

Nanostructuration de surface pour l'imagerie à résonance de plasmons de surface de haute résolution

Frédéric Banville

▶ **To cite this version:**

Frédéric Banville. Nanostructuration de surface pour l'imagerie à résonance de plasmons de surface de haute résolution. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COmUE); Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2019. Français. NNT : 2019SACLO005 . tel-02173714

HAL Id: tel-02173714
https://pastel.hal.science/tel-02173714

Submitted on 4 Jul 2019

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

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

université PARIS-SACLAY

INSTITUT d'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

NNT : 2019SACLO005

Thèse de doctorat

Nanostructuration de surface pour l'imagerie à résonance de plasmons de surface de haute résolution

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay et de l'Université de Sherbrooke, préparée à l'Institut d'Optique Graduate School et à l'Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique

École doctorale n°575 Electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)
Spécialités de doctorat: Électronique et Optoélectronique, Nano- et Microtechnologies (UP-Saclay), et Génie Électrique (UdeS)

Thèse présentée et soutenue à Sherbrooke, le 27 mai 2019, par

Frédéric A. Banville

Composition du Jury :

Marie Frénéa-Robin Maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur (UP-Saclay)
Jean-François Masson Professeur, Université de Montréal	Rapporteur (UP-Saclay)
Serge Charlebois Professeur, Université de Sherbrooke	Rapporteur (UdeS) et Président (UP-Saclay)
Philippe Gogol Enseignant-Chercheur, CNRS – C2N	Examinateur
Michael Canva Directeur de recherche, CNRS - LCF	Directeur de thèse
Paul G. Charette Professeur, Université de Sherbrooke	Directeur de thèse
Stéphane Collin Chargé de recherche, CNRS – C2N	Co-Directeur de thèse
Michel Grandbois Professeur, Université de Sherbrooke	Co-Directeur de thèse

À toi papa qui malgré ton absence était toujours présent avec moi.

RÉSUMÉ

En recherche pharmacologique, les cellules vivantes sont largement utilisées comme modèles d'analyse pour l'étude de phénomènes biologiques, par exemple l'apoptose et la réponse cellulaire à des stimuli biologiques. Différents outils de caractérisation sont développés pour analyser et traduire l'information biologique en information quantifiable. L'imagerie à résonance de plasmons de surface (SPR) est sensible aux variations d'indice de réfraction d'un milieu à l'interface d'une couche métallique. Elle trouve beaucoup d'applications en biologie cellulaire et en pharmacologie, car elle permet l'acquisition d'images en temps réel et ne nécessite pas de marquage biologique comme en fluorescence. Cependant, la nature propagative des plasmons de surface (PSP) limite la résolution spatiale en entraînant un étalement de l'information dans la direction de propagation des PSP. Cela signifie qu'il est difficile de résoudre spatialement des détails inférieurs à la distance de propagation des PSP, pouvant atteindre des dizaines de micromètres. Plusieurs groupes de recherche travaillent à améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR. Toutefois, bien que des résolutions spatiales inférieures à cette distance de propagation ont été obtenues, cela a été au prix de compromis importants, en particulier une plus grande complexité dans l'acquisition des images et donc une diminution de la résolution temporelle, ou une perte significative de sensibilité.

Ce projet de thèse s'insère dans cette problématique en concevant et réalisant des dispositifs plasmoniques permettant d'améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR, tout en minimisant les compromis avec les autres paramètres d'imagerie. Ces puces SPR sont composées de surfaces métalliques nanostructurées dont le mode guidé combine les propriétés des plasmons propagatifs et des plasmons localisés. Des modélisations numériques ont permis de démontrer comment la géométrie des surfaces nanostructurées peut être optimisée de manière à réduire la longueur d'atténuation du mode plasmonique tout en conservant un fort contraste d'imagerie. Une géométrie optimale a été identifiée et des résolutions spatiales de l'ordre du micromètre ont été observées à l'aide de ces puces SPR nanostructurées optimisées. Les résultats expérimentaux ont montré une réduction de la propagation d'un facteur de 6.3 comparativement à des surfaces métalliques uniformes.

Les performances en imagerie des puces SPR nanostructurées ont été validées par des études de réponses cellulaires suite à une stimulation de nature biochimique, notamment dans l'étude de changements d'intégrité de couches confluentes de cellules. La génération de défauts dans la couche cellulaire suite à la stimulation a été quantifiée dans le temps et s'est montrée amplifiée par l'utilisation des puces SPR nanostructurées. L'amélioration de la résolution spatiale a résulté en une augmentation de la sensibilité de détection à l'activité cellulaire. De plus, aucunes perturbations au niveau du comportement des cellules n'a été observée par la présence de nanostructures. Finalement, l'étude de la morphologie de cellules au cytosquelette fortement organisé a permis d'observer des structures subcellulaires et de suivre la réorganisation du cytosquelette de cellules individuelles. Les puces SPR nanostructurées conçues et réalisées au cours de cette thèse montrent donc un fort potentiel d'applications en imagerie sans marquage de cellules vivantes.

Mots-clés : Biophotonique, applications de biodétection sans marquage, imagerie cellulaire, résonance de plasmons de surface, nanostructuration de surface, résolution spatiale.

ABSTRACT

In pharmacological research, living cells are widely used as sensing models for biological studies, such as cell apoptosis and cellular response to biological stimuli. Different optical characterization systems were developed to analyze and quantify biological information. Surface plasmon resonance (SPR) imaging is sensitive to minute refractive index variations occurring in a medium at the proximity of a metal layer. It has found many applications in cellular biology and in pharmacology since it allows the real-time image acquisition and does not require biological labeling like for fluorescence. However, the propagative nature of surface plasmons (PSPs) limits the spatial resolution by blurring the information in the direction of propagation of the PSPs. This means that it is difficult to spatially resolve details smaller than the attenuation length of the PSPs, generally of the order of tens of micrometers. Several research groups have worked on this limitation in order to improve the spatial resolution in SPR imaging. However, although spatial resolutions lower than that of the propagation have been obtained, those techniques require important compromises, such as an added complexity in the image acquisition which leads to a loss in temporal resolution or a significant reduction in sensitivity.

In this thesis project, plasmonic devices were designed and characterized in order to improve spatial resolution in SPR imaging, while minimizing compromises with other imaging parameters. These SPR chips are composed of nanostructured metal surfaces where the guided mode combines the properties of propagative plasmons and localized plasmons. An in-house numerical modeling software has demonstrated how the geometry of nanostructured surfaces can be optimized to reduce the attenuation length of the plasmonic mode, while maintaining a high imaging contrast. An optimum geometry was identified, and micron-sized spatial resolution have been observed using the optimized nanostructured SPR chips. Experimental results showed a reduction in propagation by a factor of 6.3 compared to uniform metal surfaces.

The imaging performances of nanostructured SPR chips were assessed by studying cellular responses following biochemical stimulation, in particular by real-time monitoring of integrity changes in confluent endothelial cell layer. The formation of defects in the cell layer following stimulation has been quantified over time and was seen amplified by the use of the nanostructured SPR chips. The improvement in spatial resolution has resulted in an increase in detection sensitivity to cellular activity. In addition, no disturbances in the behavior of the cells were observed due to the presence of nanostructures. Finally, the study of morphology in highly linear cytoskeleton cells enabled the observation of subcellular structures and the monitoring of cytoskeleton reorganization in individual cells. The nanostructured SPR chips designed and realized during this thesis show a strong potential label-free live cell imaging.

Keywords: Biophotonics, label-free biodetection applications, live cell imaging, surface plasmon resonance, surface nanostructuring, spatial resolution.

REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu remercier mes directeurs Paul Charette et Michel Grandbois de l'Université de Sherbrooke de m'avoir accompagné et supporté tout au long de mon projet doctoral. Votre encadrement durant ces dernières années m'a permis de grandir autant au niveau professionnel que personnel. Je tiens à remercier mes directeurs français Michael Canva et Stéphane Collin pour votre accueil au sein de vos équipes. Votre disponibilité a été grandement appréciée, ainsi que les nombreuses discussions scientifiques. Un grand merci à vous quatre.

Je remercie particulièrement les membres de mon jury de thèse Marie Frénea-Robin, Serge Charlebois, Philippe Gogol et Jean-François Masson pour avoir accepté d'examiner et de juger mes travaux.

Un grand merci à Julien Moreau pour ton encadrement et ta disponibilité autant en France qu'au Québec. Ton enthousiasme, tes encouragements et ta passion pour la science m'ont donné du courage et m'ont permis de persévérer dans mes recherches, malgré tous les longs calculs numériques. Merci également pour la lecture de cette thèse et pour les commentaires judicieux ayant permis de bonifier sa qualité.

Merci à Mondher Besbes pour ton soutien et ton aide dans le développement du logiciel de modélisation numérique. Ta personnalité chaleureuse a su réchauffer mes journées froides au Québec. Merci à Andrea Cattoni pour ton implication dans la fabrication des puces nanostructurées et pour les discussions scientifiques. Merci à Karen Perronet pour ton accueil au LCF. J'ai beaucoup apprécié nos nombreuses discussions. Je tiens également à remercier Philippe Ben-Abdallah pour son encadrement au sein de l'école doctorale EOBE. Ton expérience au Québec et ta compréhension m'ont aidé à démystifier l'administration française.

Un gros merci à Ulrike Fröelich pour ton soutien dans la culture cellulaire. Tu étais toujours présente pour m'aider et pour discuter de science et de famille. Merci au personnel des salles blanches, sans qui rien ne pourrait être réalisé. Merci à René Labrecque pour les nombreuses discussions tranquilles le matin en salles blanches. Le nettoyage d'échantillons n'a jamais été aussi plaisant qu'en ta compagnie.

Je veux remercier tous mes collègues, particulièrement Thierry, Clément, Guillaume et Thomas. Votre aide tout au long de mon doctorat a été grandement appréciée, ainsi que toutes les discussions non scientifiques concernant l'agriculture, le volleyball, les bandes dessinées et l'escalade.

Merci à Émilie, Amaudric (Momo), Ilan, Sylvain et Martin pour votre accueil chaleureux en France. Vous avez été un groupe fabuleux et j'ai énormément apprécié passer du temps avec vous. Nos soirées autour d'une bière, de cartes et de magnésie seront pour toujours gravées dans ma mémoire.

Je tiens à remercier tous mes amis, particulièrement Nicolas, Xavier, Michael et Marie-Michèle. Votre soutien tout au long de mon doctorat m'a encouragé à persévérer et à passer au travers des situations difficiles.

Je veux également remercier ma mère Myriam pour son support constant et son amour inconditionnel. Tes encouragements m'ont permis de toujours regarder en avant et m'ont permis de me surpasser.

Je tiens finalement à remercier ma conjointe Marie-Christine sans qui je ne serais pas la personne que je suis. Ton amour, ta confiance, tes encouragements et ton support m'ont permis de me dépasser et d'atteindre mes objectifs professionnels. Je te remercie également de m'avoir accompagné dans ce pays étrange qu'est la France. Merci aussi à ma belle Rose d'amener tant de joie dans ma vie. Je vous aime de tout mon cœur.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ i

ABSTRACT iii

REMERCIEMENTS v

LISTE DES FIGURES ix

LISTE DES TABLEAUX xiii

LISTE DES ACRONYMES xv

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1
1.1 Mise en contexte et problématique 1
1.2 Question de recherche et objectifs du projet 3
1.3 Plan du document et contributions originales 4

CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART ET CADRE DE RÉFÉRENCE 7
2.1 Techniques d'analyse et de quantification de la réponse cellulaire en surface 7
2.2 Résonance de plasmons de surface 12
2.2.1 Notions d'optiques et modes guidés 12
2.2.2 Théorie et couplage SPR 15
2.2.3 Imagerie SPR 20
2.2.4 Amélioration de la résolution en SPRI 24
2.3 Surfaces métalliques nanostructurées 34
2.3.1 Détection par puces nanostructurées 34
2.3.2 Adhésion des cellules sur surfaces structurées 37
2.4 Résumé 40

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE 43
3.1 Modélisation numérique de réseaux métalliques 43
3.2 Fabrication des échantillons 47
3.2.1 Techniques de lithographie 47
3.2.2 Fabrication des puces SPR 51
3.3 Résumé 53

CHAPITRE 4 NANOSTRUCTURATION DE SURFACE EN IMAGERIE SPR 55
4.1 Avant-propos 55
4.2 Article 59
4.2.1 Introduction 59
4.2.2 Numerical analysis 62
4.2.3 Experimental results and parameter estimation 71
4.2.4 Conclusion 78

4.2.5 Funding 78
4.2.6 Acknowledgments 78

CHAPITRE 5 SUIVI DE L'ACTIVITÉ CELLULAIRE EN SPRI 81
5.1 Avant-propos 81
5.2 Article 86
5.2.1 Introduction 86
5.2.2 Material and methods 88
5.2.2.1 Sensor chip design 88
5.2.2.2 Cell culture and reagents 91
5.2.2.3 Threshold estimation for intercellular gap detection 92
5.2.3 Results and discussion 95
5.2.3.1 Monitoring of cell response in confluent endothelial cell monolayers 95
5.2.3.2 Quantification of intercellular gap morphology dynamics in endothelial cell monolayers 98
5.2.4 Conclusion 101
5.2.5 Acknowledgements 101
5.2.6 Appendix A 102

CHAPITRE 6 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES COMPLÉMENTAIRES 105
6.1 Étude préliminaire du cytosquelette de cellules vivantes 105
6.2 Modélisation de réseaux métalliques périodiques 2D 108
6.3 Résumé 110

CHAPITRE 7 CONCLUSION 113
7.1 Résumé du contexte 113
7.2 Sommaire des travaux et atteinte des objectifs 113
7.3 Contributions originales des travaux 115
7.4 Perspectives de recherche 116

ANNEXE A PROTOCOLES DE FABRICATION 119

LISTE DES RÉFÉRENCES 123

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 – Schéma expliquant les principes de techniques de biodétection basés sur l'impédance (EIS) et l'optique (RWG). 9

Figure 2.2 – Réflexion et transmission d'une onde lumineuse polarisée. 13

Figure 2.3 – Schéma d'un guide d'ondes à trois couches. 14

Figure 2.4 – Schéma de la propagation des plasmons de surface à l'interface d'une couche métallique et une couche diélectrique. 15

Figure 2.5 – Schéma du profil d'intensité des plasmons de surface lors de la propagation. 17

Figure 2.6 – Méthodes de couplage entre une onde incidente et les plasmons de surface. 17

Figure 2.7 – a) Carte de réflexion de l'angle en fonction de la longueur d'onde. b) Courbe de réflexion à λ = 700 nm où il y a résonance à l'angle θ_p. 18

Figure 2.8 – Détection de la variation d'indice de réfraction de la couche diélectrique. 19

Figure 2.9 – Schéma décrivant la variation de contraste en imagerie SPR. 21

Figure 2.10 – Impact de la propagation des plasmons de surface sur la résolution en imagerie SPR. 22

Figure 2.11 – Résolution spatiale en microscopie optique. 22

Figure 2.12 – Exemple de la limitation en résolution observée en imagerie SPR. 23

Figure 2.13 – Impact d'une variation abrupte des conditions de couplage du mode plasmonique sur l'intensité lumineuse réfléchie. 24

Figure 2.14 – Système exploitant l'interférence destructive des plasmons de surface. 25

Figure 2.15 – Technique d'imagerie SPR avec illumination par projecteur DLP. 27

Figure 2.16 – Amélioration de la résolution spatiale par procédure de restauration d'images combinant des images de différentes directions de propagation. 28

Figure 2.17 – Impact d'un réseau de lignes sur la propagation des plasmons de surface. 30

Figure 2.18 – Impact de la présence de nanopiliers dans l'excitation sélective de fluorophores. 35

Figure 2.19 – Schéma décrivant les étapes nécessaires pour fonctionnaliser sélectivement une surface nanostructurée. 36

Figure 2.20 – Bilan de la composition, des dimensions et de l'architecture des adhésions focales. 38

Figure 2.21 – Micrographies en champ clair montrant l'évolution dans le temps des protrusions membranaires de cellules endothéliales. 39

Figure 3.1 – Surface nanostructurée modélisée numériquement. 45

Figure 3.2 – Schématisation du procédé de photolithographie. 48

Figure 3.3 – Schématisation de la fabrication de structures métalliques par lithographie électronique. 49

Figure 3.4 – Schéma de la fabrication d'un moule en H-PDMS/PDMS et d'un échantillon nanostructuré par « soft-UV-NIL ». 51

Figure 3.5 – Images MEB et optiques de différentes structures réalisées. 53

Figure 4.1 – Nanostructured chip design and modeled reflectance curves versus incidence angle for unstructured and structured films. 64

Figure 4.2 – Modeled 2D maps of the performance metrics as a function of in-plane grating parameters (w and Λ) for fixed out-of-plane parameters (h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm) and as a function of out-of-plane grating parameters (h_1 and h_2) for fixed in-plane parameters (w = 200 nm and Λ = 400 nm). 67

Figure 4.3 – Modeled contrast vs mode attenuation length at λ = 830 nm for different structure configurations. 70

Figure 4.4 – Characterization of spatial resolution with cross-shaped orifice in the synthetic target layer. 73

Figure 4.5 – Plots of reflected intensity line profiles in the direction of mode propagation for the line overlays shown in Figure 4.4(b)-(e). 76

Figure 4.6 – Resolution test chart patterned in the synthetic target layer imaged with brightfield and SPRI on unstructured and nanostructured Au films. 77

Figure 5.1 – Nanostructured chips design. 89

Figure 5.2 – Surface nanostructuring impact on SPR cell imaging. 90

Figure 5.3 – Threshold identification for intercellular gap detection: nanostructured metal films. 94

Figure 5.4 – Endothelial cell layer activation by thrombin: gap formation monitoring. 96

Figure 5.5 – Endothelial cell layer activation by thrombin: monolayer confluence tracking. 97

Figure 5.6 – Quantification of intercellular gap morphology dynamics and effect of thrombin concentration. 99

Figure 5.7 – Nanostructured sensor chip characterization after repeated use. 102

Figure 5.8 – Threshold identification for intercellular gap detection: unstructured metal films. 103

Figure 6.1 – Images en champ clair et en SPRI de cellules du muscle lisse (A7r5). 106

Figure 6.2 – Investigation de l'effet de la propagation du mode plasmonique sur l'information spatiale des structures subcellulaires. 107

Figure 6.3 – Grille composée de parties réelles et imaginaires du vecteur d'onde permettant de déterminer la valeur exacte du vecteur d'onde pour une structure. 109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 – Comparaison des méthodes d'imagerie SPR « sans prisme ». 31

Tableau 2.2 – Comparaison des méthodes d'imagerie SPR « à prisme ». 33

Tableau 3.1 – Convergence du vecteur d'onde en fonction du nombre d'itérations. 46

LISTE DES ACRONYMES

Par ordre alphabétique :

Acronyme	Définition
1D/2D/3D	Une/deux/trois dimensions
A7r5	Cellules du muscle lisse de l'aorte de rat
AFM	Microscopie à force atomique
DLP	Projecteur à traitement numérique de lumière
EA.hy 926	Cellules endothéliales humaines
EBL	Lithographie à faisceau d'électrons
EIS	Spectroscopie par impédance électrochimique
EM	Électromagnétique
FA	Adhésion focale
FDTD	Différences finies dans le domaine temporel
FEM	Méthode par éléments finis
FMM	Méthode modale de Fourier
FWHM	Largeur à mi-hauteur
HLP	*Hybrid lattice plasmon*
HMW	Poids moléculaire élevé
LMW	Poids moléculaire faible
LPS	Lypopolysaccharide
LSP	Plasmon de surface localisé
MCWG	Guides d'ondes à gaine métallique
MEB/SEM	Microscopie électronique
NA	Ouverture numérique
NIL	Lithographie par nanoimpression
PAR-1	*Protease-activated receptor 1*
PMA	*Phorbol-12-myristate-13-acetate*
PSP	Plasmon de surface propagatif
RCPG/GPCRs	Récepteurs couplés aux protéines G
RIU	Unité d'indice de réfraction
RWG	Réseau de diffraction résonant en mode guidé
SEF	Métrique d'amélioration
SERS	Spectroscopie Raman exalté de surface
SPEF	Fluorescence exaltée par plasmons de surface
SPP	Plasmons polaritons de surface
SPR	Résonance de plasmons de surface
SPRI	Imagerie à résonance de plasmons de surface
TE	Transverse électrique
TIRF	Fluorescence par réflexion totale interne
TM	Transverse magnétique
U-373 MG	Cellules cancéreuses humaines
UV	Ultraviolet
UV-NIL	Lithographie par nanoimpression assistée par UV

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte et problématique

Pour répondre aux exigences dans le domaine de santé et du développement de nouveaux médicaments, les récentes recherches *in vitro* privilégient l'étude de cellules vivantes dans leur contexte physiologique afin d'analyser directement des interactions entre les cellules et des stimuli extérieurs [Bousse, 1996; Taylor *et al.*, 2001]. En effet, les cellules sont des structures complexes pouvant offrir une multitude d'informations [Abadian *et al.*, 2014], par exemple sur le changement de leur morphologie causé par une hormone ou une toxine [Chabot *et al.*, 2009; Yanase *et al.*, 2013], comme lors de l'apoptose (mort programmée des cellules) [Maltais *et al.*, 2012] et de la réorganisation cellulaire [Chabot *et al.*, 2013]. Les outils d'analyses ne nécessitant pas de marquage (« label-free ») sont particulièrement intéressants pour l'étude de l'activité cellulaire, du fait qu'ils ne modifient pas le comportement des cellules [Fang, 2011]. Parmi les différentes techniques sans marquage utilisées en recherche pharmacologique, on retrouve la spectroscopie par impédance électrochimique (EIS) [Giaever et Keese, 1993], et les technologies basées sur le champ évanescent tels les réseaux de diffraction résonants en mode guidé (RWG) [Fang *et al.*, 2006] et la résonance par plasmons de surface (SPR) [Chabot *et al.*, 2009].

La SPR est une technique optique couplant une lumière incidente polarisée et les plasmons de surface (PSP), ondes propagatives de surface confinées à une interface entre un métal et un milieu diélectrique [Homola, 2006]. Les conditions de couplage sont très sensibles aux variations d'indice de réfraction dans le milieu diélectrique d'analyse survenant à la surface du métal, sur une distance de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres [Raether, 1988]. La SPR est particulièrement pertinente pour l'étude et la caractérisation des phénomènes biologiques se manifestant dans la partie basale de la cellule, comme l'adhésion d'une cellule à un substrat [Yanase *et al.*, 2007] et le suivi de variation d'intégrité d'une monocouche de cellules [Cuerrier *et al.*, 2008].

L'imagerie SPR (SPRI) permet l'acquisition d'images où les variations d'indice de réfraction à la surface se traduisent par des variations de réflexion du faisceau incident. La SPRI peut être

appliquée à l'étude en parallèle de réactions biomoléculaires [Bally *et al.*, 2006] et permet d'étudier des cellules individuelles [Jamil *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2009], plutôt qu'une population cellulaire. Cependant, cette méthode d'imagerie est limitée quant à sa résolution spatiale, c'est-à-dire la distance minimale permettant de distinguer deux objets. En effet, lorsque l'onde lumineuse incidente est couplée avec les PSP, ces derniers se propagent avant d'être totalement atténués sur une distance pouvant atteindre plusieurs dizaines de micromètres [Giebel *et al.*, 1999]. L'atténuation des PSP est dépendante du métal guidant et de la longueur d'onde de la lumière d'excitation. La distance d'atténuation peut être très limitative lorsque les objets observés ont des dimensions inférieures à celle-ci. Elle s'exprime dans les images acquises comme un flou directionnel dans le sens de la propagation de l'onde de surface. Conséquemment, la résolution spatiale dans le plan de la surface imagée n'est pas uniforme : elle est limitée par la distance d'atténuation dans la direction de propagation de la lumière, et par la diffraction dans la direction orthogonale.

Il existe dans la littérature plusieurs méthodes pour réduire ou déconvoluer la propagation des plasmons de surface afin d'améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR. Certains groupes utilisent des techniques d'interférence plasmonique [Somekh *et al.*, 2000a, 2000b] aux dépens d'une diminution de la résolution temporelle, tandis que d'autres préfèrent utiliser des métaux à fortes pertes comme le cuivre ou l'aluminium [Giebel *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2007], mais doivent faire des compromis sur la résolution en indice de réfraction (sensibilité). Dans des travaux antérieurs, nous avons développé une procédure de post-traitement par reconstruction d'images permettant d'améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR [Banville *et al.*, 2015]. Une amélioration d'un facteur 6 a été obtenue (résolution passant de 6 µm à 1 µm). Cependant, cette technique peut difficilement atteindre une résolution submicronique et ne permet pas l'analyse en temps réel des images acquises. Ainsi, malgré les améliorations en résolution spatiale offertes par ces différentes techniques, il est essentiel de développer une méthode minimisant les compromis entre les différentes performances en imagerie SPR.

Des études récentes montrent que l'utilisation de nanostructures plutôt qu'un film métallique continu permet de réduire la propagation des plasmons de surface grâce à la génération de plasmons localisés (LSP) [Petryayeva et Krull, 2011]. Ces derniers présentent un fort

confinement du champ électrique à la surface de la nanostructure où il y a absence de propagation. Ce type de réseaux métalliques sur verre a été exploré par certains, et la nanostructuration de surface semble avoir un impact sur la résolution spatiale en imagerie SPR [Kim et Kim, 2010; Wonju Lee *et al.*, 2012]. Cependant, les résultats présentés ont montré que la présence des nanostructures réduit le contraste des images SPR. Plus récemment, il a été démontré que le mode guidé par un réseau métallique, c'est-à-dire une couche de métal nanostructurée périodiquement, correspond au faible couplage des modes PSP et LSP formant un mode dit hybride (*hybrid lattice plasmon*, HLP) [Sarkar, Besbes, *et al.*, 2015]. En modifiant les dimensions du réseau métallique, il est alors possible de passer d'un mode purement localisé à un mode purement propagatif. Le contrôle sur ces dimensions ouvre donc la voie à une optimisation des paramètres du réseau afin de minimiser les compromis entre les différentes performances relatives à l'imagerie SPR.

1.2 Question de recherche et objectifs du projet

La thématique de recherche consiste à concevoir et réaliser par le biais de la nanostructuration de surface des puces SPR optimisées offrant une haute résolution spatiale tout en minimisant les compromis avec la sensibilité et le contraste dans les images. Ces puces seront utilisées dans des applications d'étude de cellules vivantes et de suivi d'activité cellulaire en temps réel sans marquage.

Les objectifs suivants ont permis d'atteindre le but du projet :

1) Modéliser et optimiser numériquement la **nanostructuration de surface** permettant de confiner adéquatement les plasmons de surface, tout en conservant une forte efficacité de couplage pour la détection, en suivant des **métriques de performance** pour l'imagerie SPR de **haute résolution**.

2) **Fabriquer** les puces SPR nanostructurées et **caractériser leurs performances** de détection en imagerie SPR. Ces puces devront permettre de résoudre des objets aux dimensions **inférieures au micromètre**, et ce, sans avoir d'impact sur le contraste dans les images.

3) Démontrer les **avantages** des puces nanostructurées en les appliquant au **suivi** en temps réel de **l'activité de cellules biologiques vivantes**. Visualiser et quantifier les **changements de morphologie** au niveau d'une population de cellules et au niveau de **cellules individuelles**.

1.3 Plan du document et contributions originales

Le manuscrit de thèse est composé de six chapitres, dont le premier est l'introduction. Le second chapitre présente une vue d'ensemble des techniques de biodétection sans marquage, suivi des principes fondamentaux liés à la résonance de plasmons de surface. De plus, le chapitre 2 fait l'état des connaissances dans le domaine de l'imagerie SPR, ainsi que les alternatives proposées pour compenser et surpasser la limitation en résolution spatiale.

Le chapitre 3 décrit la méthodologie impliquée dans le déroulement du projet de doctorat. Tout d'abord, le fonctionnement du logiciel de modélisation numérique impliqué dans l'optimisation des performances des échantillons nanostructurés est détaillé. Finalement, ce chapitre présente les détails de la fabrication de ces échantillons par la technique de lithographique par nano-impression assistée par UV (UV-NIL).

Un article scientifique publié dans la revue Optics Express sous le titre « *Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design* » est présenté au chapitre 4. Il décrit en détail l'utilisation de la nanostructuration de surface pour l'amélioration de la résolution spatiale en SPRI. Les échantillons nanostructurés sont optimisés par modélisation numérique suivant des métriques de performances pertinentes en SPRI. Les résultats de modélisation mettent en lumière les relations entre ces différentes métriques et la géométrie du réseau. Des résultats expérimentaux démontrent le gain apporté par la nanostructuration de surface en imagerie SPR avec une amélioration significative de la résolution spatiale tout en gardant un excellent contraste dans les images et une grande sensibilité.

Le chapitre 5 décrit l'application de la nanostructuration de surface dans l'étude sans marquage de cellules vivantes. Le suivi de l'activité cellulaire, en particulier la variation de l'intégrité

d'une monocouche de cellules endothéliales lorsque stimulée par une enzyme, est amélioré grâce à la haute résolution spatiale offerte par les échantillons nanostructurés. Leurs performances sont étudiées en visualisant et en quantifiant la formation de trous intercellulaires dans la couche, et les résultats expérimentaux montrent combien d'information est perdue par l'utilisation de puces SPR standards. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique soumis au journal Biosensors and Bioelectronics et intitulé « *Nanoplasmonics-enhanced label-free imaging of endothelial cell monolayer integrity.* »

Le chapitre 6 discute de projets en cours de travail. Tout d'abord, les puces SPR nanostructurées sont appliquées dans l'étude de la morphologie de cellules au cytosquelette fortement organisé. Ensuite, une méthode de calcul numérique est présentée permettant de modéliser des structures périodiques 2D. Le dernier chapitre conclut la thèse en présentant un bilan des travaux effectués, un retour sur les objectifs du projet, ainsi que ses perspectives.

CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART ET CADRE DE RÉFÉRENCE

Dans ce chapitre, les méthodes d'analyse et de quantification de la réponse cellulaire utilisées en pharmacologie pour l'étude de cellules vivantes seront présentées, en particulier les techniques ne nécessitant pas de marquage. Ensuite, la théorie autour de la résonance de plasmons de surface (SPR) sera détaillée, suivie de son application en imagerie (SPRI) pour la biodétection, plus particulièrement pour l'imagerie de cellules vivantes. Les limitations associées à la SPRI seront abordées, ainsi que les différentes méthodes employées dans la littérature pour s'en affranchir. Parmi celles-ci se trouve la nanostructuration de la surface métallique qui se distingue des autres par son habileté à confiner le mode plasmonique et réduire sa propagation grâce à la présence de plasmons localisés au niveau des nanostructures. La dernière partie du chapitre portera sur ce type de structures en faisant tout d'abord un aperçu de leur application en biodétection. Finalement, le chapitre se terminera par une discussion sur l'adhésion des cellules vivantes sur des surfaces nanostructurées, afin de bien comprendre l'impact de ces structures sur le comportement et la morphologie des cellules.

2.1 Techniques d'analyse et de quantification de la réponse cellulaire en surface

En pharmacologie et en biologie, l'étude de cellules vivantes dans leur contexte physiologique est importante pour faciliter la recherche de nouvelles drogues et l'analyse des interactions entre les cellules et les stimuli extérieurs [Bousse, 1996; Taylor *et al.*, 2001]. Au cours des dernières années, les systèmes de biodétection utilisant des structures biologiques comme moyen de détection se sont révélés être une méthode efficace pour analyser de manière non invasive l'activité des cellules [Chabot *et al.*, 2009; Fang, 2011; Pancrazio *et al.*, 1999]. Ces systèmes permettent de transformer l'information biologique (adhésion cellulaire, migration cellulaire, *etc.*) en un signal quantifiable (électrique, optique, *etc.*). Par exemple, les cellules possèdent de nombreux récepteurs dans leur membrane extracellulaire avec lesquels elles peuvent interagir avec le milieu extérieur afin de réguler leur métabolisme. La plus grande catégorie est les

récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui vont détecter les molécules externes et activer des processus internes en conséquence. Le suivi de la signalisation des RCPG dans les biocapteurs à base de cellules vivantes montre un potentiel énorme dans la découverte de médicaments [Fang *et al.*, 2008; Scott et Peters, 2010]. D'autres applications sont notamment le suivi de l'intégrité d'une monocouche cellulaire [Benson *et al.*, 2013; Cuerrier *et al.*, 2008], les changements de morphologie par la présence de toxines [Chabot *et al.*, 2009; Maltais *et al.*, 2012] et l'adhésion cellule-substrat [Berginski *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2018; Shroff *et al.*, 2008; Son, Seo, *et al.*, 2017].

Deux grandes catégories de systèmes de biodétection existent, les outils nécessitant le marquage des structures ou des molécules étudiées et ceux qui n'en requièrent pas. Parmi les systèmes optiques, c'est-à-dire exploitant l'interaction entre la lumière et la matière, la technique avec marquage la plus courante est la spectroscopie ou l'imagerie de fluorescence. La fluorescence survient lorsqu'une molécule absorbe un photon puis émet immédiatement un photon d'énergie moindre. Elle est généralement décrite par un diagramme de Jablonski [Lakowicz, 2006]. Cette technique est couramment utilisée, car les marqueurs fluorescents (ou fluorophores) sont très spécifiques, relativement simples à utiliser et permettent l'acquisition en temps réel d'images de haute résolution. Plusieurs techniques d'imagerie de « super-résolution » permettent de dépasser les limites optiques et atteindre une résolution de l'ordre de quelques dizaines à centaines de nanomètres seulement [Cox, 2015; Hell *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2009; Sahl *et al.*, 2017; Toomre et Bewersdorf, 2010]. Cependant, l'exploitation de la fluorescence peut causer une modification du milieu biologique d'analyse par le marquage avec les molécules fluorescentes, ce qui risque d'altérer le comportement des structures étudiées. De plus, les fluorophores subissent le phénomène de photo-blanchiment (extinction du fluorophore au bout d'un certain nombre de cycles de fluorescence) ce qui est un facteur limitant de toutes ces techniques.

Les techniques sans marquage quant à elles offrent plusieurs avantages. Elles sont non invasives, ne nécessitent pas de modifier les structures biologiques d'intérêt et permettent l'analyse en temps réel [Fang, 2011]. Les principales techniques couramment employées sont la spectroscopie par impédance électrochimique (EIS), les biocapteurs à réseau de diffraction

résonant en mode guidé (RWG), et la résonance de plasmons de surface (SPR). La spectroscopie par impédance électrochimique (Figure 2.1a) permet d'étudier les changements morphologiques de cellules adhérentes, comme la motilité cellulaire [Giaever et Keese, 1991, 1993], la fonction de barrière d'une couche endothéliale [Benson *et al.*, 2013; Tiruppathi *et al.*, 1992] ou l'activité de récepteurs cellulaires [McGuiness, 2007], grâce aux faibles changements d'impédance de la membrane cellulaire. Cette technique utilise des électrodes de part et d'autre du milieu d'analyse, en générant un voltage alternatif aux électrodes. L'amplitude et la phase du courant alternatif sont mesurées, et l'impédance est ensuite obtenue selon la loi d'Ohm. À partir des valeurs d'impédance recueillies, de l'information peut être extraite sur le comportement des cellules épithéliales lors d'études de la barrière hématoencéphalique, plus particulièrement sur les jonctions serrées [Abbott *et al.*, 2006]. Cependant, le signal acquis décrit la moyenne des impédances d'une population de cellules, et peut correspondre à plusieurs phénomènes biologiques ou interactions cellulaires. La Figure 2.1a présente les deux types de transports ioniques, c'est-à-dire paracellulaire (entre deux cellules) et transcellulaire (au travers d'une cellule). Cela veut dire que le signal obtenu est une combinaison des deux types de transport [Krug *et al.*, 2009].

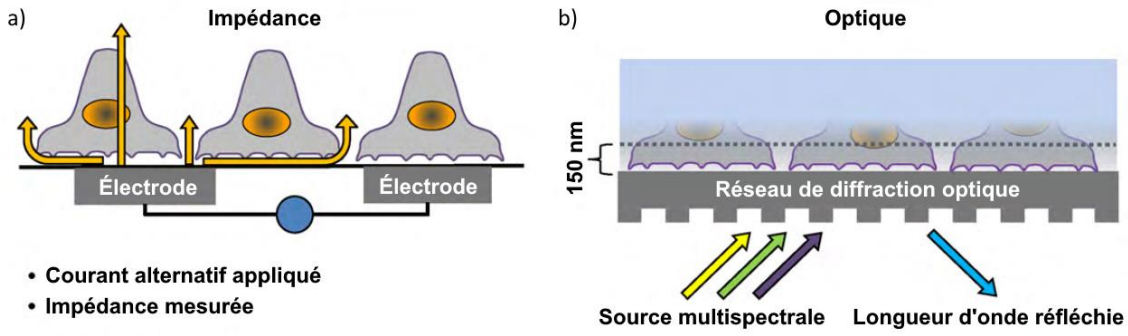


Figure 2.1 – Schéma expliquant les principes de techniques de biodétection basés sur l'impédance (EIS) en a) et l'optique (RWG) en b) (traduit et adapté de [Scott et Peters, 2010]). a) Un courant alternatif est généré entre deux électrodes et l'impédance est mesurée. Des variations d'impédance dans la membrane cellulaire sont alors détectées. b) Une source multispectrale est couplée à un guide d'onde via un réseau de diffraction, et l'intensité moyenne de la lumière réfléchie est analysée spectralement ou angulairement. Cette technique exploite l'onde évanescente décrivant le mode guidé pour sonder dans le milieu diélectrique.

