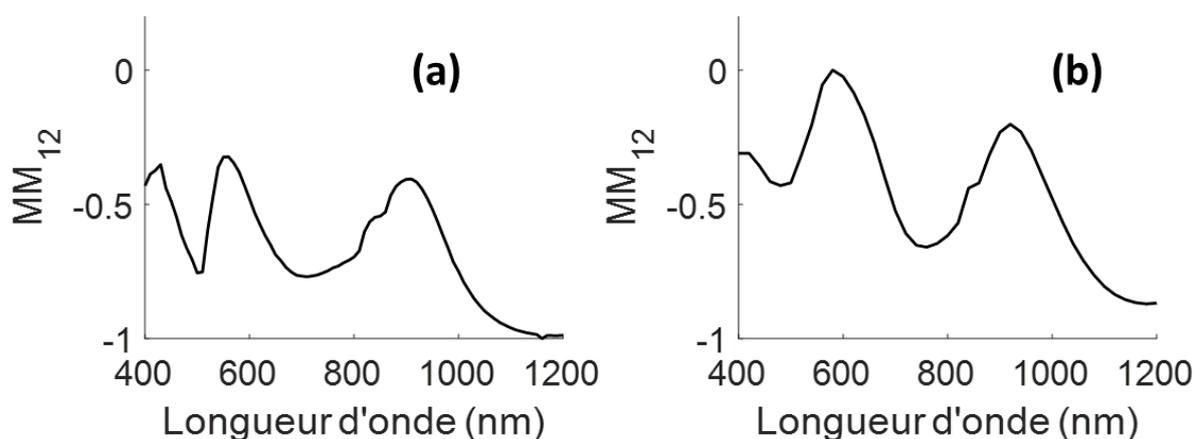


Figure 42 : Élément MM_{12} de la matrice de Mueller associée à un positionnement des U dans un réseau de manière (a) ordonné et (b) désordonné.

Partie 3. L'ellipsométrie généralisée à l'INSP : un environnement liquide

Les mesures réalisées durant ce travail ont été réalisées à l'INSP en utilisant une cellule liquide. Les caractéristiques de ce travail expérimental sont présentées dans cette partie notamment : la cellule pour environnement liquide, la procédure d'alignement et la stabilité de la mesure.

1. Le milieu dans lequel est réalisée la mesure

L'ellipsomètre utilisée dans le cadre de la thèse est un V-VASE (J. A. Woolam). La plage spectroscopique du monochromateur associé s'étend de 190 nm à 2500 nm ; les angles d'incidence disponibles sont dans une gamme comprise entre 17 ° et 89 ° et enfin il est possible de focaliser le faisceau à l'aide de lentilles ce qui donne un spot d'approximativement 260 μm^2 . La source est une lampe à Xenon. Le logiciel associé permet de calculer directement les éléments de la matrice de Mueller sans traitement de données de notre côté.

Dans le cas de notre appareil, il n'est possible de mesurer que les trois premières lignes de la matrice de Mueller. Ceci est dû à la présence d'un compensateur uniquement dans le bras source de l'appareil.

Au début de la thèse et dans le cadre du contrat post-doctoral de Lu Zhang, les mesures étaient réalisées pour différents angles d'incidence et différents angles azimutaux ce qui a permis de faire les choix présentés jusqu'ici. De plus ces mesures étaient réalisées à l'air. L'idée principale était d'observer la matrice de Mueller d'un échantillon, de fonctionnaliser cet échantillon avec des molécules biologiques (principalement des protéines) puis de répéter la mesure en essayant de reproduire les conditions expérimentales. Ces mesures donnaient des résultats probants mais ont soulevé trois problèmes majeurs :

- La difficulté de reproduire la même expérience avant et après fonctionnalisation
- L'impossibilité de suivre *in-situ* le greffage des molécules
- L'impossibilité d'étudier l'influence de solvants

C'est pourquoi, un protocole qui permet de mesurer un échantillon à un azimut et à un angle d'incidence fixé au sein d'une cellule liquide permettant de faire une expérience *in-situ* existe désormais. La cellule liquide permet à la fois d'étudier l'influence de différents milieux mais aussi de réaliser un suivi cinétique lors de l'adsorption de biomolécules. La mesure de la matrice de Mueller dans un environnement liquide permet de modifier l'environnement diélectrique sans modifier les réglages optiques.

Une cellule a été développée et imprimée en 3D au LRS (Figure 43) avec Axel Wilson. La cellule se compose d'un corps, d'un couvercle et d'un joint torique. L'échantillon est placé entre le couvercle et le joint torique, et serré à l'aide de trois vis M3. L'étanchéité est assurée par compression du joint torique entre l'échantillon et le corps de la cellule. Les deux orifices latéraux comportent un canal menant à une cavité d'environ 0,3 cm^3 . Ils sont taraudés afin de visser des connections standards en PEEK (Polyétheréthercétone) permettant la circulation du liquide à l'aide de seringues standards.

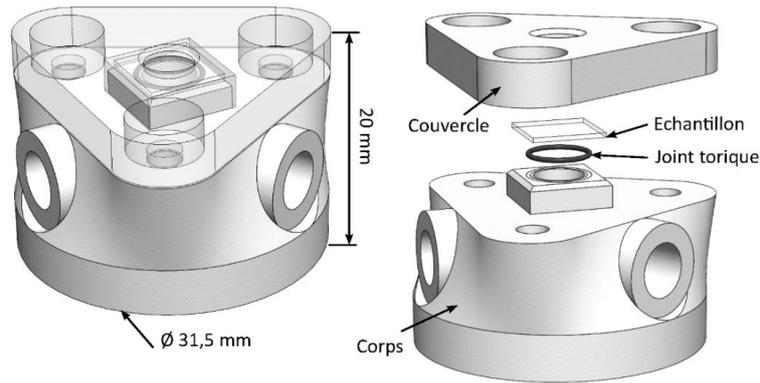


Figure 43 : Cellule utilisée pour réaliser les mesures. Cellule imprimée en 3D au LRS en ABS et en acide méthacrylique.

Une première version de la cellule a été imprimée en 3D en acrylonitrile butadiène styrène (ABS) par dépôt de filament fondu (FDM) sur une Ultimaker 3. Un test de stabilité de l'ABS dans différents solvants a été réalisé par immersion de chutes d'ABS pour une durée de 24 heures. Le test a démontré que la cellule était stable dans l'eau, l'éthanol et l'acétone mais pas dans du TFE 40 % (dans H₂O). Ce solvant est d'intérêt car il permet de donner une structure aux peptides étudiés en solution (Chapitre 4). Pour les mesures avec le TFE une seconde version de la cellule a été imprimée par stéréolithographie laser (SLA) sur une Formlabs Form3. Cette méthode d'impression 3D avancée utilise une résine visqueuse composée d'un polymère (acide méthacrylique) et d'un photoinitiateur. La polymérisation est initiée grâce à un laser UV balayant couche par couche les régions à durcir. La résine polymérisée a passé le test de stabilité dans le TFE validant son usage pour les mesures.

Pour mesurer les métasurfaces, l'alignement optique est bien évidemment primordial et l'élaboration du processus d'alignement a pris un certain temps afin de déterminer les conditions optimales pour mesurer un échantillon. En effet, depuis les premières mesures de résonateurs en U réalisées à l'INSP sur l'ellipsomètre [97], les conditions expérimentales sont bien différentes. En particulier, la procédure a dû être adaptée à la présence d'une mesure en cellule liquide ce qui implique qu'il n'est pas possible d'effectuer des mesures suivant différents azimuts et que celui-ci doit être déterminé soigneusement une fois pour toute dès le début des expériences. On essaiera de se placer suivant l'azimut 90°, ou 270°, ce qui permet de minimiser les différences entre les éléments de matrice de Mueller symétriques et d'espérer une plus grande sensibilité à des différences qui pourraient apparaître.

2. Alignement d'un échantillon pour la mesure de résonateurs en U par ellipsométrie généralisée

La procédure d'alignement a été adaptée et est présentée en Annexe 2. Il sera présenté ici uniquement l'alignement azimutal.

Le réglage de l'angle azimutal est crucial car il permet de déterminer les symétries initiales de la matrice. La mesure des éléments de la matrice de Mueller pour un échantillon immergé dans l'eau à une longueur d'onde de 840 nm à différents azimuts permet de rendre compte de cette calibration comme le montre la Figure 44. Les éléments se rapprochent lorsque l'azimut est proche d'une valeur centrale correspondant à l'azimut 90°. Pour les raisons

présentées plus haut, il est cependant impossible d'obtenir l'égalité parfaite des éléments pour chacun des couples M_{ij} et M_{ji} et pour toutes les longueurs d'onde.

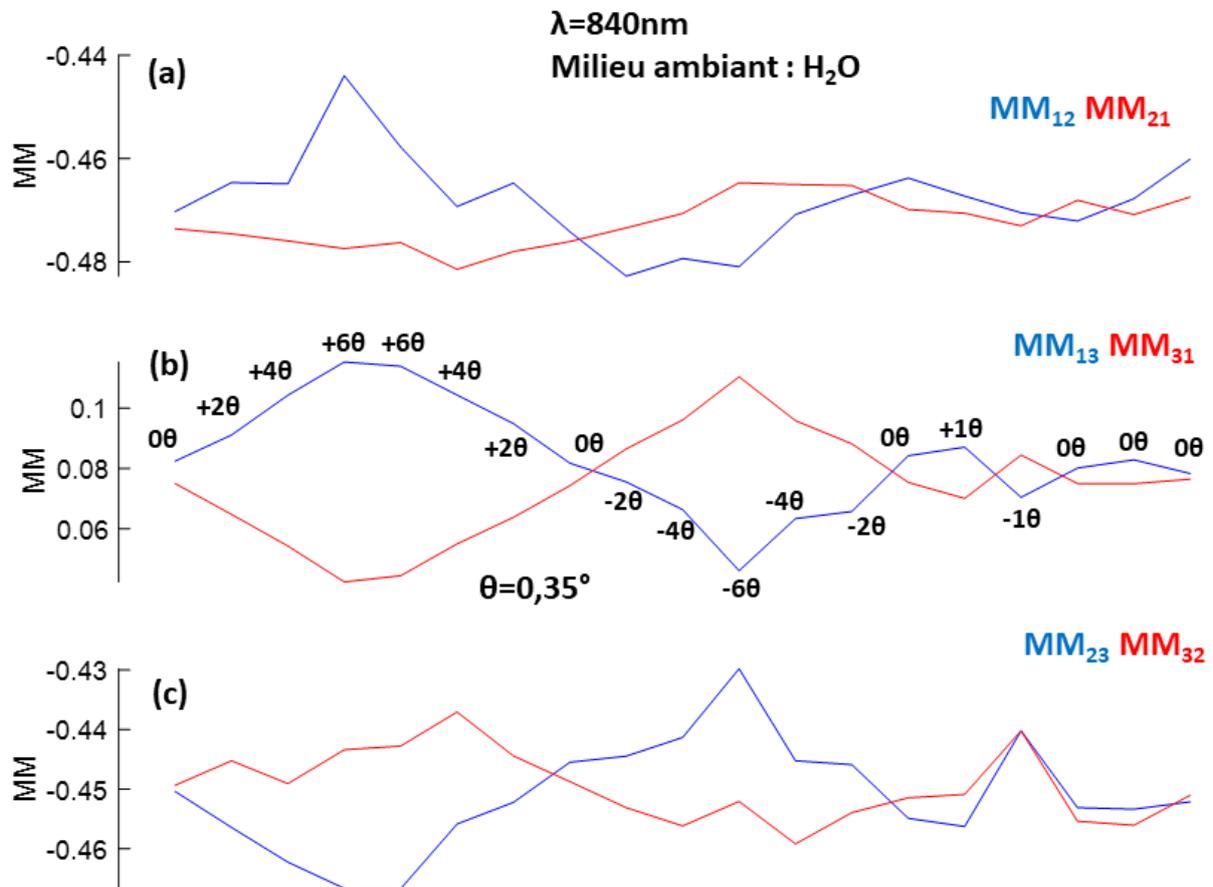


Figure 44 : Obtention de l'égalité des éléments symétriques de la matrice de Mueller en fonction de l'angle azimutal par rapport au plan de polarisation pour un échantillon de U dans de l'eau à $\lambda=840\text{nm}$ pour (a) MM_{12}/MM_{21} (b) MM_{13}/MM_{31} et (c) MM_{23}/MM_{32} . On gardera à l'esprit qu'avant chaque rotation il est important de vérifier que le faisceau est toujours centré sur la métasurface.

3. Stabilité de la mesure

Une détermination de la stabilité de la mesure au cours du temps est nécessaire pour déterminer des seuils d'incertitude acceptables. La Figure 45 (a) présente la matrice de Mueller (trait en bleu) d'un échantillon mesuré dans de l'eau. La différence entre les éléments de la matrice pour une mesure à $t=20\text{h}$ et une mesure initiale est aussi présentée (trait rouge). Les différences observées sont inférieures à .02 pour tous les éléments. En outre, il est utile ici de s'intéresser à l'effet induit en décalage spectral car ce sera la grandeur d'intérêt pour l'interprétation des résultats. Une mesure a été réalisée toutes les heures pendant 20h ce qui permet de suivre une « cinétique » de stabilité. Sont présentés ici Figure 45 (b) et (c) les éléments MM_{12} et MM_{14} de la matrice pour les 20 mesures et en (d) et (e), les décalages spectraux associés en fonction du temps au niveau des points d'inflexion des éléments susnommés. Le décalage observé est ici inférieur à 0.1 nm pour MM_{12} et 0.3 nm pour MM_{14} ce qui donne un ordre de grandeur pour l'interprétation des résultats et l'incertitude de

mesure associée. Il est certain qu'une partie de ces dérives peut être attribuée à la variation de la température au cours du temps de la pièce dans laquelle s'effectue la mesure et qu'une stabilisation de la cellule en température pourrait les réduire. Cependant, ces dérives sont bien en deçà de celles reportées dans la littérature comme caractéristiques de la présence de molécules chirales sur une métasurface chirale [36]. On verra aussi que les cinétiques suivies dans ce travail ont une durée caractéristique de l'ordre de 3h, les dérives observées sont bien plus faibles alors. On peut considérer que la stabilité de la mesure est pour l'instant suffisante pour caractériser les effets qui nous intéressent.

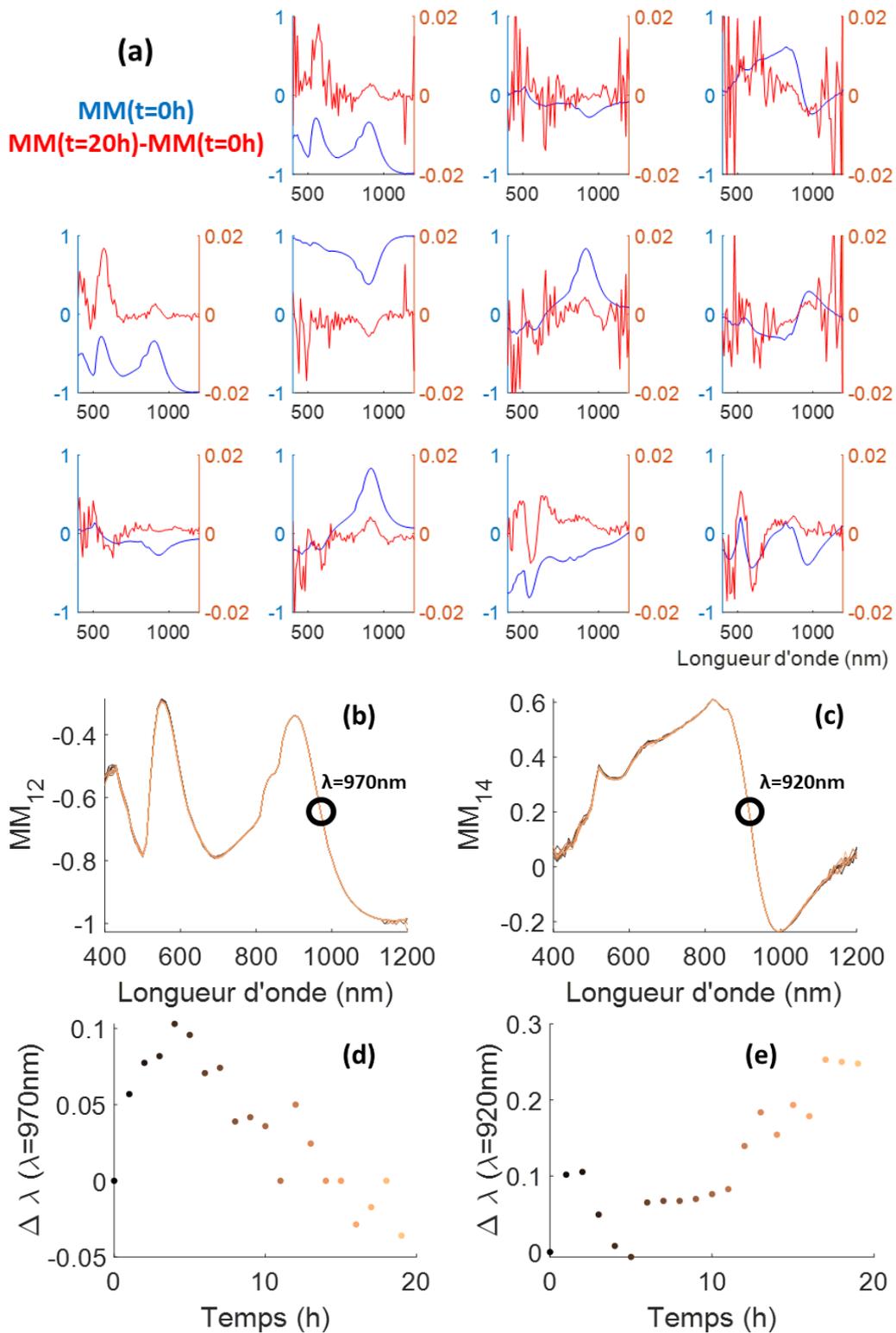


Figure 45 : Etude de la stabilité : (a) Matrice de Mueller dans l'eau (en bleu) et différence entre les matrices après 20h d'attente (en rouge), (b) MM_{12} pour 20 mesures pendant 20h, (c) MM_{14} pour 20 mesures pendant 20h, (d) $\Delta \lambda$ à 970 nm (point d'inflexion) pour MM_{12} en fonction du temps et (e) $\Delta \lambda$ à 920 nm (point d'inflexion) pour MM_{14} en fonction du temps.

Partie 4. Caractérisation des métasurfaces dans la cellule liquide

La mesure des décalages spectraux peut être faite à différentes longueurs d'ondes ou pour différents éléments de la matrice de Mueller. Cependant, certaines conditions de mesure sont plus favorables, ce qui est classiquement quantifiable par un facteur de mérite. Dans le cas des matrices de Mueller, j'ai déterminé un facteur de mérite alternatif.

1. Mesure d'une métasurface dans de l'eau

La Figure 46 montre une matrice de Mueller mesurée entre 400 nm et 2000 nm pour un échantillon composé de résonateurs en U positionnés sur un réseau pseudo-aléatoire en contact avec de l'eau. Ceci permet de mettre en évidence les différents modes de résonance associés aux résonateurs en U (déjà décrits précédemment)

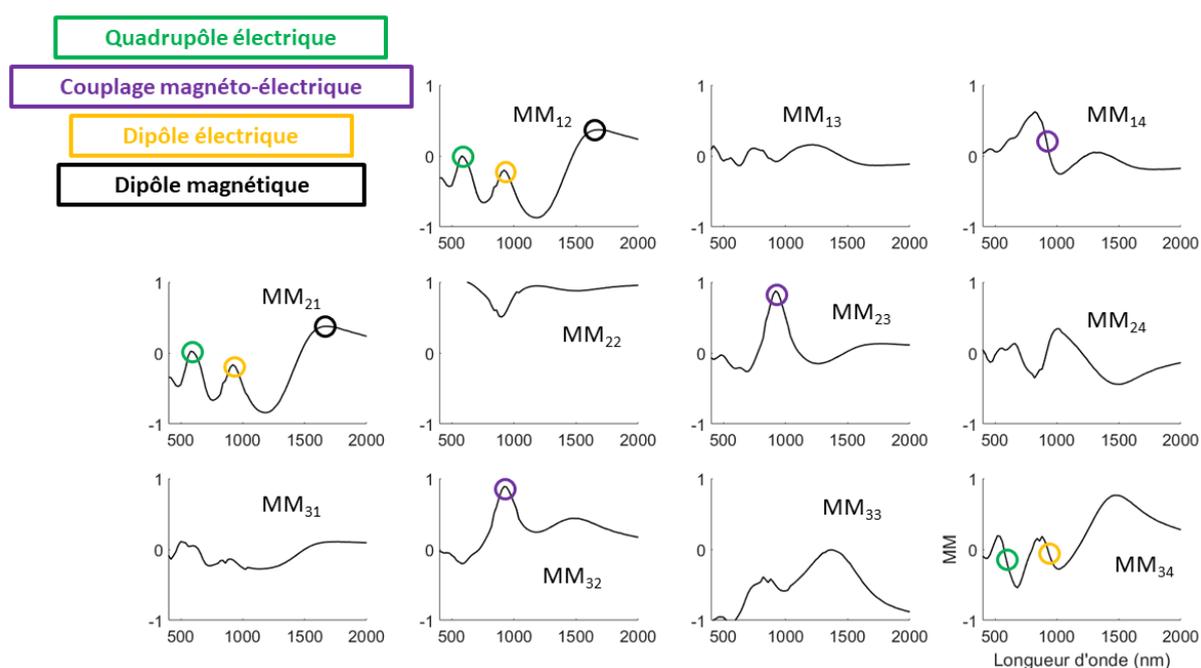


Figure 46 : Matrice de Mueller d'une métasurface dans l'eau mesurée à l'ellipsométrie : les structures associées aux différents modes dans les éléments de la matrice sont représentés selon quatre couleurs.

Les différents modes de résonance sont bien retrouvés. Le quadripôle électrique et le dipôle électrique correspondent à des maxima de MM₁₂ et MM₂₁ et à des points d'inflexion de MM₃₄. De même, le couplage magnéto-électrique est visible sur les maxima de MM₂₃ et MM₃₂ et sur une inflexion de MM₁₄.

2. Matrices pour les différents échantillons réalisés, reproductibilité

Cette mesure fut reproduite pour plusieurs séries d'échantillons :

- Cinq avec un arrangement ordonné des résonateurs en U pour la plupart des échantillons recyclés qui ont été utilisés lors du contrat postdoctoral de Lu Zhang
- Quatre échantillons avec une disposition pseudo-aléatoire des antennes

Ceci est présenté sur la Figure 47. Ici, l'échelle va de 400 nm à 1200 nm, car les échantillons ordonnés n'ont été mesurés que sur cette gamme spectrale.

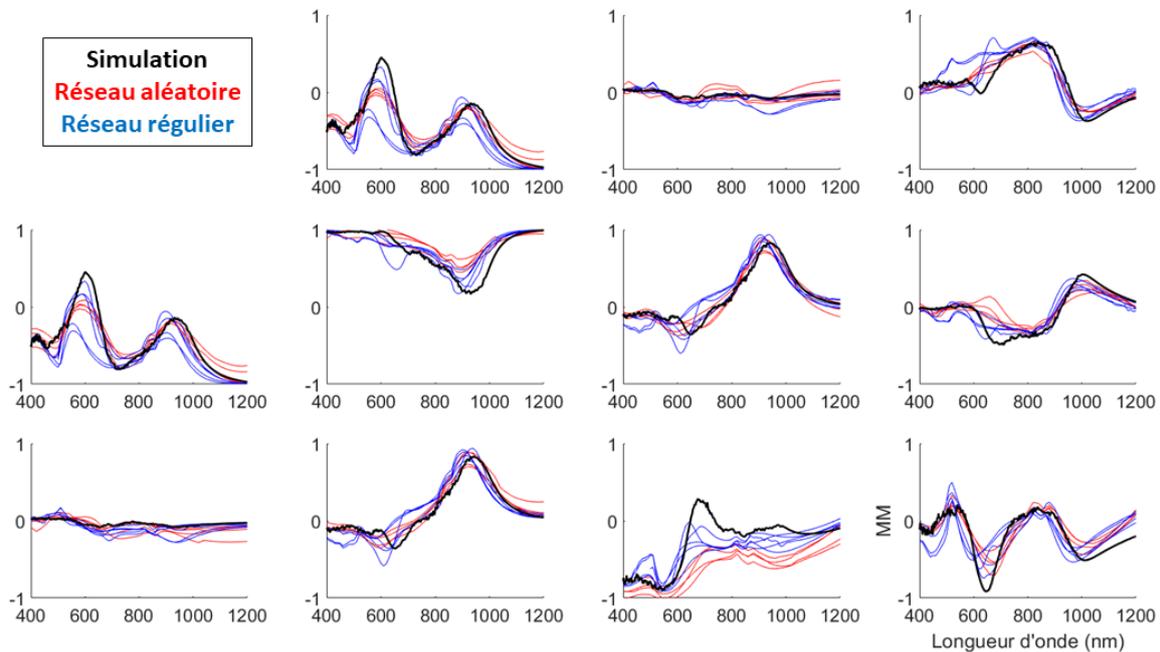


Figure 47 : Matrices de Mueller superposées pour 9 échantillons différents et une simulation.

Les dynamiques se retrouvent d'un échantillon à l'autre, c'est-à-dire que les résonances sont au même endroit avec environ la même intensité pour les deux séries d'échantillons (aléatoire et régulier). C'est le plus important dans le sens où cela signifie que les modes à observer sont dans les mêmes zones spectroscopiques et polarimétriques.

Cependant les courbes ne se recouvrent pas parfaitement. Cette non reproductibilité peut s'expliquer selon différents facteurs classés qualitativement de ceux qui ont la plus grande influence vers ceux qui en ont le moins :

- L'incertitude sur l'alignement optique et notamment pour ces deux paramètres :
 1. L'angle azimutal : la recherche de la symétrie entre les éléments est le critère de choix : ceci est difficile à réaliser pour toutes les longueurs d'onde et éléments de la matrice simultanément
 2. Le plan de focalisation : imprécision sur la recherche du plan focal principalement à cause de la nécessité de travailler sur la face arrière de l'échantillon
- La non reproductibilité des échantillons lors de la fabrication et ce à deux moments cruciaux :
 1. Malgré toute l'attention portée à cette étape, le dépôt titane/or n'est jamais réalisé avec le même angle exactement ce qui peut entraîner des longueurs et largeurs de bras différentes pour les U
 2. L'épaisseur de PMMA n'est pas la même lors des différents dépôts, une incertitude de quelques nanomètres peut suffire à changer la structure des U (largeur des bras, principalement)

- Le recyclage des échantillons dits réguliers
- Les facteurs environnementaux non contrôlables comme la température

En outre, en noir sur la figure précédente, la simulation réalisée sur HFSS semble concorder sur les positions des résonances. Par conséquent, ceci valide qualitativement à posteriori la simulation réalisée dans le Chapitre 2.

3. Vers un facteur de mérite alternatif pour chaque métasurface

La caractérisation des métasurfaces réalisés passe par la mesure d'une sensibilité et d'un facteur de mérite alternatif comme présenté dans le Chapitre 1. Des mesures ont donc été réalisées pour tous les échantillons en modifiant le solvant au sein de la cellule liquide en l'occurrence le passage de l'eau à l'éthanol. La méthode pour le calcul d'une sensibilité S_B et de FOM** (présentés dans les Chapitres 1 et 2) est le même que celui adopté pour le traitement des données obtenues en simulation numérique. C'est-à-dire qu'il faut procéder aux étapes suivantes :

1. Détermination de $\Delta\lambda$ en fonction de la longueur d'onde *via* un fit linéaire
2. Calcul de la sensibilité $S_B = \frac{\Delta\lambda}{\Delta n}$, associée en prenant en compte le caractère dispersif du milieu
3. Calcul du facteur de mérite alternatif $FOM^{**} = S_\lambda * \frac{dMM}{d\lambda}$

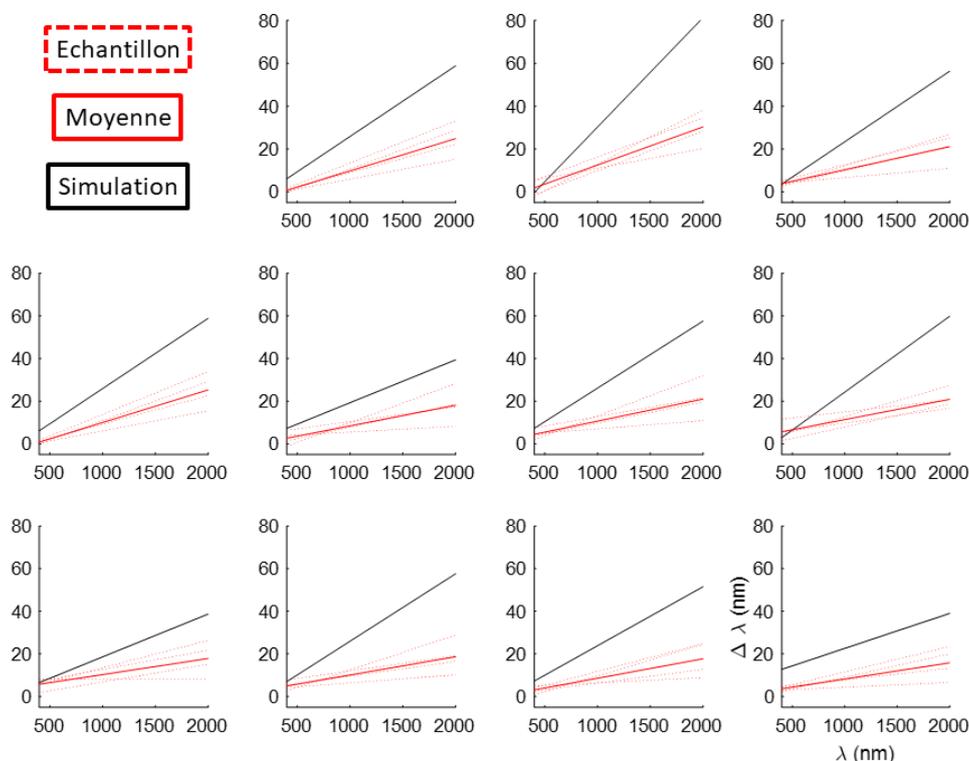


Figure 48 : Décalage spectroscopique associé à chaque élément de la matrice pour une moyenne sur des échantillons de type aléatoire.

Sur la Figure 48, les décalages spectraux associés au changement d'indice H2O/EtOH sont croissants pour tous les éléments de la matrice. Cependant, le coefficient directeur est

différent suivant l'élément considéré. Ceci reflète le comportement différent de chaque élément pour une même mesure, la sensibilité au changement de milieu change selon la polarisation étudiée. La comparaison avec ce qui est obtenu en simulation numérique valide la dynamique croissante et la différence de comportement. En revanche le décalage plus important observé *via* le calcul par éléments finis s'explique par :

- La différence systématique observée entre les mesures et les simulations (pas vraiment comprise pour l'instant) pour les grandes longueurs d'onde ($\lambda > 1000$ nm) amène à une surestimation du décalage réel
- L'utilisation de l'indice de réfraction non dispersif pour l'eau

Pour étudier la différence de sensibilité entre les éléments, les valeurs de S_B peuvent être comparées à la littérature.

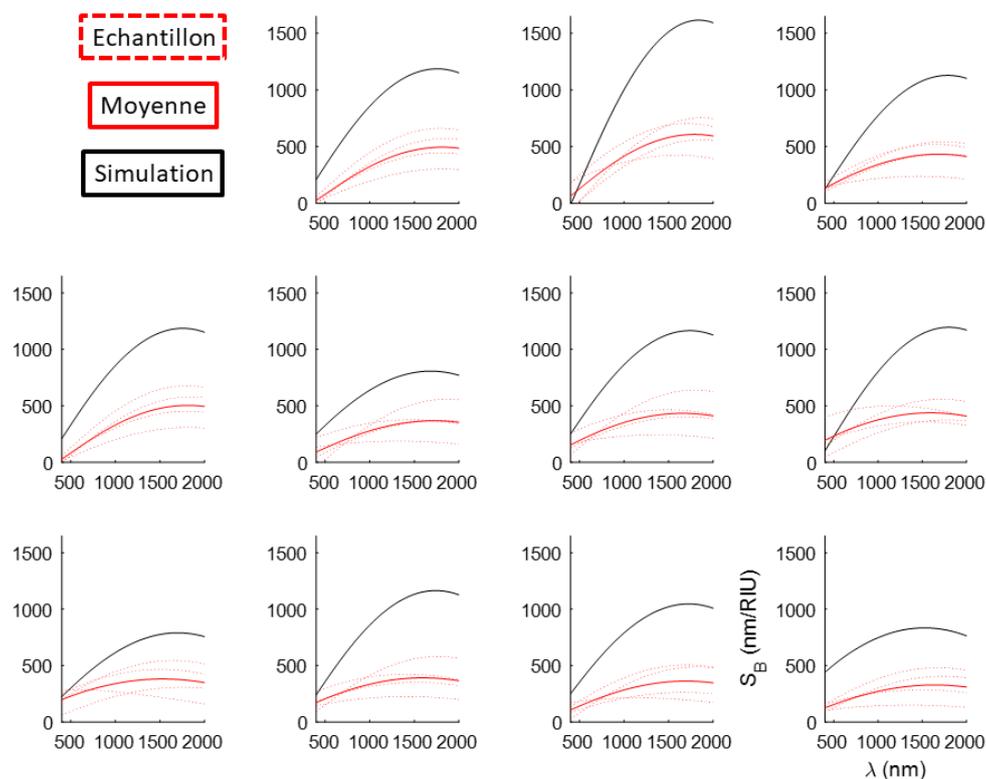


Figure 49 : Sensibilité associée à chaque élément de la matrice de Mueller pour une moyenne sur des échantillons de type aléatoire.

Les sensibilités maximales obtenues sont résumés sur les Tableau 6 (U aléatoires), Tableau 7 (U réguliers) et Tableau 8 (Simulation).

Tableau 6 : Sensibilité S_B maximale moyenne par élément de matrice de Mueller obtenue sur les métasurfaces aléatoires.

S_B	495	607	432
503	367	433	437
381	391	362	328

Tableau 7 : Sensibilité S_B maximale moyenne par élément de matrice de Mueller obtenue sur les métasurfaces régulières.

S_B	590	592	339
615	272	581	504
579	509	934	555

Tableau 8 : Sensibilité S_B maximale moyenne par élément de matrice de Mueller obtenue pour la simulation numérique HFSS.

S_B	1186	1615	1128
1186	807	1166	1195
792	1164	1046	834

Les valeurs expérimentales peuvent être comparés à la littérature pour des objets équivalents. Seront ici considérés les valeurs recueillis dans la revue de 2016 de Špačková & al. [134]. Le Tableau 9 est ici une reproduction partielle d'un tableau de cette revue permettant de comparer avec les valeurs de S_B :

Tableau 9 : Valeurs références de sensibilité pour des objets comparables aux métasurfaces composés de U en or (issu de [134]).

Nanostructure (Au)	Type d'étude	Longueur d'onde d'étude (nm)	S_B (nm.RIU ⁻¹)	Référence
Nano-batônnet	Théorique	600-1000	200-600	[135]
Nano-prisme	Expérimentale	700	647	[136]
Nano-étoile	Expérimentale	650-750	218	[137]
Nano-anneau	Expérimentale	870	350	[138]
Nano-croix	Expérimentale	1400	500	[139]
Bipyramide	Expérimentale	900	381	[140]

Les valeurs obtenues pour les métasurfaces composés de U en or sont dans le même ordre de grandeur que ceux obtenus dans la littérature pour des objets similaires. Ceci valide *a posteriori* la sensibilité satisfaisante de nos structures. La recherche d'une meilleure sensibilité n'est pas dans le cadre d'étude du travail présenté ici même si une étude paramétrique permettrait sûrement d'optimiser S_B . Ici les dimensions ont été choisies pour obtenir des résonances dans des zones du spectre électromagnétique mesurables en ellipsométrie et non pour obtenir le meilleur S_B possible. On notera que la sensibilité est plus faible pour les métasurfaces aléatoires (bien que satisfaisante). Cependant, on rappellera que la diminution des signatures des anomalies de Rayleigh nous semble être un critère plus important que de gagner en sensibilité à ce stade.

Pour connaître les zones où la sensibilité est la meilleure, il convient de calculer le facteur de mérite alternatif FOM**. Il est présenté Figure 50 pour toute la matrice pour un échantillon

et à titre de comparaison pour la simulation numérique associée. Les valeurs de facteur de mérite alternatif sont plus faibles expérimentalement. Ceci provient principalement de la sensibilité différente suivant que l'on considère la mesure expérimentale ou bien le calcul par simulation numérique (Figure 49).

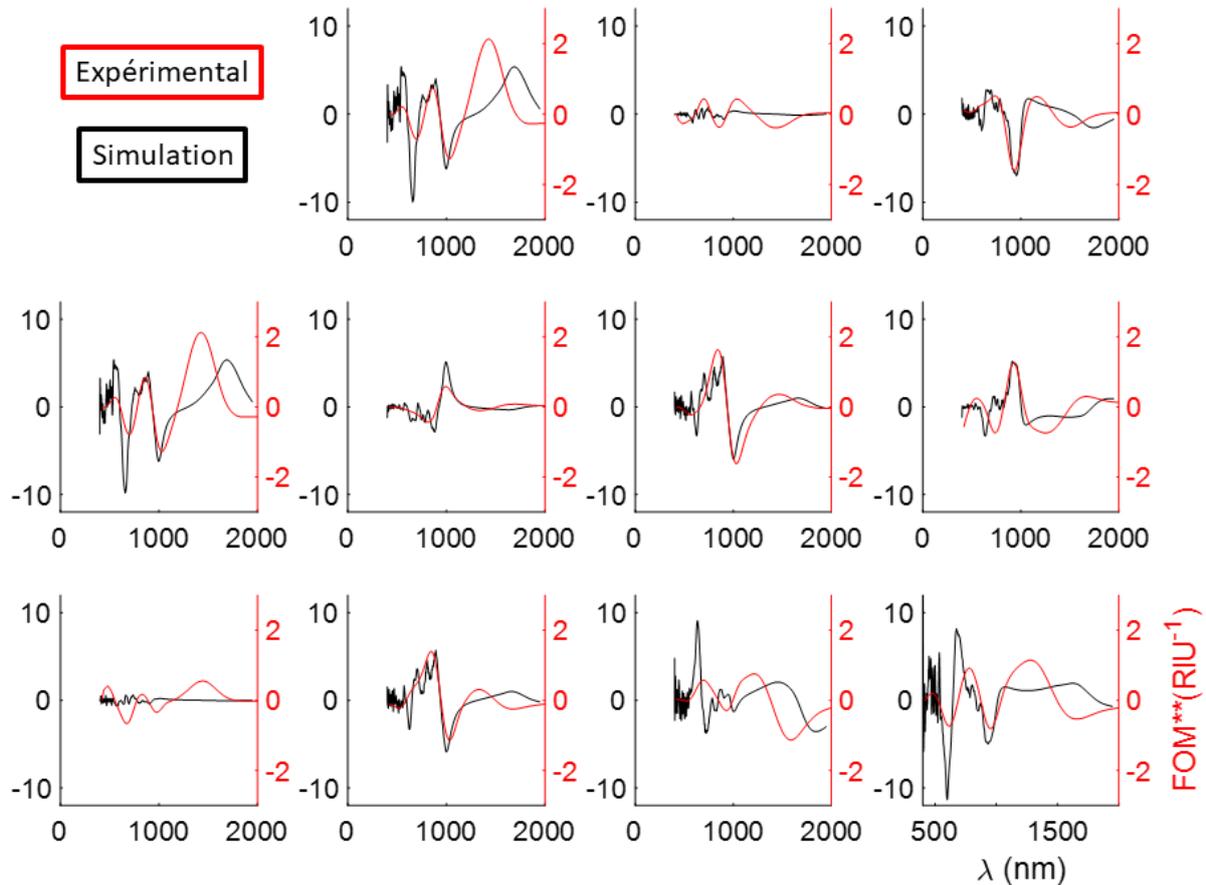


Figure 50 : Facteur de mérite alternatif FOM** associé à chaque élément de la matrice pour un échantillon de type aléatoire entre 400 nm et 2000 nm (rouge) et pour la simulation (noir).

C'est cette caractérisation qui détermine les zones à étudier lors du greffage des biomolécules. Pour chaque longueur d'onde et chaque élément, un facteur de mérite alternatif est déterminé. Les extremums locaux associés à FOM** sont caractéristiques d'une certaine polarisation et d'une longueur d'onde. Ceci permet de déterminer les gammes de longueur d'onde pertinentes pour caractériser la sensibilité d'un échantillon à une variation d'indice de son environnement. La détermination des éléments de la matrice de Mueller permet aussi de tirer parti des relations entre eux comme expliqué dans le Chapitre 2. Ceci est illustré en particulier sur la Figure 51 (a) MM_{12} et (b) MM_{34} . Au niveau des maximums de MM_{12} , on retrouve le positionnement des modes de résonances en l'occurrence le quadropôle électrique et le dipôle électrique. Cependant, les maximums sur MM_{12} ne correspondent pas à des extremums pour FOM**. En revanche, sur l'élément conjugué MM_{34} , ces positions ($\lambda=600$ nm/930 nm) correspondent à des extremums locaux pour FOM**. Ceci est principalement dû au fait qu'un maximum de MM_{12} correspond à un point d'inflexion pour MM_{34} .

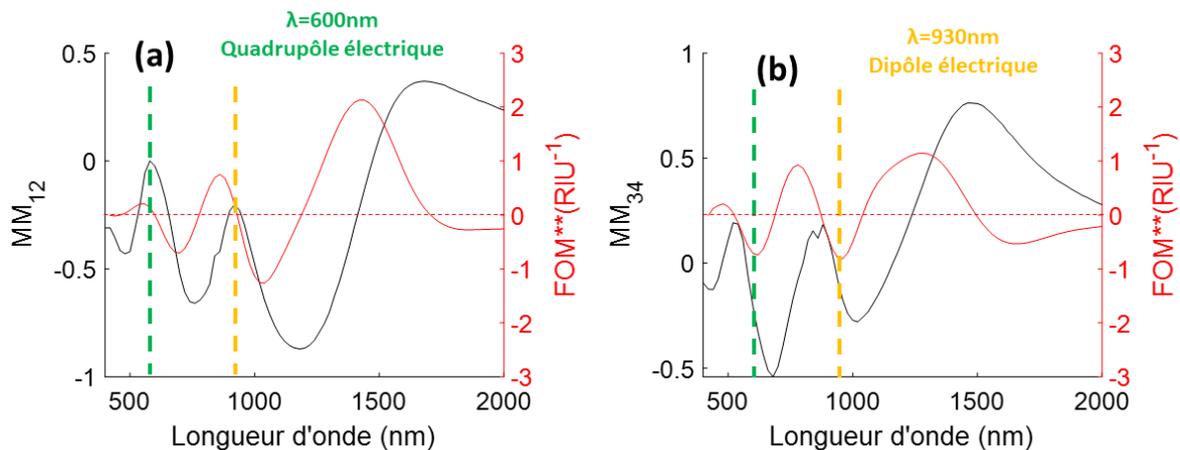


Figure 51 : Elément de la matrice de Mueller (noir) et Facteur de mérite alternatif FOM** (rouge) pour les éléments (a) MM_{12} et (b) MM_{34} . Le trait en pointillé rouge correspond au zéro de FOM**. Le quadrupôle électrique s'observe au niveau des lignes verticales vertes et le dipôle électrique au niveau des lignes verticales jaunes.

Pour étudier un mode en particulier lors du greffage d'une biomolécule (considérons par exemple le quadrupôle électrique), il existe deux solutions :

- La première est d'observer sur MM_{12} le décalage spectral associé au greffage sur la pente qui précède ou qui suit la résonance, FOM** y possède un extremum local. Ce sont les pentes avant et après la résonance à 600 nm.
- La seconde est d'observer sur MM_{34} le décalage spectral à 600 nm. L'intérêt est double : FOM** y est maximal et l'observation se déroule à la position où le mode est résonnant.

Dans le Chapitre suivant, les observations lors du greffage seront réalisés dans ce cadre. C'est-à-dire que le greffage d'une biomolécule sera suivi dans ces deux zones.

4. Un test en indice plus précis

Afin de caractériser la métasurface étudiée, il convient donc de mesurer une sensibilité à l'indice de réfraction et d'en déduire un facteur de mérite alternatif. Pour comparer les différentes sensibilités associées à chacun des modes étudiés, la matrice de Mueller d'un échantillon a été mesurée dans différents milieux afin de sonder l'influence de l'indice de réfraction. Différentes dilutions de mélanges $H_2O/EtOH$ ont donc été réalisées et les décalages spectroscopiques associés ont été mesurés pour 10 mélanges. Ils sont présentés sur la Figure 52. La pente associée aux courbes correspond aux sensibilités. On remarque comme précédemment que la sensibilité n'est pas la même pour chacun des modes étudiés. En l'occurrence elle n'est pas uniquement croissante en fonction de la longueur d'onde. Elle vaut ici 300 nm.RIU^{-1} pour le couplage magnéto-électrique alors qu'elle est égale à 225 nm.RIU^{-1} pour le dipôle électrique. Cette mesure permet également de montrer que la sensibilité reste constante (illustré ici par le fit linéaire) même pour des variations faibles d'indice, ce qui sera le cas lors du greffage de peptides ou d'autres molécules biologiques sur la surface.

Quadrupôle électrique : $MM_{34}(600\text{nm})$
Couplage magnéto-électrique : $MM_{32}(840\text{nm})$
Dipôle électrique : $MM_{34}(930\text{nm})$

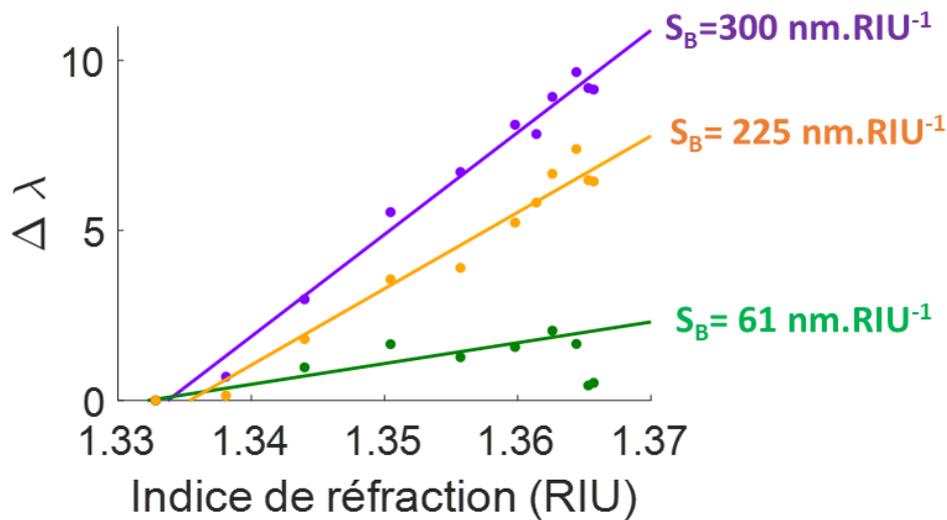


Figure 52 : Sensibilités associées à trois modes de résonances. Les sensibilités ont été déterminés à l'aide de 11 mesures d'une même métasurface dans différentes dilutions de mélanges $H_2O/EtOH$.

Partie 5. Conclusion et perspectives du Chapitre

Dans ce Chapitre, le processus de fabrication des métasurfaces ainsi que la mise en évidence expérimentale des propriétés polarimétriques et spectroscopique ont été expliqués.

Les différents modes de résonance associés aux résonateurs en U sont visibles aussi bien en mesure de transmission qu'en ellipsométrie généralisée. Les quatre modes de résonance induisent des signatures spectrales nettes dans les matrices de Mueller expérimentales.

Les symétries associées au théorème de réciprocity et au retournement temporel ont été étudiées. Les relations entre les éléments de matrice de Mueller des métasurfaces ne respectent pas les symétries attendues pour des résonateurs idéaux. Une origine identifiée est dans les asymétries résiduelles, et probablement inévitables, associées à la fabrication des résonateurs. Par contre, en utilisant la propriété du retournement temporel, il semble suffisant de mesurer les antennes à un seul azimut, l'autre azimut s'obtient en observant l'élément de matrice symétrique.

La décomposition logarithmique d'une matrice mesurée en transmission a permis de déterminer les propriétés polarimétriques intrinsèques à nos métasurfaces. Elle permet de mettre en évidence que la CDOA observée est réellement due à du dichroïsme circulaire et est donc certainement reliée au champ chiral généré localement par la structure pseudo-chirale qui avait été observée numériquement dans le Chapitre 2.

L'influence des anomalies de Rayleigh sur les mesures a été étudiée. On observe des signatures nettes liées à la diffraction par le réseau carré des résonateurs. Pour solutionner

cela, les échantillons peuvent être manufacturés en positionnant les U sur un réseau pseudo-aléatoire.

A partir des résultats de ce travail, il est possible de mesurer l'échantillon avant et après adsorption d'une espèce sans modifier l'alignement d'où l'élaboration d'une cellule liquide permettant une mesure *in-situ*. L'influence du changement de l'environnement diélectrique sur les mesures a été étudiée en changeant le liquide qui baigne les résonateurs. La sensibilité des différents modes résonants de la métasurface au changement d'indice est caractérisée par un facteur de mérite alternatif. Il est ainsi possible de déterminer des gammes spectrales et spectroscopiques d'intérêt pour étudier le greffage de biomolécules.

Le Chapitre suivant sera donc naturellement porté sur l'étude du greffage de peptides sur les métasurfaces et la modification de la réponse polarimétrique et spectroscopique induite.

Chapitre 4 : Greffage des peptides sur métasurfaces. Détection de leur chiralité en surface ?

Partie 1. Les temporines : caractéristiques et stratégie de greffage adoptée

1. Mise en évidence des propriétés chirales et antibactériennes des temporines

a) Origine, structure, synthèse et propriétés chirales

Comme évoqué dans le Chapitre 1, afin de lutter contre les infections nosocomiales dues au développement des bactéries résistantes sur des biomatériaux, l'utilisation de peptides antimicrobiens est prometteuse : il n'a pas été observé de développement de résistance bactérienne comme c'est de plus en plus le cas avec les antibiotiques. La temporine fait partie de cette famille. Plus particulièrement, les temporines-Sh sont issues de la grenouille *Pelophylax saharicus*. La Sha (FLSGIVGMLGKLF_{amide} = PheLeuSerGlylleValGlyMetLeuGlyLysLeuPhe) d'une masse molaire de 1,4kDa et la Shf (FFFLSRIF_{amide} = PhePhePheLeuSerArgllePhe) d'une masse molaire de 1,1kDa sont les peptides utilisés pendant les recherches présentées dans ce manuscrit. Les temporines utilisées sont des peptides de synthèse produites au sein de l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) par Christophe Piesse et Ali Ladram. La synthèse est réalisée par voie chimique à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides puis purification par HPLC en phase inverse. La pureté est garantie à hauteur de 95 %. Les temporines sont des peptides qui adoptent une structure secondaire en hélice α et cette méthode de synthèse permet de produire des temporines de chiralité L ou D et de positionner le groupement cystéine en bout de séquence, ce qui permettra la fonctionnalisation sur or sur la terminaison Oxygène (côté C-ter) ou Azote (côté N-ter) du peptide. Cette équipe de recherche a déjà utilisé et montré certaines propriétés notamment les mesures de spectre de dichroïsme circulaire des temporines Sha [50] et Shf [141, p.]. La Figure 53 montre les spectres CD obtenus en solution pour ces deux peptides en 2008 et 2010.

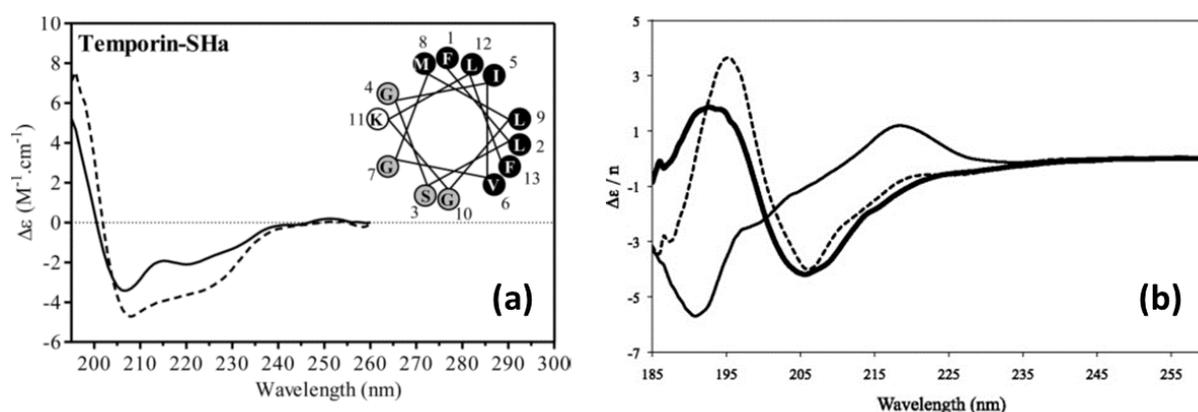


Figure 53: Spectres CD pour (a) la temporine Sha dans 40 % TFE (ligne pleine) et 80 mM SDS (ligne en pointillé) et (b) la temporine Shf dans l'eau (ligne pleine fine), 80 mM SDS (ligne en pointillé) et dans 120 mM DPC (ligne pleine épaisse). Spectres issus de [50], [141].

L'apparition d'un double pic dans la zone UV caractéristique de l'hélice α (extremums à 208 nm et 222 nm) s'observe directement sur le spectre associé à la temporine Sha (dans TFE ou SDS) tandis que le spectre CD de la temporine Shf dans des milieux membrano-mimétiques

(SDS ou DPC) montrent une forte bande positive vers 195 nm et une bande négative vers 206 nm indicatifs de la présence d'une conformation ordonnée en hélice. Les différents peptides obtenus sont résumés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Différentes temporines synthétisées à l'IBPS.

Type de peptide	Sha				Shf			
Terminaison	Cter		Nter		Cter		Nter	
Chiralité	L	D	L	D	L	D	L	D

Les spectres CD d'une partie de ces peptides ont été réalisés à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM) sur un spectropolarimètre permettant la mesure de dichroïsme circulaire (Jasco J-815). En particulier, la mesure associée aux temporines Sha-Nter L et D a été effectuée. Ces spectres sont représentés sur la Figure 54 en forme brute (Figure 54 (a)) et après un fit *via* une somme en série de Fourier à l'ordre 8 (Figure 54 (b)). Les peptides sont concentrés à 10 μ M pour les quatre mesures. Dans le PBS, aucune réponse ou tout du moins une réponse très faible est observée. En revanche, dans le solvant composé de 40 % de TFE et de 60 % d'eau, il y a l'apparition d'un double pic dans la zone UV caractéristique de l'hélice α (extremums à 207 nm et 224 nm) bien visible après le fit. Les courbes sont de signe opposé suivant l'énantiomère considéré ce qui est attendu. En solution la structure secondaire des peptides se retrouve bien et est solvant dépendante.

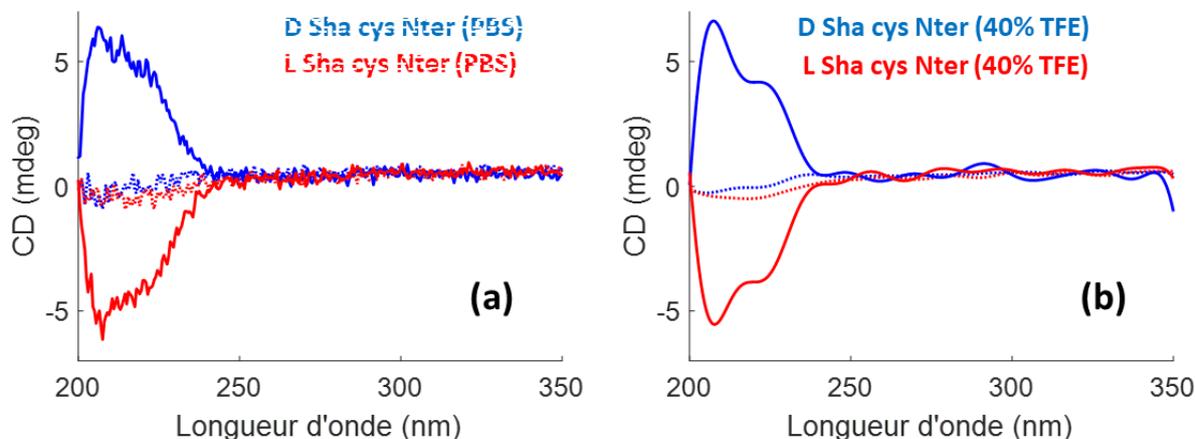


Figure 54: Spectres de dichroïsme circulaire (a) bruts et (b) après un fit par une somme de fonctions sinusoïdales (ordre 8) pour deux chiralités opposées (L & D) et pour deux solvants PBS (lignes pointillées) & TFE 40 % (lignes pleines).

b) La temporine : un agent antibactérien

Les temporines sont des peptides antibactériens. Pour la synthèse peptidique réalisée, il convient de mesurer l'activité bactéricide. Des expériences ont été menées par Laetitia Valentin et Vincent Humblot au LRS. Je n'ai pas travaillé sur les résultats présentés. Cependant, la présentation de l'activité antibactérienne associée aux peptides étudiés est nécessaire pour justifier leur étude ainsi que la présence d'une structure secondaire en surface. Cette sous-partie est annexe au travail de thèse mais nécessaire à l'étude présentée.

Les activités antibactériennes des différents peptides ont été évaluées sur une souche de *Listeria innocua* (CIP 80.11T) et une souche *Staphylococcus epidermidis* (CIP 68.21) fournie par l'Institut Pasteur (Collection de l'Institut Pasteur, CIP), en solution dans un premier temps, puis après immobilisation sur des surfaces d'or planes.

I. Tests en solution

Pour évaluer l'activité antimicrobienne d'une molécule en solution, il convient de déterminer sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette valeur correspondant à la plus faible concentration d'agent antimicrobien pour laquelle il n'y a pas de croissance bactérienne visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24h, est déterminée par la méthode des microdilutions présentée sur la Figure 55. Pour cela, une pré-culture sur gélose nutritive Mueller Hinton Agar (MHA) est préparée à partir d'un aliquot glycérolé stocké à -80 °C. Après une nuit d'incubation à 37 °C, une colonie est prélevée, mise en suspension dans 5 mL de bouillon nutritif Mueller Hinton Broth (MHB) et placée à 37 °C sous agitation (150 tours/minutes) pendant une nuit supplémentaire. 100 µL de cette culture sont ensuite prélevés et dilués dans 10 mL de MHB. Parallèlement, une série de solutions contenant les temporines à tester est préparée, par dilution successive d'un facteur 2 (les concentrations variant de 25 à 0,012 mg.L⁻¹). Dans une plaque 96 puits, 100 µL de chaque dilution sont ensuite mélangés à 100 µL de culture diluée au 1/100 ° puis placés à 37 °C pendant une nuit.

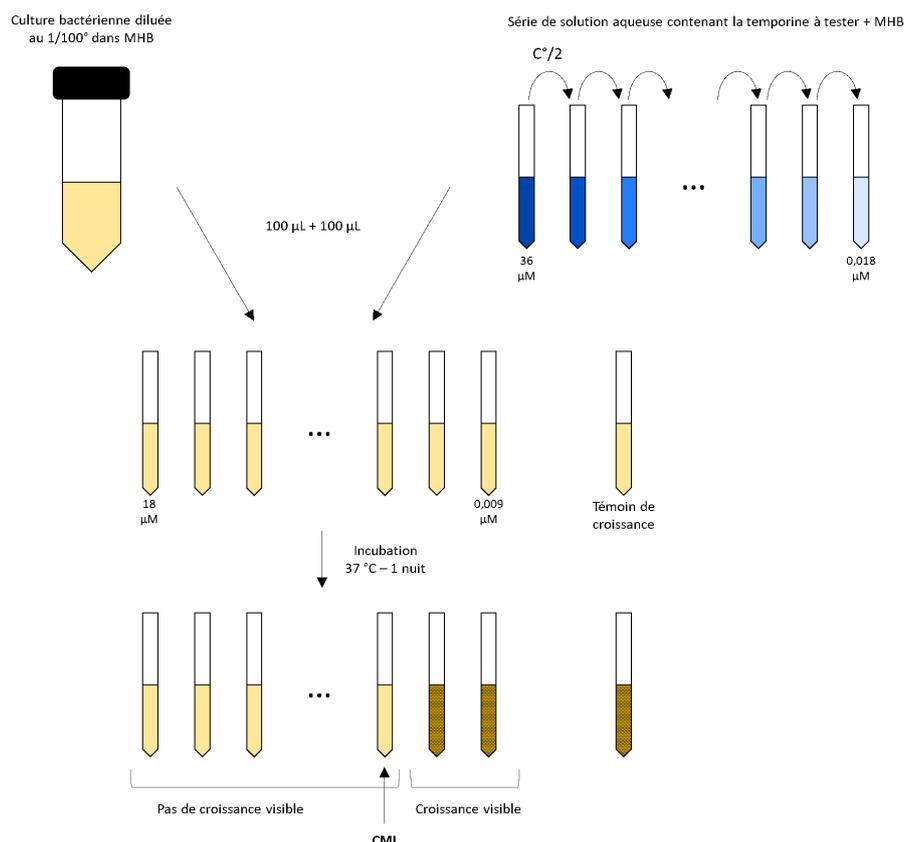


Figure 55 : Processus expérimental pour quantifier l'activité antimicrobienne des temporines en solution

Pour l'ensemble des temporines Sha, la CMI en solution trouvée est de 6 µM pour la *Listeria innocua* et 18 µM pour la *Staphylococcus epidermidis*. Les temporines exercent une activité

antibactérienne en solution. Reste à savoir ce qu'il en est lorsqu'elles sont greffées sur des surfaces.