Par ailleurs, la biodétection par RWG (Figure 2.1b) et SPR sont deux techniques qui exploitent la sensibilité de l'onde évanescente générée par le couplage d'une onde lumineuse dans un guide d'onde, afin de sonder un milieu diélectrique. Ces deux méthodes vont étudier les variations d'indice de réfraction dans le milieu biologique d'intérêt, résultant en la modification des

conditions de couplage qui pourront être associées à un phénomène biologique. La détection par RWG s'effectue en couplant une lumière multispectrale dans un guide d'onde par l'entremise d'un réseau de diffraction diélectrique, et en analysant spectralement ou angulairement l'intensité lumineuse réfléchie [Cunningham *et al.*, 2002; Fang, 2006; Fang *et al.*, 2006]. Les biocapteurs RWG ont prouvé leur efficacité dans l'étude de la signalisation cellulaire, par exemple pour différentier deux types de RCPG [Fang et Ferrie, 2007], pour détecter et suivre simultanément la signalisation de plusieurs classes de récepteurs [Schröder *et al.*, 2010], ainsi que pour mesurer des réponses cellulaires en parallèle [Zaytseva *et al.*, 2011]. Récemment, les RWG ont été employés pour l'imagerie de cellules vivantes. Ce type de système permet de spatialement faire le suivi de la réponse cellulaire en parallèle dans des plaques microtitre pouvant atteindre jusqu'à 1536 puits [Fang, 2015; Ferrie *et al.*, 2010, 2012]. Bien que le temps d'acquisition soit rapide (~3 s), la résolution spatiale est très limitée (12 µm) et ne permet pas d'étudier les réponses au niveau de cellules individuelles [Ferrie *et al.*, 2014]. Cette limitation en résolution spatiale est due aux faibles pertes dans le mode guidé. Ainsi, cette méthode n'est pas adaptée pour résoudre des structures dont les dimensions sont de l'ordre du micromètre.

Pour ce qui est de la SPR, une onde incidente est réfléchie par une couche mince de métal, et est couplée avec les plasmons de surface (PSP, charges libres oscillatoires confinées à l'interface d'une couche de métal et d'une couche diélectrique), généralement à l'aide d'un prisme d'indice de réfraction élevé. L'intensité lumineuse réfléchie est ensuite analysée spectralement, angulairement ou simplement en terme de variation de réflexion dans une image. Cette utilisation en imagerie (SPRI) permet l'acquisition d'images où les variations d'indice de réfraction sont mesurées localement et dont la résolution spatiale peut atteindre dans des configurations particulières de métal et de longueur d'onde d'excitation, des valeurs inférieures au micromètre [Berger *et al.*, 1994]. Cette résolution permet d'observer des cellules individuelles qui pourraient ne pas être distinguables par l'imagerie RWG [Peterson *et al.*, 2014]. Cependant, la résolution spatiale en SPRI est limitée par la nature propagative des PSP qui peut être critique selon l'application visée. Cette problématique sera discutée en détail dans les prochaines sections.

Bien que ces différentes techniques soient non-invasives et ne nécessitent pas de marquage, leur principal inconvénient est que le signal collecté (impédance ou intensité lumineuse) est convolué et peut provenir de plusieurs phénomènes différents. Ceux-ci peuvent alors être difficilement déconvolués sans connaissances préalables des phénomènes observés. Certaines approches à cette problématique combinent plusieurs systèmes, c'est-à-dire plusieurs techniques sans marquage, ou avec et sans marquage. Par exemple, un système d'imagerie SPR et à impédance électrochimique a été développé pour étudier des cellules vivantes et des processus intracellulaires [Wang *et al.*, 2011]. Ceux-ci ont étudié plusieurs processus cellulaires, comme l'apoptose (mort programmée des cellules) et l'électroporation des cellules. Ce système permet l'acquisition de plusieurs types d'images, c'est-à-dire des images obtenues par SPR, par EIS et en champ clair. Pour les images par EIS, un courant alternatif est généré à la surface de l'échantillon et va induire un changement au signal SPR. Cette variation du signal SPR est alors liée aux variations d'impédance dans l'échantillon. Cependant, la résolution des images SPR et EIS obtenues par le système est ici aussi limitée par la propagation des plasmons de surface.

Par ailleurs, un système combinant la fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) et les RWG a permis l'étude de plusieurs récepteurs pharmacologiques [Chen *et al.*, 2013]. Une onde incidente est couplée dans un guide d'onde, et les fluorophores sont excités par l'entremise du champ évanescent dans le milieu diélectrique. L'émission de fluorescence est collectée par un objectif de microscope sous l'échantillon, afin de générer des images de résolution submicronique (0.78 µm). Ce système hybride permet d'analyser plusieurs cuves simultanément.

Plus récemment, la fluorescence exaltée par plasmons de surface (SPEF) et les guides d'ondes à gaine métallique (MCWG) ont été combinés en un système d'imagerie pour le suivi en parallèle de l'activité cellulaire de cellules individuelles de haute résolution spatiale et sensibilité [Söllradl, Chabot, *et al.*, 2018]. La SPEF est une technique similaire au TIRF, où les fluorophores à la surface du métal sont excités par un champ évanescent. Le couplage entre la lumière incidente et les plasmons de surface résulte en une augmentation significative de l'énergie du champ évanescent. Cela rend la technique particulièrement efficace pour l'excitation de fluorophores pour l'imagerie de cellules vivantes [Chabot *et al.*, 2013; He *et al.*,

2006, 2009, 2010]. Pour ce qui est des MCWG, ceux-ci sont un type de guide d'ondes dont une des gaines est une couche fine de métal. La principale particularité des MCWG est que leurs propriétés peuvent être optimisées en variant l'épaisseur du cœur. Par exemple, la profondeur de pénétration de l'onde évanescente peut varier d'environ 150 nm à 900 nm pour une même longueur d'onde d'excitation [Söllradl *et al.*, 2017]. Cependant, ce système combinant la SPEF et les MCWG présente des micrographies dont la résolution spatiale est toujours limitée par la propagation du mode plasmonique.

Ainsi, les différents systèmes présentés ci-dessus ont tous des limitations, en particulier le marquage par fluorophores ou une faible résolution spatiale. Voilà pourquoi les travaux de cette thèse ont pour but de développer un système d'imagerie de haute résolution ne requérant pas de marquage pour l'étude de cellules vivantes.

2.2 Résonance de plasmons de surface

Cette section débute par une présentation des notions d'optiques à la compréhension de la résonance de plasmons de surface. La théorie autour des plasmons de surface ainsi que son couplage avec une lumière incidente sont ensuite présentés. L'état de l'art de l'utilisation de la SPR en imagerie est par la suite dressé en identifiant les avantages et les limitations qui y sont liées. Finalement, les avancées en imagerie SPR développées dans la littérature pour améliorer la résolution spatiale sont discutées.

2.2.1 Notions d'optiques et modes guidés

Les rayons lumineux sont des ondes électromagnétiques (EM) qui sont des oscillations couplées de champs électriques et magnétiques. L'onde EM peut être décrite en tout point par l'amplitude et l'orientation des champs **E** et **M,** ces deux vecteurs étant reliés par les équations de Maxwell. Des ondes EM se propageant dans une direction peuvent être décrites par une combinaison d'ondes planes, c'est-à-dire des séries de fronts d'onde d'amplitude constante. Une onde plane EM se propageant dans une direction unique (x) et dont les propriétés de matériaux sont invariables est décrite selon l'équation suivante:

$$\vec{E}(x,y,z,t) = \vec{E}_0 e^{\pm j(\omega t - \beta x)} \qquad (2.1)$$

où $\vec{E}_0$ corresponds au vecteur amplitude de l'onde, ω à sa fréquence et β à la constante de propagation. Cette dernière représente la norme du vecteur d'onde indiquant la direction de propagation (x) de l'onde plane uniforme monochromatique. Cette constante de propagation dépend du matériau dans lequel l'onde se propage :

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda_0} n \tag{2.2}$$

où n est l'indice de réfraction du matériau, c'est-à-dire le ratio entre la vitesse de la lumière dans le vide (c) et la vitesse de propagation dans le matériau (υ), et λ_0 est la longueur d'onde dans le vide. Une onde est dite polarisée transverse magnétique (TM) ou transverse électrique (TE) si son champ magnétique ou électrique est perpendiculaire au plan d'incidence. La Figure 2.2 présente un schéma d'une onde TM réfléchie à une interface :

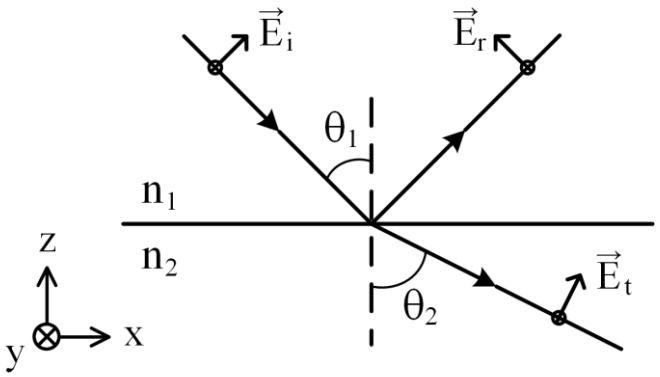


Figure 2.2 – Réflexion et transmission d'une onde lumineuse polarisée. L'onde lumineuse est polarisée TM, où le champ électrique est dans le plan d'incidence et le champ magnétique est perpendiculaire.

Lorsqu'une onde électromagnétique se propageant dans un milieu (n_1) rencontre un milieu d'indice de réfraction différent (n_2), celle-ci sera réfléchie et réfractée selon son angle d'incidence normal à l'interface (θ), décrite selon la relation de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2) \tag{2.3}$$

Les coefficients de réflexion (r) et de transmission (t) en amplitude sont décrits par les équations de Fresnel et vont dépendre de la polarisation [Hecht, 2016] :

$$\begin{aligned} r_{TM} &= \frac{n_1 \cos(\theta_2) - n_2 \cos(\theta_1)}{n_2 \cos(\theta_1) + n_1 \cos(\theta_2)} & t_{TM} &= \frac{2n_1 \cos(\theta_1)}{n_2 \cos(\theta_1) + n_1 \cos(\theta_2)} \\ r_{TE} &= \frac{n_1 \cos(\theta_1) - n_2 \cos(\theta_2)}{n_1 \cos(\theta_1) + n_2 \cos(\theta_2)} & t_{TE} &= \frac{2n_1 \cos(\theta_1)}{n_1 \cos(\theta_1) + n_2 \cos(\theta_2)} \end{aligned} \tag{2.4}$$

Ces équations peuvent être appliquées pour des structures multicouches, c'est-à-dire un empilement de matériaux différents, afin de déterminer le pourcentage de lumière transmise et réfléchie [Abelès, 1950].

Si $n_1 > n_2$, il existe une plage d'angles d'incidence où l'onde EM est totalement réfléchie à l'interface, c'est-à-dire les angles supérieurs à l'angle de réflexion totale interne $\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$. Une onde peut ainsi être guidée dans un matériau d'indice élevé confiné (cœur) entre deux matériaux d'indice plus faible (gaines) si l'angle de l'onde se propageant est supérieur à θ_c [Yeh, 2005]. Ce type de structure est appelé un guide d'onde.

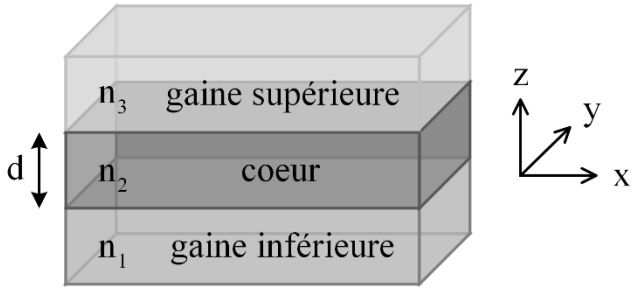


Figure 2.3 – Schéma d'un guide d'ondes à trois couches. Un cœur (n_2) d'épaisseur d est confiné entre deux gaines (n_1 et n_3).

Seulement certains angles vont résulter en une onde guidée selon les propriétés du guide d'onde, c'est-à-dire les indices de réfraction des matériaux et l'épaisseur du cœur. Effectivement, l'onde lumineuse se propageant dans le cœur interfère avec elle-même de manière constructive (guidée) ou destructive (non guidée). Cette relation est appelée un mode et sa constante de propagation est définie par l'équation suivante :

$$\beta_{mode} = \frac{2\pi}{\lambda_0} n_{eff} \tag{2.5}$$

où l'indice effectif (n_{eff}) est fonction de l'angle à laquelle la lumière se propage dans le cœur (θ), suivant la relation $n_{eff} = n_{coeur}\sin[\theta]$. Les vecteurs d'onde des modes pouvant être guidés par un guide d'onde à trois couches peuvent être calculés à l'aide des équations à valeurs propres suivantes [Homola, 2006] :

Modes TM $$\tan(\kappa d) = \frac{\gamma_1/\kappa + \gamma_3/\kappa}{1-(\gamma_1/\kappa)(\gamma_3/\kappa)} \tag{2.6a}$$

Modes TE $$\tan(\kappa d) = \frac{\gamma_1\varepsilon_2/\kappa\varepsilon_1 + \gamma_3\varepsilon_2/\kappa\varepsilon_3}{1-(\gamma_1\varepsilon_2/\kappa\varepsilon_1)(\gamma_3\varepsilon_2/\kappa\varepsilon_3)} \tag{2.6b}$$

avec $\kappa^2 = \omega^2\varepsilon_2\varepsilon_0\mu_0 - \beta^2$ et $\gamma^2_{1,3} = \beta^2 - \omega^2\varepsilon_{1,3}\varepsilon_0\mu_0$, où $\varepsilon_{1,2,3}$ sont les constantes diélectriques ou les permittivités des différentes couches et correspondent au carré de l'indice de réfraction ($\varepsilon = n^2$), ε_0 et μ_0 sont respectivement la permittivité et la perméabilité du vide, et où d correspond à l'épaisseur du coeur.

Il est important de noter que l'énergie de l'onde guidée dans le cœur n'est pas totalement confinée. En effet, bien qu'il y ait une réflexion totale de la lumière aux interfaces cœur/gaine, une quantité d'énergie est transmise dans la gaine et va décroître de façon exponentielle avec la distance. La profondeur à laquelle l'onde va pénétrer dans le matériau est définie par la distance à partir de l'interface où l'énergie diminue à 1/e de son amplitude initiale (diminution d'environ 63%) suivant l'équation suivante :

$$L_z = \frac{1}{\alpha} \tag{2.7}$$

où α est la constante d'atténuation et décrit le taux de décroissance de l'amplitude de l'onde (z). La portion du champ électrique s'étendant à l'extérieur du cœur est particulièrement importante pour les techniques de biodétection sans marquage comme la SPR et sera discutée dans la section suivante.

2.2.2 Théorie et couplage SPR

On appelle les plasmons de surface l'oscillation collective du nuage d'électrons libres confinés à l'interface d'une couche métallique et d'un milieu diélectrique (Figure 2.4). En particulier, les plasmons de surface propagatifs (PSP) correspondent à une onde plane de surface non homogène confinée à une interface dont la constante de propagation est complexe [Raether, 1988].

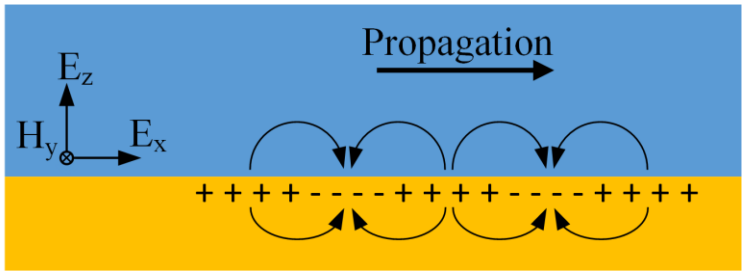


Figure 2.4 – Schéma de la propagation des plasmons de surface à l'interface d'une couche métallique (jaune) et une couche diélectrique (bleu). L'onde lumineuse d'excitation est polarisée transverse magnétique (TM, champ électrique dans le plan x-z).

Les PSP sont une structure particulière de guide d'onde à trois couches dont le cœur est d'épaisseur nulle et la gaine inférieure est un métal semi-infini. Les équations (2.6a) et (2.6b) peuvent être simplifiée en réduisant la variable d à zéro [Homola, 2006], et la constante de propagation du mode plasmonique (k_{psp}) peut alors été trouvée analytiquement. Cependant, seulement le mode TM trouve une solution. La constante de propagation est composée d'une partie réelle liée à l'indice effectif (indice du milieu vu par l'onde guidée) et une partie imaginaire décrivant les pertes du mode guidé (absorption dans le métal) [Barnes *et al.*, 2003] :

$$k_{psp} = k'_{psp} + ik''_{psp} = \frac{2\pi}{\lambda_0}\left[\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon'_m}{\varepsilon_d + \varepsilon'_m}} + \frac{i\varepsilon''_m}{2(\varepsilon'_m)^2}\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon'_m}{\varepsilon_d + \varepsilon'_m}}^{3}\right] \tag{2.8}$$

avec $\varepsilon_m < 0$ et $\varepsilon_d > 0$, et où λ_0 est la longueur d'onde de l'onde incidente, ε est la constante diélectrique (d : diélectrique, m : métal) et où ' et '' sont les parties réelles et imaginaires de ε.

Suivant les équations de Maxwell, une onde confinée se doit d'être une onde non homogène (ou non-uniforme), ce qui veut dire que le profil du champ électrique varie dans le plan de phase constante. Ainsi, ce profil est composé de deux profils exponentiels décroissants (ondes évanescentes), l'un dans la couche métallique et l'autre dans le diélectrique. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente varie de l'ordre de plusieurs dizaines à centaines de nanomètres, et dépend entre autres de la longueur d'onde (Figure 2.5a) [Homola, 2006].

$$L_{z(d,m)} = \left[\text{partie réelle}\left(\frac{i2\pi}{\lambda_0}\frac{\varepsilon_{d,m}}{\sqrt{\varepsilon_d + \varepsilon_m}}\right)\right]^{-1} \tag{2.9}$$

Par ailleurs, l'énergie des plasmons de surface décroit exponentiellement dans la direction de propagation à cause des pertes de la couche métallique (Figure 2.5b). Cette décroissance est calculée analytiquement à partir de la partie imaginaire de la constante de propagation et est quantifiée par sa longueur d'atténuation, c'est-à-dire la distance à laquelle l'énergie tombe à 1/e de son intensité initiale dans le sens de la propagation.

$$L_x = \frac{1}{2k''_{psp}} \tag{2.10}$$

Selon le métal et la longueur d'onde, la longueur d'atténuation des PSP peut être inférieure au micron jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres [Berger *et al.*, 1994].

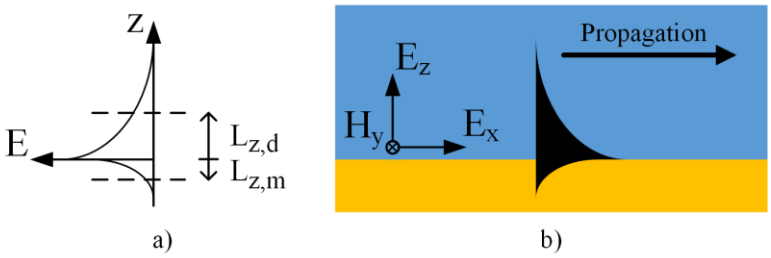


Figure 2.5 – Schéma du profil d'intensité des plasmons de surface lors de la propagation. a) L'énergie de l'onde évanescente décroit spatialement dans les matériaux (z). La profondeur de pénétration L_z est définie par la diminution de l'amplitude par un facteur 1/e. b) L'onde propagative évanescente est atténuée dans la direction de propagation (x).

Les plasmons de surface peuvent être efficacement excités par une onde lumineuse polarisée TM lorsque les conditions de couplage sont satisfaites, c'est-à-dire lorsque leur vecteur d'onde est équivalent (composante dans l'axe de la propagation, x). La résonance aura ainsi lieu lorsque $k_x = k'_{psp}$:

$$k'_{psp} = \frac{2\pi}{\lambda_0}\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon'_m}{\varepsilon_d + \varepsilon'_m}} \tag{2.11a}$$

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda_0}\sin(\theta_{inc}) \tag{2.11b}$$

Il est toutefois impossible de satisfaire ces conditions de couplage dans le vide. En effet, $k_x < k'_{psp}$ pour toutes valeurs d'angle d'incidence dans le vide. Les deux méthodes les plus utilisées pour coupler la lumière avec les PSP sont l'utilisation d'un réseau de diffraction ou d'un prisme d'indice de réfraction élevé ($n_{prisme} > n_{diélectrique}$).

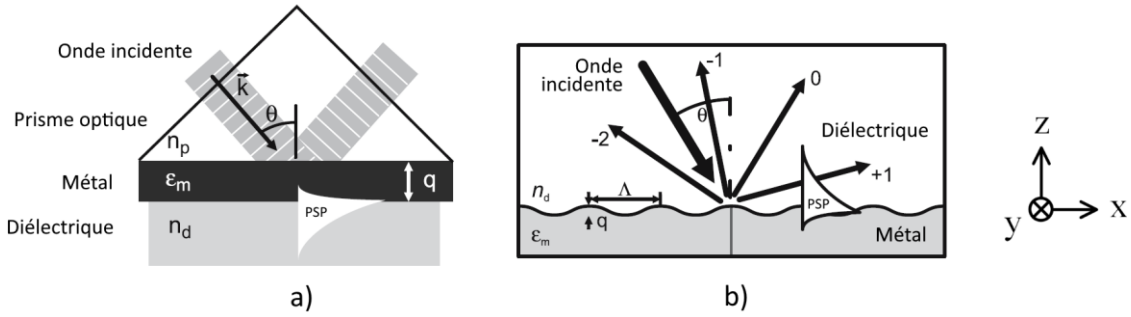


Figure 2.6 – Couplage entre une onde incidente et les plasmons de surface (adapté de [Homola, 2006]). a) Prisme optique à indice de réfraction élevé ($k_p = n_p k_x$). b) Réseau de diffraction ($k_r = k_x \pm m2\pi/\Lambda$).

L'onde lumineuse va pénétrer le prisme optique et sera réfléchie par la couche de métal vers un détecteur pour des angles d'incidence du faisceau supérieurs à l'angle de réflexion totale interne

$\left[\theta_{inc} \geq \sin^{-1}\left(\frac{n_d}{n_p}\right)\right]$. À l'angle de résonance ($k_x = k'_{psp}$), la lumière incidente traverse la couche métal par effet tunnel pour exciter le mode plasmonique. La lumière réfléchie et la lumière réémise par le mode plasmonique vont interférer de manière destructive et aucune lumière (ou très peu selon les conditions de couplage) ne sera recueillie par le détecteur. La couche de métal doit être assez mince pour qu'il y ait un couplage entre la lumière et les PSP. L'épaisseur de cette couche est importante pour qu'il y ait un couplage critique [Lecaruyer *et al.*, 2007]. En effet, le transfert d'énergie entre la lumière d'excitation et les PSP sera optimal à une certaine épaisseur du métal variant selon la longueur d'onde d'excitation. Une épaisseur supérieure à l'épaisseur de peau du métal résultera en une forte atténuation de l'énergie incidente, jusqu'à absorption totale.

La résonance entre une lumière incidente et les plasmons de surface peut être observée de deux principales façons. La première est un balayage angulaire à longueur d'onde fixe, et la deuxième est un balayage spectral à angle d'incidence fixe. La Figure 2.7a présente une carte de réflexion collectée par un détecteur pour une structure composée de verre (BK7), d'or (50 nm) et de l'eau.

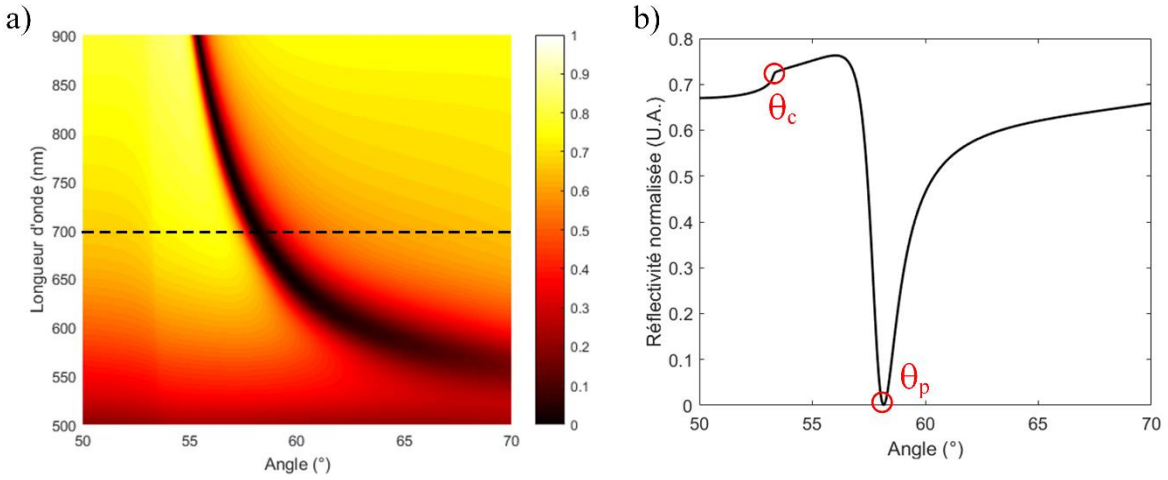


Figure 2.7 – a) Carte de réflexion TM/TE de l'angle (θ) en fonction de la longueur d'onde (λ). b) Courbe de réflexion à λ = 700 nm où il y a résonance à l'angle θ_p.

Le spectre angulaire typique en Figure 2.7b sera observé en procédant à un balayage angulaire à une longueur d'onde fixe de 700 nm. Lorsque l'angle d'incidence du faisceau dépasse l'angle de réflexion totale interne (θ_c), il y a couplage partiel avec les PSP et aucune lumière ne sera réfléchie lorsque l'angle atteint θ_p, où il y a résonance, appelée la résonance de plasmons de surface [Homola, 2006].

L'avantage de la SPR est sa sensibilité aux faibles variations d'indice de réfraction de sa couche diélectrique survenant près de la surface du métal. Ces variations vont modifier les conditions de couplage et vont se traduire par un déplacement de l'angle de résonance θ_p, tel que présenté à la Figure 2.8. Ce décalage peut être quantifié selon la variation de l'angle de résonance ($\Delta\theta = 0.14°$) ou la variation en réflexion ($\Delta R = 14.33\%$).

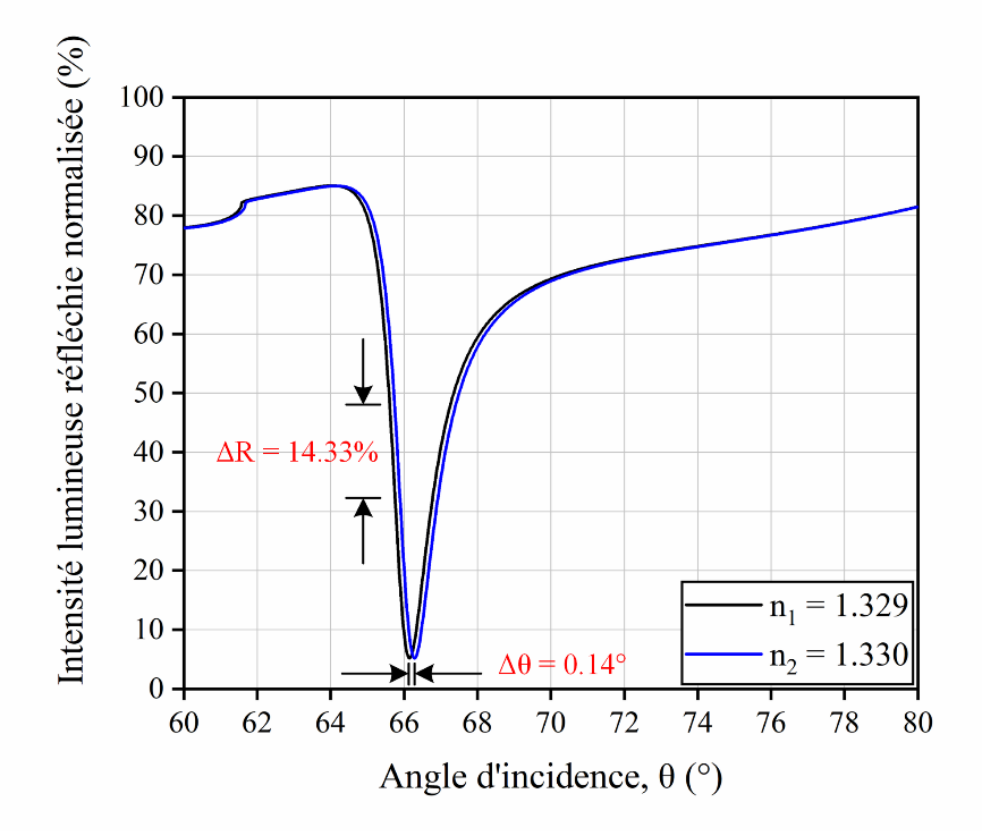


Figure 2.8 – Courbe de réflexion en SPR. L'indice de réfraction de la couche diélectrique varie de 0.1 % et la courbe de réflexion est modifiée (déplacement vers la droite).

C'est la base de la technique d'analyse par SPR. Des phénomènes biologiques peuvent alors être caractérisés [Schuck, 1997], en particulier l'interaction entre deux molécules [Gopinath, 2010; Masson, 2017; Nguyen *et al.*, 2015; Patching, 2014]. En fonctionnalisant la couche de métal avec des récepteurs spécifiques, il sera possible d'observer les variations d'indice de réfraction lorsque des molécules spécifiques aux récepteurs s'y accrocheront. Ces variations pourront être liées à une concentration d'analytes (molécules d'intérêt) présents à la surface de l'échantillon.

Ces variations peuvent être spatialement détectées par imagerie. La prochaine section traite de l'imagerie SPR et discute des principales limitations associées avec cette technique.

2.2.3 Imagerie SPR

La résonance de plasmons de surface peut être observée en imagerie en ajoutant à un système SPR conventionnel un capteur 2D (caméra) comme détecteur. L'imagerie SPR, initialement explorée par [Rothenhäusler et Knoll, 1988; Yeatman et Ash, 1987], permet de générer des images où chaque valeur de pixel peut être liée à une valeur d'indice de réfraction du diélectrique à proximité de la surface de la couche de métal. La majorité des systèmes d'imagerie SPR utilisent un prisme d'indice de réfraction élevé pour coupler la lumière incidente avec les plasmons de surface. Cependant, plusieurs aberrations sont générées par l'utilisation d'un prisme [Laplatine, 2015]. Certains systèmes avancés utilisent plutôt un objectif de microscope à grande ouverture numérique qui offre un agrandissement plus élevé qu'un prisme et permet ainsi d'observer des structures aux dimensions inférieures au micromètre [Huang *et al.*, 2007]. La présence de l'objectif de microscope permet en plus de s'affranchir des aberrations générées par le prisme. Ainsi, c'est ce type de système d'imagerie SPR qui a été utilisé dans cette thèse et sera discuté en plus grands détails dans les prochaines sections.

Le contraste dans une image SPR correspond aux variations de réflectance collectée par la caméra qui sont liées aux conditions de couplage entre la lumière et les PSP. La Figure 2.9 illustre l'origine du contraste observé dans les images SPR en présentant un exemple où la couche diélectrique est composée de deux milieux d'indice de réfraction différent ($\Delta n = 1\%$). À l'angle d'incidence θ, la lumière incidente est couplée efficacement avec le mode guidé au niveau du milieu 1 ($k_{inc,x} = \beta_1$), et résulte en une faible intensité lumineuse réfléchie. Celle-ci est due à l'interférence destructive entre la lumière réfléchie par la couche métallique et la lumière réémise par le mode guidé. Cette interférence n'est pas présente avec le mode guidé par le milieu 2, car les conditions de couplage à l'angle θ ne sont pas respectées. Ainsi, la majorité de la lumière est réfléchie et collectée par le détecteur. Cette différence d'intensité lumineuse entre les deux milieux correspond au contraste observé dans les images acquises. La Figure 2.9b présente les courbes de réflexion en fonction de l'angle d'incidence des deux milieux, où un contraste de ~75% est observable ($\theta \approx 66°$).

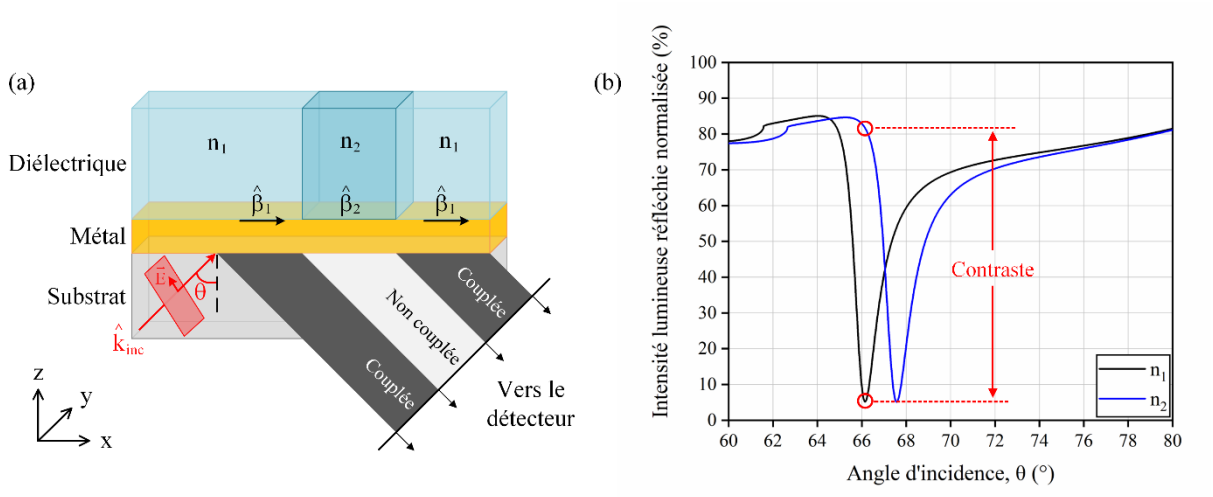


Figure 2.9 – Schéma décrivant la variation de contraste en imagerie SPR. a) À l'angle d'incidence (θ), les conditions de couplage sont optimales avec le milieu 1 (n_1) et aucune lumière n'est réfléchie. La lumière est réfléchie par la couche de métal en milieu 2 (n_2) et collectée par le détecteur. b) Courbes de réflexion pour les deux milieux. Le contraste observé dans les images correspond à la différence de réflexion pour les deux milieux à l'angle de résonance du milieu 1.

L'imagerie SPR permet alors d'observer spatialement des zones de la couche diélectrique dont les conditions de couplage sont différentes, et ce, en temps réel. La SPRI est majoritairement utilisée en recherche pharmacologique de deux façons. La première est l'observation en temps réel et simultanée d'une matrice de zones d'analyse (*microarrays*). Par exemple, des groupes ont étudié avec des *microarrays* la cinétique de liaisons entre des protéines et entre des brins d'ADN [Bally *et al.*, 2006] et d'autres ont séparé la surface d'analyse sous forme de puits afin de caractériser différents réactifs ou différentes concentrations du même réactif [Bassil *et al.*, 2003; Beusink *et al.*, 2008]. La deuxième est l'imagerie proprement dite du volume au-dessus de la surface métallique, par exemple pour l'étude de cellules vivantes [Kim *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011; Wang, Yang, *et al.*, 2012], afin d'étudier des réactions cellulaires ayant un impact sur la morphologie des cellules.

La résolution spatiale en imagerie SPR limitée par la nature propagative du mode plasmonique. La Figure 2.10 présente l'impact de la propagation sur la résolution spatiale en SPRI [Giebel *et al.*, 1999] où la longueur d'atténuation des plasmons de surface est plus grande que la taille des détails à résoudre.

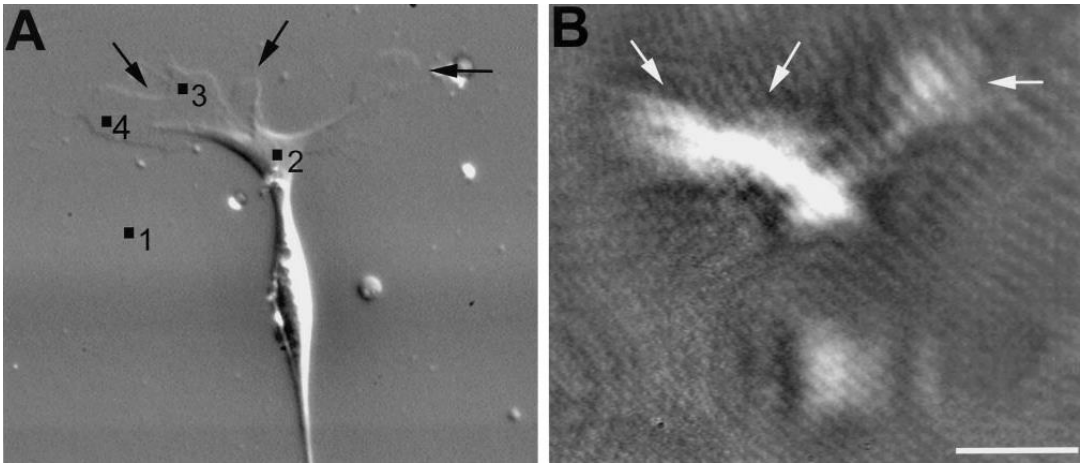


Figure 2.10 – Impact de la propagation des plasmons de surface sur la résolution en imagerie SPR (figure modifiée de [Giebel et al., 1999]). A) Image obtenue par microscopie à contraste interférentiel permettant d'identifier les contours de la cellule. B) Image d'imagerie SPR où les contours de la cellule ne sont pas résolus. Échelle : 100 µm.

La résolution optique associée à un système de microscopie conventionnel est déterminée par le critère de Rayleigh, communément référée à la limite de diffraction. Celle-ci est définie par la distance latérale minimale permettant de distinguer deux objets (Figure 2.11b), c'est-à-dire le rayon de la tache d'Airy [Hecht, 1997]. La résolution dépend de la longueur d'onde de la lumière incidente et de l'ouverture numérique du système optique (NA) selon $R = 0.61\lambda/NA$. Pour les longueurs d'onde dans le visible ($\lambda \sim 400 – 700$ nm), la limite de diffraction sera de l'ordre de quelques centaines de nanomètres pour une NA de 1.46 (~ 170 – 290 nm).