II. Tests en surface

Pour déterminer l'activité antimicrobienne d'une molécule en surface, il convient de déterminer l'évolution des unités formant colonies (UFC) caractéristiques du nombre de bactéries vivantes. Pour déterminer le nombre d'UFC, il faut dénombrer le nombre de bactéries vivantes après contact avec le peptide antibactérien. La méthode est présentée sur la Figure 56.

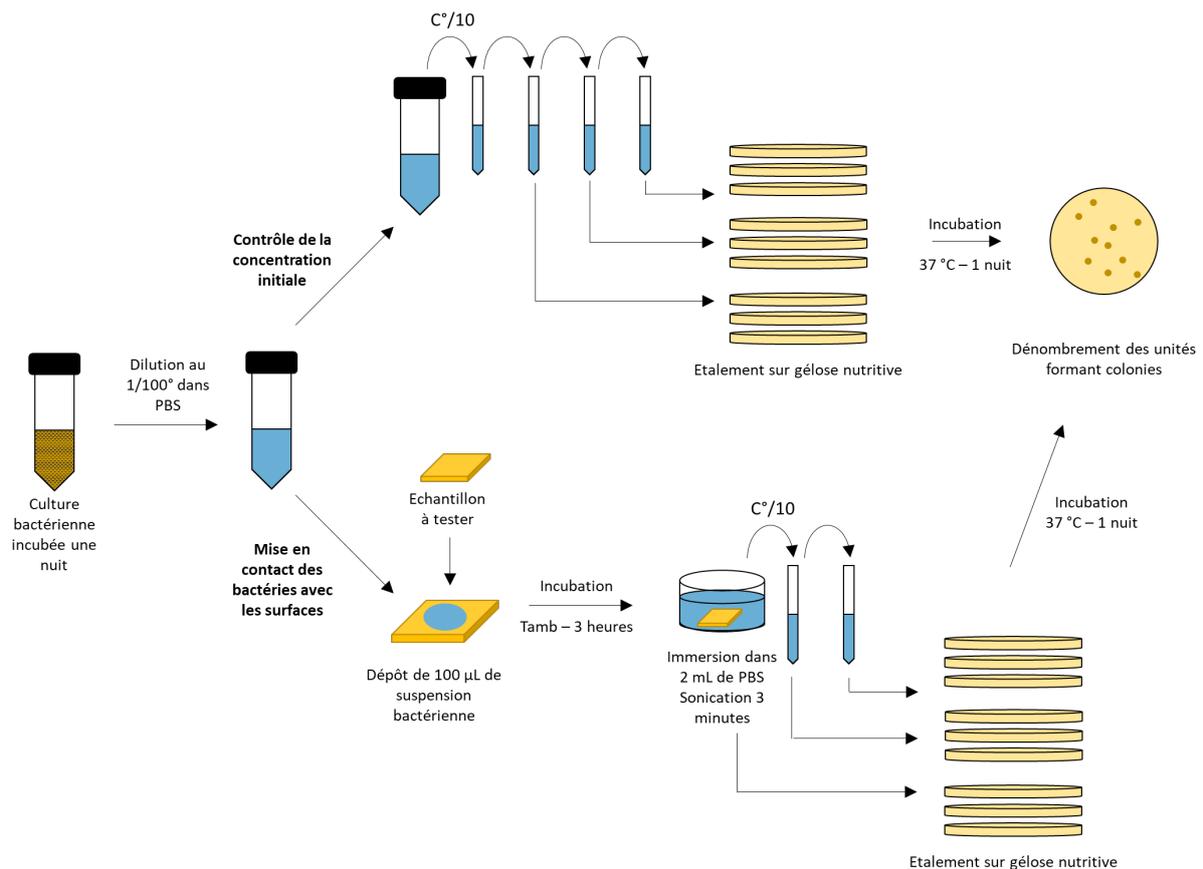


Figure 56 : Processus expérimental pour quantifier l'activité antimicrobienne des temporines en surface

De même que pour la détermination des CMI, une culture est préparée par prélèvement d'une colonie sur gélose nutritive, mise en suspension dans MHB et incubée à 37 °C pendant une nuit. 100 µL de cette culture sont ensuite dilués dans 10 mL de PBS. La détermination du nombre d'UFC (Unité de formation de colonies) dans cette dilution est systématiquement réalisée. Puis 20 µL de la dilution sont déposés successivement sur les surfaces d'or fonctionnalisées puis recouverts par une lamelle de verre et laissés en contact à 37 °C, sous atmosphère humide. Après 1 heure de contact, chaque surface est immergée dans un pilulier contenant 2 mL de PBS. Les piluliers sont ensuite plongés dans un bain à ultrasons pendant 3 minutes afin de s'assurer que toutes les bactéries aient été remises en solution. Les solutions contenues dans les piluliers sont alors diluées par 10 et par 100, et 20 µL de chaque dilution (C°, C/10 et C/100) sont déposés en triplicata sur des géloses nutritives MHB. Les boîtes de

pétri sont incubées à 37 °C pendant une nuit, puis les UFC sont dénombrées. Ces valeurs sont ensuite comparées à la concentration initiale en bactérie, déterminée par la même méthode, avant dépôt sur les surfaces. L'activité antibactérienne est déterminée par comparaison entre le nombre de bactéries vivantes après contact et le nombre de bactéries déposées en début de test (équation (41)).

$$\text{Activité antibactérienne} = \left(1 - \frac{\text{nombre d'UFC final}}{\text{nombre d'UFC initial}} \right) \times 100 \quad (41)$$

Quatre temporines (Sha : D/L et Cter/Nter) ont été testées. Des tests réalisés sur *Staphylococcus epidermidis* ont montré une absence d'activité antibactérienne, il a été décidé de changer de souche bactérienne et de modifier certains paramètres du test. Trois tests sur *Listeria innocua* ont été réalisés à plusieurs semaines d'intervalle. Les résultats de ces trois tests sont présentés sur le Tableau 11, le Tableau 12 et le Tableau 13. Sont présentées les UFC.mL⁻¹ restantes pour chaque peptide et pour un substrat témoin. Enfin l'activité est calculé à l'aide de l'équation (41). On remarque que l'activité antibactérienne est présente pour tous les peptides et tests même si le dernier semble moins concluant. En revanche, aucune différence notable n'est observée lorsque l'on s'intéresse à une chiralité ou l'autre (L ou D) ou bien à une accroche ou une autre (Cter ou Nter). Le fait que ces peptides possèdent une activité bactérienne en surface indique très probablement qu'ils possèdent une structure secondaire lorsqu'ils sont greffés à la surface de l'or comme précédemment évoqué dans le Chapitre 1 : la présence d'une structure secondaire est lié à l'activité antibactérienne [45]–[48]. Ces trois tests valident l'activité antibactérienne des temporines utilisées et donc très probablement la présence d'une structure secondaire lorsqu'elles sont sur une surface d'or.

Tableau 11 : Premier test d'activité antibactérienne pour un substrat témoin T₀ et quatre temporines.

TEST 1	Témoin	Temporines			
	T ₀	D-Sha-Cter	D-Sha-Nter	L-Sha-Cter	L-Sha-Nter
Moyenne (UFC/mL)	2,25E+07	2,45E+06	1,65E+06	1,87E+05	3,36E+04
Ecart-type	7,08E+05	2,72E+05	2,33E+05	6,50E+03	1,95E+03
Activité /T ₀		89,13 %	92,68 %	99,17 %	99,85 %

Tableau 12 : Deuxième test d'activité antibactérienne pour un substrat témoin T₀ et quatre temporines.

TEST 2	Témoin	Temporines			
	T ₀	D-Sha-Cter	D-Sha-Nter	L-Sha-Cter	L-Sha-Nter
Moyenne (UFC/mL)	2,23E+07	1,07E+06	1,00E+05	1,25E+06	2,46E+06
Ecart-type	8,98E+05	2,54E+05	5,44E+04	1,56E+05	3,23E+05
Activité /T ₀		95,21 %	99,55 %	94,39 %	88,96 %

Tableau 13 : Troisième test d'activité antibactérienne pour un substrat témoin T₀ et quatre temporines.

TEST 3	Témoin	Temporines			
	T ₀	D-Sha-Cter	D-Sha-Nter	L-Sha-Cter	L-Sha-Nter
Moyenne (UFC/mL)	1,59E+07	7,04E+06	8,38E+06	5,78E+06	6,97E+06
Ecart-type	6,63E+05	2,84E+05	2,11E+05	4,63E+05	3,38E+05
Activité /T ₀		55,64 %	47,24 %	63,57 %	56,12 %

2. Stratégie de greffage et protocole

a) Chimie Thiol-Or

Pour déterminer les propriétés structurales du peptide lorsqu'il est au voisinage d'une antenne, la chimisorption a été choisie pour des raisons déjà explicitées dans la partie introductive [1]. Cette méthode est chimiquement plus exigeante mais fournit généralement une plus grande stabilité des molécules immobilisées. Plusieurs étapes sont nécessaires y compris la modification chimique de la biomolécule et/ou de l'antenne avant le couplage molécule-antenne [142]. Afin de greffer le peptide à la surface d'or, une approche directe a été adoptée c'est-à-dire qu'aucun agent de liaison (*cross-linker*) n'a été utilisé. Pour cela, il convient de modifier au préalable le peptide afin d'obtenir une temporine thiolée c'est-à-dire possédant un soufre libre permettant de créer une liaison S-Au. Ce travail a été réalisé au sein de l'IBPS et les peptides peuvent directement s'accrocher à l'or sous conditions adéquates de temps d'incubation et de solvatation. Ces conditions seront décrites dans les parties suivantes.

b) Conditions expérimentales et spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de polarisation

Les fonctionnalisations ont lieu dans le PBS à 72.5 mg.L⁻¹ afin de reproduire le protocole utilisé dans le processus de mesure de propriétés antibactériennes. Ces facteurs découlent d'une optimisation de protocole réalisé sur des plaques d'or plan à l'aide de la Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de polarisation (PM-IRRAS).

Les spectres PM-IRRAS sont enregistrés *via* un spectromètre Thermo-Scientific Nicolet 5700. Le faisceau lumineux est focalisé sur l'échantillon considéré grâce à un miroir concave positionné à 80 ° d'incidence. Un polariseur à grille ZnSe et un modulateur photoélastique ZnSe modulent le signal entre les polarisations p et s (HINDS, PEM 90, f_{modulation}=50kHz). Ensuite, la lumière réfléchiée sur l'échantillon est collectée par un détecteur MCT (Mercury-Cadmium-Telluride) refroidi par azote liquide. Les spectres présentés correspondent à une somme de 256 balayages avec une résolution de 8 cm⁻¹. Le signal obtenu est alors : $\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s}$ (ou R correspond au coefficient de réflexion) [143].

Les substrats d'or plan sont des plaques de verre (11x11 mm²) (Arrandee, Werther, Allemagne) recouvertes d'une couche d'accroche de chrome de 50 nm puis d'une couche d'or de 200 nm. Ensuite deux choix existent :

- Un recuit *via* une flamme d'hydrocarbure afin de structurer le métal surfacique : ce procédé est utilisé pour les tests antimicrobiens
- Pas de recuit : intéressant ici car le recuit est impossible sur les métasurfaces sous peine de détruire les nanostructures mais aussi pour les expériences en QCM-D (balance à cristal de quartz avec mesure de dissipation) avec également l'impossibilité de « flammer » les quartz car il y a également un risque de destruction

En l'occurrence, pour la détermination des paramètres de concentration et de temps d'incubation, les substrats flammés ont été utilisés pour déterminer le protocole utilisable en test antimicrobien. En revanche, lorsqu'une surface de contrôle est réalisée simultanément à une expérience ellipsométrique, un substrat non flammé est utilisé. Enfin, les substrats sont rincés à l'eau déionisée et à l'éthanol absolu, séchés sous flux d'azote et ozonés durant trente minutes. Les résultats en termes de concentration et de temps d'incubation sont supposés être les mêmes : en tout cas les différences sont considérées comme négligeables au regard des objectifs de recherche.

La fonctionnalisation sur or plan se déroule en déposant des gouttes de 125 μL de peptides dilués dans du PBS. Puis à la fin du temps d'incubation souhaité, un rinçage au PBS et l'eau déionisée est effectué.

Tout d'abord, il convient d'observer un spectre unique sur la Figure 57 correspondant à un temps d'incubation de 4h et une concentration de peptide de 72.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Le peptide utilisé est ici la temporine D-Sha-Cter. Ce spectre permet de prouver le greffage sur l'or de la biomolécule et l'attribution des bandes est la suivante [43] :

- Deux bandes intenses à 1662 cm^{-1} et à 1545 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations des bandes associées à l'amide I ($\nu\text{C=O}$) et à l'amide II ($\delta\text{NH} + \nu\text{C-N}$)
- Deux bandes à 2923 cm^{-1} et à 2865 cm^{-1} correspondants aux bandes νCH (respectivement asymétriques et symétriques) de la chaîne carbonée

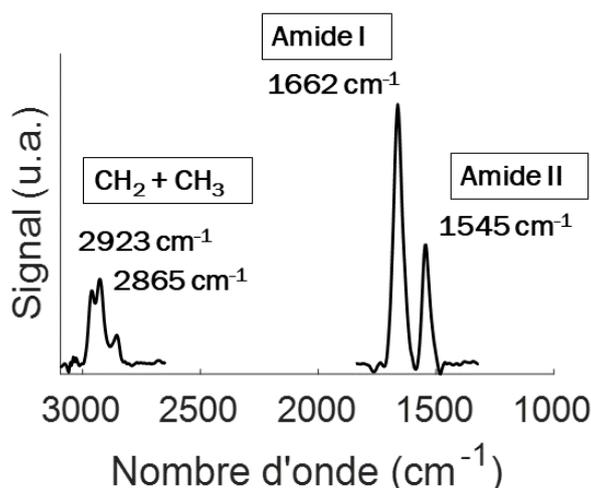


Figure 57: Spectre PM-IRRAS associé au greffage de la temporine D-Sha-Cter.

Afin de déterminer les concentrations et temps d'incubation appropriés pour les futures expériences, la détermination de l'aire sous les bandes amides permet d'obtenir des valeurs

seuils pour ces deux paramètres. L'évolution attendue est une augmentation de l'intensité des bandes amides en fonction du temps d'incubation et de la concentration [144]. Par conséquent, deux tests ont été réalisés pour établir le protocole de fonctionnalisation. La Figure 58 présente les spectres associés à un test pour trois concentrations distinctes : 5 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹ et 125 mg.L⁻¹ dans du PBS avec un temps d'incubation de 4h. Chaque concentration a été testée pour quatre échantillons distincts. Les spectres présentés Figure 58 (a) correspondent aux trois concentrations, les bandes amides et les bandes de vibration CH des groupements CH₂-CH₃ sont observables pour toutes les concentrations. La seule différence notable est l'allure des résonances associées aux bandes amides. L'aire sous ces bandes augmente avec la concentration. Cependant un effet de seuil semble être atteint pour 25 mg.L⁻¹. La concentration choisie pour les expériences qui suivront est en fait de 72.5 mg.L⁻¹ ce qui permet d'assurer le recouvrement maximal de la surface par les peptides : la saturation de la surface étant un des critères nécessaires à la bonne interprétation des expériences.

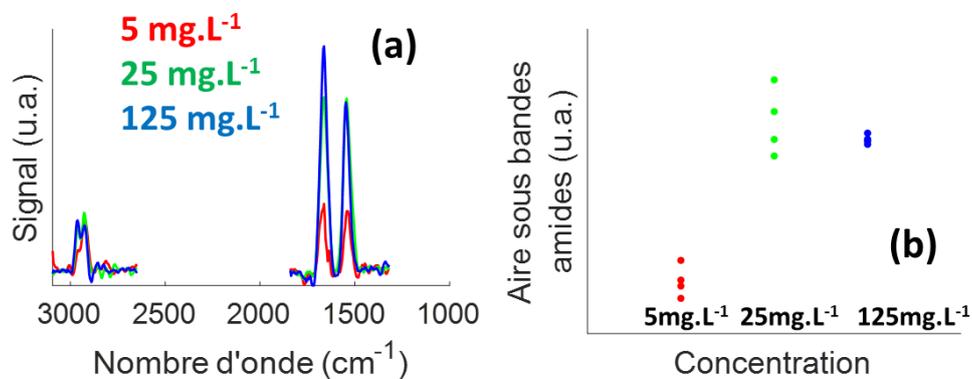


Figure 58 : Tests en concentration de la fonctionnalisation du peptide D-Sha-Cter dans du PBS avec un temps d'incubation de 4h ; (a) spectres PM-IRRAS pour trois concentrations et (b) évolution de l'aire sous les bandes amides pour les douze échantillons associés aux trois concentrations.

En outre, un test sur le temps d'incubation a été réalisé avec une concentration de 72.5 mg.L⁻¹ dans du PBS. Trois temps ont été testés : 1h, 6h et 18h (3 échantillons par temps). Les spectres présentés sur la Figure 59 (a) montrent bien la présence des bandes amides et les bandes de vibration CH des groupements CH₂-CH₃. L'intégration des bandes amides est la même pour 1h et 6h puis augmente au bout de 18h (Figure 59 (b)) :

- La même valeur de l'aire sous les pics associés aux bandes amides après une heure et six heures signifie que la majorité des accroches S-Au possibles se fait en moins d'une heure. En revanche, la nette augmentation après 18 heures est sûrement due à de l'agrégation entre les peptides qui est une conséquence de l'association covalente ou non des chaînes peptidiques [145]. Les expériences réalisées en QCM-D permettront de valider cette hypothèse.

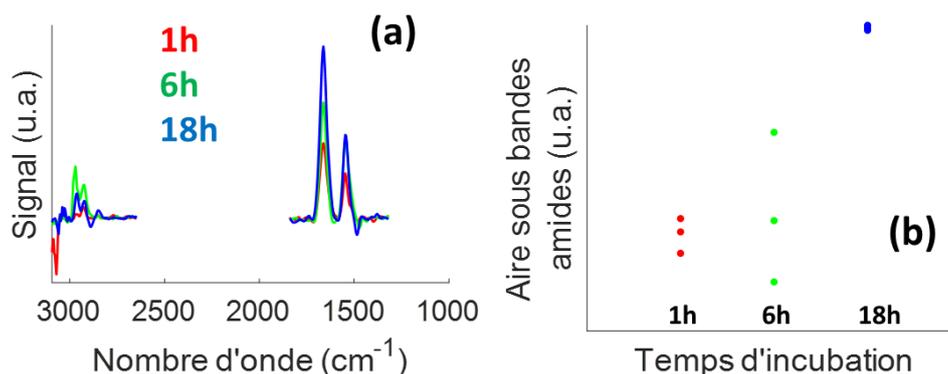


Figure 59: Tests en temps d'incubation de la fonctionnalisation du peptide D-Sha-Cter dans du PBS avec une concentration de 72.5 mg.L^{-1} ; (a) spectres PM-IRRAS pour trois temps d'incubation et (b) évolution de l'aire sous les bandes amides pour les neuf échantillons associés aux trois temps.

Finalement, le temps choisi pour les fonctionnalisations de surface lors des expériences de microbiologie a été de 4 heures afin d'assurer la saturation de la surface et le réarrangement des peptides en surface.

A partir des résultats infrarouges et plus particulièrement le spectre associé à la bande amide, il est possible d'obtenir des informations sur la conformation associée au peptide. Plus particulièrement, le pic associé à la vibration de la bande amide I peut être observé. L'étude de la dérivée seconde associée à ce pic permet, entre autres méthodes, de quantifier la proportion de peptides possédant une structure secondaire en hélices α , en feuillets β ou bien aléatoire [146]–[148]. La Figure 60 présente le spectre infrarouge associé à cette bande (a) (zoom de la Figure 57) et la dérivée seconde associée (b). Le fort pic de la dérivée seconde autour de 1662 cm^{-1} est caractéristique d'une conformation en hélice α . Des contributions dues à des feuillets β (le plus caractéristique vers 1627 cm^{-1}) ou bien à une conformation aléatoire (autres pics le long de la courbe) sont également présentes mais en quantité négligeables. Sur la surface, le peptide semble adopter une conformation en hélice α d'après cette décomposition de la dérivée seconde du signal infrarouge. Aucune différence notable n'est perceptible en étudiant les autres temporines (L/D et Cter/Nter).

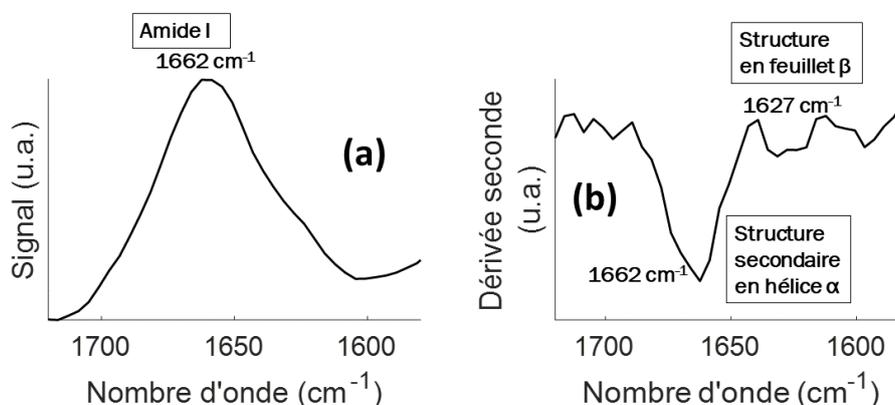


Figure 60 : Spectre PM-IRRAS associé à la bande amide I et (b) la dérivée seconde associée au spectre infrarouge.

Partie 2. Accès à une cinétique et à un taux de recouvrement

1. La cinétique et différents régimes d'adsorption grâce à la QCM-D

L'étude quantitative de l'adsorption de molécules sur des surfaces d'or peut être suivie *via* une balance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) [69], [149]. Les mesures piézoélectriques ont été effectuées sur des quartz recouverts d'or avec le modèle E4 (Biolin Scientific, Suède) possédant une fréquence fondamentale f_f de 5 MHz. Les mesures sont réalisées à la fréquence fondamentale mais aussi aux harmoniques successives (15,25,35,45,55 et 65 MHz). Deux paramètres sont mesurés ici : la fréquence d'oscillation et la dissipation. Le changement de fréquence associé à l'adsorption d'une molécule est, pour les couches rigides, relié à la masse adsorbée grâce à l'équation de Sauerbrey [150] (42) :

$$\Delta f = -N \frac{\Delta m}{C_f} \quad (42)$$

Où Δf est le changement de fréquence, N l'harmonique considérée, Δm le changement de masse consécutive à l'adsorption et C_f ($=17,7 \text{ ng.cm}^{-2}$ à $f=5 \text{ MHz}$) la constante de sensibilité de masse. Vu que cette équation n'est valide que pour une couche rigide. Il est nécessaire de déterminer l'élasticité ou la rigidité de la couche en mesurant le changement de dissipation ΔD qui est l'inverse du facteur de qualité de la résonance accessible. Plus particulièrement c'est le ratio $\frac{\Delta D}{\Delta f}$ qui va permettre de déterminer dans quel régime se placer. Plus ce ratio est faible, plus la couche est rigide et donc il devient possible d'appliquer le modèle de Sauerbrey.

Le critère de rigidité utilisé est $\left| \frac{\Delta D}{\Delta f} \right| < \frac{1}{f_f} = 2 * 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$.

La QCM-D a été utilisé en mode dynamique à une température de 20 °C régulée par un thermostat à effet Peltier. Le débit utilisé est de $10 \mu\text{L.min}^{-1}$ et une concentration de 7.25 mg.L^{-1} (afin d'obtenir une quantité de matière équivalente au voisinage du quartz que lors de la fonctionnalisation sur or plan). La circulation est assurée à l'aide d'une pompe péristaltique et la stabilisation a été réalisée avec du PBS. La Figure 61 (a) présente les Δf et ΔD pour trois harmoniques (5, 7 et 9 *ie* 25, 35 et 45 MHz) en fonction du temps pour la temporine D-Sha-Cter. La diminution de la fréquence en fonction du temps résulte de l'adsorption du peptide à la surface du quartz. Il est également possible de tracer ΔD en fonction de Δf comme sur la Figure 61 (b). Deux régimes semblent apparaître au regard de ces deux graphes, un premier jusqu'à environ 4h et un second lors du reste de l'adsorption. En fait, la première zone correspond au régime de Sauerbrey et la seconde zone à un régime viscoélastique. Ce régime viscoélastique correspond sûrement à de l'agrégation entre les peptides. L'étude d'autres peptides (L/D ou Nter/Cter) ou bien d'autres conditions de solvants (TFE 40 %) n'a pas donné d'informations supplémentaires. Cette cinétique et ces deux régimes bénéficieront à l'interprétation des mesures réalisées en ellipsométrie généralisée.

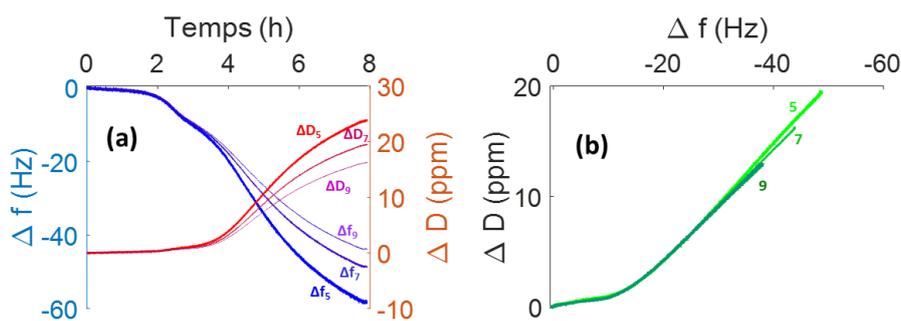


Figure 61 : Adsorption de la temporine D-Sha-cys-Cter sur un quartz d'or plan avec un débit de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ avec (a) les décalages fréquentiel et dissipatif et (b) le décalage fréquentiel en fonction du décalage dissipatif. Les résultats sont présentés pour trois différentes harmoniques (25, 35 et 45 MHz).

2. Utilisation de la spectroscopie de photoélectrons X

Afin de prouver le greffage des peptides sur les métasurfaces il est impossible d'utiliser le PM-IRRAS. En revanche, l'utilisation de la spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) permet cela.

Les analyses XPS ont été effectuées à l'aide d'un appareil Scienta Omicron Argus, équipé d'une source de rayonnement monochromatique d'aluminium Al $K\alpha$ ($h\nu=1486,6$ eV) avec une puissance de 280 W. Les spectres sont réalisés sous Ultra Vide ($\leq 10^{-9}$ mBar), dans une direction faisant un angle de 45° avec la surface, avec une énergie de 100 eV pour le spectre général et de 20eV pour les régions C1s, O1s, N1s, Si2s, Si2p, S2s, S2p et Au4f. Les énergies de liaison sont calibrées par rapport à l'énergie de liaison associée à l'Au 4f à 84 eV. Les intensités des pics sont déterminées après soustraction d'un fond de Shirley. Les décompositions sont réalisées à l'aide du logiciel Casa XPS (Casa Software Ltd, U.K.). Les spectres associés à une fonctionnalisation sur Or plan sont présentés sur la Figure 62 ((a) C1s et (b) N1s) pour une fonctionnalisation de la temporine D-Sha-Cter sur or plan. Le pic associé au carbone 1s à 287,8 eV [(C=O),(N-C=O)] et le pic de l'azote 1s à 399,7 eV [N_{amide}] sont caractéristiques d'un acide aminé.

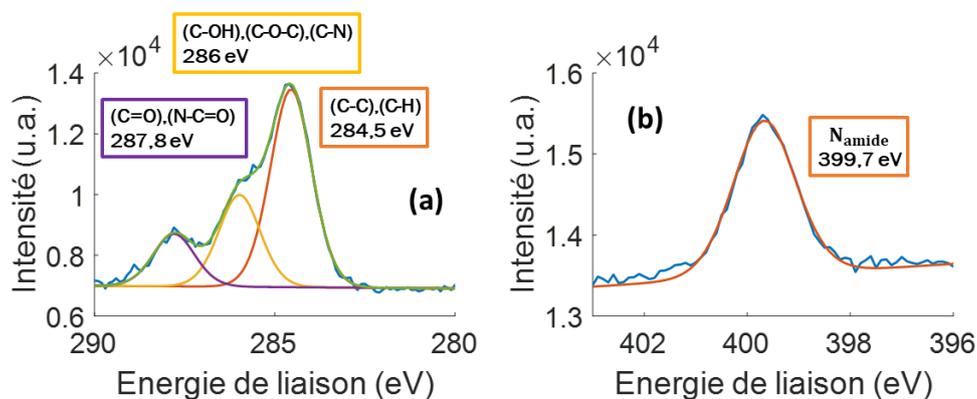


Figure 62 : Spectres XPS associés à la fonctionnalisation de la temporine D-Sha-Cter sur or plan pour le (a) Carbone 1s et (b) l'Azote 1s.

Une mesure a également été réalisée pour un greffage sur une métasurface. Pour réaliser cette mesure, vu que le spot utilisé en XPS fait environ 1 mm^2 , il faut une surface suffisamment grande pour que la mesure ne soit réalisée que sur la zone contenant des antennes. Pour ce faire une lithographie a été réalisée pendant un long week-end pour faire un échantillon suffisamment grand. Sachant que $15'$ sont nécessaires pour réaliser un patch de $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$, 63 heures ont été nécessaires pour réaliser l'échantillon présenté Figure 63. L'arrêt de la lithographie au niveau du patch n°255 (patch coupé en deux sur la Figure 63 (a)) est dû un défaut de la mémoire interne du logiciel de lithographie en cours de lithographie. Ceci étant la surface déjà réalisée était suffisante pour nos mesures.

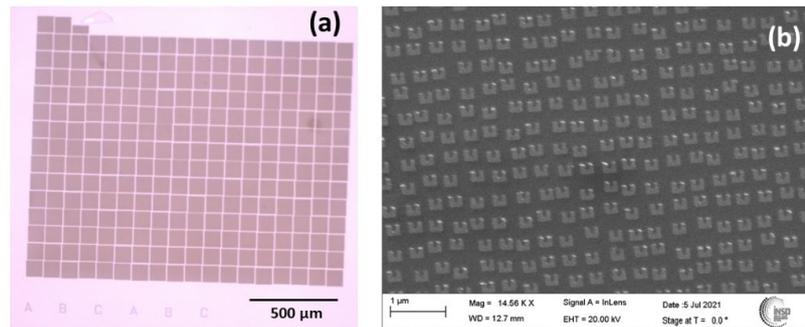


Figure 63: Echantillon utilisé pour réaliser la mesure XPS associée au greffage de la temporine D-Sha-Cter sur métasurface avec (a) l'imagerie *via* un microscope optique et (b) *via* le MEB.

Le spectre associé à la fonctionnalisation de cette métasurface est présenté Figure 64. Les pics caractéristiques de la présence du peptide sont retrouvés avec le pic associé au carbone 1s à 287,9 eV [(C=O),(N-C=O)] et le pic de l'azote 1s à 399,7 eV [N_{amide}]. Des peptides sont présents sur la métasurface. En outre, il est possible de relier ces spectres à des taux de recouvrement en utilisant des ratios d'intensité de pics. Cependant, l'influence de la silice accessible aux molécules est difficile à quantifier, des analyses supplémentaires sont à réaliser afin d'obtenir une estimation du taux de recouvrement.

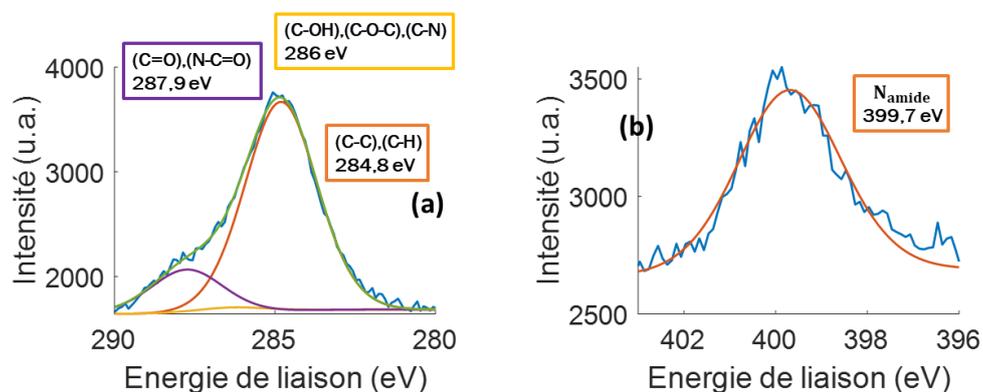


Figure 64 : Spectres XPS associés à la fonctionnalisation de la temporine D-Sha-Cter sur la métasurface montré Figure 63 pour le (a) Carbone 1s et (b) l'Azote 1s.

Partie 3. Détection des temporines par ellipsométrie *in-situ*

L'objectif initial de ce travail est d'avoir accès à des informations concernant la conformation de biomolécules et plus particulièrement leur structure secondaire lorsqu'elles sont adsorbées chimiquement à des surfaces. Pour cela, la mesure en ellipsométrie généralisée semble adaptée. Comme expliqué dans les Chapitres précédents, le processus est le suivant :

- Réalisation de métasurfaces pseudo-chirales (résonateurs en U) possédant des modes de résonance particuliers
- Mise en évidence des différents modes de résonance des structures
- Détermination du facteur de mérite alternatif pour connaître les gammes spectrales d'intérêt
- Greffage *in-situ* des molécules biologiques
- Suivi polarimétrique, spectroscopique et cinétique du greffage

Les échantillons utilisés pour les mesures ressemblent à celui présenté en Figure 63. La matrice de Mueller de cet échantillon a été mesurée dans la cellule liquide. Le facteur de mérite alternatif FOM** a également été déterminé à l'aide d'une autre mesure dans de l'éthanol. Ces deux grandeurs sont présentées sur la Figure 65. Les résonances déjà présentées aux Chapitres 2 et 3 sont bien visibles sur les éléments de la matrice de Mueller, les extremums locaux de FOM** sont également bien visibles pour chacun des éléments de la matrice.

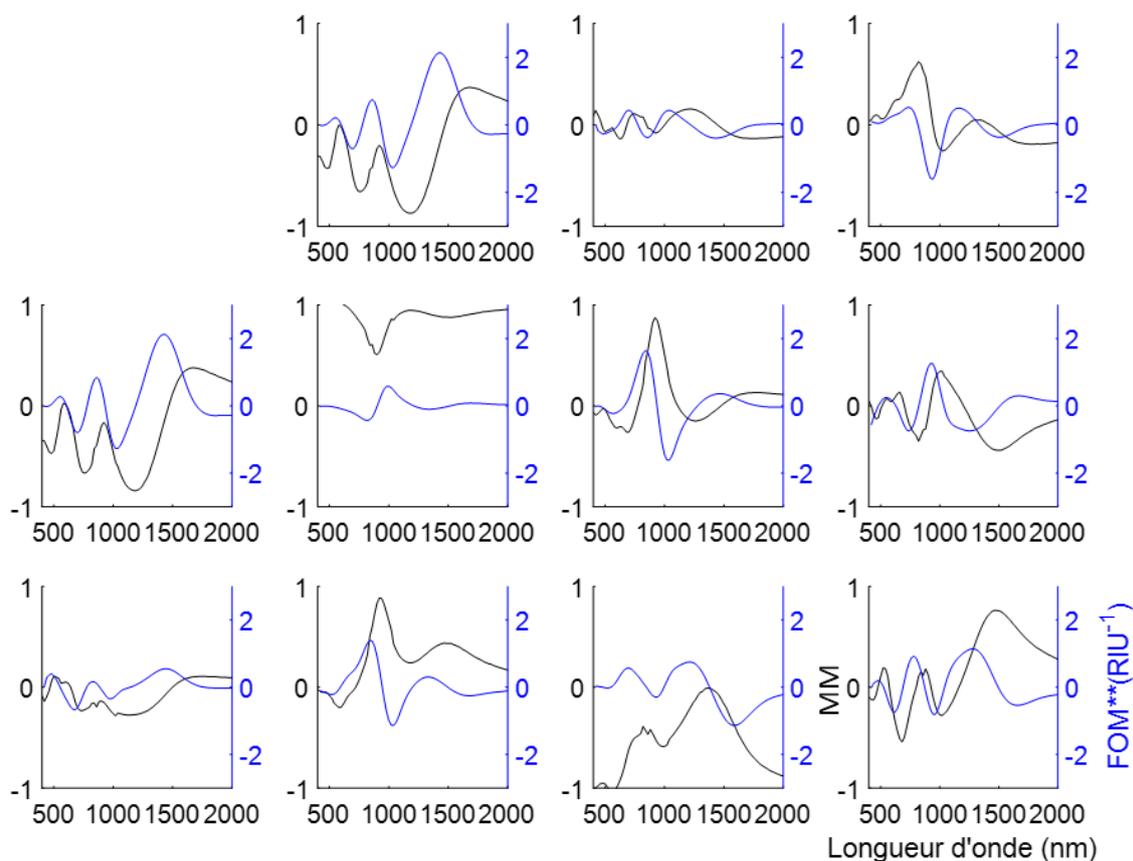


Figure 65 : Matrice de Mueller mesurée pour une métasurface dans du PBS (courbes noires) et facteur de mérite alternatif FOM** (courbes bleues) déterminé à partir des éléments de la matrice de Mueller et d'une mesure dans l'éthanol.

En se plaçant sur les extremums de la FOM**, il est possible de réaliser un greffage *in-situ* d'un peptide et d'étudier les décalages spectraux induits par sa présence.

1. Un suivi spectroscopique et polarimétrique de l'adsorption

Le greffage d'une temporine est réalisé avec une concentration de 72.5 mg.L⁻¹ dans du PBS. La Figure 66 présente les spectres de la matrice de Mueller pour les éléments MM₁₂ et MM₁₄ entre 600 nm et 1200 nm (Figure 66 (a) et (b)). On remarque premièrement un décalage des spectres entre la mesure avant adsorption (noir) et celle réalisée 5h30 plus tard après adsorption et un rinçage dans du PBS (rouge).

Afin de comparer les décalages spectraux induits par la biomolécule au niveau des différents modes de résonance, il convient d'observer les $\Delta\lambda$ pour une longueur d'onde d'intérêt. Un spectre total en ellipsométrie prend environ 45 minutes donc afin de tracer une cinétique d'adsorption il faut mesurer sur des plages spectroscopiques restreintes. C'est ce qui a été réalisé en mesurant toutes les cinq minutes un spectre sur trois plages centrées sur les extremums de la FOM** correspondants aux points d'inflexion des modes de résonance visibles sur M₁₂ et M₁₄. Les trois plages sont les suivantes :

1. [640 ;680] nm pour le quadrupôle électrique visible sur MM₁₂
2. [900 ;940] nm pour le couplage magnéto-électrique visible sur MM₁₄
3. [980 ;1020] nm pour le dipôle électrique visible sur MM₁₂

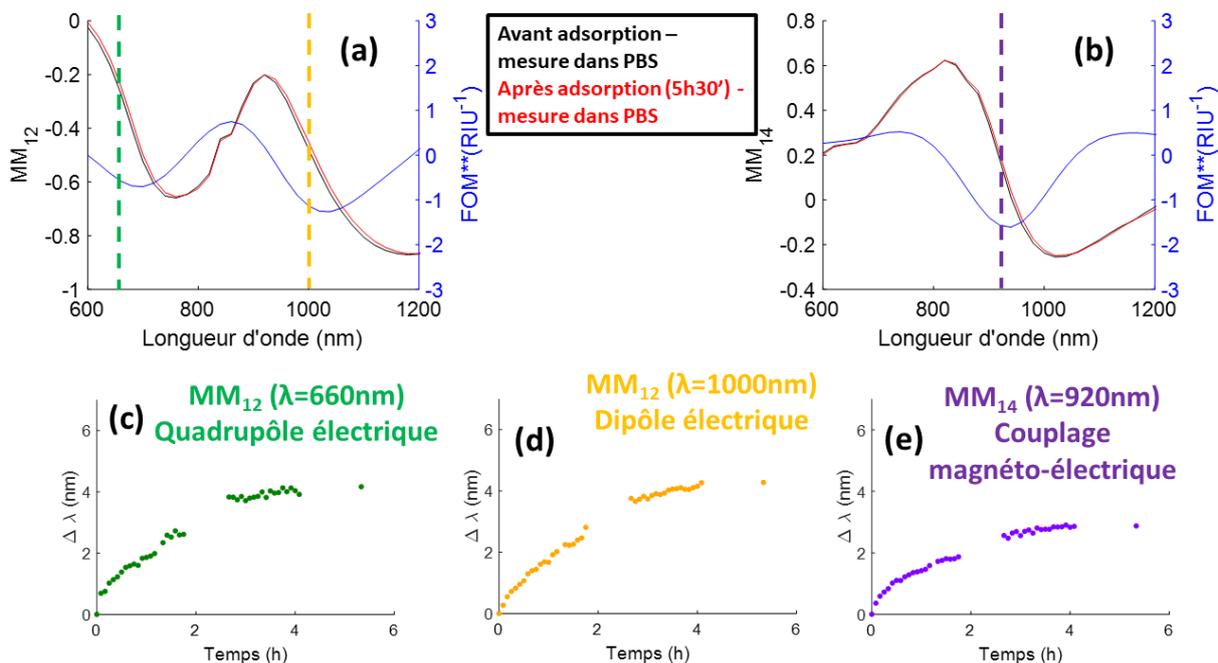


Figure 66 : Suivi de l'adsorption de la temporine D-Sha-Cter par ellipsométrie généralisée avec la matrice de Mueller avant et après adsorption ainsi que le facteur de mérite alternatif FOM** associé pour (a) MM₁₂ et (b) MM₁₄. Les décalages spectraux associés aux zones d'inflexion de trois modes de résonance sont présentés en l'occurrence (c) le quadrupôle électrique, MM₁₂ ($\lambda=660$ nm) (d) le dipôle électrique, MM₁₂ ($\lambda=1000$ nm) et (e) le couplage magnéto électrique MM₁₄ ($\lambda=920$ nm).

Il est alors possible de déterminer le $\Delta\lambda$ induit par le greffage du peptide au cours du temps sur ces points d'inflexion. Les longueurs d'onde choisies sont les valeurs centrales (660 nm, 920 nm et 1000 nm). Ces valeurs sont indiquées respectivement en vert, mauve et jaune sur la Figure 66 (a) et (b). Le facteur de mérite est alors sur un de ses extremums locaux (attendu car directement lié à la dérivée du signal). Les courbes de cinétiques sont visibles sur la Figure 66 pour (c) le quadripôle électrique, (d) le dipôle électrique et (e) le couplage magnéto-électrique. L'absence de points entre 2h et 3h et entre 4h et 5h correspond à la mesure d'une matrice de Mueller pour plus de longueurs d'onde (entre 400 nm et 2000 nm avec un pas de 20 nm) ce qui prend environ une heure.

Les valeurs de $\Delta\lambda$ finaux obtenues sont supérieures à 3 nm pour les trois modes observés ce qui est largement supérieur aux incertitudes causées par l'instabilité de la mesure qui est de l'ordre de 10^{-1} nm comme vu dans le Chapitre 3.

La cinétique d'adsorption coïncide avec celle observée en QCM-D montrée sur la Figure 61 c'est-à-dire que jusqu'à 4h, le décalage spectral augmente. Le phénomène d'agrégation potentielle observé en QCM-D après 4h ou bien au PM-IRRAS n'est pas visible ici et ceci peut être causé par deux facteurs :

- Il y a un flux dynamique en QCM-D alors qu'ici la cellule liquide impose un bain statique
- La QCM-D et le PM-IRRAS sont réalisés sur des surfaces d'or plan alors qu'ici des résonateurs en U sont considérés

La cinétique d'adsorption est la même pour les trois modes observés c'est-à-dire qu'il faut environ 4 heures pour arriver à un plateau. En revanche, les décalages ne sont pas les mêmes. On pourrait s'attendre à un $\Delta\lambda$ croissant en fonction de la longueur d'onde comme c'est le cas lorsque l'indice du solvant est modifié, le décalage spectral après un ajustement linéaire entre deux mesures réalisées entre l'eau et l'éthanol (mesure qui permet d'obtenir la sensibilité de la métasurface et donc son facteur de mérite alternatif) est présenté sur le Tableau 14 ci-dessous.

Tableau 14 : Décalages spectraux calculés à partir des matrices de Mueller obtenues pour l'eau et l'éthanol après ajustement par une variation linéaire.

	MM_{12} $\Delta\lambda=-7.4+0.018\lambda$	MM_{13} $\Delta\lambda=1.8+0.009\lambda$	MM_{14} $\Delta\lambda=-1.7+0.012\lambda$
MM_{21} $\Delta\lambda=-7.4+0.018\lambda$	MM_{22} $\Delta\lambda=-2.9+0.011\lambda$	MM_{23} $\Delta\lambda=-0.21+0.010\lambda$	MM_{24} $\Delta\lambda=2.7+0.007\lambda$
MM_{31} $\Delta\lambda=3.7+0.009\lambda$	MM_{32} $\Delta\lambda=2.5+0.007\lambda$	MM_{33} $\Delta\lambda=-5.0+0.015\lambda$	MM_{34} $\Delta\lambda=-1.8+0.011\lambda$

Après greffage, on obtient les décalages suivants : $\Delta\lambda=4.2$ nm pour $MM_{12}(\lambda=660$ nm) et $\Delta\lambda=4.3$ nm pour $MM_{12}(\lambda=1000$ nm). Si le greffage correspondait uniquement à un changement d'indice de réfraction au voisinage de l'antenne, les deux valeurs devraient être différentes et plus précisément plus élevées d'un facteur 2.4 pour la longueur d'onde la plus grande. De même, le décalage associé au couplage magnéto-électrique pour MM_{14} ($\lambda=920$ nm) est bien plus faible ($\Delta\lambda=2.9$ nm) que celui mesuré sur MM_{12} à environ la même longueur d'onde et que

celui observé entre l'eau et l'éthanol qui était de l'ordre de 9.2 nm pour MM_{12} et MM_{14} à 920 nm. L'augmentation ici n'est pas du même ordre de grandeur que celle attendue que ce soit en fonction de la longueur d'onde pour un élément de la matrice de Mueller ou en fonction de l'élément de matrice pour une longueur d'onde donnée. **Les différents modes n'ont pas la même sensibilité à la présence des mêmes molécules.** Un élément d'explication est que le décalage spectral observé est non seulement dû au changement d'indice de réfraction localement comme c'est le cas lorsque le solvant est modifié mais aussi à la taille du peptide. En effet, le champ local décroît exponentiellement avec la distance à la surface du résonateur et le décalage spectral est alors relié au recouvrement du champ local et du peptide greffé. Or, la longueur d'évanescence du champ n'est pas la même suivant le mode considéré et donc la valeur de $\Delta\lambda$ peut être différente suivant le mode considéré. Ceci n'est pas observable pour le changement de solvant dans la mesure où sans molécule le milieu est semi-infini et l'évanescence du champ ne joue plus. En outre, il est logique d'étudier les cinétiques de greffage, et donc le décalage spectral final pour les éléments Kramers-Koenig de MM_{12} et MM_{14} : les éléments MM_{34} et MM_{23} . En effet, ici le travail est réalisé en réflexion donc les éléments MM_{12} et MM_{23} correspondent aux parties imaginaires de l'oscillateur tandis que MM_{14} et MM_{34} aux parties réelles. Les mesures sont prises dans des zones les plus proches possibles de maxima de FOM^{**} (Figure 67 (a) et (b)). On a $\Delta\lambda=1.8$ nm pour $MM_{34}(\lambda=642$ nm) et $\Delta\lambda=2.8$ nm pour $MM_{34}(\lambda=936$ nm). Les décalages spectraux sont plus petits, en comparant les mêmes modes, pour MM_{34} que pour MM_{12} . De plus $\Delta\lambda(MM_{23}(\lambda=902$ nm))=5.8 nm ce qui est supérieur au décalage de 2.9 nm trouvé pour MM_{14} .

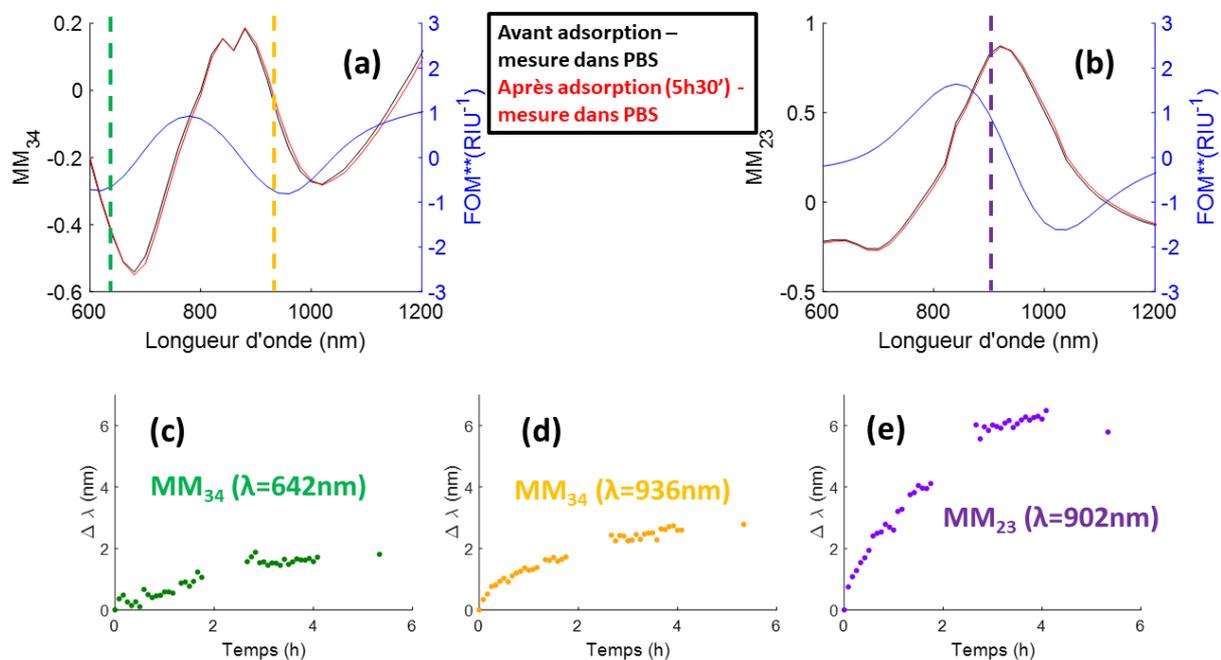


Figure 67 : Suivi de l'adsorption de la temporine D-Sha-Cter par ellipsométrie généralisée avec la matrice de Mueller avant et après adsorption ainsi que le facteur de mérite alternatif FOM^{**} associé pour (a) MM_{34} et (b) MM_{23} . Les décalages spectraux associés aux zones d'inflexion de trois modes de résonance sont présentés en l'occurrence (c) le quadrupôle électrique, MM_{34} ($\lambda=642$ nm) (d) le dipôle électrique, MM_{34} ($\lambda=936$ nm) et (e) le couplage magnéto électrique MM_{23} ($\lambda=902$ nm).

Les décalages spectraux sont plus importants pour les éléments représentant les parties imaginaires des oscillateurs que pour ceux représentant les parties réelles comme le montre le Tableau 15. Le rapport R_λ entre les décalages spectraux pour les couples MM_{12}/MM_{34} et MM_{23}/MM_{14} pour les différents modes vaut 2.3, 1.5 et 2.

Tableau 15 : Rapports des décalages spectraux entre les valeurs correspondant aux parties réelles et aux parties imaginaires de l'indice.

Mode considérés	Rapport R_λ	
Quadrupôle électrique	$\Delta\lambda(MM_{12}) / \Delta\lambda(MM_{34})$	2.3
Dipôle électrique	$\Delta\lambda(MM_{12}) / \Delta\lambda(MM_{34})$	1.5
Couplage magnéto-électrique	$\Delta\lambda(MM_{23}) / \Delta\lambda(MM_{14})$	2

Pour les mesures dans l'éthanol, en se référant au Tableau 14, les rapports sont de 0.85, 1.25 et 0.99. Ces rapports suivent la croissance de $\Delta\lambda$ en fonction de la longueur d'onde.

Cette mesure a été réalisée pour d'autres échantillons en l'occurrence un autre échantillon avec un positionnement désordonné des antennes et trois échantillons dits ordonnés. Les fonctionnalisations ont été réalisées pour cinq peptides (1 et 2 correspondent aux échantillons aléatoires ; 3 à 5 aux échantillons ordonnés) :

1. D-Sha-Cter
2. D-Sha-Cter
3. D-Sha-Cter
4. L-Sha-Cter
5. L-Sha-Cter

Ceci est présenté sur la Figure 68. A titre de comparaison, les mesures réalisées pour le changement de solvant $H_2O/EtOH$ sont aussi présentées. Globalement, la dynamique présentée précédemment est respectée c'est-à-dire que les R_λ pour les échantillons fonctionnalisés sont supérieurs à ceux mesurés pour un changement d'indice pour tout le milieu semi-infini. On trouve $R_{\text{Quadrupôle}}=1.9\pm 0.4$, $R_{\text{DE}}=1.8\pm 0.5$ et $R_{\text{ME}}=2.0\pm 0.4$. Il convient de noter que les mesures réalisées pour le quadrupôle électrique pour les échantillons ordonnés sont fortement influencées par les anomalies de Rayleigh ce qui sous-estime le décalage spectral en ajoutant une contribution fixe (la position de l'anomalie de Rayleigh ne dépendant que du pas du réseau en première approximation) : les points verts sont difficilement interprétables pour ces échantillons et n'ont pas été utilisés pour $R_{\text{Quadrupôle}}$. En outre, suivant les structures secondaires étudiées (L ou D), aucune différence systématique ne semble ressortir.

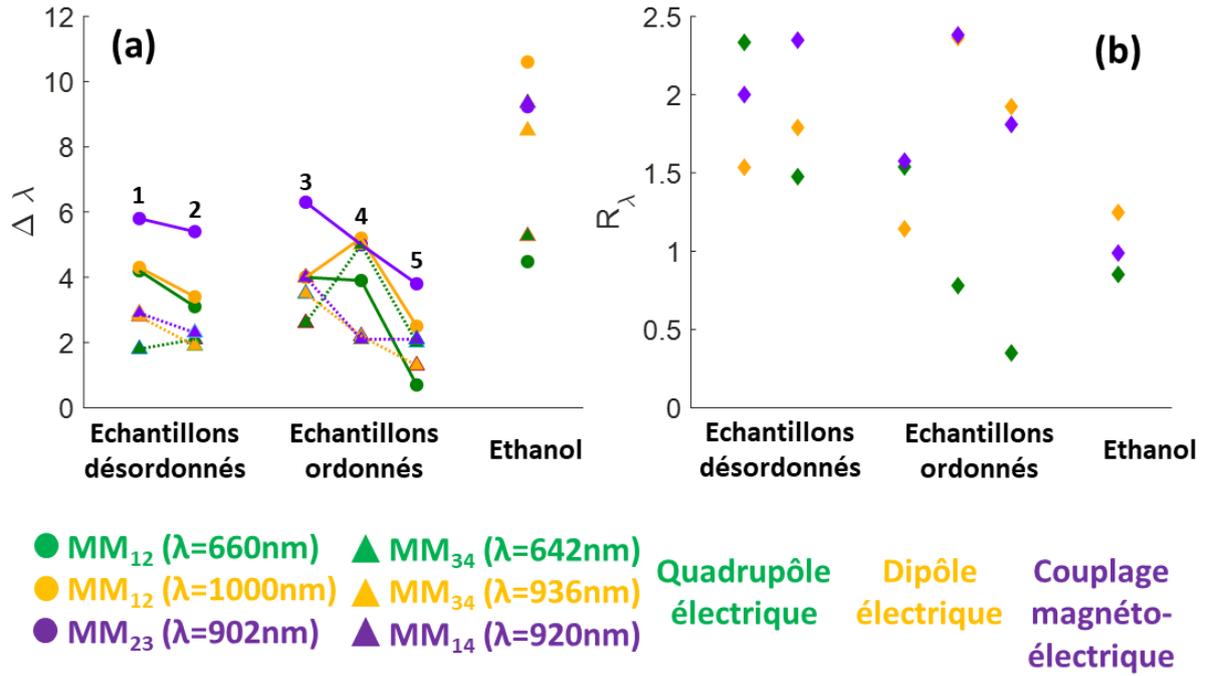


Figure 68 : (a) Décalages spectraux pour cinq échantillons fonctionnalisés par des temporines (1. D-Sha-Cter, 2. D-Sha-Cter, 3. D-Sha-Cter, 4. L-Sh-Cter et 5. L-Sha-Cter) et pour le changement de solvant H₂O/EtOH ainsi que (b) les rapports R_λ associés.

2. Influence de l'extension du champ sur la sensibilité de la mesure

Pour étudier l'influence des modes sur la détection des biomolécules, il faut désormais comparer les décalages obtenus pour les différents modes. Pour ce faire, les décalages spectraux associés aux parties imaginaires des oscillateurs sont choisis en l'occurrence MM_{12} et MM_{23} ici. On trouve deux rapports (équations (43) et (44)) pour l'échantillon (Echantillon aléatoire fonctionnalisé par une temporine D-Sha-Cter) présenté aux Figure 66 et Figure 67:

$$\frac{DE}{QE} = \frac{\Delta\lambda(MM_{12}, \lambda = 1000nm)}{\Delta\lambda(MM_{12}, \lambda = 660nm)} = \frac{4.3}{4.2} = 1.02 \quad (43)$$

$$\frac{ME}{DE} = \frac{\Delta\lambda(MM_{23}, \lambda = 902nm)}{\Delta\lambda(MM_{12}, \lambda = 1000nm)} = \frac{5.8}{4.3} = 1.35 \quad (44)$$

Il faut noter que les valeurs moyennes pour les cinq échantillons sont de 1.06 et 1.40 en ne considérant pas les valeurs associées aux quadrupôles ordonnés.

Pour l'éthanol, les rapports sont de 2.37 et de 0.87 ce qui suit la logique de la croissance de $\Delta\lambda$ en fonction de la longueur d'onde.

Il convient de comparer ces valeurs avec les extensions du champ électromagnétique pour chacun des modes. La longueur d'extension L est définie comme la distance pour laquelle le champ électrique quadratique moyenné spatialement est atténué d'un facteur e par rapport à sa valeur à la surface du résonateur c'est-à-dire L tel que :

$$|E^2(L)| = \frac{\langle |E^2(\text{surface})| \rangle}{e} \quad (45)$$

Les modes sont excités aux longueurs d'onde et polarisations adéquates et les distances L sont déterminées avec HFSS en utilisant les cartes de champ présentées au Chapitre 2. Pour chacun des modes précédemment évoqués, les longueurs d'extension trouvées sont de 1.73 nm pour le quadrupôle électrique, 0.59 nm pour le dipôle électrique et 0.43 nm pour le couplage magnéto-électrique. Ces valeurs sont rapportées à une décroissance effective à partir de toute la surface latérale des résonateurs. Il est certain que localement cette distance peut être plus grande ou plus courte. Il m'a semblé que la hiérarchie des valeurs caractéristiques de la décroissance du champ était bien respectée avec cette hypothèse. Il est alors possible de calculer les rapports entre ces différentes longueurs d'extension du champ (46) et (47) :

$$\frac{L_{QE}(= 1.73 \text{ nm})}{L_{DE}(= 0.59 \text{ nm})} = 2.93 \quad (46)$$

$$\frac{L_{DE}(= 0.59 \text{ nm})}{L_{ME}(= 0.43 \text{ nm})} = 1.37 \quad (47)$$

On s'attend à ce que plus la longueur d'évanescence associée à un mode est faible, plus la sensibilité à la présence du peptide sera importante et donc le décalage spectral $\Delta\lambda$ sera aussi plus important.

Le premier rapport vaut 2.93 (équation (46)) donc on s'attend à ce que le mode associé au dipôle électrique soit plus sensible que le mode associé au quadrupôle électrique ce qui n'est pas le cas ici. Ceci n'est pas observé expérimentalement (rapport de 1.02 issu de l'équation (43)). L'écart spectral entre les deux modes et donc la grande différence d'énergie entre eux (en termes de $1/\lambda$) explique la difficulté à comparer ces deux modes.

En revanche, la comparaison entre le mode associé au dipôle électrique et celui associé au couplage magnéto-électrique a plus de sens car les gammes spectrales d'étude sont similaires. Le rapport trouvé entre les longueurs d'évanescence est de 1.37 (équation (47)) ce qui est du même ordre de grandeur que le rapport trouvé expérimentalement (équation (44)) qui est de 1.35 (ou 1.40 en moyenne). L'extension du mode en champ proche semble être le paramètre principal qui influence la sensibilité de la métasurface.

Cette dépendance à la longueur d'évanescence du mode peut être observée différemment en définissant une masse ellipsométrique m_e analogue aux masses optiques m_{LSPR} déjà utilisés dans la littérature [69], [151], [152] telle que :

$$m_{LSPR} = d \frac{\Delta\lambda}{S \left(1 - e^{-2\left(\frac{d}{L}\right)} \right) \frac{dn}{dc}} \quad (48)$$

Où d est l'épaisseur de la couche de biomolécules, $\Delta\lambda$ le décalage spectral, S la sensibilité à l'indice de réfraction, L la longueur d'évanescence du champ et $\frac{dn}{dc}$ l'incrément d'indice de réfraction pour la biomolécule.

Le principe est de déterminer une masse ellipsométrique pour chaque élément de la matrice de Mueller en prenant d et $\frac{dn}{dc}$ constants. En revanche $\Delta\lambda$, S et L dépendent de la longueur d'onde choisie et de l'élément : ce sont des grandeurs spectroscopiques et polarimétriques. La masse optique trouvée devrait être la même pour tous les éléments. Si $\Delta\lambda$ et S sont connus

pour chaque élément à chaque longueur d'onde, il est possible de trouver une longueur d'évanescence $L_{ij}(\lambda)$ pour chaque élément MM_{ij} qui varierait en fonction du mode considéré.

L_{ij} ne dépend pas uniquement de $\Delta\lambda$ mais aussi de la sensibilité S . Les longueurs d'évanescence présentées par la suite ne doivent pas être interprétées uniquement en tant qu'inversement proportionnelles à $\Delta\lambda$. La sensibilité associée à chaque configuration spectroscopique et polarimétrique est insérée dans le calcul.

Pour trouver les valeurs $L_{ij}(\lambda)$, une mesure a été réalisée sur un quartz d'or nanostructuré avec un système permettant de coupler la QCM-D et une mesure LSPR [69]. Le module utilisé est un *Q-Sense sapphire window module* (Biolin Scientific, Suède) couplé avec un module *Insplorion Acoulyte* (Insplorion AB, Suède). Des nano-disques de 100 nm de diamètre et 20 nm de hauteur possédant une bande d'absorption autour de 700 nm sont présents sur un quartz de QCM. Les résultats associés sont présentés sur la Figure 69. Sur les spectres bruts à 0h et 4h sur la Figure 69 (a), le décalage spectral s'observe et sur la Figure 69 (b) la cinétique d'adsorption s'observe de nouveau avec un $\Delta\lambda$ qui atteint 6 nm. Enfin, il est possible de calculer une masse optique m_{LSPR} à l'aide de l'équation (48) en utilisant les paramètres suivants : $d=2$ nm, $S=60$ nm.RIU-1, $L=10$ nm et $\frac{dn}{dc}=0.185$ [153]. m_{LSPR} est égale à 3.5 ng.cm⁻² en fin de fonctionnalisation.

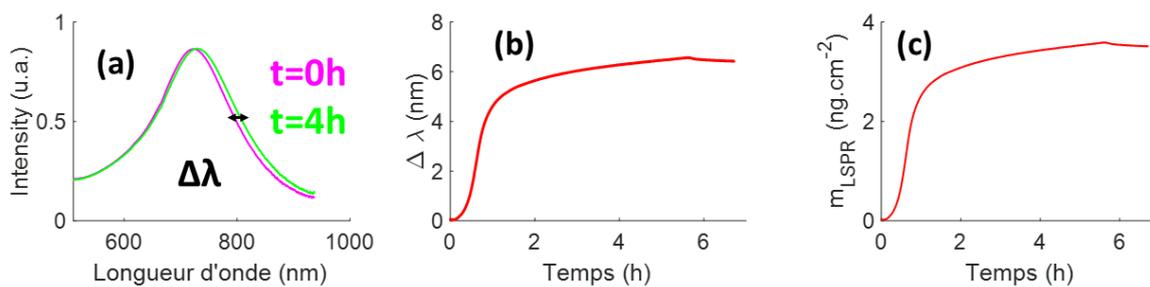


Figure 69 : Mesure LSPR sur un quartz d'or nanostructuré fonctionnalisé par la temporine D-Sha-Cter. Sont présentés ici (a) les spectres bruts, (b) le décalage spectral en fonction du temps et (c) une masse optique en fonction du temps.

Afin de déterminer des longueurs d'évanescence propres à chaque élément, l'idée est de rendre égales les masses ellipsométriques m_e associées à chaque élément à celle mesurée en LSPR à chaque moment. Tous les paramètres de l'équation (48) sont alors connus hormis $L_{ij}(\lambda)$ qui a été ajusté indépendamment pour chaque élément de matrice de Mueller. La sensibilité et le décalage spectral sont ceux qui ont été mesurés en ellipsométrie généralisée, d et $\frac{dn}{dc}$ sont les mêmes qu'en LSPR. Le résultat est présenté sur la Figure 70 pour une mesure réalisée à $\lambda=1000$ nm. On remarque que la cinétique n'est pas similaire dans les deux cas, ceci peut être dû à la surface considérée (Nano-U sur verre d'un côté et nano-disques sur or de l'autre) et l'expérience en LSPR est menée sous flux comme en QCM-D ce qui modifie certainement la cinétique de fonctionnalisation. En outre certains éléments semblent très bruités comme MM_{34} , la faiblesse du décalage spectral et donc l'influence plus importante du bruit de mesure peut expliquer ceci pour cet élément.

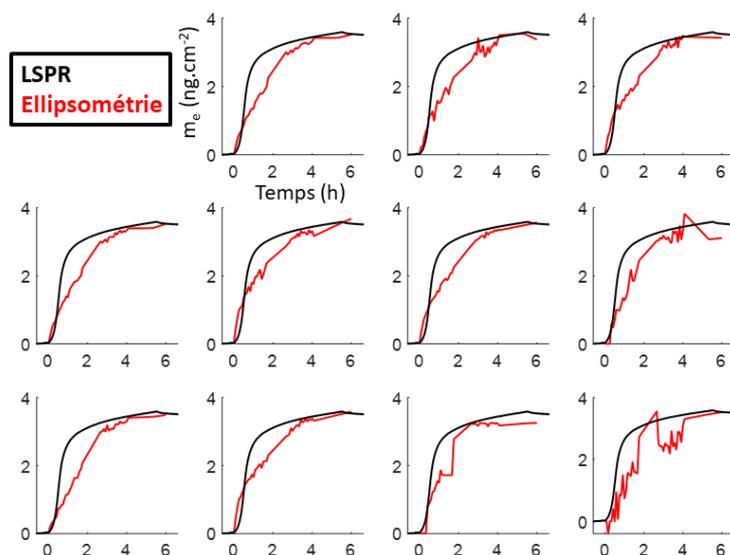


Figure 70 : Evolution temporelle de la masse greffée déterminée, par LSPR m_{LSPR} (noir), et par ellipsométrie, m_e (rouge). Les courbes rouges montrent l'évolution de la masse obtenue après ajustement des paramètres L_{ij} pour chaque élément de la matrice de matrice de Mueller mesurée à $\lambda=1000$ nm.

Le Tableau 16 montre les longueurs d'évanescence correspondant à chaque élément. La valeur intrinsèque de ces longueurs est à prendre avec précaution dans la mesure où les mesures sont ajustées avec une grandeur m_{LSPR} qui n'est pas mesurée avec le même système et de surcroît pas à la même longueur d'onde. Les ordres de grandeurs sont très différents de ceux trouvés avec HFSS (valeurs inférieures à 2 nm), en gardant à l'esprit que ces valeurs étaient moyennées sur tout le résonateur. En revanche, ce qui nous intéresse ici, c'est la différence entre les grandeurs. L'interprétation est similaire à celle réalisée précédemment : la sensibilité de chaque mode est différente car l'évanescence du champ n'est pas la même localement. On remarque que les rapports des longueurs d'évanescence des champs associées à M_{12} et M_{14} sont assez similaires qu'ils soient déterminés à partir des L_{ij} ($\frac{L_{12}}{L_{14}} = \frac{103}{62} = 1.66$) ou numériquement (1.37). On peut aussi noter un rapport à peu près constant de 2 entre les modes et leurs conjugués : MM_{34} et MM_{12} , MM_{23} et MM_{14} , MM_{13} et MM_{24} . Ces valeurs ne sont accessibles que grâce à ce fit car les conditions de polarisation correspondant aux éléments MM_{34} , MM_{23} et MM_{24} ne sont pas aisées à mettre en évidence numériquement. La plus faible longueur trouvée est L_{14} qui vaut 62 nm. Ceci semble logique car dans cette zone, MM_{14} est sensible au couplage magnéto-électrique.

Tableau 16 : Longueurs d'évanescence $L_{ij}(\lambda=1000$ nm) calculées à partir du fit présenté sur la Figure 70.

L_{ij}	103	129	62
109	121	116	61
85	125	18	222

3. Influence de la structure secondaire du peptide sur la mesure

Le mode magnéto-électrique devrait être sensible à une molécule chirale comme évoqué dans le Chapitre 2. La présence de molécules chirales au voisinage du résonateur devrait exacerber la réponse de ce mode. En observant la Figure 68 (a), MM_{23} montre un décalage particulièrement fort (5.3 nm en moyenne) par rapport au mode électrique à des longueurs d'onde comparables que ce soit sur MM_{12} (3.9 nm en moyenne) ou MM_{34} (2.34 nm en moyenne). Est-ce dû à la chiralité des peptides ? Les expériences ont été réalisées dans du PBS : dans ce solvant les temporines n'adoptent pas de conformation structurée en hélice (Figure 54) donc si il existe une exacerbation du couplage magnéto-électrique causée par la chiralité des molécules, elle est uniquement due aux molécules adsorbées chimiquement. Dans PBS, les temporines greffées sur or plan possèdent une activité bactéricide et donc devraient, en surface, être structurées.

Le décalage fort observé pour le mode associé au couplage magnéto-électrique peut être causé par la présence de peptides chiraux présents à la surface. Pour valider cette interprétation, une mesure réalisée à un angle d'incidence opposé (-45°) permettrait de vérifier que le décalage est dû à la chiralité des biomolécules. Avec le montage actuel comprenant une cellule liquide montée sur un ellipsomètre généralisé commercial, cette mesure est impossible pour toute la matrice car seules les trois premières lignes sont disponibles. En outre, il est impossible de changer l'angle azimutal à cause de l'encombrement stérique. Il est possible de tracer les symétries associées à certains éléments en l'occurrence : $\Delta_{12}=MM_{12}-MM_{21}$, $\Delta_{13}=MM_{13}-MM_{31}$ et $\Delta_{23}=MM_{23}-MM_{32}$. Si l'échantillon était parfaitement symétrique, on aurait $\Delta_{12}=0$, $\Delta_{13}=0$ et $\Delta_{23}=0$ mais le processus de lithographie engendre un écart comme ceci est visible sur la Figure 71 (les trois couples sont représentés) où l'on observe que pour certaines longueurs d'onde l'écart est important (supérieur à 0.05 pour $\Delta_{13}=MM_{13}-MM_{31}$ vers 600 nm). Il est ici présenté un échantillon aléatoire pour lequel la symétrie est la mieux respectée. L'avantage de l'expérience réalisée *in-situ* est qu'il est possible de comparer les dissymétries avant et après adsorption du peptide sans désalignement malgré les imperfections de la surface. On s'affranchit dans une certaine mesure des incertitudes inhérentes à la lithographie et à l'alignement. On peut comparer les Δ_{ij} avant et après adsorption même si ceux-ci ne sont pas nuls au début.

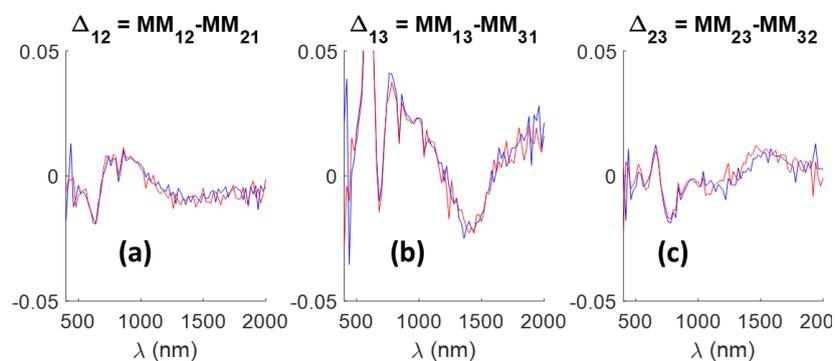


Figure 71 : Δ_{ij} en fonction de la longueur d'onde pour les couples d'éléments MM_{12}/MM_{21} , (b) MM_{13}/MM_{31} et (c) MM_{23}/MM_{32} . En bleu est représenté la métasurface avant adsorption dans du PBS et en rouge la métasurface après adsorption de la temporine D-Sha-Cter dans PBS également.

On peut donc comparer Δ_{12} , Δ_{13} et Δ_{23} avant et après adsorption. Ceci permettant d'observer l'influence du greffage comme présenté sur la Figure 72 où le décalage entre les courbes de la Figure 71 est visible. Rien de significatif n'est observable au regard du bruit de mesure pour les courbes représentant $\Delta_{12}(\text{PBS})-\Delta_{12}(\text{Peptide})$ et $\Delta_{13}(\text{PBS})-\Delta_{13}(\text{Peptide})$. En revanche, pour celle concernant le couple $\text{MM}_{23}/\text{MM}_{32}$, une oscillation en forme de **S** semble apparaître autour de 1000 nm avec des décalages de l'ordre de $5 \cdot 10^{-3}$. Ces pics peuvent être la signature de la chiralité car ils correspondent à une variation d'oscillateurs au niveau du couplage magnéto-électrique. Dans la littérature, les décalages attendus sont de l'ordre de 10^{-4} [73] ou de 10^{-3} [37] en terme de variation de dichroïsme circulaire. Les valeurs obtenues ici sont du même ordre de grandeur mais sont aussi dans le bruit de mesure ne permettant pas d'affirmer à 100 % que le décalage est dû à la présence de molécules chirales. Ce résultat sera confronté à des mesures sur d'autres biomolécules dans le Chapitre 5.

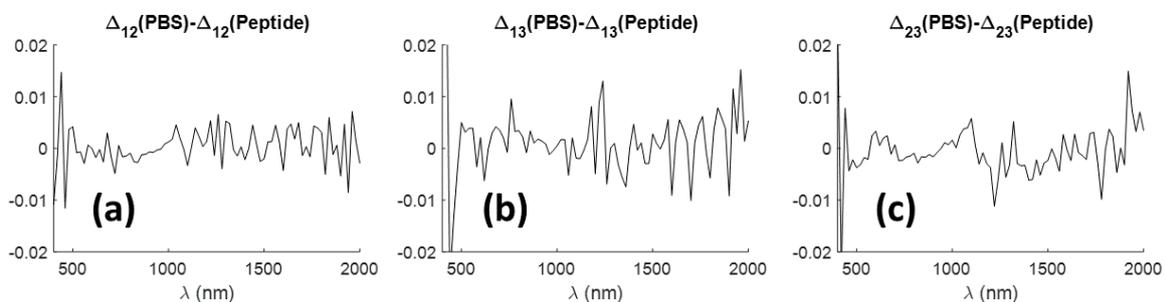


Figure 72 : Représentation de la différence entre les Δ_{ij} avant et après adsorption en fonction de la longueur d'onde pour les couples d'éléments $\text{MM}_{12}/\text{MM}_{21}$, (b) $\text{MM}_{13}/\text{MM}_{31}$ et (c) $\text{MM}_{23}/\text{MM}_{32}$.

Partie 4. Conclusion et perspectives du Chapitre

Lors de ce Chapitre les résultats suivants ont été montrés :

- En solution les temporines adoptent une structure secondaire en hélice α avec un solvant adéquat.
- Les temporines Sh possèdent une activité bactéricide lorsqu'elles sont adsorbées sur des surfaces d'or.
- Le greffage de ces temporines a été réalisé avec succès sur or plan et sur les métasurfaces en U. Des caractérisations par PM-IRRAS et par XPS le montrent.
- Une cinétique de fonctionnalisation est accessible en QCM-D et il est possible de la retrouver en ellipsométrie généralisée *in-situ* et en mesure LSPR.
- Les décalages spectroscopiques induits par le greffage d'un peptide diffèrent selon le mode observé.
- La différence entre ces décalages est causée par une longueur d'évanescence du champ qui dépend du mode considéré.
- Le décalage fort observé pour le mode associé au couplage magnéto-électrique semble indiquer la présence d'une structuration en surface. Cependant, la sensibilité de la mesure ne semble pas suffisante pour s'en assurer.

Dans tous les cas, pour détecter la signature de biomolécules chirales au voisinage de métasurfaces, il semble nécessaire de conserver les mêmes conditions expérimentales (même alignement et même échantillon) pour pouvoir prétendre que la chiralité des molécules influence le signal émis par les résonateurs.

Afin d'augmenter la sensibilité de la détection et d'observer plus d'effets de symétries, plusieurs perspectives peuvent être imaginées. Deux options ont été choisies et sont présentées dans les Chapitres 5 et 6 :

1. L'utilisation d'un autre solvant qui, à coup sûr structure les peptides comme le TFE 40 % dans H₂O (Figure 54) serait d'intérêt mais la cellule liquide en ABS ne résistait pas à ce solvant. De l'acide méthacrylique a été utilisé afin de pouvoir utiliser ce solvant : les tests de résistance étaient concluants (Chapitre 3). Cependant, le fait que ce mélange possède un indice de réfraction très différent de celui de l'eau complique l'analyse et donc cette expérience n'a pas encore été réalisée. Une autre possibilité serait de dénaturer les peptides après greffage. Mais ceci semble compliqué à réaliser *in-situ* sachant que les protocoles de dénaturation nécessitent des températures élevées [154] ou des solvants bien particuliers [155].
2. L'utilisation d'autres biomolécules qui possèderaient d'autres structures secondaires que l'hélice α des temporines est un axe de recherche qui semble pertinent. En outre, des biomolécules plus volumineuses devraient plus influencer la réponse des métasurfaces. Le Chapitre 5 présente donc des résultats pour des protéines et des vésicules extracellulaires qui sont des objets biologiques bien plus volumineux que les peptides présentés dans ce Chapitre. Le Chapitre 5 est donc consacré à l'étude de nouveaux agents biologiques.
3. L'élaboration d'un système optique permettant l'observation simultanée de différents angles d'incidences bénéficierait à l'interprétation de l'expérience. C'est pourquoi un μ -polarimètre de Mueller qui permet d'imager le plan de Fourier et donc les différents angles d'incidence pour tous les éléments de la matrice est en cours d'élaboration. Les résultats associés à ce montage optique sont présentés dans le Chapitre 6.

Chapitre 5 : D'autres espèces biologiques d'intérêt

Pour étudier la conformation de biomolécules en surface, il est utile d'étudier des molécules plus complexes que les peptides qui ont fait l'objet du Chapitre 4. Par exemple, l'étude de protéines semble intéressante dans la mesure où ces assemblages sont bien plus volumineux que les temporines (la chaîne d'acides aminés est 10 fois plus grande généralement). Par conséquent, des protéines différant par leur structure et organisation ont été étudiées. En outre, une étude préliminaire sur des vésicules extracellulaires a été réalisée. Les résultats associés à ces études sont présentés dans ce Chapitre.

Partie 1. Le cas des protéines

Afin de détecter la signature de la chiralité de biomolécules lorsqu'elles sont greffées à des surfaces, la mesure polarimétrique de métasurfaces en U fonctionnalisées par différentes protéines a été réalisée. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Lu Zhang, postdoctorante à l'INSP et au LRS, et l'équipe de Morten KILDEMO à NTNU en Norvège. Plusieurs protéines possédant des structures secondaires différentes ont ainsi été étudiées.

Pour étudier l'influence de ces protéines, elles ont été greffées sur les métasurfaces préalablement fonctionnalisées pour assurer des liaisons covalentes avec les protéines, puis analysées. Ensuite, ces métasurfaces ont été régénérées (c'est-à-dire que les protéines ont été retirées à l'aide d'un traitement chimique et physique) et caractérisées de nouveau. La comparaison des deux mesures est ensuite réalisée.

1. Protocole expérimental pour le greffage des protéines sur or

Plusieurs protéines ont été choisies afin de sonder la signature de leur structure secondaire en l'occurrence :

- La β -lactoglobuline (L-3908) (18 kDa)
- La β -lactoglobuline B (L-8005) (18 kDa)
- L'IgG associé au rat (I-5006) (150 kDa)
- La myoglobine (18 kDa)
- La protéine A (21184) (42 kDa)

La protéine A provient de Thermo Scientific tandis que toutes les autres protéines proviennent de Sigma-Aldrich.

Afin de sonder la structure secondaire en solution, des mesures de dichroïsme circulaire en solution ont été effectuées. Les protéines ont été diluées dans un tampon PBS 10mM pour des concentrations dans la gamme 1-5 μ M. Les spectres CD ont été réalisés à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM) sur un spectropolarimètre permettant la mesure de dichroïsme circulaire (Jasco J-815). Les spectres CD sont présentés sur la Figure 73. Sur les spectres CD, la β -lactoglobuline et la β -lactoglobuline B présentent un caractère en feuillet β avec un unique pic négatif vers 210-220 nm. L'IgG est aussi structuré en feuillet β avec un unique pic négatif autour de 215 nm. La myoglobine montre deux pics négatifs caractéristiques d'une structure secondaire en hélice α . La structure de la protéine A n'est pas bien connue, mais d'après nos mesures, elle semble majoritairement se structurer en hélice α .

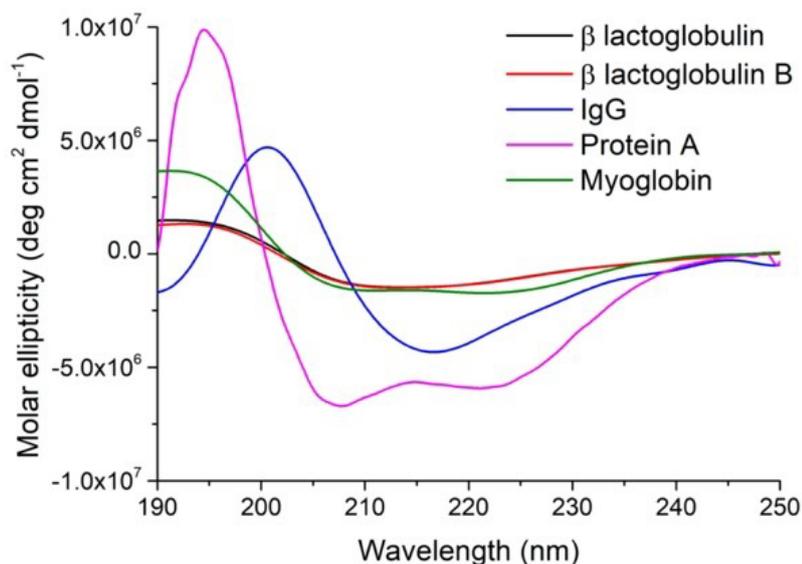


Figure 73: Spectres CD des différentes protéines utilisés après soustraction du signal de calibration.

Les métasurfaces ont été fonctionnalisées conjointement à des surfaces planes d'or pour réaliser un contrôle de la fonctionnalisation par PM-IRRAS. Tout d'abord, il faut générer des fonctions amines à la surface de l'or en formant une monocouche auto-assemblée (SAM pour Self-Assembled Monolayer) de cystéamine (CEA). Les surfaces ont été immergées dans une solution de CEA (1 mM dans EtOH) pendant 24h avec une agitation douce. Ensuite, les surfaces sont lavées avec de l'éthanol absolu (3x5'). Pour activer les SAM, les surfaces sont immergées dans une solution de 1,4- phénylene diisothiocyanate (PDITC) (0.02 % w/v dans un solvant de pyridine/DMF (N,N-Diméthylformamide) 1:9) pendant 2h et finalement rincées par le solvant pyridine/DMF 1:9 (1x5'). Les protéines sont alors attachées de manière covalente au PDITC activé. Les protéines ont été greffées *via* le dépôt d'une goutte de 150 μ L (50 mg/L dans PBS) et incubées durant 2h [156]. Les surfaces sont rincées vigoureusement dans du PBS 0.1 % Tween 20 (2x5'). Les surfaces fonctionnalisées sont ensuite rincées avec de l'eau Mili-Q (1x5') et séchées sous azote sec.

Les spectres PM-IRRAS sont présentés sur la Figure 74. La CEA montre 2 bandes à 2920 et 2854 cm^{-1} , qui correspondent aux modes asymétriques et symétriques des groupes CH de la chaîne alkyle. La bande à 1635 cm^{-1} peut être attribuée à la vibration de déformation N-H, ce qui confirme la présence de groupements amine primaire. Un pic à une plus faible longueur d'onde à 1450 cm^{-1} peut être dû à la vibration de cisaillement des groupes CH₂. Après addition du PDITC, l'intensité des bandes augmente légèrement. Le greffage des protéines est aussi vérifié avec la présence de bandes amide intenses à 1660 cm^{-1} et 1540 cm^{-1} , qui correspondent aux vibrations amide I et amide II. Les deux bandes dans la gamme 2920-2970 cm^{-1} se décalent vers des plus grands nombres d'onde et leur intensité augmente.

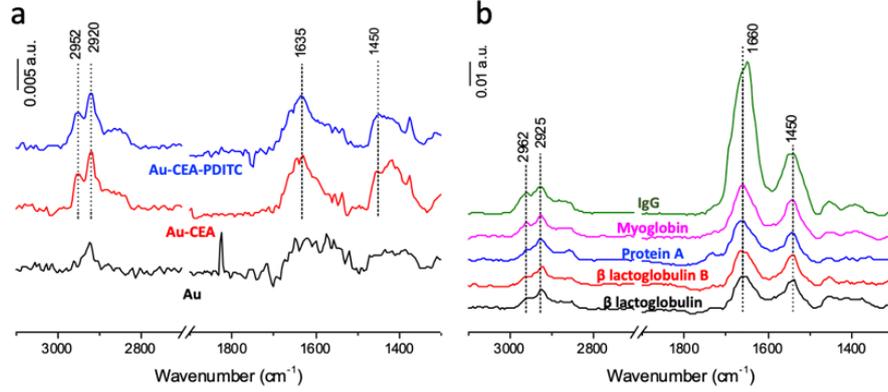


Figure 74: Spectres PM-IRRAS de (a) Au, de Au-CEA et de Au-CEA-PDITC et (b) des protéines greffées.

Pour mesurer les métasurfaces, il faut comparer une mesure après greffage et une mesure sans protéines. Pour cela, certaines des surfaces ont été régénérées. Le protocole utilisé est le suivant :

1. Imagerie MEB des métasurfaces
2. Nettoyage sous UV/Ozone pendant 20 minutes
3. Rinçage dans une solution de SDS 2 % (dans l'eau mili-Q) pendant 2 heures
4. Rinçage à l'eau mili-Q
5. Séchage sous l'azote sec
6. Nettoyage sous UV/Ozone pendant 20 minutes
7. Rinçage à l'éthanol absolu
8. Séchage sous azote sec
9. Imagerie MEB des métasurfaces

Ce protocole a été effectué en parallèle sur les résonateurs fonctionnalisés et sur de l'or plan pour lequel le processus de fonctionnalisation avait été effectué en même temps. Pour quantifier l'influence de ce processus de régénération, des mesures de PM-IRRAS ont été réalisées avant et après régénération, la baisse d'intensité des bandes amide validant le protocole de régénération. De plus, des mesures de spectrométrie de photoélectrons X (XPS) ont été réalisées ce qui permet de quantifier le taux de recouvrement de la surface. En utilisant les pics associés aux niveaux de cœur carbone 1s et or 4f, il est possible de déterminer des taux de recouvrement. Ceci a été réalisé sur l'or plan et l'analyse des niveaux de cœur a été faite en utilisant le modèle suivant (équation (49)) [69]:

$$\frac{I_{C1s(288\text{ eV})}}{I_{Au4f}} = \frac{204 \frac{\rho_{prot}}{M_{prot}} \sigma_{C1s} \lambda_{C1s}^{prot} \theta \left[1 - \left(\frac{2\lambda_{C1s}^{prot^2}}{d_{prot}} \right) \left[1 - \left(\frac{d_{prot}}{\lambda_{C1s}^{prot}} + 1 \right) \exp\left(-\frac{d_{prot}}{\lambda_{C1s}^{prot}}\right) \right] \right]}{\frac{\rho_{Au}}{M_{Au}} \sigma_{Au4f} \lambda_{Au4f}^{Au} \left[\theta \left(\frac{2\lambda_{Au4f}^{prot^2}}{d_{prot}} \right) \left[1 - \left(\frac{d_{prot}}{\lambda_{Au4f}^{prot}} + 1 \right) \exp\left(-\frac{d_{prot}}{\lambda_{Au4f}^{prot}}\right) \right] + (1 - \theta) \exp\left(-\frac{d_{org}}{\lambda_{Au4f}^{org}}\right) \right]} \quad (49)$$

$I_{C1s(288\text{ eV})}$ et I_{Au4f} : Intensités XPS de $C_{1s(288\text{ eV})}$ et Au_{4f} ; ρ_{prot} : densité d'une protéine; M_{prot} : masse molaire d'une protéine; ρ_{Au} : densité de l'or; M_{Au} : masse molaire de l'or; λ_x^y : libre parcours moyen des électrons x dans la matrice y basé sur « Quases TPP2M »: $\lambda_{C1s}^{prot} =$

3.2 nm, $\lambda_{Au4f}^{prot} = 3.7 \text{ nm}$, $\lambda_{Au4f}^{Au} = 1.6 \text{ nm}$. σ_x : section efficace de photoionisation de l'électron x [3]. $\sigma_{C1s}=1$, $\sigma_{Au4f}=14.34$.

Cette détermination du taux de recouvrement a été réalisée après le greffage des protéines et après l'étape de régénération pour trois protéines : la β -lactoglobuline, la β -lactoglobuline B et la protéine A. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Taux de recouvrement associés à la fonctionnalisation de l'or plan par trois protéines avant et après régénération des surfaces.

Protéine	Taux de recouvrement	
	Après greffage	Après régénération
β -lactoglobuline	50 %	15 %
β -lactoglobuline B	60 %	22 %
Protéine A	59 %	11 %

On observe que les taux de recouvrement de l'or plan après fonctionnalisation sont compris entre 50 % et 60 % et qu'ils tombent à des valeurs situées entre 10 % et 20 % après régénération. Ceci valide le protocole de nettoyage des surfaces. Il est possible de comparer les mesures pour ces deux types d'échantillons. On supposera que le résultat est similaire pour les autres protéines (IgG et myoglobine).

2. Caractérisation des métasurfaces

Les mesures sur des métasurfaces ordonnées ont été réalisées en Norvège et ont déjà été présentées dans le Chapitre 3 pour des surfaces nues. Il faut noter qu'au contraire des mesures réalisées à l'INSP, les résultats présentés ici sont réalisés en phase sèche.

La Figure 75 (a) présente la matrice de Mueller mesurée après fonctionnalisation (rouge) et après régénération (bleue) pour la protéine A à un azimut de 90 °. On observe directement que la présence de protéines implique un décalage vers le rouge des résonances. La Figure 75 (b) présente le décalage spectroscopique associé à chaque élément de la matrice de Mueller. Comme prévu ce décalage est croissant en fonction de la longueur d'onde. Le résultat est similaire pour les autres protéines utilisées. On observe le même comportement que pour les peptides présentés dans le Chapitre 4.

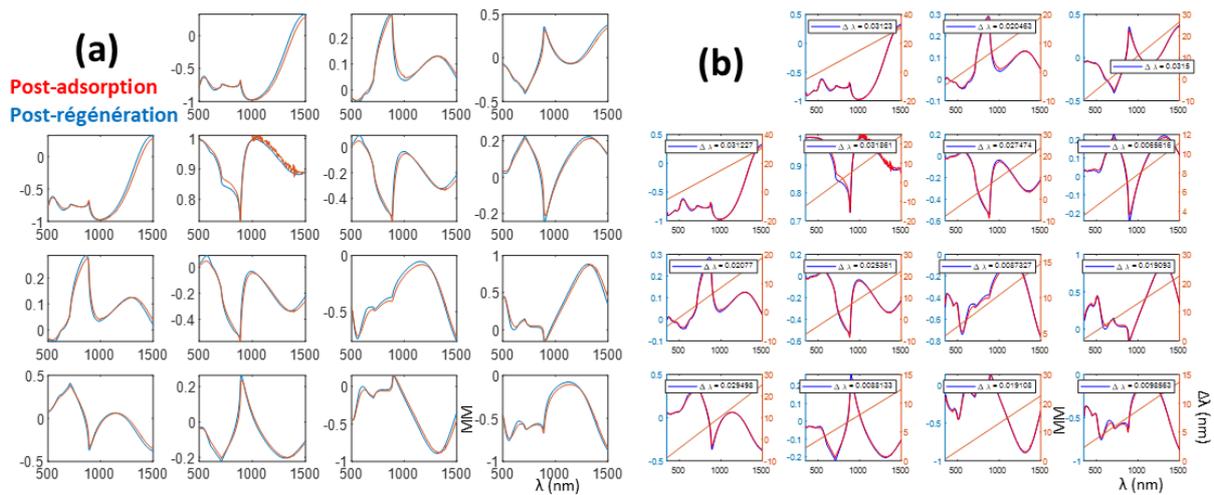


Figure 75 : (a) Matrice de Mueller associée à une métasurface fonctionnalisée par de la protéine A après fonctionnalisation (rouge) et après régénération (bleue) et (b) Décalage spectroscopique associé à chaque élément de la matrice de Mueller. Les mesures sont réalisées pour un azimuth de 90° .

Pour étudier l'influence de la présence des protéines à la surface des résonateurs, l'étude de $\Delta\Delta_{ij}$ (présenté sur l'équation(50)) permettrait d'étudier les dissymétries engendrées.

$$\Delta\Delta_{ij} = \left(MM_{ij}(90^\circ) - MM_{ji}(270^\circ) \right)_{\text{avec protéine}} - \left(MM_{ij}(90^\circ) - MM_{ji}(270^\circ) \right)_{\text{après régénération}} \quad (50)$$

Les courbes obtenues pour $\Delta\Delta_{ij}$ sont montrées sur la Figure 76. Quatre protéines ont été étudiées à savoir la β -lactoglobuline, la myoglobine, la β -lactoglobuline B et la protéine A. Les points rouges correspondent à la position des anomalies de Rayleigh qui sont particulièrement marquées pour cette série de mesures réalisées sur des surfaces ordonnées (voir Figure 40 du Chapitre 3 (MM₃₄ avec les positions des anomalies de Rayleigh superposées)). Les échantillons utilisés pour ces mesures étant composés de résonateurs en U positionnés sur un réseau régulier, l'influence de ces anomalies est importante. On observe que toutes les variations sont bornées entre $-5 \cdot 10^{-3}$ et $+5 \cdot 10^{-3}$. En revanche, aucune observation n'est systématique entre les différentes expériences. Ceci confirme la nécessité de réaliser les expériences *in-situ* : les deux mesures sont réalisées après avoir retiré les échantillons ce qui induit trop d'incertitudes, en particulier sur l'alignement.

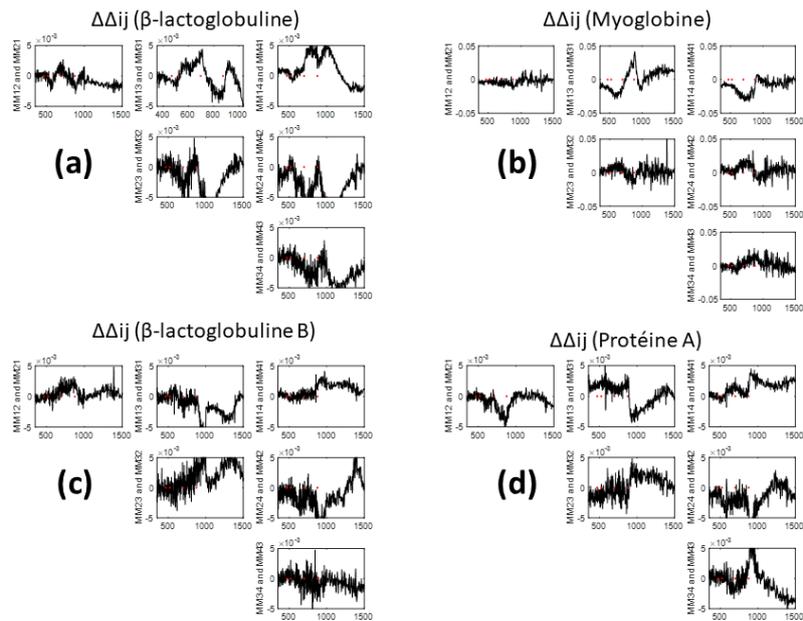


Figure 76 : $\Delta\Delta_{ij}$ pour quatre protéines : (a) la β -lactoglobuline, (b) la myoglobine, (c) la β -lactoglobuline B et (d) la protéine A. Les points rouges correspondent aux positions des anomalies de Rayleigh.

Une étude *in-situ* a aussi été réalisée pour la β -lactoglobuline et la Protéine A. Après activation de la surface par greffage du couple CEA/PDITC de manière équivalente au protocole expliqué précédemment. Les protéines ont été diluées dans PBS à une concentration de 50 mg.L^{-1} puis greffées à la métasurface *via* la cellule liquide associée à l'ellipsomètre de la même manière que pour les temporines présentées au Chapitre 4.

Il est alors possible de calculer $\Delta_{23} = \text{MM}_{23} - \text{MM}_{32}$ puis de tracer Δ_{23} (avant adsorption) - Δ_{23} (après adsorption) (défini dans le Chapitre 4) pour ces deux protéines : cette différence est présentée sur la Figure 77. Les valeurs sont inférieures à $5 \cdot 10^{-3}$. Une oscillation en forme de S apparaît autour de 1000 nm, pour la β -lactoglobuline et la protéine A. Avant de comparer et d'interpréter plus en profondeur les différents résultats, une autre espèce biologique est présentée : une vésicule extracellulaire.

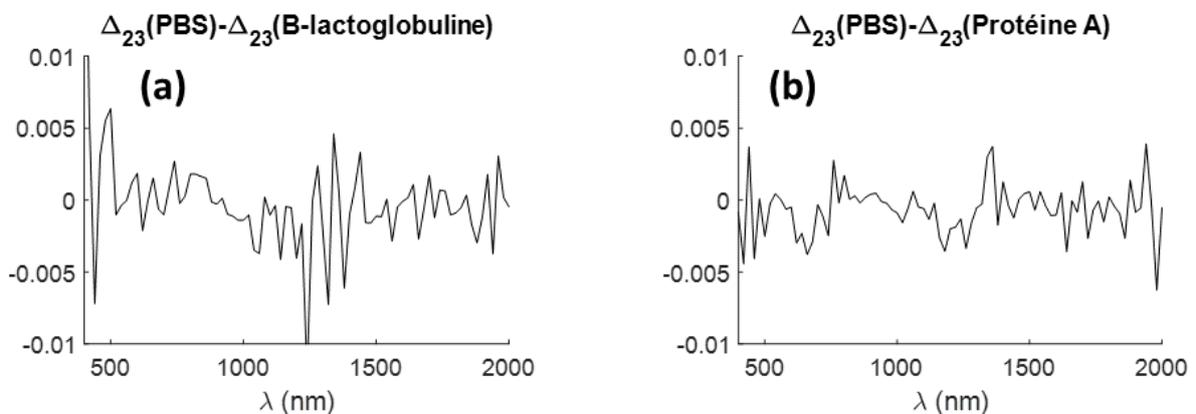


Figure 77 : Représentation de la différence entre les Δ_{23} avant et après adsorption en fonction de la longueur d'onde pour (a) la β -lactoglobuline et (b) la protéine A.

Partie 2. Le cas des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VE) sont des objets de taille nanométrique d'origine endosomale impliqués dans la communication intercellulaire qui modulent un large éventail de processus biologiques dans des conditions normales et pathologiques [157]. Elles sont dernièrement beaucoup étudiées car prometteuses dans la lutte contre le cancer ou encore la maladie d'Alzheimer [158]. Cependant, les vésicules extracellulaires sont très hétérogènes en termes d'origine cellulaire, de taille et de densité. En particulier, les exosomes sont de plus en plus étudiés : ce sont des vésicules qui ont une taille comprise entre 30 et 150 nm [159].

Un des axes de recherche sur les exosomes est de trouver une méthode permettant de distinguer les vésicules « saines » des « malsaines » afin de détecter en amont un cancer. Plusieurs techniques associées aux biocapteurs ont été développées dernièrement [160] pour réaliser cette détection notamment certains travaux qui utilisent la résonance plasmonique de surface de l'or [157], [161]. Dans ce cadre, une étude est menée au LRS pour discriminer les exosomes en utilisant la QCM-D couplée à la détection LSPR (présentée au Chapitre 4). Une autre idée est de caractériser leur structure secondaire afin de différencier les deux types. En ce sens, l'utilisation de ces vésicules comme agents à sonder, *via* l'ellipsométrie généralisée, bénéficierait à l'avancée des connaissances sur ce domaine. A ce stade, des vésicules extracellulaires issues du rat en l'occurrence le variant 109Q (forme mutante) ont été étudiées. Il a été fourni par l'équipe de Christian Néri de l'Institut Biologie Paris Seine (IBPS). Par la suite, l'étude du variant 7Q (forme normale) doit être réalisée. Puis, la différenciation entre les formes mutées et normales issues de l'humain serait une perspective intéressante.

1. Protocole expérimental pour le greffage des vésicules extracellulaires sur or

Pour greffer les vésicules extracellulaires étudiées sur la métasurface d'or, le protocole à réaliser est le suivant :

1. Activation de la surface par greffage du couple CEA/PDITC de manière équivalente au protocole expliqué précédemment pour le greffage des protéines puis rinçage par DPBS
2. Greffage de l'anticorps de rat CD63 à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un tampon de phosphate de Dulbecco (DPBS) puis rinçage au DPBS
3. Blocage des sites d'adsorption non spécifique par ajout d'albumine de sérum bovin (BSA) à 0.1 % dans DPBS puis rinçage au DPBS
4. Ajout de l'exosome à une concentration de $3.6 \cdot 10^9$ particules.mL⁻¹ dans DPBS

Jusqu'au greffage de l'anticorps, les étapes ont été menées simultanément sur or plan afin de faire un suivi au PM-IRRAS et donc de valider la fonctionnalisation de la surface.

2. Caractérisation des métasurfaces

Tout comme pour les autres biomolécules, il est possible d'observer des cinétiques de greffage pour les étapes réalisées *in-situ* pendant la mesure ellipsométrique. La métasurface activée par CEA/PDITC est positionnée dans la cellule liquide et les étapes 2, 3 et 4 du protocole (accroches de l'anticorps, de la BSA et de la vésicule) sont réalisées *in-situ* afin de réaliser un

suivi cinétique, spectroscopique et polarimétrique. Les trois étapes de greffage sont visibles sur la Figure 78 : à chacun des modes est associé un décalage spectroscopique. On remarque que pour chacune des étapes de greffage, la sensibilité n'est pas la même pour les trois modes. Par exemple le couplage magnéto-électrique est très sensible à l'accroche de l'anticorps (Figure 78 (b)). L'anticorps utilisé étant une protéine chirale, la sensibilité particulière de ce mode semble logique. Les vésicules sont des objets de taille conséquente donc on s'attend à ce qu'ils modifient fortement l'environnement diélectrique et donc impliquent un fort décalage spectroscopique. Or, ce n'est pas visible sur les cinétiques montrées. Ceci s'explique par la présence d'agents de liaison qui éloignent l'exosome de la surface et donc en raison de l'évanescence du champ proche, la réponse de la métasurface est peu modifiée.

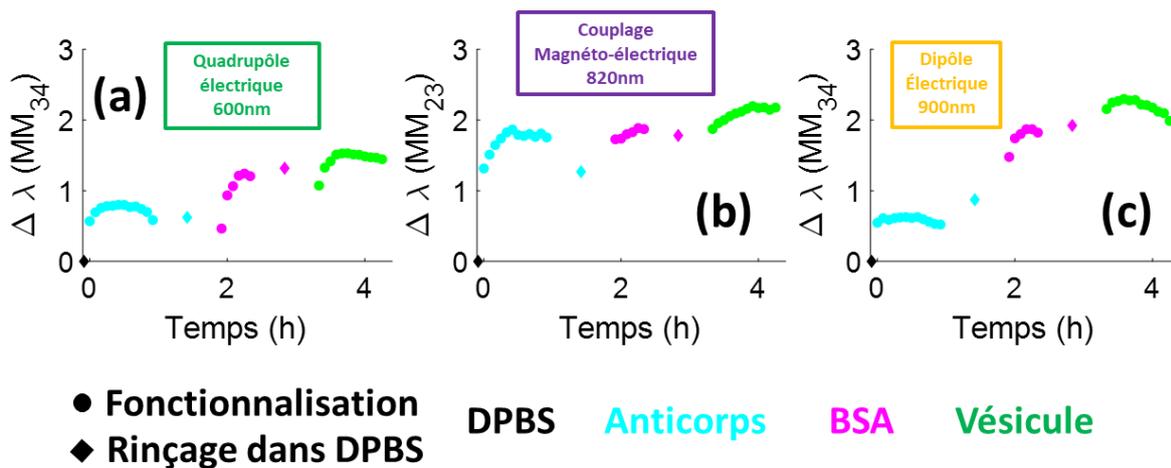


Figure 78: Cinétiques de greffage associées à la fonctionnalisation d'une métasurface par une vésicule extracellulaire pour les trois modes d'intérêt à savoir (a) le quadrupôle électrique, (b) le couplage magnéto-électrique et (c) le dipôle électrique.

On peut également présenter les dissymétries induites par la présence des différentes biomolécules greffées. La Figure 79 présente Δ_{23} (défini dans le Chapitre 4 et dans la partie précédente). Les ordres de grandeur obtenus sont faibles en l'occurrence inférieurs à $1 \cdot 10^{-3}$, même si en présence des vésicules extracellulaires certains pics apparaissent vers 800 nm et 1200 nm. Plus précisément, des variations d'oscillateurs sont observables. Pour affirmer que c'est la signature d'une quelconque structure secondaire, il faut répéter l'expérience et la réaliser pour des vésicules extracellulaires non mutées afin de dresser une comparaison.

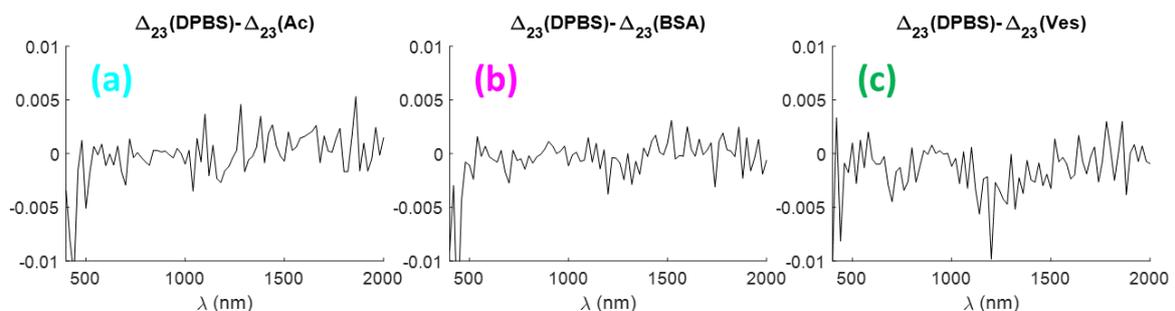


Figure 79: Différences en Δ_{23} avant et après adsorption (a) de l'anticorps, (b) de la BSA et (c) des vésicules extracellulaires.

Partie 3. Comparaison entre les molécules biologiques

Il convient de comparer les résultats obtenus pour les différentes biomolécules étudiées en ellipsométrie généralisée *in-situ* : la temporine (D-Sha-Cter), la β -lactoglobuline, la protéine A et les vésicules extracellulaires. En l'occurrence on peut comparer les différences induites sur Δ_{23} pour chaque type de biomolécule. Les courbes présentant les Δ_{23} avant et après adsorption sont présentées en Annexe 3. On observe une différence, faible (de l'ordre de quelques 10^{-3}) mais qui semble significative, dans une zone spectrale localisée entre 1000 nm et 1500 nm. Cette différence n'est probablement pas une conséquence de la dérive causée par la stabilité de la mesure (Figure 45 du Chapitre 3) puisqu'elle est localisée. J'ai calculé $\Delta_{23}(\text{avant adsorption}) - \Delta_{23}(\text{après adsorption})$. Les courbes associées à cette différence sont présentées sur la Figure 80. Toutes les mesures sont faites dans PBS avant adsorption et après un rinçage dans PBS après adsorption. Il semble apparaître une oscillation commune en forme de **S** entre 800 nm et 1400 nm. Pour visualiser ce **S** sur la Figure 80, j'ai tracé une simple sinusoïde (guide pour les yeux). De même, j'ai tracé une ligne horizontale où chaque point prend la valeur -0.001, cette ligne coupe le point d'inflexion de la sinusoïde.

Pour la protéine A, l'effet semble très faible voire inexistant (Figure 77 (b) et Figure 80). En revanche, pour la temporine D-Sha-Cter (Figure 72 (c) du Chapitre 4 et Figure 80), la β -lactoglobuline (Figure 77 (a) et Figure 80) et la vésicule extracellulaire (Figure 79 (c) et Figure 80), l'effet est plus marqué. Dans le cas de la temporine, plusieurs surfaces ont été mesurées (Chapitre 4) mais malheureusement seule celle présentée ici a été mesurée jusqu'à 2000 nm, pour les autres les mesures s'arrêtent à 1200 nm.

Cette oscillation est de l'ordre de $1-2 \cdot 10^{-3}$. Dans la littérature, les différences attendues sont de l'ordre de quelques 10^{-4} [73] ou de 10^{-3} [37] en terme de variation de dichroïsme circulaire (Chapitres 1 et 4). Dans le cas de l'exacerbation de dichroïsme circulaire dans les résonateurs, le mécanisme n'est pas encore complètement clair. Cependant, il faut noter que le CD mesuré sur les molécules dans l'UV donne une information nécessaire sur la présence d'une structure secondaire mais ne renseigne pas forcément sur l'amplitude du signal dans le proche infrarouge. Celui-ci pourrait par exemple être lié à la densité des molécules dans le champ très proche des résonateurs et donc à la fois la densité de molécules en surface et l'extension du champ proche par rapport à la taille des molécules peuvent modifier l'amplitude des variations observées sur MM_{23}/MM_{32} . En outre, dans cette zone spectrale (autour de 1000 nm), le coefficient MM_{23} est sensible au couplage magnéto-électrique qui est lui-même sensible à la chiralité des biomolécules. Cependant, cette différence est du même ordre de grandeur que le bruit de mesure, il est donc difficile d'affirmer, à ce stade, si ce qu'on semble observer pourrait être dû à une absorption chirale dans les résonateurs ou à un décalage différentiel. Ce comportement reste prometteur car l'ordre de grandeur est celui attendu, la zone spectrale aussi et une certaine reproductibilité apparaît entre différentes expériences.

Pour supporter cette affirmation, il faudra répéter l'expérience plusieurs fois. L'influence du bruit de mesure pourrait alors être amoindrie à l'aide d'un traitement statistique.

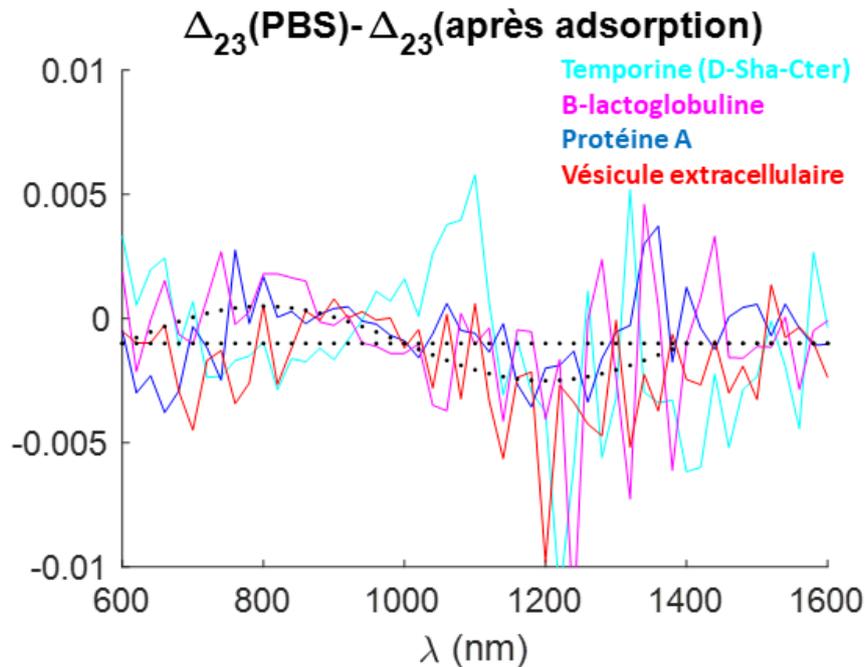


Figure 80 : Différences en Δ_{23} avant et après adsorption entre 600 nm et 1600 nm pour la temporine D-Sha-Cter (turquoise), la β -lactoglobuline (magenta), la protéine A (bleu) et une vésicule extracellulaire (rouge). La sinusoïde simple (guide pour les yeux) est en pointillé noir ainsi qu'une ligne horizontale qui coupe la sinusoïde au niveau de son point d'inflexion.

Partie 4. Conclusion et perspectives du Chapitre

L'utilisation de diverses espèces biologiques plus volumineuses que les temporines et qui présentent donc généralement un signal CD plus fort dans l'UV a été testée.

Des protéines ont été greffées sur les métasurfaces d'or après activation des surfaces par CEA/PDITC. Une vésicule extracellulaire a également été étudiée après activation de la surface par CEA/PDITC et greffage de l'anticorps associé.

Une étude en phase sèche après adsorption des protéines et après régénération a été réalisée. Les incertitudes sur la reproductibilité de l'alignement confirment la nécessité de réaliser les mesures *in-situ*.

Une étude a alors été réalisée *in-situ* pour deux protéines et des vésicules extracellulaires. Des différences de signal apparaissent lors de l'observation des variations des couples MM_{23}/MM_{32} avant et après adsorption. Les ordres de grandeurs, zones spectroscopiques et reproductibilités de ces décalages semblent prometteurs pour caractériser la signature des espèces biologiques.

Trois voies sont à suivre afin de s'assurer que les différences observées sont reliées à une absorption chirale :

1. Il semble que le couple MM_{23}/MM_{32} (sans toute la matrice) soit particulièrement pertinent. On peut alors imaginer qu'un autre appareil optimisé pour cette mesure

comme par exemple le polarimètre JASCO est optimisé pour la mesure du CD, permettrait sûrement d'augmenter la résolution pour ces éléments.

2. La mesure de la matrice de Mueller complète ou bien à un azimuth opposé permettrait également d'étudier les variations d'autres couples de coefficient tels que MM_{14}/MM_{41} et MM_{24}/MM_{42} ce qui bénéficierait à l'interprétation des différences observés. C'est l'objectif du μ -polarimètre présenté dans le Chapitre suivant.
3. Des calculs par éléments finis peuvent aussi permettre de prédire les variations induites par la présence de biomolécules chirales au voisinage des résonateurs en U [162] et donc aider à l'interprétation des observations. Ces simulations numériques ne sont pas possibles sur tous les logiciels commerciaux puisqu'il faut pouvoir utiliser des tenseurs constitutifs chiraux. Il semblerait que COMSOL puisse être adapté à cette fin [75], mais n'ayant pas accès à ce logiciel je n'ai pas exploré cette voie. Par ailleurs, des codes faits maison existent désormais à l'Institut Fresnel (au sein de la collaboration via l'ANR Chiroptmol) par Jayeeta Amboli, Nicolas Bonod, Guillaume Demesy et Brian Stout. Un tel code peut aussi permettre une optimisation numérique sur la forme géométrique des résonateurs afin d'augmenter fortement la densité locale de chiralité au voisinage des résonateurs.

Chapitre 6 : Un μ -polarimètre de Mueller pour cartographier polarimétriquement et spectroscopiquement

Afin de caractériser la conformation d'espèces biologiques en surface, l'accès à la matrice de Mueller est utile pour accéder aux différents modes de résonances. Les travaux présentés dans les Chapitres précédents sont axés sur des expériences menées à l'aide de l'ellipsométrie généralisée. L'utilisation d'une cellule liquide a permis de suivre *in-situ* les propriétés polarimétriques de métasurfaces modifiées par des peptides antimicrobiens. Cependant, cette méthode de détection ne permettait pas de détecter différents angles d'incidence. Dans ce cadre, l'utilisation d'un autre instrument permettant de mesurer la matrice de Mueller d'un échantillon a été étudié. Afin de mesurer une matrice de Mueller, le principe général est de générer différents états de polarisation *via* un PSG (Polarisation State Generator) puis de les analyser après le passage de la lumière en transmission ou bien en réflexion d'un échantillon *via* un PSA (Polarisation State Analyser), comme montré sur la Figure 81 (a).

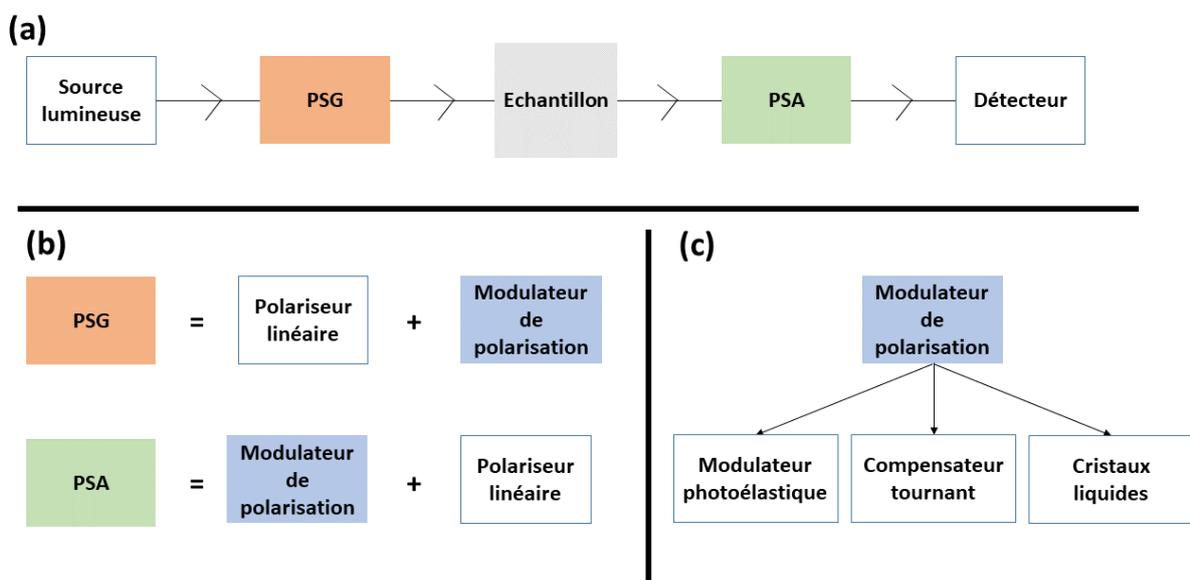


Figure 81 : (a) Schéma de principe d'un polarimètre en transmission; (b) principe simplifié d'un PSG (Polarisation State Generator) et d'un PSA (Polarisation State Analyser) et (c) les trois choix principaux pour moduler la polarisation.

Si tous les états de polarisation de la lumière sont générés et analysés, il est possible d'obtenir la matrice de Mueller de l'échantillon (le formalisme de Mueller a été détaillé dans le Chapitre 2). Pour ceci, il faut que le PSG et le PSA comprennent un polariseur linéaire et un modulateur de retard, Figure 81 (b), c'est-à-dire que le polarimètre est « complet » : on génère 16 états de polarisations que l'on analyse en sortie pour connaître les 16 éléments de la matrice. Cependant, il n'est pas forcément nécessaire d'obtenir toute la matrice et donc de faire de la polarimétrie généralisée pour caractériser des biomolécules en surface. Il est possible, par exemple, d'utiliser un PSG qui module la polarisation et un PSA qui se résout uniquement à de la détection (ou bien l'inverse).

Pour moduler la polarisation, il y a trois orientations principales montrées sur la Figure 81 (c), à savoir un modulateur photoélastique qui permet d'exercer un retard sur l'onde lumineuse grâce à une contrainte mécanique (contrôlable *via* la piézoélectricité), un compensateur tournant qui est une lame quart d'onde que l'on positionne à différentes positions en rotation continue ou non ou bien un modulateur à cristaux liquides.

Il est ici présenté un μ -polarimètre de Mueller basé sur le principe de la rotation continue de deux compensateurs tournants. Ce choix est motivé par le faible coût de cette technique ainsi que par la gamme spectrale accessible qui est plus étendue que pour les autres techniques.

Afin d'étudier les différents angles d'incidence, il convient d'observer le plan de Fourier de l'échantillon. Ceci a commencé à être réalisé en réflexion mais le travail est à continuer. Pour preuve de concept et avec une application à la détection d'objets contrefaits, un μ -polarimètre de Mueller en transmission a été construit. Ce montage a donné lieu à une publication scientifique [65] qui est recopiée en Annexe 6. Ceci permet de valider la caractérisation spectroscopique.