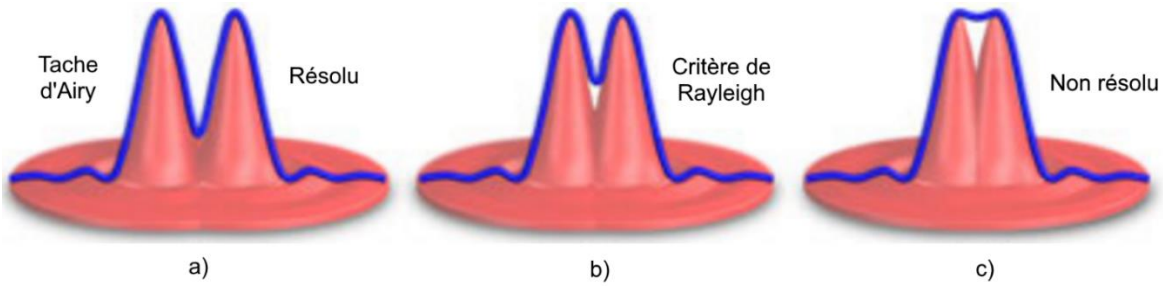


Figure 2.11 – Schéma décrivant la résolution spatiale en microscopie optique (traduit de [Olympus, 2019]). a) Les deux objets sont parfaitement résolus ($R \geq R_{Rayleigh}$). b) La distance minimale entre deux objets pour les distingués est définie par le critère de Rayleigh ($R = R_{Rayleigh}$). c) Les deux objets sont non résolus ($R < R_{Rayleigh}$).

Ce n'est toutefois pas le cas pour l'imagerie SPR où la résolution spatiale peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres. En effet, la résolution spatiale en SPRI est anisotrope, c'est-à-dire qu'elle est limitée par la longueur d'atténuation du mode plasmonique dans la direction de propagation, tandis qu'elle est définie par la limite de diffraction dans la direction

perpendiculaire à la propagation. Cette propagation dépend principalement des matériaux et de la longueur d'onde d'excitation. Par exemple, pour une couche d'argent de 53 nm à une longueur d'onde de 633 nm, la longueur d'atténuation des PSP calculée est de 40 µm, tandis qu'elle est de 1 µm pour une couche de 15 µm d'aluminium [Giebel *et al.*, 1999]. Comme il est montré dans la Figure 2.12, les structures (6x6 μm^2, 12 µm de périodicité) ne sont pas résolues pour le substrat d'argent.

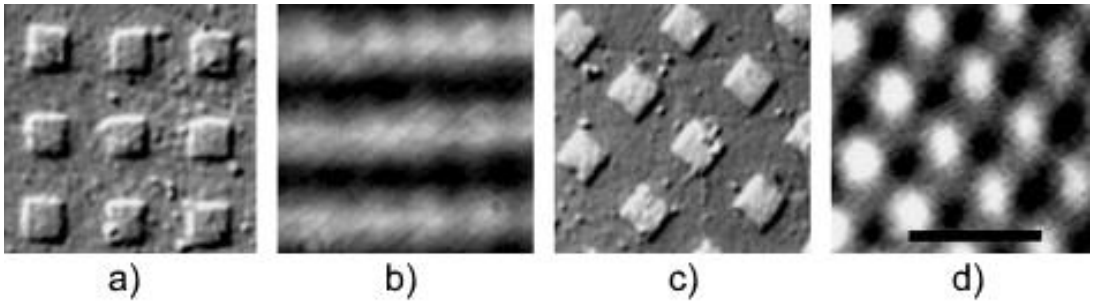


Figure 2.12 – Exemple de la limitation en résolution observée en imagerie SPR (modifié de [Giebel et al., 1999]). Images de microscopie optique pour couche d'argent (a) et aluminium (c). Carrés de 6x6 μm^2 et de 12 µm de périodicité. Les images acquises en imagerie SPR (b-d) montrent l'impact de la propagation (de gauche à droite) sur la résolution (Ag : 40 µm, Al : 1 µm). Échelle : 20 µm.

Ce flou directionnel généré par la propagation du mode plasmonique est significatif et peut fortement limiter l'analyse de structures aux dimensions de l'ordre du micron ou inférieures. Il est d'autant plus problématique du fait que le flou peut être accompagné de franges d'interférences. En effet, des modèles analytiques ont été développés pour simuler le comportement du mode plasmonique sur l'intensité réfléchie lorsqu'il y a des variations abruptes d'indice de réfraction [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996]. La Figure 2.13 illustre l'impact de variations abruptes des conditions de couplage sur l'intensité réfléchie. Dans cet exemple, la lumière est couplée efficacement avec le mode guidé par le milieu 1 (vecteur d'onde $k_1 = k_1' + ik_1''$), tandis qu'elle est partiellement couplée avec le mode guidé par le milieu 2 (vecteur d'onde $k_2 = k_2' + ik_2''$). L'intensité réfléchie (I) varie différemment pour les transitions $n_1 \rightarrow n_2$ et $n_2 \rightarrow n_1$, et est respectivement décrite par les équations suivantes :

$$I_{2\rightarrow1}(x) = A^2 e^{-2k_1''} \tag{2.12a}$$

$$I_{1\rightarrow2}(x) = A^2 \left[1 + e^{-2k_2''} - 2e^{-2k_2'' x} \cos\left(k_2' - k_1'\right) x\right] \tag{2.12b}$$

où A est une constante dépendante des composantes du champ électrique. L'impact du changement abrupt de conditions de couplage sur l'intensité lumineuse réfléchie entraîne alors

une diminution exponentielle pour la transition $n_2 \rightarrow n_1$ ($L_x = 9.7$ µm), et correspond plutôt à un sinus amorti pour la transition $n_1 \rightarrow n_2$.

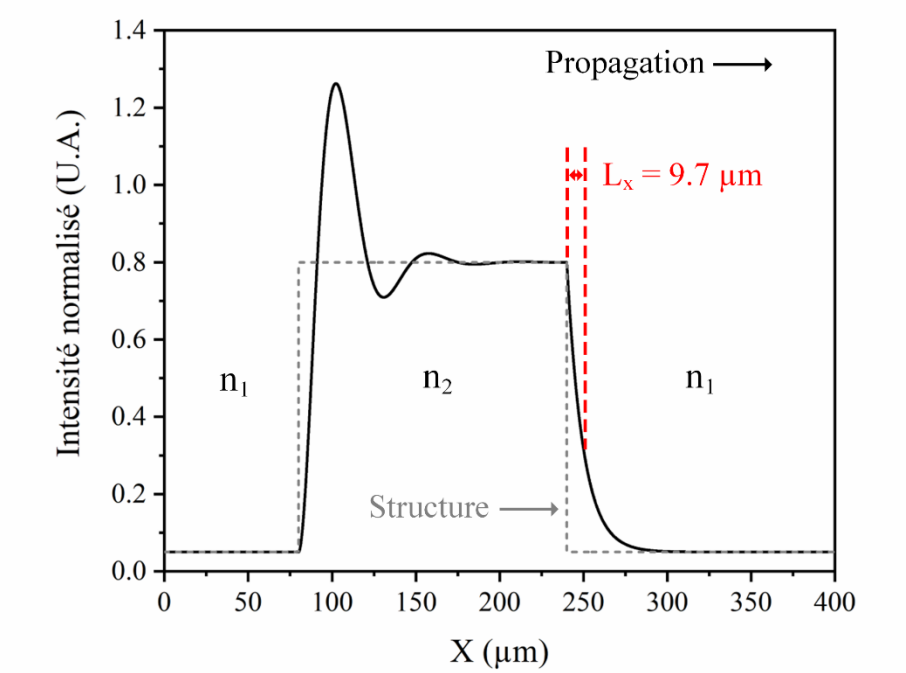


Figure 2.13 – Impact d'une variation abrupte des conditions de couplage du mode plasmonique sur l'intensité lumineuse réfléchie. Une transition $n_2 \rightarrow n_1$ (non-résonance à résonance) résulte en une diminution exponentielle de l'intensité, tandis qu'une transition $n_1 \rightarrow n_2$ résulte en un sinus amorti dont la fréquence d'oscillation dépend de la variation d'indice de réfraction des deux milieux. Les pointillés gris montrent le signal attendu sans oscillations ni propagation.

La perturbation oscillatoire provient d'une interférence entre les deux vecteurs d'onde du mode guidé dans les deux milieux. Plus la variation entre les indices de réfraction du milieu diélectrique est grande, plus la fréquence d'oscillation est élevée et résulte en un nombre élevé de franges d'interférence dans les images SPR. Ce phénomène d'interférence plasmonique a un impact dans les images SPR qui est non-négligeable, et il important de l'adresser afin de pouvoir imager des structures aux dimensions submicroniques, comme des structures cellulaires.

2.2.4 Amélioration de la résolution en SPRI

Plusieurs groupes de recherche travaillent à développer des systèmes d'imagerie SPR ou des techniques d'acquisition permettant d'améliorer la résolution spatiale en SPRI. Une première approche exploite la nature cohérente des plasmons de surface [Somekh *et al.*, 2000a, 2000b]. Ce type de système excite les PSP sous plusieurs orientations et les fait interférer entre eux. Par exemple, un microscope à balayage spatial (plan de l'échantillon) a été développé par le groupe

de Kano et offre des images dont la résolution est de l'ordre de la limite de diffraction (~ 170 nm) [Kano et Knoll, 2000; Watanabe *et al.*, 2007, 2010]. Ce système génère des plasmons localisés grâce à l'interférence destructive des plasmons de surface. Une image de haute résolution est alors générée en balayant l'échantillon à l'aide d'un support à échantillon sur plaque piézoélectrique. Par ailleurs, le système développé par [Berguiga *et al.*, 2007] exploitant également l'interférométrie offre des résolutions spatiales inférieures au micromètre. Ce système se base sur le retard de phase engendré par la propagation des plasmons excités. En injectant de la lumière à plusieurs angles d'incidence et directions de propagation, seulement certains faisceaux (angles où il y a résonance plasmonique) auront une phase retardée, lorsque réfléchis.

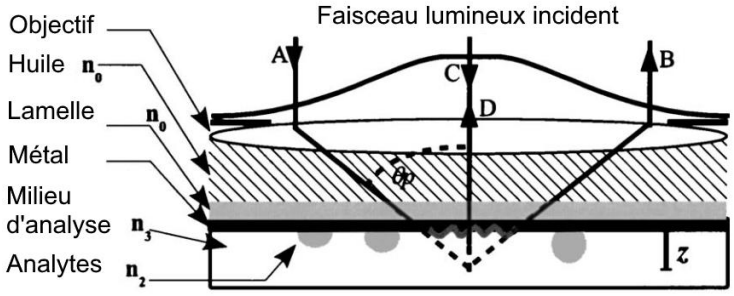


Figure 2.14 – Schéma modifié de l'excitation des plasmons de surface par le système développé par [Berguiga et al., 2007]. La défocalisation du faisceau incident (z) excite les plasmons de surface (A) qui engendre un retard de phase dans le faisceau réfléchi (B). La phase n'est pas affectée pour les angles d'incidence où il n'y a pas de résonance plasmonique (C-D).

La lumière réfléchie est comparée à un faisceau de référence par interférométrie hétérodyne, et les images sont générées en balayant l'échantillon et en appliquant une défocalisation au faisceau d'excitation. Ce système a été appliqué à l'imagerie à longue durée de cellules vivantes et offre des résolutions de l'ordre de la limite de diffraction [Berguiga *et al.*, 2016]. Il a également été appliqué à l'imagerie d'objets diélectriques 3D pour la reconstruction tomographique de haute résolution [Berguiga *et al.*, 2017]. Le balayage spatial de l'échantillon limite toutefois le temps d'acquisition.

Un autre système analogue à celui développé par [Kano et Knoll, 2000] se base sur l'illumination de Köhler [Stabler *et al.*, 2004], et est appelée microscopie à champ large. Celui-ci est simple dans son assemblage et ne nécessite pas de balayage de l'échantillon. Une résolution de l'ordre du micron a été obtenue. Cependant, le contraste dans les images acquises est limité par l'acquisition simultanée des deux polarisations TM et TE. De plus, c'est le cas

pour tous les systèmes utilisant un objectif de microscopie, la plage angulaire est limitée par l'ouverture numérique de l'objectif (NA), ce qui veut dire que certaines résonances plasmoniques survenant à des angles élevés ne pourront être observées, suivant l'équation $NA = n_{huile}\sin(\theta_{max})$. Par exemple, à une longueur d'onde de 530 nm, l'angle d'incidence maximal pour une $NA = 1.46$ et un $n_{huile} = 1.5196$ est de 73.9°. L'angle de résonance plasmonique pour une interface 50 nm d'or et de l'eau ne sera jamais atteint ($\theta_p = 75.4°$). Certains paramètres peuvent alors être modifiés pour observer le couplage plasmonique. Par exemple, changer de longueur d'onde d'excitation ($\theta_p = 70.0°$ à $\lambda = 660$ nm), remplacer l'objectif de microscope pour un d'ouverture numérique plus élevée, utiliser de l'optique conique pour une illumination radiale [Vander et Lipson, 2009], ou ajouter une couche diélectrique d'indice de réfraction élevé entre le métal et le milieu d'analyse (MCWG, [Chabot, 2013; Convert *et al.*, 2012; Söllradl *et al.*, 2017]).

Le système de [Kano et Knoll, 2000] a été adapté pour combiner la microscopie à champ large et la microscopie à balayage, où la résolution spatiale est de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres [Somekh *et al.*, 2009]. Le système de microscopie à balayage a également été combiné avec un microscope SPR à lentilles pour permettre le balayage angulaire de l'échantillon et le balayage spatial [Toma *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2012]. Cependant, bien que les techniques de microscopie à balayage spatial font l'acquisition d'images de haute résolution [Tanaka et Yamamoto, 2003], le balayage de l'échantillon rend cette technique difficilement utilisable pour observer en temps réel des phénomènes biologiques rapides. En effet, l'acquisition d'une image peut prendre plusieurs dizaines de secondes (50 s pour des images de 500x500 pixels [Berguiga *et al.*, 2016]).

Il est également possible de modeler le faisceau lumineux et de le conjuguer au plan focal arrière d'un objectif de microscope, afin d'avoir un contrôle dynamique sur l'angle d'incidence du faisceau. Cela peut être fait à l'aide d'un modulateur spatial de lumière [Tan *et al.*, 2016] ou à l'aide d'un projecteur à traitement numérique de lumière (DLP) [Peterson *et al.*, 2014, 2018]. La première méthode excite les plasmons de surface dans toutes les orientations à la fois et varie l'angle d'incidence du faisceau. Les images seront acquises à chaque valeur d'angle, et, par traitement numérique, l'angle auquel les conditions de couplage sont résonantes sera identifié

pour chaque pixel. Ainsi, une image d'indice de réfraction du milieu diélectrique pourra être reconstruite grâce aux informations extraites des courbes angulaires pour chaque pixel. La deuxième méthode va tout d'abord illuminer l'échantillon avec une onde polarisée TM dans toutes les orientations simultanément afin de collecter une carte d'intensité en fonction de l'angle d'incidence (Figure 2.15a). Celle-ci va permettre d'identifier rapidement l'angle de résonance du milieu diélectrique (b). Le faisceau d'excitation est alors modelé par logiciel et l'image générée est conjuguée au plan focal arrière de l'objectif de microscope.

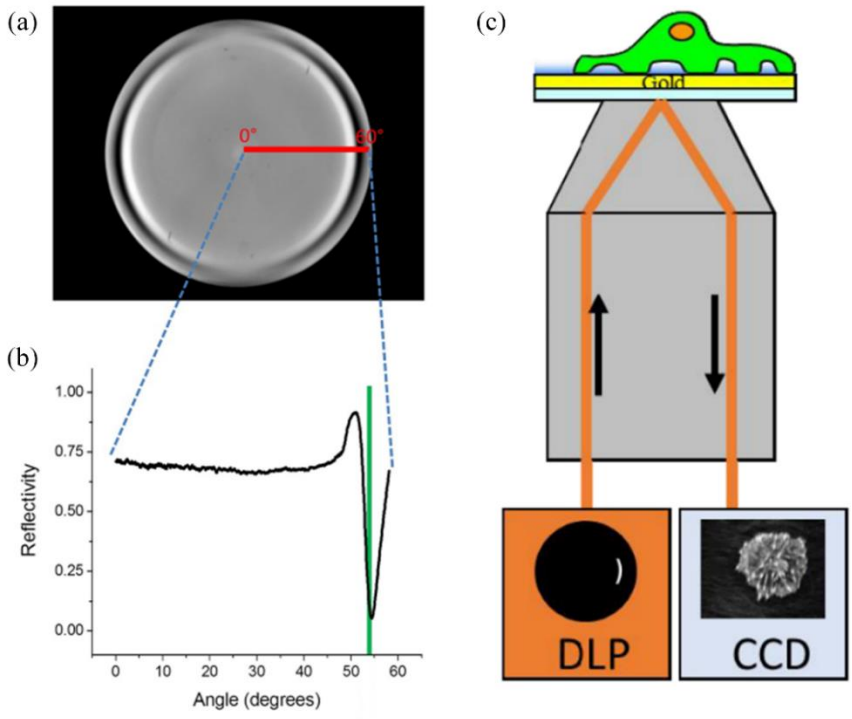


Figure 2.15 – Technique d'imagerie SPR avec illumination par projecteur DLP. a-b) Identification de l'angle de résonance du milieu diélectrique en illuminant l'échantillon dans toutes les orientations simultanément. c) Schéma de l'illumination modelée par DLP permettant l'acquisition d'image cellulaire de haute résolution au fort contraste. Cette figure est une combinaison de sous-figures de [Peterson *et al.*, 2014, 2018].

L'illumination en forme d'arc circulaire (image encadrée en orange en c) permet d'exciter les plasmons de surface à un angle spécifique à plusieurs orientations simultanément. Cela génère des interférences destructives entre PSP pour réduire la propagation plasmonique sans affecter le contraste dans les images [Peterson *et al.*, 2014]. Des images de haute résolution et de fort contraste peuvent alors être acquises en temps réel. Cependant, cette technique nécessite un objectif à très grande ouverture numérique afin d'avoir un contraste élevé en milieu aqueux, rendant son utilisation coûteuse et complexe. De plus, la résolution spatiale est toujours limitée

par la propagation du mode plasmonique rendant la technique difficilement utilisable à des longueurs d'onde élevées où la sensibilité est supérieure.

Une autre méthode pour améliorer la résolution spatiale en SPRI est le post-traitement des images [Banville *et al.*, 2015; Berguiga *et al.*, 2017; Son *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017]. Ces techniques permettent de faire l'acquisition d'images SPR où la résolution est limitée par la propagation des PSP et de la compenser pour obtenir des images de haute résolution spatiale. Nous avons ainsi développé récemment une procédure de restauration d'images où des images prises avec différentes directions de propagation du mode plasmonique sont recombinées [Banville *et al.*, 2015]. Cette technique se base sur le modèle de l'interaction des plasmons de surface présenté précédemment [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996], et procède à la déconvolution de la dégradation engendrée par la propagation des PSP. Cette déconvolution est effectuée par un algorithme de minimisation non linéaire afin d'obtenir une image de haute résolution [Rav-Acha et Peleg, 2005].

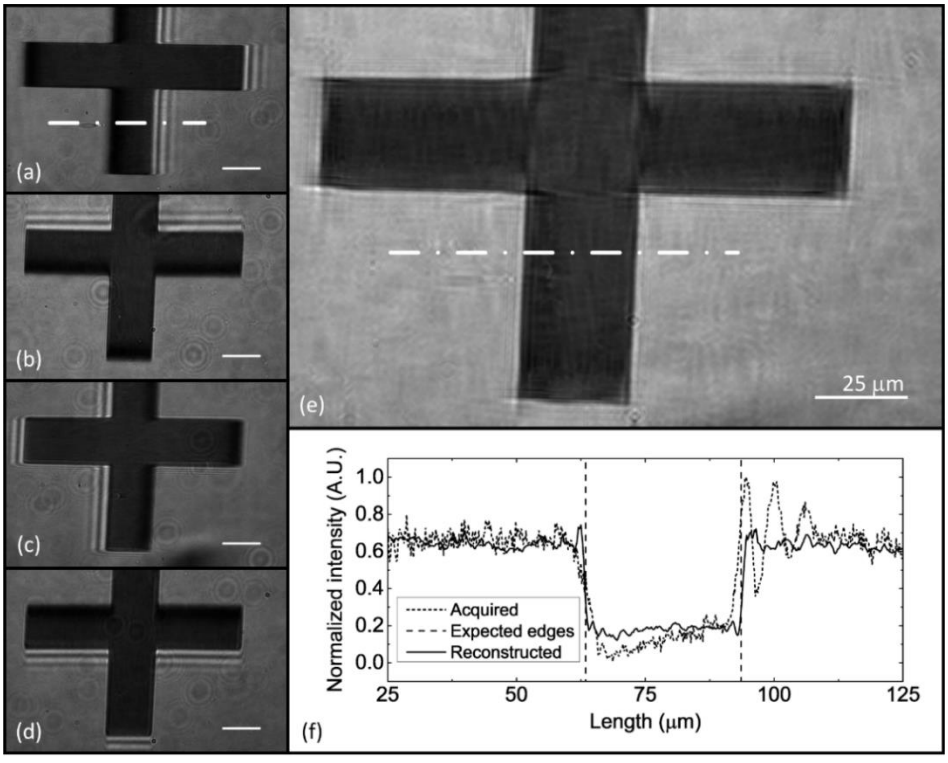


Figure 2.16 – Résultat de la procédure de restauration d'images développée par [Banville *et al.*, 2015]. a-d) Images acquises où la direction de propagation de l'onde de surface est différente (angles de 0º, 90º, 180º, 270º). e) Image restaurée. Les oscillations ont disparu. f) Comparaison entre l'image acquise et celle restaurée. Une amélioration de la résolution d'un facteur de 6 est obtenue.

La résolution, définie ici par la distance à laquelle l'intensité lumineuse passe de 10 % à 90 %, a été améliorée d'un facteur de 6 (de 6 µm à 1 µm) [Stabler *et al.*, 2004]. Cependant, il y a présence d'artefacts de reconstruction qui peuvent être importants lorsqu'il y a beaucoup de variations d'indice de réfraction dans l'image. De plus, l'utilisation de post-traitement signifie que cette technique n'est plus temps réel dans son analyse d'images de haute résolution.

D'autres groupes ont préféré réduire la longueur d'atténuation des PSP en utilisant des métaux fortement absorbants, comme le cuivre et l'aluminium [Giebel *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2007], ou en diminuant la longueur d'onde d'excitation [Berger *et al.*, 1994]. En augmentant l'absorption du métal ou en diminuant la longueur d'onde, les plasmons de surface seront atténués plus rapidement, mais aux dépens de la sensibilité et du contraste dans les images. De plus, ces métaux sont incompatibles avec des applications en biologie cellulaire.

Une avenue prometteuse a été initiée par les membres du groupe de Donghyun Kim. Ceux-ci ont procédé à la nanostructuration de la surface métallique des échantillons SPR [Kim et Kim, 2010] en fabriquant des réseaux de lignes (structures 1D) dont les dimensions sont inférieures à la longueur d'onde d'excitation (période de 400 nm, largeur des lignes de 200 nm, longueur d'onde de 630.8 nm). Différents paramètres ont été variés (épaisseur des lignes, choix de métal) afin d'identifier l'impact des réseaux sur la résolution en imagerie SPR en comparant avec une surface métallique continue. La Figure 2.17 présente une comparaison des images SPR acquises à l'aide d'un système à prisme pour des surfaces d'or (images de gauche) et d'argent (images de droite), où la propagation des PSP est perpendiculaire au réseau (du bas vers le haut).

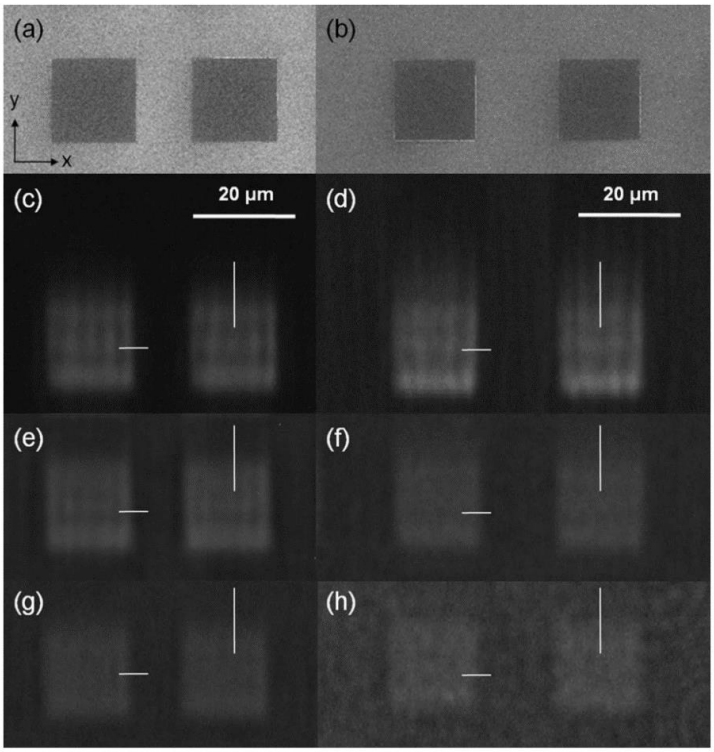


Figure 2.17 – Impact d'un réseau de lignes sur la propagation des plasmons de surface (période de 400 nm, largeur des lignes de 200 nm, épaisseur du film de métal de 40 nm, λ_0 = 630.8 nm). a-b) Images de microscopie électronique (SEM) pour des surfaces d'or (gauche) et d'argent (droite). c-d) Images acquises en imagerie SPR sans réseau (or : gauche, argent : droite). e à h) Réseau de lignes dont l'épaisseur varie (e-f : 10 nm, g-h : 20 nm). La longueur d'atténuation des PSP diminue pour l'épaisseur de 20 nm, mais aux dépens d'un moins grand contraste.

Cette figure montre que la longueur d'atténuation des PSP est diminuée lorsqu'il y a un réseau. En effet, la présence du réseau permet de localiser des plasmons de surface au niveau des nanostructures, et ainsi de perturber la propagation des plasmons de surface. Cependant, les conditions de couplage pour ces échantillons ne sont pas optimales et entraînent des images de faible contraste. De plus, la propagation des PSP est seulement affectée dans la direction perpendiculaire au réseau de lignes, ce qui signifie qu'il serait difficile d'observer avec une haute résolution des structures complexes comme des cellules.

Les tableaux suivants dressent les caractéristiques des différentes techniques de SPRI où une faible résolution spatiale est recherchée :

Tableau 2.1 – Comparaison des méthodes d'imagerie SPR « sans prisme ».

Technique	Réfs.	Principes physiques	Résolution spatiale	Temps d'acquisition	Sensibilité	NA de l'objectif (grossissement)	Limitations
Balayage spatial	[Somekh *et al.*, 2000a, 2000b]	Interférométrie hétérodyne	Limite de diffraction (310 nm)	---	---	1.25 (100X)	1) Temps d'acquisition élevé causé par le balayage spatial 2) Pas de balayage angulaire
	[Berguiga *et al.*, 2007]		Moins de 1 µm	50 s pour 250x250 pixel		1.45 (air, 60X) 1.65 (eau, 100X)	
	[Berguiga *et al.*, 2016]		~ 180 nm	50 s pour 500x500 pixel	2.3×10^{-3} RIU	1.57 (100X)	
	[Kano et Knoll, 2000]	Interférence entre les PSP	1.5 µm	---	---	1.4	
	[Watanabe *et al.*, 2007]		210 nm				
	[Watanabe *et al.*, 2010]		~ 170 nm		4×10^{-4} RIU	1.65	
Microscopie à champ large	[Stabler *et al.*, 2004]	Illumination Köhler	~ 1 µm (air)	Temps réel	---	1.45 (100X)	Conditions de couplage critique pouvant être non-observables
	[Vander et Lipson, 2009]		Moins de 1 µm		$< 10^{-3}$ RIU	1.4	

Combinaison Balayage spatial et microscopie à champ large	[Somekh *et al.*, 2009]	Interférométrie hétérodyne et interférence entre les PSP	600 – 800 nm	500 ms	---	1.45 (100X)	Pas de balayage angulaire
Combinaison Balayage spatial et angulaire	[Watanabe *et al.*, 2012]	Interférence entre les PSP	~ 200 nm	---	---	1.65 (100X)	Temps d'acquisition élevé causé par le balayage spatial
	[Toma *et al.*, 2014]		210 nm				
Modelage de l'illumination	[Tan *et al.*, 2016]	Interférence entre les PSP	1.23 µm (⊥*, air) 3.62 µm (‖*, air) 2.75 µm (⊥, eau) 5.73 µm (‖, eau)	Temps réel	$3.4x10^{-5}$ RIU	1.49 (60X)	Compromis entre la sensibilité et la résolution spatiale
	[Peterson *et al.*, 2014]		300 nm (⊥) 600 nm (‖)		---	1.65 (100X)	
Post-traitement numérique	[Banville *et al.*, 2015]	Reconstruction d'images	1 µm	Temps réel	---	1.46 (63X)	Temps élevé pour la reconstruction
	[Yu *et al.*, 2017]		~ 310 nm			1.49 (60X)	
	[Son *et al.*, 2018]		155 nm			1.49 (100X)	
Choix du métal	[Huang *et al.*, 2007]	Métal fortement absorbant	1.5 µm (eau, Cu)	Temps réel	Diminution	1.40, 1.45, 1.49, 1.69 (60X, 100X)	1) Diminution de la sensibilité 2) Problèmes de biocompatibilité

*Les symboles ⊥ et ‖ correspondent respectivement à la résolution spatiale perpendiculaire et parallèle à la direction de propagation du mode plasmonique guidé.

Tableau 2.2 – Comparaison des méthodes d'imagerie SPR « à prisme ».

Technique	Réfs.	Principes physiques	Résolution spatiale	Temps d'acquisition	Sensibilité	NA du prisme (grossissement)	Limitations
Optimisation du système optique	[Laplatine *et al.*, 2014]	Minimisation des aberrations dues au prisme	1.7 µm (⊥) 2.8 µm (∥)	Temps réel	5.6%/nm bio (Au) 6.9%/nm bio (Ag) 9.4%/nm bio (Cu)	0.5 (50X)	Compromis entre résolution spatiale et sensibilité
Rotation de l'objet	[de Bruijn *et al.*, 1993]	Alignement de la direction de propagation avec les objets	1.5 µm (⊥) 3.0 µm (∥)	Temps réel	---	--- (4X et 40X)	1) Alignement du système et de l'échantillon critique 2) Nombre de manipulations dépendent de l'objet imagé
Choix du métal	[Giebel *et al.*, 1999]	Métal fortement absorbant	1 µm (air, Al)	Temps réel	Diminution	0.35 (20X) Zoom (5X)	Diminution de la sensibilité
Choix de la longueur d'onde	[Berger *et al.*, 1994]	Diminution de la longueur d'onde	2 µm	Temps réel	Faible à basses longueurs d'onde	0.19	Faible contraste pour longueurs d'onde inférieures à 530.9 nm
Nanostructuration de la surface	[Kim et Kim, 2010]	Réseau de lignes à la surface	5.5 µm	Temps réel	---	0.28 (10X) Zoom (12X)	Faible contraste

2.3 Surfaces métalliques nanostructurées

Cette section discute tout d'abord de l'utilisation de surfaces nanostructurées dans la biodétection avec et sans marquage. L'impact de la nanostructuration de surface sur l'adhésion est ensuite abordé. Ce sujet est particulièrement important afin de déterminer si la présence de nanostructures modifie le comportement des cellules pouvant introduire un biais dans les analyses.

2.3.1 Détection par puces nanostructurées

Au cours des récentes années, les surfaces nanostructurées ont montré un potentiel intéressant pour la biodétection avec ou sans marquage [Kabashin *et al.*, 2009]. Cet intérêt est principalement dû au fort confinement du champ au niveau des nanostructures qui peut être optimisé en modifiant par exemple les dimensions, les matériaux et les formes des structures. Les puces nanostructurées utilisées pour la détection avec marquage sont en majeure partie employées pour exciter des fluorophores sélectivement. Cela permet d'avoir des images de haute résolution avec un faible bruit volumique, tout en augmentant la sensibilité [Kim, Oh, *et al.*, 2010]. Par exemple, des nanopiliers marqués par des anticorps ont permis de se lier à des protéines dans des cellules vivantes et de simultanément les illuminer par fluorescence [Xie *et al.*, 2011]. La Figure 2.18 montre la sensibilité de telles structures lorsque celles-ci excitent les fluorophores. Le signal obtenu par épifluorescence en (b) est très saturé, tandis que celui en (c) est très sélectif dans son excitation où seulement les nanopiliers excitent les fluorophores.

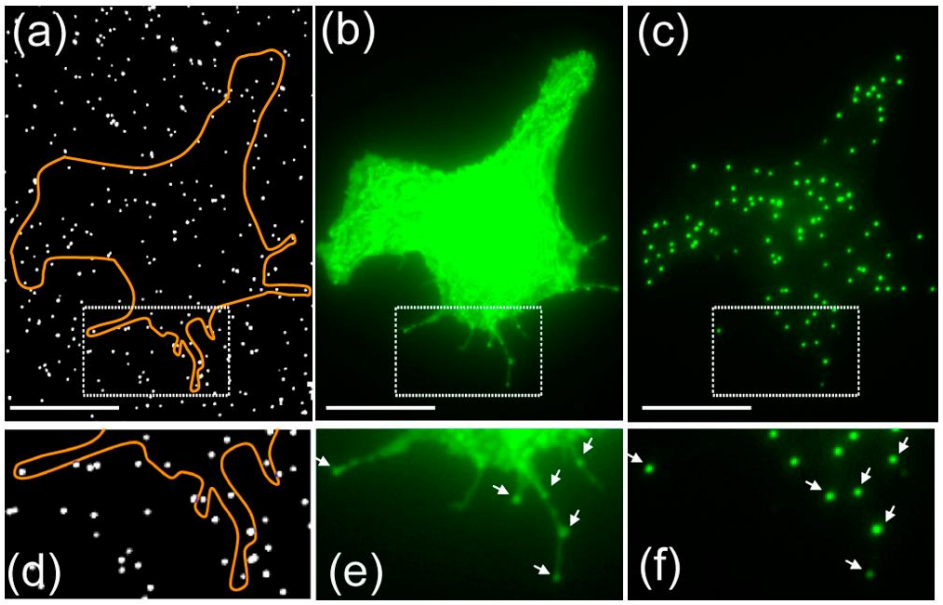


Figure 2.18 – Impact de la présence de nanopiliers (points blancs en a et d) dans l'excitation sélective de fluorophores. Les fluorophores liés aux piliers sont sélectivement excités par le fort champ électrique au niveau des nanostructures (c et f). Image tirée de [Xie et al., 2011].

L'excitation de particules fluorescentes par des nanostructures isolées s'est montré une méthode efficace pour exalter le signal par fluorescence [Kim, Choi, *et al.*, 2010; Oh, Lee, *et al.*, 2014; Oh, Son, *et al.*, 2014; Son, Lee, *et al.*, 2017]. C'est également le cas pour les réseaux périodiques où l'exaltation du signal acquis par fluorescence survient sur la totalité du réseau [Kim, Kim, Cho, *et al.*, 2009].

La présence du fort champ électrique au niveau des nanostructures est particulièrement intéressante pour la détection sans marquage de molécules comme des anticorps [Live *et al.*, 2012] ou l'ADN pour le suivi de son hybridation [Kim, Byun, *et al.*, 2010]. En effet, la sensibilité de surface peut être augmentée par la présence de nanostructures sur une couche métallique. Par exemple, la détection de l'ADN par SPR a été utilisée pour comparer la sensibilité de surface entre des couches métalliques uniformes et nanostructurées (piliers et trous) [Malic *et al.*, 2009] où l'hybridation de l'ADN à la surface du métal a été modélisée par une fine couche (3.5 nm) dont l'indice de réfraction est varié de 5%. Afin de comparer les sensibilités, une métrique d'amélioration (SEF) a été définie sous la forme suivante $\mathrm{SEF}=\left|\frac{\Delta\theta_{\mathrm{NSPR}}}{\Delta\theta_{\mathrm{SPR}}}\right|$ et corresponds au ratio du décalage de l'angle de résonance dû à la variation d'indice de réfraction. Une surface composée de trous (largeur de 30 nm, période de 500 nm)

s'est révélée augmenter la sensibilité de détection de l'immobilisation de l'ADN d'un facteur de 1.91 et de son hybridation d'un facteur 4.13, comparativement à une couche uniforme.

Des augmentations similaires de la sensibilité surfacique ont également été observées grâce à l'utilisation de réseaux nanostructurés de lignes 1D [Byun *et al.*, 2008; Kim, Kim, Moon, *et al.*, 2009]. Par exemple, il est possible de concevoir des structures où les molécules d'intérêt seront fixées aux endroits où le champ électrique est le plus élevé [Kim *et al.*, 2017]. La Figure 2.19 présente une méthode pour fonctionnaliser sélectivement une surface d'argent avec de la biotine afin de concentrer la détection du complexe biotine-streptavidine aux endroits à fort champ.