Partie 1. Construction d'un μ -polarimètre de Mueller en transmission

1. Principe général théorique pour la détermination de la matrice de Mueller d'un échantillon

Le choix s'est porté sur un montage inspiré des travaux d'Arteaga & al. [103] en 2014. Ce montage est présenté Figure 82 (a) avec le schéma et Figure 82 (b) la photographie du montage avec le laser d'alignement qui traverse les différents éléments optiques.

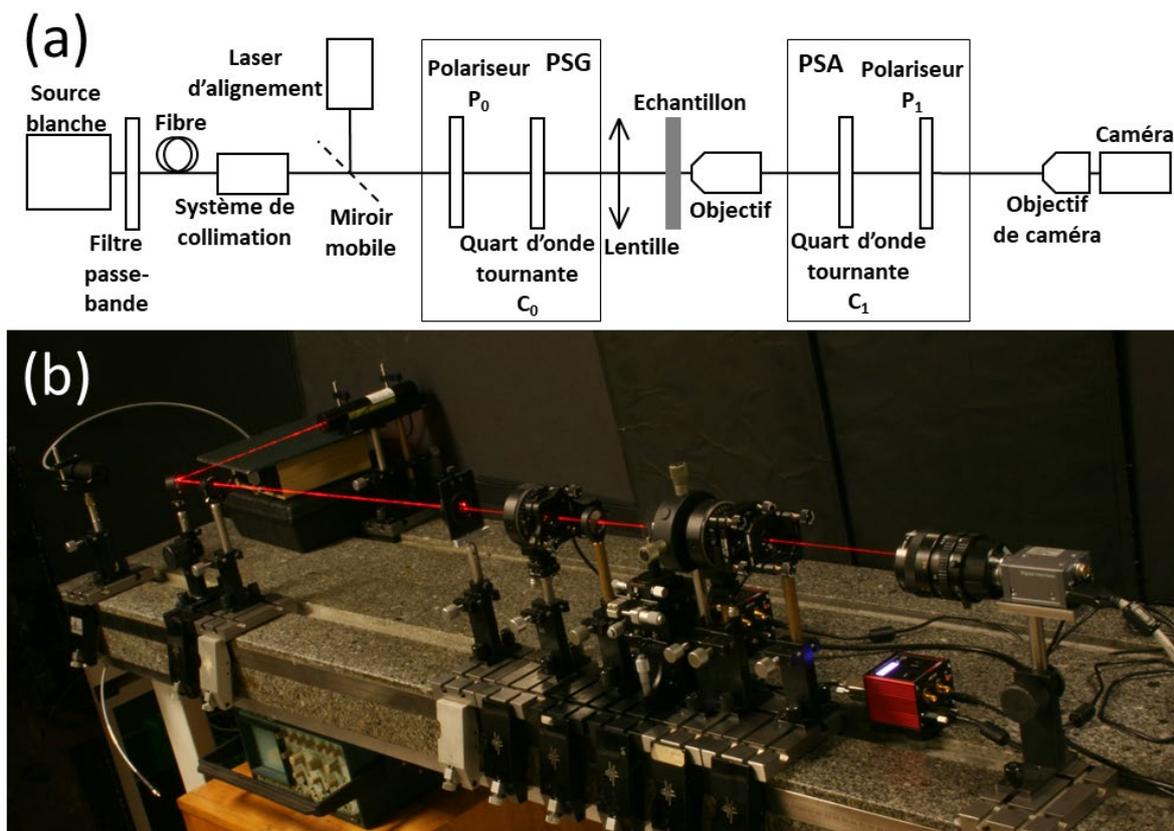


Figure 82 : (a) Schéma et (b) photographie du montage optique.

Pour chaque pixel de la caméra, il est possible de mesurer l'intensité lumineuse. Cette intensité correspond à la première composante du vecteur de Stokes $S_{cam}(t)$. Ce vecteur est fonction du temps de par la rotation des compensateurs C_0 et C_1 (ie lames quart d'onde).

$S_{cam}(t)$ est fonction du vecteur de Stokes de la lumière incidente S_{inc} ainsi que des différentes matrices de Mueller des éléments optiques du montage (51) :

- P_0 : polariseur linéaire du PSG orienté selon l'angle α_0
- P_1 : polariseur linéaire du PSA orienté selon l'angle α_1
- C_0 le compensateur du PSG qui tourne à une vitesse angulaire ω_0 , avec une phase à l'origine ϕ_0 et un retard δ_0
- C_1 le compensateur du PSG qui tourne à une vitesse angulaire ω_1 , avec une phase à l'origine ϕ_1 et un retard δ_1
- M_{obj} : l'objectif de microscope
- M : l'échantillon
- M_l : la lentille avant l'échantillon

$$S_{cam}(t) = P_1(\alpha_1)C_1(\omega_1 t + \Phi_1, \delta_1)M_{obj}MM_lC_0(\omega_0 t + \Phi_0, \delta_0)P_0(\alpha_0)S_{inc} \quad (51)$$

Pour plus de clarté, définissons $M_{mes} = M_{obj} M M_l$ qui est la quantité à mesurer puis à corriger en connaissant M_{obj} et M_l .

Lorsque la lumière incidente est non polarisée, elle possède un vecteur de Stokes $S_{inc}=(1,0,0,0)$ et l'intensité mesurée par la caméra $I(t)$ correspond à la première composante du vecteur de Stokes $S_{cam}(t)$. Il vient alors la relation de l'équation (52) entre l'intensité lumineuse mesurée, les différents paramètres du système, le temps et la matrice de Mueller M_{mes} .

$$I(t) = f(\omega_0, \omega_1, \Phi_0, \Phi_1, \delta_0, \delta_1, \alpha_0, \alpha_1, t)M_{mes} \quad (52)$$

La fonction f correspond à l'équation 4 de l'article d'Arteaga & al. [103]. En utilisant une approche présentée pour la première fois par Ichimoto & al. en 2006 [162].

En considérant un vecteur A contenant les seize éléments de la matrice de Mueller, l'équation (52) peut être réécrite suivant la relation suivante, où B est l'équivalent vectoriel de la fonction f :

$$I(t) = B^T(t)A \quad (53)$$

Le temps peut alors être considéré comme une dimension supplémentaire dans le calcul matriciel. Si l'on considère N le nombre de mesures dans l'espace temporel, I devient alors un vecteur $N \times 1$, B une matrice $16 \times N$ et A toujours un vecteur 16×1 . On a alors l'équation (54) :

$$I = B^T A \quad (54)$$

Il vient en multipliant de part et d'autre par B :

$$BI = BB^T A \quad (55)$$

Et on en déduit la relation finale en nommant $K=(BB^T)^{-1}$:

$$A = KBI \quad (56)$$

Le calcul de l'équation (56) permet d'obtenir chaque élément de la matrice de Mueller et il doit être réalisé pour chaque pixel de la caméra. Cependant, B (et donc K) est indépendant du pixel considéré donc KB doit être calculé une seule fois en considérant que les propriétés des compensateurs et polariseurs sont uniformes sur la surface de l'échantillon mesuré.

Pour déterminer KB , une étape de calibration est nécessaire. Pour ceci, une mesure en trace directe sans lentille, échantillon ou objectif donc pour $M_{mes}=I_4$, la matrice identité est effectuée.

Considérons ici $\alpha_0=0^\circ$ (tous les angles sont mesurés à partir de cette référence) et $\alpha_1=90^\circ$ grâce à une procédure d'alignement utilisant la loi de Malus. En moyennant l'intensité obtenue sur tous les pixels de la caméra et en réalisant un fit entre la courbe obtenue et l'équation donnant l'intensité lumineuse en configuration de trace directe I_{TD} (57), il est possible de réaliser le fit présenté sur la Figure 83 où il est présenté sur les points bleus l'intensité détectée en fonction de l'angle de la première lame à retard. Ici la lumière est filtrée dans le rouge à 650 nm et moyenné sur les pixels de la caméra correspondants aux pixels rouge de la configuration de Bayer RGB de la caméra. Les valeurs Φ_0 et Φ_1 sont de -50.7° et -55.0° ce qui correspond à la position initiale de l'axe rapide des lames quart d'onde par rapport au polariseur P_0 . Les valeurs δ_0 et δ_1 qui sont égales respectivement à 95.3° et 92.7° correspondent aux retards des lames quart d'onde C_0 et C_1 .

$$I_{TD}(t) = I_0(1 - [\cos^2(2(\omega_0 t + \Phi_0)) + \cos(2\delta_0) \sin^2(2(\omega_0 t + \Phi_0))] * \quad (57)$$

$$[\cos^2(2(\omega_1 t + \Phi_1)) + \cos(2\delta_1) \sin^2(2(\omega_1 t + \Phi_1))] - [\cos(2(\omega_0 t + \Phi_0)) \sin(2(\omega_0 t + \Phi_0)) (1 - \cos(\delta_0))] *$$

$$[\cos(2(\omega_1 t + \Phi_1)) \sin(2(\omega_1 t + \Phi_1)) (1 - \cos(\delta_1))] + \sin(\delta_0) \sin(\delta_1) \sin(2(\omega_0 t + \Phi_0)) \sin(2(\omega_1 t + \Phi_1)))$$

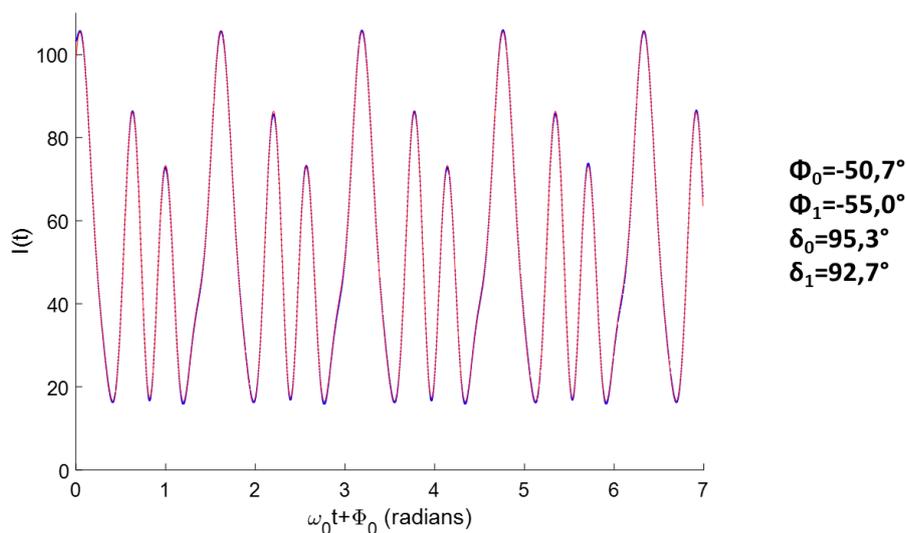


Figure 83: Intensité lumineuse détecté en configuration de trace directe pour la calibration du système, les valeurs obtenues grâce au fit sont aussi présentées (ligne rouge).

Afin de s'assurer que les valeurs de Φ_0 et Φ_1 sont les mêmes après la calibration, une synchronisation des moteurs avec la caméra est faite afin que l'acquisition des images et la position angulaire possèdent la même horloge. Cette synchronisation et l'interfaçage de toute l'expérience ont été réalisés avec Labview avec Francis Breton et Catherine Schwob. Pour réaliser une mesure, tout est coordonné depuis ce logiciel. Il est montré dans l'Annexe 4 une capture d'écran de l'interface utilisée. *Via* cette interface, il est possible d'appliquer les caractéristiques d'acquisition à savoir l'accélération et la vitesse des moteurs, la durée de l'expérience (au moins un tour de C_0), les paramètres de la caméra (configuration de Bayer, gains, taille de l'obturation, focus de l'échantillon pour obtenir une image nette...).

A titre de vérification le compensateur C_1 a été mesuré en ellipsométrie pour déterminer son retard. Le résultat est présenté sur la Figure 84. Le retard est bien différent de 90° et il varie fortement en fonction de la longueur d'onde. La détermination du retard à une longueur d'onde spécifique est cruciale. La valeur de $92,7^\circ$ correspond à la mesure réalisée en ellipsométrie dans le sens où le filtre utilisé pour la lumière rouge est centré sur 650 nm en possédant une largeur spectrale de 70 nm . De plus les pixels de la caméra filtrent également la lumière donc l'incertitude est forte sur la longueur d'onde de la lumière détectée.

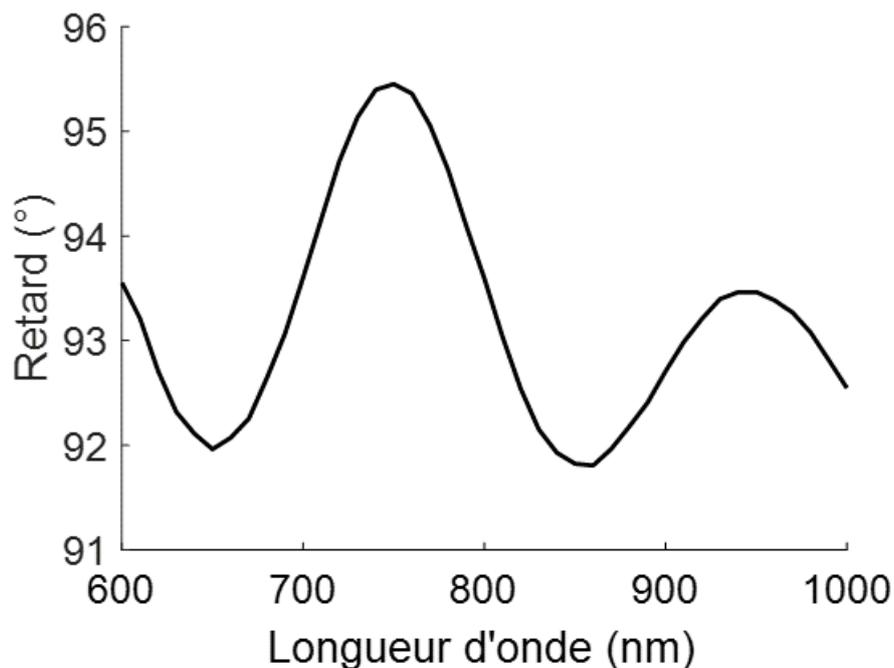


Figure 84: Retard associé au compensateur C_1 en fonction de la longueur d'onde. Mesure réalisée en ellipsométrie.

Une fois que la calibration est effectuée, il est possible de mesurer la matrice de Mueller d'un échantillon en utilisant l'équation (56) grâce à la connaissance de KB. En ne positionnant aucun échantillon M, il est possible de déterminer la matrice de Mueller du couple lentille/objectif permettant l'imagerie : $M_{obj} * M_l$. Cette matrice est montrée sur la Figure 85 (a) ou une moyenne de cinq matrices de Mueller mesurées à 650 nm est montrée. Cette mesure permet également d'observer la dispersion des valeurs sur la surface imagée. Après cinq mesures, la déviation standard sur la surface est de $5 * 10^{-3}$ pour chacun des éléments de la matrice. Ensuite, il convient de mesurer M_{mes} et d'en déduire M. Afin de corriger l'influence de $M_{obj} * M_l$, ce produit de matrice est considéré comme un retardeur avec un faible retard ce qui est confirmé expérimentalement.

Une retardance théorique a été calculée en réalisant la décomposition logarithmique déjà présentée dans le Chapitre 3 [115]–[117], [130]. La retardance δ est calculée telle que (avec les notations du Chapitre 3 pour LB et LB') :

$$\delta = i\sqrt{-LB^2 - LB'^2} \quad (58)$$

La retardance moyenne est de -1.03° comme montré sur la Figure 85 (b). Ceci valide la modèle du faible retardeur pour le système d'imagerie.

Il est possible d'obtenir un résultat équivalent en faisant correspondre la mesure obtenue pour le système d'imagerie et un retardeur pur $M_{\delta,\theta,T}$ qui possède la matrice de Mueller présenté sur l'équation (59), où T est la transmission, δ la retardance et θ l'orientation de l'axe du retardeur :

$$M_{\delta,\theta,T} = \begin{bmatrix} T & 0 & 0 & 0 \\ 0 & T(\cos^2(2\theta) + \cos(\delta)\sin^2(2\theta)) & \cos(2\theta)\sin(2\theta)(1 - \cos(\delta)) & -\sin(2\theta)\sin(\delta) \\ 0 & \cos(2\theta)\sin(2\theta)(1 - \cos(\delta)) & T(\sin^2(2\theta) + \cos(\delta)\cos^2(2\theta)) & \cos(2\theta)\sin(\delta) \\ 0 & \sin(2\theta)\sin(\delta) & -\cos(2\theta)\sin(\delta) & T\cos(\delta) \end{bmatrix} \quad (59)$$

Avec ce fit, la transmission moyenne T vaut 1, l'orientation θ vaut $5^\circ (\pm 2.5^\circ)$ et la retardance moyenne vaut -1.04° ce qui concorde avec la décomposition logarithmique.

En outre, la polarisance P de la matrice associée à l'objectif a été calculée telle que :

$$P = \sqrt{\frac{MM_{12}^2 + MM_{13}^2 + MM_{14}^2}{MM_{11}^2}} \quad (60)$$

La polarisance moyenne \bar{P} est de 0.015 (Figure 85 (c)) ce qui est compatible avec l'hypothèse d'un comportement de retardeur pur pour l'objectif de microscope.

Finalement, la dépolarisation de la matrice peut être déterminé grâce à la détermination de la matrice de covariance V (matrice 3x3) associée à la décomposition logarithmique :

$$D = \frac{\text{Re}(V_{11} + V_{22} + V_{33})}{3} \quad (61)$$

La dépolarisation moyenne est de 0.047 ce qui confirme l'hypothèse d'un comportement de retardeur pur pour l'objectif de microscope. En effet un dépolariseur parfait pourrait aussi conduire à une polarisance nulle mais avec une dépolarisation de 100 %.

Finalement, il est possible de considérer que de M_{obj} et M_I commutent avec M. Par conséquent le calcul de M final est le suivant si l'on connaît M_{mes} et $M_{\text{obj}}*M_I$:

$$M = (M_{\text{obj}}M_I)^{-1}M_{\text{mes}} \quad (62)$$

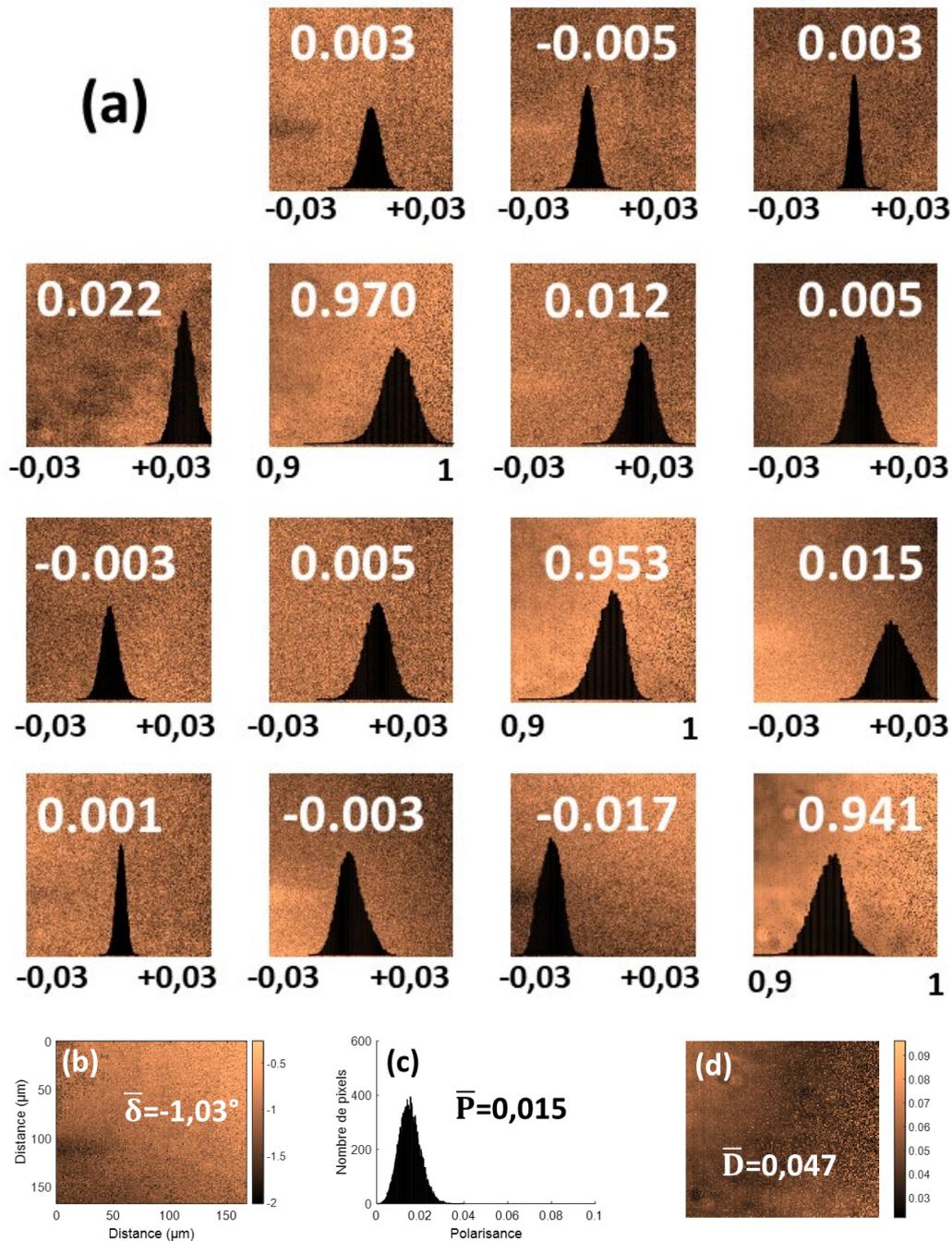


Figure 85: (a) Matrice de Mueller du couple lentille/objectif $M_{\text{obj}} * M_{\text{l}}$ (valeurs moyennes en blanc), un élément correspond à une surface de $160 \times 160 \mu\text{m}^2$, les histogrammes insérés présentent la dispersion des données sur tous les pixels, (b) une retardance théorique est calculée pour chaque pixel ($\bar{\delta}$ est la retardance moyenne), (c) la polarisation P est calculée pour chaque pixel (\bar{P} est la polarisation moyenne) et (d) la dépolariation D est calculée pour chaque pixel (\bar{D} est la dépolariation moyenne).

La méthode pour déterminer la matrice d'un échantillon a été démontrée. Un tour complet du compensateur le plus lent permet de mesurer la matrice de Mueller d'un échantillon après une calibration et une correction par la matrice de Mueller du système d'imagerie. Il convient maintenant d'étudier les caractéristiques expérimentales du montage c'est-à-dire les

éléments optiques considérés, les spécificités de l’alignement ainsi que les erreurs et incertitudes associées au montage.

2. Caractéristiques expérimentales du montage

c) Eléments optiques et alignement

Les différents éléments utilisés pour réaliser ce montage sont les suivants :

- Une source blanche stabilisée à large spectre stabilisée couplée à une fibre : Thorlabs-SLS201/M
- Des filtres Corion passe-bande (largeur de 70 nm) pour les mesures monochromatiques et un filtre optique pour les mesures en lumière blanche (Heat Abs Glass KG-5, Edmunds Optics)
- Deux polariseurs linéaires : PGT-S1V Glan-Taylor et WP25M-UB Thorlabs
- Deux lames quart d’onde super-achromatiques montées : SAQWP05M-700
- Les lames sont montées sur des montures cinématiques avec tilts et translations (KC1-S/M, Thorlabs)
- Deux structures et moteurs permettant la rotation de C_0 et C_1 : PRM1Z8 Thorlabs et KDC101 K-Cube Brushed DC Servo Motor Controller Thorlabs
- Une lentille convergente : $f=75$ mm
- Un objectif de microscope conjugué à l’infini : Olympus, UMPlanFI 20x / NA=0.46
- Une caméra Sony XCD-SX90CR, 30 images par secondes
- Un objectif de caméra avec une distance focale de 69 mm

Le polariseur et l’analyseur ont été positionnés selon les angles $\alpha_0=0^\circ$ et $\alpha_1=90^\circ$ en utilisant la loi de Malus. Les lames quart d’onde tournent aux vitesses $\omega_0=4^\circ.s^{-1}$ et $\omega_1=20^\circ.s^{-1}$. Ces valeurs ont été choisies pour avoir un ratio $\frac{\omega_1}{\omega_0} = 5$. Ceci permettant l’inversion de la matrice BB^T , ce ratio est déterminé grâce à plusieurs études précédentes et permettent de générer suffisamment de fréquences dans le signal pour pouvoir déterminer indépendamment les 16 éléments de la matrice de Mueller [65], [103], [117], [163]–[165].

Lors de la mise en place de l’expérience, l’alignement des compensateurs tournants est un moment critique à cause de leur caractère mobile. La procédure d’alignement choisie est une procédure dichotomique. Un schéma présentant cet alignement est présenté en Annexe 4.

d) Erreurs et incertitudes du montage

Avant de présenter les résultats associés à ce montage, il convient de présenter brièvement les erreurs systématiques qui proviennent du caractère non-idéal des différents éléments optiques, les incertitudes provenant de la calibration et les incertitudes causés par la procédure d’alignement.

En réalisant un fit sur la courbe de calibration présentée Figure 83 en insérant l’influence de l’angle α_1 dans l’équation (57), on trouve $\alpha_1=90\pm 10^{-2}^\circ$. Les valeurs δ_0 et δ_1 des compensateurs sont en accord avec les valeurs trouvées en ellipsométrie présentées Figure 84 pour δ_0 . En outre, une erreur systématique sur les positions de C_0 et C_1 existe : C_1 tourne à $20^\circ.s^{-1}$ tandis que la fréquence d’images de la caméra est de $30s^{-1}$. Ceci induit une incertitude systématique de 0.67° sur la position de cet élément tournant. La propagation des erreurs a déjà été étudié

dans la littérature [103], [104], [106], [166]. Avec une approximation du premier ordre, les erreurs systématiques du montage induisent une incertitude pour les éléments de la matrice de Mueller de ± 0.02 sauf pour MM_{23} et MM_{32} qui sont plus sensibles aux erreurs (± 0.05). Pour réduire l'influence du bruit aléatoire, plusieurs mesures consécutives peuvent être réalisées. Comme montré sur la Figure 85 (a) pour le couple $M_{obj} * M_l$, la déviation standard pour les éléments est de $5 * 10^{-3}$.

La principale critique souvent apporté sur ce type de polarimètre utilisant des compensateurs tournants est la précession de ces dits compensateurs. Les lames quart d'onde fournies par le constructeur ne sont pas à faces parfaitement parallèles ce qui résulte en une déviation du faisceau lumineux. Le constructeur donne une déviation maximale du faisceau de $5 * 10^{-2}$ °. En réalité, la déviation du faisceau induite par une lame quart d'onde a été mesuré expérimentalement et est égale à $5 * 10^{-3}$ °. Ceci est bien inférieur à l'angle d'acceptance de l'analyseur (20 °) ce qui assure que l'intensité détectée sur la caméra permet d'extraire les éléments de la matrice. L'analyseur est positionné à 30cm de l'objectif de caméra qui possède une distance focale de 69mm. Ceci implique un déplacement du faisceau d'environ $6 \mu\text{m}$ sur le détecteur CCD de la caméra pendant un tour de C_0 . Un pixel de la caméra a une taille de $3.75 \times 3.75 \mu\text{m}^2$ dans une configuration de Bayer. Pour l'imagerie colorimétrique utilisé dans le cadre de ce travail un pixel sur quatre est utilisé pour analyser l'intensité lumineuse donc deux sous pixels sont séparés d'une distance de $7.5 \mu\text{m}$. Le déplacement attendu est donc d'environ un pixel. L'influence de ce déplacement est illustrée sur la Figure 86 avec (a) une image en transmission qui ne comprend pas les défauts de précession et (b) l'élément MM_{43} de la matrice de Mueller à 650 nm. Cette métasurface composée de résonateurs en U en or a déjà été présenté dans la littérature en 2018 [100]. Les détails sont toujours résolus malgré le déplacement du faisceau induit par la précession des compensateurs. L'ordre de grandeur de 1 sous pixel de $7.5 \mu\text{m}^2$ d'incertitude semble raisonnable.

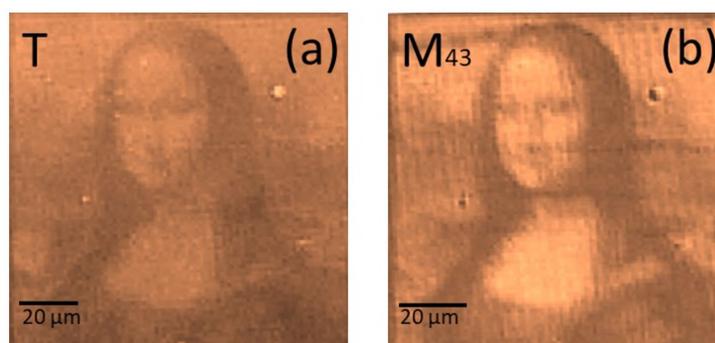


Figure 86 : Image d'une métasurface contenant la reproduction de la Joconde en (a) imagerie directe (Présentation de la transmission T) et (b) l'élément MM_{43} de la matrice de Mueller à 650 nm.

Afin de réduire l'erreur induite par la déviation du faisceau, une correction de la position de l'image au cours du temps en détectant les contrastes a été réalisé. Cependant, ici, la résolution est inférieure (ou en tout cas du même ordre de grandeur) au pixel de détection. Cette correction s'est avérée inutile. Pour une mesure qui demanderait une précision plus grande avec des pixels plus petits, un traitement informatique afin de stabiliser l'image serait une solution adéquate.

Partie 2. Résultats sur le montage en transmission

1. Validation de la mesure spectroscopique avec un exemple d'application à la colorimétrie : Reconstruction des couleurs grâce aux propriétés polarimétriques et aux propriétés de la caméra

L'ingénierie associée à la construction d'un μ -polarimètre en transmission permet la mesure de la mesure de Mueller et donc les propriétés polarimétriques d'échantillons. Dans le cadre des recherches présentées dans cette thèse, ceci permet d'observer l'influence du greffage de biomolécules sur des métasurfaces et potentiellement d'accéder à des informations sur leur conformation. Cependant, les matrices de Mueller font partie d'autres domaines d'application comme la colorimétrie. Plus particulièrement, en anti contrefaçon, il est intéressant de construire des surfaces difficiles à élaborer mais faciles à détecter. Des nano-antennes ont déjà été étudiées pour construire des étiquettes anti-contrefaçons [167], [168]. Certaines métasurfaces ont utilisé les effets polarimétriques à une longueur d'onde [100] mais il est fait possible d'encoder des métasurfaces pour exprimer conjointement des propriétés polarimétriques et spectroscopiques (donc colorimétriques). Pour évaluer cette double dépendance, des métasurfaces contenant des résonateurs en U en aluminium ont été imaginées et réalisées. En effet, en faisant varier la taille des résonateurs ainsi que le pas du réseau qui contient ces antennes, il est possible d'observer différentes couleurs [169]. L'aluminium a été choisi pour obtenir des résonances plasmoniques aussi dans le bleu. Des résonateurs possédant des tailles de $320 \times 320 \text{ nm}^2$ (Figure 87 (a)), $270 \times 270 \text{ nm}^2$ (Figure 87 (b)) et $170 \times 170 \text{ nm}^2$ (Figure 87 (c)) ont été réalisés ce qui permet d'obtenir des résonances plasmoniques dans le rouge, le vert et le bleu. Quatre pas du réseau ont été testés en l'occurrence 350 nm, 400 nm, 450 nm et 500 nm. L'épaisseur de ces résonateurs est de 40 nm. Pour chaque combinaison (douze au total), une aire de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ a été réalisée.

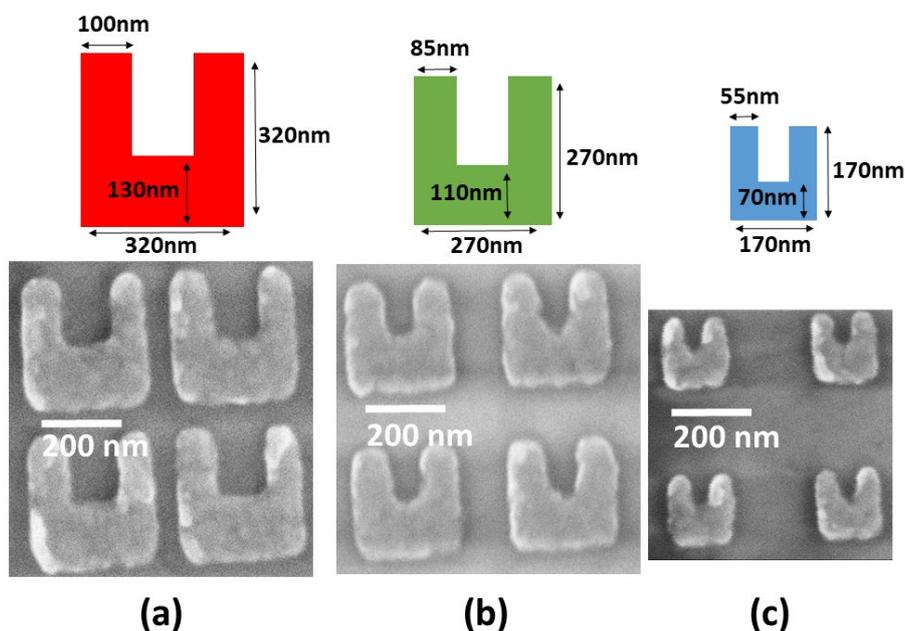


Figure 87 : Images réalisées au MEB de résonateurs en U en aluminium pour un pas de réseau de 400 nm pour différentes tailles en l'occurrence (a) $320 \times 320 \text{ nm}^2$ (b) $270 \times 270 \text{ nm}^2$ et (c) $170 \times 170 \text{ nm}^2$.

L'observation de ces différents patches au microscope optique (Olympus BX61) selon deux polarisations distinctes permet de rendre compte des différentes couleurs que l'on peut obtenir. Ces couleurs sont représentés sur la Figure 88 (a) pour une polarisation parallèle aux bras du U que l'on appellera verticale et sur la Figure 88 (b) pour une polarisation perpendiculaire aux bras du U que l'on appellera horizontale. Différentes couleurs sont obtenues pour différentes tailles de U et différents pas du réseau. Les couleurs vont du rouge vers le bleu en passant par le jaune et le vert, une grande partie du spectre visible est ici représenté.

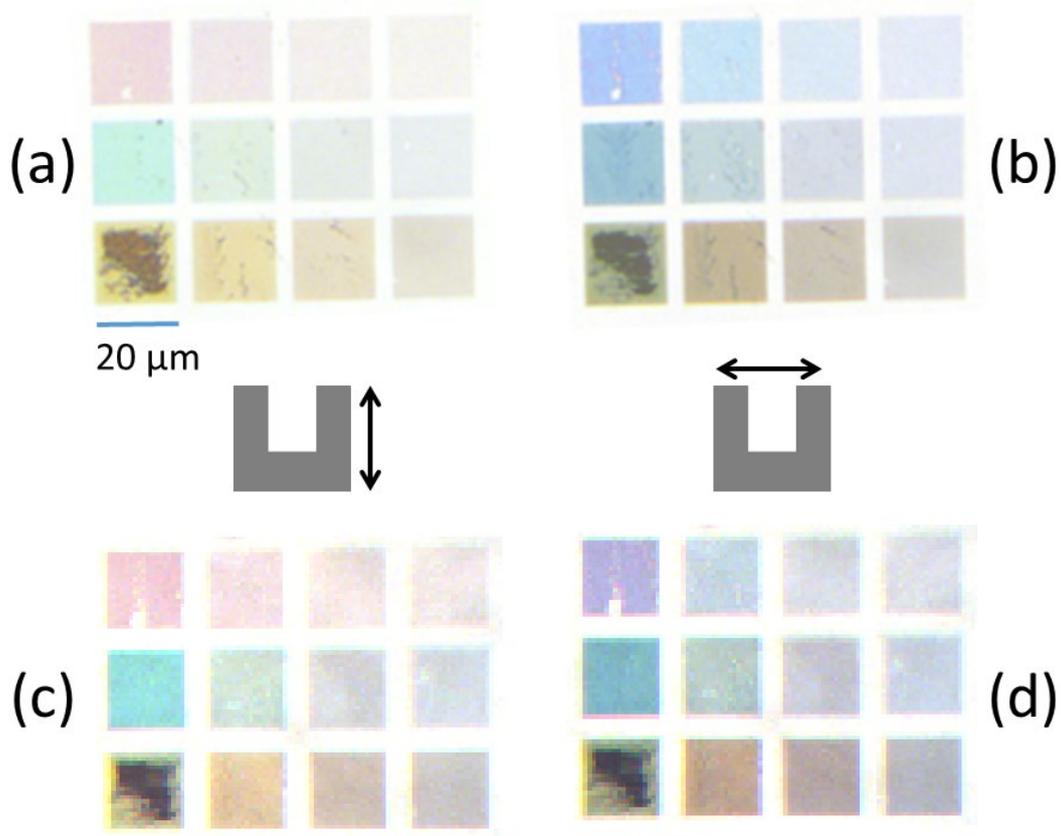


Figure 88 : Observation au microscope optique des différents patches réalisés selon deux états de polarisation incidente respectivement (a) verticale et (b) horizontale. Recombinaison RGB des paramètres de Stokes sortant après la mesure d'une unique matrice de Mueller pour, toujours, deux polarisations incidente respectivement (c) verticale et (d) horizontale.

La mesure de la matrice de Mueller associée à ces différents patches permet de reconstruire ces couleurs en réalisant une seule mesure. Il est possible de reconstruire les couleurs pour toute polarisation incidente. Pour réaliser ceci, il convient de mesurer la matrice en illuminant l'échantillon en lumière blanche et d'utiliser les propriétés de la caméra pour laquelle chaque pixel est en fait divisé en sous-pixels arrangés en configuration de Bayer. Cette configuration ainsi que la réponse spectrale associée à chacun de ces filtres sont présentés sur la Figure 89. Les sous-pixels sont équipés de filtres passe-bande. Chaque sous-pixel peut être traité séparément afin d'obtenir une réponse spectroscopique personnalisée. Une seule illumination avec de la lumière blanche rend possible la mesure à trois longueurs d'onde

distinctes. L'utilisation d'un *heat-filter* permet de réduire l'influence du filtre bleu dans la partie proche infrarouge.

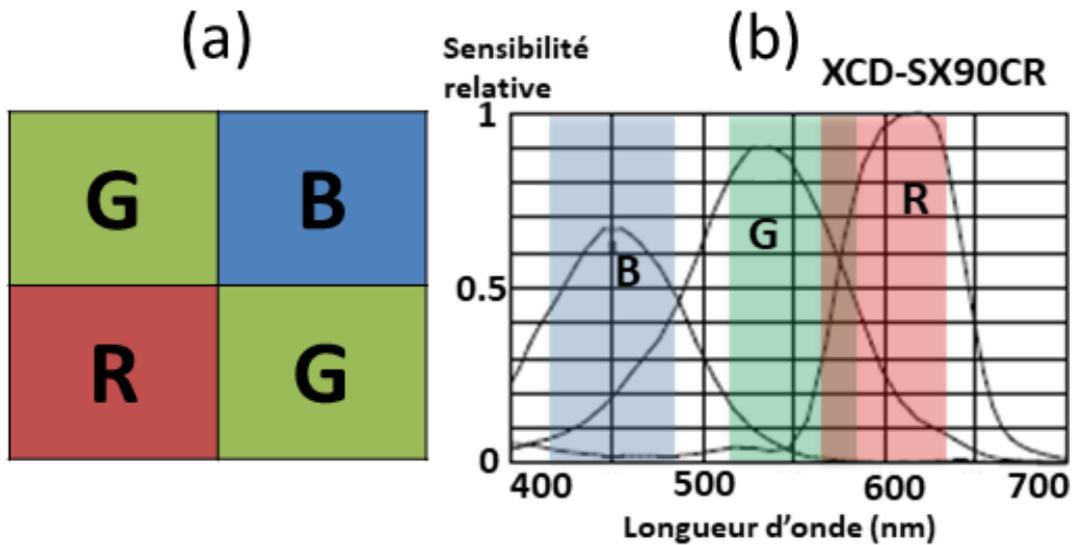


Figure 89 : (a) Configuration de bayer de la caméra et (b) les caractéristiques de sensibilité associée à chaque sous pixel (données constructeur). Les bandes colorées correspondent aux gammes spectrales des filtres Corion utilisés ici.

Les réponses spectrales de chaque filtre s'entrelacent de par leur large bande, une diaphonie (*crosstalk*) est attendue. La Figure 90 présente la dépendance temporelle des intensités enregistrées pour chaque sous pixel (moyenne de tous les sous pixels illuminés correspondants à la même couleur) pour une lumière incidente bleue (filtre Corion centré autour de 450 nm). Clairement, l'amplitude des intensités dépend du sous pixel considéré et donc de la longueur d'onde incidente. De la diaphonie est quand même remarquable : par exemple l'intensité lumineuse observée sur le pixel vert n'est pas négligeable. Pour prendre en compte cet effet, trois mesures ont été réalisées à $\lambda_B=450$ nm, $\lambda_G=550$ nm et $\lambda_R=600$ nm (au plus proche des maximums des filtres de la caméra). Ces mesures permettent d'obtenir une matrice X 3x3 qui contient les ratios des amplitudes caractérisant la diaphonie. Cette matrice est présentée ci-dessous (équation (63)) avec les valeurs mesurées expérimentalement. Le formalisme utilisé ici est $I_{\text{sous-pixel}}^{\text{source}}$.

$$X = \begin{bmatrix} 1 & \frac{I_R^{\lambda_G}}{I_G^{\lambda_G}} & \frac{I_R^{\lambda_B}}{I_B^{\lambda_B}} \\ \frac{I_G^{\lambda_R}}{I_R^{\lambda_R}} & 1 & \frac{I_G^{\lambda_B}}{I_B^{\lambda_B}} \\ \frac{I_B^{\lambda_R}}{I_R^{\lambda_R}} & \frac{I_B^{\lambda_G}}{I_G^{\lambda_G}} & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0.24 & 0.03 \\ 0.09 & 1 & 0.19 \\ 0.01 & 0.07 & 1 \end{bmatrix} \quad (63)$$

Pour déterminer les trois matrices de Mueller associées à chaque couleur, il faut déterminer une intensité idéale $I_{\text{idéale}}$: l'équation (64) présente cette intensité idéale (Σ correspond à la lumière blanche). L'équation (65), elle, montre la méthode de calcul pour la déterminer à partir de l'intensité mesurée $I_{\text{mesurée}}$ dans chaque sous pixel et de la matrice de diaphonie X.

$$I_{\text{mesurée}} = \begin{bmatrix} I_{\Sigma}^R \\ I_{\Sigma}^G \\ I_{\Sigma}^B \end{bmatrix} = X \begin{bmatrix} I_R^{\lambda_R} \\ I_G^{\lambda_G} \\ I_B^{\lambda_B} \end{bmatrix} = X I_{\text{idéale}} \quad (64)$$

$$I_{\text{idéale}} = X^{-1} \begin{bmatrix} I_{\Sigma}^R \\ I_{\Sigma}^G \\ I_{\Sigma}^B \end{bmatrix} \quad (65)$$

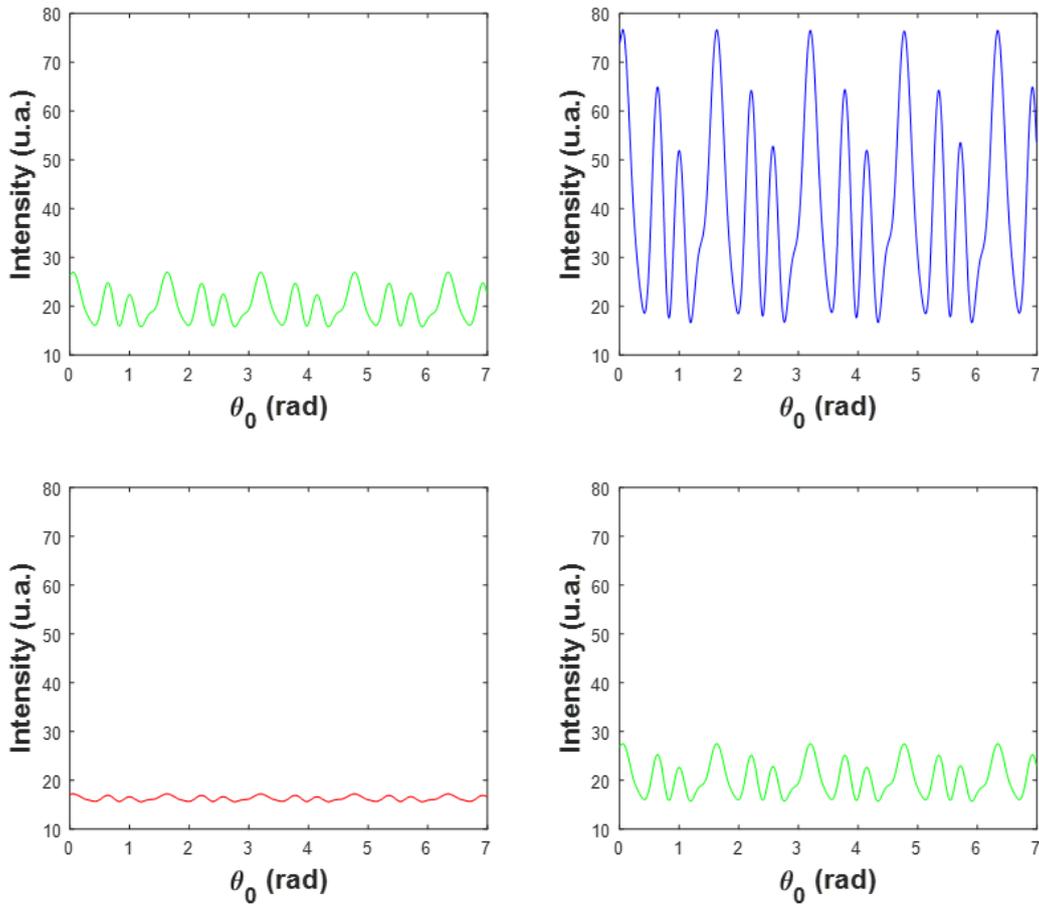


Figure 90 : Intensité moyenne pour les sous-pixels associés à la configuration de Bayer pour une lumière incidente bleue (filtre Corion centré autour de 450 nm).

A partir de cette intensité idéale, il est possible de déterminer trois matrices de Mueller pour chaque couleur : M_R , M_G et M_B . Pour chacune de ces matrices, le calcul utilisé est celui présenté précédemment avec bien sûr une correction par la matrice du système d'imagerie déterminée préalablement pour chaque couleur. Ces matrices sont observables sur la Figure 91 avec les images de transmission associées. On remarque qu'autour des patches, là où le verre est présent, on retrouve la matrice identité à part pour les éléments MM_{12}/MM_{21} et MM_{13}/MM_{31} associés à la mesure dans le bleu pour laquelle ces éléments ne sont pas nuls. Les symétries attendues pour la matrice sont également présentes. Par exemple, pour la matrice M_R (Figure 91 (c)), les égalités $MM_{12}=MM_{21}$ et $MM_{34}=-MM_{43}$ sont directement identifiables.

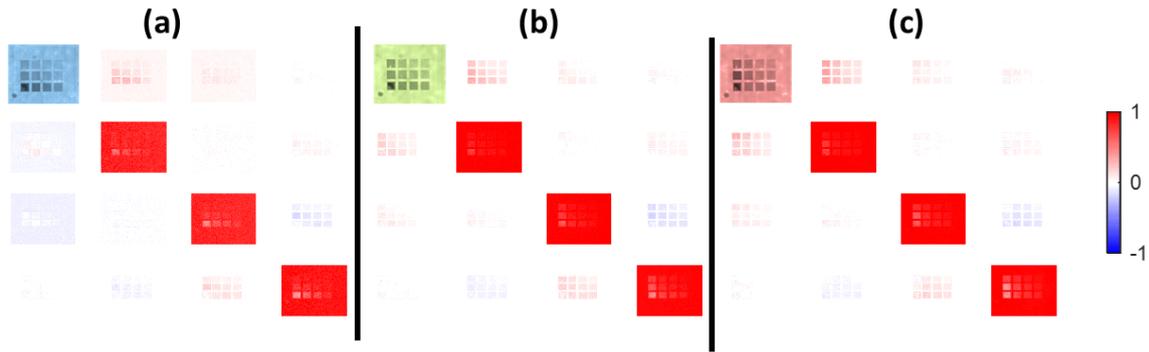


Figure 91 : Matrices de Mueller associées aux trois couleurs mesurées : (a) M_B (bleu), (b) M_G (vert) et (c) M_R (rouge). Les images correspondant à la transmission sont présentées en lieu et place de M_{11} pour chaque couleur.

Pour reconstruire les couleurs associées à différentes polarisations, il convient alors de multiplier chacune de ces matrices par un vecteur de Stokes choisi $S_{incident}$, qui reproduit la polarisation incidente souhaitée, afin d'obtenir un vecteur de Stokes $S_{sortant}$ en utilisant l'équation (66).

$$\begin{aligned}
 S_{sortant}^{\lambda_R} &= M_R S_{incident} \\
 S_{sortant}^{\lambda_G} &= M_G S_{incident} \\
 S_{sortant}^{\lambda_B} &= M_B S_{incident}
 \end{aligned} \tag{66}$$

Enfin, en associant les intensités contenues dans $S_{sortant}$ puis en reproduisant la configuration de Bayer, on peut reconstruire les couleurs pour l'intensité totale mais aussi pour tout polarisation sortante en utilisant les propriétés du vecteur de Stokes.

Ce calcul a été appliqué à la métasurface en aluminium. En multipliant les matrices M_R , M_G et M_B par $S_H=(1,-1,0,0)$ et $S_V=(1,1,0,0)$ puis en recombinaison les intensités totales des vecteurs de Stokes obtenus $I_{sortant}$, une couleur est obtenue pour chaque pixel. Enfin, une normalisation est appliquée (en considérant que le verre entourant les patchs est blanc) pour obtenir une intensité finale I_f pour chaque pixel qui est fonction de l'intensité $I_{0,verre}$ (correspondant à I_0 de l'équation (57)) moyennée sur une partie du verre :

$$I_f = 255 \frac{I_{sortant}}{\langle I_{0,verre} \rangle} \tag{67}$$

Les couleurs obtenues sont présentées sur la Figure 88 ((c) et (d)) afin de comparer le résultat avec la mesure résultat au microscope optique. Qualitativement, les couleurs sont en très bon accord ce qui valide la méthode utilisée pour extraire des couleurs polarimétriques à l'échelle micrométrique.

Quantitativement, il est possible de représenter les couleurs obtenues pour chaque polarisation (horizontale ou verticale), patch (douze) et méthode (microscope optique ou μ -polarimètre) dans un gamut CIE comme sur la Figure 92 (a) : une moyenne des couleurs obtenues pour chaque patch a été réalisée. La plupart des points semblent concorder à part quelques patches qui correspondent en fait à la ligne du bas de l'échantillon utilisée pour laquelle, le lift-off n'a pas été idéal. Pour quantifier les écarts, une conversion des données sRGB dans l'espace Lab CIE 1976 permet de déterminer une grandeur $\Delta E =$

$\sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$ (ou L, a et b sont les coordonnées de l'espace Lab) [170]. Les valeurs obtenues sont présentées sur le Tableau 18 pour la polarisation horizontale et sur le Tableau 19 pour la polarisation verticale. On observe directement que les patches présents sur la ligne du bas ont un ΔE très important. Sinon, pour les deux lignes supérieures, les valeurs sont toutes inférieures à 10. La valeur de 2.3 correspondant à une limite de différence perceptible au premier coup d'œil c'est-à-dire que si $\Delta E < 2.3$, il faut se concentrer pour différencier deux couleurs alors que quand $\Delta E > 2.3$ la différenciation se fait au premier coup d'œil.

Tableau 18 : ΔE entre les deux expériences pour la polarisation horizontale.

6.5	0.8	2.2	1.1
1.2	1.9	3.1	0.6
28.3	20.3	13.1	10.2

Tableau 19 : ΔE entre les deux expériences pour la polarisation verticale.

9.9	3.5	3.9	6.1
8.6	4.3	5.3	5.4
42.7	23.2	15.8	11.2

Ces valeurs de ΔE ainsi que la limite de 2.3 sont tracées sur la Figure 92 (b) afin d'observer la dispersion des données. A part pour les patches de la ligne inférieure, les valeurs obtenues sont homogènes et le résultat semble meilleur pour la polarisation horizontale que pour la verticale.

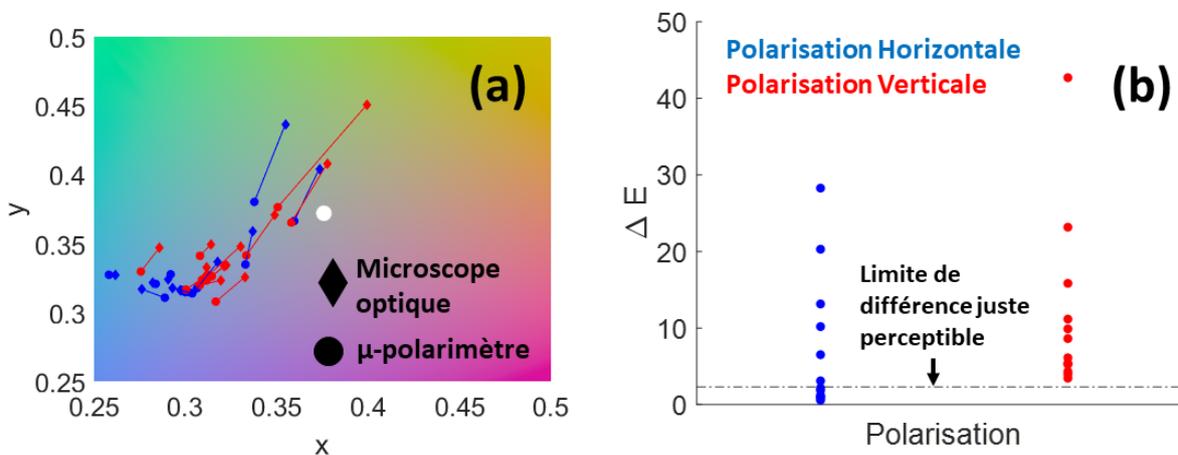


Figure 92 : (a) Position des couleurs moyennes des douze patches sur un Gamut CIE pour deux polarisation incidentes (horizontale en bleu et verticale en rouge) et deux méthodes de détection (microscope optique en losange et μ -polarimètre en cercle), les point correspondants aux mêmes caractéristiques sont reliés. (b) Distance ΔE entre les deux méthodes de détection pour chacun des patches.

L'intérêt de la procédure décrite ici est multiple. De nombreux patches anti-contrefaçons utilisent des images entrelacées dans des états de polarisation orthogonaux [171]–[173] ou bien cachées dans certains états de polarisation [100]. Le bon contraste entre les différentes images repose sur un parfait alignement des axes de polarisation avec les axes des images. Le

μ -polarimètre complet présenté ici ainsi que le traitement rapide des données permettent de trouver directement la polarisation optimale pour obtenir le meilleur contraste et donc de révéler l'image sans un alignement fastidieux pour l'utilisateur final.

Pour les applications commerciales, il existe un besoin de mesures polarimétriques. Des caméras de Stokes existent déjà pour une mesure à une longueur d'onde. Nous montrons ici que l'imagerie à plusieurs longueurs d'onde pour rendre compte de la couleur polarisée est faisable. L'utilisation de l'appareil photo des smartphones pour la lutte contre la contrefaçon peut être imaginé. Certaines publications récentes sur les métasurfaces permettent d'envisager des adaptateurs externes qui pourraient être montés sur l'appareil photo des smartphones pour permettre une imagerie de Stokes [174]. La matrice de Mueller mesurée pourrait être enregistré dans une base de données sécurisée et utilisé pour valider les mesures de Stokes.

2. Impossibilité d'observer le plan de Fourier en transmission

Afin d'observer les effets du greffage de biomolécules, une étude spectroscopique est nécessaire afin d'observer des décalages induits par la présence de biomolécules. Une alternative est d'observer la matrice de Mueller dans le plan de Fourier d'un échantillon ce qui permet d'observer l'échantillon dans l'espace angulaire et donc d'étudier dans l'espace des k la matrice de Mueller plutôt que dans l'espace des longueurs d'ondes. Ceci permet d'obtenir tous les angles d'incidence (avec la limite de l'ouverture numérique) en une seule mesure. Ceci est possible en insérant une lentille dite de « Bertrand » qui permet de passer du mode « imagerie réelle » à « imagerie de Fourier ». Le principe de base est montré sur la Figure 93 (a) ou l'activation de la lentille de Bertrand conjuguée préalablement au plan de Fourier de l'objectif permet de choisir entre les deux modes d'imagerie.

Pour réaliser ceci, il faut une ouverture numérique suffisamment grande pour observer suffisamment d'angles.

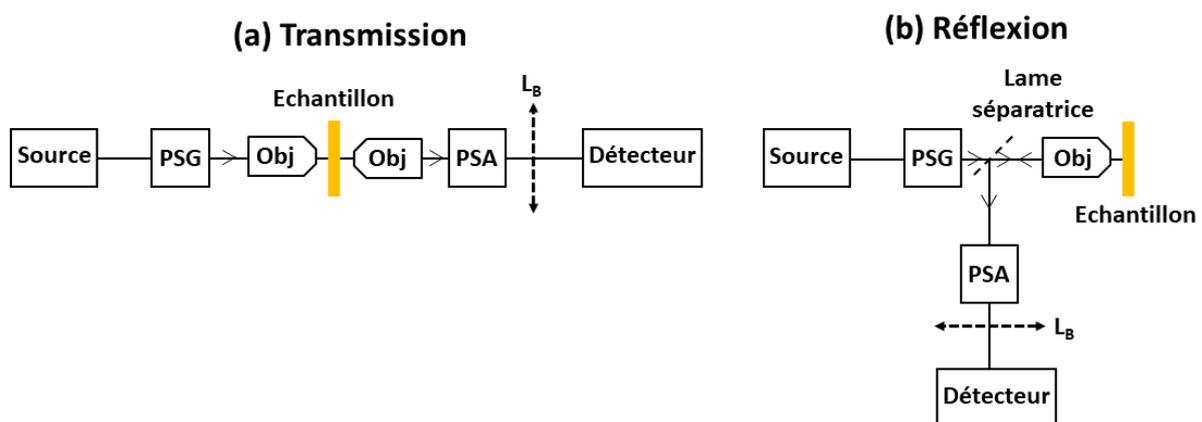


Figure 93 : Schémas de principe pour imager le plan réel ou le plan de Fourier de la matrice de Mueller d'un échantillon (a) en transmission ou (b) en réflexion.

L'utilisation d'un montage en transmission induit un problème majeur :

- Il n’y a pas assez de place pour placer un porte échantillon permettant de faire un suivi *in situ* : un problème d’encombrement stérique est présent à cause des distances de travail des objectifs de microscope qui ne permettent pas de combiner grande ouverture numérique avec grande distance de travail pour un suivi en environnement liquide.

Par contre, l’utilisation d’un montage en réflexion permettrait d’étudier le plan de Fourier et donc de réaliser des études de surfaces modifiées *in situ*. Le principe est le même qu’en transmission, le schéma de base est présenté sur la Figure 93 (b) ou l’ajout d’une lame séparatrice est la condition pour réaliser le montage en réflexion.

Partie 3. Construction d’un μ -polarimètre de Mueller en réflexion

Le μ -polarimètre en réflexion a été construit et aligné. Cependant, aucun résultat présenté la mesure de matrice de Mueller de métasurface n’a été réalisé pour l’instant. Par conséquent, le montage sera présenté brièvement avec quelques résultats intermédiaires. Enfin, les perspectives et travaux à réaliser seront détaillés.

1. Principe général pour la détermination de la matrice de Mueller d’un échantillon pour un μ -polarimètre en réflexion

Pour déterminer la matrice de Mueller dans ce type de montage, le choix s’est porté sur un système similaire à celui présenté sur la Figure 82 pour l’ellipsomètre en transmission. Le schéma et la photographie du montage sont présentés sur la Figure 94 ((a) et (b)). Les paramètres qui changent par rapport au montage en transmission sont les suivants :

- Ajout d’une lame séparatrice (Thorlabs BSW26)
- La lentille présente avant l’échantillon en transmission disparaît au profit d’un double passage à travers l’objectif de microscope
- Une lentille de Bertrand pour imager le plan de Fourier ainsi qu’un système afocal pour filtrer spatialement le plan de Fourier et donc choisir des angles d’incidence particuliers

Ces modifications font que l’équation (51) devient alors l’équation (68). Les dépendances temporelles ainsi que la dépendance aux caractéristiques des éléments polarisants ont été supprimé pour plus de clarté. Il a fallu introduire les matrices de Mueller de la lame séparatrice en transmission $M_{sep,t}$ et en réflexion $M_{sep,r}$ ainsi que l’inverse de M_{obj} .

$$S_{cam} = P_1 C_1 M_{sep,r} M_{obj} M M_{obj}^{-1} M_{sep,t} C_0 P_0 S_{inc} \quad (68)$$

Par conséquent, une mesure de calibration nécessite de déterminer la matrice de Mueller de la lame séparatrice en transmission et en réflexion. Celle-ci a en fait été mesurée sur notre ellipsomètre de table V-VASE. Lors de la procédure pour croiser P_0 et P_1 , il faut aligner les axes des polariseurs de façon à ce qu’ils soient soit suivant la polarisation p soit s de la lame séparatrice. Il faut noter que la lame séparatrice n’est pas à faces parallèles pour éviter les réflexions multiples. J’ai choisi d’avoir le bras analyseur de polarisation à 90° du bras

générateur de polarisation pour faciliter les étapes d'alignement des éléments optiques en mettant un miroir à 45° au niveau de la lame séparatrice. Ce miroir est ensuite remplacé par la lame séparatrice pour l'alignement de l'objectif. En conséquence, la partie objectif/échantillon ne se trouve pas dans l'alignement de l'axe optique du bras générateur de polarisation.