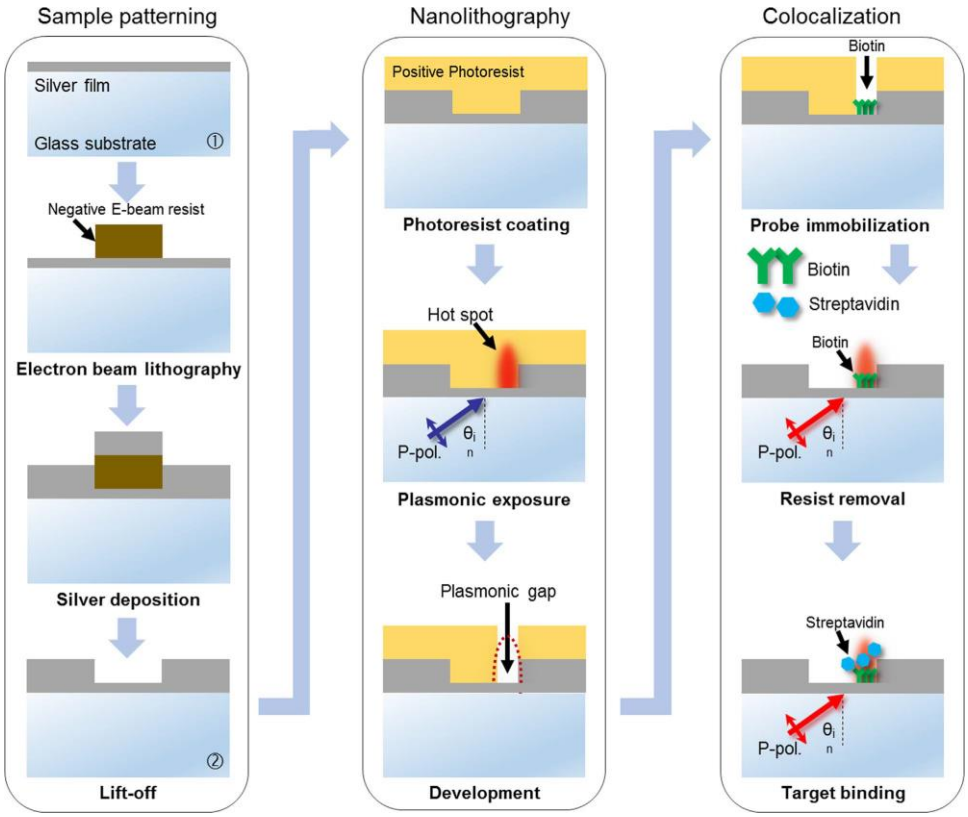


Figure 2.19 – Schéma décrivant les étapes nécessaires pour fonctionnaliser sélectivement une surface nanostructurée [Kim et al., 2017]. Cette sélectivité permet d'augmenter la sensibilité de détection.

Les résultats montrent une amélioration de la sensibilité de détection par un facteur de 5.48 lorsque la fonctionnalisation est effectuée sélectivement. L'amélioration est toutefois marginale (facteur de 1.19) si le réseau est fonctionnalisé en entier.

Récemment, la nanostructuration de surface a été employée pour l'imagerie de cellules vivantes sans marquage [Hackett *et al.*, 2017]. Dans cette étude, la séparation de cellule-substrat est suivie avec succès à l'aide d'une couche métallique trouée périodiquement permettant une transmission optique extraordinaire. Ce type de structure offre une haute sensibilité aux variations d'indice de réfraction à sa surface. Ainsi, l'utilisation de ce type de substrat permet de cartographier l'adhésion cellulaire de cellules individuelles à l'aide d'images acquises par un microscope à champ clair.

Ces différentes techniques montrent un fort potentiel de la nanostructuration de surface dans la biodétection et dans l'imagerie qui reste à être explorée davantage. Cependant, son impact sur les structures étudiées, en particulier les cellules vivantes, doit être tenu en compte afin de ne pas biaiser les analyses.

2.3.2 Adhésion des cellules sur surfaces structurées

L'adhésion des cellules entre elles ou avec leur substrat environnant se fait par le biais de complexes protéiques, en particulier les adhésions focales (FA). Celles-ci s'assurent de réguler le cytosquelette et la signalisation biochimique et mécanique et d'ancrer les cellules. Récemment, plusieurs techniques ont été proposées pour étudier les FA afin de mieux comprendre ces mécanismes, notamment en imagerie de super-résolution [Kanchanawong *et al.*, 2010]. Par exemple, l'étude de la morphologie des adhésions focales a permis prédire la vitesse de migration de cellules à partir de leurs dimensions (longueur, périmètre, aire, etc.) [Kim et Wirtz, 2013]. L'imagerie de super-résolution a également été appliquée à l'étude de la biologie des adhésions cellulaires. La Figure 2.20 dresse un bilan de la composition et des dimensions des adhésions focales [Kanchanawong *et al.*, 2010; Tabarin *et al.*, 2014]. Cette figure montre les différentes morphologies d'adhésion lorsque les FA entrent en tension, notamment lorsque la membrane d'une cellule s'étend. La grosseur des FA adhérées sur une surface vont varier selon leur maturité de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres.

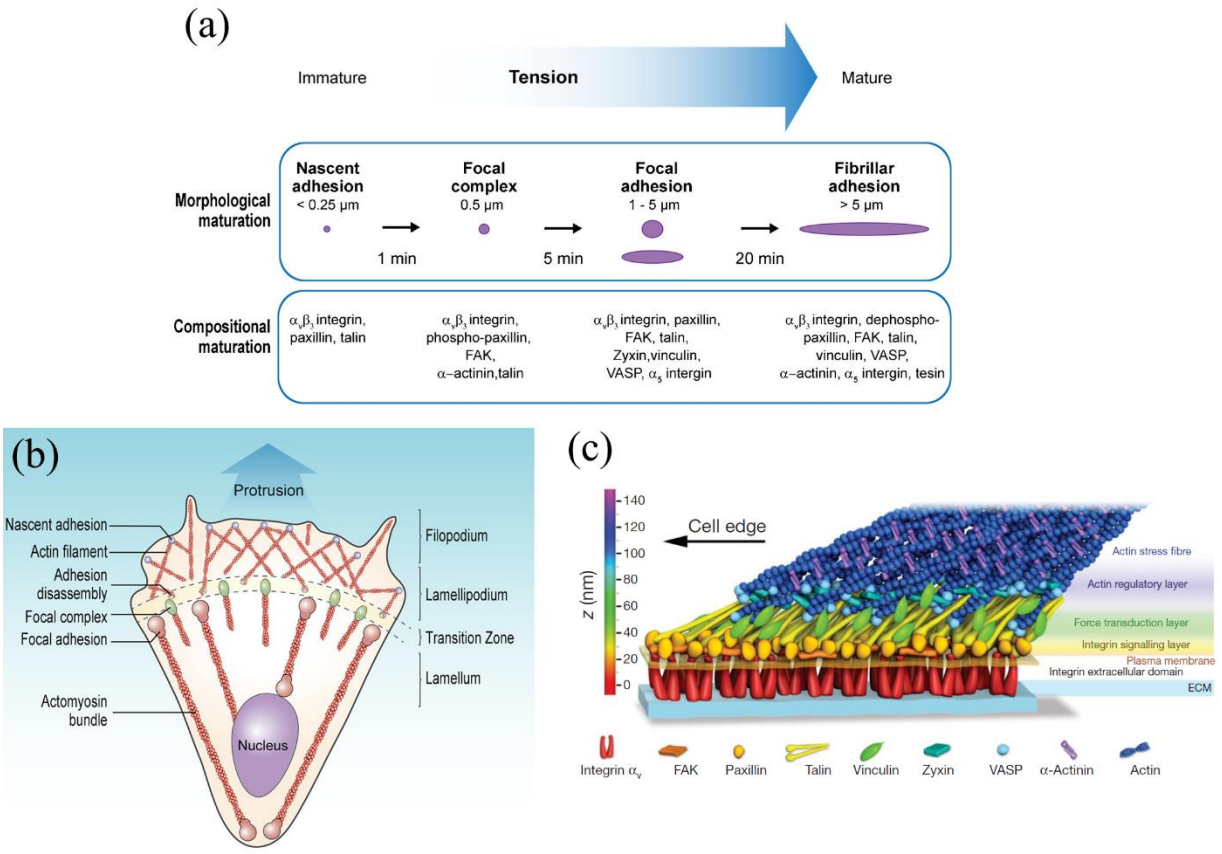


Figure 2.20 – a-b) Bilan de la composition et des dimensions des adhésions focales. Celles-ci vont dépendre de leur maturité et de leur type. Les FA vont varier de grosseur de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres. c) Architecture des adhésions focales. Cette figure est une combinaison de figures tirées de [Kanchanawong et al., 2010; Tabarin et al., 2014].

L'architecture des adhésions focales présentée en (c) indique que celles-ci sont également très près de la surface (quelques dizaines à centaine de nanomètres). L'utilisation d'une technique d'imagerie de surface comme la SPRI permettrait de les observer sans nécessiter de marquage [Peterson *et al.*, 2018] et pourrait être combinée à la nanostructuration de surface pour exalter le signal de surface.

En parallèle, les surfaces nanostructurées ont été aussi grandement utilisées, en particulier pour combattre les pathogènes bactériens [Tripathy *et al.*, 2017, 2018]. Les bactéries pathogènes communes ont des tailles qui s'étendent de plusieurs centaines de nanomètres à la dizaine de micromètres, c'est-à-dire des dimensions similaires à celles des adhésions focales de cellules eucaryotes. Les nombreuses surfaces structurées développées dans ces études ont montré des caractéristiques bactéricides où les pathogènes peuvent difficilement rester accrochées à ces

surfaces. Cette faible adhésion est principalement obtenue en réduisant au maximum la surface d'accroche, grâce à l'utilisation de structures au rapport de forme (hauteur/largeur) est élevé et dont la distance entre structures est inférieure au micron. Par exemple, des réseaux périodiques de pyramides (hauteur de 490 nm et période de 300 nm, rapport ~3) ont montré leur efficacité à détacher les cellules bactériennes et à empêcher la prolifération de celles-ci [Kim *et al.*, 2015]. Le choix de la géométrie de la nanostructuration est donc critique afin d'étudier des cellules vivantes sans affecter leur comportement ou leurs propriétés.

Les études de l'interaction entre les cellules et leur matrice extracellulaire sont cependant très complexes, car la réponse cellulaire (adhésion, migration, prolifération, etc.) varie fortement selon le type de cellules et le substrat environnant [Skoog *et al.*, 2018]. Voilà pourquoi plusieurs types de structures ont été proposés pour les études d'adhésion cellulaire. Par exemple, les lignes 1D ont révélé avoir un impact important sur la morphologie des cellules du tissu conjonctif, comme les fibroblastes qui ont un cytosquelette riche en actine. En effet, plusieurs études montrent que les fibroblastes vont adapter leur morphologie en s'alignant dans la direction des lignes lorsque celles-ci sont fortement compactes [Biela *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2007; Kim, Han, Gupta, *et al.*, 2009; Rianna *et al.*, 2015]. Les lignes 1D peuvent également influencer la migration des cellules en favorisant leur déplacement le long du réseau [Ray *et al.*, 2017]. La Figure 2.21 présente le comportement des protrusions membranaires de cellules endothéliales le long d'un réseau de lignes 1D et sur une surface uniforme.

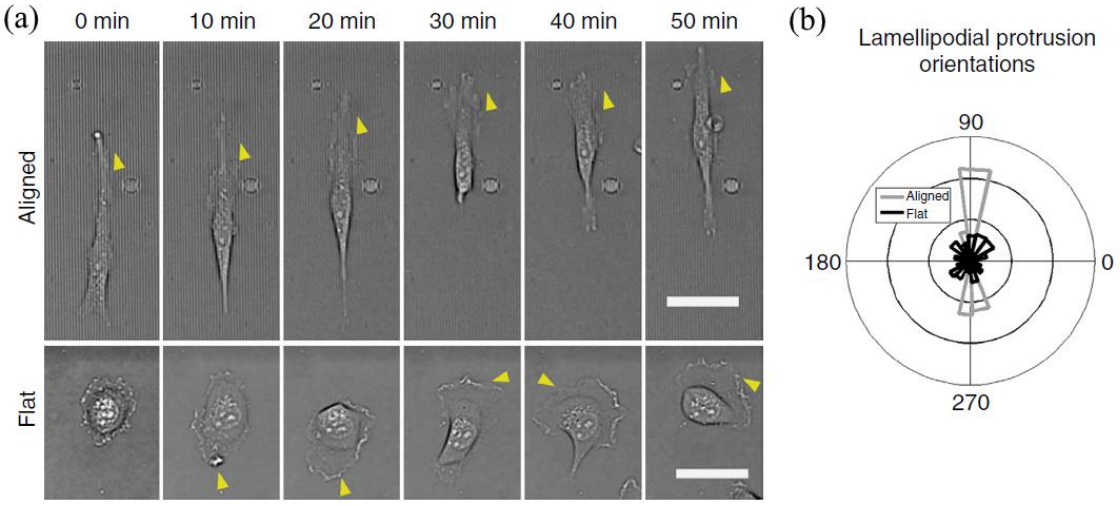


Figure 2.21 – Micrographies (champ clair) montrant l'évolution dans le temps des protrusions membranaires de cellules endothéliales. La migration est très ordonnée lorsqu'il y a présence d'un réseau de lignes. Figure modifiée de [Ray et al., 2017].

Les micrographies en champ clair montrent que les cellules ont une morphologie fortement alignée avec le réseau de lignes et que la présence du réseau favorise leur migration le long des lignes. En effet, la cellule sur la surface plane migre sans direction préférentielle. La présence de nanostructures de surface a alors un impact non négligeable sur le comportement des cellules qu'il faut prendre en compte lors du choix des dimensions. En effet, les différents réseaux mentionnés ci-dessus sont composés de nanostructures dont les hauteurs dépassent la centaine de nanomètres, allant même jusqu'à plusieurs microns. Dans une étude récente, les dimensions de nanostructures ont été variées (épaisseurs ~4 à 160 nm, période 40 à 2000 nm), afin de comprendre la réponse morphologique de fibroblastes *in vitro*, particulièrement leur orientation le long des lignes 1D [Loesberg *et al.*, 2007]. Cette étude leur a permis de conclure que les cellules modifient leur forme selon la topographie de la surface d'accroche jusqu'à des valeurs minimales (largeur de 100 nm et profondeur de 70 nm). Un temps de culture supplémentaire a montré que les fibroblastes peuvent toutefois s'aligner avec des structures dont la profondeur peut descendre jusqu'à 35 nm. Selon leurs résultats, le paramètre essentiel pour un alignement cellulaire sur des lignes 1D est la hauteur des nanostructures. C'est une conclusion similaire qui est ressortie d'une autre étude où des nanoîles de 35 nm de haut disposées au hasard sur une surface n'avaient pas d'impact sur l'adhésion des cellules à la surface [Dalby *et al.*, 2004].

Les résultats de ces études sont particulièrement intéressants pour les applications visées dans cette thèse. En effet, les réseaux de nanostructures proposées par [Kim et Kim, 2010] ont des dimensions inférieures à 35 nm (20 et 30 nm) et ont montré un impact sur la résolution spatiale en imagerie SPR. Par ailleurs, des nanostructures aux dimensions similaires (30 nm) ont également été proposées où le fort confinement du champ autour des nanostructures permet d'augmenter la sensibilité de biodétection [Sarkar, 2015].

2.4 Résumé

Dans ce chapitre, les principales techniques d'analyse et de quantification de la réponse cellulaire ne nécessitant pas de marquage, notamment la SPR, ont été abordées. Cette technique sensible à des phénomènes de surface a ensuite été discutée davantage en rappelant différents concepts optiques et en décrivant la théorie autour de la SPR et de son utilisation en biodétection. Son application en imagerie a montré des limitations quant à sa résolution spatiale, et les

méthodes développées dans la littérature pour s'affranchir de ces limitations ont été exposées. L'application de la nanostructuration de surface en biodétection, ainsi que les enjeux autour de l'impact d'une surface structurée sur la réponse cellulaire ont finalement été abordés. Les réseaux métalliques ont démontré une exaltation locale du champ électrique autour des nanostructures permettant d'augmenter la sensibilité de surface comparativement à des substrats SPR conventionnels. De plus, une hauteur de nanostructures inférieure à quelques dizaines de nanomètres s'est révélée avoir peu d'impact sur la réponse cellulaire. Ainsi, les puces nanostructurées se montrent bien adaptées pour l'imagerie SPR de haute résolution, moyennant une optimisation des propriétés du mode guidé pour minimiser les compromis face aux autres performances.

Le chapitre suivant présente la conception et la fabrication des puces nanostructurées. Le logiciel de simulation numérique sera tout d'abord abordé afin de valider son efficacité dans la modélisation de dispositifs photoniques, notamment de surface avec réseaux métalliques périodiques. Les différentes techniques de lithographie seront abordées, ainsi que les protocoles de réalisation des puces SPR. Dans le chapitre 4, l'optimisation de puces nanostructurées pour l'imagerie SPR de haute résolution sera présentée, suivie de la caractérisation de leurs performances en comparant celles de puces SPR conventionnelles. Le chapitre 5 présente l'utilisation de ces puces nanostructurées dans la quantification d'activités morphologiques de cellules associée à l'activité de signalisation intracellulaire. Finalement, la nanostructuration de surface appliquée en imagerie SPR de haute résolution de cellules individuelles sera discutée dans le dernier chapitre. Des perspectives pour de futures applications seront également abordées.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre traite de l'optimisation de la géométrie et de la fabrication des puces nanostructurées. La première section discute de la modélisation numérique de structures plasmoniques, notamment de réseaux métalliques. Dans cette section, les outils numériques utilisés par le logiciel de simulation seront abordés. La seconde et dernière partie du chapitre présente la conception et la caractérisation des puces SPR. Les différentes techniques de lithographie utilisées dans les processus de fabrication seront discutées, ainsi que la fabrication des puces SPR.

3.1 Modélisation numérique de réseaux métalliques

Des travaux récents ont démontré par modélisation numérique que le mode guidé par une surface métallique nanostructurée exprime une combinaison des propriétés de plasmons propagatifs et localisés [Sarkar, 2015]. Ce mode hybride (*hybrid lattice plasmon*, HLP) tire son origine de l'interaction entre les PSP et les LSP qui peut se modéliser efficacement comme l'interaction entre deux oscillateurs harmoniques faiblement couplés [Novotny, 2010]. L'équation analytique suivante décrit la partie réelle du vecteur d'onde d'un tel mode :

$$k_{HLP\pm}^2 = \frac{1}{2}\left[k_{PSP}^2 + k_{LSP}^2 \pm \sqrt{\left(k_{PSP}^2 - k_{LSP}^2\right)^2 + 4\frac{\Gamma^2}{c^4}} \right] \tag{3.1}$$

où k correspond à la constante de propagation des différents modes, Γ au paramètre de couplage entre les deux modes, et c à la vitesse de la lumière dans le vide. Les calculs numériques présentés par [Sarkar, 2015] montrent que les propriétés du mode HLP sont dépendantes de la géométrie du réseau. Par exemple, des dimensions peuvent être choisies pour que le mode HLP s'exprime principalement comme un mode propagatif afin de sonder profondément dans le milieu diélectrique, ou bien peuvent être choisies pour confiner fortement le champ au niveau des nanostructures sans propagation, comme il est le cas pour les LSP. Ainsi, selon les applications de biodétection d'intérêt, il est possible d'optimiser la géométrie du réseau métallique pour exalter le signal en SPRI. Cependant, le modèle mathématique en (3.1) ne donne pas d'information sur la propagation du mode [Eq. (2.10)], étant donné que seules les parties réelles des constantes de propagation sont prises en compte. Voilà pourquoi un logiciel de

simulation a été utilisé pour modéliser les structures plasmoniques d'intérêt et ainsi obtenir numériquement les caractéristiques du mode guidé.

Ce logiciel est développé au sein de l'équipe du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School (France) depuis plusieurs années. Cet outil combine sous le logiciel Matlab la méthode des éléments finis (FEM) et la méthode modale de Fourier (FMM) afin de modéliser numériquement des dispositifs photoniques [Besbes *et al.*, 2007]. Chacune des deux méthodes possède des avantages et des inconvénients, et deviennent complémentaires lorsqu'un modèle hybride est employé. En effet, l'utilisation des éléments finis permet de modéliser des structures de géométrie complexe qui peuvent poser problème en utilisant la FMM, particulièrement pour des structures métalliques. Cette dernière est toutefois très rapide et offre des solutions aux calculs rigoureux en reposant sur la décomposition en séries de Fourier du champ EM et de la permittivité des différents milieux. Cette méthode hybride permet entre autres de calculer les champs EM au niveau des structures en reliant le champ électrique au champ magnétique partout dans la zone maillée.

La Figure 3.1 présente un exemple d'une structure plasmonique modélisée à l'aide du logiciel, ici un réseau de lignes d'or sur film d'or, de largeur w suivant x et infini suivant y. Tout d'abord, une période Λ est définie par différentes couches suivant z (structurées ou non) et leur indice de réfraction associé. Dans cet exemple, une surface d'or structurée ($h_1 = h_2 = 30$ nm, w = 100 nm, $\Lambda = 200$ nm) est comprise entre un substrat de verre (BK7) et un milieu diélectrique (air). Des conditions de périodicité sont choisies en x, tandis que des PML sont ajoutées en z. Le maillage de la structure utilise le logiciel Trelis (Csimsoft) avec un paramétrage approprié pour obtenir une forte densité de maillage (avec des éléments de dimensions nanométriques) au niveau des zones de champs intenses et un maillage beaucoup plus lâche (quelques dizaines de nm) loin de la surface. Le nombre d'éléments dans le maillage étant un compromis entre précision du résultat et temps de calcul avec un maximum fixé par la taille mémoire disponible. Après le maillage (a), le logiciel cherche la résonance de la structure en réponse à un dipôle électrique situé à la proximité de l'interface métal/diélectrique qui sert de source d'excitation. Pour ce faire, le logiciel itère sur la valeur du vecteur d'onde à longueur d'onde fixe afin d'atteindre les conditions de résonance. Lors de chaque itération, le logiciel résout les équations de Maxwell

pour chaque élément maillé et calcule l'amplitude du champ électrique au niveau de la structure. Celle-ci sera maximale lorsqu'il y aura résonance. Ainsi, une minimisation non linéaire de l'inverse du champ électrique permet d'identifier la valeur du vecteur d'onde à la résonance.

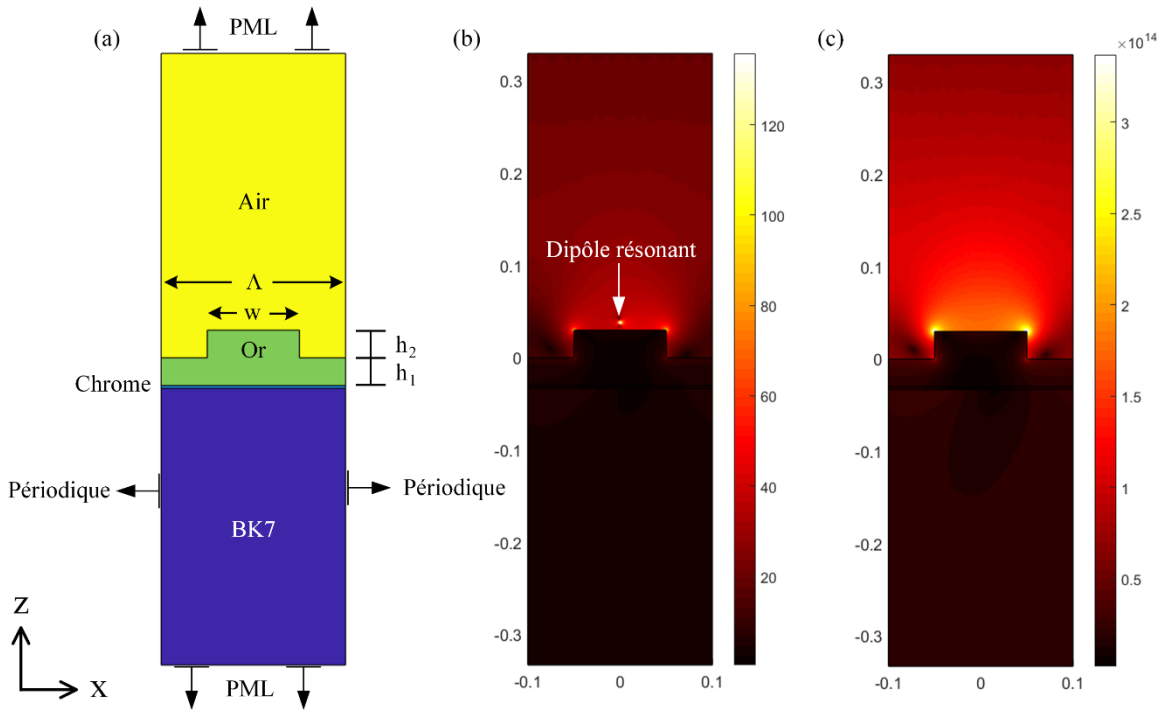


Figure 3.1 – Surface nanostructurée modélisée numériquement. a) Structure plasmonique composée d'un substrat (BK7), de couches métalliques (Cr, Au structuré) et d'un milieu diélectrique (Air). b-c) Champ électrique au niveau de la nanostructure pour λ = 830 nm. Conditions de non-résonance entre le dipôle et la structure en (b) avec k_x = 7.71679 + 0.00124i µm^{-1}. Conditions de résonance atteintes en (c) avec k_x = 7.9945 + 0.08002i µm^{-1}.

La Figure 3.1 présente une visualisation du champ électrique pour la structure hors résonance (b, k_x = 7.71679 + 0.00124i µm^{-1}) et en résonance (c, k_x = 7.9945 + 0.08002i µm^{-1}), où le vecteur d'onde sélectionné au départ correspond à celui calculé à l'aide de l'équation analytique pour un métal semi-infini en (2.8). La valeur maximale du champ électrique est effectivement beaucoup plus élevée en (c) qu'en (b), c'est-à-dire une valeur de ~3.4x10^{14} plutôt que de ~140. La convergence de l'algorithme est très rapide, généralement de l'ordre de 5 à 10 itérations (< 1 min) pour obtenir la valeur du vecteur d'onde à la résonance.

Le tableau suivant présente la convergence du vecteur d'onde en fonction du nombre d'itérations, où le vecteur d'onde à la résonance est obtenu après sept itérations :

Tableau 3.1 – Convergence du vecteur d'onde en fonction du nombre d'itérations.

		Vecteur d'onde	
Nombre d'itérations	Temps de calcul (s)	Partie réelle	Partie imaginaire
1	12.2	7.71678779	0.00124876
2	18.0	7.71755947	0.00124888
3	23.9	7.87530986	0.02277354
4	30.1	8.00281778	0.08996764
5	36.0	7.99441555	0.07970427
6	42.1	7.99448796	0.08002012
7	**49.7**	**7.99448780**	**0.08002028**
8	49.6	7.99448780	0.08002028
9	49.3	7.99448780	0.08002028
10	49.4	7.99448780	0.08002028

Typiquement, les structures 1D comme des lignes peuvent ainsi être évaluées en quelques dizaines de secondes ce qui permet des études exhaustives sur les paramètres géométriques. Pour des structures 2D comme les réseaux de nanocylindres d'or sur film d'or, les temps de calcul sont beaucoup plus importants et empêchent pour l'instant ces études multiparamétriques. C'est pour cette raison que l'optimisation des performances a été faite sur des réseaux de lignes afin de dégager les grandes tendances et comprendre l'évolution des différentes grandeurs en fonction de la géométrie de la structure.

À partir du vecteur d'onde à résonance, les performances de la structure pour les applications visées peuvent être calculées. En premier lieu, la longueur d'atténuation du mode guidé (L_x) et la profondeur de pénétration de l'onde évanescente (L_z) sont calculées suivant les équations :

$$L_x = \frac{1}{2k_x''} \tag{3.1a}$$

$$L_z = \frac{1}{\sqrt{(k_x')^2 - \left(\frac{2\pi}{\lambda} n_{\text{diélectrique}}\right)^2}} \tag{3.1b}$$

Ces équations sont similaires aux équations analytiques présentées à la section précédente, mais ne font pas d'approximations et sont applicables à n'importe quel type de mode guidé.

Le logiciel de simulation permet également de calculer la réponse à une onde plane incidente et d'obtenir les nappes de réflexion et de transmission des différentes structures plasmoniques d'intérêt. Une carte anglo spectrale et une courbe de réflexion en fonction de l'angle d'incidence

ont été présentées à la Figure 2.7. C'est à l'aide des courbes de réflexion que le contraste en résonance et les sensibilités de surface et de volume peuvent être calculés. En effet, le contraste en résonance est défini dans cette thèse comme la différence de réflexion à l'angle de réflexion totale interne et à l'angle de résonance plasmonique ($\Delta R\% = R_{RTI} - R_{PSP}$). La sensibilité de volume est obtenue en variant l'indice de réfraction du milieu diélectrique par une valeur de 0.001 RIU (Δn) et en calculant la variation de réflectance au point d'opération ($S_{volume} = \Delta R\%/\Delta n$). Ce dernier correspond à l'angle où une faible variation d'indice de réfraction résulte en une grande variation de réflexion. La sensibilité de surface est obtenue en ajoutant une fine couche (~5 nm) d'indice de réfraction élevé à la surface du métal simulant une couche biologique, et en calculant la variation de réflectance au point d'opération ($S_{bio} = \Delta R\%$/nm de bio).

C'est à l'aide de ces différentes métriques de performances que les surfaces nanostructurées sont caractérisées, évaluées et comparées à des surfaces uniformes afin d'identifier la géométrie optimale. Cette analyse est présentée dans le chapitre 4 sous la forme d'un article scientifique.

3.2 Fabrication des échantillons

Suivant les simulations numériques, plusieurs structures différentes ont été retenues lors de la conception des puces SPR. En pratique, des échantillons avec et sans structuration de surface ont été fabriqués afin de comparer leurs performances lorsqu'appliqués en imagerie SPR. Trois techniques de lithographie ont été utilisées pour la fabrication de ces échantillons, plus particulièrement, la lithographie électronique (EBL), la lithographie par nanoimpression assistée par UV (UV-NIL) et la photolithographie. Les deux premières ont été employées pour la fabrication des surfaces nanostructurées, tandis que la dernière a permis la fabrication de structures synthétiques pour la validation expérimentale des performances.

3.2.1 Techniques de lithographie

La photolithographie est l'une des méthodes de fabrication les plus utilisées dans les milieux académiques et industriels. En effet, celle-ci est rapide, limitée en coût et facile à utiliser. Le fonctionnement de la photolithographie repose sur l'exposition d'une résine photosensible à une lumière UV. Un masque transparent composé de motifs opaques de chrome est employé pour

structurer le faisceau d'excitation. Ainsi, seulement certaines portions de la résine seront exposées à la lumière. La structure de la résine est modifiée lorsqu'insolée, et les structures sont révélées lors de l'étape de développement où la résine est exposée à un solvant. Il existe deux groupes de résines photosensibles, les résines positives et négatives. Lors du développement, les résines positives ayant été exposées à la lumière seront retirées, tandis qu'elles seront conservées pour une résine négative. La Figure 3.2 présente une schématisation du processus de fabrication de structures par photolithographie.

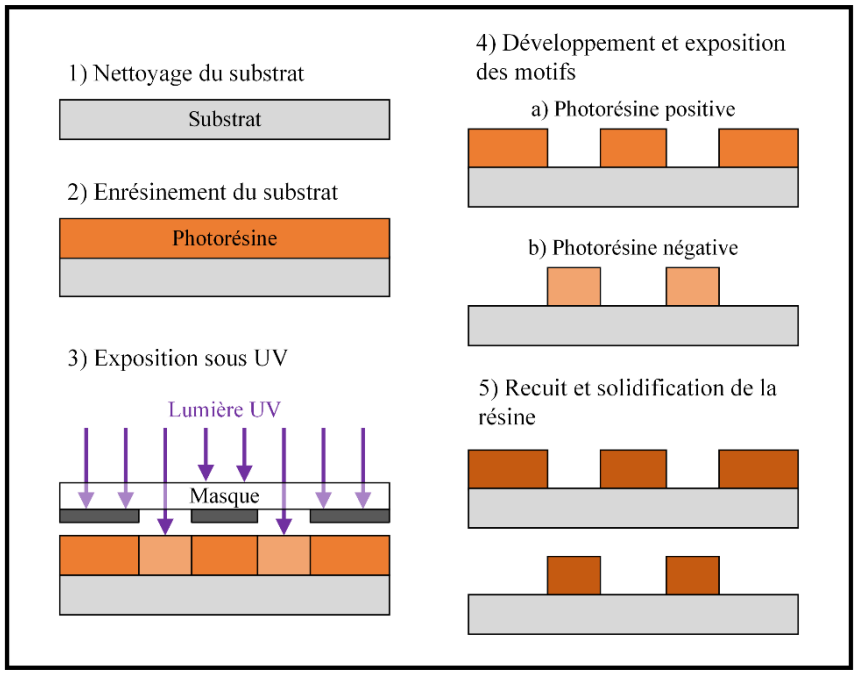


Figure 3.2 – Schématisation du procédé de photolithographie. Une résine photosensible est étalée sur un substrat puis exposée à la lumière UV. Pour une résine positive, les portions insolées seront retirées lors du développement. L'inverse se produira avec une résine négative.

Les dimensions minimales typiques sont de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres, où cette limitation en résolution est due à la diffraction de la lumière. La photolithographie ne peut alors pas être utilisée pour fabriquer des structures de l'ordre de quelques dizaines à la centaine de nanomètres comme il est question dans cette thèse. Voilà pourquoi les techniques de lithographie EBL et UV-NIL ont été employées pour la fabrication des échantillons nanostructurés. En effet, ces techniques permettent de fabriquer des structures dont les dimensions peuvent atteindre quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres [Graczyk *et al.*, 2018; Vieu *et al.*, 2000].

La lithographie EBL est une technique qui utilise des électrons pour modifier les propriétés de la résine, ici électrosensible. L'utilisation d'électrons permet de s'affranchir de la limitation due à la diffraction de la lumière et ainsi atteindre des résolutions beaucoup plus petites. Le fonctionnement de cette technique est similaire à celui de la photolithographie, par rapport aux étapes de fabrication, c'est-à-dire l'étalement d'une résine, l'écriture de motifs à l'aide d'un masque, suivi de leur développement. L'écriture des motifs se fait à l'aide d'un logiciel permettant de contrôler notamment la puissance et la position du faisceau à électrons, ainsi que le temps d'exposition. Les électrons vont pénétrer la résine et la rendre soluble à un développeur. Il est toutefois important de bien contrôler la dose (densité de charges déposées) afin de minimiser les effets de proximité [Stepanova et Dew, 2012]. Ceux-ci sont dus aux électrons pénétrants dans la résine qui vont rétrodiffuser et élargir les motifs. Ces effets peuvent être compensés par exemple en diminuant la dose d'écriture ou en réduisant la taille des motifs en gardant la même dose. La Figure 3.3 présente un schéma illustrant la fabrication de structures métalliques par EBL.

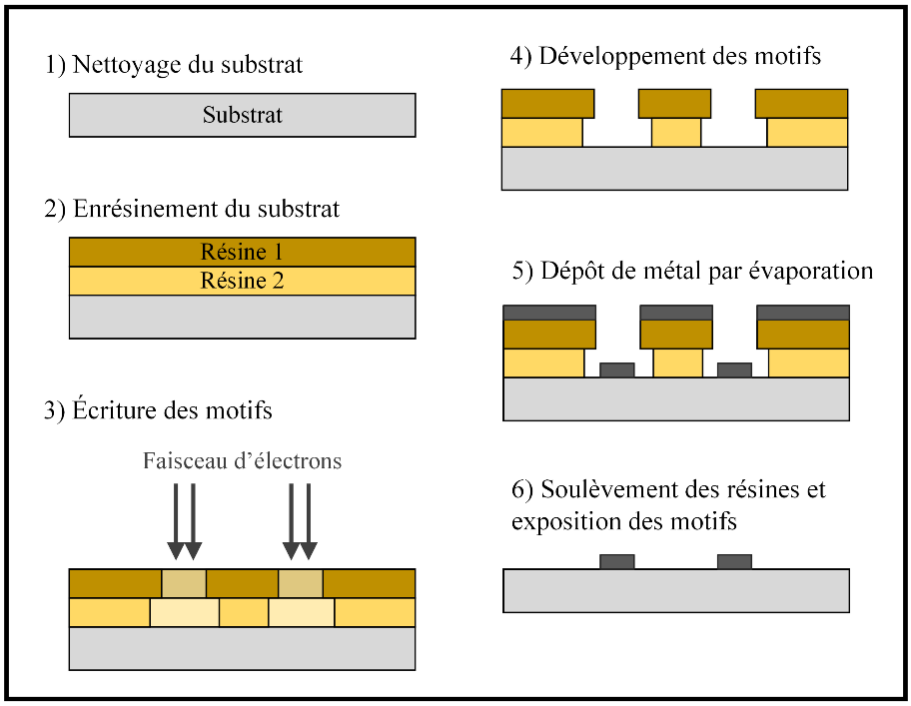


Figure 3.3 – Schématisation de la fabrication de structures métalliques par lithographie électronique. Deux couches de résines sont utilisées pour éviter le recouvrement des flancs de la structure lors du dépôt métallique.

Il peut être préférable d'utiliser deux couches de résines au poids moléculaire différent lors de l'étape d'enrésinement. Une résine au poids moléculaire faible (LMW, résine 2) sera insolée

plus rapidement qu'une résine au poids moléculaire élevé (HMW, résine 1). Cela permet de graver un trou en forme pyramidale ou avec une « casquette » et ainsi d'éviter le recouvrement des flancs de la structure lors du dépôt métallique pouvant nuire à l'étape de soulèvement.

La lithographie électronique permet de fabriquer des structures dont les dimensions sont très petites de façon reproductible. Cependant, plusieurs limitations sont à prendre en compte lors de l'utilisation de cette technique lithographique. Tout d'abord, les temps d'écriture peuvent atteindre plusieurs heures, même plus d'un jour selon les dimensions des structures et la surface d'écriture, rendant les coûts de fabrication non négligeable. Voilà pourquoi la charge d'utilisation d'un microscope électronique est grande et peut être contraignante en milieu académique. Une maintenance régulière est également nécessaire et peut occasionner des retards dans les utilisations.

La lithographie par nanoimpression (NIL) est une technologie émergente pour la micro et nanofabrication, et est vue comme une alternative à la photolithographie et à la lithographie électronique [Traub *et al.*, 2016]. La NIL a une limite de résolution autour de quelques dizaines de nanomètres et permet de fabriquer des structures sur de grandes surfaces en quelques heures seulement. Elle est également une technique bien adaptée pour la fabrication rapide de plusieurs échantillons, ce qui n'est pas envisageable pour la lithographie électronique. La NIL repose sur l'embossage de motifs dans une résine visqueuse à l'aide d'un moule réutilisable. Le type de lithographie par nanoimpression utilisée dans la thèse est le « soft-UV-NIL », c'est-à-dire la lithographie par nanoimpression assistée par UV à l'aide d'un moule souple en PDMS. La Figure 3.4 présente le processus de fabrication d'un échantillon nanostructuré par soft-UV-NIL. Un moule en silicium est tout d'abord fabriqué par lithographie électronique et représente le négatif de la structure à être fabriquée. L'étampe de PDMS dur (H-PDMS) et de PDMS souple est ensuite fabriquée à partir du moule de silicium et sera utilisée pour la nanoimpression.