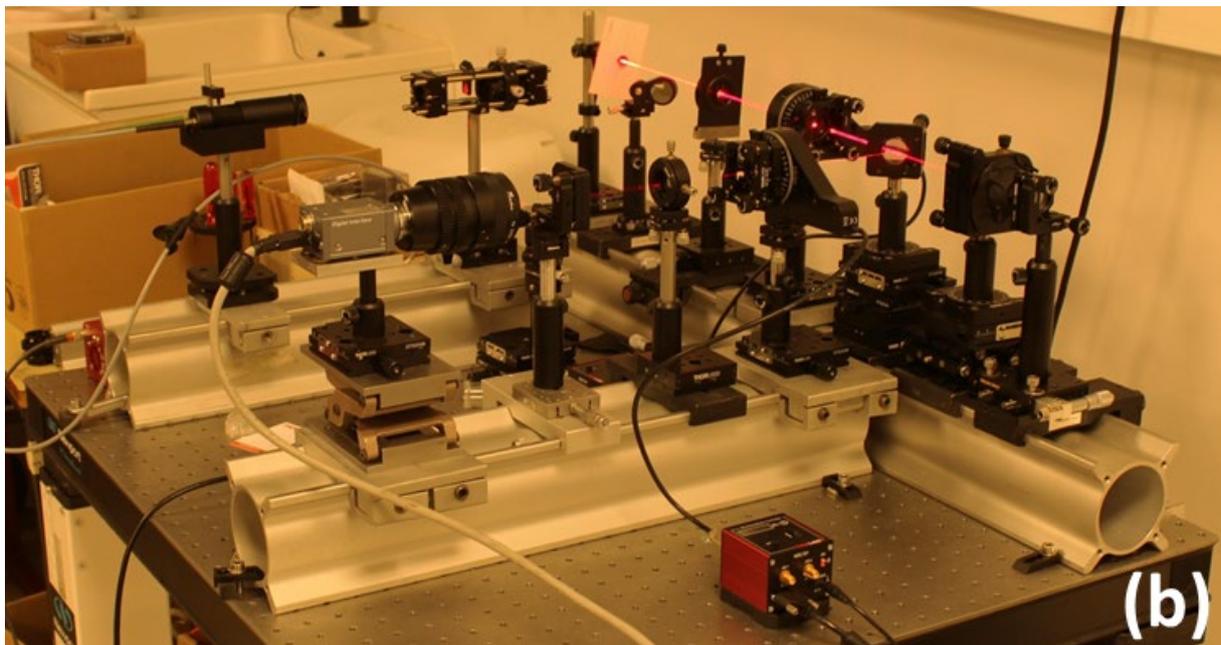
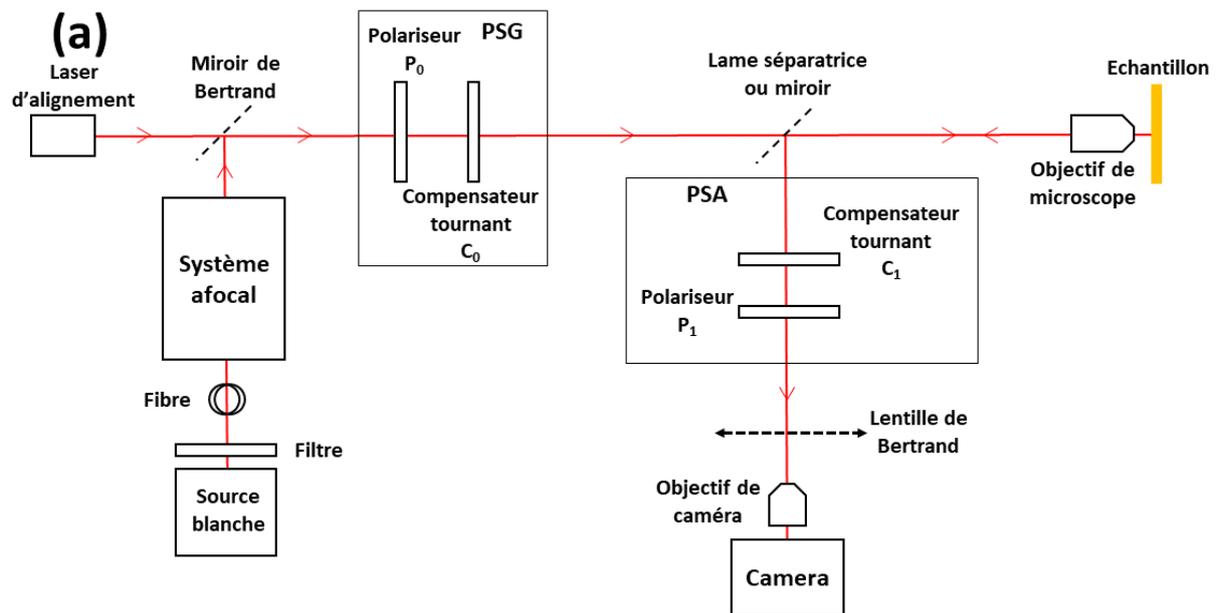


Figure 94: (a) Schéma et (b) photographie du montage optique en réflexion.

2. Calibration du plan de Fourier

Le plan de Fourier associé à l'échantillon est situé au niveau de l'objectif de microscope donc il faut que la lentille de Bertrand possède une focale suffisante pour être à l'extérieur du PSA afin de ne pas influencer la mesure polarimétrique. La lentille de Bertrand choisie est une lentille de focale 500mm (LA1908-AB-N-BK7, Thorlabs). Il faut calibrer le plan de Fourier : l'utilisation d'un réseau de diffraction connu permet d'établir la correspondance entre

position radiale dans l'image et position angulaire dans l'espace des k . Pour filtrer le plan de Fourier et donc choisir les angles d'intérêt, la mise en place d'un système afocal après la source lumineuse a été faite. Le schéma de ce système est présenté sur la Figure 95. Le cœur de la fibre associée à la source blanche est imagée à l'infini. Puis deux lentilles L_1 et L_2 de focales $f_1=75\text{mm}$ et $f_2=25\text{mm}$ forment un système afocal dans lequel est placé un pinhole. Le pinhole est positionné dans un plan conjugué par la lentille L_2 du plan de Fourier de l'objectif d'imagerie.

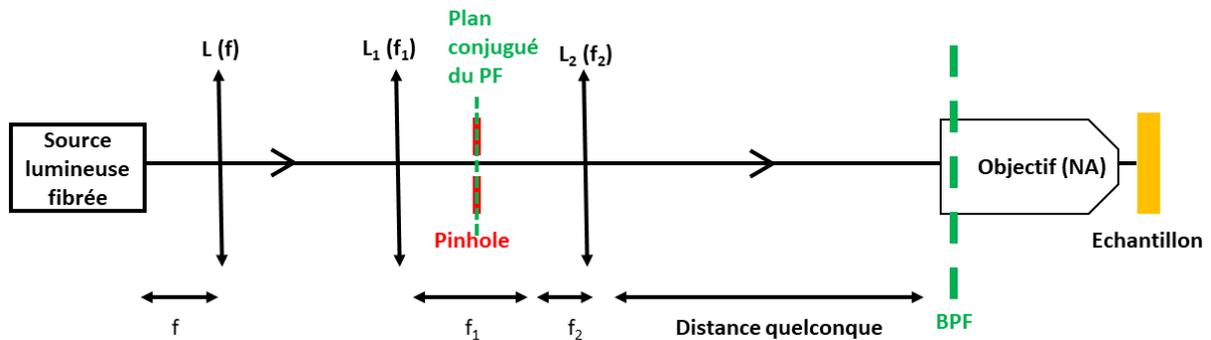


Figure 95 : Schéma décrivant le système afocal utilisé afin de filtrer spatialement le plan de Fourier.

Les images réalisées dans le plan réel et le plan de Fourier d'un réseau de diffraction (pas de $2\ \mu\text{m}$, réalisé dans du Si - INSP) sont présentées dans le Tableau 20. Un pinhole de diamètre $40\ \mu\text{m}$ a été installé au sein du système afocal présenté sur la Figure 95. Ceci permet de réduire les tâches de diffraction et donc de pouvoir calibrer le système. L'objectif x20 a une ouverture numérique de 0.46 et l'objectif x100 une ouverture numérique de 0.95. Les images dans le plan de Fourier sont délimitées par un disque qui correspond à l'image de la pupille d'entrée de l'objectif de microscope. Les pupilles ont respectivement un diamètre de 9 mm et 4 mm pour les objectifs x20 et x100. Ce rapport de diamètre se retrouve dans les tailles des images du plan de Fourier dans le Tableau 20. L'illumination est réalisée avec une source blanche filtrée autour de $500\ \text{nm}$.

Tableau 20 : Images associées au plan réel et au plan de Fourier d'un réseau de diffraction pour deux grossissements (x20 et x100) et avec ou sans filtration spatiale par un pinhole de diamètre $40\ \mu\text{m}$.

	x20		x100	
Sans pinhole				
Avec pinhole				

La Figure 96 présente les images obtenues dans le plan réel et dans le plan de Fourier pour le réseau de pas $2 \mu\text{m}$ pour les objectifs d'ouverture numérique 0.46 et 0.95. Dans ces deux cas, le pinhole était en place dans le système afocal en entrée. La calibration angulaire dans le plan de Fourier a été obtenue en identifiant la pupille d'entrée dans l'image du plan de Fourier et en y attribuant la bonne valeur angulaire θ_{NA} (équation (69)).

$$\theta_{NA} = \sin^{-1}(NA) \quad (69)$$

La position angulaire θ_m (pour l'ordre m) de tâches de diffraction associées au réseau est alors trouvée vers 14.5° dans les deux cas, en très bon accord avec la valeur donnée par la formule des réseaux (équation(70)). Pour un pas du réseau $a=2 \mu\text{m}$ et cette longueur d'onde ($\lambda=500 \text{ nm}$), on trouve $\theta_1=14.48^\circ$.

$$\theta_m = \sin^{-1}\left(\frac{m\lambda}{a}\right) \quad (70)$$

$$\theta_1 = \sin^{-1}\left(\frac{1 * 500 * 10^{-9}}{2 * 10^{-6}}\right) = 14.48^\circ$$

Le système en réflexion est à présent en place mais pour envisager des mesures sur des métasurfaces, il reste à mettre en place la procédure d'acquisition permettant de conserver les valeurs de Φ_0 et Φ_1 déterminées sur une trace directe pour des mesures dans le plan de Fourier. La procédure de mesure de trace directe doit aussi être mise en place. En particulier, la prise en compte de la séparatrice et de son activité en fonction de l'angle dans le plan de Fourier doit être faite.

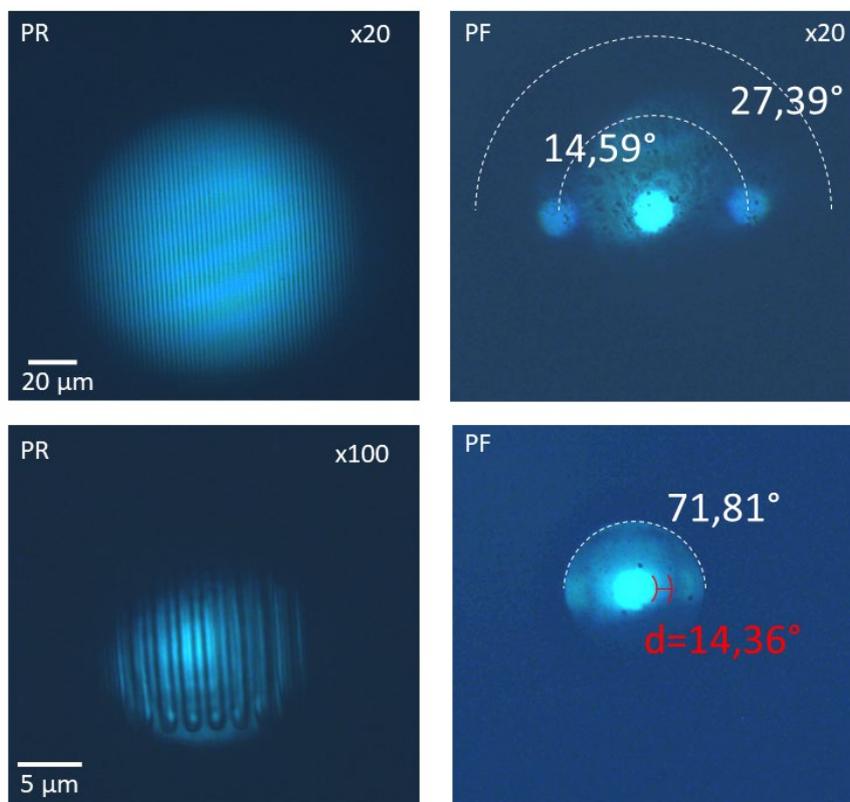


Figure 96 : Images dans le plan réel (PR) et le plan de Fourier (PF) de l'objectif pour des objectifs d'ouvertures numériques 0.46 (x20) et 0.95 (x100). Positions angulaires de la pupille de l'objectif et des tâches de diffraction.

Partie 4. Conclusion et perspectives du Chapitre

La réalisation d'un μ -polarimètre de Mueller en transmission a démontré la possibilité de mesurer la matrice de Mueller complète d'un échantillon dans un temps court (moins de deux minutes). En utilisant les propriétés spectroscopiques de notre caméra, il est possible de faire une analyse totale (spectroscopique et polarimétrique) de l'échantillon considéré. L'erreur systématique de mesure pour notre montage est de ± 0.02 sauf pour MM_{23} et MM_{32} qui sont plus sensibles aux erreurs (± 0.05). Ceci est trop important pour être utilisé afin de détecter la signature de la chiralité de biomolécules : les différences attendues dans la littérature sont de l'ordre de 10^{-3} . Cependant, l'utilisation de molécules qui modifieraient plus fortement la réponse des résonateurs (par exemple avec un CD dans la partie Infrarouge du spectre) permettrait d'utiliser ce montage à terme pour cette application. En outre, l'utilisation de résonateurs qui engendreraient une densité locale de chiralité plus forte rendrait également l'utilisation d'un tel montage intéressante. Pour ce faire, il convient de l'utiliser en réflexion afin de pouvoir imager le plan de Fourier et donc d'obtenir une information spectroscopique complète à chaque mesure.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de détecter la signature de la chiralité de biomolécules adsorbées chimiquement sur des surfaces. La détection de la structure secondaire de biomolécules a ainsi été étudiée au voisinage de surfaces.

Les mesures réalisées en ellipsométrie généralisée *in-situ* ont montré que les différents modes associés à une métasurface composée de résonateurs en U n'ont pas la même sensibilité à la présence des mêmes espèces biologiques. En particulier, il est possible d'observer un mode avec une forte contribution magnéto-électrique qui est particulièrement sensible à la structure secondaire d'une biomolécule. Sur des mesures en réflexion, la sensibilité semble particulièrement marquée pour l'élément de matrice MM_{23} qui est l'élément conjugué de MM_{14} . Différents objets biologiques ont été sondés (peptides, protéines et vésicules extracellulaires) et pour chacun d'entre eux, une variation de signal semble être observée dans la gamme spectrale de ce mode. Cependant, les variations observées sont faibles (ce qui est prévu dans la littérature) et l'on gagnerait à augmenter la force de l'interaction entre surface et adsorbat ou bien à détenir une sensibilité de mesure plus importante.

Pour parvenir à cet objectif, trois grandes questions doivent être étudiées :

1. Quelles surfaces ?
 2. Quelles méthodes de détection ?
 3. Quelles biomolécules ?
-
1. Afin de détecter la structure secondaire de biomolécules au voisinage de surfaces, le choix s'est porté sur des métasurfaces contenant des résonateurs lithographiés en forme de U. Ce choix est pertinent dans la mesure où la pseudo-chiralité intrinsèque des U couplée à une fonctionnalisation *in-situ* permet de réaliser une mesure unique pour détecter des différences de dichroïsme circulaire. Ceci est un atout par rapport à certains travaux de la littérature car les différents résultats obtenus montrent que les incertitudes causées par la lithographie et l'alignement optique ne sont pas négligeables par rapport à l'effet recherché. L'étude de nanomatériaux de formes différentes pourrait permettre d'accroître l'interaction avec les biomolécules, en tout cas d'accroître la différence d'interaction de la lumière polarisée entre un matériau nu et un fonctionnalisé. Par exemple, des nano-rods ou des nano-ouvertures achirales présentent une densité locale de chiralité non nulle en champ proche [175].
 2. Pour mesurer l'influence de la chiralité extrinsèque de biomolécules sur des surfaces, plusieurs choix de détection existent. L'ellipsométrie généralisée utilisée ici durant cette thèse est un outil de choix dans la mesure où cet appareil permet de mesurer la matrice de Mueller d'un échantillon permettant l'étude des différentes caractéristiques modales des surfaces. L'accès à une cartographie polarimétrique et spectroscopique est permis. Cependant, le couplage de cet appareil avec une cellule liquide empêche la mesure d'un échantillon à plusieurs angles d'incidence. Pour résoudre ce problème, il faut obtenir toute la matrice et utiliser les propriétés de

symétrie de celle-ci mais l'asymétrie des résonateurs reste un facteur influent. Par conséquent, l'utilisation d'un μ -polarimètre de Mueller permettant l'observation du plan de Fourier d'une surface bénéficierait fortement à la détection de la structure secondaire de biomolécules. En outre, une autre perspective serait de construire un polarimètre plus simple qui permettrait la mesure de l'élément de matrice choisi uniquement. La plus grande simplicité de ce montage permettrait sûrement d'éliminer certaines incertitudes et de faire une mesure plus précise, modulée en polarisation, comme le fait un polarimètre JASCO par exemple.

3. Enfin, durant cette thèse, plusieurs espèces biologiques ont été testées. L'étude des peptides et protéines pour lesquelles la signature de la chiralité en CD se trouve dans l'ultraviolet est d'intérêt car ce sont celles qui présentent le plus d'applications dans le domaine du biomédical. Afin de confirmer les observations faites, on pourrait imaginer de changer la conformation des molécules greffées par une action extérieure (solvant, pH, température...). Ceci dit, les variations d'indice du milieu doivent alors être prises aussi en compte et l'analyse n'est pas nécessairement immédiate. Dans un contexte de recherche, l'étude de molécules, bien que moins utiles industriellement, qui présentent un CD important dans la partie infrarouge du spectre permettrait sûrement d'exacerber la réponse de la surface étudiée : on pense par exemple aux complexes photosynthétiques (LHC pour Light Harvesting Complexes) ou au CdSe fonctionnalisé comme présenté dans le Chapitre 1. De plus, le travail présenté ici s'est concentré sur des approches de fonctionnalisation pour lesquelles les molécules sont liées de manière covalente à la surface : c'est primordial dans un contexte d'applications. En effet, la détection de la structure secondaire de molécules qui seraient physisorbées à la surface n'aurait pas un grand intérêt en tant qu'information biologique. En revanche, dans un cadre de recherche, le dépôt de couches plus épaisses ou plus concentrés pourrait permettre d'augmenter l'interaction surface-molécules et donc validerait certaines conditions de détection.

Bibliographie

- [1] M. Nicolas *et al.*, « Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices », *Antibiotics*, vol. 11, n° 1, p. 13, déc. 2021, doi: 10.3390/antibiotics11010013.
- [2] S. Baron et P. Bégué, « Traitement antibiotique des angines », *Médecine Mal. Infect.*, vol. 18, p. 521-525, oct. 1988, doi: 10.1016/S0399-077X(88)80011-8.
- [3] F. Legent, Ph. Bordure, et C. Beauvillain, « Etude comparative de la ciprofloxacine et de l'amoxicilline/acide clavulanique dans le traitement de l'otite chronique », *Médecine Mal. Infect.*, vol. 23, p. 14-20, août 1993, doi: 10.1016/S0399-077X(05)81704-4.
- [4] J. J. Pessey, « Efficacité et tolérance du céfixime en traitement de 4 jours ou de 10 jours versus 10 jours d' amoxicilline-acide clavulanique dans les sinusites aiguës de l'adulte », p. 7.
- [5] R. Lodha, S. K. Kabra, et R. M. Pandey, « Antibiotics for community-acquired pneumonia in children », *Cochrane Database Syst. Rev.*, juin 2013, doi: 10.1002/14651858.CD004874.pub4.
- [6] N. Lounis, J. Guillemont, N. Veziris, A. Koul, V. Jarlier, et K. Andries, « R207910 (TMC207) : un nouvel antibiotique pour le traitement de la tuberculose », *Médecine Mal. Infect.*, vol. 40, n° 7, p. 383-390, juill. 2010, doi: 10.1016/j.medmal.2009.09.007.
- [7] A. Coblenz, « Treatment of geriatric peptic ulcer with chymotrypsin and an antibiotic », *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 16, n° 9, p. 1039-1046, sept. 1968, doi: 10.1111/j.1532-5415.1968.tb02734.x.
- [8] L. Kosar et T. Laubscher, « Prise en charge de l'impétigo et de la cellulite », *Can. Fam. Physician*, vol. 63, p. 5, 2017.
- [9] L. V. Stamm, « Syphilis: antibiotic treatment and resistance », *Epidemiol. Infect.*, vol. 143, n° 8, p. 1567-1574, juin 2015, doi: 10.1017/S0950268814002830.
- [10] J. Acar et G. Moulin, « Antimicrobial resistance: a complex issue: -EN- -FR- L'antibiorésistance : une question complexe -ES- la resistencia a los agentes antimicrobianos, un tema complejo », *Rev. Sci. Tech. OIE*, vol. 31, n° 1, p. 23-31, avr. 2012, doi: 10.20506/rst.31.1.2098.
- [11] C. Aenishaenslin, B. Häsler, A. Ravel, J. Parmley, K. Stärk, et D. Buckeridge, « Evidence needed for antimicrobial resistance surveillance systems », *Bull. World Health Organ.*, vol. 97, n° 4, p. 283-289, avr. 2019, doi: 10.2471/BLT.18.218917.
- [12] « Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2017 », p. 12, 2017.
- [13] Santé Publique France, « Antibiotiques et résistance bactérienne : une menace mondiale, des conséquences individuelles. », p. 24, 2019.

- [14] M. Jamal *et al.*, « Bacterial biofilm and associated infections », *J. Chin. Med. Assoc.*, vol. 81, n° 1, p. 7-11, janv. 2018, doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- [15] G. A. James *et al.*, « Biofilms in chronic wounds », *Wound Repair Regen.*, vol. 16, n° 1, p. 37-44, janv. 2008, doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x.
- [16] J. D. Bryers, « Medical biofilms », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, n° 1, p. 1-18, mai 2008, doi: 10.1002/bit.21838.
- [17] N. Khardori et M. Yassien, « Biofilms in device-related infections », *J. Ind. Microbiol.*, vol. 15, n° 3, p. 141-147, sept. 1995, doi: 10.1007/BF01569817.
- [18] D. I. Chan, E. J. Prenner, et H. J. Vogel, « Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1758, n° 9, p. 1184-1202, sept. 2006, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.04.006.
- [19] N. Sitaram et R. Nagaraj, « Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1462, n° 1-2, p. 29-54, déc. 1999, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00199-6.
- [20] P. M. Hwang et H. J. Vogel, « Structure–function relationships of antimicrobial peptides », vol. 76, p. 12, 1998.
- [21] M. Zasloff, « Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. », *Proc Natl Acad Sci USA*, p. 5, 1987.
- [22] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C. M. Pradier, et T. Jouenne, « Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches », *Acta Biomater.*, vol. 8, n° 5, p. 1670-1684, mai 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.01.011.
- [23] L. Steinstraesser *et al.*, « Host Defense Peptides as Effector Molecules of the Innate Immune Response: A Sledgehammer for Drug Resistance? », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, n° 9, p. 3951-3970, sept. 2009, doi: 10.3390/ijms10093951.
- [24] B. Gao et S. Zhu, « Mesobuthus Venom-Derived Antimicrobial Peptides Possess Intrinsic Multifunctionality and Differential Potential as Drugs », *Front. Microbiol.*, vol. 9, p. 320, févr. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00320.
- [25] D. J. Holthausen *et al.*, « An Amphibian Host Defense Peptide Is Virucidal for Human H1 Hemagglutinin-Bearing Influenza Viruses », *Immunity*, vol. 46, n° 4, p. 587-595, avr. 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.018.
- [26] B. Shen *et al.*, « Triintsin, a human pathogenic fungus-derived defensin with broad-spectrum antimicrobial activity », *Peptides*, vol. 107, p. 61-67, sept. 2018, doi: 10.1016/j.peptides.2018.08.003.

- [27] M. A. Terkawi, R. Takano, A. Furukawa, F. Murakoshi, et K. Kato, « Involvement of β -defensin 130 (DEFB130) in the macrophage microbicidal mechanisms for killing *Plasmodium falciparum* », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 41772, mars 2017, doi: 10.1038/srep41772.
- [28] L. Huang *et al.*, « Dermaseptin-PH: A Novel Peptide with Antimicrobial and Anticancer Activities from the Skin Secretion of the South American Orange-Legged Leaf Frog, *Pithecopus (Phyllomedusa) hypochondrialis* », *Molecules*, vol. 22, n° 10, p. 1805, oct. 2017, doi: 10.3390/molecules22101805.
- [29] X. Wang *et al.*, « Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species », *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, vol. 49, n° 6, p. 550-559, juin 2017, doi: 10.1093/abbs/gmx032.
- [30] Y. Hu et J. Zhang, « CscCL17, a CC chemokine of *Cynoglossus semilaevis*, induces leukocyte trafficking and promotes immune defense against viral infection », *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 45, n° 2, p. 771-779, août 2015, doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.043.
- [31] S. Liu *et al.*, « Assessment of antimicrobial and wound healing effects of Brevinin-2Ta against the bacterium *Klebsiella pneumoniae* in dermally-wounded rats », *Oncotarget*, vol. 8, n° 67, p. 111369-111385, déc. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.22797.
- [32] J. M. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, et T. G. Villa, « Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 133, p. 117-138, juin 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.018.
- [33] M. Stauss-Grabo, S. Atiye, T. Le, et M. Kretschmar, « Decade-long use of the antimicrobial peptide combination tyrothricin does not pose a major risk of acquired resistance with gram-positive bacteria and *Candida* spp », *Pharmazie*, n° 11, p. 838-841, nov. 2014, doi: 10.1691/ph.2014.4686.
- [34] D. I. Andersson, D. Hughes, et J. Z. Kubicek-Sutherland, « Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides », *Drug Resist. Updat.*, vol. 26, p. 43-57, mai 2016, doi: 10.1016/j.drug.2016.04.002.
- [35] S. Gruenheid et H. Moual, « Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 330, n° 2, p. 81-89, mai 2012, doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02528.x.
- [36] E. Hendry *et al.*, « Ultrasensitive detection and characterization of biomolecules using superchiral fields », *Nat. Nanotech.*, vol. 5, n° 11, p. 783-787, nov. 2010, doi: 10.1038/nnano.2010.209.
- [37] J. García-Guirado, M. Svedendahl, J. Puigdollers, et R. Quidant, « Enantiomer-Selective Molecular Sensing Using Racemic Nanoplasmonic Arrays », *Nano Lett.*, vol. 18, n° 10, p. 6279-6285, oct. 2018, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02433.
- [38] D. Barra et M. Simmaco, « Amphibian skin: A promising resource for antimicrobial peptides », *Trends Biotechnol.*, vol. 13, n° 6, p. 205-209, juin 1995, doi: 10.1016/S0167-7799(00)88947-7.

- [39] A. Ladram, « Antimicrobial peptides from frog skin biodiversity and therapeutic promises », *Front. Biosci.*, vol. 21, n° 7, p. 1341-1371, 2016, doi: 10.2741/4461.
- [40] Yasuhara, T., Nakajima, T., Erspamer, V., Falconieri Erspamer, G., Tuka-moto, Y., et Mori, M., « Isolation and sequential analysis of peptides in *Rana erythraea* skin », *Peptide chemistry*, Protein Research Foundation, Osaka., p. 363-368, 1986.
- [41] M. Simmaco *et al.*, « Purification and characterization of bioactive peptides from skin extracts of *Rana esculenta* », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1033, n° 3, p. 318-323, mars 1990, doi: 10.1016/0304-4165(90)90140-R.
- [42] R. El-Dirany *et al.*, « Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against *Leishmania* and Other Parasites: An Overview », *Biomolecules*, vol. 11, n° 7, p. 984, juill. 2021, doi: 10.3390/biom11070984.
- [43] A. Lombana *et al.*, « Temporin-SHa peptides grafted on gold surfaces display antibacterial activity: ANTIMICROBIAL PEPTIDE: TEMPORINS ON GOLD SURFACES », *J Pept Sci*, vol. 20, n° 7, p. 563-569, juill. 2014, doi: 10.1002/psc.2654.
- [44] N. Masurier *et al.*, « Site-specific grafting on titanium surfaces with hybrid temporin antibacterial peptides », *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, n° 12, p. 1782-1790, 2018, doi: 10.1039/C8TB00051D.
- [45] P.-C. Oger, C. Piesse, A. Ladram, et V. Humblot, « Engineering of Antimicrobial Surfaces by Using Temporin Analogs to Tune the Biocidal/antiadhesive Effect », *Molecules*, vol. 24, n° 4, p. 814, févr. 2019, doi: 10.3390/molecules24040814.
- [46] T. Li *et al.*, « Potent intracellular antibacterial activity of a marine peptide-N6NH₂ and its D-enantiomer against multidrug-resistant *Aeromonas veronii* », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 105, n° 6, p. 2351-2361, mars 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11176-3.
- [47] M. F. Mohamed, A. Brezden, H. Mohammad, J. Chmielewski, et M. N. Seleem, « A short D-enantiomeric antimicrobial peptide with potent immunomodulatory and antibiofilm activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 6953, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07440-0.
- [48] J. Huang *et al.*, « Inhibitory effects and mechanisms of physiological conditions on the activity of enantiomeric forms of an α -helical antibacterial peptide against bacteria », *Peptides*, vol. 32, n° 7, p. 1488-1495, juill. 2011, doi: 10.1016/j.peptides.2011.05.023.
- [49] Z. Raja *et al.*, « Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent », *PLoS ONE*, vol. 12, n° 3, p. e0174024, mars 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0174024.
- [50] F. Abbassi *et al.*, « Solution Structure and Model Membrane Interactions of Temporins-SH, Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin. A NMR Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry Study [†]§ », *Biochemistry*, vol. 47, n° 40, p. 10513-10525, oct. 2008, doi: 10.1021/bi8006884.

- [51] F. Abbassi *et al.*, « Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide », *Biochimie*, vol. 95, n° 2, p. 388-399, févr. 2013, doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.015.
- [52] S. André *et al.*, « Functional Characterization of Temporin-SHe, a New Broad-Spectrum Antibacterial and Leishmanicidal Temporin-SH Paralog from the Sahara Frog (*Pelophylax saharicus*) », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n° 18, p. 6713, sept. 2020, doi: 10.3390/ijms21186713.
- [53] S. André *et al.*, « Structure–Activity Relationship-based Optimization of Small Temporin-SHf Analogs with Potent Antibacterial Activity », *ACS Chem Biol*, vol. 10, n° 10, p. 2257-2266, oct. 2015, doi: 10.1021/acscchembio.5b00495.
- [54] F. Abbassi *et al.*, « Temporin-SHf, a New Type of Phe-rich and Hydrophobic Ultrashort Antimicrobial Peptide », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 22, p. 16880-16892, mai 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.097204.
- [55] L. Pasteur, « Sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique et le sens de la polarisation rotatoire », *Ann. Chim. Phys*, vol. 24, p. 442-459, 1848.
- [56] M. Faraday, « The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. », p. 145-192, 1856.
- [57] Hergert, W. et Wriedt, T., « The Mie theory: basics and applications », *Springer*, 2012.
- [58] S. A. Cunningham, « Incident, Accident, Catastrophe: Cyanide on the Danube: Incident, Accident, Catastrophe: Cyanide on the Danube », *Disasters*, vol. 29, n° 2, p. 99-128, juin 2005, doi: 10.1111/j.0361-3666.2005.00276.x.
- [59] S. Eustis et M. A. El-Sayed, « Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes », *Chem Soc Rev*, vol. 35, n° 3, p. 209-217, 2006, doi: 10.1039/B514191E.
- [60] V. G. Kravets, A. V. Kabashin, W. L. Barnes, et A. N. Grigorenko, « Plasmonic Surface Lattice Resonances: A Review of Properties and Applications », *Chem. Rev.*, vol. 118, n° 12, p. 5912-5951, juin 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00243.
- [61] R. L. Rich et D. G. Myszka, « Survey of the 2009 commercial optical biosensor literature: SURVEY OF THE 2009 COMMERCIAL OPTICAL BIOSENSOR LITERATURE », *J. Mol. Recognit.*, vol. 24, n° 6, p. 892-914, nov. 2011, doi: 10.1002/jmr.1138.
- [62] V. G. Kravets, F. Schedin, et A. N. Grigorenko, « Plasmonic blackbody: Almost complete absorption of light in nanostructured metallic coatings », *Phys. Rev. B*, vol. 78, n° 20, p. 205405, nov. 2008, doi: 10.1103/PhysRevB.78.205405.
- [63] S. V. Zhukovsky, V. E. Babicheva, A. V. Uskov, I. E. Protsenko, et A. V. Lavrinenko, « Enhanced Electron Photoemission by Collective Lattice Resonances in Plasmonic Nanoparticle-Array Photodetectors and Solar Cells », *Plasmonics*, vol. 9, n° 2, p. 283-289, avr. 2014, doi: 10.1007/s11468-013-9621-z.

- [64] B. Demory, T. A. Hill, C.-H. Teng, L. Zhang, H. Deng, et P.-C. Ku, « Plasmonic Enhancement of Single Photon Emission from a Site-Controlled Quantum Dot », *ACS Photonics*, vol. 2, n° 8, p. 1065-1070, août 2015, doi: 10.1021/acsp Photonics.5b00086.
- [65] M. Nicolas *et al.*, « Mueller micropolarimeter for color imaging of aluminum metasurfaces », *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 38, n° 4, p. 1184, avr. 2021, doi: 10.1364/JOSAB.416833.
- [66] K. M. Mayer et J. H. Hafner, « Localized Surface Plasmon Resonance Sensors », *Chem. Rev.*, vol. 111, n° 6, p. 3828-3857, juin 2011, doi: 10.1021/cr100313v.
- [67] L. J. Sherry, S.-H. Chang, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, B. J. Wiley, et Y. Xia, « Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Nanocubes », *Nano Lett.*, vol. 5, n° 10, p. 2034-2038, oct. 2005, doi: 10.1021/nl0515753.
- [68] J. Becker, A. Trügler, A. Jakab, U. Hohenester, et C. Sönnichsen, « The Optimal Aspect Ratio of Gold Nanorods for Plasmonic Bio-sensing », *Plasmonics*, vol. 5, n° 2, p. 161-167, juin 2010, doi: 10.1007/s11468-010-9130-2.
- [69] Y. Mazouzi *et al.*, « Design and Analytical Performances of a Diclofenac Biosensor for Water Resources Monitoring », *ACS Sens.*, vol. 6, n° 9, p. 3485-3493, sept. 2021, doi: 10.1021/acssensors.1c01607.
- [70] D. M. Lipkin, « Existence of a New Conservation Law in Electromagnetic Theory », *J. Math. Phys.*, vol. 5, n° 5, p. 696-700, mai 1964, doi: 10.1063/1.1704165.
- [71] Y. Tang et A. E. Cohen, « Optical Chirality and Its Interaction with Matter », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 104, n° 16, p. 163901, avr. 2010, doi: 10.1103/PhysRevLett.104.163901.
- [72] W. A. Paiva-Marques, F. Reyes Gómez, O. N. Oliveira, et J. R. Mejía-Salazar, « Chiral Plasmonics and Their Potential for Point-of-Care Biosensing Applications », *Sensors*, vol. 20, n° 3, p. 944, févr. 2020, doi: 10.3390/s20030944.
- [73] J. M. Slocik, A. O. Govorov, et R. R. Naik, « Plasmonic Circular Dichroism of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles », *Nano Lett.*, vol. 11, n° 2, p. 701-705, févr. 2011, doi: 10.1021/nl1038242.
- [74] A. O. Govorov, Z. Fan, P. Hernandez, J. M. Slocik, et R. R. Naik, « Theory of Circular Dichroism of Nanomaterials Comprising Chiral Molecules and Nanocrystals: Plasmon Enhancement, Dipole Interactions, and Dielectric Effects », *Nano Lett.*, vol. 10, n° 4, p. 1374-1382, avr. 2010, doi: 10.1021/nl100010v.
- [75] M. L. Nesterov, X. Yin, M. Schäferling, H. Giessen, et T. Weiss, « The Role of Plasmon-Generated Near Fields for Enhanced Circular Dichroism Spectroscopy », *ACS Photonics*, vol. 3, n° 4, p. 578-583, avr. 2016, doi: 10.1021/acsp Photonics.5b00637.
- [76] B. M. Maoz *et al.*, « Amplification of Chiroptical Activity of Chiral Biomolecules by Surface Plasmons », *Nano Lett.*, vol. 13, n° 3, p. 1203-1209, mars 2013, doi: 10.1021/nl304638a.

- [77] M. Puri et V. E. Ferry, « Circular Dichroism of CdSe Nanocrystals Bound by Chiral Carboxylic Acids », *ACS Nano*, vol. 11, n° 12, p. 12240-12246, déc. 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b05690.
- [78] J. T. Collins, C. Kuppe, D. C. Hooper, C. Sibia, M. Centini, et V. K. Valev, « Chirality and Chiroptical Effects in Metal Nanostructures: Fundamentals and Current Trends », *Adv. Opt. Mater.*, vol. 5, n° 16, p. 1700182, août 2017, doi: 10.1002/adom.201700182.
- [79] V. Bochenkov et T. Shabatina, « Chiral Plasmonic Biosensors », *Biosensors*, vol. 8, n° 4, p. 120, déc. 2018, doi: 10.3390/bios8040120.
- [80] V. K. Valev *et al.*, « Plasmonic Ratchet Wheels: Switching Circular Dichroism by Arranging Chiral Nanostructures », *Nano Lett.*, vol. 9, n° 11, p. 3945-3948, nov. 2009, doi: 10.1021/nl9021623.
- [81] W. Ye, X. Yuan, C. Guo, J. Zhang, B. Yang, et S. Zhang, « Large Chiroptical Effects in Planar Chiral Metamaterials », *Phys. Rev. Appl.*, vol. 7, n° 5, p. 054003, mai 2017, doi: 10.1103/PhysRevApplied.7.054003.
- [82] V. E. Bochenkov et D. S. Sutherland, « Chiral plasmonic nanocrescents: large-area fabrication and optical properties », *Opt. Express*, vol. 26, n° 21, p. 27101, oct. 2018, doi: 10.1364/OE.26.027101.
- [83] C. Kelly *et al.*, « Chiral Plasmonic Fields Probe Structural Order of Biointerfaces », *J Am Chem Soc*, vol. 140, n° 27, p. 8509-8517, juill. 2018, doi: 10.1021/jacs.8b03634.
- [84] C. Jack *et al.*, « Biomacromolecular Stereostructure Mediates Mode Hybridization in Chiral Plasmonic Nanostructures », *Nano Lett*, vol. 16, n° 9, p. 5806-5814, sept. 2016, doi: 10.1021/acs.nanolett.6b02549.
- [85] O. Arteaga *et al.*, « Relation between 2D/3D chirality and the appearance of chiroptical effects in real nanostructures », *Opt. Express*, vol. 24, n° 3, p. 2242, févr. 2016, doi: 10.1364/OE.24.002242.
- [86] J. C. Wilson, P. Gutsche, S. Herrmann, et K. M. Mcpeak, « Correlation of circular differential optical absorption with geometric chirality in plasmonic meta-atoms », p. 19.
- [87] O. Yavas, M. Svedendahl, et R. Quidant, « Unravelling the Role of Electric and Magnetic Dipoles in Biosensing with Si Nanoresonators », *ACS Nano*, vol. 13, n° 4, p. 4582-4588, avr. 2019, doi: 10.1021/acsnano.9b00572.
- [88] J. García-Guirado, M. Svedendahl, J. Puigdollers, et R. Quidant, « Enhanced Chiral Sensing with Dielectric Nanoresonators », *Nano Lett.*, vol. 20, n° 1, p. 585-591, janv. 2020, doi: 10.1021/acs.nanolett.9b04334.
- [89] Y. Zhao, A. N. Askarpour, L. Sun, J. Shi, X. Li, et A. Alù, « Chirality detection of enantiomers using twisted optical metamaterials », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, p. 14180, avr. 2017, doi: 10.1038/ncomms14180.

- [90] N. Liu, H. Liu, S. Zhu, et H. Giessen, « Stereometamaterials », *Nat. Photonics*, vol. 3, n° 3, p. 157-162, mars 2009, doi: 10.1038/nphoton.2009.4.
- [91] M. Decker *et al.*, « Strong optical activity from twisted-cross photonic metamaterials », *Opt. Lett.*, vol. 34, n° 16, p. 2501, août 2009, doi: 10.1364/OL.34.002501.
- [92] Z. Wu et Y. Zheng, « Moiré Chiral Metamaterials », *Adv. Opt. Mater.*, vol. 5, n° 16, p. 1700034, août 2017, doi: 10.1002/adom.201700034.
- [93] M. M. Hossain et M. Gu, « Fabrication methods of 3D periodic metallic nano/microstructures for photonics applications: Fabrication methods of 3D periodic metallic nano/microstructures », *Laser Photonics Rev.*, vol. 8, n° 2, p. 233-249, mars 2014, doi: 10.1002/lpor.201300052.
- [94] M. Schäferling, X. Yin, N. Engheta, et H. Giessen, « Helical Plasmonic Nanostructures as Prototypical Chiral Near-Field Sources », *ACS Photonics*, vol. 1, n° 6, p. 530-537, juin 2014, doi: 10.1021/ph5000743.
- [95] F. Bernal Arango, T. Coenen, et A. F. Koenderink, « Underpinning Hybridization Intuition for Complex Nanoantennas by Magnetoelectric Quadrupolar Polarizability Retrieval », *ACS Photonics*, vol. 1, n° 5, p. 444-453, mai 2014, doi: 10.1021/ph5000133.
- [96] J. Proust, N. Bonod, J. Grand, et B. Gallas, « Optical Monitoring of the Magnetoelectric Coupling in Individual Plasmonic Scatterers », *ACS Photonics*, vol. 3, n° 9, p. 1581-1588, sept. 2016, doi: 10.1021/acsp Photonics.6b00041.
- [97] N. Guth *et al.*, « Optical properties of metamaterials: Influence of electric multipoles, magnetoelectric coupling, and spatial dispersion », *Phys Rev B*, vol. 85, n° 11, p. 115138, mars 2012, doi: 10.1103/PhysRevB.85.115138.
- [98] I. Sersic, C. Tuambilangana, T. Kampfrath, et A. F. Koenderink, « Magnetoelectric point scattering theory for metamaterial scatterers », *Phys. Rev. B*, vol. 83, n° 24, p. 245102, juin 2011, doi: 10.1103/PhysRevB.83.245102.
- [99] I. Sersic, M. Frimmer, E. Verhagen, et A. F. Koenderink, « Electric and Magnetic Dipole Coupling in Near-Infrared Split-Ring Metamaterial Arrays », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 103, n° 21, p. 213902, nov. 2009, doi: 10.1103/PhysRevLett.103.213902.
- [100] T. S. H. Yoo *et al.*, « Circularly Polarized Images with Contrast Reversal Using Pseudochiral Metasurfaces », *ACS Photonics*, vol. 5, n° 10, p. 4068-4073, oct. 2018, doi: 10.1021/acsp Photonics.8b00730.
- [101] M. H. Alizadeh et B. M. Reinhard, « Plasmonically Enhanced Chiral Optical Fields and Forces in Achiral Split Ring Resonators », *ACS Photonics*, vol. 2, n° 3, p. 361-368, mars 2015, doi: 10.1021/ph500399k.
- [102] C. Chen, I. An, G. M. Ferreira, N. J. Podraza, J. A. Zapien, et R. W. Collins, « Multichannel Mueller matrix ellipsometer based on the dual rotating compensator principle », *Thin Solid Films*, vol. 455-456, p. 14-23, mai 2004, doi: 10.1016/j.tsf.2003.11.191.

- [103] O. Arteaga, M. Baldrís, J. Antó, A. Canillas, E. Pascual, et E. Bertran, « Mueller matrix microscope with a dual continuous rotating compensator setup and digital demodulation », *Appl Opt*, vol. 53, n° 10, p. 2236, avr. 2014, doi: 10.1364/AO.53.002236.
- [104] L. Broch, A. En Naciri, et L. Johann, « Systematic errors for a Mueller matrix dual rotating compensator ellipsometer », *Opt Express*, vol. 16, n° 12, p. 8814, juin 2008, doi: 10.1364/OE.16.008814.
- [105] X. Cheng, M. Li, J. Zhou, H. Ma, et Q. Hao, « Error analysis of the calibration of a dual-rotating-retarder Mueller matrix polarimeter », *Appl. Opt.*, vol. 56, n° 25, p. 7067, sept. 2017, doi: 10.1364/AO.56.007067.
- [106] E. Chironi et C. Lemmi, « Error analysis and compensation for a discrete dual rotating retarder Mueller matrix polarimeter », *Appl. Opt.*, vol. 59, n° 21, p. 6368, juill. 2020, doi: 10.1364/AO.397482.
- [107] E. Garcia-Caurel, A. De Martino, et B. Drévilion, « Spectroscopic Mueller polarimeter based on liquid crystal devices », *Thin Solid Films*, vol. 455-456, p. 120-123, mai 2004, doi: 10.1016/j.tsf.2003.12.056.
- [108] B. Laude-Boulesteix, A. De Martino, B. Drévilion, et L. Schwartz, « Mueller polarimetric imaging system with liquid crystals », *Appl. Opt.*, vol. 43, n° 14, p. 2824, mai 2004, doi: 10.1364/AO.43.002824.
- [109] O. Arteaga, J. Freudenthal, B. Wang, et B. Kahr, « Mueller matrix polarimetry with four photoelastic modulators: theory and calibration », *Appl. Opt.*, vol. 51, n° 28, p. 6805, oct. 2012, doi: 10.1364/AO.51.006805.
- [110] S. Alali, A. Gribble, et I. Alex Vitkin, « Rapid wide-field Mueller matrix polarimetry imaging based on four photoelastic modulators with no moving parts », *Opt. Lett.*, vol. 41, n° 5, p. 1038, mars 2016, doi: 10.1364/OL.41.001038.
- [111] R. Ossikovski, M. Anastasiadou, S. Ben Hatit, E. Garcia-Caurel, et A. De Martino, « Depolarizing Mueller matrices: how to decompose them? », *Phys. Status Solidi A*, vol. 205, n° 4, p. 720-727, avr. 2008, doi: 10.1002/pssa.200777793.
- [112] J. J. Gil et E. Bernabeu, « Obtainment of the polarizing and retardation parameters of a nondepolarizing optical-system from the polar decomposition of its Mueller Matrix », *OPTIK*, vol. 76, n° 2, p. 67-71, 1987.
- [113] S.-Y. Lu et R. A. Chipman, « Interpretation of Mueller matrices based on polar decomposition », *J Opt Soc Am A*, vol. 13, n° 5, p. 1106, mai 1996, doi: 10.1364/JOSAA.13.001106.
- [114] S. R. Cloude, « Conditions For The Physical Realisability Of Matrix Operators In Polarimetry », San Diego, janv. 1990, p. 177. doi: 10.1117/12.962889.
- [115] R. Ossikovski, « Differential matrix formalism for depolarizing anisotropic media », *Opt. Lett.*, vol. 36, n° 12, p. 2330, juin 2011, doi: 10.1364/OL.36.002330.

- [116] R. Ossikovski, « Differential and product Mueller matrix decompositions: a formal comparison », *Opt. Lett.*, vol. 37, n° 2, p. 220, janv. 2012, doi: 10.1364/OL.37.000220.
- [117] R. Ossikovski et A. De Martino, « Differential Mueller matrix of a depolarizing homogeneous medium and its relation to the Mueller matrix logarithm », *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 32, n° 2, p. 343, févr. 2015, doi: 10.1364/JOSAA.32.000343.
- [118] A. Le Gratiet, A. Mohebi, F. Callegari, P. Bianchini, et A. Diaspro, « Review on Complete Mueller Matrix Optical Scanning Microscopy Imaging », *Appl. Sci.*, vol. 11, n° 4, p. 1632, févr. 2021, doi: 10.3390/app11041632.
- [119] D. J. Cho, F. Wang, X. Zhang, et Y. R. Shen, « Contribution of the electric quadrupole resonance in optical metamaterials », *Phys. Rev. B*, vol. 78, n° 12, p. 121101, sept. 2008, doi: 10.1103/PhysRevB.78.121101.
- [120] C. Rockstuhl, F. Lederer, C. Etrich, T. Zentgraf, J. Kuhl, et H. Giessen, « On the reinterpretation of resonances in split-ring-resonators at normal incidence », *Opt. Express*, vol. 14, n° 19, p. 8827, 2006, doi: 10.1364/OE.14.008827.
- [121] A. M. Soehartono, A. D. Mueller, L. Y. M. Tobing, K. K. Chan, D. H. Zhang, et K.-T. Yong, « Ultra-small v-shaped gold split ring resonators for biosensing using fundamental magnetic resonance in the visible spectrum », *Nanotechnology*, vol. 28, n° 40, p. 405305, oct. 2017, doi: 10.1088/1361-6528/aa83a6.
- [122] D. L. Jaggard, A. R. Mickelson, et C. H. Papas, « On electromagnetic waves in chiral media », p. 6.
- [123] A. Ishimaru, Seung-Woo Lee, Y. Kuga, et V. Jandhyala, « Generalized constitutive relations for metamaterials based on the quasi-static lorentz theory », *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 51, n° 10, p. 2550-2557, oct. 2003, doi: 10.1109/TAP.2003.817565.
- [124] B. D. H. Tellegen, « A general network theorem with applications », *Philips Research Reports*, p. 259-269., 1952.
- [125] F. Capolino, *Theory and Phenomena of Metamaterials*. 2009.
- [126] R. Marqués, F. Medina, et R. Rafii-El-Idrissi, « Role of bianisotropy in negative permeability and left-handed metamaterials », *Phys. Rev. B*, vol. 65, n° 14, p. 144440, avr. 2002, doi: 10.1103/PhysRevB.65.144440.
- [127] M. M. I. Saadoun et N. Engheta, « A reciprocal phase shifter using novel pseudo-chiral or ω medium », *Microw. Opt. Technol. Lett.*, vol. 5, n° 4, p. 184-188, avr. 1992, doi: 10.1002/mop.4650050412.
- [128] R. A. Harris, « On the Optical Rotary Dispersion of Polymers », *J. Chem. Phys.*, vol. 43, n° 3, p. 959-970, août 1965, doi: 10.1063/1.1696878.
- [129] S. Efrima, « The effect of large electric field gradients on the Raman optical activity of molecules adsorbed on metal surfaces. », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 102, n° 1, 1983.

- [130] R. M. A. Azzam, « Propagation of partially polarized light through anisotropic media with or without depolarization: A differential 4 X 4 matrix calculus », p. 12.
- [131] P. M. Walmsness, N. Hale, et M. Kildemo, « Spectroscopic Mueller matrix ellipsometry of a gap surface plasmon array at conical incidences », *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 38, n° 9, p. 2551, sept. 2021, doi: 10.1364/JOSAB.432466.
- [132] C. Menzel, C. Rockstuhl, et F. Lederer, « Advanced Jones calculus for the classification of periodic metamaterials », *Phys. Rev. A*, vol. 82, n° 5, p. 053811, nov. 2010, doi: 10.1103/PhysRevA.82.053811.
- [133] L. Li, « Symmetries of cross-polarization diffraction coefficients of gratings », *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 17, n° 5, p. 881, mai 2000, doi: 10.1364/JOSAA.17.000881.
- [134] B. Spackova, P. Wrobel, M. Bockova, et J. Homola, « Optical Biosensors Based on Plasmonic Nanostructures: A Review », *Proc. IEEE*, vol. 104, n° 12, p. 2380-2408, déc. 2016, doi: 10.1109/JPROC.2016.2624340.
- [135] M. A. Otte, B. Sepúlveda, W. Ni, J. P. Juste, L. M. Liz-Marzán, et L. M. Lechuga, « Identification of the Optimal Spectral Region for Plasmonic and Nanoplasmonic Sensing », *ACS Nano*, vol. 4, n° 1, p. 349-357, janv. 2010, doi: 10.1021/nn901024e.
- [136] G. K. Joshi, P. J. McClory, S. Dolai, et R. Sardar, « Improved localized surface plasmon resonance biosensing sensitivity based on chemically-synthesized gold nanoprisms as plasmonic transducers », *J Mater Chem*, vol. 22, n° 3, p. 923-931, 2012, doi: 10.1039/C1JM14391C.
- [137] S. K. Dondapati, T. K. Sau, C. Hrelescu, T. A. Klar, F. D. Stefani, et J. Feldmann, « Label-free Biosensing Based on Single Gold Nanostars as Plasmonic Transducers », *ACS Nano*, vol. 4, n° 11, p. 6318-6322, nov. 2010, doi: 10.1021/nn100760f.
- [138] T. Stakenborg et L. Lagae, « Gold nanoring as a sensitive plasmonic biosensor for on-chip DNA detection », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 100, n° 17, p. 173114, avr. 2012, doi: 10.1063/1.4707382.
- [139] F. J. Rodríguez-Fortuño *et al.*, « Highly-sensitive chemical detection in the infrared regime using plasmonic gold nanocrosses », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 98, n° 13, p. 133118, mars 2011, doi: 10.1063/1.3558916.
- [140] S. Lee, K. M. Mayer, et J. H. Hafner, « Improved Localized Surface Plasmon Resonance Immunoassay with Gold Bipyramid Substrates », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 11, p. 4450-4455, juin 2009, doi: 10.1021/ac900276n.
- [141] F. Abbassi *et al.*, « Temporin-SHf, a New Type of Phe-rich and Hydrophobic Ultrashort Antimicrobial Peptide », *J Biol Chem*, vol. 285, n° 22, p. 16880-16892, mai 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.097204.
- [142] L. Zhang, Y. Mazouzi, M. Salmain, B. Liedberg, et S. Boujday, « Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected

Applications », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 165, p. 112370, oct. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112370.

[143] T. Buffeteau, B. Desbat, et J. M. Turlet, « Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-Thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis », *Appl. Spectrosc.*, vol. 45, n° 3, p. 380-389, mars 1991, doi: 10.1366/0003702914337308.

[144] A. Vallée, « Vers une compréhension des interfaces biomolécules-surfaces métalliques : Adsorption de petits peptides sur des surfaces d'or, de l'Ultra Haut Vide à la phase liquide », *Thèse Dr. Univ. Pierre Marie Curie*, 2009.

[145] K. L. Zapadka, F. J. Becher, A. L. Gomes dos Santos, et S. E. Jackson, « Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics », *Interface Focus*, vol. 7, n° 6, p. 20170030, déc. 2017, doi: 10.1098/rsfs.2017.0030.

[146] J. Bandekar, « Amide modes and protein conformation », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1120, n° 2, p. 123-143, avr. 1992, doi: 10.1016/0167-4838(92)90261-B.

[147] H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, et S. Yu, « Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy », *Nat. Protoc.*, vol. 10, n° 3, p. 382-396, mars 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.024.

[148] Y. Jiang *et al.*, « Qualification of FTIR spectroscopic method for protein secondary structural analysis », *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, n° 11, p. 4631-4641, nov. 2011, doi: 10.1002/jps.22686.

[149] S. Boujday, A. Bantegnie, E. Briand, P.-G. Marnet, M. Salmain, et C.-M. Pradier, « In-Depth Investigation of Protein Adsorption on Gold Surfaces: Correlating the Structure and Density to the Efficiency of the Sensing Layer », *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, n° 21, p. 6708-6715, mai 2008, doi: 10.1021/jp711916g.

[150] G. Sauerbrey, « Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung », *Z. Phys.*, vol. 155, p. 206-22, 1959.

[151] M. P. Jonsson, P. Jönsson, et F. Höök, « Simultaneous Nanoplasmonic and Quartz Crystal Microbalance Sensing: Analysis of Biomolecular Conformational Changes and Quantification of the Bound Molecular Mass », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 21, p. 7988-7995, nov. 2008, doi: 10.1021/ac8008753.

[152] A. R. Ferhan, J. A. Jackman, et N.-J. Cho, « Integration of Quartz Crystal Microbalance-Dissipation and Reflection-Mode Localized Surface Plasmon Resonance Sensors for Biomacromolecular Interaction Analysis », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 24, p. 12524-12531, déc. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04303.

[153] J. Vörös, « The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers », *Biophys. J.*, vol. 87, n° 1, p. 553-561, juill. 2004, doi: 10.1529/biophysj.103.030072.

[154] Z. Qin, S. K. Balasubramanian, W. F. Wolkers, J. A. Pearce, et J. C. Bischof, « Correlated Parameter Fit of Arrhenius Model for Thermal Denaturation of Proteins and Cells », p. 13.

- [155] B. J. Bennion et V. Daggett, « The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 9, p. 5142-5147, avr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0930122100.
- [156] P. Thébault, S. Boujday, H. Sénéchal, et C.-M. Pradier, « Investigation of an Allergen Adsorption on Amine- and Acid-Terminated Thiol Layers: Influence on Their Affinity to Specific Antibodies », *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, n° 32, p. 10612-10619, août 2010, doi: 10.1021/jp103164b.
- [157] Y. Mazouzi *et al.*, « Biosensing Extracellular Vesicle Subpopulations in Neurodegenerative Disease Conditions », *ACS Sens.*, p. accsensors.1c02658, avr. 2022, doi: 10.1021/acssensors.1c02658.
- [158] M. Tkach et C. Théry, « Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go », *Cell*, vol. 164, n° 6, p. 1226-1232, mars 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- [159] A. Blandin et S. Le Lay, « Exosomes, vésicules extracellulaires et dialogue inter-organes », *Médecine Mal. Métaboliques*, vol. 14, n° 3, p. 250-257, mai 2020, doi: 10.1016/j.mmm.2020.01.013.
- [160] N. Cheng *et al.*, « Recent Advances in Biosensors for Detecting Cancer-Derived Exosomes », *Trends Biotechnol.*, vol. 37, n° 11, p. 1236-1254, nov. 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2019.04.008.
- [161] L. Zhu *et al.*, « Label-Free Quantitative Detection of Tumor-Derived Exosomes through Surface Plasmon Resonance Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 17, p. 8857-8864, sept. 2014, doi: 10.1021/ac5023056.
- [162] K. Ichimoto, K. Shinoda, T. Yamamoto, et J. Kiyohara, « Photopolarimetric Measurement System of Mueller Matrix with Dual Rotating Waveplates », p. 9.
- [163] R. M. A. Azzam, « Photopolarimetric measurement of the Mueller matrix by Fourier analysis of a single detected signal », *Opt. Lett.*, vol. 2, n° 6, p. 148, juin 1978, doi: 10.1364/OL.2.000148.
- [164] R. W. Collins et J. Koh, « Dual rotating-compensator multichannel ellipsometer: instrument design for real-time Mueller matrix spectroscopy of surfaces and films », *J Opt Soc Am A*, vol. 16, n° 8, p. 1997, août 1999, doi: 10.1364/JOSAA.16.001997.
- [165] P. S. Hauge, « Mueller matrix ellipsometry with imperfect compensators », *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 68, n° 11, p. 1519, nov. 1978, doi: 10.1364/JOSA.68.001519.
- [166] G. Piller, L. Broch, et L. Johann, « Experimental study of the systematic errors for a Mueller matrix double rotating compensator ellipsometer », *Phys. Status Solidi C*, vol. 5, n° 5, p. 1027-1030, mai 2008, doi: 10.1002/pssc.200777750.
- [167] C. Zhang, D. Wen, F. Yue, Y. Intaravanne, W. Wang, et X. Chen, « Optical Metasurface Generated Vector Beam for Anticounterfeiting », *Phys Rev Appl.*, vol. 10, n° 3, p. 034028, sept. 2018, doi: 10.1103/PhysRevApplied.10.034028.