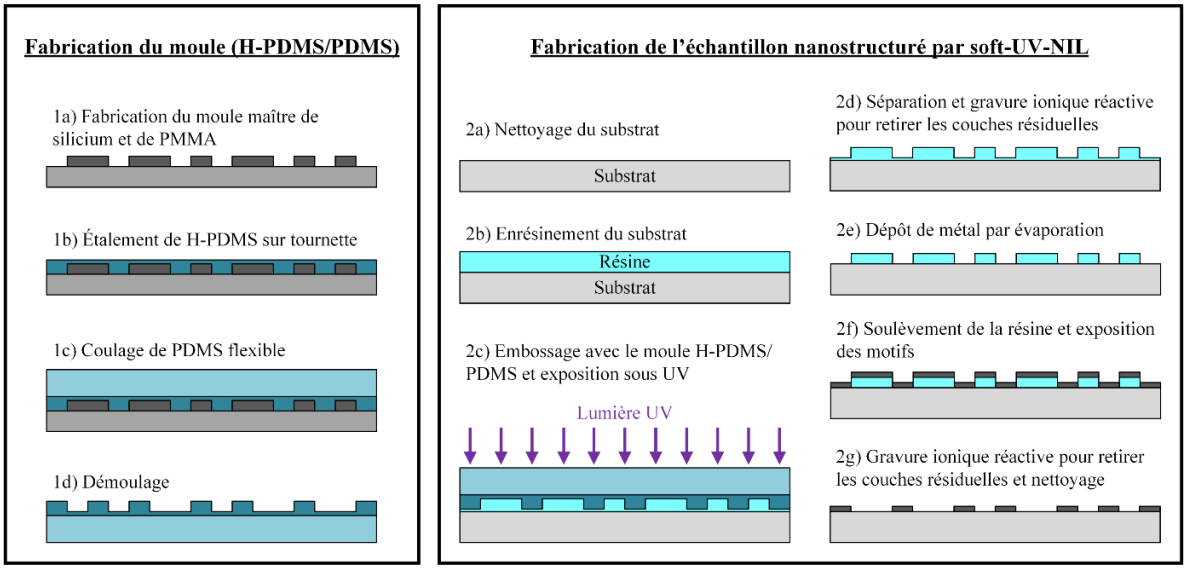


Figure 3.4 – Schéma de la fabrication d'un moule en H-PDMS/PDMS et d'un échantillon nanostructuré par « soft-UV-NIL ».

Le moule maître peut être réutilisé indéfiniment, et le moule en PDMS peut être réutilisé plusieurs fois permettant ainsi une fabrication rapide d'échantillons. Cette reproductibilité est particulièrement intéressante pour des applications biologiques où plusieurs échantillons sont nécessaires.

3.2.2 Fabrication des puces SPR

Tous les échantillons ont été fabriqués en salles blanches (classe 100, ISO 5) afin de minimiser les contaminations avec la poussière. Cela est particulièrement important lorsque les dimensions des structures à fabriquer sont plus petites que les poussières en suspension dans l'air. Plusieurs types d'échantillons ont été fabriqués au courant de la thèse afin de comparer les performances de puces SPR avec et sans nanostructuration.

Les substrats de verre (BK7) ont tout d'abord été nettoyés afin d'éliminer les impuretés provenant de la fabrication. Les étapes de nettoyage sont effectuées en simultanées sur une dizaine de lamelles en immersion dans des contenants en pyrex (Protocole A1 de l'Annexe A). Les lamelles nettoyées ont ensuite été envoyées pour dépôt de métaux par évaporation à l'aide d'un évaporateur Intlvac. Deux couches de métaux ont été déposées, c'est-à-dire une couche de chrome (3 nm) afin de promouvoir l'adhésion de l'or sur le verre et une couche d'or (25 nm ou 50 nm). Les taux de dépôt sont respectivement de 0.5 Å/s, 2 Å/s (25 nm Au) et 5 Å/s

(50 nm Au). Ces deux évaporations sont effectuées successivement sans briser le vide dans la chambre afin de ne pas ajouter d'impuretés dans le processus.

À partir de ces lamelles de verre métallisées (BK7/Cr/Au), des structures ont ensuite été fabriquées à l'aide des techniques de fabrication présentées ci-dessus. La KMPR (résine similaire à la SU-8) a été utilisée comme résine pour la fabrication de structures macrométriques pour la caractérisation de la résolution spatiale et du contraste en SPRI. La KMPR est stable, biocompatible et plus résistante aux fissures que la SU-8 [Convert *et al.*, 2012]. L'utilisation de la lithographie électronique pour la fabrication de nanostructures a permis de varier facilement les dimensions de réseaux afin de caractériser leurs performances en SPRI. Le soft-UV-NIL a été utilisé pour fabriquer des réseaux de grande surface (1 cm^2) aux dimensions optimisées, pour des expériences cellulaires. Les protocoles utilisés pour les différentes techniques de fabrication sont présentés dans l'Annexe A, c'est-à-dire les protocoles A2 pour la photolithographie, A3 pour la lithographie électronique et A4 pour le soft UV-NIL.

La Figure 3.5 présente des images MEB (microscopie électronique) et optique de puces nanostructurées d'or réalisées à l'aide des techniques de lithographie ci-dessus. Les réseaux en (a) et (c) ont été fabriqués par lithographie électronique, tandis que le réseau en (e) a été fabriqué par soft-UV-NIL. Ces réseaux sont respectivement composés de lignes 1D, cylindres et carrés. Les nanostructures ont toutes les mêmes dimensions, c'est-à-dire une largeur de 200 nm et une période de 400 nm. La surface des réseaux en (a) et (c) est de 200 µm x 200 µm, tandis qu'elle est de 1 cm^2 pour le réseau en (e). Il faut noter que les lignes ont dû être coupées dans leur longueur pour faciliter l'étape de soulèvement. En effet, des difficultés sont survenues lors du soulèvement de la résine lorsque les lignes étaient plus longues que 100 µm. Ces puces SPR ont été utilisées pour caractériser et quantifier l'amélioration de la résolution spatiale en SPRI (chapitre 4), ainsi que pour l'étude de l'intégrité de monocouche de cellules endothéliales (chapitre 5). La stabilité des puces SPR nanostructurées est présentée à la Figure 5.7 et valide leur fiabilité et utilité pratique. En effet, ces puces SPR ont été réutilisées plus de 50 fois chaque pour des expériences cellulaires sans détériorations apparentes des réseaux métalliques et sans perdre de leur efficacité en SPRI.

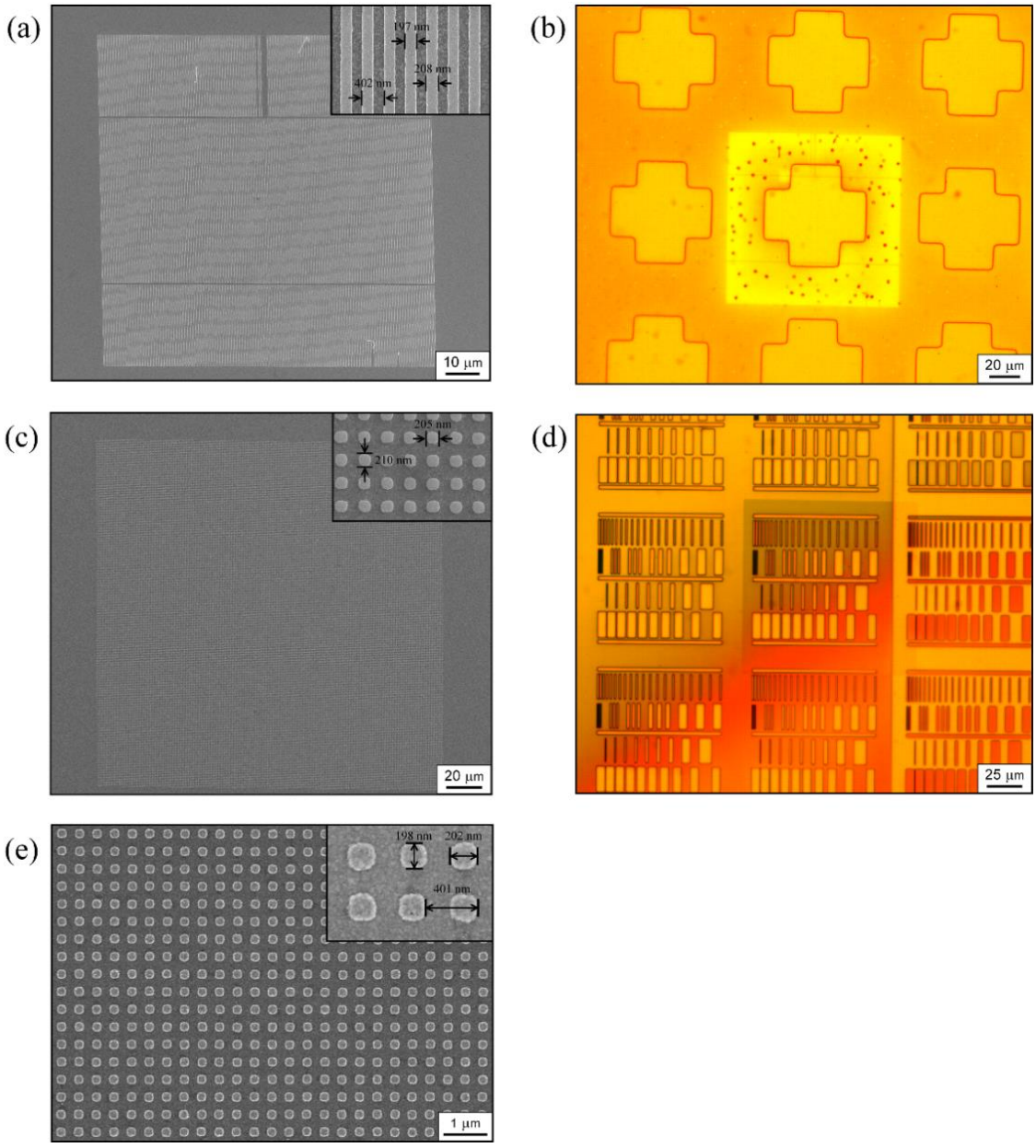


Figure 3.5 – Images MEB et optiques de différentes structures réalisées. Les réseaux métalliques d'or en (a-d) ont été fabriqués par lithographie électronique (200 µm x 200 µm), tandis que le réseau d'or en (e) a été fabriqué par soft-UV-NIL (1 cm^2).

3.3 Résumé

Dans ce chapitre, l'optimisation des paramètres géométriques des puces nanostructurées a tout d'abord été traitée. Celle-ci a été effectuée à l'aide d'un logiciel de simulation, combinant la méthode des éléments finis et la méthode modale de Fourier, et un algorithme de minimisation permettant d'obtenir les différentes grandeurs de mesure de performances des réseaux

métalliques. La géométrique optimale des puces nanostructurées a ainsi été déterminée et sera traitée dans le chapitre 4. Ce chapitre a également discuté de la conception et de la caractérisation des puces SPR. Les différentes techniques de lithographie ont été présentées, ainsi que les protocoles de fabrication des puces SPR.

CHAPITRE 4 NANOSTRUCTURATION DE SURFACE EN IMAGERIE SPR

4.1 Avant-propos

Auteurs et affiliations :

Frédéric A. Banville : [1]Étudiant au doctorat, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada. [2]Étudiant au doctorat, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Julien Moreau : Chercheur au CNRS, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Mitradeep Sarkar : Étudiant au post-doctorat, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Mondher Besbes : Ingénieur de recherche au CNRS, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Michael Canva : Professeur, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)-CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Paul G. Charette : Professeur, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)-CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Date de l'acceptation : 9 avril 2018

État de l'acceptation : version finale publiée

Revue : Optics Express

Référence : Banville, F. A., Moreau, J., Sarkar, M., Besbes, M., Canva, M. et Charette, P. G. (2018). Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design. Optics Express, volume 26, numéro 8, p. 10616-10630.

Titre français : Amélioration du compromis entre la résolution spatiale et le contraste en imagerie à résonance de plasmons de surface (SPRI) à haute résolution par la conception de surfaces métalliques nanostructurées.

Contribution au manuscrit :

De nombreuses techniques ont été proposées pour améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR [Banville *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2012]. Cependant, celles-ci entraînent une détérioration des autres paramètres d'imagerie. Dans cette publication, nous démontrons que les surfaces métalliques nanostructurées permettent de réduire efficacement la propagation des modes plasmoniques propagatifs, et qu'elles sont bien adaptées pour l'imagerie SPR de haute résolution.

Originalité des travaux :

Ces travaux présentent une analyse exhaustive des propriétés du mode « hybride » supporté par une surface métallique nanostructurée, en relation avec la géométrie du réseau de nanostructures. Nous démontrons que cette géométrie peut être optimisée de manière à réduire significativement la propagation du mode plasmonique sans atténuer les autres paramètres d'imagerie. Les résultats des simulations numériques sont ensuite validés expérimentalement à l'aide de structures synthétiques de test. La comparaison entre les surfaces métalliques uniformes et nanostructurées montre une nette amélioration de la résolution spatiale sans diminution du contraste dans les images acquises.

Contributions respectives des auteurs :

J’ai effectué les simulations numériques, fabriqué les échantillons utilisés dans cette étude, effectué les mesures en imagerie SPR et traité les résultats expérimentaux. Mondher Besbes a développé le logiciel d’analyse numérique et Mitradeep Sarkar a aidé dans l’analyse des résultats des simulations numériques. Les professeurs Michael Canva et Paul Charette, ainsi que mon encadrant en France Julien Moreau ont supervisé la direction des travaux. Tous les auteurs ont approuvé la version finale du manuscrit avant la soumission pour publication.

Résumé français :

L'imagerie à résonance de plasmons de surface (SPRI) est une technique optique de champ proche utilisée pour la cartographie des perturbations chimiques et physiques survenant au-dessus d'une surface métallique sans la nécessité de marquage. À ce jour, la majorité des systèmes SPRI sont employés pour la biodétection en temps réel et simultanée d’une matrice de zones d’analyse, et ne nécessitent qu'une résolution spatiale modeste. Il existe un intérêt croissant pour l’application de la SPRI pour l’imagerie sans marquage de cellules biologiques afin d’étudier les interactions entre cellules et surfaces. Cependant, la résolution nécessaire pour imager ces phénomènes de surface (inférieure au micron) dépasse largement ce que les systèmes actuels permettent. En effet, la longueur d’atténuation des plasmons polaritons de surface (SPP) limite fortement la résolution selon l’axe de propagation, typiquement de l’ordre des dizaines de micromètres. Les stratégies développées à ce jour pour améliorer la résolution spatiale en SPRI entraînent une détérioration des autres paramètres d’imagerie, notamment le contraste des images. Contrairement aux surfaces métalliques uniformes utilisées en SPRI supportant des modes de surface purement propagatifs, les surfaces métalliques nanostructurées supportent des modes plasmoniques dit « hybrides » qui partagent les propriétés de modes propagatifs et localisés. Dans cet article, nous montrons que ces modes hybrides sont particulièrement bien adaptés pour l’imagerie SPR de haute résolution. Nous démontrons comment la géométrie des réseaux métalliques peut être optimisée pour obtenir une résolution inférieure au micromètre tout en atténuant les compromis avec les autres propriétés d’imagerie.

Résumé anglais :

Surface plasmon resonance imaging (SPRI) is an optical near-field method used for mapping the spatial distribution of chemical/physical perturbations above a metal surface without exogenous labeling. Currently, the majority of SPRI systems are used in microarray biosensing, requiring only modest spatial resolution. There is increasing interest in applying SPRI for label-free near-field imaging of biological cells to study cell/surface interactions. However, the required resolution (sub-μm) greatly exceeds what current systems can deliver. Indeed, the attenuation length of surface plasmon polaritons (SPP) severely limits resolution along one axis, typically to tens of μm. Strategies to date for improving spatial resolution result in a commensurate deterioration in other imaging parameters. Unlike the smooth metal surfaces used in SPRI that support purely propagating surface modes, nanostructured metal surfaces support "hybrid" SPP modes that share attributes from both propagating and localized modes. We show that these hybrid modes are especially well suited to high-resolution imaging and demonstrate how the nanostructure geometry can be designed to achieve sub-μm resolution while mitigating the imaging parameter trade-off according to an application-specific optimum.

4.2 Article

4.2.1 Introduction

Surface plasmon resonance (SPR) sensing is an optical near-field based method for detecting minute material or physical changes that occur within a thin volume on the dielectric side of a metal/dielectric interface [Kretschmann et Raether, 1968; Otto, 1968]. The literature often describes SPR sensing with a mixture of quantum mechanical (photons, plasmons, polaritons) and classical (electromagnetic waves, phase matching, evanescent fields) terminology. Except for single photons or entangled states, SPR can be entirely described by classical electromagnetism [Lal *et al.*, 2007], which facilitates quantitative comparisons with other guided wave near-field optical sensing methods. SPR systems generally fall into two classes depending on the nature of the electromagnetic modes in play: "propagating" modes at smooth dielectric/metal planar interfaces versus "localized" modes at the surface of colloidal metal nanoparticles or nanostructured metal surfaces.

A typical propagating-type SPR sensor is in fact a planar waveguide that supports a single TM-polarized guided mode propagating at a metal/dielectric interface with a field profile that decays exponentially on either side, i.e. a surface wave. This mode, commonly referred to as "surface plasmon polaritons (SPP)" or simply as "surface plasmons", can be excited by input light with a matching wavevector in a number of ways, similarly to guided modes in photonic waveguides. The "SPP mode" is attenuated over a short distance because, in standard photonics terminology, it is both "lossy" due to propagation losses by absorption in the metal and "leaky" due to out-coupling of guided light back into the high index medium of the input/output optical coupling system. Since mode characteristics and input/output coupling efficiency are highly dependent on local material properties and geometry, perturbations near the interface that change the dielectric refractive index distribution within the effective range of the evanescent field will induce variations in the output light intensity [Homola, 2006]. Resonance occurs when the uncoupled fraction of input light interferes destructively with light out-coupled from the SPP mode, causing the output intensity to drop to a minimum.

With appropriate optics and a 2D sensor (camera), propagating-type SPR can be used for imaging (SPRI), where refractive index variations in the dielectric close to the metal/dielectric

interface are spatially resolved in the plane of the interface. Most SPRI systems use off-the-shelf equilateral prisms for input/output light coupling [Berger *et al.*, 1994; de Bruijn *et al.*, 1993; Giebel *et al.*, 1999] where imaging resolution in the plane is typically several µm or more. Resolution can be improved by using custom-designed prisms to reduce geometric aberrations [Laplatine *et al.*, 2014] or a high numerical aperture microscope objective for input/output optical coupling [Huang *et al.*, 2007; Söllradl *et al.*, 2017]. Ultimately, spatial resolution in widefield (un-scanned) SPRI is limited by the "attenuation length" (defined below) in the mode propagation direction and by diffraction in the orthogonal direction [Berger *et al.*, 1994; Söllradl *et al.*, 2017; Yeatman, 1996]. As the attenuation length is typically greater than the diffraction limit, spatial resolution is anisotropic. This phenomenon is most apparent in high-resolution SPRI, where images appear to suffer from a "blurring effect" along the direction of mode propagation [Banville *et al.*, 2015; Raether, 1988].

Currently, the vast majority of SPRI systems are used with spotted microarrays for parallel measurements of affinity assays. In such cases, spatial resolution is not critical since a single averaged measurement is sought for each spot (typically 100 µm in diameter or more). Recently, there has been growing interest in real-time label-free surface-based (near-field) imaging of relatively large biological objects such as cells to better understand how interactions with the substrate may trigger specific biochemical signalling events that lead to pathological behavior, such as with many types of cancer. SPRI is particularly well suited to this challenging task and a number of groups have published pioneering work in this area [Giebel *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2014; Toma *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2012]. In this relatively new application of SPRI, spatial resolution *is* of critical importance. While most of the cell body is generally outside the evanescent field and thus out of SPR sensing range, the first hundred nanometers above the sensor surface are nevertheless "information rich" for key aspects of cell behavior such as focal adhesion remodelling during cell motility and morphological changes induced by molecular signalling events [Söllradl, Banville, *et al.*, 2018]. The relatively large refractive index differences ($1.355 < n < 1.60$) between the cellular organelles and the cytosol (intra-cellular fluid), as well as between the organelles themselves [Liu *et al.*, 2016], are easily observable with SPR. However, focal adhesion and cytoskeleton remodelling involve fine (sub-µm) features both within the cells (organelles) and at the cell boundary (ex: pseudopods) that

can only be resolved with high spatial resolution, where resolution anisotropy in SPRI is a significant problem.

Several approaches have been proposed to address the resolution problem along the mode propagation direction in SPRI. Scanning-based methods exploit SPP mode self-interference to achieve isotropic diffraction-limited imaging but at the cost of much longer image acquisition times [Berguiga *et al.*, 2016; Somekh *et al.*, 2000b; Toma *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2010, 2012]. Other approaches involve using higher loss metals [Huang *et al.*, 2007] or numerically combining images with distinct mode propagation directions [Banville *et al.*, 2015]. These techniques are, however, limited in either temporal resolution or image contrast.

Over the past decade, there have been many exciting developments in nanoplasmonics [Collin, 2014]. Most of the work to date applied to biosensing on planar substrates has focused on local enhancement of the electric field ("hot spots") either to increase sensitivity at very low target concentrations [Zeng *et al.*, 2017] or for surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) [Gillibert *et al.*, 2016], and more recently in super-resolution fluorescence microscopy [Oh, Son, *et al.*, 2014]. Since label-free high-resolution imaging of distributed objects such as biological cells with SPRI is a fairly new field, relatively little work has been done so far to explore nanoplasmonics solutions to the spatial resolution anisotropy problem, with only a few notable exceptions [Kim et Kim, 2010]. In a series of papers published by our group on SPP modes supported by nanostructured metal films, we showed that strong coupling between propagating and localized modes gives rise to a "hybrid" SPP mode [Chamtouri, Dhawan, *et al.*, 2014; Chamtouri, Sarkar, *et al.*, 2014; Sarkar, Besbes, *et al.*, 2015; Sarkar, Bryche, *et al.*, 2015]. In continuation of this work, we demonstrate in the present paper that these hybrid modes are especially well suited for high resolution SPRI as they benefit from a reduction in attenuation length due to the localized component influence, thereby improving resolution along the direction of mode propagation, without undue deterioration in other performance metrics relative to a purely propagating mode. The particular balance between the propagating and localized mode properties is entirely determined by the metal surface nanostructure geometry and can be tailored according to application-specific design criteria.

The nanostructure design process, involving numerical modeling and parameter estimation from the experimental data, is described below in a case study based on one of the most common SPRI biosensing system configurations: a dielectric fluid medium atop a 50 nm uniform gold film at an operating wavelength of $\lambda = 830$ nm. This particular choice of wavelength is motivated by the fact that longer operating wavelengths yield higher SPR sensitivity and that 830 nm is considered the practical upper limit for systems based on silicon photodetectors. However, longer wavelengths also result in longer mode attenuation lengths, exacerbating the resolution problem. Hence, loss of resolution along the mode propagation direction is most acute in this widely used SPRI configuration, making it a good point of comparison for demonstrating our work on metal surface nanostructuring to improve imaging resolution. Both 1D (lines) and 2D (pillars) grating nanostructures are studied in the modeling and experimental sections below. The dielectric material system in the case study is based on biological cells.

4.2.2 Numerical analysis

The role of the numerical analysis is to determine the optimal nanostructure geometry according to application-specific requirements based on 4 imaging performance metrics that are functions of the hybrid mode characteristics: 1) *Mode attenuation length*: since high spatial resolution is required to resolve fine features in cell morphology, attenuation length must be as short as possible. Mode attenuation length, L_x, is defined as the propagation distance over which mode power decreases to 1/e of its steady-state value; 2) *Penetration depth into the dielectric*: since cells are relatively thick objects, measurement range into the fluid must be as deep as possible. Penetration depth, L_z, is defined as the distance into the dielectric from the interface over which the mode amplitude decreases to 1/e of its value at the interface; and 3) *Measurement dynamic range* or *resonance contrast*: since the dielectric material system in the case study involves a wide range of refractive indices, a large dynamic range is required. Resonance contrast is defined as the drop in output intensity at resonance relative to total internal reflection, normalized with respect to an unstructured 50 nm Au film (normalization is not required for the other metrics which are defined in absolute units); 4) *Sensitivity* is defined as the maximum change in output light intensity as a function of change in two material properties in the dielectric: volume refractive index (“bulk sensitivity”: %/RIU) and surface adlayer (biofilm) thickness (“surface sensitivity”: %/nm, relative to a 5 nm biofilm at n = 1.48). In addition,

design constraints are imposed by the available instrumentation (highest mode effective index accessible by the optical coupling system) and by the nanofabrication process (minimum feature size), as discussed below.

The numerical analysis was conducted using a custom-developed tool that combines the finite element method (FEM) with the Fourier modal method (FMM) for resource-efficient modeling of photonics devices that include periodic and aperiodic structures at different levels of scale [Besbes *et al.*, 2007]. Sources for refractive indices used in the analyses are as follows: metals (Cr and Au) measured with ellipsometry typically very close to Johnson & Christy [Johnson et Christy, 1972], distilled water from the Sellmeier equation [Daimon et Masumura, 2007], KMPR and BK7 from manufacturer specifications (MicroChem Corp. and SCHOTT AG, respectively).

As shown in Figure 4.1(a), the substrates are composed of a BK7 glass cover slip, a 3 nm Cr adhesion layer, a continuous Au film (thickness, h_1), a nanostructured Au grating (thickness, h_2), and distilled water as the dielectric sensing medium. Two types of grating structures (period Λ, width w) are studied: lines (periodic in x, uniform in y) and pillars (periodic in x and y). Thickness h_2 is zero for unstructured films.

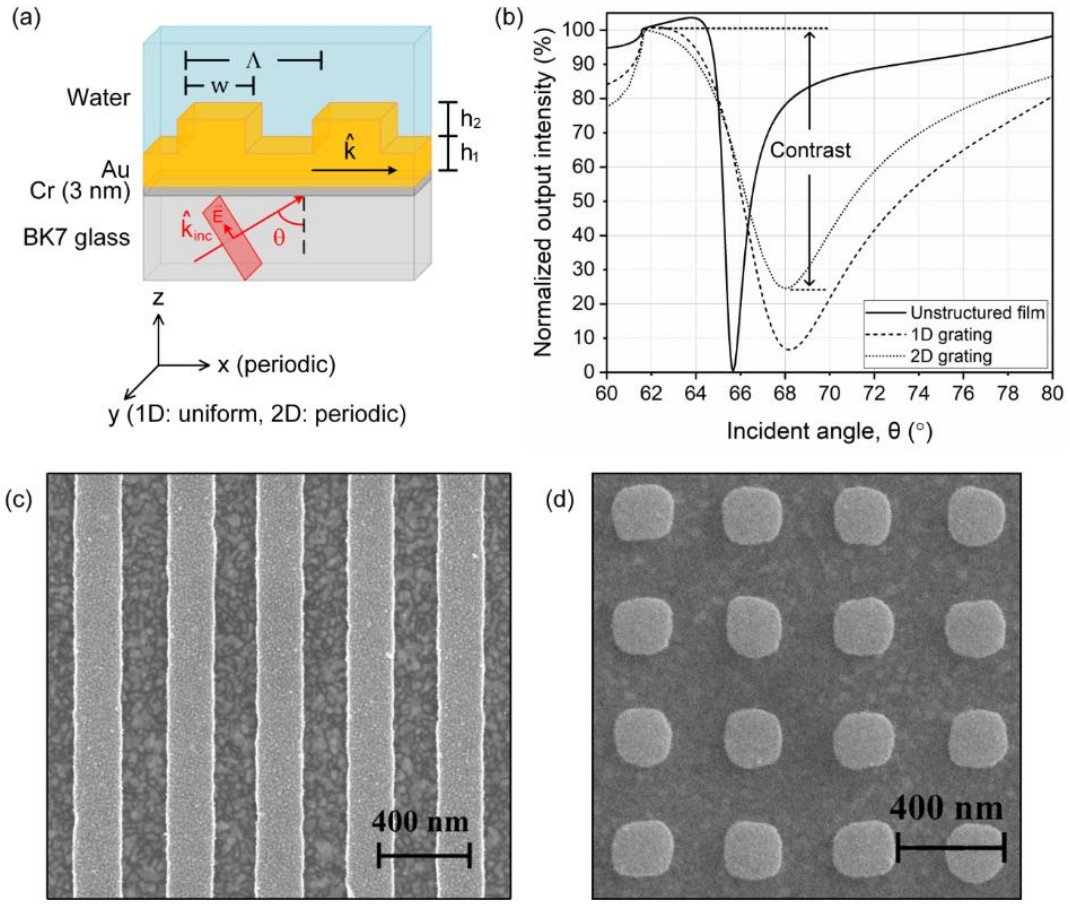


Figure 4.1 – (a) Schematic of the SPRI substrate thin film stack: BK7 glass cover slip – Cr adhesion layer (3 nm) – nanostructured Au film – distilled water. The nanostructured Au film is composed of a uniform bottom layer (height h_1) and a grating top layer (height h_2, period Λ, width w along x). For 1D gratings, the geometry is uniform along y, whereas 2D gratings have the same periodicity along x and y. A TM-polarized plane wave with wavevector k_{inc} is incident at the glass/metal interface at angle θ; (b) Modeled reflectance curves versus incidence angle for unstructured (h_1 = 50 nm) and structured (w = 200 nm, Λ = 400 nm, h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm) Au films, showing the resonance contrast metric definition for the 2D grating; (c-d) SEM images of 1D and 2D nanostructured substrates with grating parameters as in (b).

A TM-polarized plane wave at $\lambda = 830$ nm (k_{inc}) is incident at angle θ and totally internally reflected at the glass/metal interface. The incident light couples via optical tunneling through the metal to the hybrid SPP mode at the opposite metal/dielectric interface (Au/water) when both wavevector components along the *x*-axis are matched. Figure 4.1(b) shows modeled reflectance curves as a function of incidence angle for unstructured ($h_1 = 50$ nm, $h_2 = 0$ nm) and structured ($w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm, $h_1 = 25$ nm, $h_2 = 25$ nm) Au films, also showing the resonance contrast metric definition in the case of the 2D grating. Figure 4.1(c) and (d) show

SEM images of 1D and 2D nanostructured Au films fabricated by electrolithography (w = 200 nm, Λ = 400 nm).

Our numerical modeling tool calculates the complex wavevector ($k = k' + ik''$) of the guided hybrid SPP mode at the metal/dielectric interface. The first two metrics (mode attenuation length, L_x, and penetration depth, L_z) can then be calculated in the usual way from the wavevector components:

$$L_x = \frac{1}{2k''} \tag{4.1}$$

$$L_z = \frac{1}{\sqrt{\left(k'\right)^2 - \left(\frac{2\pi n_{BK7}}{\lambda}\right)^2}} \tag{4.2}$$

Note that since the evanescent field profile in the dielectric above a structured film is not uniform along x (1D and 2D gratings) and y (2D gratings), neither is the penetration depth. Nevertheless, Eq. (4.2) gives a useful "average" value for this metric. The modeling tool also calculates output light intensity as a function of incidence angle to generate intensity vs angle transfer functions, as required to estimate resonance contrast (third metric) and bulk/surface sensitivities (fourth metric).

Though our numerical tool is more capable than existing commercial products for full 3D electromagnetic field modeling of complex structures involving different levels of scale, the modal analysis module (eigen mode expansion) is currently limited to 2D analyses (code development for extending this functionality to 3D is ongoing). Hence, the numerical analysis below of the performance metrics as a function of nanostructure geometry is based on 1D line gratings (2D space analysis), since the performance metrics are themselves derived from the hybrid mode characteristics and/or far field behavior of the structure (reflectance signal at the detector as a function of coupling to/from the hybrid mode). Nevertheless, numerical analysis of 1D line gratings yields very good insight into 2D grating design and characteristics, as confirmed by the experimental results below for both 1D and 2D gratings.

The numerical analysis of the 1D line grating structure described in Figure 4.1(a) proceeded in two steps. The first step calculated the performance metrics as a function of the in-plane grating characteristics (w, Λ) while the out-of-plane grating characteristics (h_1, h_2) were kept constant, each equal to half the standard 50 nm thickness used in conventional SPRI with unstructured metal films at λ = 830 nm ($h_1 + h_2$ = 50 nm). The grating period was varied from 100 to 500 nm and the line width was varied from 50 to 450 nm, both in increments of 5 nm. The second step refined the analysis to identify the optimal out-of-plane characteristics (h_1, h_2). To compare modeling results with conventional SPRI systems, the analysis was also performed for unstructured Au films over a range of film thicknesses (10 nm to 50 nm). In particular, the standard 50 nm thickness used in SPR on Au films at λ = 830 nm, yielding the highest sensitivity and contrast for an aqueous dielectric medium at this wavelength, is used as a benchmark in the discussion below.

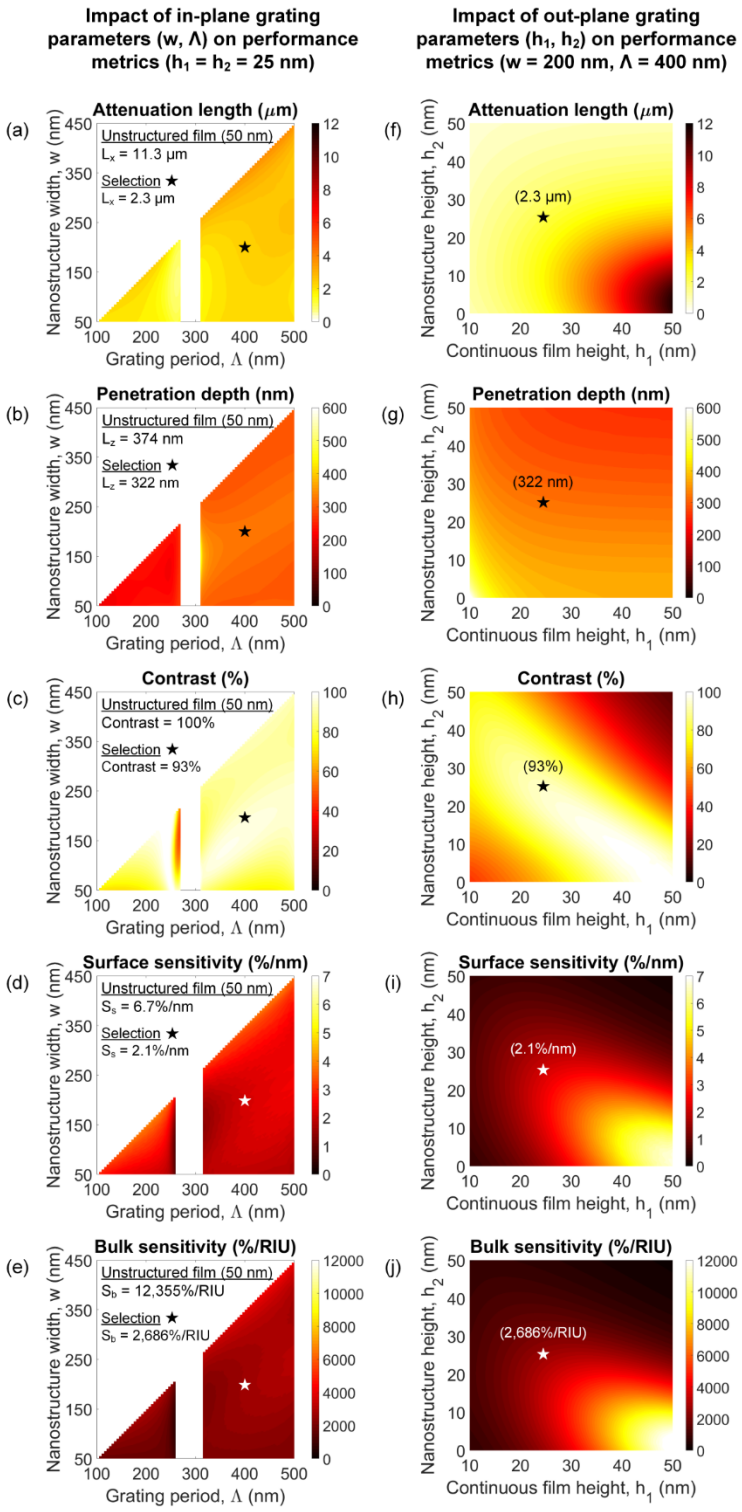


Figure 4.2 – (a)-(e) Modeled 2D maps of the performance metrics as a function of in-plane grating parameters (w and Λ) for fixed out-of-plane parameters (h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm); (f)-(j) Modeled 2D maps of the performance metrics as a function of out-of-plane grating parameters (h_1 and h_2) for fixed in-plane parameters (w = 200 nm and Λ = 400 nm). The star markers indicate the estimated metric values for a surface nanostructure geometry of w = 200 nm, Λ = 400 nm, h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm. All results calculated for λ = 830 nm.

Figure 4.2(a)-(e) show 2D maps of the performance metrics at $\lambda = 830$ nm as a function of in-plane grating parameters (w, Λ) with $h_1 = h_2 = 25$ nm. Due to the anti-crossing between the first order grating modes and the propagating SPP modes [Chamtouri, Dhawan, *et al.*, 2014], there is a bandgap centered on a grating period of ~300 nm. For short grating periods ($\Lambda < 300$ nm), the hybrid mode is highly confined (short L_x and L_z). At longer grating periods ($\Lambda > 300$ nm) mode confinement is lower, resulting in contrast and penetration depth values comparable to an unstructured 50 nm film. Importantly, attenuation length is significantly shorter overall compared to an unstructured film, especially near the band gap. Finally, though bulk and surface sensitivities improve slightly further away from the bandgap, they are lower in general compared to an unstructured film due to the higher confinement of the hybrid SPP mode. However, this loss in sensitivity is an acceptable compromise in view of the important expected gains in imaging resolution due to the reduction in attenuation length along the direction of mode propagation.

As indicated by the star markers in Figure 4.2, we chose $w = 200$ nm and $\Lambda = 400$ nm as a compromise between theoretical and practical considerations. From a theoretical perspective, a point closer to the bandgap, for example $w = 100$ nm and $\Lambda = 350$ nm, would improve spatial resolution slightly. However, such narrow structures are difficult to fabricate reliably over large areas with a lift-off process. In addition, the numerical aperture of the microscope objective imposes an upper limit on the incidence angle of the excitation light. This in turn imposes an upper limit on the effective index of the guided modes than can be excited in the structure since mode index increases with decreasing grating period. The objective used in our system (NA = 1.46) imposes a lower limit of $\Lambda = 325$ nm on the grating period.

In the second step of the numerical analysis, the line width and period were kept constant at $w = 200$ nm and $\Lambda = 400$ nm while the bottom continuous film thickness (h_1) was varied from 10 to 50 nm and the nanostructure height (h_2) was varied from 0 nm to 50 nm, both in increments of 1 nm. Figure 4.2(f)-(j) show 2D maps of the performance metrics as a function of out-of-plane grating parameters at $\lambda = 830$ nm. As seen in Figure 4.2(f), hybrid mode attenuation length improves (decreases) along the diagonal starting at the bottom-right, upwards to the top-left, due to the increasing influence of the localized mode component as the grating depth of

modulation increases (h_2 *vs* h_1+h_2) at constant total metal thickness (h_1+h_2). Conversely, Figure 4.2(h)-(j) show that contrast and sensitivity decrease along the same diagonal and direction, relative to the bottom-right corner where the influence of the propagating mode component is highest. A total metal thickness of 50 nm with a 50% grating depth of modulation ($h_1 = h_2 = 25$ nm, see star markers in the figures), as used in the previous analysis step, yields an acceptable compromise between the two opposing tendencies. Finally, Figure 4.2(g) shows that penetration depth is relatively independent of continuous film thickness while it decreases with increasing nanostructure height due to higher field confinement.

SPRI applied to biological cell imaging is relatively new and is still in its exploratory stages. Indeed, the vast majority of existing SPRI systems are used for parallel monitoring of bioassay kinetics in spotted microarrays where high sensitivity is critical while spatial resolution requirements are moderate since spot diameters are typically relatively large (> 100 μm). In the case of cell imaging, as explained earlier, the opposite is true: sensitivity requirements are moderate while spatial resolution and contrast (dynamic range) are of primary importance. As such, the direct trade-off between these two metrics, resulting from the opposing influences of the propagating and localized components in the hybrid mode, is central to the design process seeking to optimize the surface nanostructure geometry for a particular application.

Figure 4.3 shows plots of contrast as a function of attenuation length at $\lambda = 830$ nm for different configurations of the structure shown in Figure 4.1. The solid black curve shows the resolution vs contrast trade-off for unstructured Au films as a function of thickness (10 nm – 50 nm), where attenuation length is 11.3 μm and contrast is 100% for a 50 nm film. As film thickness decreases (leftward along the curve, starting from the right at 50 nm thickness), attenuation length decreases as well since the SPP mode becomes “leakier”, which also causes contrast to decrease due to incomplete destructive interference at resonance with the uncoupled portion of the input light. The colored curves show three cases of structured metal films (1D gratings) at selected nanostructure heights (h_2 = 15 nm, 25 nm, and 35 nm) over a range of bottom metal layer thicknesses (h_1 increases from left to right along the curves). In each case, the particular bottom metal layer thickness corresponding to the curve apex (maximum achievable contrast for a particular value of h_2) is indicated in the figure legend.

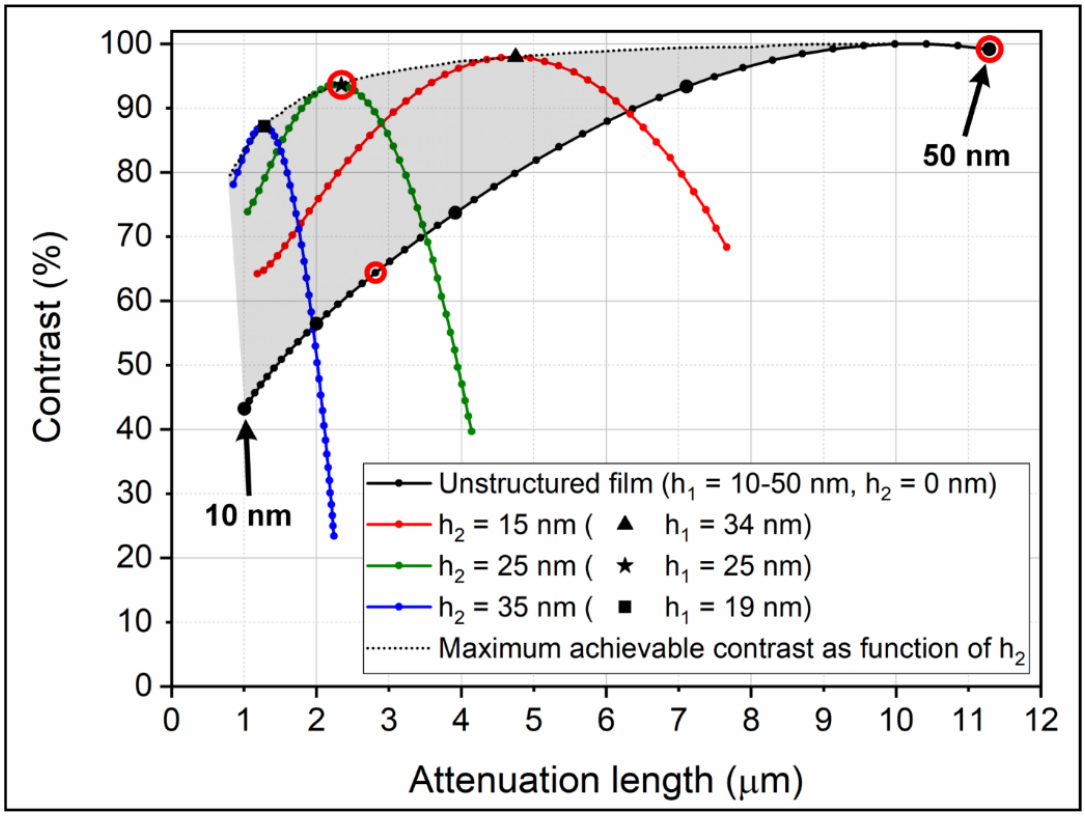


Figure 4.3 – Modeled contrast vs mode attenuation length at $\lambda = 830$ nm for different configurations of the structure shown in Figure 4.1. Solid black curve: unstructured Au film, thickness increases from 10 to 50 nm, left to right along the curve (small dots: 1 nm steps, large dots: 10 nm steps). Colored curves: nanostructured Au films (1D gratings, $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm) for 3 examples of selected nanostructure height (h_2 = 15 nm, 25 nm, 35 nm) as a function of increasing bottom metal layer thicknesses from left to right along the curves, where the values of h_1 at the apex of each curve (maximum contrast) are given in the legend. Dotted black line: maximum achievable contrast versus attenuation length for structured films at varying nanostructure heights h_2. The circular markers indicate the 1D nanostructured substrate configuration and two unstructured substrate configurations that were fabricated and characterized experimentally, as shown below.

Figure 4.3 demonstrates one of the most important results of this work, namely that surface nanostructuring can significantly improve the resolution (attenuation length) vs contrast trade-off in SPRI high-resolution imaging. The dotted black curve at the top traces the maximum achievable contrast for a given nanostructure height (h_2) along with the corresponding attenuation length. The vertical difference between the dotted and solid black curves shows the improvement in resolution/contrast trade-off enabled by surface nanostructuring. Furthermore, the grayscale area between by the two black curves illustrates the latitude with which the imaging characteristics can be chosen. Indeed, for a particular application, the optimal surface nanostructure geometry may not be along the dotted black line at the top (maximum achievable

contrast) but rather at a point between the two curves where resolution can be further improved at the price of an acceptably small loss of contrast. The apex of the green curve ($h_1 = h_2 = 25$ nm) in Figure 4.3 indicates the particular nanostructure configuration chosen for the experiments.

Another important result of this work demonstrated in the next section is that surface nanostructuring with a 2D grating (pillars) yields a further improvement in the resolution/contrast trade-off. Moreover, 2D nanostructuring has greater potential compared to the 1D case for reducing the sensitivity gap with unstructured films, if required. Note that operating at shorter wavelengths and/or using metals with higher losses (ex: Cu) will also reduce attenuation length. However, a shorter wavelength with unstructured substrates does not significantly improve the resolution/contrast trade-off (data not shown).

4.2.3 Experimental results and parameter estimation

This section describes the experimental measurements acquired using both unstructured and nanostructured SPRI substrates, followed by parameter estimation of the attenuation length and contrast performance metrics from the experimental data. Since penetration depth into the dielectric is difficult to measure reliably in practice (it can be done with a scanning near-field optical microscope, but the deconvolution has a high degree of uncertainty), the actual value of this metric was not confirmed experimentally. Sensitivity measurements were not performed as the central interest here is with image spatial resolution. The SPRI imaging system used in the experiments is based on a high numerical aperture microscope objective with excitation light at $\lambda = 830$ nm [Söllradl *et al.*, 2017]. The system can simultaneously image a sample from the underside with SPRI and from the topside with brightfield or fluorescence microscopy (63× objective).

The SPRI substrates were fabricated on BK7 glass cover slips (170 μm thick, 22x22mm, Fisher Scientific). The Au nanostructures were fabricated with electron beam lithography and lift off. To acquire good SPRI image data for robust parameter estimation, a synthetic “target layer” incorporating a variety of shapes with sharp edges was patterned atop the metal surface of the substrates. This target layer was fabricated with 220 nm thick photoresist (KMPR, MicroChem Corp., similar to SU8 but with higher resistance to fissuring) patterned with UV lithography to

expose the metal in orifices of various shapes. The cover slips were first cleaned with a solvent (acetone, isopropyl alcohol, distilled water, 5 min sonication per step) and dried with N_2 prior to deposition of the uniform bottom metal film in an e-beam evaporator (3 nm Cu, 25 nm Au, IntlVac, USA). A PMMA bilayer (bottom: LMW 4% in anisole, top: HMW 2% in anisole) was spin-coated atop the Au film (90 s soft bake on hot plate at 180ºC per layer) and exposed to a 20 kV e-beam for patterning the 1D and 2D gratings in 200x200 μm^2 areas. The PMMA resist was developed in a 9:1 isopropyl alcohol-water solution (1 min), rinsed in water (30 sec), and dried with N_2. A second 25 nm Au film was then deposited with the e-beam evaporator and the Au nanostructures were revealed by lift-off in a solvent (Microposit Remover 1165, MicroChem Corp.). KMPR (KMPR1005, 15% dilution with SU8 thinner, MicroChem Corp.) was spin-coated on the nanostructured samples, soft baked (1 min, hot plate at 110 ºC), UV exposed (Model 806, OAI) for 10 sec (120 mJ/cm^2), soft baked (1 min, hot plate at 110 ºC), developed in solvent (MicroChem SU-8 Developer, Isopropyl alcohol, water, 30 sec per step) and dried with N_2.

The substrates were inserted into the SPRI imaging system and covered by a microfluidic chamber filled with distilled water. The “BK7/Cr/Au/KMPR/water” and “BK7/Cr/Au/water” film stacks will form distinct waveguide structures supporting SPP modes of different effective indices according to whether the dielectric in contact with the metal is either water ($n_{water} = 1.328$) or resist ($n_{KMPR} = 1.555$). As a result, excitation light at a fixed angle of incidence θ will result in different output light intensity levels for the two cases due to differences in input/output coupling efficiency to/from the guided modes. For example, for the 1D grating geometry discussed above ($w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm, $h_1 = 25$ nm, $h_2 = 25$ nm), the difference in output light intensity at $\theta = 68°$ and $\lambda = 830$ nm between the two film stacks is 85.5% (normalized with respect to an unstructured 50 nm Au film, as per the contrast metric definition).

Figure 4.4(a) shows the brightfield image of a cross-shaped orifice in the target layer where the dielectric atop the metal is KMPR outside the cross and water inside the cross. Figure 4.4(b)-(e) show SPRI images at $\lambda = 830$ nm of the target patterned onto unstructured Au films (b: $h_1 = 50$ nm, c: $h_1 = 25$ nm) and nanostructured Au films (d: 1D lines, e: 2D pillars,

h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm, w = 200 nm, Λ = 400 nm). In the SPRI images, dark pixels indicate strong coupling of the excitation light to the SPP mode which results in low reflectivity from the substrate whereas light pixels indicate weak coupling which results in high reflectivity. The direction of mode propagation is from left to right along the horizontal. The SPRI images were normalized by subtracting the dark image and dividing by the average intensity in a small uncoupled zone common to all images. Figure 4.4(b) shows the resolution anisotropy problem clearly: horizontal edges are clearly resolved whereas vertical edges perpendicular to the mode propagation direction appear blurred. The SPR image sequence in Figure 4.4 illustrates increasing improvements in spatial resolution first by reducing the metal film thickness to increase mode leakage in an unstructured substrate [Figure 4.4(b) and (c)], then with 1D nanostructuring [Figure 4.4(d)], and finally with 2D nanostructuring [Figure 4.4(e)].

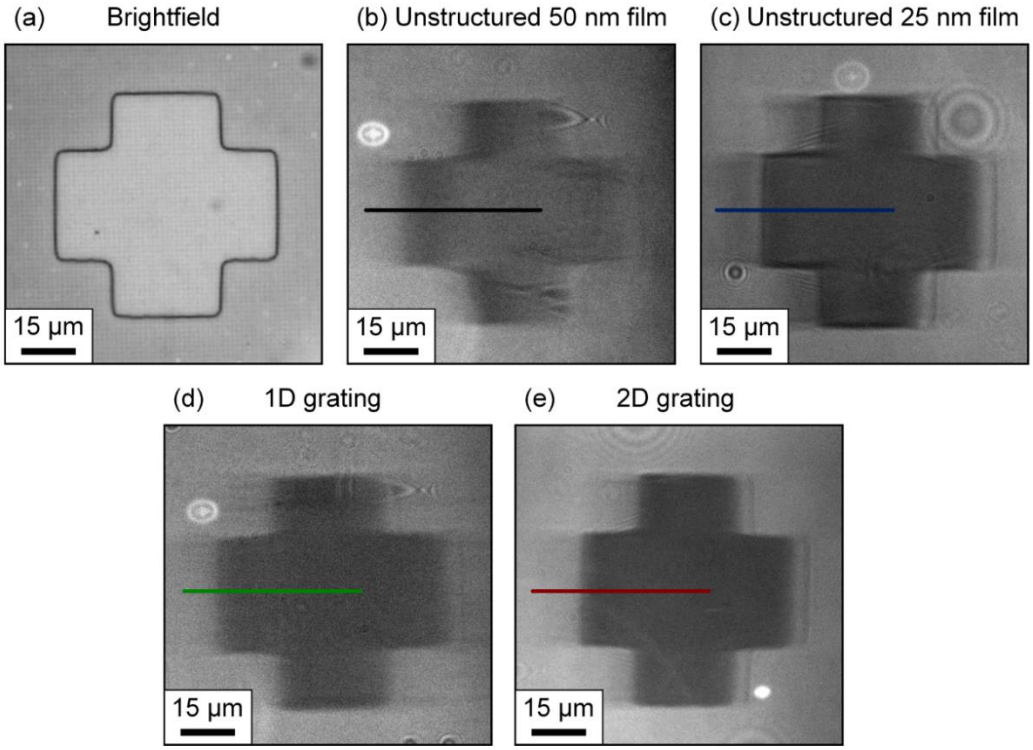


Figure 4.4 – (a) Brightfield image of a cross-shaped orifice in the synthetic target layer: the dielectric atop the metal outside the cross is KMPR and water inside the cross; (b-e) Normalized SPRI images at λ = 830 nm of the cross patterned atop: unstructured Au films (b: 50 nm, c: 25 nm) and nanostructured Au films (d: 1D lines, e: 2D pillars, h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm, w = 200 nm, Λ = 400 nm). Mode propagation is from left to right. The horizontal line overlays indicate the line profiles plotted in Figure 4.5.

Though our modeling tool is particularly efficient, it is nevertheless computationally demanding as with all such field-based numerical tools for solving Maxwell's equations over a discretized space. Since parameter estimation from experimental data typically involves iterative multi-variate non-linear minimization, a more practical choice for this task is a simpler physics-based parametric model that relates the parameters one wishes to estimate with the observable variables in the data. Equation (4.3) expresses the light intensity reflected from an SPR substrate as a function of the incident light wavevector, angle of incidence, and SPP mode wavevector [Banville *et al.*, 2015; Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996]. This parametric model expresses a line profile of reflected intensity along the direction of mode propagation, $I(x)$, following a step change in dielectric index at $x = 0$ that increases the coupling level between the incident light and the SPP mode:

$$I(x) = \left(I_{\max} - I_{\min}\right) e^{-2k'' x} \cos\left(\Delta k' x\right) + I_{\min} \tag{4.3}$$

where I_{max} and I_{min} are the steady-sate reflected light intensities before and after the index step change, k'' is the imaginary part of the surface mode wavevector $k = k' + ik''$ supported by the waveguide structure following the step, and $\Delta k'$ is the difference between the real part of the mode wavevector and the (purely real) input light wavevector (k_{inc}) incident at angle θ_{inc}:

$$\Delta k' = k' - k'_{inc} = k' - \frac{2\pi}{\lambda} n_{BK7} \sin\left(\theta_{inc}\right) \tag{4.4}$$

As seen along the horizontal lines from left to right in Figure 4.4(b)-(e), the reflected intensity drops to a minimum following the abrupt dielectric change above the metal from KMPR to water. The coupling between the incident light and the guided mode requires a finite distance to reach steady state as expressed by the exponential in Eq. (4.3). This in turn explains the exponential decay in reflected light intensity in the direction of mode propagation following a step change in dielectric refractive index and why resolution along this direction is limited by the attenuation length [Eq. (4.1)] rather than diffraction. The sinusoidal modulation of the exponential in Eq. (4.3) is characteristic of the destructive interference underlying the coupling process. As a result, "fringes" or "ringing" appear along edges perpendicular to the direction of mode propagation, contributing significantly to the degradation of perceived spatial resolution in high-resolution SPRI images [Banville *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2007]. To fit the line profile data from an image to Eq. (4.3), I_{max} and I_{min} are first estimated by calculating average pixel intensities over homogeneous areas on either side of the step. Equation (4.3) is then fitted to the

data by constrained minimization to obtain estimates of the free parameters (wavevector components, incidence angle, and relative location of the origin x = 0), where constraints on the fitting domains correspond to narrow ranges about nominal values determined from the numerical modeling (wavevector components), instrumentation settings (incidence angle), and the image data (location of the origin). The attenuation length and penetration depth metrics are then calculated from the fitted mode wavevector components with Eqs. (4.1) and (4.2).

Figure 4.5 shows line profiles of reflected intensity in the direction of the mode propagation from left to right along the horizontal line overlays in Figure 4.4(b)-(e), where mode coupling to the excitation light goes from weakly coupled (KMPR top layer, high output intensity) to strongly coupled (water top layer, low output intensity). The experimental data are plotted with solid lines (black and blue: unstructured film, green and red: nanostructured films) and the parametric fits are plotted with dotted lines in the corresponding colors. The parametric model shows a good fit with the exception of the soft shoulder at the start of the intensity drop that is not explicitly modeled by Eq. (4.3) [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996]. The large undershoot in the line profiles for the unstructured films is due to the sinusoidal modulation term in Eq. (4.3). In the structured film profiles, however, no undershoot is visible. Interestingly, the effect is not symmetrical. Indeed, as seen on Figure 4.4(e), the modulation is absent for the weak-to-strong coupling transition at the leftmost edge of the cross pattern and present at the strong-to-weak coupling transition at the rightmost vertical edge of the cross pattern. This asymmetry is likely due to differences in the way the multiple wave components involved combine to reach steady state conditions after an abrupt change in coupling conditions (weak to strong coupling: buildup to a guided mode, destructive interference with the incident light; strong to weak coupling: diffusion of the guided light, decay back to uncoupled conditions, incomplete interference with the incident light), combined with a shorter mode attenuation length.

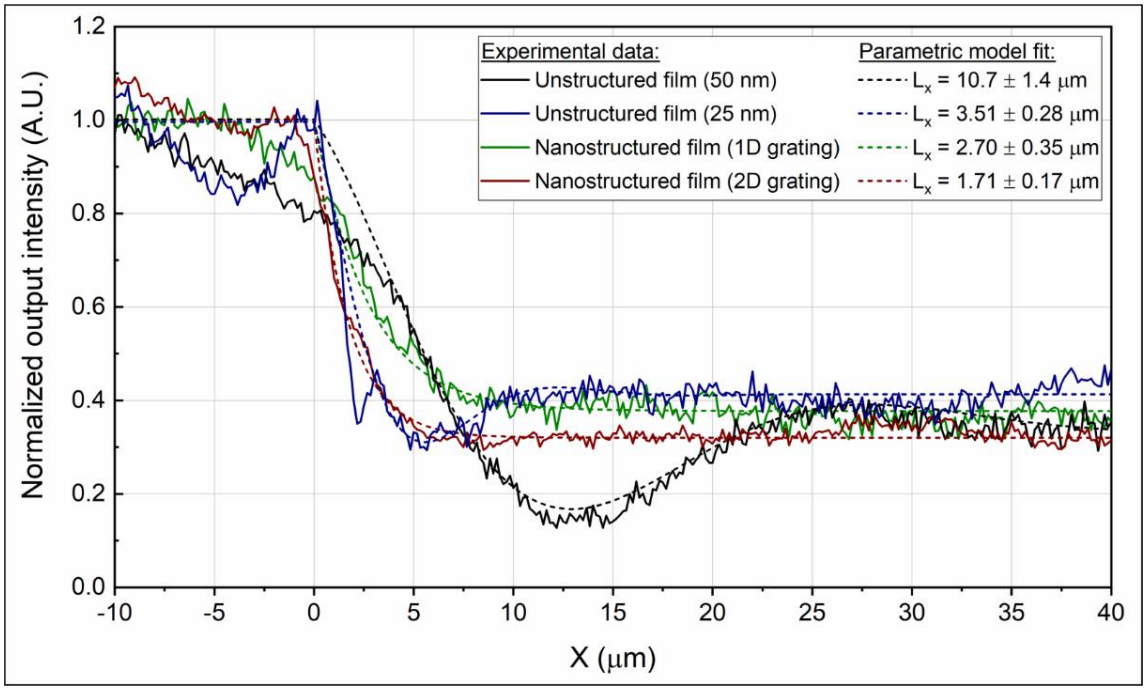


Figure 4.5 – Plots of reflected intensity line profiles in the direction of mode propagation for the line overlays shown in Figure 4.4(b)-Figure 4.4(e). Experimental data: solid lines, parametric model fits: dotted lines.

Parametric model parameter fits averaged across 10 neighboring horizontal lines in the images yielded estimates of $L_x = 10.7 \pm 1.4$ μm and $L_x = 3.51 \pm 0.28$ μm for the unstructured films (h_1 = 50 nm and 25 nm, respectively) and $L_x = 2.70 \pm 0.35$ μm and $L_x = 1.71 \pm 0.17$ μm for the structured films (1D and 2D gratings, respectively). The estimates for the unstructured films and 1D grating are in close agreement with the numerical analysis from the previous section (L_x = 11.3 μm, L_x = 2.8 μm, L_x = 2.3 μm, respectively). The 2D nanostructured film results in a 6.3-fold decrease in attenuation length over the 50 nm unstructured film and a 2-fold decrease over the 25 nm unstructured film, with commensurate increases in spatial resolution. A straight comparison of attenuation lengths tells only part of the story, however, as the sinusoidal perturbations in the line profiles, which also contribute significantly to the degradation in perceived spatial resolution, is absent for the structured films at transitions from weak to strong mode coupling.

Figure 4.6 shows the results of an experiment on a more complex target layer designed to characterize the impact of nanostructuring on spatial resolution in SPRI in terms of feature size and separation between objects.

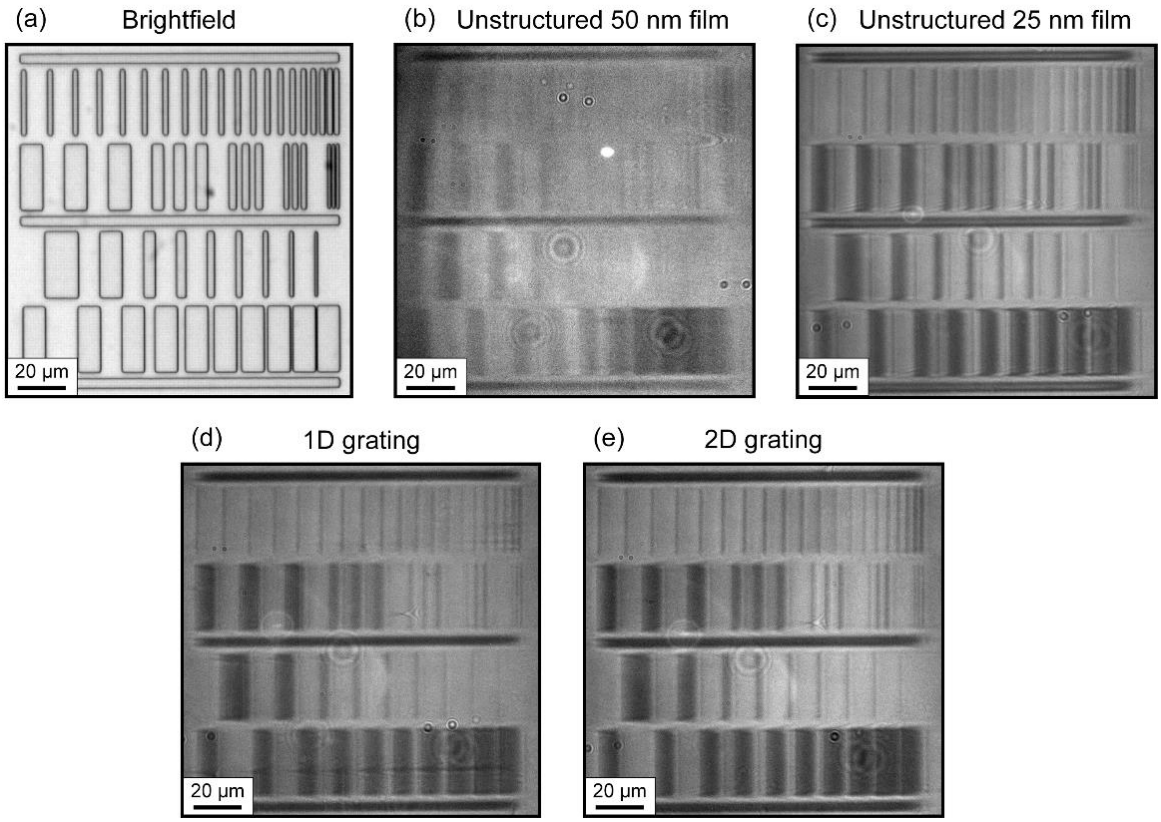


Figure 4.6 – Resolution test chart patterned in the synthetic target layer imaged with (a) brightfield and SPRI on unstructured (b: 50 nm, c: 25 nm) and nanostructured (d: 1D lines, e: 2D pillars, h_1 = 25 nm, h_2 = 25 nm, w = 200 nm, Λ = 400 nm) Au films at λ = 830 nm. In (b)-(e), light grey (weak coupling to the hybrid mode) indicates KMPR atop the metal and dark grey (strong coupling) indicates water-filled orifices in the target layer. Mode propagation direction is left to right horizontally, i.e. perpendicular to the vertical edges. Top row in the images: 2 µm wide lines with variable spacing (10 to 1 µm, in 0.5 µm steps). Second row: groups of 3 lines having equal width and spacing (10, 5, 3, 2, 1 µm). Third row: lines of variable width (15, 10, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 µm) at fixed spacing (10 µm). Fourth row: inverse of previous row (10 µm fixed line width, variable spacing).

Figure 4.6(a) shows a brightfield image of the sample with rectangle-shaped orifices of varying widths and spacings in the KMPR target layer. Figure 4.6(b)-(e) show normalized SPRI images of the pattern on unstructured (b: 50 nm, c: 25 nm) and nanostructured (d: 1D grating, e: 2D pillars, grating geometry is identical to the structure shown in Figure 4.4) Au films. Mode propagation direction is along the horizontal from left to right. The finest features in the target layer, for example the 2 µm lines (top row) and the 1 µm lines separated by 1 µm (second row, RHS), are distinctly resolved in Figure 4.6(e) only, in a clear demonstration of the image resolution improvement due to the 2D grating surface nanostructuring.

4.2.4 Conclusion

This work shows that metal surface nanostructuring significantly improves the inherent trade-off in plasmonics imaging between spatial resolution and other performance metrics compared to the smooth metals films used in most SPRI systems, enabling sub-micrometer resolution near-field label-free imaging in both axes with high contrast. A detailed numerical analysis of 1D grating nanostructured substrates based on performance metrics relevant to imaging (attenuation length, penetration depth into the dielectric, resonance contrast, bulk and surface sensitivities) is used to characterize SPRI performance as a function of nanostructure geometry. Parametric fits to the experimental data obtained with fabricated devices show excellent agreement with the numerical modeling. Experimental results further show that 2D surface nanostructuring with nano-pillars provides additional imaging performance improvement over 1D line gratings. Note that while spatial resolution in SPRI with unstructured metal surfaces can be improved in the direction of mode propagation simply by increasing mode leakage using thinner metal films (see results above for a uniform 25 nm Au film) or by increasing mode losses using higher-loss metals (ex: Cu), such purely “detuning-based” solutions potentially result in severe reductions in measurement sensitivity and image contrast. Using the proposed nanostructuring-based design methodology, however, overall imaging performance is superior and the surface geometry can be optimized according to application-specific requirements and fabrication constraints.

4.2.5 Funding

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (RGPIN-2015-05188).

4.2.6 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) with Discovery Grants for M.C. and P.G.C. F.A.B. is supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and by a French doctoral contract (MESRI) with the Université Paris-Saclay. LN2 is an international laboratory (Unité Mixte Internationale UMI 3463) jointly managed by French CNRS and the Université de Sherbrooke as well as Université de Lyon (ECL, INSA de Lyon, CPE) and the

Université Grenoble Alpes (UGA). LN2 is associated to the French national nanofabrication network RENATECH and is also financially supported by FRQNT. The authors thank C. Colin and T. Söllradl for help in electrolithography and experimental acquisition.

CHAPITRE 5 SUIVI DE L'ACTIVITÉ CELLULAIRE EN SPRI

5.1 Avant-propos

Auteurs et affiliations :

Frédéric A. Banville : [1]Étudiant au doctorat, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada. [2]Étudiant au doctorat, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Julien Moreau : Chercheur au CNRS, Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Kevin Chabot : Étudiant à la maîtrise, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Andrea Cattoni : Chercheur au CNRS, Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N)- CNRS UMR-9001, Université Paris-Sud/Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Ulrike Fröelich : Assistante de recherche, Département de Pharmacologie et Physiologie, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Jean-François Bryche : Étudiant postdoctoral, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Stéphane Collin : Chercheur au CNRS, Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N)- CNRS UMR-9001, Université Paris-Sud/Paris-Saclay, CNRS, Palaiseau, France.

Paul G. Charette : Professeur, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Michel Granbois : Professeur, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Département de Pharmacologie et Physiologie, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Michael Canva : Professeur, Laboratoire Nanotechnologies Nanosystèmes (LN2)- CNRS UMI-3463, Institut Interdisciplinaire d'Innovation Technologique (3IT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Date de soumission : 25 mars 2019

État de l'acceptation : version soumise pour révision

Revue : Biosensors and Bioelectronics

Référence : Banville, F. A., Moreau, J., Chabot, K., Cattoni, A., Fröelich, U., Bryche, J.-F., Collin, S., Charette, P. G., Grandbois, M. et Canva, M. (2019). Nanoplasmonics-enhanced label-free imaging of endothelial cell monolayer integrity. Biosensors and Bioelectronics.

Titre français : Imagerie sans marquage de l'intégrité de monocouches endothéliales améliorée par des structures nanoplasmoniques.

Contribution au manuscrit :

Dans cet article, nous présentons une première application des puces SPR nanostructurées optimisées pour l'imagerie de cellules vivantes. L'utilisation de ces puces dans l'étude de phénomènes cellulaires a permis de montrer leur potentiel pour les applications pharmacologiques. En effet, la haute résolution spatiale des puces nanostructurées permet d'identifier et de quantifier des changements morphologiques survenant dans une population confluente de cellules.

Originalité des travaux :

Dans cette publication, nous montrons que l'amélioration de la résolution spatiale offerte par la nanostructuration de surface permet d'augmenter significativement la définition des contours de cellules individuelles. Les performances des puces SPR nanostructurées ont été validées dans le suivi de variations d'intégrité d'une monocouche de cellules endothéliales stimulées par la thrombine en observant l'apparition de trous intercellulaires et en quantifiant le nombre et leur dimension. Les résultats expérimentaux ont montré une augmentation de la sensibilité à l'activité cellulaire due à l'amélioration de la résolution spatiale par la nanostructuration de surface.

Contributions respectives des auteurs :

J'ai effectué les mesures en imagerie SPR, traité les résultats expérimentaux et participé à la fabrication des échantillons nanostructurés avec Andrea Cattoni. Kevin Chabot a participé aux expériences cellulaires et Jean-François Bryche à la caractérisation des puces nanostructurées. Ulrike Fröelich s'est occupée de la culture cellulaire. Les professeurs Michael Canva, Michel Grandbois, Paul Charette et Stéphane Collin, ainsi que mon encadrant Julien Moreau ont supervisé la direction des travaux. La version finale du manuscrit a été approuvée par tous les auteurs avant la soumission pour publication.

Résumé français :

L'imagerie par résonance de plasmons de surface (SPRI) est une méthode d'imagerie sans marquage puissante pour l'analyse de changements morphologiques dynamiques dans des monocouches cellulaires. Cependant, les systèmes d'imagerie plasmoniques classiques ont une résolution spatiale relativement faible le long d'un axe en raison de la longueur d'atténuation du mode plasmonique (typiquement de plusieurs dizaines de micromètres), ce qui limite considérablement leur capacité à observer des structures subcellulaires. Nous nous affranchissons de cette limitation en ajoutant un réseau de nanostructures à la surface du métal (réseau de 25 nm d'épaisseur, 200 nm de largeur, période de 400 nm) afin de coupler les plasmons localisés à des plasmons propagatifs, réduisant ainsi la longueur d'atténuation et augmentant proportionnellement la résolution spatiale, sans pertes significatives de la sensibilité ou du contraste des images. Dans ce travail, les résultats expérimentaux obtenus avec des puces

SPRI classiques (non structurées) et nanostructurées montrent un net gain en résolution spatiale grâce à la nanostructuration de surface. Le travail démontre la capacité des puces SPRI nanostructurées à résoudre des détails morphologiques fins (trous intercellulaires) dans des expériences de suivi de l'intégrité de monocouches cellulaires endothéliales à la suite de l'activation du récepteur PAR1 par la thrombine. De plus, les puces nanostructurées ont montré la présence de petits trous intercellulaire (< 5 μm^2) bien après la récupération apparente de l'intégrité de la monocouche de cellules détectée par une surface classique non structurée. Cette nouvelle modalité d'imagerie plasmonique à haute résolution spatiale utilise des substrats structurés peu couteux et réutilisables. Elle trouvera probablement des applications en biologie cellulaire et en pharmacologie en permettant une quantification sans marquage des activités morphologiques des cellules associées à la signalisation intracellulaire dépendante de récepteurs.

Résumé anglais:

Surface plasmon resonance imaging (SPRI) is a powerful label-free imaging modality for the analysis of morphological dynamics in cell monolayers. However, classical plasmonic imaging systems have relatively poor spatial resolution along one axis due to the plasmon mode attenuation distance (tens of μm, typically), which significantly limits their ability to resolve subcellular structures. We address this limitation by adding an array of nanostructures onto the metal sensing surface (25 nm thick, 200 nm width, 400 nm period grating) to couple localized plasmons with propagating plasmons, thereby reducing attenuation length and commensurately increasing spatial imaging resolution, without significant loss of sensitivity or image contrast. In this work, experimental results obtained with both conventional unstructured and nanostructured gold film SPRI sensor chips show a clear gain in spatial resolution achieved with surface nanostructuring. The work demonstrates the ability of the nanostructured SPRI chips to resolve fine morphological detail (intercellular gaps) in experiments monitoring changes in endothelial cell monolayer integrity following the activation of the cell surface protease-activated receptor 1 (PAR1) by thrombin. In particular, the nanostructured chips reveal the persistence of small intercellular gaps (<5 μm^2) well after apparent recovery of cell monolayer integrity as determined by conventional unstructured surface based SPRI. This new high spatial resolution plasmonic imaging technique uses low-cost and reusable patterned substrates and is

likely to find applications in cell biology and pharmacology by allowing label-free quantification of minute cell morphological activities associated with receptor dependent intracellular signaling activity.

5.2 Article

5.2.1 Introduction

Investigating the interactions and responses of eukaryotic cells to external stimuli such as toxins, pathogens and hormones is instrumental in cell biology and for the development of new drugs. Cells have a large number of membrane-bound receptors that are essential to their metabolisms and functional activities. In particular, G-protein-coupled receptors (GPCRs), such as the PAR1 receptor of thrombin, compose the largest family of such receptors. The screening and monitoring of GPCRs signaling in cell-based assays have shown tremendous potential in the drug discovery process [Fang *et al.*, 2008; Scott et Peters, 2010].