- [168] L. Li, « Technology designed to combat fakes in the global supply chain », *Bus. Horiz.*, vol. 56, n° 2, p. 167-177, mars 2013, doi: 10.1016/j.bushor.2012.11.010.
- [169] S. J. Tan *et al.*, « Plasmonic Color Palettes for Photorealistic Printing with Aluminum Nanostructures », *Nano Lett*, vol. 14, n° 7, p. 4023-4029, juill. 2014, doi: 10.1021/nl501460x.
- [170] W. S. Mokrzyck et M. Tatol, « Color difference ΔE -A survey », *Mach Graph Vis.*, vol. 20, p. 383-411, 2011.
- [171] L. Duempelmann, A. Luu-Dinh, B. Gallinet, et L. Novotny, « Four-Fold Color Filter Based on Plasmonic Phase Retarder », *ACS Photonics*, vol. 3, n° 2, p. 190-196, févr. 2016, doi: 10.1021/acsp Photonics.5b00604.
- [172] M. Makhsiyani, P. Bouchon, J. Jaeck, J.-L. Pelouard, et R. Haïdar, « Shaping the spatial and spectral emissivity at the diffraction limit », *Appl Phys Lett*, vol. 107, n° 25, p. 251103, déc. 2015, doi: 10.1063/1.4937453.
- [173] P. Zijlstra, J. W. M. Chon, et M. Gu, « Five-dimensional optical recording mediated by surface plasmons in gold nanorods », *Nature*, vol. 459, n° 7245, p. 410-413, mai 2009, doi: 10.1038/nature08053.
- [174] N. A. Rubin, G. D'Aversa, P. Chevalier, Z. Shi, W. T. Chen, et F. Capasso, « Matrix Fourier optics enables a compact full-Stokes polarization camera », *Science*, vol. 365, n° 6448, p. eaax1839, juill. 2019, doi: 10.1126/science.aax1839.
- [175] S. Hashiyada, T. Narushima, et H. Okamoto, « Active Control of Chiral Optical near Fields on a Single Metal Nanorod », *ACS Photonics*, vol. 6, n° 3, p. 677-683, mars 2019, doi: 10.1021/acsp Photonics.8b01500.

Annexes

Annexe 1

Cette Annexe généralise les résultats présentés au Chapitre 2 pour l'élément MM_{12} de la matrice de Mueller à tous les éléments de cette matrice. A savoir la détermination à l'aide d'Ansys-HFSS des décalages spectroscopiques lors d'un changement de solvant $H_2O/EtOH$, la sensibilité associée à un réseau de résonateurs en U et finalement le facteur de mérite alternatif.

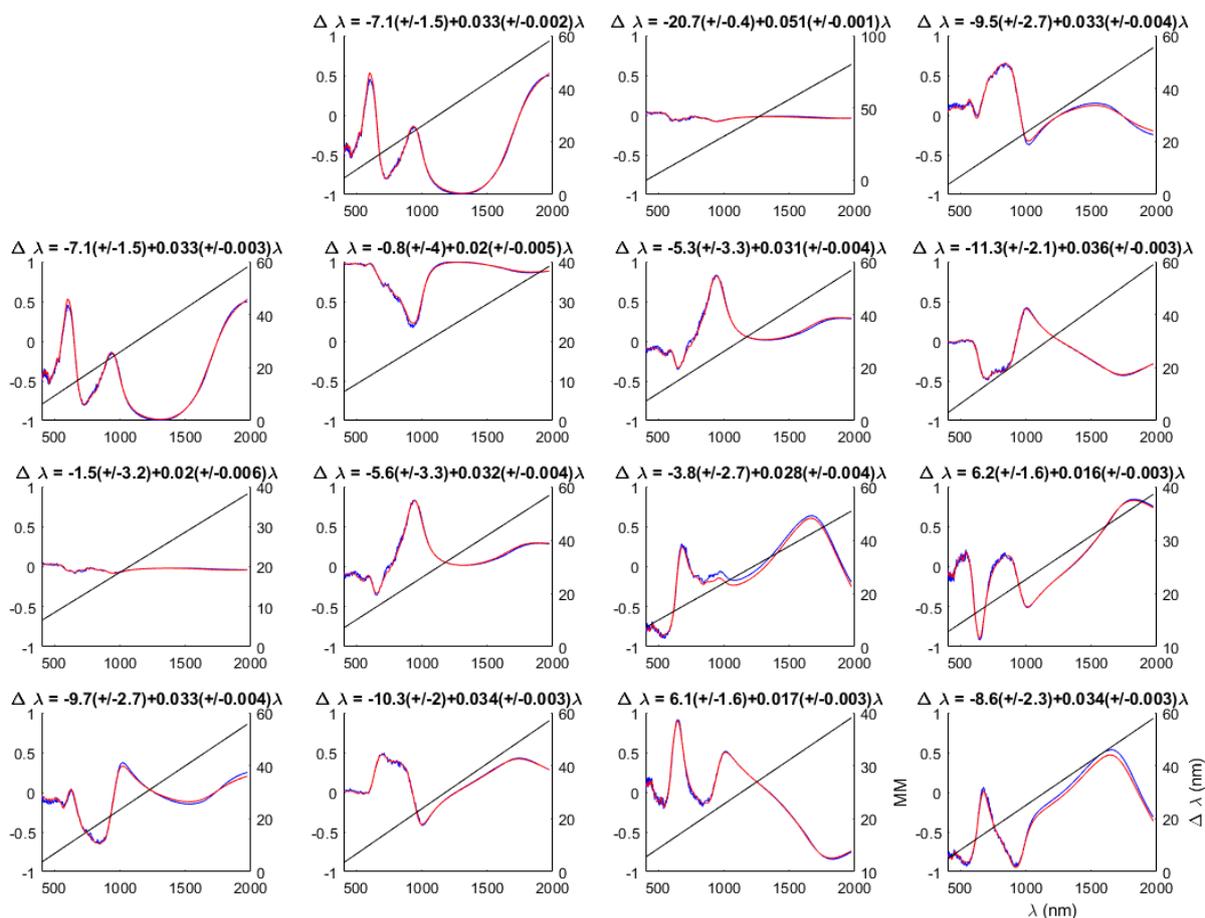


Figure 97 : Décalage spectroscopique associé à deux matrices de Mueller dans l'eau (bleu) et l'éthanol (rouge). Le décalage spectroscopique est déterminé *via* un fit.

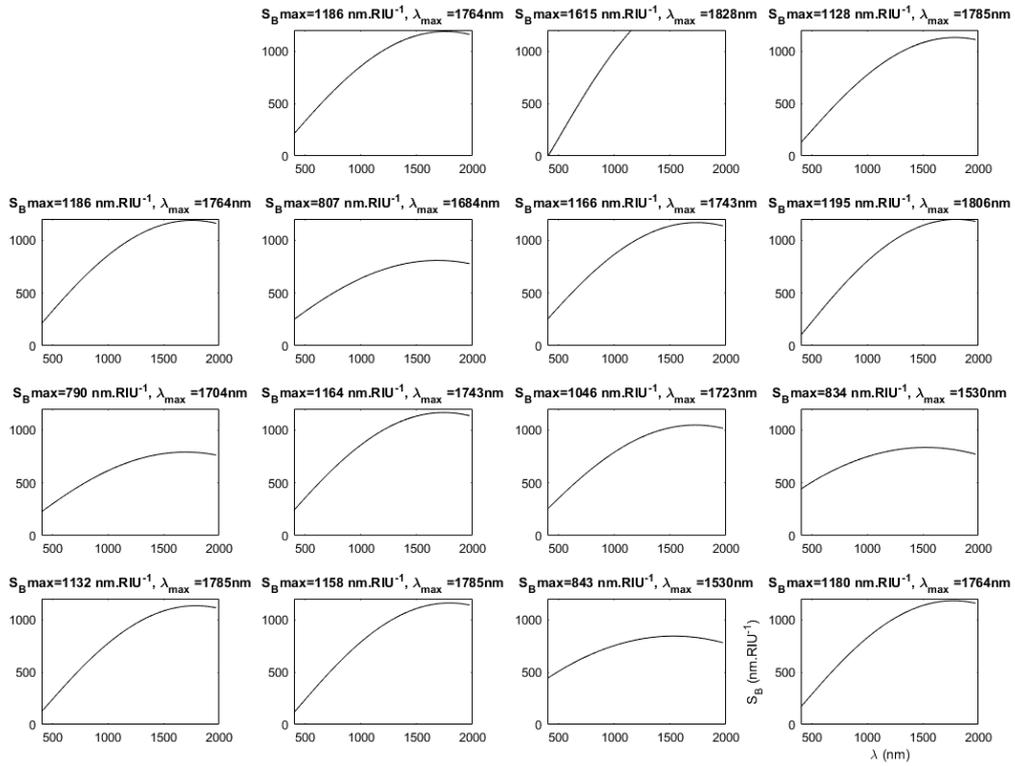


Figure 98 : Sensibilité S_B associé à un réseau de résonateurs en U déterminé à l'aide d'HFSS-Ansys.

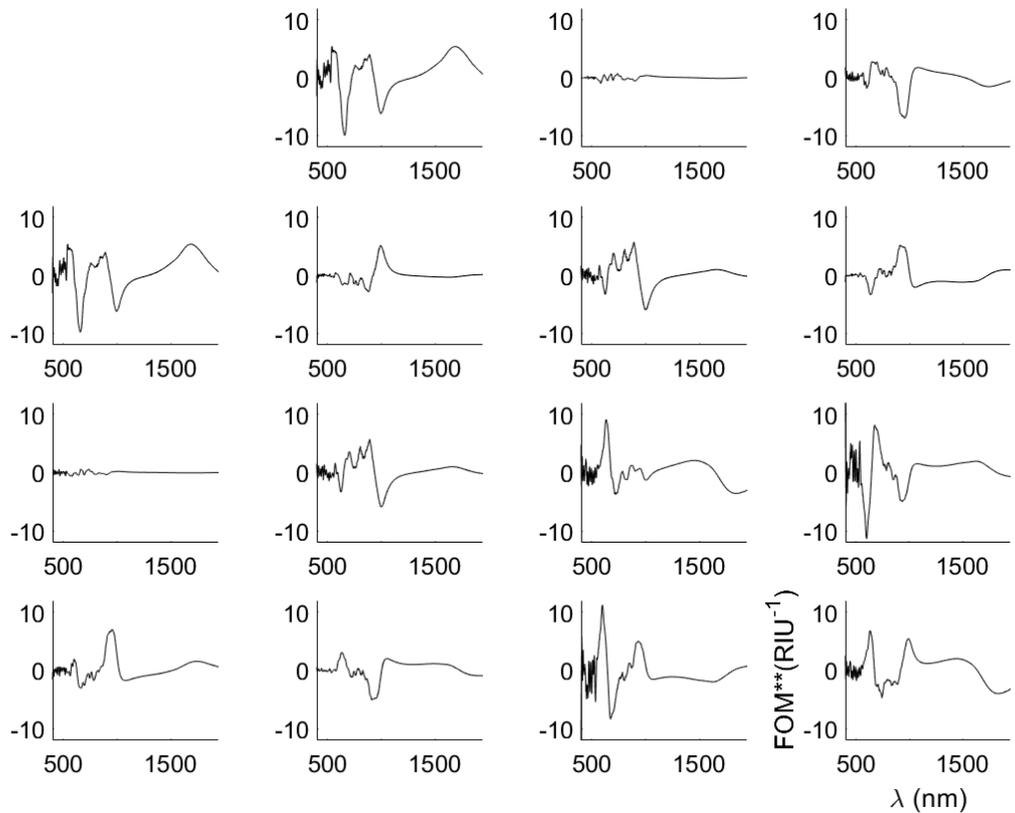


Figure 99 : Facteur de mérite alternatif FOM^{**} associé à un réseau de résonateurs en U déterminé à l'aide d'HFSS-Ansys.

Annexe 2

L'alignement nécessite une procédure précise pour vérifier les caractéristiques souhaitées de la matrice de Mueller. Tout d'abord, il faut calibrer le système afin de positionner les axes de polarisation de la lumière dans le plan d'incidence de la surface étudié. Pour ce faire, un substrat de Silicium est aligné en autocollimation tout en maximisant le signal. Ensuite des lentilles de focalisation sont positionnées ce qui permettra à terme de mesurer la zone lithographiée contenant les U uniquement et de réduire l'influence du substrat de verre dans la mesure. Le porte échantillon utilisé pour la mesure des résonateurs en U n'est pas le même que pour le substrat de silicium. Il est nécessaire de conserver le même alignement et la mise en place d'un laser d'alignement inamovible extérieur au système permet de faire cela en modifiant les tilts du porte-échantillon. En outre il faut positionner le spot sur la métasurface grâce aux déplacements x/y présents sur le porte-échantillon et à une caméra de visualisation. De plus, la focalisation du spot sur la surface d'intérêt se fait grâce à un déplacement en profondeur z. Finalement, il faut aligner, l'angle azimutal grâce à un dernier réglage ϕ . Les positions des réglages associés aux différents degrés de liberté sont montrés sur la Figure 100.

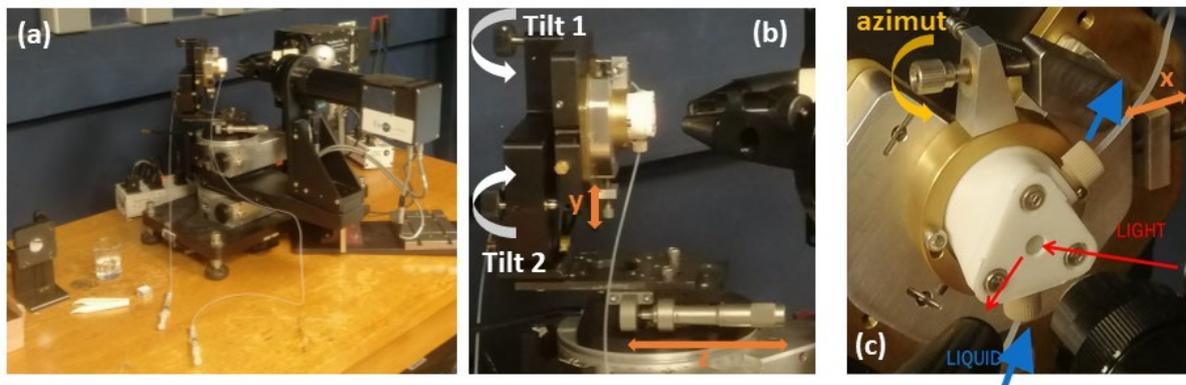


Figure 100 : (a) Photographie de l'ellipsomètre utilisé, (b) positionnement des réglages de tilt, y et z et (c) positionnement de la cellule liquide avec les arrivées de liquide ainsi que les positions de réglages de l'azimut et du degré de liberté x.

Les mesures se faisant à travers le substrat il faut vérifier en permanence que l'on récupère bien le signal de la métasurface et pas de la face arrière (la plus proche donc, pour le faisceau). Et aussi que la mesure est réalisée au milieu de la métasurface : la photo montrée sur la Figure 101 illustre cela.

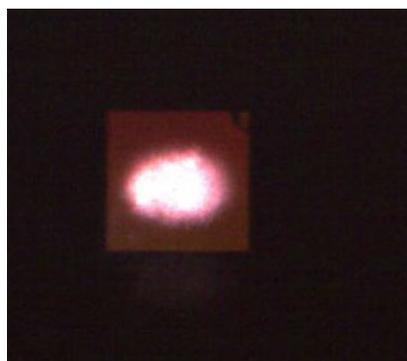


Figure 101 : Photo de la métasurface avec le spot centré (lumière blanche).

La procédure d'alignement est résumée dans le Tableau 21 qui suit avec les critères utilisés.

Tableau 21 : Procédure d'alignement pour la mesure de la matrice d Mueller d'une métasurface en ellipsométrie généralisée.

Etapes	Opérations effectuées	Critères de satisfaction
Alignement substrat de Silicium	Faisceau au milieu du substrat Autocollimation du substrat avec les tilts Maximisation du signal en z	Spot centré sur détecteur Maximisation du signal
Alignement lentilles de focalisation	Modification des tilts des lentilles	Spot centré sur détecteur Maximisation du signal
Positionnement du laser d'alignement	Un point de sortie du laser est choisi avec un passage par un diaphragme	Positionnement des éléments
Alignement de la métasurface en incidence normale	Autocollimation et spot sur métasurface	Modification des x/y et des tilts
Alignement de la métasurface à 45 °	Alignement des tilts donc du plan d'incidence	Tilts et positionnement du laser d'alignement
	Spot centré sur métasurface	Déplacements x/y avec caméra
	Intensité du signal	Focalisation du spot sur la face arrière de l'échantillon avec le déplacement en z
Maximisation des éléments	Optimisation de la focalisation	Maximisation de la valeur de M_{14}
Réglage de l'angle azimutal	Modification progressive de l'angle	Minimisation de : $\int_{\lambda=400nm}^{\lambda=2000nm} \left(\begin{array}{c} M_{12}(\lambda) - M_{21}(\lambda) \\ + \\ M_{13}(\lambda) - M_{31}(\lambda) \\ + \\ M_{23}(\lambda) - M_{32}(\lambda) \end{array} \right) d\lambda$

Annexe 3

La Figure 102 présente $\Delta_{23} = MM_{23} - MM_{32}$ avant (bleu) et après (rouge) adsorption pour quatre biomolécules : la temporine (D-Sha-Cter), la β -lactoglobuline, la protéine A et une vésicule extracellulaire. Ces données permettent de calculer les différences en Δ_{23} présentées dans le Chapitre 5 sur la Figure 77, la Figure 79 (c) et la Figure 80 On observe sur ces courbes que le décalage observé avant et après adsorption se déroule dans une zone spectroscopique précise entre 1000 nm et 1500 nm.

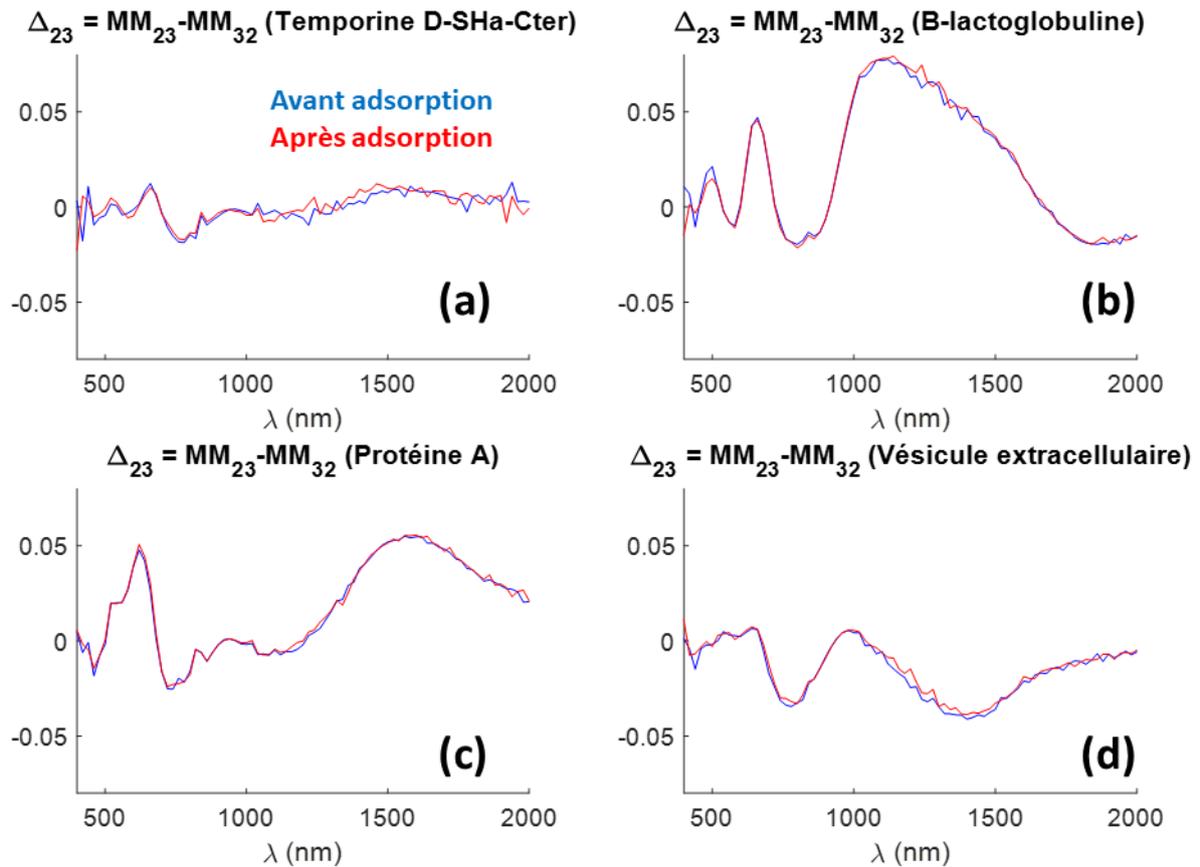


Figure 102 : Δ_{23} avant (bleu) et après (rouge) adsorption dans PBS pour (a) la temporine (D-Sha-Cter), (b) la β -lactoglobuline, (c) la protéine A et (d) une vésicule extracellulaire.

Annexe 4

On présente ici l'interface Labview réalisée (Figure 103) qui permet de faire les mesures associées au μ -polarimètre ainsi que la procédure d'alignement (Figure 104) permettant l'utilisation de compensateurs tournants continuellement. A la fin de la mesure, l'interface génère une série d'images au format .AVI et un fichier texte contenant en colonnes au temps de chaque image : le temps de la mesure, la position du compensateur 1 et la position du compensateur 2.

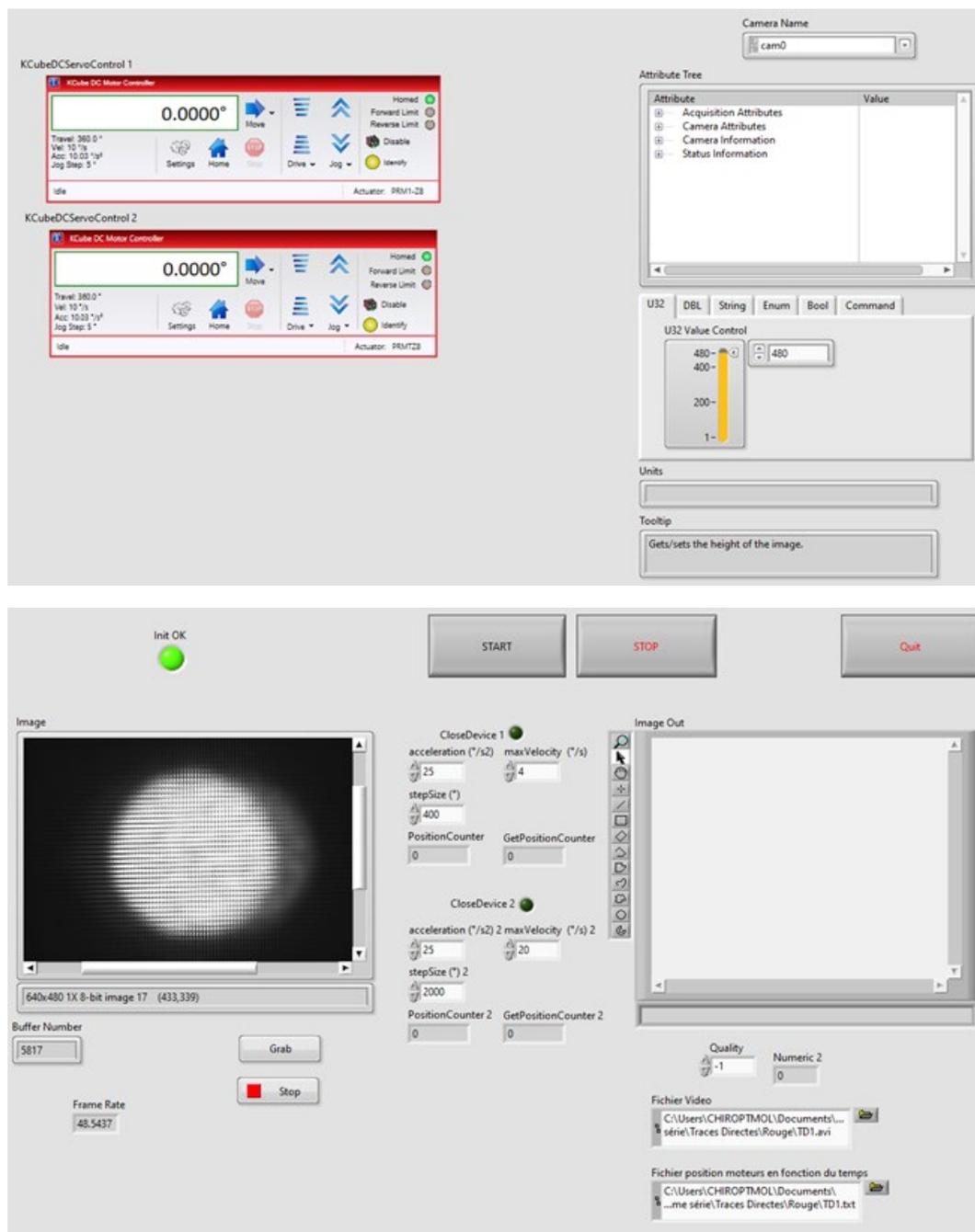


Figure 103 : Interface Labview permettant de faire les mesures associées au μ -polarimètre.

Alignement des compensateurs tournants

L'alignement se fait en auto-collimation avec le laser d'alignement du μ -polarimètre. Pour ceci il faut un trait-point-plan sur le porte compensateur, une rotation verticale et un tilt (avant-arrière) sur le support du moteur. L'objectif est de faire se confondre les trois axes suivants : la normale à la surface du compensateur, l'axe de rotation du moteur et l'axe optique du μ -polarimètre. La procédure est décrite dans la Figure 104. Tout d'abord on joue sur les tilts du compensateur pour ramener le spot réfléchi par le compensateur sur la source. Ensuite on répète les étapes suivantes jusqu'à confondre le spot réfléchi avec la source :

1/ on fait tourner le compensateur de 180° . Le faisceau réfléchi se décale et on le recentre jusqu'à mi-chemin du centre en jouant sur la rotation et le tilt du support du moteur.

2/ on fait tourner le compensateur de 180° . Le faisceau réfléchi se décale et on recentre jusqu'à mi-chemin du centre en jouant sur les tilts du porte-compensateur.

Cette procédure converge en quelques itérations. On peut estimer l'erreur sur la position du spot réfléchi sur la source à moins d'un millimètre. La distance du premier compensateur à la source est d'environ 50 cm, ce qui fait une erreur d'alignement de moins de 0.1° . Le deuxième compensateur se trouve à environ 90 cm de la source, l'erreur d'alignement est inférieure à 0.06° .

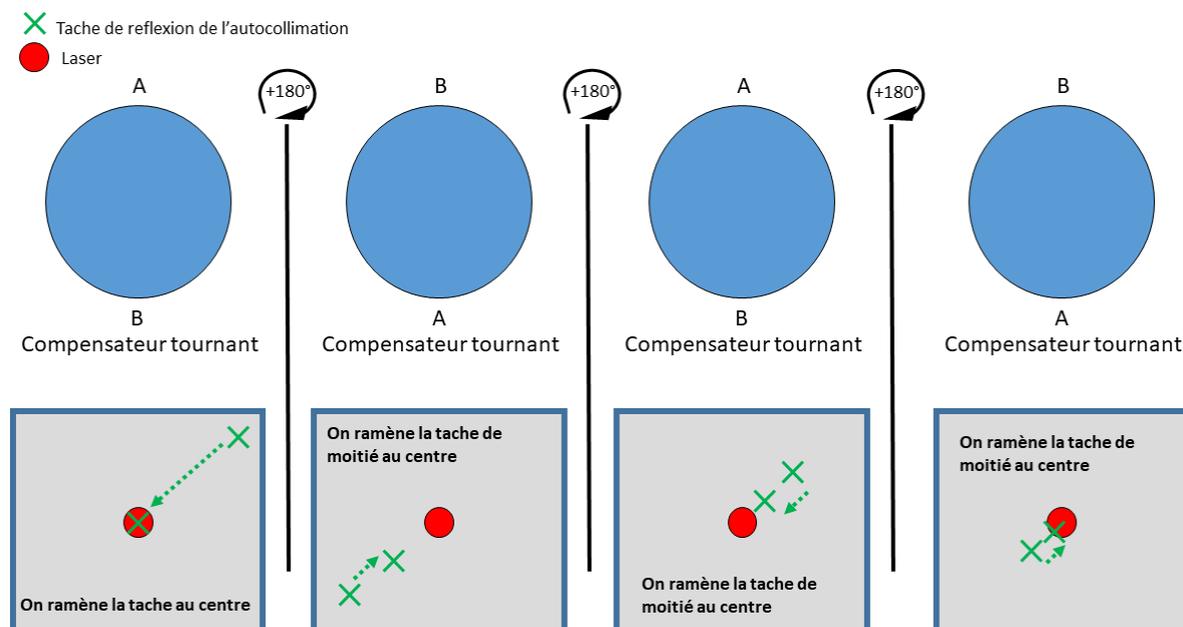


Figure 104 : Procédure dichotomique d'alignement pour les compensateurs tournants.

En parallèle, il faut aussi que le faisceau soit centré sur le compensateur. Ceci se fait en lumière blanche et en vérifiant que le faisceau reste diaphragmé de la même façon au cours de la rotation du compensateur. La procédure d'alignement est similaire à celle de la rotation sauf qu'on utilise des déplacements en x et y : un sur le porte-compensateur, un sur le support du moteur (Figure 105). L'alignement est plus qualitatif dans ce cas, l'objectif est que les bords de l'image sur la caméra gardent un contraste constant au cours de la rotation des compensateurs.

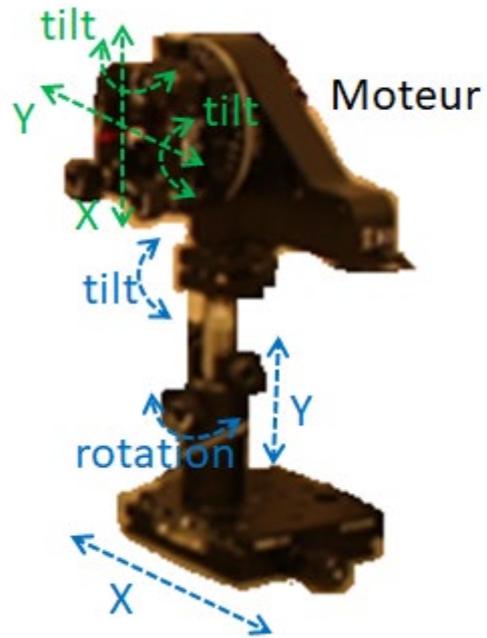


Figure 105 : Alignements présents sur chaque lame quart d'onde : en bleu les mouvements sur le support du moteur, en vert les mouvements sur le porte quart-d'onde.

Annexe 5

Cette Annexe correspond à une revue publiée en 2022 dans le journal Antibiotics, MDPI :

”Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices”



Review

Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices

Mathieu Nicolas^{1,2}, Bruno Beito³, Marta Oliveira³, Maria Tudela Martins³, Bruno Gallas², Michèle Salmain⁴, Souhir Boujday^{1,*} and Vincent Humblot^{1,5,*}

¹ Sorbonne Université, UMR 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 4 Place Jussieu, F-75005 Paris, France; mathieu.nicolas@insp.jussieu.fr

² Sorbonne Université, Institute of Nanosciences Paris (INSP), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 4 Place Jussieu, F-75005 Paris, France; gallas@insp.jussieu.fr

³ Sorbonne Université, Master de Chimie, Profil MatNanoBio, Faculté des Sciences et Ingénierie de Sorbonne Université, 4 Place Jussieu, F-75005 Paris, France; beitobruno_17@hotmail.com (B.B.); Marta.rdo.97@gmail.com (M.O.); maria.tudela.martins@gmail.com (M.T.M.)

⁴ Sorbonne Université, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 4 Place Jussieu, F-75005 Paris, France; michele.salmain@sorbonne-universite.fr

⁵ Franche-Comté Électronique Mécanique Thermique et Optique-Sciences et Technologies (FEMTO-ST) Institute, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 6174, Université Bourgogne Franche-Comté, 15B Avenue des Montboucons, F-25030 Besançon, France

* Correspondence: souhir.boujday@sorbonne-universite.fr (S.B.); vincent.humblot@femto-st.fr (V.H.)



Citation: Nicolas, M.; Beito, B.; Oliveira, M.; Tudela Martins, M.; Gallas, B.; Salmain, M.; Boujday, S.; Humblot, V. Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices. *Antibiotics* **2022**, *11*, 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010013>

Academic Editor: Barbara Skerlavaj

Received: 15 November 2021

Accepted: 22 December 2021

Published: 23 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nosocomial and medical device-induced biofilm infections affect millions of lives and urgently require innovative preventive approaches. These pathologies have led to the development of numerous antimicrobial strategies, an emergent topic involving both natural and synthetic routes, among which some are currently under testing for clinical approval and use. Antimicrobial peptides (AMPs) are ideal candidates for this fight. Therefore, the strategies involving surface functionalization with AMPs to prevent bacterial attachment/biofilms formation have experienced a tremendous development over the last decade. In this review, we describe the different mechanisms of action by which AMPs prevent bacterial adhesion and/or biofilm formation to better address their potential as anti-infective agents. We additionally analyze AMP immobilization techniques on a variety of materials, with a focus on biomedical applications. Furthermore, we summarize the advances made to date regarding the immobilization strategies of AMPs on various surfaces and their ability to prevent the adhesion of various microorganisms. Progress toward the clinical approval of AMPs in antibiotherapy is also reviewed.

Keywords: biofilms; AMP; antimicrobial; peptide; immobilization; biofunctionalization

1. Introduction

Biofilms infections caused by implants and medical devices through nosocomial diseases are increasingly present in hospitals, and in order to avoid patient's lives being impacted, novel approaches are needed to prevent these infections. These pathologies have led to the development of numerous antifouling strategies, an emergent topic involving both natural and synthetic routes, among which some are currently under testing for clinical approval and use. By definition, antifouling is the property by which specially designed coatings prevent biofouling. Antifouling can be achieved by preventing bacterial adhesion to surfaces (anti-adhesive strategy) or by exerting a biocidal action (bactericidal or bacteriostatic strategies). Antimicrobial peptides (AMPs) are ideal candidates for the latter. Therefore, the strategies involving surface functionalization with AMPs have experienced a tremendous development over the last decade to prevent bacterial attachment by exerting a biocidal action. In this review, we provide an overview of the methods of immobilization of AMPs on a variety of materials, with a focus on biomedical applications. We additionally

analyze the different mechanisms of action by which AMPs prevent biofilm formation to better understand their potential as anti-infective agents.

It becomes clear that, with their reliable mechanisms of protection and communication, biofilms are not only extremely hard and costly to remove, but also very resistant to current antibiotic treatments [1]. Thus, a new preventive approach has been taken to address this issue, involving antimicrobial peptides as a viable solution. These peptides, which are part of the immune response of several organisms against microbial invasion, can be immobilized onto surfaces to prevent the formation of biofilms at their early stages so that removal of the unwanted microorganisms in a later stage becomes unnecessary [2]. Currently, more research is being put into this subject and, along with AMP coatings, numerous techniques for preventing biofilms formation are being investigated [3–5] such as interception of the quorum sensing (QS) system [6], microstructure topographic exploitation [7], use of alternative antibacterial compounds like quaternary ammonium salts [8], among others.

Conceptually, AMPs represent a promising alternative to antibiotics when it comes to overcoming bacterial resistance to treatment. However, their clinical approval is still pending due to insufficient efficiency and possible toxicity to the surrounding tissues. In what follows, we will focus on the biomedical applications of AMPs and discuss their potential as therapeutic agents to fight biofilm infections. We will describe different AMPs and their utility, along with the diversity of surfaces where they can be immobilized.

2. Biofilms Formation and Resistance

Biofilms, although yet to be named at that time, were first scientifically referenced by Anton van Leeuwenhoek in the 17th century by his description of “*animaculi*” in his own dental plaque. Although it took a long time for this observation to be recognized by his peers, he is now considered as a pioneer in the field of microbiology [9,10].

Currently, biofilms are defined as an irreversibly attached microbial aggregates incorporated in a matrix of self-produced extracellular polymeric substances (EPSs), Figure 1. This matrix is composed of polysaccharides, extracellular DNA and various proteins, glycoproteins and glycolipids [11–13]. In advantage to planktonic bacterial cells, these sessile communities thrive in a range of different environments and hosts due to their phenotypically distinctive mode of growth [14,15]. Along with this protective mechanism, biofilms comprise a circulatory system by which the colonies can receive nutrients. In addition, biofilms also hold the ability to coordinate gene expression conforming to cell density, phenomenon known as quorum sensing [16,17].

These features make biofilms highly infectious and enhance their resistance to treatment. In fact, these microorganisms are responsible for past and present large epidemic infections. They still affect millions of individuals by causing microbial infections [18], especially through implanted medical devices [19,20]. Furthermore, biofilms are also a cause for concern in a very significant number of industrial fields, such as food, paper, air conditioning, and water processing, to name a few [21–23]. For all of these reasons, the hazards of biofilm formation and the urgency to find more efficient and effective ways to eliminate them are topics of ongoing investigations, due in part to the great source of expenditure in money and resources that it represents in the present day.



Figure 1. Scanning electron microscopy image of *P. aeruginosa* PA14, cultured as a pellicle. Reproduced from [24]. Copyright © 2011 Franklin et al.

One major issue when dealing with biofilms, from a biomedical point of view, is their intrinsic resistance to antimicrobial agents. While planktonic bacterial cells can be eliminated most of the time with proper antibiotics, bacteria in their sessile state (i.e., mature irreversible biofilms) show, in most cases, a much lower vulnerability to antimicrobial treatment [15,25]. This phenomenon can be explained by multiple factors among which the fact that the EPSs matrix prevents the antimicrobial agents from reaching deep into the biofilm and therefore defies the diffusion of antibiotics. Another reason for biofilms resistance is the fact that when there is a nutrient limitation (as it could be the case for a mature biofilm), bacteria slow their growth rate and behave as if in a stationary phase. Therefore, it is believed that stationary phase can be responsible for the insusceptibility of biofilms to antibiotics. Amongst several others, these defense strategies provide biofilms with a powerful protective response to antibacterial treatment [2].

The high resistance of biofilms to antimicrobial agents is partly understandable when investigating the mechanism of their formation. The complex process of biofilm formation starts with an initial attachment of planktonic cells onto the surface, Figure 2. In the particular case of the surface of biomedical devices, this adhesion process can sometimes be facilitated by proteins and glycoproteins that coat the surface as a natural reaction of the host to the device [26]. The rate of attachment is also dependent on the characteristics of the microbial cells, such as the presence of appendages [27]. The reversible attachment phase is followed by progression to a sessile state, where the quorum sensing system is initiated within the microcolonies and when the building process of the biofilm becomes irreversible, Figure 2. The cells secrete the polysaccharides that make up the matrix of EPSs, which gives structure to the now matured biofilm. After maturation, cells begin to detach from the biofilm, initiating the dispersion phase by induction of disassembly factors [28].

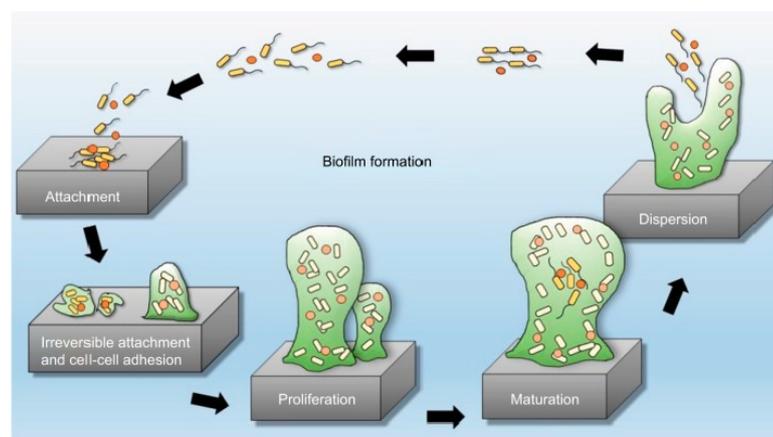


Figure 2. Five stages of biofilm development. Reproduced from [29]. Copyright © 2018 Abu Bakar et al. Reproduced by permission from Perfectus Biomed Limited. <http://perfectusbiomed.com/cbe-meeting-anti-biofilm-technologies/>.

To conclude, owing to their reliable mechanisms of protection and communication, biofilms are therefore extremely hard and costly to remove, but also very resistant to current antibiotic treatments. In what follows we will focus on the biomimetic approach relying on the use antimicrobial peptides (AMPs).

3. Antimicrobial Peptides (AMPs) Structure and Mechanism of Action

AMPs are short amphiphilic peptides composed of 12 to 100 amino acids, present in the first line of defense of multiple organisms [30–32]. They were first isolated in the 1980s from the frog species *Xenopus laevis*, whose skin provides a defense mechanism against microbes through the presence of one particular cationic AMP: magainin, an amphipathic α -helix 23 AA-residues peptide [33]. This AMP prevents formation of biofilm by disrupting the bacterial cell membrane [34], without interfering with the host cells.

To date, the antibacterial polymer database (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/>) lists 3273 AMPs among which 369 bacteriocins (from bacteria), 5 AMPs from archaea, 8 from protists, 22 from fungi, 361 from plants, and 2424 from animals, the main source of AMPs. These peptides have among others antibiofilm, antiprotozoal action [2,35], antibacterial [36], antiviral [37], antifungal [38], antiparasitic [39], anticancer [40], antioxidant [41], chemotactic [42], insecticidal [36], or even wound healing [43] properties.

The mechanism of action of AMPs responsible for their antibacterial activity is based on the integration and consecutive disruption of the phospholipid bilayer of microbial cells, which can be achieved by different pathways. The main models are the barrel-stave, the toroidal (or wormhole) pore and the carpet models, as shown in Figure 3. In the barrel-stave mechanism, the peptides penetrate the membrane and form a pore so that the hydrophobic regions of the peptides face the lipid core, and the hydrophilic regions outline the inside of the pore, as shown in Figure 3A. The carpet model is a result of the parallel orientation of the peptides with respect to the lipid bilayer surface and formation of a peptide carpet, disrupting the membrane, as shown in Figure 3B. Finally, in the toroidal pore model (Figure 3C), the peptides induce the phospholipid layer molecules to curve inwards, creating a pore where the hydrophilic regions of the peptides and the lipid groups of the layer molecules face the interior of the pore [44–47]. In addition to these three main models, several other mechanisms also characterize the mode of action of certain AMPs, including strategies that diverge from a membrane-disruption approach [46].

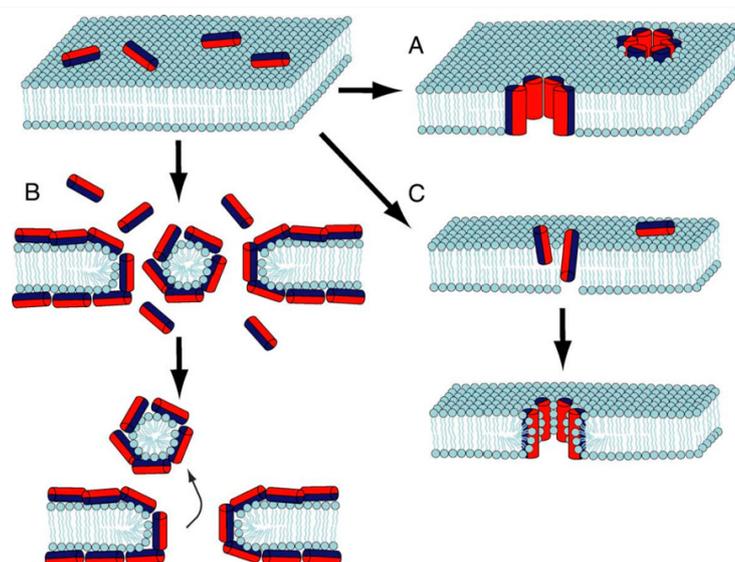


Figure 3. Antimicrobial peptide mechanisms of action. (A) The barrel-stave model. (B) The carpet model. (C) The toroidal or wormhole pore model. Adapted from [48]. Copyright © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Therefore, antimicrobial peptides can be categorized according to different features. One major feature is their secondary and tertiary structures that differ from aqueous solvents to a membranomimetic medium, as well as their interactions with membrane vesicles. Based on these three-dimensional secondary and tertiary structures, which can be determined by NMR spectroscopy [49], AMPs are divided into four categories as depicted in Figure 4: (i) α when the major secondary structure of the peptide is α -helical, (ii) β if the structure contains at least a pair of two-strands, (iii) $\alpha\beta$ for peptides with both types of structure, (iv) non- $\alpha\beta$ if none of the structures are present. The secondary and tertiary structures of AMPs are believed to play an important role in the mechanism of action against microbial cells, particularly in the process of integration in the cell membrane [47], albeit in 2021 only about 40% of AMPs have in fact a known 3D structure [50].

Another classification of AMPs divides them into four different families, which additionally includes the amino acid composition. This categorization includes cationic AMPs, which can be (i) linear helical peptides (that is to say non-cyclic peptides with a helical secondary structure), (ii) peptides enriched with one amino acid, (iii) peptides with one disulfide bridge and (iv) peptides with more than one disulfide bridge [44].

One major advantage of antimicrobial peptides that focused attention as a possible alternative to conventional antibiotic treatments is the low development of resistance by these antimicrobial agents, which overcomes the crucial problem of dangerously rapid ineffectiveness of regular therapies when combating sensitive bacterial strains [51,52]. Furthermore, AMPs also show activity against a broad range of microorganisms. The natural defense system via antimicrobial peptides present in a wide variety of animal, insect and plant species suggested the use of AMPs as therapeutic agents against biofilm infections, either on their own or incorporated in a classic antibiotic treatment for a synergistic enhancement of effectiveness [53,54].

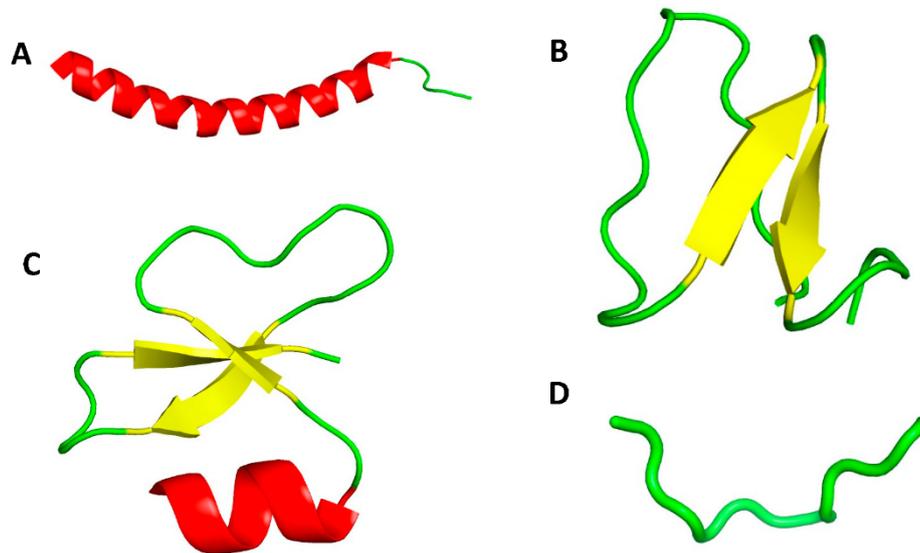


Figure 4. Three-dimensional (3D) structures of representative antimicrobial peptides. (A) α -helical Scheme 37. (PDB code: 2K6O); (B) β -sheet structure of plant kalata B1 (PDB code: 1NB1); (C) $\alpha\beta$ structure of human β -defensin-1 HBD-1 (PDB code: 1IJV); (D) non- $\alpha\beta$ structure of cattle indolicidin (PDB code: 1G89).

Despite their great potential as anti-infective agents, clinical approval of AMPs has been setback for various reasons. In 2019, Koo and coworkers [55] reported that 70 natural and synthetic AMP were in preclinical and clinical trials at different stages with only 2% being FDA approved to date. Systemic and local toxicity, questionable proteolytic stability, pH sensitivity and production cost are among the critical drawbacks that have prevented FDA approval of AMPs as therapeutic agents. In other cases, treatment with antimicrobial peptides has shown no obvious advantages over conventional antibiotics [53,56–58]. A more detailed list of the antimicrobial peptides that have undergone clinical and preclinical trials is documented in Table 1.

It has become clear over the last 2 decades, that the immobilization techniques for surfaces coating represent a crucial factor in the success of AMPs for preventing biofilm formation or bacterial contamination. In the next section, we intent to summarize the work developed to date with an in-depth description of immobilization strategies for a wide range of surfaces.

Table 1. AMPs in clinical trials (phase I-III) and preclinical trials (2019). Data collected from ref. [53,55,59–62].

AMP	AMP Source	Target ^a	Phase	Company
EA-230	hCG derivative	Sepsis and renal failure protection	II	Exponential Biotherapies
CZEN-002	α-MSH derivative	Anti-fungal	II	Zengen
XMP-629	BPI derivative	Impetigo and acne rosacea	III	Xoma Ltd.
Neuprex(rBPI21)	BPR derivative	Pediatric meningococemia	III	Xoma Ltd.
Delmitide(RDP58)	HLA class I derivative	Inflammatory bowel disease	II	Genzyme
Ghrelin	Endogenous HDP	Chronic respiratory failure	II	University of Miyazaki; Papworth Hospital
NVB-302	Lantibiotic	<i>C. difficile</i>	I	Novacta
hLF1-11	Lactoferricin derivative	MRSA, <i>K. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i>	I/II	AM-Pharma
Wap-8294A2 (Lotilibicin)	<i>Lysobacter</i> spp.	G(+) bacteria (VRE, MRSA)	I/II	aRigen
DPK-060	Kininogen derivative	Acute external otitis	II	ProMore Pharma
PXL01	Lactoferrin analog	Postsurgical adhesions	III	ProMore Pharma
PAC113	Histatin 5 analog	Oral candidiasis	II	Pacgen Biopharmaceuticals
POL7080	Protegrin analog	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>	III	Polyphor Ltd.
OP-145	LL-37 derivative	Chronic middle ear infection	II	Dr. Reddy's Research
LL-37	Human cathelicidin	Leg ulcer	II	ProMore Pharma
Novexatin (NP213)	Cyclic cationic peptide	Fungal nail infection	II	Novabiotics
Iseganan (IB-367)	Protegrin analog	Pneumonia, stomatitis	III	IntraBiotics Pharmaceuticals
Pexiganan (MSI-78)	Magainin analog	Diabetic foot ulcers	III	Dipexium Pharmaceuticals
Omiganan (CLS001)	Indolicidin derivative	Rosacea	III	Cutanea Life Sciences
Surotomycin	Cyclic lipopeptide	<i>C. difficile</i> (diarrhea)	III	Cubist Pharmaceuticals/Merck
Ramoplanin (NTI-851)	<i>Actinoplanes</i> spp.	G(+) (VRE, <i>C. difficile</i>)	III	Nano-therapeutics
Friulimicin B	Cyclic lipopeptide	Pneumonia, MRSA	I	MerLion Pharmaceuticals
MU1140	Lantibiotic	G(+) bacteria (MRSA, <i>C. difficile</i>)	P	Oragenics
HB1275	Lipopeptide	Fungal skin infections	P	Helix Biomedix
HB1345	Lipopeptide	Skin infections, acne	P	Helix Biomedix
Arenicin (AP139)	<i>Arenicola marina</i>	G(−) bacteria, UTI	P	Adenium Biotech
AP114	Arenicin analog	<i>C. difficile</i>	P	Adenium Biotech
AP138	Arenicin analog	MRSA	P	Adenium Biotech
Novamycin (NP339)	Poly-arginine cationic peptide	Fungal infections	P	Novabiotics
Avidocin and Purocin	Modified bacteriocin	G(−) bacteria	P	Pylum Biosciences

^a G(+), Gram positive; G(−), Gram negative; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; VRE, vancomycin-resistant *Enterococci*; UTI, urinary tract infection; P, preclinical.

4. Strategies for AMP Immobilization on Surfaces

It is widely accepted that the ideal strategy for successful anti-fouling activity can be achieved by preventing initial attachment of microbial agents, either by anti-adhesive or bactericidal/bacteriostatic approaches. The immobilization techniques for binding AMPs onto

surfaces have proven to be extremely relevant to determine levels of performance [51,63]. Furthermore, a successful immobilization is crucial to avoid or control AMP diffusion and limit toxicity of the antimicrobial coating.

Immobilization can be achieved by a number of different strategies, either by physical methods (adsorption, Layer-by-Layer (LbL)) or chemical methods (covalent bonding, Self-Assembled Monolayers (SAMs)). Recent developments tend to focus on covalent immobilization approaches for the coating of surfaces due to increased stability and efficacy of antimicrobial activity, partnered with decrease in both toxicity levels and AMP diffusion [64–66]. Another important factor to consider when performing the immobilization of AMPs on surfaces lies in the low surface concentrations needed for high antimicrobial efficacy.

A broad range of solid surfaces has been modified by numerous antimicrobial peptides, including polymers, titanium, gold, stainless steel and glass, some of which are addressed in more detail in the following review [65]. Regardless of surface type, several key factors strongly influence antimicrobial performance of AMPs and should be considered for successful immobilization and peptide activity. These factors range from coverage or surface density as mentioned previously [67], but also orientation, distance to the surface [68] or even lateral mobility [69]. An overview on AMP immobilization methods is given in Table 2, detailing the strategies utilized, along with the type of bound AMP, solid support, and invading microorganism.

We mainly focus herein on nosocomial diseases and medical device-related biofilm infections. Functionalized AMPs for a direct treatment of an infection are off topic, even if interesting studies have been carried out—for instance a very recent study published in 2021 [70] about hydrogels functionalized with peptide RRP9W4N thanks to EDC-NHS chemistry that exhibit strong antibacterial activity. Research on resins, not related to the biomedical field, are not reviewed here but also deserve to be mentioned such as the works of Bagheri et al. [68], about peptides linked to resins thanks to PEG spacers where the influence of the spacer's length on the antibacterial activity was studied; in that particular case, the decrease of activity due to spacer length variation cannot be compensated by an increase in surface density of the peptide.

Table 2. Overview of AMP immobilization on solid surfaces and their antimicrobial activity.

AMP	Substratum	Immobilization Strategy	Studied Microorganisms	Reference
Magainin I	Gold surface	Self-assembled monolayer	<i>L. ivanovii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	Humblot et al., (2009) [71]
LL37	Titanium surface	Site-specific conjugation via amine-reactive NHS and thiol-reactive maleimide moieties	<i>E. coli</i>	Gabriel et al., (2006) [72]
HHC36	Titanium surface	CuAAC click chemistry: Titanium silanized with APTS and peptide modified with PEG	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Chen et al., (2019) [73]
Tet-213	Titanium slide	Tethering on copolymer brushes of N,N-dimethylacrylamide/N-(3-aminopropyl)-methacrylamide hydrochloride	<i>P. aeruginosa</i>	Gao et al., (2011) [74]
Tet-213, 1010cys, Tet-20, Tet-21, Tet-26, HH2, MXX226	Titanium slide	Covalently grafted hydrophilic polymer brushes conjugated with peptides	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Gao et al., (2011) [75]
Magainin I	Silicon wafer	Tethering on copolymer brushes of 2-(2-methoxyethoxy) ethylmethacrylate/hydroxyl-terminated oligo (ethylene glycol) Poly(MOE2MA-co-HOEGMA)	<i>L. ivanovii</i> , <i>B. cereus</i>	Glinel et al., (2009) [76]
CW11	Polydimethylsiloxane (PDMS)	Cross-linking of peptides to allylglycidyl ether modified PDMS surface (PDMS-AGE-PEG) via Sulfhydryl Chemistry	<i>E. Coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Lim et al., (2013) [77]

Table 2. Cont.

AMP	Substratum	Immobilization Strategy	Studied Microorganisms	Reference
RK1 and RK2	Silicone urinary catheter and Polydimethylsiloxane (PDMS)	Cross-linking of peptides to allylglycidyl ether modified PDMS surface (PDMS-AGE)	<i>E. Coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	Li et al., (2014) [78]
Temporin-SHa	Titanium surface	Covalent immobilization on Si-O-Ti groups	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i>	Masurier et al., (2018) [79]
122 variant peptides of 2 starting sequences: Bac2A and Indolicidin	Cellulose support	Cellulose-amino-hydroxypropyl ether (CAPE) linker chemistry; or directly synthesized onto a bifunctional resin; or directly bound to the microtiter plate via biotin-streptavidin interaction	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>	Hilpert et al., (2009) [80]
TBKKG6A and lasioglossin-III	Cellulose support	cysteine-cellulose conjugate coupled to obtaining thioester peptides either on the C-terminal or the N-terminal part of the molecules	<i>E. coli</i> .	Sperandeo et al., (2020) [81]
Antibacterial hybrid peptide	Silicone catheter	Covalent immobilization on silanol groups	<i>E. Coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Pinese et al., (2016) [82]
Bioactive peptides	Silicone dressing	Covalent immobilization on silanol groups	Studies of peptides bioactivity	Pinese et al., (2017) [83]
Protamine, a mixture of Protamine and Melittin and Melimine	Commercial contact lens (Etafilcon-A)	Physical adsorption and covalent attachment via EDC	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Willcox et al., (2008) [84]
hLF1-11	Titanium surface silanized with CPTES or APTES	Peptide physical adsorption and covalent binding with CPTES or APTES	<i>S. sanguinis</i> , <i>L. salivarius</i>	Godoy-Gallardo et al., (2014) [85]
Dhvar5	Titanium and gold substrates	Physical adsorption and covalent binding with chitosan films, EDC-NHS chemistry and introduction of amino acids spacers	<i>S. aureus</i>	Costa et al., (2015) [66]
Defensin from <i>Anopheles gambiae</i> mosquitoes	Multilayer polyelectrolyte films of PEI-(PSS-PAH) ₂ -(PGA-PLL) _n	Layer-by-layer	<i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i>	Etienne et al., (2004) [86]
Gramicidin A complexed with a non-denaturing anionic amphiphilic polysaccharide	Multilayer polyelectrolyte films of PEI and PLL	Layer-by-layer	<i>E. faecalis</i>	Guyomard et al., (2008) [87]
Ponericin G1	Silicone substrate	Layer-by-layer	<i>S. aureus</i>	Shukla et al., (2010) [88]
Magainin II	Stainless Steel	Modification of peptide with dopamine, direct grafting via catechol groups	<i>C. farmer</i> , <i>V. natriegens</i>	Cao et al., (2020) [89]
HHC-36	PU substrates	Via APTES-Br SAM	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Zhang et al. 2019 [90]
MSI-78A	Au	SAMS EG4 thiols-biotin-neutravidin-maleimide	<i>H. pylori</i>	Parreira et al. 2019 [91]
MSI-78	CaF ₂	Silica layer + maleimide	<i>E. coli</i>	Xiao et al. 2018 [92]

4.1. Cross-Linking of Peptides to Surfaces

Surface functionalization is a convenient method for covalent attachment of AMPs: a terminal function, often amine or acid, is assembled on the material surface and AMPs are attached via a cross linking agent. The case of Magainin I (MAG) immobilized on gold surfaces through Self-Assembled Monolayers (SAMs) has been studied by Humblot et al. [71] in 2009. The mechanism of action of these AMPs focuses on targeting the lipid matrix rather than the proteins present in bacteria. As shown in Figure 5, three main steps are necessary to immobilize MAG, thus a mixed SAM with 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) was firstly elaborated. Then, through the reaction with NHS in the presence of EDC, the carboxylic acid tail groups of MUA were converted into esters. Lastly one amino

moiety of MAG reacted with the ester groups via an amidation reaction to create a covalent bond between MAG and the SAM.

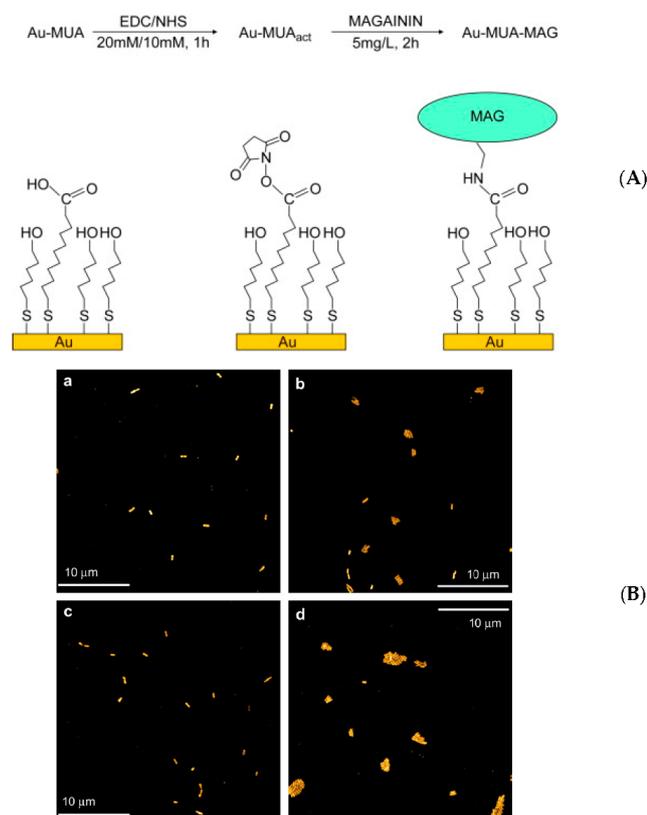


Figure 5. (A) Scheme of magainin I immobilization. Step 1: formation of SAM of MUA on gold, Au-MUA; step 2: esterification of the COOH function of MUA by NHS/EDC, Au-MUA_{act}; step 3: covalent binding of magainin I, Au-MUA-MAG (B) AFM images of gold samples Au-MUA (a,c) and Au-MUA-MAG (b,d) obtained after 30 min and 3 h, respectively, of contact with a *Listeria ivanovii* bacterial suspension at 1.5×10^6 cfu/mL at 37 °C; imaging conditions: 50 μm × 50 μm, 512 lines, 2 Hz, tapping mode. Reproduced from [71]. Copyright © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Adhesion tests were performed with *Listeria ivanovii* cells suspension on the resulting magainin modified surfaces. After the first 30 min of contact, it was assumed that cells could adhere but not grow within the experimental conditions used; however, IR analysis after three hours of contact showed an increase in amide bands intensity with respect to those measured after 30 min. Time-dependent adhesion was also visualized by AFM as shown in Figure 5. Additional antibacterial tests showed that more than 50% of adhered bacteria were killed, for all three types of Gram-positive bacteria tested (*L. ivanovii*, *S. aureus* and *E. faecalis*), with more than 80% in the case of *L. ivanovii*. Long-term antibacterial activity was also tested, revealing that activity persisted over six months after the first coating. With the presented results, and the fact that the concentration of MAG on the surface was low (around 1 peptide/nm²), this AMP makes for a possible candidate for applications in various fields.