In recent years, the development and validation of biosensors modalities exploiting whole live cells as sensing elements have proven to be efficient methods for the analysis of receptor-dependent signaling activity. Most commonly used techniques employ fluorescent probes to specifically mark structures and molecular targets, as it is the case for total internal reflection fluorescence (TIRF) and surface plasmon enhanced fluorescence (SPEF) [Chabot *et al.*, 2013; Goedhart et Gadella, 2009; He *et al.*, 2009; Liebermann et Knoll, 2000; Ni *et al.*, 2018]. However, while being highly specific techniques, the use of labelling may impact the cells [Progatzky *et al.*, 2013], which is not the case for non-invasive label-free methods [Bourassa *et al.*, 2015; Bousse, 1996; Chabot *et al.*, 2009; Fang, 2011; Pancrazio *et al.*, 1999]. Cell activity has been successfully monitored using several label-free biosensing methods, in particular by electrochemical impedance spectroscopy [Giaever et Keese, 1993; McGuiness, 2007], resonant Waveguide Grating [Fang *et al.*, 2006; Ferrie *et al.*, 2010], surface plasmon resonance [Chabot *et al.*, 2009, 2012, 2013; Giebel *et al.*, 1999; Maltais *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2009; Wang, Wang, *et al.*, 2012] and metal-clad waveguides [Söllradl, Banville, *et al.*, 2018; Söllradl, Chabot, *et al.*, 2018; Söllradl *et al.*, 2017]. Evanescent-field based methods such as surface plasmon resonance (SPR) and metal-clad waveguides (MCWG) are highly sensitive to small variations in refractive index at the sensor surface (hundred of nanometers). This selectivity in volume can be especially useful when studying cell-substrate interactions such as cell adhesion to the surface [Howe *et al.*, 2019; Kreysing *et al.*, 2018; Peterson *et al.*, 2018; Son, Seo, *et al.*, 2017; Toma *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2012] and changes in a cell monolayer integrity [Cuerrier *et al.*, 2008; Söllradl, Banville, *et al.*, 2018].

SPR imaging (SPRI) has been used to spatially resolve individual cells and subcellular structures [Peterson *et al.*, 2014]. However, SPRI is limited in spatial resolution due to the mode attenuation distance, which results in a directional blur in acquired images that was described by analytical models [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996]. Various approaches have been proposed to address this issue, but carry losses in sensitivity, temporal resolution or image contrast [Banville *et al.*, 2015; Berguiga *et al.*, 2016; de Bruijn *et al.*, 1993; Giebel *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2007; Somekh *et al.*, 2000b; Wei *et al.*, 2015]. In previous works, we showed that nanostructured metal films are well suited for high resolution SPRI as they support a "hybrid" plasmonic mode, which is the result of a strong coupling between propagating (SPP) and localized (LSP) modes [Sarkar, Besbes, *et al.*, 2015]. This hybrid mode benefits from a reduction in mode attenuation distance due to the localized mode properties. In a previous manuscript by our group [Banville *et al.*, 2018], we demonstrated that the nanostructured film geometry can be designed in such a way as to improve spatial resolution while mitigating imaging performance losses. We showed that a trade-off between the attenuation length and the sensitivity is required, while maintaining a high image contrast. The numerical analysis of the nanostructured film geometry confirmed that the improvements in spatial resolution derives from the decrease in the uniform gold film thickness, while the high contrast is rather associated to the presence of the nanostructures. In this previous work, we have identified an optimal nanostructured film geometry (grating of 25 nm thick, 200 nm width and 400 nm period on a 25 nm Au film) that was applied to the design of our nanostructured chips proposed in the current manuscript. The performances were compared to those of "conventional" SPR sensor chips (50 nm continuous Au film), and experimental results showed a significant decrease in attenuation length while maintaining high image contrast in SPR imaging, where features as small as 1 micron wide could be resolved in all dimensions.

Quantitative high spatial resolution imaging is of particular interest in label-free studies of cell monolayer permeability. Indeed, most commonly used techniques employ fluorescent markers to spatially track intercellular gap formation and associated changes in cell monolayer integrity. Earlier published work from our group based on MCWG imaging showed that intercellular gaps in endothelial cell monolayers can be resolved in a label-free manner [Söllradl, Banville, *et al.*,

2018]. However, only "large" gaps (radius > 4 µm) were resolved as the spatial resolution limit of the MCWG system was 5 µm and smaller gaps could not be resolved.

In this study, we used nanostructured metal surfaces as a method to increase spatial resolution in SPRI and thus to improve the performance of this imaging modality to quantify morphological changes in an endothelial cell layer exposed to permeability enhancing agents. We fabricated the nanostructured metal surfaces by low-cost and large surface area Soft Nanoimprint lithography and we showed multiple reuse of the same substrate without degradation of its functionality. We demonstrated that surface nanostructuring, by enhancing spatial resolution in SPRI, also enhances measurement sensitivity of cell activity by improving detection of reversible intercellular gap formation in the cell layer.

5.2.2 Material and methods

5.2.2.1 Sensor chip design

The imaging system setup presented in Figure 5.1A is based on a high numerical aperture microscope objective and has previously been described [Söllradl *et al.*, 2017]. The excitation light (LED filtered at 830 nm, FWHM of 10 nm) is focused on the back focal plane of the objective (NA = 1.46), reflected by the sensor chip placed atop the objective, and imaged by a CMOS camera. The light incident on the sensor chip is collimated and the incidence angle is chosen for maximum mode coupling by moving the focal point in the back focal plane of the objective with the motorized stage along y-z axes.

The sensor chip metal surface nanostructure geometry (Figure 5.1B) was designed numerically as explained elsewhere [Banville *et al.*, 2018] to achieve the optimal compromise between spatial resolution limited by the mode attenuation length, image contrast and sensitivity. The chips are composed of a BK7 glass cover slip (170 µm thick, 22×22 mm, Fisher Scientific), a 3 nm Cr adhesion layer, a 25 nm continuous Au film (h_1), 25 nm thick (h_2) square Au nanostructures (width w of 200 nm, grating period Λ of 400 nm). They were fabricated by lift-off of gold using soft UV nanoimprint lithography (soft UV-NIL) over a surface area of 1 cm^2. This technique uses cheap and flexible polydimethylsiloxane (PDMS) based stamps (hard-PDMS/PDMS) replicated from a Si master fabricated by electron beam lithography and dry

etching. Since the PDMS based stamp can be used tens of time, this technology offers fast large-scale patterning at low cost compared to electron beam lithography [Cattoni, Chen, *et al.*, 2011; Cattoni, Ghenuche, *et al.*, 2011]. Figure 5.1C shows SEM images of a nanostructured chip fabricated with high resolution on a large scale (grating surface of 1 cm^2).

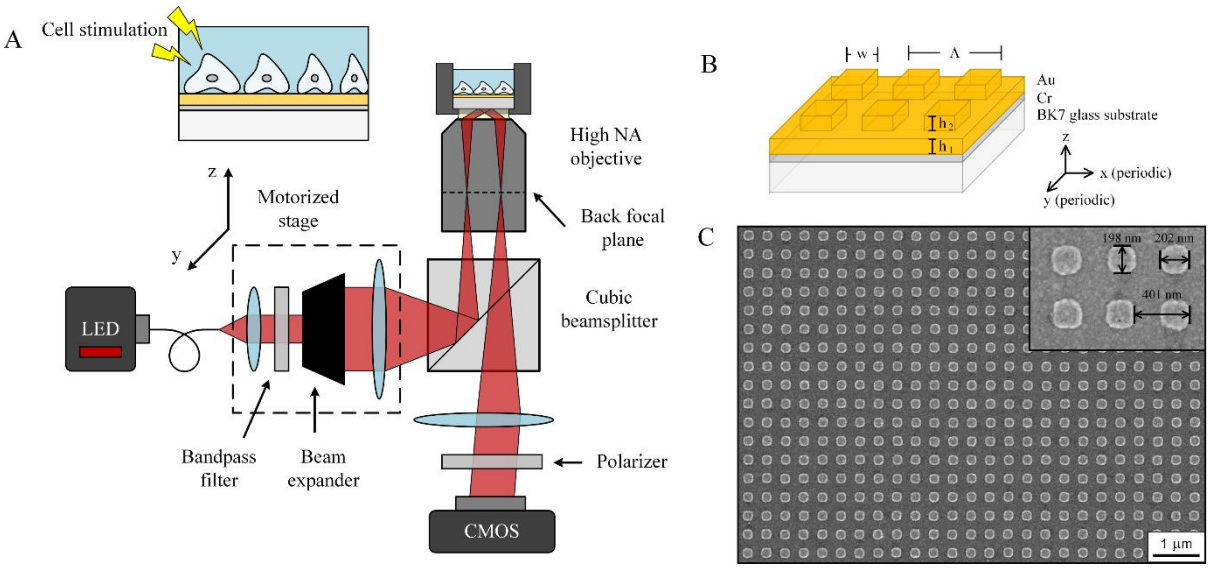


Figure 5.1 – *Nanostructured chips used in live-cell SPR imaging.* A) Schematic of the optical system based on a high numerical aperture microscope objective; B) Schematic of the SPRI chip: BK7 glass substrate – Cr adhesion film (3 nm) – flat or nanostructured Au films. The flat film is composed of a uniform film (height of h_1), while the nanostructured film is composed of a uniform film (height of h_1) and a grating (height of h_2, width of w and period of Λ) periodic along x and y axes; C) SEM image of nanostructured sample fabricated by soft UV-NIL with inset showing high fabrication resolution in terms of structure shape and grating dimensions ($h_1 = h_2 = 25$ nm, $w = 200$ nm, $\Lambda = 400$ nm).

The unstructured sensor chips used for reference had a 50 nm continuous Au layer (BK7 glass cover slip, 3 nm Cr adhesion layer) as most commonly used in SPR biosensing. A layer of cells was grown on the sensor surfaces in a biological medium. As cells are much larger (>10 µm) than the grating dimensions, they completely cover nanostructures. Optical coupling conditions were chosen to obtain a reflectance minimum (maximum coupling to the SPR mode) in areas without cells. This results in cells appearing as bright objects in the SPRI images and areas devoid of cells appearing as dark regions as can be seen in Figure 5.2. The round oscillatory patterns visible in SPRI images do not correspond to biological structures at the metal surface, but rather to coherence artifacts due to dust particles in the optical path. All SPRI images in this work are presented with the same grayscale range.

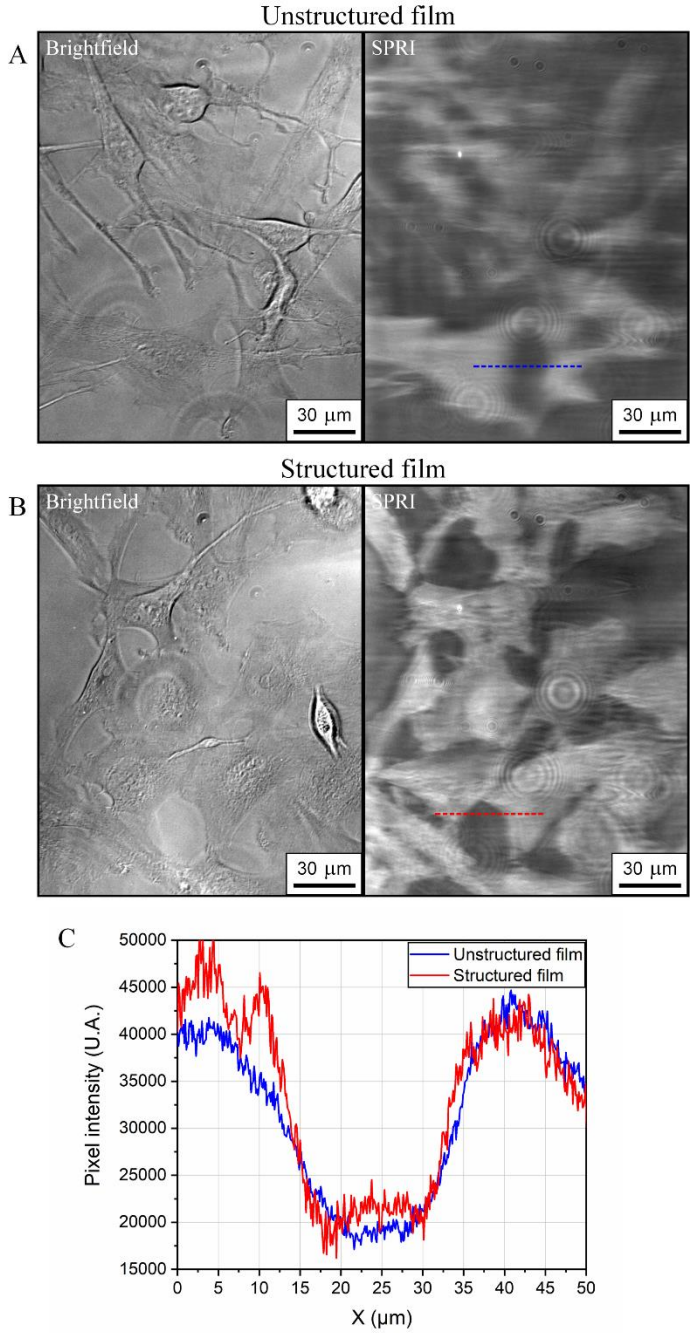


Figure 5.2 – *Surface nanostructuring impact on SPR cell imaging.* A) Brightfield and reflectance images (λ = 830 nm) of glioblastoma cells (U-373 GM) atop an unstructured gold film (50 nm); B) Brightfield and reflectance images of glioblastoma cells atop the nanostructured gold film (25 nm continuous film, 25 nm thick nanostructures, width of 200 nm, grating period of 400 nm); C) Line profiles of SPRI images showing better resolved cell edges for the structured film.

Figure 5.2 shows glioblastoma cells (U-373 GM) imaged with brightfield along with unstructured and nanostructured surface SPRI chips. Cells imaged on the structured film (B) are better resolved than on the unstructured film (A), while maintaining a high image contrast as

shown in (C). In a previous work [Banville *et al.*, 2018], we showed by numerical modeling and confirmed experimentally that the attenuation length for a 50 nm unstructured Au film is ~11 µm and ~1.7 µm for the proposed nanostructured film. This reduction in attenuation length improves the spatial resolution, which results in gaps between cells and cell edges being more defined on the nanostructured sensor chip, the plasmonic mode allowing to isolate the structural parts in the immediate vicinity (~100 nm) of the surface.

5.2.2.2 Cell culture and reagents

Two cell types were used: glioblastoma cell line U-373 GM (ATCC, Manassas, USA) and an immortalized endothelial cell line EA.hy 926 (kindly provided by Dr. CJ Edgell, University of North Carolina, USA). The two cell types served respectively to qualitatively and to quantitatively investigate the impact of surface nanostructuring on cell activity studies through improved spatial resolution. Cells were maintained in EME (U-373 GM) or DMEM (EA.hy 926) supplemented with 10% temperature inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 g/ml streptomycin at 37 °C in a 5% CO_2 incubator on 100 mm diameter tissue culture Petri dishes (Corning) and were sub-cultured upon reaching 70–80% confluence using Trypsin/EDTA (0.25%), within approximately three days.

Both types of sensor chips (unstructured and nanostructured surfaces) were seeded with ~1.5 x 10^5 cells (U-373 GM) or ~2.5 x 10^5 cells (EA.hy 926) directly atop the uncoated ethanol-sterilized Au film. U-373 GM were grown to ~50 % confluence in two days, while EA.hy 926 were grown to full confluence within seven days. The presence of a nanoscale surface grating was not found to affect the growth rate nor the morphology of the cells.

Prior to the experiments, the sensor chips were washed twice in HEPES-Buffered Salt Solution (HBSS) heated at 37 °C, then mounted in our custom sample holder, maintained at 37 °C (TC1-100, Bioscience Tools). Cells were kept in the HBSS buffer solution for an hour to stabilize on the imaging system prior to measurements. An optimal plasmon coupling angle was identified by scanning angularly the incident light for maximal image contrast between the cell layer and the surrounding areas devoid of cells. This coupling angle was kept fixed throughout the image sequence acquisition.

LPS stimulation (Sigma-Aldrich, 0.5 mg/ml solution) was used for the estimation of the threshold for intercellular gap detection, described in the following section, while thrombin was used to disrupt reversibly the monolayer (Sigma-Aldrich, 5 and 10 nM solutions), thus mimicking biological conditions of modulation in cell monolayer permeability. The sensor chips were cleaned with soap, distilled water, ethanol and dried with N_2 at the end of each experiments. The nanostructured chips were reused multiple times (over 50 times each) in the course of our studies, for static observation of individual cells and dynamic monitoring of cell activity in confluent cell populations, without significant performance deterioration. To qualify this stability, we have checked that the incident light angle for maximum plasmonic coupling did not significantly drift during the several months of experiments, which would have been evident if any degradation of the nanostructured metal surface had occurred. Their low-cost and reusability validate their reliability and usefulness in practical use (see Figure 5.7 in Appendix A for SEM images of the nanostructured sensor chip prior to initial use and after multiple reuses).

5.2.2.3 Threshold estimation for intercellular gap detection

The SPRI instrument image acquisition parameters were chosen to minimize background noise while maximizing pixel intensity dynamic range. SPRI images were generated at 10-second intervals by averaging three successive CMOS camera images, low-pass filtered for high-frequency noise reduction and normalized by subtracting a dark reference acquired at the beginning. The endothelial cell monolayer integrity disruption following stimulation was characterized by monitoring and analyzing the formation of intercellular gaps in the monolayer. To do so, the image pixels were segmented into two populations corresponding to the presence or absence of cells using an intensity-based thresholding algorithm [Otsu, 1979]. The thresholding process was found to be robust owing to the high contrast in the SPRI images between cellular regions and intercellular gaps, allowing the characterizing of intercellular gap size distribution in any given image. The segmentation threshold pixel intensity values were determined from calibration experiments by stimulating a confluent layer of EA.hy 926 cells with the cytotoxin LPS. In those experiments, the LPS stimulation lead to irreversible loss in the monolayer integrity, as can be seen in Figure 5.3A (0 min and 100 min). These experiments allowed the acquisition of sequences of intensity distribution histograms spanning the range

from full cell confluence to complete cell monolayer detachment. This shift between both populations was necessary to identify the intensity threshold defining them, which could not be accurately obtained in the thrombin experiment, which exhibit a partial and reversible cell layer response. Those threshold values were applied to all experiments (one for each sensor chip type, unstructured and nanostructured) by conserving the acquisition parameters and sensor chip geometries.

Three images from a sequence acquired during a typical calibration experiment on nanostructured film are shown in Figure 5.3A (T = 0 min, 57 min, 100 min) with their associated histograms (Figure 5.3B). The two threshold values were calculated from the image in each of the two corresponding calibration sequences where the cell surface coverage was approximately 50%. Pixel intensity histograms for such images had a wide distribution (large full-width at half maximum, FWHM) with a relatively low pixel count at maximum (dotted curve in Figure 5.3B), compared to the histograms for images of full confluence (plain curve in Figure 5.3B) and full detachment (dashed curve in Figure 5.3B). Figure 5.3C presents the evolution over time of the image histogram maximum values (blue curve) and of the image histogram FWHM (red curve). The two 50% confluence images were selected automatically from the calibration data shown in Figure 5.3C at the point where the histogram FWHM was largest and pixel count at maximum simultaneously lowest (dashed black line). The intensity-based thresholding algorithm was then applied to those images resulting in pixel intensity thresholds (dashed green vertical line in Figure 5.3B) for the nanostructured and unstructured films respectively of 29568 and 30208 (see Figure 5.8 in Appendix A for the unstructured film pixel intensity threshold evaluation).

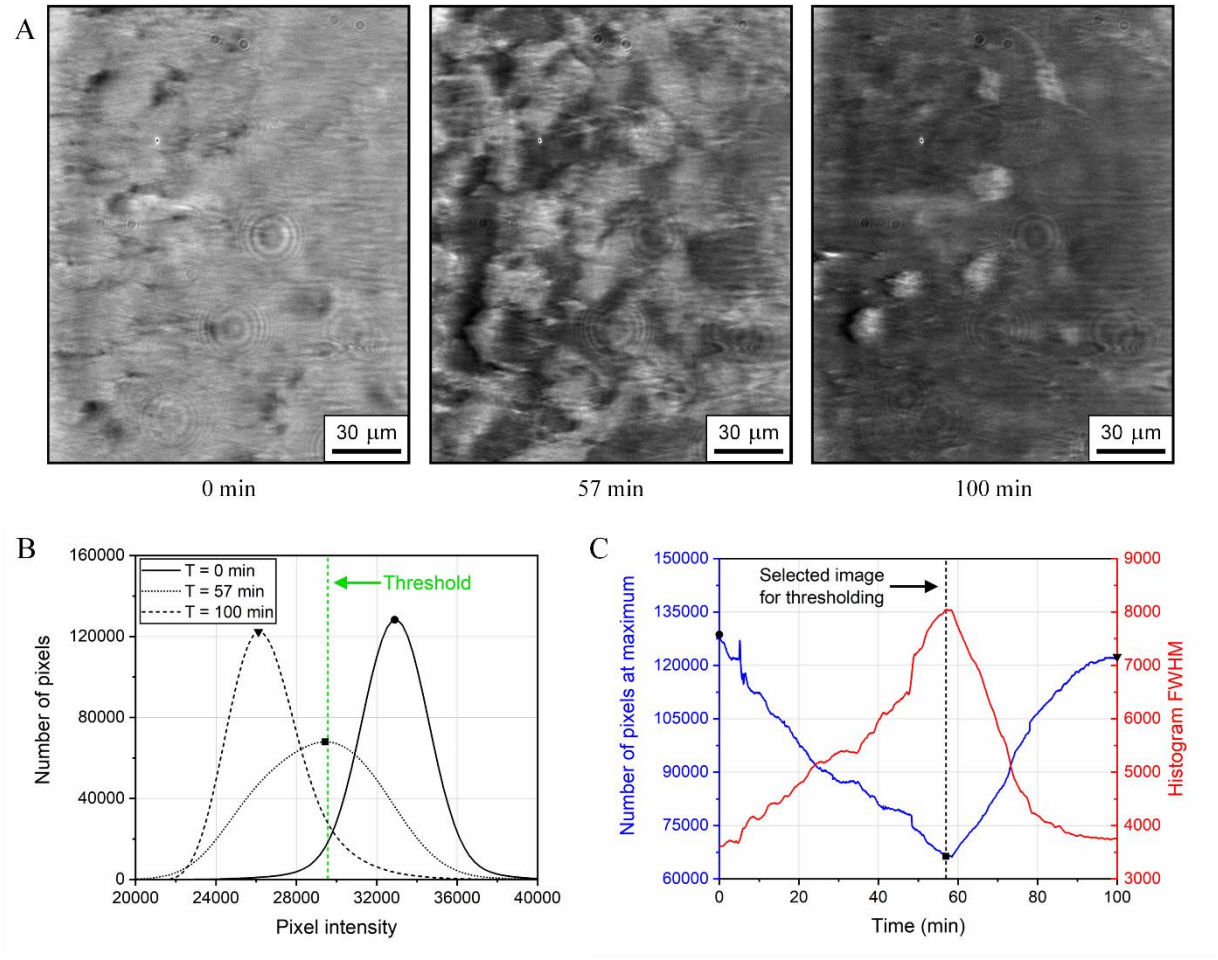


Figure 5.3 – *Threshold identification for intercellular gap detection: nanostructured metal films.* A) SPRI images (λ = 830 nm) of EA.hy 926 endothelial cells on a nanostructured Au film where the monolayer integrity is disrupted following LPS stimulation. At 0 min, the cell monolayer confluence is close to 100%. At 100 min, virtually no cells are visible on the sensor surface; B) Histograms of pixel intensity of three SPRI images taken at different times (0, 57 and 100 min). The green dashed line corresponds to the pixel intensity threshold calculated by automatic clustering-based thresholding from the image at 57 min; C) Evolution over time of histogram maximum value (blue) and FWHM (red). The image selected for the automatic clustering-based thresholding corresponds to the image where the FWHM is highest and the histogram maximum is lowest (black dashed line). The markers in (B) and (C) correspond to the maximum values in the pixel histograms at T = 0 min (circle), T = 57 min (square) and T = 100 min (triangle).

Thereafter, the sizes of the gaps in the endothelium cell layer were quantified by using connected-component labeling with the following sequence:

1) Gaussian-filtering to remove high-frequency noise (3×3 kernel) by using the OpenCV Python function *GaussianBlur()*.
2) Image binarization by automatic clustering-based thresholding using the OpenCV Python function *threshold()*.

3) Connected-component labeling using the scikit-image Python package functions: *label()* to connect regions in the binary images, *regionprops()* to measure the properties of the labeled image regions.
4) Statistical analysis of regions area.

Gap areas under 1 μm^2 were found to be highly dependent on image noise and were not considered in the statistical analyses. For visualization purposes, as shown for example in Figure 5.4 below, gap contours were highlighted (yellow) in the images using the morphological transformation "gradient" with the Python function *morphologyEx()*.

5.2.3 Results and discussion

5.2.3.1 Monitoring of cell response in confluent endothelial cell monolayers

To demonstrate the potential of nanostructured SPRI chips in cell studies, EA.hy 926 endothelial cells were grown to confluence and stimulated with thrombin. Cell responses following protease-activated receptor 1 (PAR1) activation by thrombin have been studied for its role in haemostasis and inflammation mechanisms [Coughlin, 2000]. Thrombin binds with the cell protease-activated receptor 1 (PAR1), activates intracellular signaling cascades which induces endothelial cell contraction, cell-cell molecular junction disassembly and the modulation of cell attachment onto the substrate [Opal et van der Poll, 2015]. These events are associated to transient and reversible gap formation in the endothelial cell layer. Figure 5.4A-B present the time sequence of SPRI images acquired during endothelial cell layer integrity disruption following thrombin stimulation (10 nM). The intercellular gaps (dark zones selected as described in previous section) are outlined in yellow to facilitate visualization. Negative controls were performed prior to stimulation by injecting HBBS buffer solution and did not result in observable cell response. As shown in the image sequence, intercellular gaps become apparent at 8 min. Afterwards, the endothelial cells gradually recover to return to a quasi-confluent monolayer.

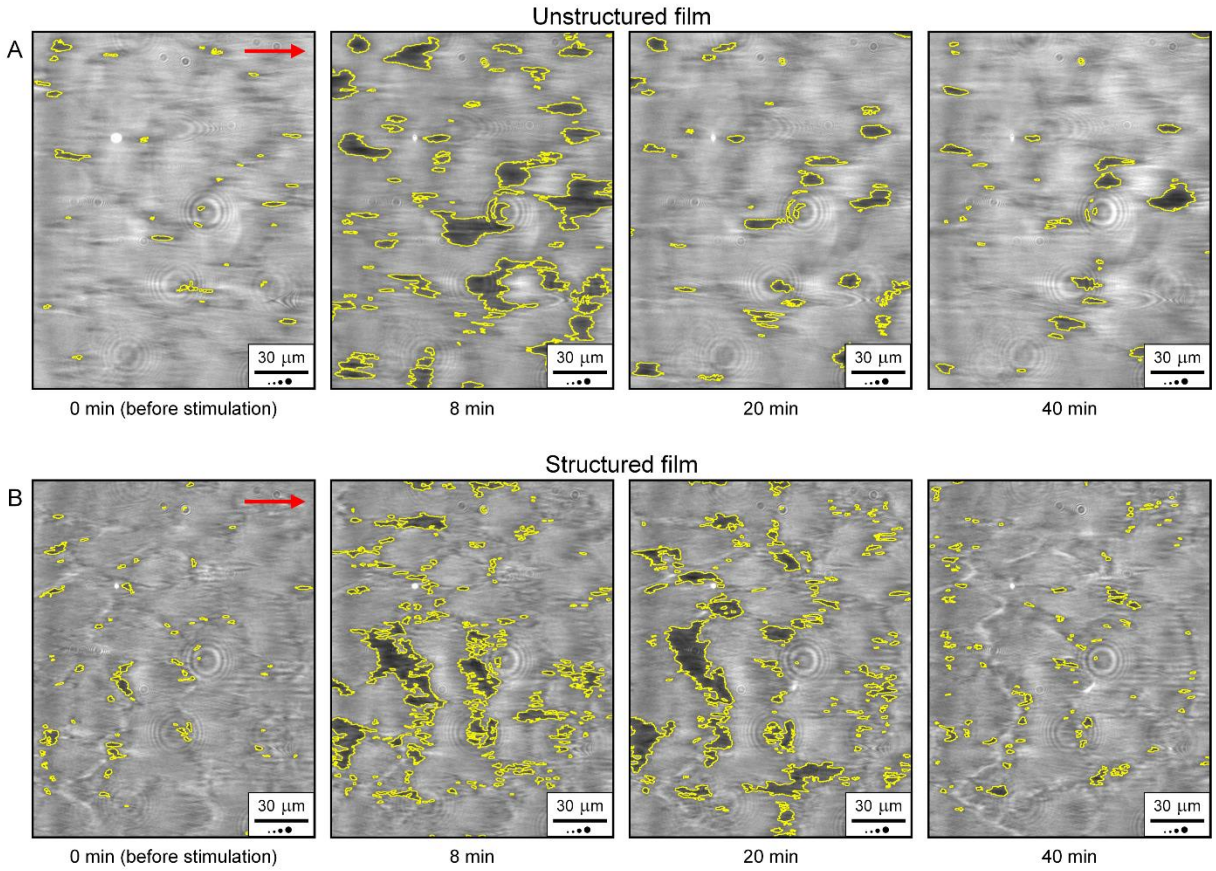


Figure 5.4 – *Endothelial cell layer activation by thrombin: gap formation monitoring.* Reflectance images (λ = 830 nm) of EA.hy 926 endothelial cells on unstructured (A) and structured (B) Au films before and after cell layer activation by thrombin stimulation (concentration of 10 nM). The images show the evolution of intercellular gaps outlined in yellow that appear after stimulation and gradually disappear until cell layer integrity is recovered. The direction of plasmon mode propagation is from left to right (red arrows). The nanostructured film images show a higher spatial resolution resulting in improved gap morphology measurement throughout the experiment. The circles in the legend represent equivalent gap pixel areas of 1, 2, 5 and 10 µm^2, respectively.

In the images, a larger number of small gaps are visible on the nanostructured film, while mainly fewer large gaps are seen on the unstructured film. This phenomenon is most likely a consequence of the lower spatial resolution when using an unstructured film where small gaps are either unobservable or combined with other gaps due to the blur in SPRI images in the direction of mode propagation (red arrows, from left to right). In addition, loss of information in gap morphology with the unstructured film is also noticeable by the smoothness of the edges and the preferential orientation of the gaps along the direction of mode propagation.

Two thrombin concentrations (red: 5 nM, black: 10 nM) were used to induce endothelial monolayer response in order to compare the effects on gap formation. The image data were

analyzed in terms of the coverage percentage by the cell layer as a function of time as shown in Figure 5.5. As expected, monolayer integrity is rapidly lost after stimulation and gradually recovers over time to return to a quasi-confluent layer, after 25-30 min (5 nM) and 40-45 min (10 nM).

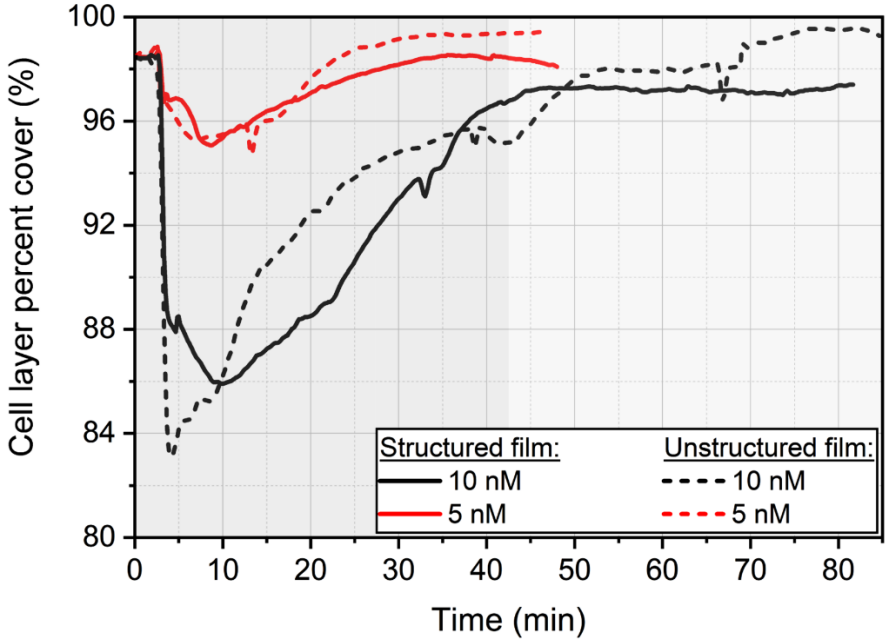


Figure 5.5 – *Endothelial cell layer activation by thrombin: monolayer confluence tracking.* Percent coverage of the endothelial cell layer as a function of time following stimulation with thrombin (black: 10 nM, red: 5 nM). The minimum in monolayer integrity occurs at 2.5 minutes after injection followed by full recovery at 40-45 min (light grey). The curves obtained from unstructured and nanostructured surface show similar response profiles and no observable phenotype changes due to the surface nanostructure are observed.

It has been shown that nanostructures can have a significant impact on cellular phenotype, such as on cell adhesion, morphology, proliferation, migration, alignment, etc. [Skoog *et al.*, 2018]. However, studies have determined that nanostructures with heights inferior to 35 nm have little to no effect on cells and no observable phenotype changes have been recorded in such cases [Dalby *et al.*, 2004; Loesberg *et al.*, 2007]. This is indeed the case for the proposed nanostructured surface, as shown in the brightfield images in Figure 5.2 which shows no obvious impact of surface nanostructuring on the general morphology of cells, or in the time course of the cell response presented in Figure 5.5, which shows similar responses profile for both sensor chip types following thrombin stimulation.

5.2.3.2 Quantification of intercellular gap morphology dynamics in endothelial cell monolayers

The complete sequence of images shown partially in Figure 5.4 was analyzed to quantify gap concentration dynamics as a function of size upon thrombin stimulation for both unstructured and nanostructured sensor chips. The statistics were extracted from the data collected and quantified via the connected-component labeling process previously described. Figure 5.6A-D show the total number of intercellular gaps in the images for both sensor chip types in four size ranges over time: 1 to 2 μm^2, 2 to 5 μm^2, 5 to 10 μm^2 and over 10 μm^2. For example, gap areas in the 1 to 2 μm^2 category correspond to zones having between 69 and 139 pixels, when considering an individual pixel surface area of 0.0144 μm^2 (0.120 µm x 0.120 µm). Gap areas under 1 μm^2 were not considered in the analyses as their labeling was assumed to be sensitive to image noise. As shown by the black line plots for the nanostructured film in Figure 5.6A-D, intercellular gap formation is triggered by thrombin stimulation at 2.5 min and gaps rapidly develop until approximately 10 min, after which the endothelial cells start to recover. The number of gaps then decreases as the layer gradually returns to a quasi-confluent monolayer (light grey region) and there is a significant drop in larger gaps over 5 μm^2 after 40-45 min. The number of smaller gaps (1 to 5 μm^2) is high until around 80 min and then returns to the pre-stimulation baseline levels.

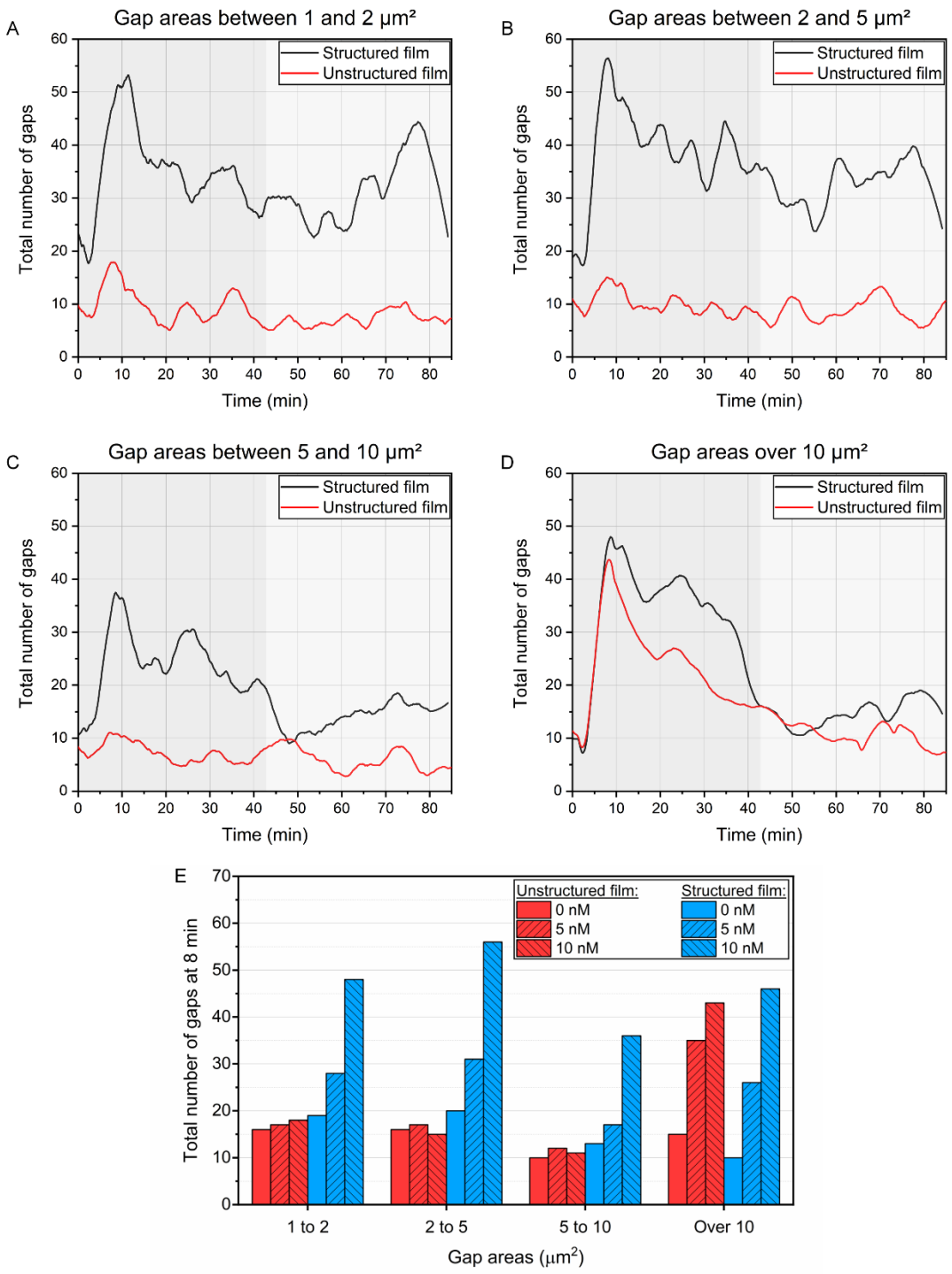


Figure 5.6 – *Quantification of intercellular gap morphology dynamics and effect of thrombin concentration.* Total number of gaps detected over time following 10 nM thrombin injection at 2.5 min with areas between 1 and 2 µm² (A), 2 and 5 µm² (B), 5 and 10 µm² (C) and over 10 µm² (D). Gaps with areas under 10 µm² are detected in greater numbers for the structured film (black) compared to the unstructured film (red); E) Intercellular gaps detected at 8 min for both sensor chip types at two thrombin concentrations (5 nM and 10 nM) and for no thrombin stimulation (0 nM).