Poly(ethylene glycol) (PEG) spacers were used to covalently attach an AMP to the surface of Titanium. Random and specific binding of peptide LL-37 has been studied in 2006 by Gabriel et al. [72]. Figure 6 displays the two strategies used in order to attach the peptide randomly via one of its six lysine residues or site-specifically from a cysteine appended to its N-terminus.

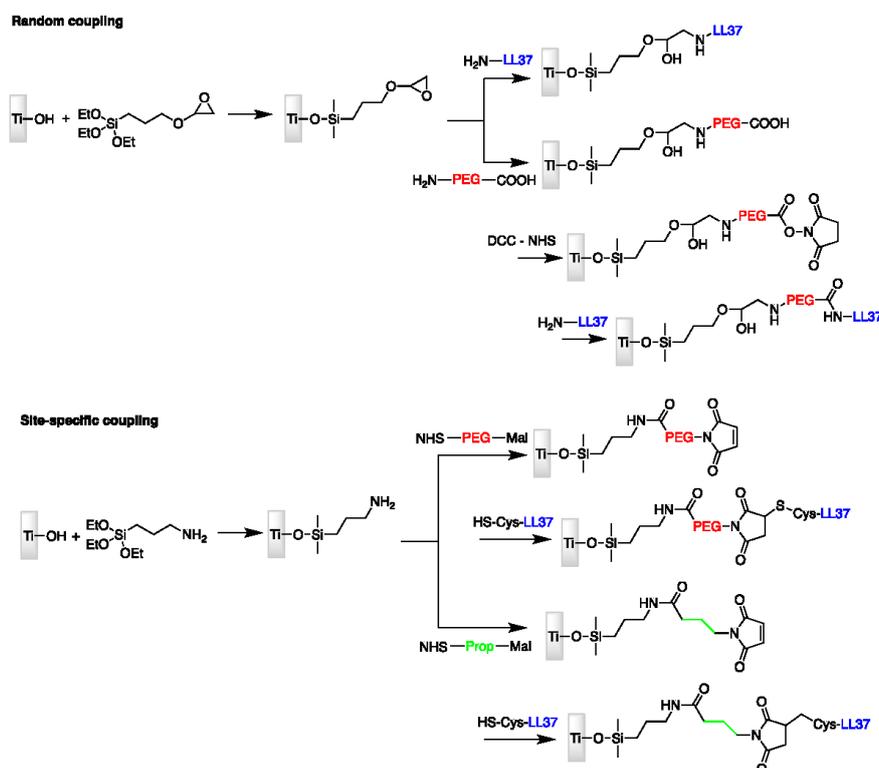


Figure 6. Random and site-specific strategies for coupling cathelicidin (LL-37) to titanium surface. Mal = maleimide; prop = propyl; PEG = poly(ethylene glycol).

Attachment via its N-terminal function provides the immobilized peptide molecules with a parallel orientation with respect to both the surface and the incoming bacteria, which was assumed to be important for this AMP to maintain an effective antibacterial activity. To measure the amount of AMP molecules bound to the surface, a sulfo-SDTB test was used, showing that surfaces bearing oriented LL-37 molecules presents 10 times more peptides that in the random case. To measure the antibacterial activity, the authors performed killing assays against the Gram-negative bacteria *E. coli* (Figure 7). The results suggested that the bactericidal activity was not related to the relative peptide concentration on titanium surfaces, but rather to the proper orientation of the peptide as well as a sufficient distance between the AMPs and the surface.

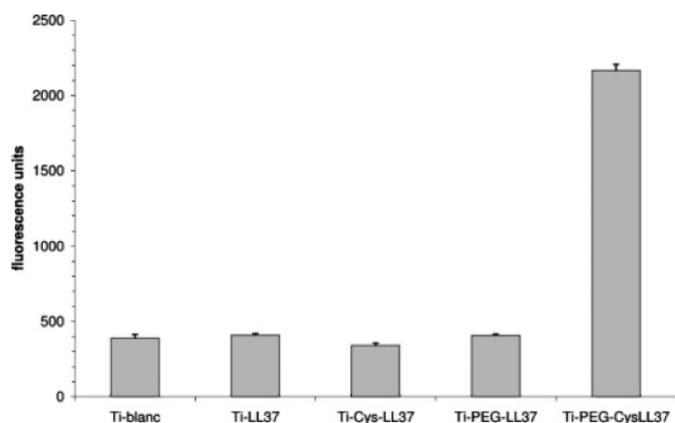


Figure 7. Fluorescence detection of bactericidal activity as a function of LL-37 AMP orientation and distance with respect to the surface. Reproduced with permission from [72]. Copyright 2006 American Chemical Society.

Titanium is an interesting material, as it makes up a large part of dental implants or bone prosthesis used today. Hence, the importance of making it resistant to bacterial infections, together with other treatments in favor of bone reconstruction, osteointegration and biocompatibility for instance. In 2018, Chen et al. [73] chose to use click chemistry to produce antibacterial titanium surfaces (Figure 8). Silanization of the surface with APTS followed by coupling of the peptide HHC36 previously modified with an azido-terminated PEG chain enabled to orientate the molecule. The coupling is carried out thanks to CuAAC click chemistry on the functionalized titanium surface. This functionalization has been validated by fluorescence imaging, XPS measurements and AFM as well. In vitro antimicrobial activity has been validated with antimicrobial assays against *S. aureus* and *E. coli* (measurements of stability, cytotoxicity and fluorescence assays have been performed). The authors also managed to perform in vivo studies with six New Zealand rabbits. After one week of incubation, it seems that AMPs still display antibacterial activity which is encouraging for future developments.

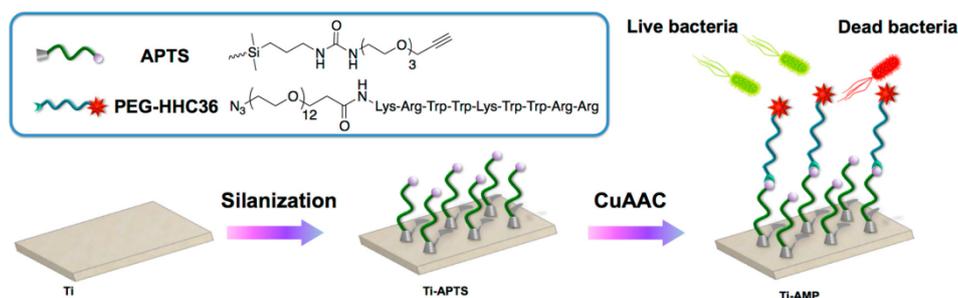


Figure 8. Schematic illustration of the CuAAC click chemistry on the titanium surface. Reproduced with permission from [73]. Copyright 2019 American Chemical Society.

Brush properties of polymers might influence AMP immobilization and antimicrobial activity; Gao et al. [74] have then studied this particular effect in 2011 by chemical modification of titanium surface and carried out the grafting of peptide Tet-213. In this study,

primary amine-functionalized copolymer brushes were generated onto titanium surfaces through surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP, Figure 9). After reaction of a maleimide-based heterobifunctional crosslinker, the Tet-213 modified peptide was covalently grafted via an added cysteine at the C-terminus, Figure 10.

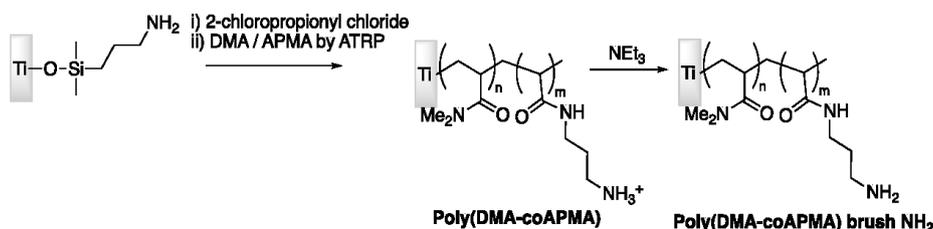


Figure 9. Synthetic route for copolymer brushes generation on titanium surface.

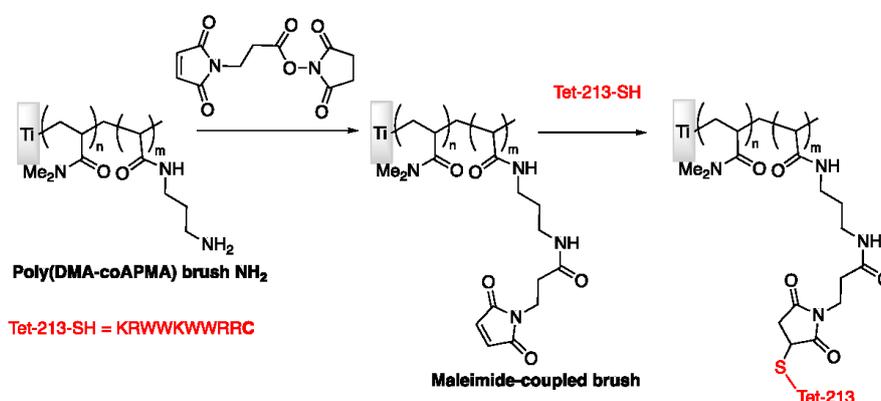


Figure 10. Different steps of functionalization to study the influence of brush properties of polymers on AMPs activity. Adapted with permission from [74]. Copyright 2011 American Chemical Society.

Water contact angle measurements, XPS, ellipsometry, ATR-FTIR, and AFM were used to characterize the properties of the polymer and surfaces. The structure of the copolymer brush and the antimicrobial activity of the conjugated polymer layer were correlated. The antimicrobial activity was tested against a bacterial strain of *P. aeruginosa*. Overall, an increase in peptide surface density, grafted polymer brush density, or brush thickness, resulted in an increase of antimicrobial activity on the surface. On the other hand, the composition of the copolymers did not show a significant influence on antimicrobial activity. Through AFM, the authors verified that the brush alone was less hydrophobic than the grafted surface. Although the surfaces with higher brush density had more peptide surface density, they were less adhesive than low density brushes, which showed better antimicrobial properties. Thus, to obtain highly effective antimicrobial coatings, the optimization of graft density and peptide density are parameters of utmost importance.

The same group in 2011 (Gao et al. [75]) employed the same strategy to covalently graft various AMPs on titanium implants. In this work, N-substituted polyacrylamide brushes were covalently grafted onto surface as shown in Figure 10.

The antimicrobial efficiency of the brushes was tested against a strain of *P. aeruginosa*, through a previously developed luminescence screening method. The results showed that upon immobilization of the polymer brush, the AMPs strongly retained their antimicrobial activity (Figure 11). Afterward, the the immobilization strategy giving best IL (inhibition

of luminescence) value against the *P. aeruginosa* strain was then tested in vitro against Gram-negative and Gram-positive bacteria, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. In this case, Ti wires were used as the surface and the results confirmed the antimicrobial effect of the AMPs after immobilization. Another important aspect to test was the longevity of the antimicrobial activity of AMP-tethered polymer brushes. For this purpose, an in vivo model of implant-associated infections was developed. AMPs were proven to be highly effective in this setting, which meant that in a clinical setting (i.e., with less bacteria and greater use of antibiotics or other local type of medicine) the antimicrobial effectiveness of this AMP would be satisfactory. The topics of biological compatibility and toxicity were also studied. Results proved that AMPs conjugated polymer coating were nontoxic to mammalian cells. These AMPs, when tested on human blood, did not initiate complement activation, nor activate human platelets. Overall, the coating proved to be a relevant approach for preventing and fighting implant-associated infections.

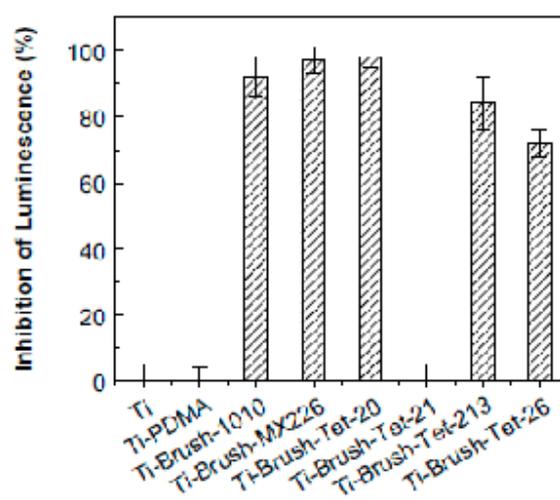


Figure 11. Antimicrobial activity of surface-immobilized peptides. Inhibition of luminescence of *P. Aeruginosa* upon incubation with titanium slides modified with peptide immobilized copolymer brush (surface area: 1 cm²); inhibition of luminescence is taken as a measure of antimicrobial activity. Ti-slides and polydimethylacrylamide (PDMA) brush coated Ti-slides (neutral brushes) were used as controls. Reproduced with permission from [75]. Copyright 2011 American Chemical Society.

Glénel et al. [76] developed poly(MOE2MA-co-HOEGMA) brushes incorporating magainin I grafted to native oxidized silicon wafers. Modified magainin I with a C-terminal cysteine residue was tethered through an oriented chemical grafting via the heterobifunctional crosslinker PMPI (p-maleimidophenyl isocyanate) on the hydroxyl groups of the copolymer brushes (Figure 12), to preserve the activity of the peptide by maintaining mobility and accessibility. Peptide grafting was confirmed by FT-IR spectroscopy, whereas the density of grafted peptides on the brushes was determined by XPS. The antibacterial effect of Magainin I-functionalized brushes was demonstrated against two distinct strains of Gram-positive bacteria: *L. tinnovii* and *B. cereus*. The bacterial inhibition assays also demonstrated that biocidal activity of magainin I was not substantially reduced by decrease of immobilized peptide concentration.

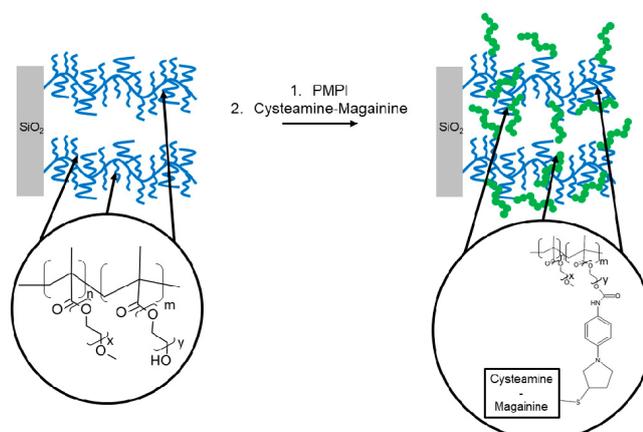


Figure 12. Oriented grafting of MAG-Cys derivative on poly(MOE2MA-co-HOEGMA) brushes via heterobifunctional crosslinker PMPI. Adapted with permission from [76]. Copyright 2009 American Chemical Society.

Lim et al. [77] and Li et al. [78], studied the immobilization of engineered arginine-tryptophan rich peptides on silicone surface. In both studies, peptides were immobilized on an argon plasma-treated PDMS surface after polymerization of allyl glycidyl ether (AGE) under uv light to generate polymer brushes. Grafting was either achieved by reaction of the cysteine residue at the N-terminus of the peptide via a NH₂-PEG-maleimide crosslinker, [77] or by reaction between the lysine residues of the peptides and the epoxide groups in the AGE brush [78]. Immobilization was confirmed by XPS. The microbiological assays done in these studies showed antibacterial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* in the work done by Lim and co-workers and against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* in the study carried out by Li and co-workers. Additionally, both works demonstrated anti-fouling properties of the immobilized peptides, and mostly both biocompatibility tests revealed no toxicity toward mammalian cells. Li et al. [78], successfully extended this work to the immobilization of the engineered peptides on silicone urinary catheter. Improvement of the antimicrobial activity and reduction biofilm formation were also observed.

In another field of application, developing antibacterial cellulose surfaces seems to be useful in order to prevent cosmetic or even pharmaceutical products from contamination thanks to their biocompatibility. Hilpert et al. [80] reported surface tethering of cationic peptides on cellulose support. They used among other substrates, cellulose-amino-hydroxypropyl ether (CAPE) linker chemistry to covalently immobilize several cationic peptides on the cellulose support. They employed a high-throughput screening assay strategy to identify surface bound peptides with antimicrobial activity. To this purpose, they measured luciferase production from a *P. aeruginosa* strain expressing a luciferase gene. Damages on membrane of *P. aeruginosa* caused by contact with the tethered peptides were visualized by SEM, Figure 13. Bacteria in contact with pristine cellulose membranes showed cell surfaces with smooth appearance (Figure 13A), whereas bacteria in contact with cellulose membranes with tethered peptides were characterized by the presence of blebs (Figure 13B). Structure–reactivity relationship studies on different peptides demonstrated that the antimicrobial activity was influenced by the linker and also by the peptide sequence, as the presence of cationic residues near the linker correlated with better activity and hydrophobic residues close to the N-terminus were determining factors for biological activity. SEM, ATP release, and depolarization analysis allowed Hilpert and co-workers to conclude that the perturbation of bacteria surface electrostatics must likely induce an autolytic and/or cell death mechanism. Moreover, in contrast to the soluble

peptides previously studied by the same team [93], the immobilized peptides did not show any cytotoxicity.

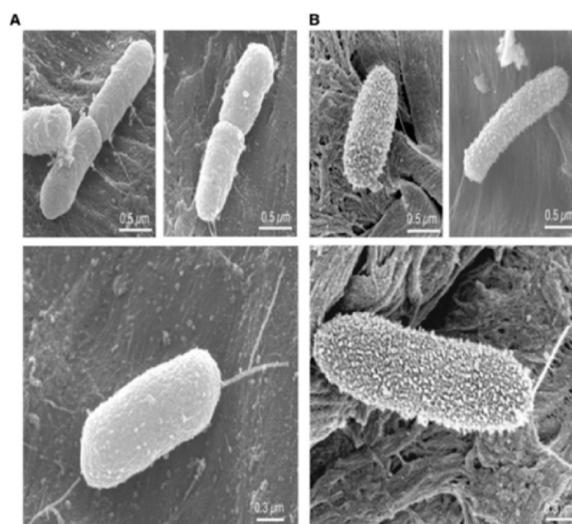


Figure 13. SEM images of *P. aeruginosa* in contact with cellulose membrane: (A) without peptide; (B) with an active tethered peptide. Reproduced from [80]. Copyright © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In 2020, another group [81] studied the interaction between cellulose and peptides in order to obtain antimicrobial materials. To this purpose, Sperandeo et al. synthesized a cysteine-modified cellulose conjugate to modify the surface. From another side, they synthesized two peptides (TBKKG6A and lasioglossin-III) carrying a thioester group either on the C-terminal or the N-terminal side of the molecules. Thanks to a chemical ligation reaction, peptides were grafted to cellulose as proven by FT-IR measurements so as to obtain an antimicrobial surface. The strategy is schematized in Figure 14. The antimicrobial activity was successfully evaluated against *E. coli*. The two modified AMPs prevented bacterial growth and decreased the number of viable cells. In addition, anti-bacterial activity was stronger with peptides attached via the N-terminus.

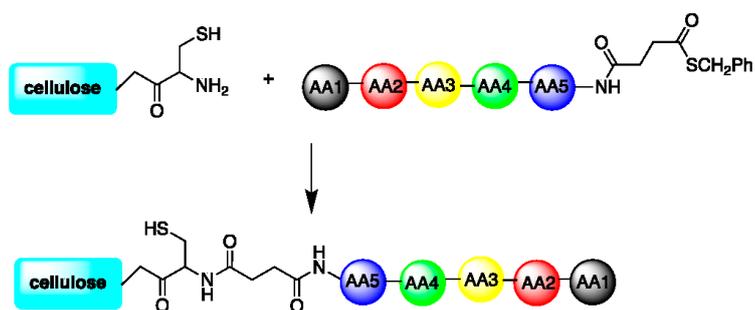


Figure 14. Summary of the Strategy used to covalently attach thioester peptides to cysteine-modified cellulose surfaces.

In summary, cross-linking strategies have been successfully used to graft various antimicrobial peptides to various inorganic and organic substrates. The density, the relative orientation of the peptides and the distance from the surface were highlighted as important parameters determining the overall antibacterial activity of the substrates.

4.2. Direct Grafting of Modified Peptides to the Surface

Through the last examples showing a possible favorable orientation of grafted peptides, modifying directly peptides in order to graft it in a one-pot fashion to the surface then appears as a good alternative way to physisorption and chemical cross linking.

In 2018, Masurier et al. [79], showed the possibility to graft temporin SHa via an additional chemical moiety on specific surface sites. Temporins are a family of AMPs with α -helical structure derived from frog *Pelophylax saharica* skin which main activity is exerted against the *Leishmania* genus. Temporins also show a wide spectrum of antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, fungi, parasites and viruses. The authors observed differences in antibacterial activity when grafted via a specific site or another. Figure 15 shows the one-step grafting strategy of temporin-SHa carrying a dimethylhydroxysilane group to titanium surfaces, in the attempt to directly react the modified surface with the hybrid peptide. However, the formed Si-O-Ti bonds can be easily hydrolyzed, and therefore the grafting density reduced after incubation. However, if the titanium surface was previously coated with silica, Si-O-Si bonds will form instead of Si-O-Ti. These new bonds, although still hydrolyzable, are much stronger than Si-O-Ti. Therefore, the titanium substrate was coated with silica prior to peptide immobilization. XPS was used to confirm the successful grafting and measure the thickness of the silica coating and the surface density. Independently of the orientation of the grafted molecules, the determined molecular surface density and the number of grafted molecules were similar. They also observed a better interaction with the bacterial membrane and so a higher antibacterial activity when the dimethylhydroxysilane function is introduced in the middle of the sequence, rather than at the N-terminus or the C-terminus.

In another examples, and following the same strategy, Pinese et al. studied silicone surfaces mimicking silicone catheters [82] and silicone dressings [83]. The authors investigated a strategy to make peptides grafting easier and more suitable for the fabrication of medical devices. Additionally, they tried to prevent peptide release in the biological fluids of the wound in order to maintain a good biological effect. To achieve this, they proposed to use hybrid dimethylhydroxysilyl peptides to covalently bind the peptides through Si-O-Si bonds to a plasma-activated silicone surface. The grafting process is similar for both works. First, the silicone surface was activated by oxygen plasma treatment to generate active silanol groups. Then, to properly achieve the grafting, the silicone catheter was incubated in a solution containing the hybrid peptide (Figure 16 top), whereas for the silicone dressing the bioactive peptide was grafted by dip-coating (Figure 16 bottom), which allows for treatment of devices on a larger scale.

This grafting process via covalent adsorption directly on the silicone surface led to a relatively low density of active peptides (~ 0.1 peptide/nm² of silicone on the catheter and ~ 0.4 peptide/nm² of silicone on the dressing). As a comparison, adsorption of antimicrobial peptides on gold surface functionalized by SAM was found to be ~ 1 peptide/nm² [94], and also the density of Lasio II antimicrobial peptide immobilized on a polymer brushes layer grafted on silicone catheters was found to be 21 peptides/nm² [95]. Nevertheless, the relatively low density observed by Pinese and co-workers, partnered with the mode of association of the bioactive peptide with the substrate, was not detrimental to the bioactivity of the surface, showing on the contrary very good bactericidal properties together with very low cytotoxicity.

In their work on grafting of antibacterial peptides on silicone catheters [82], Pinese et al. tested the antibacterial activities on the three most commonly found bacteria in contaminated medical devices: *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. They demonstrated a 75% reduction in the number of bacteria found on the peptide-grafted surfaces after 24 h

of incubation in a solution containing a known number of bacteria, by comparison with a non-grafted silicone surface. These results are satisfactory, and they further demonstrated that the peptide retains its antibacterial activity when covalently grafted. Additionally, the peptide-grafted silicone surfaces demonstrated strong anti-fouling properties on the adhesion of *S. aureus* as they were more effective than commercial “silver-coated” catheters, which are associated with a potential toxicity upon accumulation of silver in tissues and the development of silver-resistant bacteria [96,97]. The long-term efficiency of these antibacterial peptide-grafted silicone catheters is also higher than the commercial “silver-coated” materials. The work of the same group on bioactive peptides grafted on silicone dressings [83] aims to bring bioactivity to the dressing through the immobilization of three bioactive hybrid peptides. In vitro studies showed that peptide-grafted silicone dressings improved cell adhesion and proliferation in wound zone, favoring wound healing. Additionally, these dressings promoted extracellular matrix synthesis by enhancing collagen and fibronectin synthesis. Wounds inflicted on the back of a pig confirmed the in vitro studies, showing that grafted dressings can improve healing by allowing a significantly increased scar recovery (Figure 17A,B).

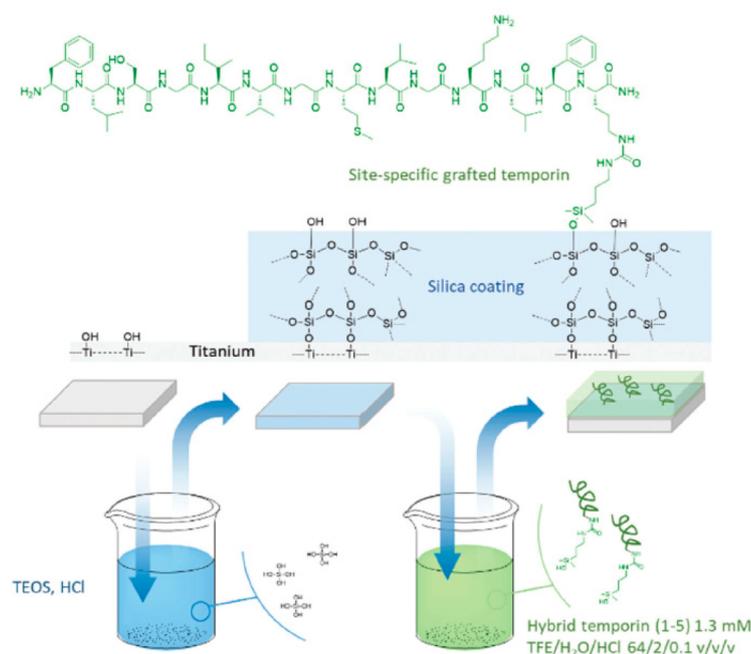


Figure 15. Example of site-specific grafting of hybrid temporin 1 on titanium surfaces. Temporins were modified at their C-ter end by a silanol group that enables the direct grafting onto TEOS precursor. Reproduced from [79]. Copyright © The Royal Society of Chemistry 2018.

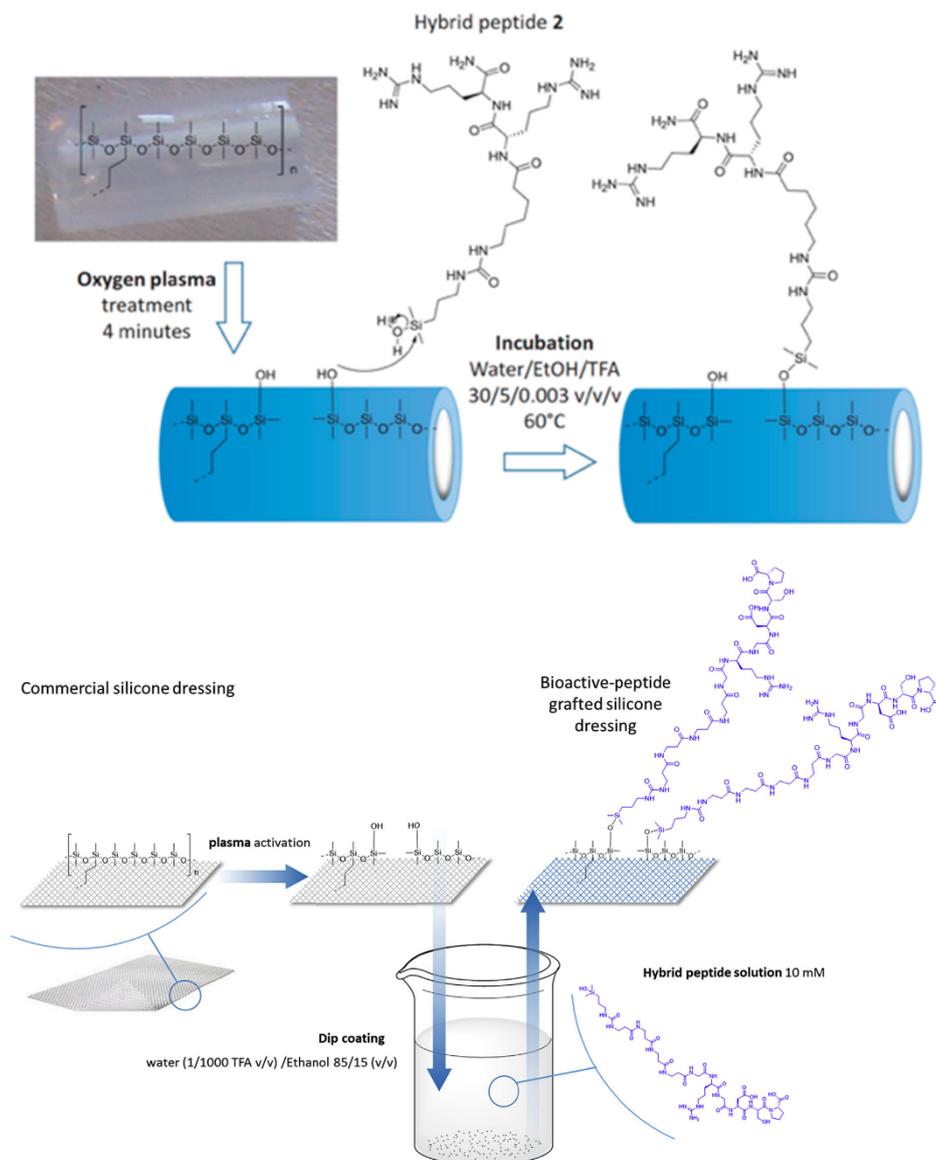


Figure 16. Grafting of AMP on activated silicone catheter (**top**) and on activated silicone dressing (**bottom**). For both strategies, the commercial silicone is activated by plasma before direct grafting of the modified peptide by a silanol group. Reproduced from [82,83]. Copyright © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Copyright © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

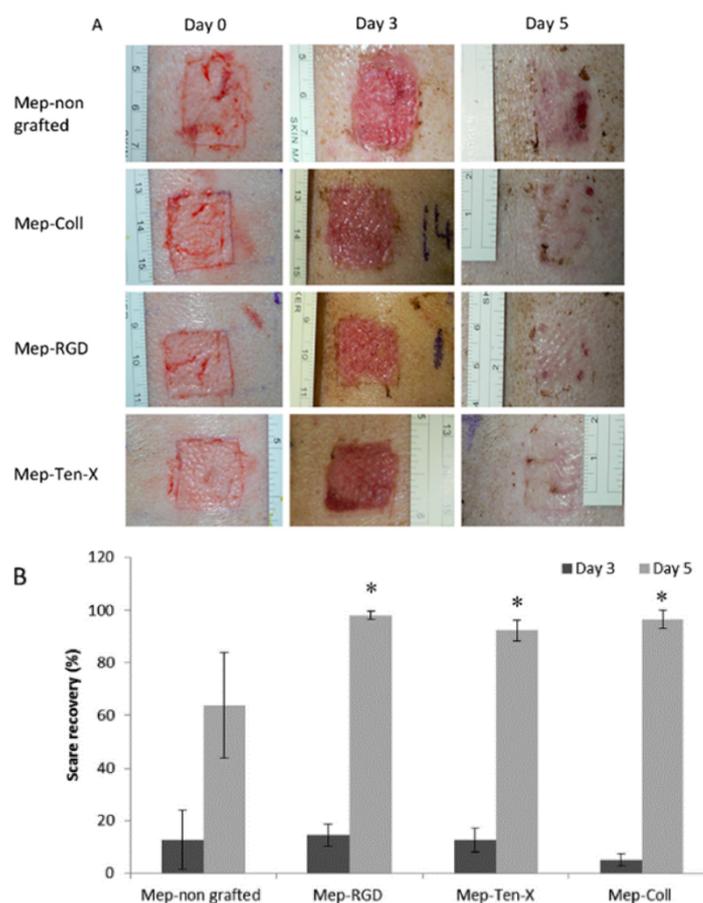


Figure 17. In vivo study. (A) Pictures of wounds inflicted on the back of a pig (at days 0, 3 and 5); (B) percentage of recovery of the scars (peptide-treated vs. non-treated dressings). Reproduced from [83]. Copyright © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved. Statistically significant differences vs. control samples are indicated with an * ($p < 0.05$).

One major challenge arises when it comes to keep AMP's antibacterial activity once immobilized and limit the toxicity potentially caused by their release. Several works done on silicone substrates have shown that it is possible to keep the antibacterial and more generally the biocidal effect [83] after grafting, which is very encouraging with respect to toxicity. For this reason, strong immobilization on silicone surfaces was shown to be the preferred method. Grafting through the use of a linker or polymeric brushes have been reported in several works, however an easier model was studied by Pinese et al., in which the bioactive peptide is directly grafted to the reactive silanol groups of plasma-activated silicone surface. Moreover, several studies showed that it is possible to achieve strong antibacterial activity with relatively low quantities of immobilized peptide on the surface [76,82,83].

In summary, direct grafting of modified peptides has been successfully achieved on several kind of surfaces from metal ones to polymers. The grafting has revealed to be simple and efficient; low concentration of active molecules enables very high antibacterial

activities compared to classical multistep grafting strategies. This route seems to be a promising one in terms of cost efficiency due to the low density of active molecules required to achieve high bactericidal grafting.

4.3. Comparison between Covalent Attachment and Physical Adsorption

In order to compare covalent attachment and physical adsorption, Willcox et al. [84] reported the use of cationic peptides to prevent microbial colonization of commercialized Etafilcon A, a contact lenses material made of hydroxyethyl methacrylate/methacrylic acid (HEMA/MAA) copolymer. Protamine, a mixture of protamine and melittin and a synthetic peptide melimine were the AMPs used for this purpose. They studied two modes of attachment: physical adsorption and covalent attachment via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) coupling reaction for melimine. This AMP retained the combined anti-microbial activity of protamine and melittin against both *P. aeruginosa* and *S. aureus* by reducing bacterial adhesion to the polymeric surface, while being less toxic to red blood cells. Willcox and co-workers also demonstrated that melimine retains its activity while covalently attached to the polymer. The peptide showed a concentration-dependent activity to reduce bacterial colonization (in over 80%) with good broad-spectrum efficacy at 500 g per lens. Covalent coupling showed greater activity, as only 20 g per lens reduced bacterial adhesion in 70%. Moreover, exposure of bacteria to melimine at MIC concentration for 30 min at 37 °C resulted in structural changes of the bacterial cells. As shown in Figure 18, *Pseudomonas aeruginosa* cells show membrane blebbing at the cell surface, disintegration of the membrane, condensation of the contents (mainly DNA) and detachment of the cell membrane from the cell wall (black arrow in Figure 18b). Moreover, no melimine-induced resistance was observed after repeated exposure of bacteria to sub-inhibitory concentrations of the peptide, making this peptide a viable option to prevent possible infections via contact lenses. Above all, covalent attachment displays more efficiency than physical adsorption.

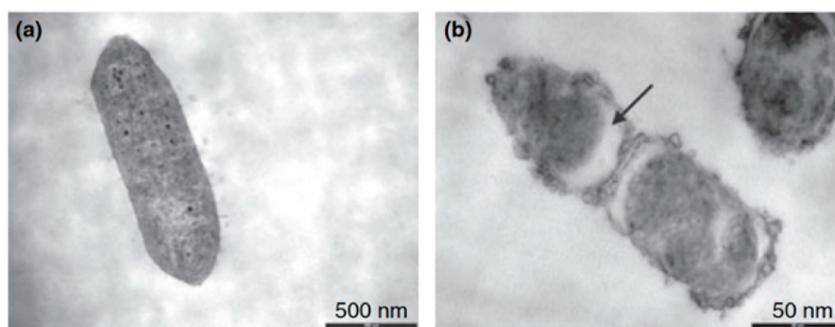


Figure 18. Transmission electron microscopy (a) *Pseudomonas aeruginosa* strain 6294; (b) *P. aeruginosa* Scheme 6294, exposed to melimine. Reproduced from [84]. © 2008 Willcox et al. J. Appl. Microbiol. © 2008 The Society for Applied Microbiology.

Godoy-Gallardo et al. [85] studied the antibacterial activity of hLf1-11, inspired from lactoferrin, by functionalizing titanium surface by silanization with CPTES (3-chloropropyltriethoxysilane) or APTES (3-aminopropyltriethoxysilane), the covalent binding is confirmed by XPS, or physisorption, Figure 19. The antimicrobial activity of the peptide was tested against *S. sanguinis* and *L. salivarius* (useful for dental applications).

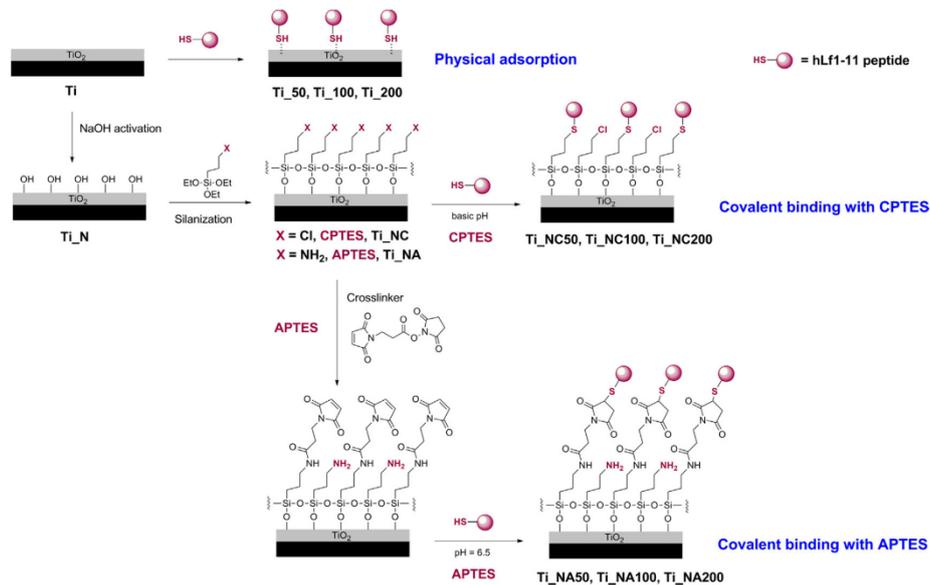


Figure 19. Functionalization strategies to anchor the hLf1-11 peptide to titanium: physical adsorption and covalent binding with CPTES or APTES. Adapted from [85]. Copyright © 2014 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

They prepared different titanium surfaces: Ti (smooth titanium), Ti_N (titanium pretreated with NaOH), Ti_{NA} (titanium pretreated with NaOH and silanized with APTES) and Ti_{NC} (titanium pretreated with NaOH and silanized with CPTES). Samples were functionalized by physisorption at different concentrations of Lf1-11 peptide: Ti₅₀, Ti₁₀₀, Ti₂₀₀. Finally other substrates were functionalized by covalent binding: Ti_{NA50}, Ti_{NA100}, Ti_{NA200} and Ti_{NC50}, Ti_{NC100}, Ti_{NC200}. Results showed an inhibition of biofilm formation and development for both bacteria strains. Indeed, with a CFU/mm² enumeration with control Titanium surfaces, the effect of AMPs is widely shown especially for covalent bindings, Figure 20. Indeed, the bacterial adhesion of *S. sanguinis* is similar for the control and the case of physical adsorption with a value around 8.0×10^4 CFU/mm². Whereas for covalent binding with CPTES the value is around 1.0×10^4 CFU/mm² and with APTES around 3.0×10^4 CFU/mm². Again, covalent binding is more suitable to achieve a better antibacterial activity.

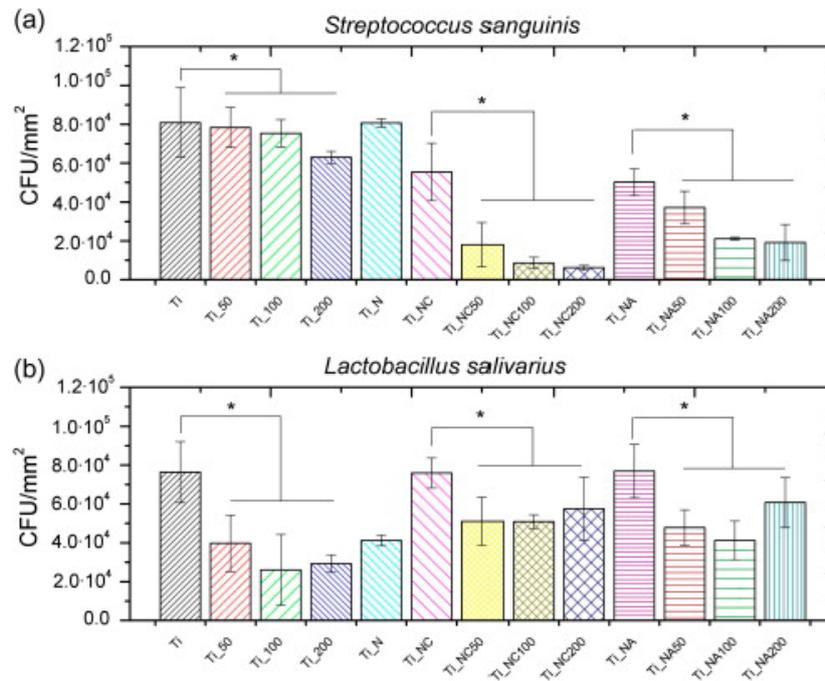
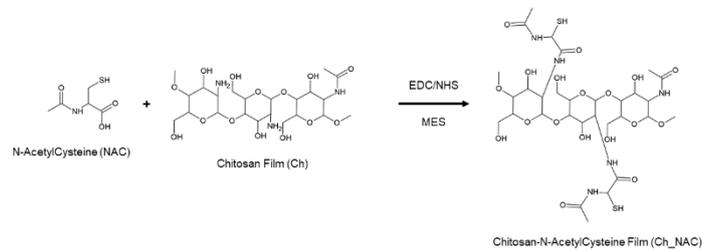


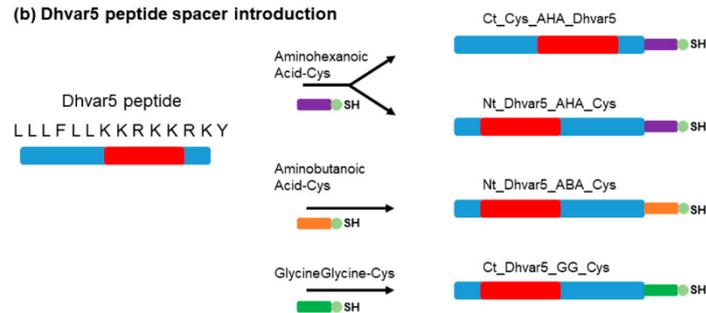
Figure 20. Bacterial adhesion of *S. sanguinis* (a) and *L. salivarius* (b) to titanium samples after 2 h of incubation at 37 °C. Statistically significant differences vs. control samples are indicated with an * ($p < 0.05$). Reproduced from [85]. Copyright © 2014 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Finally, a study of 2015 by Costa et al. [98], showed also that covalent immobilization of AMPs is more efficient than physical adsorption. Indeed, the ability to control the orientation of the peptide and its distance to the surface is crucial. Peptide Dhvar5 was covalently immobilized on titanium and gold substrates. After deposition of chitosan films after their functionalization with N-acetyl cysteine (Figure 21a), the peptide was linked to the surface via a disulfide bridge with its terminal cysteine (Figure 21c). This process is confirmed thanks to FT-RAIRS, Ellipsometry and water contact angle measurements. Additionally, physical adsorption is achieved thanks to hydrophobic end of the biomolecule. This chemistry is summed up on Figure 21. Antibacterial tests against *Staphylococcus aureus* proved the ability of covalently bound AMPs to decrease the colonization whereas for physical adsorption, there is no effect and even worse it can sometimes facilitate bacterial adhesion. Moreover, the introduction of spacers (Figure 21b), showed that the best antibacterial activity is obtained for the longest possible distance between the surface and the peptide.

(a) SH introduction into Chitosan films



(b) Dhvar5 peptide spacer introduction



(c) Dhvar5 peptide immobilization

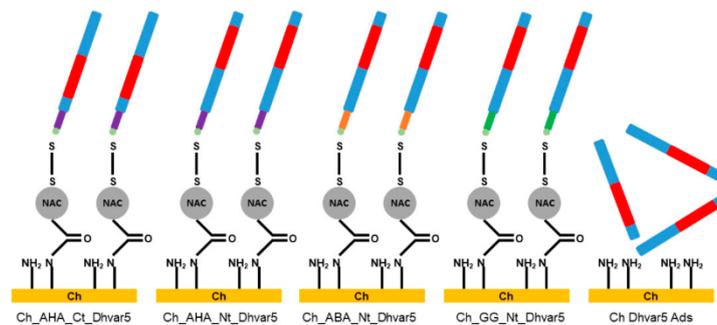


Figure 21. (a) Chitosan modification with N-acetyl cysteine (NAC); (b) Dhvar5 peptide derived in Table 2 peptides by disulfide bridge formation (a control surface, Ch Dhvar5 ads, was used where peptide was only physisorbed, not covalently bound). (c) Dhvar5 peptide immobilization strategy. Reproduced from [98]. Copyright © 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

To summarize this section, these three studies show for three different materials (copolymer, titania and gold) the advantage of using covalent linked AMPs rather than physically adsorbed peptides. Another approach exists, layer-by-layer, and will be studied in the last part of the review.

4.4. Layer-by-Layer Approach

The Layer-by-Layer (LbL) technique is based on the alternating deposition of polycations and polyanions onto a surface. LbL represents a simple and robust method to coat various surfaces and has been explored in several studies for the immobilization of AMPs on the surface of materials. Experimentally, peptides are directly incorporated in the polyelectrolyte multilayers (PEM) by the LbL method.

Etienne et al. [86], have successfully functionalized PEM with defensin from *Anopheles gambiae* mosquitoes. They studied the influence of the number of peptide layers on bioactivity and observed a 98% inhibition of *Escherichia coli* growth when 10 layers of antimicrobial peptides were embedded in the polyelectrolyte film architecture. The architecture of the film is shown on Figure 22. Additionally, good biocompatibility was demonstrated as some of the multilayer films revealed to be stable for more than two weeks in presence of body fluids. However, as defensin is positively charged ($pI = 10$) at the working pH of this study ($pH = 6.5-7$), this approach is restricted to highly-charged soluble AMPs that interact through electrostatic interactions with the polyelectrolyte chains constituting the PEM. Moreover, strong electrostatic interactions between the peptide and the polyelectrolytes may lead to denaturation of the peptide, therefore limiting its antibacterial activity.

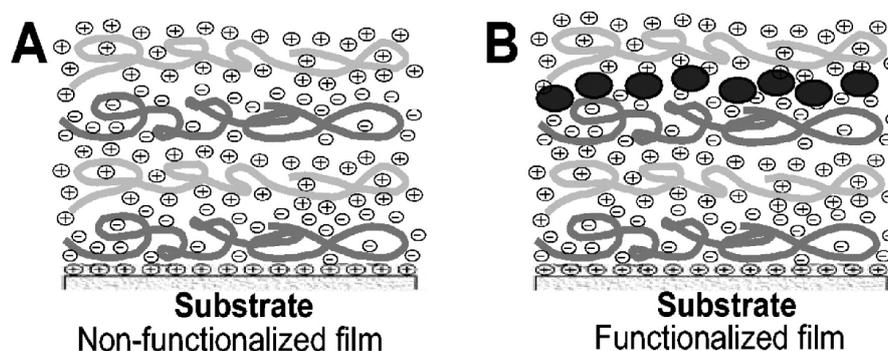


Figure 22. Scheme of polyelectrolyte multilayer film (A) and defensin insertion (B). Adsorption is obtained by adding a layer of the opposite charge; the peptide is embedded under another polyelectrolyte layer. Reproduced from [86]. Copyright © 2004 American Society for Microbiology.

Guyomard et al. [87], proposed an alternative approach to insert AMPs into polyelectrolyte films. The strategy is based on the insertion of Gramicidin A (Gram A), a hydrophobic antibacterial peptide, into a polyelectrolyte multilayer to elaborate biocidal films following the process described in Figure 23. Firstly, hydrophobic Gram A molecules were trapped by amphiphilic alkyl-grafted Carboxymethylpullulans (CMP), leading to their solubilization. Then, the resulting anionic “complex” was assembled by a LbL process with cationic poly(L-Lysine) (PLL) to form the peptide-functionalized films. These resulting films were shown to contain hydrophobic nanodomains in which gramicidin A was entrapped. The antibacterial activity of the resulting functionalized films was demonstrated against Gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis*. The authors also showed that biocidal activity proceeded through a double mechanism of contact between bacteria and film surface, and slow release of the peptide into the solution surrounding the films. In addition, rinsing of multilayers did not completely remove the peptide, which confirmed that gramicidin A was slowly released, therefore suggesting a long-term preservation of the biocidal activity of the film surface.

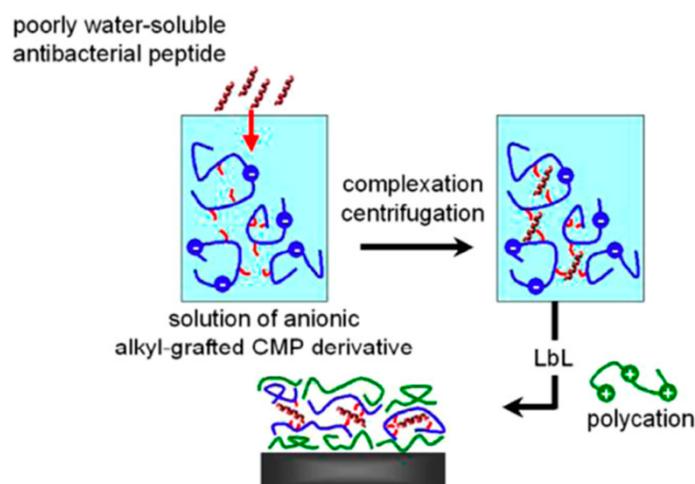


Figure 23. Process used for immobilization of Gramicidin A. Reproduced from [87]. Copyright © 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Finally, Shukla et al. [88], proposed to control the release of AMPs incorporated in PEM by using hydrolytically degradable multilayer films. They worked on local delivery of ponicin G1, an AMP exhibiting a net positive charge at physiological pH and active against *S. aureus*, as therapeutic agent for wound healing process. Ponicin G1 was embedded into a LbL assembled polyelectrolyte multilayer film based on a hydrolytically degradable cationic poly(β -aminoester) and an anionic non-cytotoxic polyanion such as alginic acid, deposited on a silicone surface. The process is described in Figure 24.

Several film architectures were studied in order to obtain various peptide loadings and led to varying release profiles in order to control the long-term activity of the films. The resulting films were able to inhibit *S. aureus* attachment for over 10 days, as degradation of the poly(β -aminoester) leads to slow release of the peptide. These observations indicated that film-releasing peptides did not suffer any loss of antibacterial activity. In addition to prevent biofilm formation, all films were found to be biocompatible with the wound healing cells.

In several works the incorporation of AMPs in PEM through a LbL process was used to immobilize bioactive peptides. As peptides are generally charged, electrostatic interactions between AMP and the polyelectrolytes represent an obstacle for the stability of these polyelectrolyte multilayers films incorporating the AMP. Nevertheless, trapping of AMP in hydrophobic nanodomains in these films was shown to be a good alternative to ensure a better stability of these films, allowing to maintain the biocidal activity. Release of AMP from PEM films can in some cases, for the delivery of a wound healing peptide for instance, be desired and this release can be controlled by engineering of the film architecture.

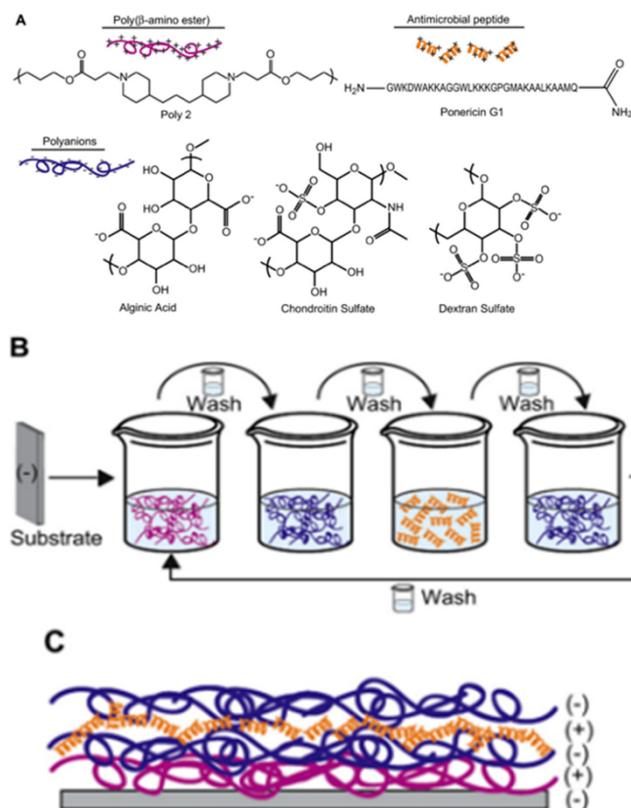


Figure 24. Process used for the immobilization of ponicin G1 embedded with the LbL structure (A) structures of all polyelectrolytes used in the LbL process. (B) schematic protocol of LbL elaboration and (C) Schematic expected structure of the final LbL film. Reproduced from [88]. Copyright © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

5. Conclusions and Future Prospects

Antimicrobial peptides naturally existing in the animal and plant kingdoms prompted the development of natural and bio-inspired synthetic peptides active against biofilms. The potential of AMPs as anti-infective agents has been noted, leading for many of them to clinical trials in order to get approval as marketed drugs [99]. Despite multiple efforts, issues such as production cost, reduced efficiency and more often possible toxicity still stand in the way of such approval, and despite the huge amount of successful studies present in the literature, no synthetic AMP and very few natural AMPs have obtained FDA approval [100,101]. Notwithstanding promising research and on-going clinical trials and, despite still in development, positive prospects for AMP use are in sight, especially concerning combination therapies. Indeed, synergetic effect of peptides coupled with other therapeutic agents such as antibiotics or essential oils have shown great potential in increasing efficacy of treatment [102]. Furthermore, AMPs hold the crucial advantage of overcoming low susceptibility of biofilm to antimicrobial agents, which suggests that their killing efficiency is promising, albeit still far from topping that of current antibiotic treatments.

This review has highlighted the wide range of antimicrobial peptides, along with the various immobilization strategies developed to date. Indeed, these biocidal-functionalized

surfaces are able to target a broad spectrum of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, together with viruses, parasites and algae for some more specific AMPs. As could be concluded from the numerous works described, covalent-based approaches are more advantageous, in addition to represent a crucial role in antimicrobial activity. Importance of the selected immobilization technique is highly emphasized in the stated literature, in some cases dominating over factors like concentration of bound peptide [63]; even via peptide engineering either by addition of a specific amino acid fragment or anchoring moiety or simply by designing totally new synthetic AMP with desired architecture and specificity [103,104]. Decades of research have led to a better understanding of the complex mechanisms of action of AMPs, however additional progress is certainly necessary to overcome current challenges and sustainably commercialize AMP-based antimicrobial coatings for use against biofilm.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, S.B. and V.H.; formal analysis, M.N., B.B., M.O. and M.T.M.; investigation, M.N., B.B., M.O. and M.T.M.; writing—original draft preparation, M.N., B.B., M.O. and M.T.M.; writing—review and editing, M.N., M.S., S.B. and V.H.; supervision, B.G., M.S., S.B. and V.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.N. acknowledges the French ANR for Ph.D. funding via the ChiROptMol (ANR-18-CE09-0010).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

List of Abbreviations

AA	Amino Acid
AFM	Atomic Force Microscopy
AMP	AntiMicrobial Peptide
APD	Antimicrobial Peptide Database
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilane
ATP	Adenosine triphosphate
ATR-IR	Attenuated Total Reflection-Infra Red
CAPE	Cellulose-amino-hydroxypropyl ether
CFU	Colony-Forming Unit
CMP	Carboxymethylpullalans
CPTES	3-Chloropropyltriethoxysilane
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EPS	Extra Cellular Polymeric substance
FDA	Food and Drug Administration
HEMA	hydroxyethyl methacrylate
LbL	Layer-by-Layer
IL	Inhibition of Luminescence
MAA	Methacrylate Acid
MAG	Magainin
MIC	Minimal Inhibition Concentration
MUA	11-mercaptoundecanoic acid
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic resonance
PDMA	Polydimethylacrylamide
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEG	Poly(Ethylene Glycol)
PEM	Polyelectrolyte multilayers
PLL	Poly-L-lysine
PM-RAIRS	Polarisation Modulation Reflection Absorption Infrared Spectroscopy
PMPI	p-maleimidophenyl isocyanate
QS	Quorum Sensing
SAM	Self-Assembled Monolayer
SEM	Scanning Electron Microscopy
SI-ATRP	Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization
XPS	X-Ray Photoemission Spectroscopy

References

- Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 76. [CrossRef] [PubMed]
- Glinel, K.; Thebault, P.; Humblot, V.; Pradier, C.M.; Jouenne, T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1670–1684. [CrossRef] [PubMed]
- Bridier, A.; Briandet, R.; Thomas, V.; Dubois-Brissonnet, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling* **2011**, *27*, 1017–1032. [CrossRef]
- Chen, M.; Yu, Q.; Sun, H. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 18488–18501. [CrossRef] [PubMed]
- Carvalho, I.; Henriques, M.; Carvalho, S. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education. New strategies to fight bacterial adhesion. *FORMATEX* **2013**, 170–178.
- Jakobsen, T.H.; Tolker-Nielsen, T.; Givskov, M. Bacterial Biofilm Control by Perturbation of Bacterial Signaling Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1970. [CrossRef]
- Graham, M.V.; Cady, N.C. Nano and Microscale Topographies for the Prevention of Bacterial Surface Fouling. *Coatings* **2014**, *4*, 37–59. [CrossRef]
- Jennings, M.C.; Ator, L.E.; Paniak, T.J.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Biofilm-Eradicating Properties of Quaternary Ammonium Amphiphiles: Simple Mimics of Antimicrobial Peptides. *ChemBiochem* **2014**, *15*, 2211–2215. [CrossRef]
- Chandki, R.; Banthia, P.; Banthia, R. Biofilms: A microbial home. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2011**, *15*, 111–114.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [CrossRef]
- Jefferson, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? *Fems Microbiol. Lett.* **2004**, *236*, 163–173. [CrossRef] [PubMed]
- Nwodo, U.U.; Green, E.; Okoh, A.I. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14002–14015. [CrossRef] [PubMed]
- Sutherland, I.W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology* **2001**, *147*, 3–9. [CrossRef] [PubMed]
- Donlan, R.M. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33*, 1387–1392. [CrossRef] [PubMed]
- Hall, M.R.; McGillicuddy, E.; Kaplan, L.J. Biofilm: Basic Principles, Pathophysiology, and Implications for Clinicians. *Surg. Infect.* **2014**, *15*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
- Johnson, P.A. Novel understandings of host cell mechanisms involved in chronic lung infection: *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrotic lung. *J. Infect. Public Health* **2019**, *12*, 242–246. [CrossRef] [PubMed]
- Zhang, Y.; Li, J.; Liu, F.; Yan, H.; Li, J.; Zhang, X.; Jha, A.K. Specific quorum sensing signal molecules inducing the social behaviors of microbial populations in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* **2019**, *273*, 185–195. [CrossRef] [PubMed]
- James, G.A.; Swogger, E.; Wolcott, R.; Pulcini, E.D.; Secor, P.; Sestrich, J.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 37–44. [CrossRef]
- Bryers, J.D. Medical Biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 1–18. [CrossRef]
- Khadori, N.; Yassien, M. Biofilms in Devices-Related Infections. *J. Ind. Microbiol.* **1995**, *15*, 141–147. [CrossRef]
- Block, J.C. Biofilms in Drinking water distribution systems. In *Biofilms—Science and Technology*; NATO ASI Series (Series E: Applied Sciences); Melo, L., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1992; pp. 469–485.
- Bott, T.R. Introduction to the problem of biofouling in industrial equipment. In *Biofilms—Science and Technology*; NATO ASI Series (Series E: Applied Sciences); Melo, L., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1992; pp. 3–11.
- Mattila-Sandholm, T.; Wirtanen, G. Biofilm Formation in the Industry—A Review. *Food Rev. Int.* **1992**, *8*, 573–603. [CrossRef]
- Franklin, M.; Nivens, D.; Weadge, J.; Howell, P. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 167. [CrossRef] [PubMed]
- Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 114–122. [CrossRef]
- Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *34*, 577–588. [CrossRef] [PubMed]
- Klausen, M.; Heydorn, A.; Ragas, P.; Lambertsen, L.; Aaes-Jorgensen, A.; Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 1511–1524. [CrossRef]
- Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H.O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 493–512. [CrossRef]
- Abu Bakar, M.; McKimm, J.; Haque, S.Z.; Majumder, M.A.A.; Haque, M. Chronic tonsillitis and biofilms: A brief overview of treatment modalities. *J. Inflamm. Res.* **2018**, *11*, 329–337. [CrossRef] [PubMed]
- Chan, D.I.; Prenner, E.J.; Vogel, H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1184–1202. [CrossRef]
- Sitaram, N.; Nagaraj, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1999**, *1462*, 29–54. [CrossRef]
- Hwang, P.M.; Vogel, H.J. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **1998**, *76*, 235–246. [CrossRef]

33. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin—Isolation, characterization of 2 active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5449–5453. [[CrossRef](#)]
34. Salditt, T.; Li, C.; Spaar, A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1483–1498. [[CrossRef](#)]
35. Steinstraesser, L.; Kraneburg, U.M.; Hirsch, T.; Kesting, M.; Steinau, H.-U.; Jacobsen, F.; Al-Benna, S. Host Defense Peptides as Effector Molecules of the Innate Immune Response: A Sledgehammer for Drug Resistance? *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3951–3970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gao, B.; Zhu, S. Mesobuthus Venom-Derived Antimicrobial Peptides Possess Intrinsic Multifunctionality and Differential Potential as Drugs. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 320. [[CrossRef](#)]
37. Holthausen, D.J.; Lee, S.H.; Kumar, V.T.V.; Bouvier, N.M.; Krammer, F.; Ellebedy, A.H.; Wrammert, J.; Lowen, A.C.; George, S.; Pillai, M.R.; et al. An Amphibian Host Defense Peptide Is Virucidal for Human H1 Hemagglutinin-Bearing Influenza Viruses. *Immunity* **2017**, *46*, 587–595. [[CrossRef](#)]
38. Shen, B.; Song, J.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; Liu, G.; Li, X.; Guo, X.; Li, W.; Cao, Z.; Wu, Y. Triintsin, a human pathogenic fungus-derived defensin with broad-spectrum antimicrobial activity. *Peptides* **2018**, *107*, 61–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Terkawi, M.A.; Takano, R.; Furukawa, A.; Murakoshi, F.; Kato, K. Involvement of beta-defensin 130 (DEFB130) in the macrophage microbicidal mechanisms for killing *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41772. [[CrossRef](#)]
40. Huang, L.; Chen, D.; Wang, L.; Lin, C.; Ma, C.; Xi, X.; Chen, T.; Shaw, C.; Zhou, M. Dermaseptin-PH: A Novel Peptide with Antimicrobial and Anticancer Activities from the Skin Secretion of the South American Orange-Legged Leaf Frog, *Pithecopus* (*Phyllomedusa*) *hypochondrialis*. *Molecules* **2017**, *22*, 1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wang, X.; Ren, S.; Guo, C.; Zhang, W.; Zhang, X.; Zhang, B.; Li, S.; Ren, J.; Hu, Y.; Wang, H. Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2017**, *49*, 550–559. [[CrossRef](#)]
42. Hu, Y.-H.; Zhang, J. CsCCL17, a CC chemokine of *Cynoglossus semilaevis*, induces leukocyte trafficking and promotes immune defense against viral infection. *Fish Shellfish. Immunol.* **2015**, *45*, 771–779. [[CrossRef](#)]
43. Liu, S.; Long, Q.; Xu, Y.; Wang, J.; Xu, Z.; Wang, L.; Zhou, M.; Wu, Y.; Chen, T.; Shaw, C. Assessment of antimicrobial and wound healing effects of Brevinin-2Ta against the bacterium *Klebsiella pneumoniae* in dermally-wounded rats. *Oncotarget* **2017**, *8*, 111369–111385. [[CrossRef](#)]
44. Gupta, S.; Bhatia, G.; Sharma, A.; Saxena, S. Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **2018**, *22*, 239–244. [[CrossRef](#)]
45. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491–511. [[CrossRef](#)]
46. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250. [[CrossRef](#)]
47. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **2002**, *66*, 236–248. [[CrossRef](#)]
48. Teixeira, V.; Feio, M.J.; Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 149–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bechinger, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1999**, *1462*, 157–183. [[CrossRef](#)]
50. Bin Hafeez, A.; Jiang, X.; Bergen, P.J.; Zhu, Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Onaizi, S.A.; Leong, S.S.J. Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 67–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389–395. [[CrossRef](#)]
53. Gordon, Y.J.; Romanowski, E.G.; McDermott, A.M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* **2005**, *30*, 505–515. [[CrossRef](#)]
54. Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; Silvestri, C.; Del Prete, M.S.; Licci, A.; D’Amato, G.; Lukasiak, J.; Scalise, G. In vitro activity of citropin 1.1 alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 410–412. [[CrossRef](#)]
55. Koo, H.B.; Seo, J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Pept. Sci.* **2019**, *111*, e24122. [[CrossRef](#)]
56. Aoki, W.; Ueda, M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1055–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Seo, M.-D.; Won, H.-S.; Kim, J.-H.; Mishig-Ochir, T.; Lee, B.-J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules* **2012**, *17*, 12276–12286. [[CrossRef](#)]
58. Koczulla, A.R.; Bals, R. Antimicrobial peptides—Current status and therapeutic potential. *Drugs* **2003**, *63*, 389–406. [[CrossRef](#)]
59. Mahlapuu, M.; Hakansson, J.; Ringstad, L.; Bjorn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 194. [[CrossRef](#)]
60. González Villa, T.; Veiga-Crespo, P. *Antimicrobial Compounds: Current Strategies and New Alternatives*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; p. 268.
61. Méndez-Samperio, P. Recent advances in the field of antimicrobial peptides in inflammatory diseases. *Adv. Biomed. Res.* **2013**, *2*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S.F. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Cent. Eur. J. Biol.* **2007**, *2*, 1–33. [\[CrossRef\]](#)
63. Rapsch, K.; Bier, F.F.; Tadros, M.; von Nickisch-Rosenegk, M. Identification of Antimicrobial Peptides and Immobilization Strategy Suitable for a Covalent Surface Coating with Biocompatible Properties. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 308–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Nie, B.E.; Long, T.; Ao, H.; Zhou, J.; Tang, T.; Yue, B. Covalent Immobilization of Enoxacin onto Titanium Implant Surfaces for Inhibiting Multiple Bacterial Species Infection and In Vivo Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection Prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01766. [\[CrossRef\]](#)
65. Silva, R.R.; Avelino, K.Y.P.S.; Ribeiro, K.L.; Franco, O.L.; Oliveira, M.D.L.; Andrade, C.A.S. Chemical immobilization of antimicrobial peptides on biomaterial surfaces. *Front. Biosci.* **2016**, *8*, 129–142.
66. Costa, F.; Carvalho, I.F.; Montelaro, R.C.; Gomes, P.; Martins, M.C.L. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1431–1440. [\[CrossRef\]](#)
67. Yu, K.; Lo, J.C.Y.; Mei, Y.; Haney, E.F.; Siren, E.; Kalathottukaren, M.T.; Hancock, R.E.W.; Lange, D.; Kizhakkedathu, J.N. Toward Infection-Resistant Surfaces: Achieving High Antimicrobial Peptide Potency by Modulating the Functionality of Polymer Brush and Peptide. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 28591–28605. [\[CrossRef\]](#)
68. Bagheri, M.; Beyermann, M.; Dathe, M. Immobilization Reduces the Activity of Surface-Bound Cationic Antimicrobial Peptides with No Influence upon the Activity Spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1132–1141. [\[CrossRef\]](#)
69. Alves, D.; Pereira, M.O. Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling* **2014**, *30*, 483–499. [\[CrossRef\]](#)
70. Atefyekta, S.; Blomstrand, E.; Rajasekharan, A.K.; Svensson, S.; Trobos, M.; Hong, J.; Webster, T.J.; Thomsen, P.; Andersson, M. Antimicrobial Peptide-Functionalized Mesoporous Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 1693–1702. [\[CrossRef\]](#)
71. Humblot, V.; Yala, J.-F.; Thebault, P.; Boukerma, K.; Hequet, A.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3503–3512. [\[CrossRef\]](#)
72. Gabriel, M.; Nazmi, K.; Veerman, E.C.; Amerongen, A.V.N.; Zentner, A. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 548–550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Chen, J.J.; Zhu, Y.C.; Xiong, M.H.; Hu, G.S.; Zhan, J.Z.; Li, T.J.; Wang, L.; Wang, Y.J. Antimicrobial Titanium Surface via Click-Immobilization of Peptide and Its In Vitro/Vivo Activity. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 1034–1044. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Gao, G.; Yu, K.; Kindrachuk, J.; Brooks, D.E.; Hancock, R.E.W.; Kizhakkedathu, J.N. Antibacterial Surfaces Based on Polymer Brushes: Investigation on the Influence of Brush Properties on Antimicrobial Peptide Immobilization and Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3715–3727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Gao, G.; Lange, D.; Hilpert, K.; Kindrachuk, J.; Zou, Y.; Cheng, J.T.J.; Kazemzadeh-Narbat, M.; Yu, K.; Wang, R.; Straus, S.K.; et al. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3899–3909. [\[CrossRef\]](#)
76. Glinel, K.; Jonas, A.M.; Jouenne, T.; Leprince, J.; Galas, L.; Huck, W.T.S. Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 71–77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Lim, K.; Chua, R.R.Y.; Saravanan, R.; Basu, A.; Mishra, B.; Tambyah, P.A.; Ho, B.; Leong, S.S.J. Immobilization Studies of an Engineered Arginine-Tryptophan-Rich Peptide on a Silicone Surface with Antimicrobial and Antibiofilm Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 6412–6422. [\[CrossRef\]](#)
78. Li, X.; Li, P.; Saravanan, R.; Basu, A.; Mishra, B.; Lim, S.H.; Su, X.; Tambyah, P.A.; Leong, S.S.J. Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 258–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Masurier, N.; Tissot, J.-B.; Boukhriess, D.; Jebors, S.; Pinese, C.; Verdier, P.; Amblard, M.; Mehdi, A.; Martinez, J.; Humblot, V.; et al. Site-specific grafting on titanium surfaces with hybrid temporin antibacterial peptides. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 1782–1790. [\[CrossRef\]](#)
80. Hilpert, K.; Elliott, M.; Jenssen, H.; Kindrachuk, J.; Fjell, C.D.; Koerner, J.; Winkler, D.F.H.; Weaver, L.L.; Henklein, P.; Ulrich, A.S.; et al. Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 58–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Sperandeo, P.; Bosco, F.; Clerici, F.; Polissi, A.; Gelmi, M.L.; Romanelli, A. Covalent Grafting of Antimicrobial Peptides onto Microcrystalline Cellulose. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 4895–4901. [\[CrossRef\]](#)
82. Pinese, C.; Jebors, S.; Echalié, C.; Licznar-Fajardo, P.; Garric, X.; Humblot, V.; Calers, C.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Simple and Specific Grafting of Antibacterial Peptides on Silicone Catheters. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 3067–3073. [\[CrossRef\]](#)
83. Pinese, C.; Jebors, S.; Stoebner, P.E.; Humblot, V.; Verdier, P.; Causse, L.; Garric, X.; Taillades, H.; Martinez, J.; Mehdi, A.; et al. Bioactive peptides grafted silicone dressings: A simple and specific method. *Mater. Today Chem.* **2017**, *4*, 73–83. [\[CrossRef\]](#)
84. Willcox, M.D.P.; Hume, E.B.H.; Aliwarga, Y.; Kumar, N.; Cole, N. A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1817–1825. [\[CrossRef\]](#)
85. Godoy-Gallardo, M.; Mas-Moruno, C.; Fernandez-Calderon, M.C.; Perez-Giraldo, C.; Manero, J.M.; Albericio, F.; Gil, F.J.; Rodriguez, D. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3522–3534. [\[CrossRef\]](#)

86. Etienne, O.; Picart, C.; Taddei, C.; Haikel, Y.; Dimarq, J.L.; Schaaf, P.; Voegel, J.C.; Ogier, J.A.; Egles, C. Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: A new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3662–3669. [[CrossRef](#)]
87. Guyomard, A.; De, E.; Jouenne, T.; Malandain, J.-J.; Muller, G.; Glinel, K. Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers: A bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 758–765. [[CrossRef](#)]
88. Shukla, A.; Fleming, K.E.; Chuang, H.F.; Chau, T.M.; Loose, C.R.; Stephanopoulos, G.N.; Hammond, P.T. Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2348–2357. [[CrossRef](#)]
89. Cao, P.; Du, C.W.; He, X.Y.; Zhang, C.; Yuan, C.Q. Modification of a derived antimicrobial peptide on steel surface for marine bacterial resistance. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *510*, 145512. [[CrossRef](#)]
90. Zhang, X.Y.; Zhao, Y.Q.; Zhang, Y.D.; Wang, A.Z.; Ding, X.K.; Li, Y.; Duan, S.; Ding, X.J.; Xu, F.J. Antimicrobial Peptide-Conjugated Hierarchical Antifouling Polymer Brushes for Functionalized Catheter Surfaces. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 4171–4179. [[CrossRef](#)]
91. Parreira, P.; Monteiro, C.; Graca, V.; Gomes, J.; Maia, S.; Gomes, P.; Goncalves, I.C.; Martins, M.C.L. Surface Grafted MSI-78A Antimicrobial Peptide has High Potential for Gastric Infection Management. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Xiao, M.Y.; Jasensky, J.; Gerszberg, J.; Chen, J.J.; Tian, J.Y.; Lin, T.; Lu, T.Y.; Lahann, J.; Chen, Z. Chemically Immobilized Antimicrobial Peptide on Polymer and Self-Assembled Monolayer Substrates. *Langmuir* **2018**, *34*, 12889–12896. [[CrossRef](#)]
93. Hilpert, K.; Volkmer-Engert, R.; Walter, T.; Hancock, R.E.W. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1008–1012. [[CrossRef](#)]
94. Schlusshuber, M.; Humblot, V.; Casale, S.; Methivier, C.; Verdon, J.; Leippe, M.; Berjeaud, J.-M. Potent antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila* and its environmental host, *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 4879–4891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mishra, B.; Basu, A.; Chua, R.R.Y.; Saravanan, R.; Tambyah, P.A.; Ho, B.; Chang, M.W.; Leong, S.S.J. Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: Evaluation against urinary tract infection pathogens. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1706–1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Mijndonckx, K.; Leys, N.; Mahillon, J.; Silver, S.; Van Houdt, R. Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance. *Biomaterials* **2013**, *26*, 609–621. [[CrossRef](#)]
97. Percival, S.L.; Bowler, P.G.; Russell, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* **2005**, *60*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Costa, F.; Maia, S.R.; Gomes, P.A.C.; Martins, M.C.L. Dhar5 antimicrobial peptide (AMP) chemoselective covalent immobilization results on higher antiadherence effect than simple physical adsorption. *Biomaterials* **2015**, *52*, 531–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Hancock, R.E.W.; Haney, E.F.; Gill, E.E. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 321–334. [[CrossRef](#)]
100. Biswara, L.S.; da Costa Sousa, M.G.; Rezende, T.M.B.; Dias, S.C.; Franco, O.L. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 855. [[CrossRef](#)]
101. Molchanova, N.; Hansen, P.R.; Franzyk, H. Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs. *Molecules* **2017**, *22*, 1430. [[CrossRef](#)]
102. Pfalzgraff, A.; Brandenburg, K.; Weindl, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 281. [[CrossRef](#)]
103. Porto, W.F.; Irazabal, L.N.; Humblot, V.; Haney, E.F.; Ribeiro, S.M.; Hancock, R.E.W.; Ladram, A.; Franco, O.L. EcDBS1R6: A novel cationic antimicrobial peptide derived from a signal peptide sequence. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2020**, *1864*, 129633. [[CrossRef](#)]
104. Porto, W.F.; Irazabal, L.; Alves, E.S.F.; Ribeiro, S.M.; Matos, C.O.; Pires, A.S.; Fensterseifer, I.C.M.; Miranda, V.J.; Haney, E.F.; Humblot, V.; et al. In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 129633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Annexe 6

Cette Annexe correspond à un article publié en 2021 dans le journal Journal of Optical Society of America B :

” Mueller micropolarimeter for color imaging of aluminum metasurfaces”



Mueller micropolarimeter for color imaging of aluminum metasurfaces

M. NICOLAS,^{1,2} I. SOUMAHORO,³ L. ZHANG,^{1,2} G. GUIDA,⁴ W. DANÉY DE MARCILLAC,¹
D. DEMAÏLLE,¹ C. SCHWOB,¹ S. BOUJDAY,² AND B. GALLAS^{1,*}

¹Sorbonne Université, Faculté des Sciences, CNRS, Institut des Nano-Sciences de Paris (INSP), 75005 Paris, France

²Sorbonne Université, Faculté des Sciences, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), 75005 Paris, France

³Université Nangui Abrogoua, Department of Fundamental and Applied Sciences LPFA, Abidjan, Côte d'Ivoire

⁴LEME, EA 4416, Université Paris Nanterre, Nanterre, France

*Corresponding author: bruno.gallas@insp.jussieu.fr

Received 7 December 2020; revised 10 February 2021; accepted 20 February 2021; posted 22 February 2021 (Doc. ID 416833);
published 18 March 2021

Many anticounterfeiting tags rely on images intricate in different color and/or different polarization states to create optical effects invisible in conventional observation conditions. We build here an imaging micropolarimeter based on the dual-rotating compensator system and using the color capabilities of cameras to yield the full polarimetric information for any color coordinates in one acquisition step. After correction for the camera response, the full color image reconstructed from the polarimetric response is validated by comparison with images obtained in an optical microscope fitted with polarizers. © 2021 Optical Society of America

<https://doi.org/10.1364/JOSAB.416833>

1. INTRODUCTION

Nanostructures host localized resonances that allow strong interaction with light in a defined wavelength range of the spectrum. This effect has been studied intensively and has been proposed to yield colorful effects with subwavelength resolution that would not fade over time. One can yield these colors with localized surface plasmon resonances [1], holograms [2], diffraction and interferences [3,4], and Mie resonances [5–7]. In addition, the dependence on polarization of anisotropic nanostructures can be added to yield additional effects such as encoding images in polarization [3,8–10]. Different metals exhibit plasmonic resonances, but aluminum is particularly interesting due to its plasmonic resonance spectrum that covers all the visible range and because it is a low-cost material [11–15]. One application of structural and plasmonic colors is in anticounterfeiting where the ability to build complex structures with unique but easily detectable responses is important. Metasurfaces and nano-resonators have been studied as a way to yield anticounterfeiting tags [16,17]. Finally, some realizations have used polarization effects at one wavelength only [10]; however, the use of colorful effects allows fancier tags and, more importantly, different images at different polarization states and colors to be encoded in the same surface. In the design of such tags, having measurement tools combining the full polarimetric properties together with colorimetric coordinates would be particularly interesting.

The most comprehensive polarimetric response of anticounterfeiting tags is required, as it would allow evaluating the

intensity observed for any emerging polarization of a surface illuminated with any incident polarization state. In particular, the information about partially polarized light is important since practical observation of many anticounterfeiting tags would use ambient light, which is nonpolarized, as a light source. Obviously, anticounterfeiting tags contain an image that can be recognized by the wary observer and would warrant the authenticity of the tag. During the design of such optical effects, it is then indispensable to combine both polarimetric and imaging capabilities to evaluate the Mueller matrix, which contains all the polarimetric information, at different wavelengths of the image under investigation.

Imaging polarimeters have been proposed in particular for biological diagnosis applications using high numerical aperture objectives [18,19]. High resolution polarimetric imaging of the high harmonic response of a metasurface has also been described [20]. In these cases, the polarization state generator (PSG) and polarization state analyzer (PSA) are based on nonmoving elements for stability's sake. However, this makes calibration steps and acquisition cumbersome and multi-wavelength imaging difficult. In contrast, devices based on dual-rotating compensators have been the early experimental setups proposed for real-time and spectroscopic full Mueller matrix determination in the far field [21–23]. More recently, imaging using spectrally filtered light has been demonstrated using dual-rotating elements [24].

In this work, we extend previous studies made on polarimetric imagers to realize an imaging micropolarimeter based on a

dual-rotating compensator configuration and using the color properties of a camera to obtain simultaneously both full polarimetric and color information on the same metasurface in one acquisition run. We illustrate the capabilities of our experimental setup to evaluate the polarization dependence of the observed color using a palette containing aluminum nanostructures.

2. MICROSCOPY POLARIMETRIC IMAGING

Mueller–Stokes formalism allows describing the polarimetric response of any surface illuminated by a light source with any polarization state, including unpolarized light. The polarization state of light is described by the four-element Stokes vector $S = (I_{\text{tot}}, I_x - I_y, I_{+45^\circ} - I_{-45^\circ}, I_{\text{RHP}} - I_{\text{LHP}})$, where I_{tot} is the total intensity; I_x and I_y are the intensities of the components linearly polarized along, respectively, directions x and y ; I_{+45° and I_{-45° are the intensities of the components linearly polarized, respectively, at $+45^\circ$ and -45° from the x direction; and I_{RHP} and I_{LHP} are the intensities of the components of the right-handed and left-handed circular polarizations, respectively. The 4×4 Mueller matrix M relates the emerging light described by its Stokes vector S_{out} to the incident one described by S_{inc} through $S_{\text{out}} = M \cdot S_{\text{inc}}$. Determination of the elements of the Mueller matrix of the samples requires generating different polarization states and analyzing the components of the emerging polarization state. With that aim, we have used a home-built imaging micropolarimeter based on a dual-rotating compensator polarimeter as presented in Fig. 1(a) and inspired from previous work [24]. The PSG is composed of a linear polarizer and a rotating quarter-wave plate yielding different states of polarization of light. The PSA is composed of the same elements in reverse order, allowing to analyze any polarization state. With this assembly, the incident polarization is defined only by the linear polarizer of the PSG, and, provided that the detector after the PSA is polarization independent, all the needed information about polarization is between the PSG and PSA. The sample to be studied is placed between a condensing lens and a microscope objective to image it.

A. Method of Analysis

From the time-dependent intensity of each pixel of the imaging system, it is possible to extract the full Mueller matrix of each

point of the imaged surface. The Stokes vector representing the light seen by the camera $S_{\text{out}}(t)$ is described as a function of the Mueller matrices of the linear polarizers (P_0 and P_1 oriented at angles α_0 and α_1), the two compensators (M_{C_0} and M_{C_1}), the objective M_{obj} , the condensing lens M_{lens} , the Mueller matrix of the sample considered M_S (to be determined), and the incoming unpolarized light S_{inc} . The values of $S_{\text{out}}(t)$ vary with time t owing to the rotating compensators, the time clock being given by the framerate of the camera. Considering the order of the different elements [Fig. 1(a)], the intensity measured can be cast in a Stokes vector as follows:

$$S_{\text{out}}(t) = P_1(\alpha_1)M_{C_1}(\omega_1 t + \phi_1, \delta_1)M_{\text{obj}}M_S M_{\text{lens}}, \quad (1)$$

$$M_{C_0}(\omega_0 t + \phi_0, \delta_0)P_0(\alpha_0)S_{\text{inc}}$$

with ω_0 the velocity of C_0 , ω_1 the velocity of C_1 , ϕ_0 the phase at origin of C_0 , ϕ_1 the phase at origin of C_1 , δ_0 the retardance of C_0 , δ_1 the retardance of C_1 , and time t . With unpolarized incident light, $S_{\text{inc}} = (1, 0, 0, 0)$, and without the objective or lens, the intensity measured with the camera $I(t)$ is

$$I(t) = f(\omega_0, \omega_1, \phi_0, \phi_1, \delta_0, \delta_1, \alpha_0, \alpha_1, t)M_S. \quad (2)$$

By inverting this formula with a method first used in Ref. [25], we obtain every Mueller matrix element of the sample M_S .

The angle α_0 is set to 0° , and all the angles hereafter are determined with respect to α_0 . To determine the other parameters ($\alpha_1, \phi_0, \phi_1, \delta_0$, and δ_1), a calibration procedure is needed. The calibration is made in a straight-through configuration without a sample, lens, or objective, so $[M_S, M_{\text{lens}}, M_{\text{obj}}] = [I_4]$ are the identity matrices. It is made by averaging the intensity of all the pixels of the camera, considered as a point detector, and fitting the obtained total intensity to a theoretical curve. In the following, we have assumed that the different optical elements could be described by the Mueller matrices of perfect polarizers and retarders. The time evolution of the total intensity in a straight-through configuration is then given by

$$I(t) = I_\theta (1 + C_{2\alpha_1} [-(C_{\delta_0} S_{2\theta_0}^2 + C_{2\theta_0}^2)(C_{\delta_1} S_{2\theta_1}^2 + C_{2\theta_1}^2) - (1 - C_{\delta_0})(1 - C_{\delta_1})C_{2\theta_0} S_{2\theta_0} C_{2\theta_1} S_{2\theta_1} + S_{\delta_0} S_{\delta_1} S_{2\theta_0} S_{2\theta_1}] + S_{2\alpha_1} [-(1 - C_{\delta_0})C_{2\theta_0} S_{2\theta_0} (S_{2\theta_1}^2 + C_{\delta_1} C_{2\theta_1}^2) + (1 - C_{\delta_1})(-C_{\delta_0} S_{2\theta_0}^2 - C_{2\theta_0}^2)C_{2\theta_1} S_{2\theta_1} - S_{\delta_0} S_{\delta_1} S_{2\theta_0} C_{2\theta_1}]) \quad (3)$$

where we have used the notations $C_Y \equiv \cos(Y)$; $S_Y \equiv \sin(Y)$; $\theta_0 = \omega_0 t + \phi_0$ and $\theta_1 = \omega_1 t + \phi_1$. The prefactor I_θ is the total intensity reaching the detector and is used to normalize $I(t)$ in the determination of the Mueller matrices.

It can be noted that with $\alpha_1 = 90^\circ$, we obtain the relation given in Ref. [24]. Once the calibration of the angles and retardance of the wave plates are done, a correction due to residual retardation introduced by the imaging system (lens + objective) has to be performed for every pixel. Using Eq. (2) with $M_S = I_4$ (so without sample), we determine $M_{\text{obj}}M_{\text{lens}}$. We cannot separate experimentally M_{obj} and M_{lens} , although the sample is placed between the two. To apply the correction, we consider $M_{\text{obj}}M_{\text{lens}}$ as a retarder with a small retardance (which is confirmed experimentally in Figs. 2(a) and 2(b)). So, $M_{\text{obj}}M_{\text{lens}}$ can be approximated to a diagonal matrix. We then assume that M_S and M_{lens} commute with M_S . Finally, we can consider a corrected matrix for the sample, which is defined by

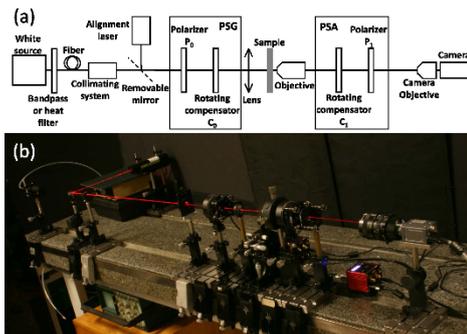


Fig. 1. (a) Scheme and (b) photography of the optical setup.

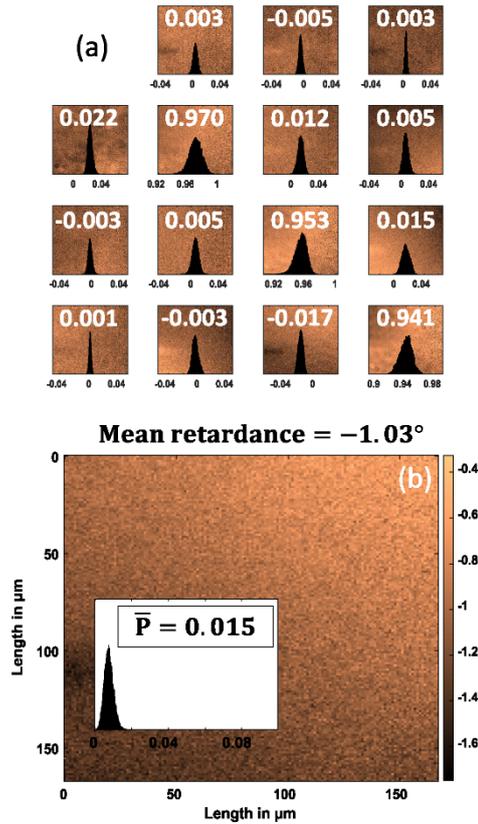


Fig. 2. (a) Mueller matrix $M_{\text{obj}} M_{\text{lens}}$ of the imaging system before correction after averaging five consecutive measurements at 650 nm. The insets present histograms of the values distribution over all pixels in each element with the mean values. (b) Image of spatial variation of the retardance of imaging system modeled as a pure retarder. The inset presents a histogram of the polarizance values over all the pixels of the camera of the imaging system.

$$M_S^{\text{corrected}} = (M_{\text{obj}} M_{\text{lens}})^{-1} M_S^{\text{measured}}. \quad (4)$$

B. Characteristics of the Setup

A photograph of our experimental setup illuminated with the alignment laser is presented in Fig. 1(b). The white source was a stabilized broadband light source (Thorlabs-SLS201/M) fitted with a fiber coupler. The beam was filtered through a bandpass or heat filter. The heat filter (Heat Abs Glass KG-5, Edmunds Optics) was used for measurements with white illumination to consider only the visible part of the light spectrum. The monochromatic measurements were performed with Corion bandpass filters with a bandwidth of 70 nm. In the following, we will mention only the center wavelength of the filters. The light was condensed at the output of the fiber to yield a collimated

parallel beam. The PSG and PSA were composed of fixed linear polarizers (PGT-S1V Glan-Taylor polarizer and WP25M-UB wire grid polarizer Thorlabs, respectively) and superachromatic quarter-wave plates as compensators (SAQWP05M-700 superachromatic quarter-wave plates Thorlabs). A plano-convex converging lens ($f = 75$ mm) was used to condense the incident beam and increase the illuminance on the surface of the sample. It was placed after the PSG so that the incident beam on the PSG was collimated. An infinite conjugated objective (Olympus, UMP1anFI $20\times$ /NA = 0.46) was used to image the surface. The camera was a Sony XCD-SX90CR allowing an acquisition of 30 frames per second fitted with an objective with 69 mm of focal length.

We crossed the polarizer and the analyzer at $\alpha_0 = 0^\circ$ and $\alpha_1 = 90^\circ$ since the relative angles are easy to set due to Malus' law.

The compensators were integrated into motorized rotation stages (Thorlabs PRM1Z8 and Thorlabs KDC101 K-Cube Brushed DC Servo Motor Controller). These rotation stages permit to control the position and rotation speed of the compensators at every time up to $25^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ with an accuracy of 0.1%. The compensators were rotating at $\omega_0 = 4^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ and $\omega_1 = 20^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ with fixed phases at origins ϕ_0 and ϕ_1 corresponding to the mechanical misalignment of the fast axis of the wave plates with the reference of the motor angle with respect to α_0 .

The velocity ratio of the compensators is of crucial importance to allow the extraction of the Mueller matrix of the sample from the measured intensities. Following previous studies, we chose a ratio of $\frac{\omega_0}{\omega_1} = 5$ [22–24,26]. To achieve a measurement, a single turn of the slowest compensator is needed, i.e., 90 s. To ensure that the values of ϕ_0 and ϕ_1 were always the same after calibration, the motors were synchronized with the camera so that the image acquisition and angle readings referred to the same clock. After the calibration procedure described previously, we obtained the values of the five angles: α_1 , ϕ_0 , ϕ_1 , δ_0 , and δ_1 .

We have to consider the systematic errors that arise from the non-ideality of the different optical elements, uncertainties about the calibration results, and uncertainties about the alignment procedure. The position of the analyzer was determined due to Malus' law; we find, with the calibration fit, $\alpha_1 = 90 \pm 10^{-2}$. Since the compensators are not perfectly achromatic, the values for the retardances were determined for each wavelength used during the experiments. We used a conventional ellipsometer to cross-check the values found with our calibration procedure. For instance, the value of the retardance of the compensator C_1 varied around $94^\circ \pm 2^\circ$ in the 400 nm–800 nm spectral range. With a filter centered at 620 nm, we found with our calibration $\delta_1 = 92.97^\circ$, while with ellipsometric measurement, $\delta_1 = 92.70^\circ$ at 620 nm. This shows that the calibration procedure yields accurate values of the retardance for our compensators. There is also a systematic uncertainty about the position of the compensators. Indeed, the fastest component is rotating at $20^\circ \cdot \text{s}^{-1}$, whereas the framerate of the camera is 30 s^{-1} . This induces a 0.67° systematic uncertainty in the position of this rotating element. The propagation of errors was studied and can be found in Refs. [24,27,28]. With a first-order approximation, we estimate that the systematic errors of our setup introduce an uncertainty for the Mueller

matrix coefficients to be generally below ± 0.02 except for the elements M_{23} and M_{32} (± 0.05), which are more sensitive to errors [24].

Random noise also affects the values of the Mueller matrix elements. The dispersion of the data in each pixel of the camera can be automatically reduced thanks to an averaging of several consecutive measurements. To analyze this influence, a measurement was performed with a filter centered at 650 nm. The dispersion of the matrix coefficients of the imaging system M_{obj} M_{ens} in air averaged over the whole imaged field is shown in Fig. 2(a).

The standard deviations were of $5 \cdot 10^{-3}$ after averaging five consecutive measurements. To extract the polarization properties of the imaging system, we used the logarithmic decomposition of the Mueller matrix M_{obj} M_{ens} [29,30]. The imaging field was 150×150 pixels². The average depolarization extracted over all the pixels was of 0.047 on average, and the polarizance \bar{P} was found nearly equal to zero with an average value of 0.015 [inset of Fig. 2(b)]. These values hint towards the imaging system behaving as a pure retarder. Figure 2(b) presents the retardance map obtained with the logarithmic decomposition. It was homogeneous across the camera detector and had an average value of -1.03° . This justifies *a posteriori* the approximations made in our correction model [Eq. (4)] considering that the imaging system could be seen as a linear retarder with a small retardance.

C. Precession of the Rotating Compensators

When imaging microscopic objects, one source of error induced by this system is the effect of the rotating element on the position of the beam emerging from the PSA. An error that cannot be reduced originates in the faces of the output compensators not being perfectly parallel resulting in a deviation of the beam. A point of the sample will no longer be imaged on the same pixel of the camera, yielding a blurred image. The wave plates used here are given by the constructor with a beam deviation below 3 arcmin (around $5 \cdot 10^{-2}^\circ$). This deviation would be well below the acceptance angle of the wire grid polarizer (20°), which ensures that the intensity detected on the detector would allow extracting the Mueller matrix elements. Our PSA is located at approximately 30 cm from the camera detector, but the focal length of the camera objective is 69 mm, which is the actual length to be taken into account. This focal length would result in a displacement of the image of approximately $60 \mu\text{m}$ on the CCD detector of the camera, across a full rotation of the compensator of the PSA. This effect would strongly hamper the resolution of the imaging system. Before placing the wave plate in our micropolarimeter, we determined, experimentally, the beam deviation induced by the non-parallel faces of the compensator and found it to be below approximately $5 \cdot 10^{-3}^\circ$. This results in a displacement of the image on the detector plane below $6 \mu\text{m}$. This value must be compared to the size of the sub-pixels of our camera detector, which are $3.75 \times 3.75 \mu\text{m}^2$ organized in the 2×2 Bayer configuration. In the color imaging configuration, we will consider only one sub-pixel out of four for each color. So, two sub-pixels of the same color are actually separated by up to $7.5 \mu\text{m}$. The expected displacement of the image should be of approximately one pixel for our resolution.

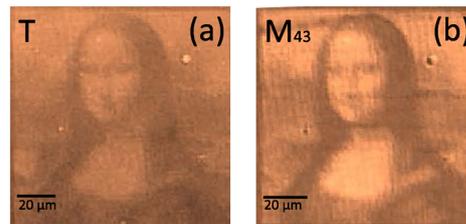


Fig. 3. (a) Image of a metasurface containing a reproduction of Mona Lisa in direct imaging configuration of the micropolarimeter (transmittance T) and (b) M_{43} coefficient of the Mueller matrix determined after measurement at 650 nm. Details of the image remain clearly visible despite the possible displacement of the beam induced by the rotating elements in the micropolarimeter.

This influence is shown in Fig. 3 where the Mueller matrix element M_{43} determined at 650 nm of a metasurface representing a Mona Lisa made of gold U-shaped resonators [10] is compared to the intensity image measured on the same surface with the compensators not rotating [Fig. 3(a)]. The image is $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ with 90×90 points: we can see that fine details can still be resolved despite the possible displacement of the beam induced by the rotating compensators.

The beam deviation error may be reduced by applying a position correction of the image by tracking computationally the position of the image as a function of the wave plate angle. However, with the magnification used here, the deviation had more or less the same magnitude as a pixel resolution and was not necessary.

D. Use of Mueller Matrix to Obtain the Colorimetric Coordinates of a Sample

To achieve a polarimetric measurement with color information, the signal obtained at three different wavelengths corresponding to the red (R), green (G), and blue (B) colorimetric coordinates could be enough due to the possibility to make RGB reconstructions. With our system, a feasible solution would be to measure our sample with three different bandpass filters placed in front of the broadband light source. However, it is possible to use the properties of the detector of our color camera for which each pixel contains four sub-pixels arranged in a Bayer configuration [31]. The Bayer configuration within each pixel is presented in Fig. 4(a) together with the spectral response of the color filters placed in front of each sub-pixel [Fig. 4(b) is a graph taken from the constructor notice]. These filters effectively achieve the spectral filtering of the broadband source, and the polarimetric response for each color can be acquired in only one acquisition, provided that each sub-pixel is treated separately. A single white illumination allows three measurements at three different wavelengths.

However, it can be seen that the filters have a rather large bandwidth and that the spectral signals overlap. In addition, it is known that the blue filter can show some efficiency again in the near infrared, requiring the use of a heat filter.

As a consequence of the overlap of the spectral response of the R, G, and B filters of the camera, cross-talk can be

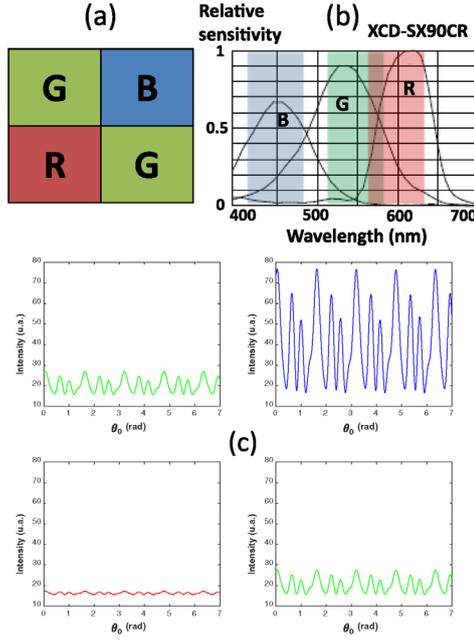


Fig. 4. (a) Bayer RGB configuration of the camera. (b) Manufacturer characteristics for the sensitivity of different RGB pixels (full lines). The positions and bandwidths of the Corion filters are also indicated as colored rectangles. (c) Mean intensity in each sub-pixel of the Bayer configuration with an incoming blue light centered at 450 nm.

expected between the sub-pixels. Figure 4(c) presents the time dependence of the intensities recorded in each sub-pixel in a straight-through configuration for incoming blue light (filtered at the source at 450 nm). It is clearly observed that the amplitude of the intensity variations in each sub-pixel of the camera depends on the incoming wavelength. In Fig. 4(c), there was some cross-talk among the pixels, particularly between the G and B ones since the intensity in the G pixels is not negligible. Consequently, three measurements were made at $\lambda_B = 450$ nm, $\lambda_G = 550$ nm, and $\lambda_R = 600$ nm, as close as possible to the maximum of the camera filters to obtain all ratios of the amplitudes characterizing the cross-talk. An X matrix with 3×3 dimension containing the cross-talk parameters is presented below with the experimental values (in the equations, the intensities are represented with this formalism $I_{\text{subpixel}}^{\text{source}}$):

$$X = \begin{bmatrix} 1 & \frac{I_R^{\lambda_G}}{I_G^{\lambda_G}} & \frac{I_B^{\lambda_B}}{I_G^{\lambda_B}} \\ \frac{I_G^{\lambda_R}}{I_R^{\lambda_R}} & 1 & \frac{I_B^{\lambda_B}}{I_R^{\lambda_B}} \\ \frac{I_B^{\lambda_R}}{I_R^{\lambda_R}} & \frac{I_B^{\lambda_G}}{I_G^{\lambda_G}} & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0.24 & 0.03 \\ 0.09 & 1 & 0.19 \\ 0.01 & 0.07 & 1 \end{bmatrix}. \quad (5)$$

An ideal intensity I_{ideal} is calculated. It contains the three intensities needed to determine the Mueller matrices at the three corresponding wavelengths with the method presented previously (Σ stands for white illumination):

$$\begin{bmatrix} I_R^\Sigma \\ I_G^\Sigma \\ I_B^\Sigma \end{bmatrix} = X \begin{bmatrix} I_R^{\lambda_R} \\ I_G^{\lambda_G} \\ I_B^{\lambda_B} \end{bmatrix} \quad \text{and} \quad I_{\text{ideal}} = \begin{bmatrix} I_R^{\lambda_R} \\ I_G^{\lambda_G} \\ I_B^{\lambda_B} \end{bmatrix} = X^{-1} \begin{bmatrix} I_R^\Sigma \\ I_G^\Sigma \\ I_B^\Sigma \end{bmatrix}. \quad (6)$$

Three Mueller matrices normalized to M_{11} are determined: M_R , M_G , and M_B . There is one matrix for each pixel of the camera. One can use these matrices by multiplying with an input Stokes vector at each pixel to simulate the effect of any incoming polarization on a sample. For each pixel of the camera, we obtain an output Stokes vector:

$$S_{\text{input}} = \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \end{bmatrix} \quad \text{with} \quad \begin{cases} S_{\text{output}}^{\lambda_R} = M_R S_{\text{input}} \\ S_{\text{output}}^{\lambda_G} = M_G S_{\text{input}} \\ S_{\text{output}}^{\lambda_B} = M_B S_{\text{input}} \end{cases}, \quad (7)$$

which describes the polarization state of the output light. Due to the Stokes formalism, it is possible to choose to display whether the total intensity, i.e., the first element of S_{output} , or different characteristics of the polarization of the light by using the different components of the Stokes vector. By inserting the Mueller matrices of polarizers into the calculation, it is also possible to filter the response for any polarization of observation. In the following, we will focus on using the wavelength dependence information to make a polarized RGB reconstruction of an image.

3. APPLICATION TO A METASURFACE MADE OF NANO-U ALUMINUM STRUCTURES

A palette containing aluminum nanostructures was imagined to evaluate the polarization dependence of the observed colors for these structures. Different sizes of U-shaped resonators placed on a square lattice with different lattice constants were tested. Indeed, it is known that both size and distance between resonators can affect the color observed [15]. With the aim of obtaining red, blue, and green colors in transmission, the size of the resonators and the lattice constant were designed using calculations based on finite element methods (HFSS by ANSYS). We used aluminum as the material to allow for plasmonic resonances in the blue part of the spectrum to be excited. We found that resonators with total footprints of 320×320 nm² [Fig. 5(a)], 270×270 nm² [Fig. 5(b)], and 170×170 nm² [Fig. 5(c)] could yield red, green, and blue colors, respectively. We also investigated four lattice constants of 350 nm, 400 nm (Fig. 5), 450 nm, and 500 nm. The samples were made with a classical e-beam lithography (EBL) method. Figure 5 presents a sketch of the different U-shaped resonators investigated together with the scanning electron microscopy (SEM) images of the obtained square lattices of resonators made of aluminum. To obtain these resonators, a 150 nm thick PMMA layer was spin-coated on a glass substrate followed by a 20 nm thick coating Electra92 to avoid charging effects during the electron beam exposure. After e-beam inscription, the Electra resist was

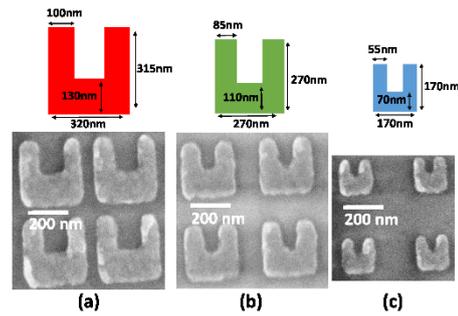


Fig. 5. Scanning electron microscopy (SEM) images of U-shaped nano structures of different size scaling on a lattice of 400 nm: resonators of (a) 320 nm, (b) 270 nm, and (c) 170 nm. The schematics above the images give the actual dimensions.

removed in deionized water, and then a MIBK-IPA (mixture of methyl isobutyl ketone and isopropanol) development step was made to reveal the exposed areas. A 40 nm thick aluminum layer was deposited, and finally, the excess resist was lifted off to yield arrays of U-shaped resonators on the glass substrate. For each combination of resonator size and lattice constant, an area of $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ was made, resulting in 12 areas.

The different plasmonic resonant modes excited in U-shaped resonators have already been studied extensively [32–34]. The different modes can be excited selectively with light linearly polarized along either the lateral arms or the bottom arm of the U-shaped resonators, hence yielding different colors. These metasurfaces were observed using a conventional optical microscope (Olympus BX61) fitted with a heat filter and linear polarizers. The observations were made in transmission bright field mode, and the observed images are presented in Figs. 6(a) and 6(b). The white balance was performed on the light transmitted in the glass next to the areas containing the resonators and set to $(R,G,B) = (255,255,255)$. One can observe that each patch had a different color and that the color in each patch changed depending on the state of polarization for the incoming light. Since the numerical aperture of the microscope objective may affect the observed colors, the measurements were made with the same $\times 20$ objective as the one used in the micropolarimeter. With this objective, a single measurement is enough to observe the 12 patches.

The metasurface was measured also with the polarimetric setup. The Mueller matrices of the sample were recorded with white heat-filtered illumination at normal incidence. After obtaining these Mueller matrices, the method presented previously to recover the colorimetric coordinates of a sample with specific states of incoming or output polarization was used. After a cross-talk correction, we chose to use two input Stokes vectors to observe the effect of incoming vertically and horizontally polarized light, $S_{in} = (1, 1, 0, 0)$ and $S_{in} = (1, -1, 0, 0)$, respectively. The angles of the linear polarizations were optimized by adjusting the Stokes vector because we cannot apply a light perfectly polarized parallelly or perpendicularly to the arms of the U resonators. We considered the first component of the output Stokes vector, and after an RGB recombination,

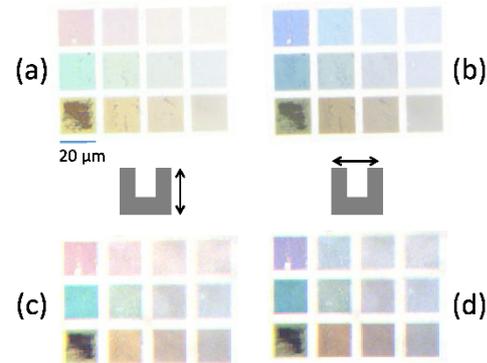


Fig. 6. Optical microscope observations of the samples of aluminum nanostructures with two different states of incoming linearly polarized light, respectively, (a) vertically and (b) horizontally, with corrected backgrounds. RGB recombination of an output Stokes parameter after a single Mueller matrix measurement for incoming linearly polarized light, respectively, (c) vertically and (d) horizontally.

a color was obtained for each pixel of the image. A white balance was performed by applying for each color a correction calculated by (i) determining the average value of the intensity I_o [Eq. (3)] over a small area of the glass substrate, $\langle I_{o, \text{glass}}^i \rangle$ with $i = (\lambda_R, \lambda_G, \lambda_B)$, and (ii) applying to each pixel and each color channel the multiplicative factor $255 \cdot I_{o, \text{pixel}}^i / \langle I_{o, \text{glass}}^i \rangle$. The reconstructed color images obtained for each incoming polarization state are shown in Figs. 6(c) and 6(d). We observe a qualitative very good agreement between the colors observed in the optical microscope [Figs. 6(a) and 6(b)] and the reconstructed ones [Figs. 6(c) and 6(d)], which supports our methodology for extracting the polarized-resolved color information of metasurfaces at the micrometer scale.

Some improvement may be brought to allow for a comparison using real colorimetric coordinates. The achromaticity of the optical components cannot be improved much, in particular for the quarter-wave plates. A possibility could be to use a Fresnel rhomb retarder instead of an achromatic wave plate. Fresnel rhomb retarders bring improvement in the fast angle orientation compared to achromatic quarter-wave plates for which the fast axis varies between -1.59° and $+0.78^\circ$ in the visible part of the spectrum. The retardance deviates from a quarter-wave by 0.004 wave for a Fresnel rhomb and by 0.008 wave for the achromatic wave plates in the visible range. However, because the retarders are rotating continuously, the beam deviation is a lot easier to minimize in imaging conditions with quarter-wave plates. The variation with wavelength of the fast axis and retardance of the quarter-wave plates, together with the broad wavelength analyzed in each pixel of the Bayer configuration, should induce depolarization in the measurements. The depolarization measured remained low. Indeed, using a previous study [35], we calculated the depolarization induced by the two quarter-wave plates in a straight-through configuration with depolarization of $1 - \sqrt{\frac{\text{tr}(M^T M) - M_{11}^2}{3 * M_{11}^2}}$, where $M = M_{C_1}$

or $M = M_{C_0}$ [36]. Considering the spectral dependence of the retardance and fast axis orientation of the achromatic quarter-wave plates provided by the manufacturer and with a bandwidth of 70 nm, we found depolarizations of 1.5×10^{-3} , 8.6×10^{-4} , and 1.8×10^{-4} at 450 nm, 550 nm, and 600 nm, respectively. These values are well below the value extracted for $M_{o_b} M_{e_{ms}}$ presented above. This shows that the non-ideal retardance of the quarter-wave plates was not a limiting factor in our setup. This is in line with the propagation in the Mueller matrices of errors made on the actual value of the retardance [24]. The overlap of the color filters of the CCD detector of our camera induces probably cross-talk corrections slightly different from the ones used here, and the values may be retrieved using color standards: this was beyond the scope of this work and the determination of the cross-talk coefficients using filters allowed us to clearly show how it affected the measurements. The interest of the procedure described here is multiple. Many anticounterfeiting tags proposed are using images interleaved in orthogonal polarization states [3,8,9] or hidden in some polarization state [10]. The good contrast between the different images relies on the perfect alignment of the polarization axes used for imaging with the axes of the images. The full polarimetric measurement of the sample and fast post-processing of the data would allow finding directly the optimum polarization axes to have the better contrast or reveal the image without relying on tedious alignment for the end user (be it scientist or customer). For commercial applications, there will be need of polarimetric measurements. There are already Stokes cameras available, generally working at one wavelength. We show here that imaging at multiple wavelengths to render color polarized images would be feasible. There are more and more proposals of using the camera of smartphones for anticounterfeiting applications. Recent publications on metasurfaces allow to envision external adaptors that could be fitted to the camera of smartphones to allow for Stokes imaging [37]. The full color measured Mueller matrix of the tag could be recorded in a secured database and used to validate the measured Stokes vector.

4. CONCLUSION

In this work, we have built a micropolarimeter combining imaging and color rendering capabilities. The micropolarimeter was based on a dual-rotating compensator system allowing to determine all 16 elements of the Mueller matrix. Due to the use of a short focal length camera, the error on the beam position introduced by the rotating elements could be maintained at acceptable levels. The color capability was obtained through the use of the Bayer configuration of the detector of the camera to filter the three R, G, and B color coordinates. Three Mueller matrices were determined simultaneously after cross-talk correction and allowed reconstructing a color image observed for two orthogonal linear polarizations. Obviously, the mathematical reconstruction could be used for any combination of incident to emerging polarization. Such a polarimeter and the information derived from its measurements could be used to investigate systematically and conveniently the color response for any polarization conditions of anticounterfeiting tags where images would be intricate in color and polarization.

Funding. Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE09-0010-01); Cluster of Excellence MATISSE funded by the Investissements d'Avenir French Government program.

Acknowledgment. The authors acknowledge the help of F. Breton at the INSP for the interfacing of the micropolarimeter. This work has been carried out thanks to the support of the ANR Chiroptmol. Three authors (L. Z., S. B., and B. G.) acknowledge support by the Cluster of Excellence MATISSE funded by the Investissements d'Avenir French Government program. Part of this work was carried out within a bipartite agreement between Sorbonne University and University Nangui Abrogoua.

Disclosures. The authors declare no conflicts of interest related to this paper.

REFERENCES

1. A. Kristensen, J. K. W. Yang, S. I. Bozhevolnyi, S. Link, P. Nordlander, N. J. Halas, and N. A. Mortensen, "Plasmonic colour generation," *Nat. Rev. Mater.* **2**, 16088 (2017).
2. Y.-W. Huang, W. T. Chen, W.-Y. Tsai, P. C. Wu, C.-M. Wang, G. Sun, and D. P. Tsai, "Aluminum plasmonic multicolor meta-hologram," *Nano Lett.* **15**, 3122–3127 (2015).
3. L. Duempelmann, A. Luu-Dinh, B. Gallinet, and L. Novotny, "Four-fold color filter based on plasmonic phase retarder," *ACS Photon.* **3**, 190–196 (2016).
4. E. D. Finlayson, I. R. Hooper, C. R. Lawrence, M. Heath, D. Anderson, J. R. Sambles, and P. Vukusic, "Covert images using surface plasmon-mediated optical polarization conversion," *Adv. Opt. Mater.* **6**, 1700843 (2018).
5. J. Proust, F. Bedu, B. Gallas, I. Ozerov, and N. Bonod, "All-dielectric colored metasurfaces with silicon Mie resonators," *ACS Nano* **10**, 7761–7767 (2016).
6. W. Yang, S. Xiao, Q. Song, Y. Liu, Y. Wu, S. Wang, J. Yu, J. Han, and D.-P. Tsai, "All-dielectric metasurface for high-performance structural color," *Nat. Commun.* **11**, 1864 (2020).
7. P. Huo, M. Song, W. Zhu, C. Zhang, L. Chen, H. J. Lezec, Y. Lu, A. Agrawal, and T. Xu, "Photorealistic full-color nanopainting enabled by a low-loss metasurface," *Optica* **7**, 1171–1172 (2020).
8. M. Makhshyan, P. Bouchon, J. Jaeck, J.-L. Pelouard, and R. Härdar, "Shaping the spatial and spectral emissivity at the diffraction limit," *Appl. Phys. Lett.* **107**, 251103 (2015).
9. P. Zijlstra, J. W. M. Chon, and M. Gu, "Five-dimensional optical recording mediated by surface plasmons in gold nanorods," *Nature* **459**, 410–413 (2009).
10. T. S. H. Yoo, J. Berthelot, G. Guida, D. Demaille, E. Garcia-Caurel, N. Bonod, and B. Gallas, "Circularly polarized images with contrast reversal using pseudochiral metasurfaces," *ACS Photon.* **5**, 4068–4073 (2018).
11. J. S. Clausen, E. Hojlund-Nielsen, A. B. Christiansen, S. Yazdi, M. Grajower, H. Taha, U. Levy, A. Kristensen, and N. A. Mortensen, "Plasmonic metasurfaces for coloration of plastic consumer products," *Nano Lett.* **14**, 4499–4504 (2014).
12. M. W. Knight, N. S. King, L. Liu, H. O. Everitt, P. Nordlander, and N. J. Halas, "Aluminum for plasmonics," *ACS Nano* **8**, 834–840 (2014).
13. R. Mudachathi and T. Tanaka, "Up scalable full colour plasmonic pixels with controllable hue, brightness and saturation," *Sci. Rep.* **7**, 1199 (2017).
14. J. Olson, A. Manjavacas, L. Liu, W.-S. Chang, B. Foerster, N. S. King, M. W. Knight, P. Nordlander, N. J. Halas, and S. Link, "Vivid, full-color aluminum plasmonic pixels," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 14348–14353 (2014).
15. S. J. Tan, L. Zhang, D. Zhu, X. M. Goh, Y. M. Wang, K. Kumar, C.-W. Qiu, and J. K. W. Yang, "Plasmonic color palettes for photorealistic printing with aluminum nanostructures," *Nano Lett.* **14**, 4023–4029 (2014).
16. L. Li, "Technology designed to combat fakes in the global supply chain," *Business Horizons* **56**, 167–177 (2013).
17. C. Zhang, D. Wen, F. Yue, Y. Intaravanne, W. Wang, and X. Chen, "Optical metasurface generated vector beam for anticounterfeiting," *Phys. Rev. Appl.* **10**, 034028 (2018).

18. B. H. Ibrahim, S. B. Hatit, and A. D. Martino, "Angle resolved Mueller polarimetry with a high numerical aperture and characterization of transparent biaxial samples," *Appl. Opt.* **48**, 5025–5034 (2009).
19. A. Pierangelo, A. Benali, M.-R. Antonelli, T. Novikova, P. Validire, B. Gayet, and A. D. Martino, "Ex-vivo characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging," *Opt. Express* **19**, 1582–1593 (2011).
20. R. Kolkowski, L. Petti, M. Ripa, C. Lafargue, and J. Zyss, "Octupolar plasmonic meta-molecules for nonlinear chiral watermarking at sub-wavelength scale," *ACS Photon.* **2**, 899–906 (2015).
21. E. Bernabeu and J.-J. Gil, "An experimental device for the dynamic determination of Mueller matrices," *J. Opt.* **16**, 139–141 (1985).
22. R. M. A. Azzam, "Photopolarimetric measurement of the Mueller matrix by Fourier analysis of a single detected signal," *Opt. Lett.* **2**, 148–150 (1978).
23. R. W. Collins and J. Koh, "Dual rotating-compensator multichannel ellipsometer: instrument design for real-time Mueller matrix spectroscopy of surfaces and films," *J. Opt. Soc. Am. A* **16**, 1997–2006 (1999).
24. O. Arteaga, M. Baldrís, J. Antó, A. Canillas, E. Pascual, and E. Bertran, "Mueller matrix microscope with a dual continuous rotating compensator setup and digital demodulation," *Appl. Opt.* **53**, 2236 (2014).
25. K. Ichimoto, K. Shinoda, T. Yamamoto, and J. Kiyohara, "Photopolarimetric measurement system of Mueller matrix with dual rotating waveplates," *Publ. Natl. Astron. Obs. Jpn.* **9**, 11 (2006).
26. P. S. Hauge, "Mueller matrix ellipsometry with imperfect compensators," *J. Opt. Soc. Am.* **68**, 1519–1528 (1978).
27. E. Chironi and C. Lemmi, "Error analysis and compensation for a discrete dual rotating retarder Mueller matrix polarimeter," *Appl. Opt.* **59**, 6368–6378 (2020).
28. G. Piller, L. Broch, and L. Johann, "Experimental study of the systematic errors for a Mueller matrix double rotating compensator ellipsometer," *Phys. Stat. Solidi C* **5**, 1027–1030 (2008).
29. R. Ossikovski, "Differential matrix formalism for depolarizing anisotropic media," *Opt. Lett.* **36**, 2330–2332 (2011).
30. R. Ossikovski and A. D. Martino, "Differential Mueller matrix of a depolarizing homogeneous medium and its relation to the Mueller matrix logarithm," *J. Opt. Soc. Am. A* **32**, 343–348 (2015).
31. P. Wilson, "High speed video application," in *Design Recipes for FPGAs*, P. Wilson, ed., 2nd ed. (Newnes, 2016), Chap. 7, pp. 67–77.
32. I. Sersic, C. Tuambilangana, T. Kampfrath, and A. F. Koenderink, "Magnetolectric point scattering theory for metamaterial scatterers," *Phys. Rev. B* **83**, 245102 (2011).
33. I. Sersic, M. Frimmer, E. Verhagen, and A. F. Koenderink, "Electric and magnetic dipole coupling in near-infrared split-ring metamaterial arrays," *Phys. Rev. Lett.* **103**, 213902 (2009).
34. J. Proust, N. Bonod, J. Grand, and B. Gallas, "Optical monitoring of the magnetolectric coupling in individual plasmonic scatterers," *ACS Photon.* **3**, 1581–1588 (2016).
35. W. Li, C. Zhang, H. Jiang, X. Chen, and S. Liu, "Depolarization artifacts in dual rotating-compensator Mueller matrix ellipsometry," *J. Opt.* **18**, 055701 (2016).
36. J. J. Gil and E. Bernabeu, "Depolarization and polarization indices of an optical system," *Opt. Acta* **33**, 185–189 (1986).
37. N. A. Rubin, G. D'Aversa, P. Chevalier, Z. Shi, W. T. Chen, and F. Capasso, "Matrix Fourier optics enables a compact full-Stokes polarization camera," *Science* **365**, eaax1839 (2019).