As shown in Figure 5.6, the number of detected intercellular gaps under 10 μm^2 is significantly greater for the nanostructured film and the data shows much more variation over time owing to the higher spatial SPRI resolution. Conversely, in the data for the unstructured film, the total number of gaps under 10 μm^2 varies little over time. Interestingly, the nanostructured film data after 40-45 min for gaps below 5 μm^2 shows that the endothelial monolayer integrity takes much longer to recover than would otherwise be determined from the unstructured film data or from Figure 5.5, which may be significant in terms of membrane permeability to small molecules. Indeed, the overall cell coverage dynamics presented in Figure 5.5 are mainly governed by large gaps in the endothelial layer. For example, at the 8 min mark (Figure 5.6E), the total surface of small intercellular gaps for the structured and unstructured films is respectively ~500 μm^2 and ~130 μm^2, while the total surface imaged is ~31000 μm^2. This corresponds to a respective drop in cell coverage of 1.6% and 0.4%, which is significantly smaller than the one registered in Figure 5.5 (12% and 13%). Both analyses should then be viewed as complementary rather than conflicting.

Figure 5.6E quantifies the impact of thrombin concentrations (0 nM, 5 nM and 10 nM) on gap dynamics for the two sensor chip types at the 8 min mark. For the unstructured film, the number of small gaps detected (< 10 μm^2) does not vary with thrombin concentration, and it is only for areas over 10 μm^2 that a significant number of gaps are quantified. This difference in detection is the result of smaller gaps combining into larger gaps due to the blurring effect associated with a longer attenuation length. This further supports the fact that gaps with sizes under that of the mode attenuation length cannot be detected accurately. Conversely, in the case of the nanostructured film, the cell layer response is quantifiable at lower concentration of thrombin stimulation (5 nM), where significant numbers of gaps between 1 and 5 μm^2 are detected. Indeed, to the exception of gaps areas between 5 and 10 μm^2, the number of detected gaps is well above the baseline of 0 nM. Clearly, the ability of the nanostructured sensor chips to detect small gaps (1 to 5 μm^2) confers a strong ability to study cellular dynamics with SPRI such as endothelial cell layer activation by thrombin.

5.2.4 Conclusion

In this work, we demonstrated a novel surface imaging method for monitoring and quantifying cell surface activity by using the case of confluent endothelial cell monolayers. This was achieved by significantly improving the spatial resolution in SPRI systems by way of metal surface nanostructuring while preserving sensitivity and image contrast. Although still dependant on the mode attenuation length, micrographs of live cells obtained with the proposed nanostructured chips were found to have sharper and more defined edges. These nanostructured sensor chips were fabricated by low-cost Soft Nanoimprint lithography over a large surface area (1 cm^2), and were demonstrated to be reusable.

The performances of the proposed sensor chips for cell applications were evaluated by conducting experiments in which endothelial cell monolayers were stimulated with agents known to disrupt cell-cell junctions and cell-substrate adhesions. Specifically, thrombin was used to transiently and reversibly generate gaps in the endothelial layer while monitoring and quantifying their evolution over time. We demonstrated that the detection of intercellular gaps, ranging from 1 to 10 μm^2, is increased several folds throughout experiments when using a nanostructured metal film. This high sensitivity to low micrometer sized gaps detection provided by nanostructured biochip makes them well suited for label-free endothelial cell monolayer studies and should prove very useful for the monitoring of other subcellular features such as cell focal adhesions. Further cell monolayer studies would benefit from exploiting our nanostructured sensor chips in labeled experiments, such as combining SPR and fluorescence imaging, where complementary data could be acquired simultaneously.

5.2.5 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) with Discovery Grants for M.C. and P.G.C. F.A.B. is supported by a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and by a French doctoral contract (MESRI) with the Université Paris-Saclay. LN2 is an international laboratory (Unité Mixte Internationale UMI 3463) jointly managed by French CNRS and the Université de Sherbrooke as well as Université de Lyon (ECL, INSA de Lyon, CPE) and the Université Grenoble Alpes (UGA). LN2 is associated to the French national nanofabrication

network RENATECH and is also financially supported by FRQNT. The C2N work was partially supported by the French RENATECH network.

5.2.6 Appendix A

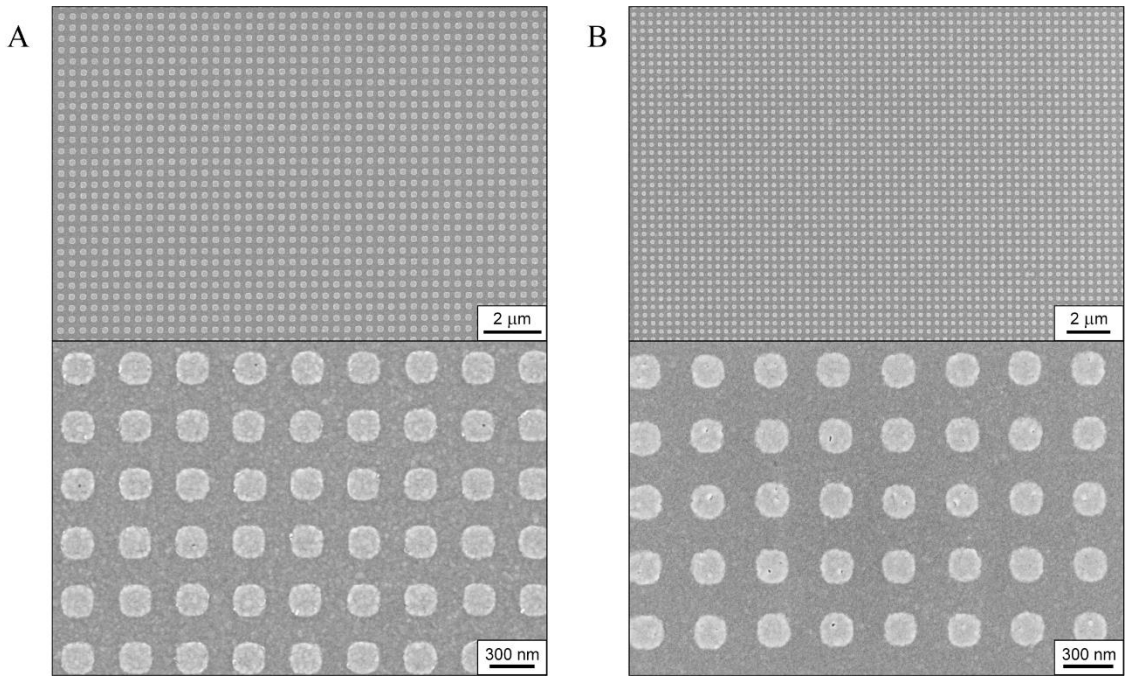


Figure 5.7 – *Nanostructured sensor chip characterization after repeated use.* SEM images of the same sensor chip following fabrication (A, August 2017) and after over 50 reuses (B, March 2019). The integrity of the grating was conserved without evident deterioration, thus validating their reliability and usefulness in practical use.

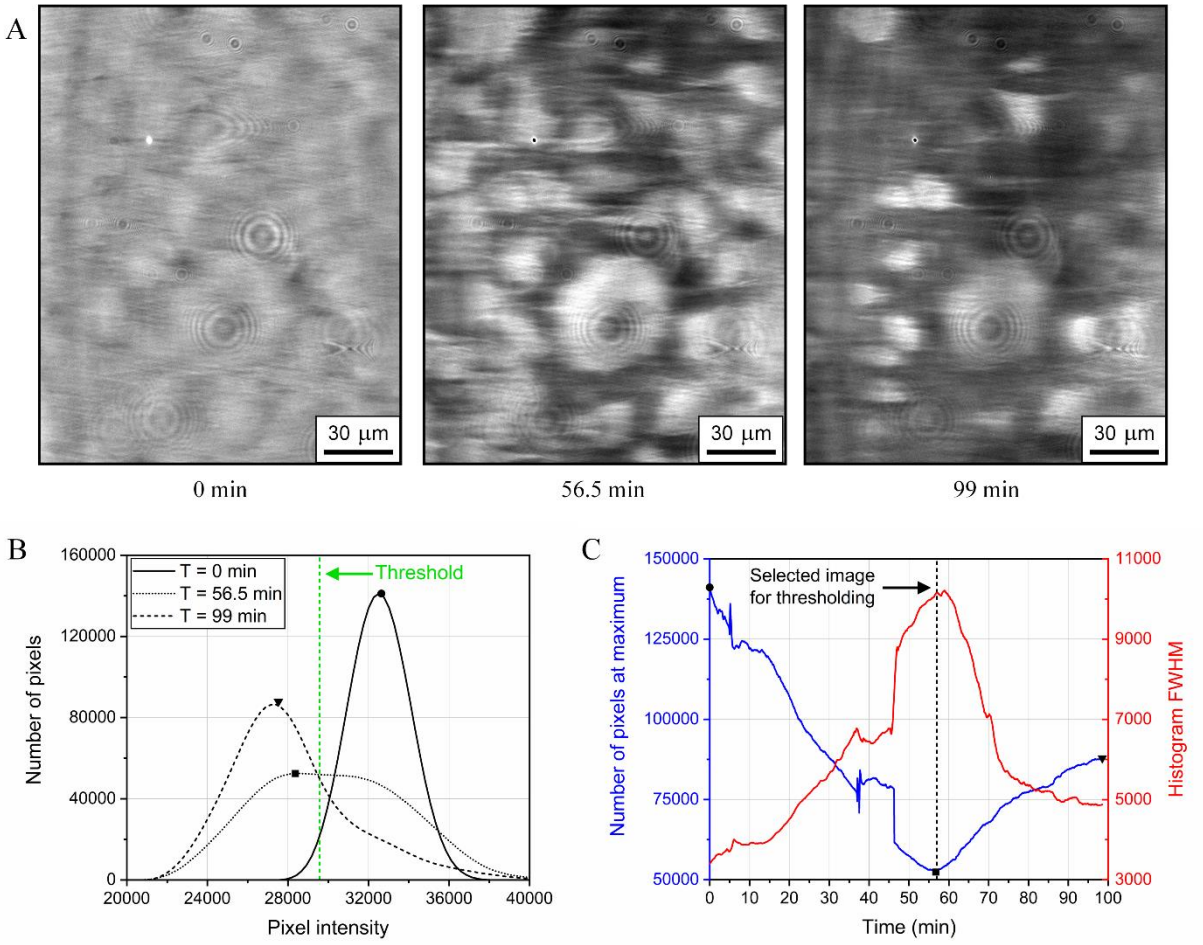


Figure 5.8 – *Threshold identification for intercellular gap detection: unstructured metal films.* A) SPRI images (λ = 830 nm) of EA.hy 926 endothelial cells on an unstructured Au film where the monolayer integrity is disrupted following LPS stimulation. At 0 min, the cell monolayer is close to 100% confluent. At 99 min, virtually no cells are visible on the sensor surface; B) Histograms of pixel intensity of the SPRI images (green dashed line: threshold calculated by automatic clustering-based thresholding); C) Evolution over time of the histogram maximum value (blue) and FWHM (red). The image selected for the automatic clustering-based thresholding corresponds to the image where the FWHM is the highest and the histogram maximum is the lowest (black dashed line). An issue with the camera occurred between 35 and 45 min effectively disrupting the global image intensity, which affected the histogram data, but did not perturb the cell monolayer. The markers in (B) and (C) correspond to the maximum values in the pixel histograms at T = 0 min (circle), T = 57 min (square) and T = 99 min (triangle).

CHAPITRE 6 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES COMPLÉMENTAIRES

Dans cette thèse, des surfaces métalliques nanostructurées ont été proposées afin de résoudre la problématique de la limitation en résolution spatiale observée en imagerie SPR. Le chapitre 4 démontre qu'une optimisation de la géométrie des réseaux métalliques permet de réduire significativement la propagation du mode plasmonique sans affecter les autres paramètres d'imagerie. Des images de haute résolution spatiale au fort contraste y sont présentées. Le chapitre 5 détaille l'application des puces nanostructurées dans l'imagerie sans marquage de cellules vivantes, notamment pour le suivi et la quantification de l'activité cellulaire dans des monocouches de cellules endothéliales confluentes. Il est montré que l'amélioration de la résolution spatiale par la nanostructuration de surface entraîne une plus grande sensibilité à l'activité morphologique des cellules, confirmant ainsi la pertinence des puces nanostructurées pour l'imagerie SPR de haute résolution de cellules vivantes.

Ce chapitre traite de résultats préliminaires obtenus dans le cadre de projets complémentaires montrant le potentiel des puces SPR nanostructurées en imagerie cellulaire. Tout d'abord, l'application des puces nanostructurées dans l'étude du cytosquelette de cellules du muscle lisse est présentée, où la haute résolution offerte par les réseaux optimisés permet d'observer des structures subcellulaires. Finalement, le chapitre traite de l'outil de simulation dont son développement a évolué de manière à modéliser numériquement des réseaux périodiques 2D et à calculer le vecteur d'onde du mode guidé.

6.1 Étude préliminaire du cytosquelette de cellules vivantes

Les puces nanostructurées ont démontré leur potentiel dans l'imagerie sans marquage de cellules vivantes, notamment dans le suivi de l'activité cellulaire d'une population de cellules. Les chapitres 4 et 5 ont montré que les puces nanostructurées permettent d'imager des structures de l'ordre du micromètre, et peuvent ainsi être appliquées dans l'imagerie de structures subcellulaires de cellules individuelles. Cette section présente une étude préliminaire du cytosquelette de cellules du muscle lisse de l'aorte de rat (A7r5). Ces cellules sont caractérisées

par une forte linéarité des fibres d'actine composant son cytosquelette. Celles-ci ont des dimensions inférieures au micromètre et sont difficilement identifiables sans l'utilisation de marqueurs spécifiques. En effet, les fibres d'actine ont beaucoup été étudiées en fluorescence, mais très peu en imagerie sans marquage [Bretscher, 1985; Gu *et al.*, 2007; Kaverina, 2003; Kim *et al.*, 2011; Wang, Wang, *et al.*, 2012]. La Figure 6.1 présente des images en champ clair et en SPRI de plusieurs cellules A7r5 adhérées aux puces nanostructurées. La forte organisation du cytosquelette des cellules est identifiable dans l'image en champ clair et est renforcée par l'orientation des structures subcellulaires observées en SPRI (Figure 6.1b).

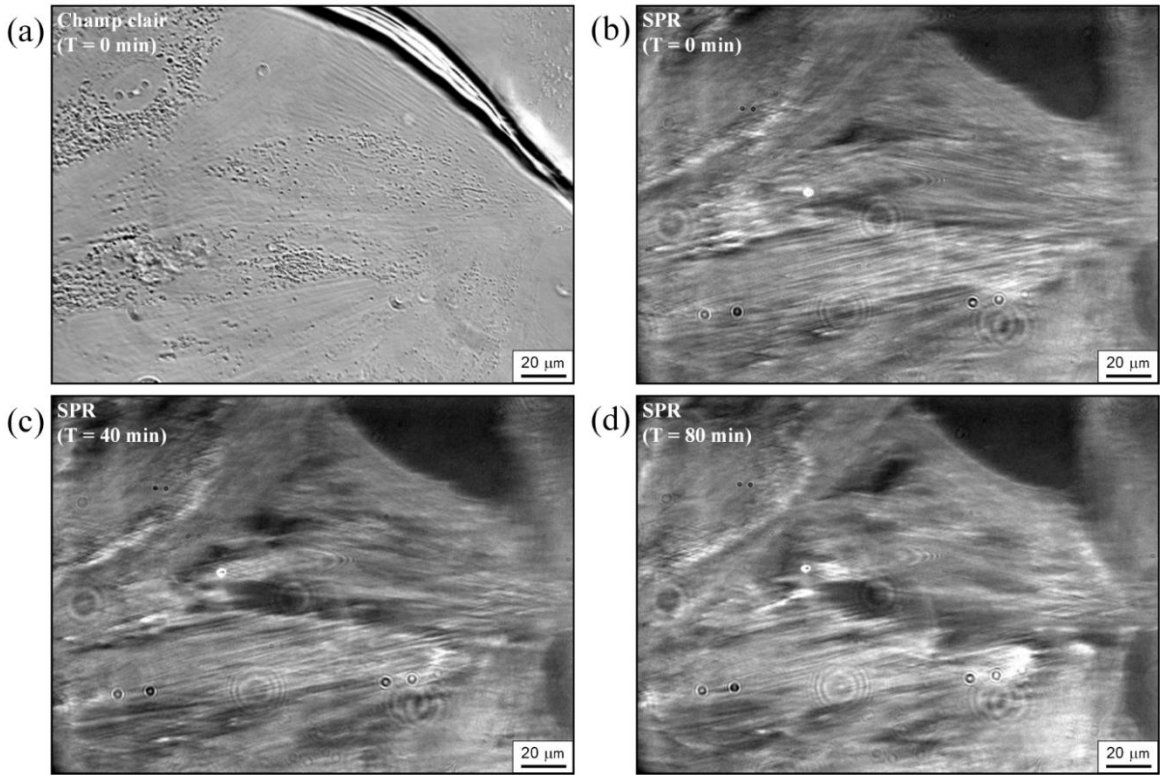


Figure 6.1 – Images en champ clair (a) et en SPRI (b-d) de cellules du muscle lisse (A7r5). a) Les cellules sont fortement adhérées à la surface et montrent une organisation distincte dans leur orientation. b-c) La réorganisation du cytosquelette des cellules est provoquée après stimulation de PMA.

Dans cette expérience, un agent stimulant a été injecté (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) afin de provoquer une réorganisation du cytosquelette. Après stimulation par PMA, les fibres d'actine se contractent et se réorganisent de manière à induire une motilité dans la cellule. Cette contraction est visible entre l'image (b) et (c) avec l'apparition de zones sombres entre les cellules. De plus, l'apparition de régions au signal SPR intense dans la Figure 6.1(d) pourrait correspondre à la formation de structures denses en actine périphérique dans les cellules

stimulées [Fultz *et al.*, 2000]. Toutefois, il serait nécessaire de procéder à des expériences où l'actine des cellules A7r5 est marquée, afin de confirmer que ces structures correspondent à des fibres d'actines.

Enfin, pour mettre en évidence les limites de ces puces SPR nanostructurées, nous avons comparé l'observation des fibres d'actine sur films uniformes et sur surfaces nanostructurées, pour deux directions orthogonales d'excitation des plasmons de surface (Figure 6.2).

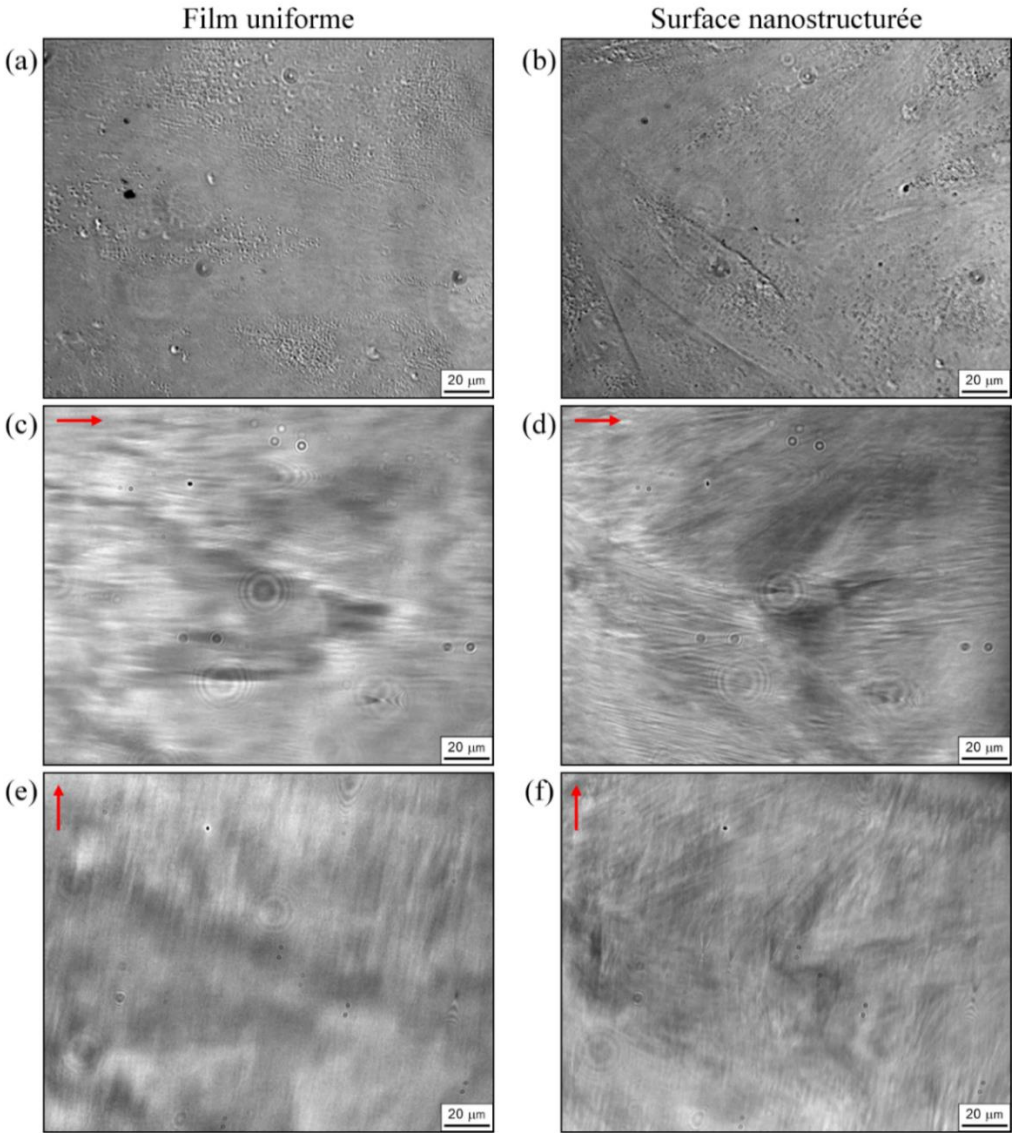


Figure 6.2 – Investigation de l'effet de la propagation du mode plasmonique sur l'information spatiale des structures subcellulaires. Les images en champ clair (a-b) montrent une population dense de cellules A7r5. Les structures subcellulaires sont difficilement identifiables en (c) et (e) à cause de la propagation plasmonique, tandis que la linéarité du cytosquelette des cellules est visible en (d) et (f). Les flèches rouges correspondent à la direction de propagation du mode.

Comme précédemment, la faible résolution spatiale du film uniforme rend difficile l'observation des fibres lorsque les cellules sont fortement confluentes. En effet, la longueur d'atténuation du mode plasmonique est d'environ 11 µm ici et ne permet pas d'identifier les structures subcellulaires, même si celles-ci sont alignées avec la direction de propagation.

Pour les surfaces nanostructurées, bien que certaines structures subcellulaires soient observables dans les deux orientations en même temps, les images (d) et (f) sont significativement différentes. L'impact de la direction de propagation du mode sur l'information spatiale reste donc toujours notable avec cette géométrie de nanostructure. Pour dépasser cette limite, il serait possible de combiner l'information des images SPR à plusieurs directions de propagation [Banville *et al.*, 2015]. Une autre alternative plus prometteuse est de pousser davantage l'optimisation de la géométrie, mais cette fois directement sur un modèle numérique 3D. En effet, la géométrie des réseaux métalliques des puces nanostructurées fabriquées actuellement résulte, pour des questions de temps de calcul, de la modélisation numérique de structures périodiques 1D (réseau de lignes), tel que présenté au chapitre 4. Une optimisation plus adaptée permettrait d'identifier numériquement une structure réduisant davantage le mode plasmonique, et ainsi de s'affranchir des limitations en résolution spatiale observées dans les figures précédentes. En effet, les résultats expérimentaux présentés au chapitre 4 montrent qu'un réseau 2D offre une propagation réduite à celle d'un réseau 1D aux mêmes dimensions. De plus, l'optimisation pourrait être effectuée de manière à réduire la profondeur de pénétration de l'onde évanescente afin de confiner davantage le champ électrique au niveau des nanostructures et minimiser l'information non pertinente aux applications d'intérêt.

6.2 Modélisation de réseaux métalliques périodiques 2D

En plus des structures 1D présentées au chapitre 3, le logiciel de simulation permet la modélisation numérique de structures 2D. Par exemple, des réseaux métalliques de nanocylindres ont été modélisés afin de caractériser le profil du champ électrique autour des nanostructures pour des applications d'exaltation du champ comme le SERS [Sarkar, Besbes, *et al.*, 2015]. Les propriétés optiques peuvent être extraites à partir des résultats de modélisation, notamment la réponse à une onde plane incidente sous forme d'une nappe anglo spectrale. Cependant, la principale limitation de la modélisation numérique de structures 2D vient du fait

que le maillage devient rapidement volumineux plus la précision du calcul augmente. En effet, les ressources disponibles se doivent d'être beaucoup plus grandes pour du calcul 3D que pour du calcul 2D, notamment la mémoire vive de l'ordinateur. Les temps de calcul deviennent également beaucoup plus élevés.

Ainsi, le logiciel de simulation a été adapté pour permettre la modélisation numérique 3D de réseaux périodiques sans perdre en précision de calcul. Pour ce faire, une méthode alternative a été développée pour déterminer le vecteur d'onde à la résonance. En effet, la méthode présentée au chapitre 3 ne permet pas d'identifier le vecteur d'onde en calcul 3D pour des raisons de divergence lors de l'opération de minimisation non linéaire.

Afin d'éviter des problèmes de convergences, ce nouvel algorithme va calculer la réponse de la structure pour un ensemble de vecteurs d'onde d'excitation autour de la valeur optimale à déterminer. Ces vecteurs d'onde étant sous-optimaux, l'amplitude du champ électrique sera plus faible qu'à la résonance. Cet ensemble de vecteurs d'excitation est numériquement sous forme d'une grille composée des composantes réelles et imaginaires. La Figure 6.3 présente une grille typique dans laquelle le vecteur d'onde du mode guidé peut être identifié.

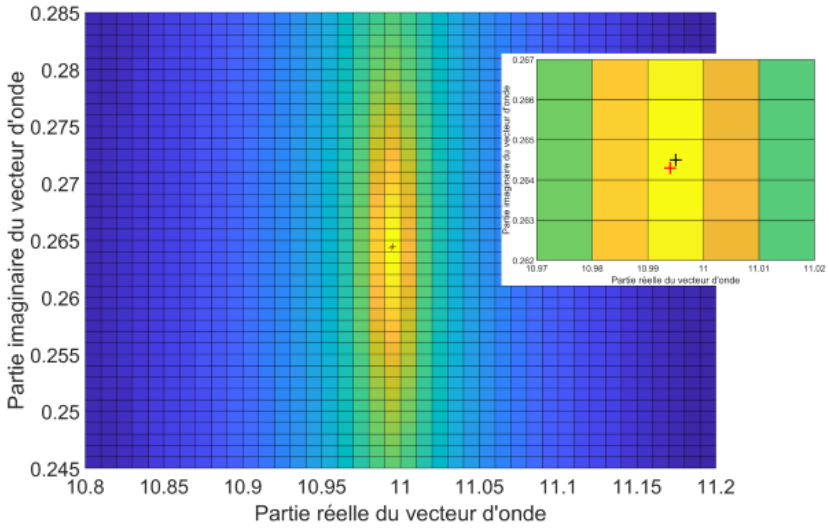


Figure 6.3 – Grille composée de parties réelles et imaginaires du vecteur d'onde permettant de déterminer la valeur du vecteur d'onde pour une structure. Celle-ci est identifiée approximativement (croix noire), puis optimisée pour obtenir la valeur exacte (croix rouge).

Dans cette grille, la maille où le champ électrique est maximal (croix noire) correspond à l'intervalle contenant la solution recherchée (croix rouge) pour le vecteur d'onde. Celle-ci est

trouvée suivant une méthode de recherche de pôles décrite dans les travaux de thèse de Benjamin Vial [Vial, 2013]. La localisation du vecteur d'onde dans la grille est obtenue grâce à l'intégrale de Cauchy suivant les équations :

$$I_k = A_m \omega_m^k \tag{6.1a}$$

$$\omega_p = \frac{I_2}{I_1} = \frac{I_1}{I_0} \tag{6.1b}$$

Dans ces équations, ω_m correspond aux différents vecteurs d'onde de la grille et A_m le champ électrique associé. Trois cas de figure sont possible : 1) 0 pôle (I0 = I1); 2) 1 pôle $\left(\frac{I_2}{I_1} = \frac{I_1}{I_0}\right)$; 3) plusieurs pôles $\left(\frac{I_2}{I_1} \neq \frac{I_1}{I_0}\right)$. Ainsi, la valeur optimale du vecteur d'onde (ω_p) est obtenue en minimisant la différence $\frac{I_2}{I_1} - \frac{I_1}{I_0}$ pour chaque élément de la grille.

Cette méthode a été validée en comparant deux structures périodiques 1D maillées en 2D et 3D, où le maillage en 2D est le même que la face à y = 0 en 3D. Les vecteurs d'onde calculés ainsi sont respectivement de $K_{x,2D}$ = 10.9940 + 0.2643i et $K_{x,3D}$ = 10.9898 + 0.2644i. Il est important de noter le maillage en 2D est nécessairement moins fin que pour des calculs purement 2D, étant donné qu'il est extrait de la représentation 3D. Bien entendu, un maillage plus fin résultera en un calcul du vecteur d'onde plus précis, mais à des temps de calcul beaucoup plus élevés. Il est ainsi important d'utiliser efficacement les ressources disponibles pour avoir un résultat précis rapidement.

Cette méthode pourra être utilisée pour l'optimisation des dimensions des réseaux métalliques périodiques 2D des puces SPR nanostructurées proposées dans cette thèse en fonction des applications biologiques d'intérêt. Par exemple, l'étude des points focaux d'adhésion de cellules vivantes serait renforcée par un réseau métallique offrant une faible profondeur de pénétration de l'onde évanescente, ainsi qu'une faible longueur d'atténuation du mode guidé.

6.3 Résumé

Dans ce chapitre, des projets en cours ont été présentés. L'étude du cytosquelette de cellules du muscle lisse à l'aide des puces nanostructurées a montré qu'il est possible d'identifier des structures subcellulaires fortement linéaires pouvant être associées à des fibres d'actine.

L’observation par imagerie avec marquage serait toutefois nécessaire pour confirmer. Finalement, une méthode alternative à celle détaillée au chapitre 3 pour la modélisation numérique de structures périodiques 2D a été présentée. Celle-ci permet de calculer efficacement le vecteur d’onde pour une structure modélisée en 3D en minimisant la charge sur les ressources de calcul disponibles.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

7.1 Résumé du contexte

L'imagerie à résonance de plasmons de surface est une technique de détection sans marquage permettant de quantifier spatialement les variations d'indice de réfraction survenant à proximité d'une surface métallique. Récemment, la SPRI s'est montré être une technique d'imagerie par ondes évanescentes particulièrement intéressante pour l'étude de cellules individuelles. Cependant, les structures subcellulaires (sous-µm) sont difficilement observables en raison de la nature propagative des plasmons de surface. En effet, la longueur d'atténuation des PSP limite significativement la résolution spatiale le long d'un axe, typiquement de l'ordre de la dizaine de micromètres pour un métal biocompatible comme l'or. Plusieurs méthodes ont été proposées pour améliorer la résolution spatiale en SPRI. Ces différentes techniques entraînent toutefois la dégradation des autres performances d'imagerie, notamment la résolution temporelle ou le contraste des images.

Ce projet de doctorat visait alors à concevoir et développer des structures plasmoniques permettant de réduire la propagation des plasmons de surface, tout en conservant un fort contraste d'images et une haute sensibilité de biodétection. Pour ce faire, des surfaces métalliques nanostructurées ont été proposées pour améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR.

7.2 Sommaire des travaux et atteinte des objectifs

Les objectifs définis au début du projet de doctorat étaient les suivants :

1) Modéliser et optimiser numériquement la nanostructuration de surface permettant de confiner adéquatement les plasmons de surface, tout en conservant une forte efficacité de couplage pour la détection, en suivant des métriques de performance pour l'imagerie SPR de haute résolution.

Les surfaces nanostructurées ont été modélisées numériquement à l'aide d'un logiciel de simulation détaillé dans les chapitres 3 et 6. Ce logiciel permet notamment d'extraire les propriétés optiques du mode guidé par ces réseaux métalliques, plus particulièrement la longueur d'atténuation des plasmons de surface, la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, le contraste en résonance et la sensibilité. Ces propriétés correspondent aux métriques de performances pertinentes en imagerie SPR. Le chapitre 4 démontre comment la géométrie des puces SPR peut être optimisée afin d'améliorer la résolution spatiale en SPRI. La diminution de l'épaisseur d'un film métallique continu réduit efficacement la longueur d'atténuation des plasmons de surface, mais aux dépens du contraste en imagerie. Les résultats numériques ont permis d'identifier une géométrie de surface nanostructurée permettant de réduire la propagation des plasmons de surface, tout en conservant un fort contraste dans les images.

2) Fabriquer les puces SPR nanostructurées et caractériser leurs performances de détection en imagerie SPR. Ces puces devront permettre de résoudre des structures aux dimensions inférieures au micromètre, et ce, sans avoir d'impact sur le contraste dans les images.

Les puces SPR nanostructurées aux dimensions optimisées (chapitre 4) ont été fabriquées suivant différentes techniques de lithographie décrites au chapitre 3. La lithographie électronique permet de varier facilement les motifs lors de la conception, mais peut occasionner des temps élevés de fabrication selon les surfaces d'écriture. La lithographie par nanoimpression assistée par UV permet de fabriquer de grandes surfaces en peu de temps, mais est moins versatile au niveau de la conception des motifs. Des réseaux périodiques 1D (lignes) et 2D (plots carrés) ont été fabriqués en EBL afin de caractériser leurs performances en SPRI. Tel que présenté au chapitre 4, les puces SPR (surfaces uniformes et nanostructurées) ont été caractérisées à l'aide de structures synthétiques de test fabriquées par lithographie optique. Ces résultats expérimentaux, qui ont fait l'objet d'une publication [Banville *et al.*, 2018], montrent une réduction de la propagation des plasmons de surface d'un facteur de 6.3 (passage de 10.7 µm à 1.7 µm) tout en conservant un fort contraste dans les images. Le chapitre 5 présente l'application des puces SPR nanostructurées fabriquées par soft-NIL-UV dans l'imagerie de

cellules vivantes, et montre une augmentation significative de la définition des contours de cellules.

3) Démontrer les avantages des puces nanostructurées en les appliquant au suivi en temps réel de l'activité de cellules biologiques vivantes. Visualiser et quantifier les changements de morphologie au niveau d'une population de cellules et au niveau de cellules individuelles.

Tel que présenté au chapitre 5, les puces SPR nanostructurées offrent une haute résolution spatiale permettant de visualiser des cellules individuelles. Ces puces ont également été appliquées dans le suivi de l'intégrité d'une monocouche endothéliale stimulée par la thrombine. Les dimensions des trous intercellulaires ont été quantifiées pour les deux types de puces SPR (film uniforme et nanostructuré), et les résultats montrent une augmentation significative du nombre de petits trous (~ 1-2 μm^2) en utilisant des surfaces nanostructurées. De plus, la quantification des surfaces de trous inférieures à 10 μm^2 démontre une haute sensibilité à l'activité cellulaire tout au long des expériences. Cette sensibilité s'est révélée être indépendante de la concentration de thrombine et être le résultat de l'augmentation de la résolution spatiale apportée par les puces SPR nanostructurées. Enfin, ces résultats ont aussi prouvé que la nanostructuration de surface, avec les dimensions choisies, n'avait pas d'impact détectable sur la croissance et l'évolution du film cellulaire. Le chapitre 6 présente une première application des puces nanostructurées dans l'imagerie de structures subcellulaires, notamment du cytosquelette de cellules du muscle lisse. Des structures fortement linéaires sont identifiables, et la stimulation par PMA permet de faire le suivi de la réorganisation du cytosquelette de cellules individuelles, ce qui n'est pas possible avec les puces SPR non structurées.

7.3 Contributions originales des travaux

Ce projet doctoral a tout d'abord démontré qu'une surface métallique nanostructurée permet de réduire significativement la propagation du mode plasmonique, et ainsi d'améliorer la résolution spatiale en imagerie SPR. Une méthode de modélisation numérique a été détaillée et a permis de montrer comment la géométrie des réseaux métalliques peut être optimisée de manière à obtenir une résolution spatiale inférieure au micromètre tout en minimisant les compromis avec les autres performances en imagerie. Cette optimisation a conduit à la fabrication par

lithographie de puces SPR nanostructurées offrant une amélioration de la résolution spatiale d'un facteur 6.3 comparativement à des puces SPR conventionnelles, tout en conservant un fort contraste d'images.

L'application des puces SPR nanostructurées dans l'imagerie de cellules vivantes a montré une augmentation significative de la résolution spatiale permettant alors l'étude de structures subcellulaires, notamment le cytosquelette de cellules du muscle lisse. Des changements morphologiques ont été observés suivant la stimulation par un agent forçant la motilité cellulaire. La haute résolution spatiale a également permis de suivre les variations d'intégrité d'une monocouche de cellules endothéliales fortement confluente stimulée par thrombine, en quantifiant le nombre et l'aire de trous intercellulaires. Les résultats expérimentaux ont démontré que l'amélioration de la résolution spatiale résulte en une augmentation de la sensibilité à l'activité cellulaire.

Les travaux présentés au cours de ce projet de recherche ont mené à la publication de trois articles scientifiques dans des journaux avec comité de lecture, un en premier auteur et deux en deuxième auteur [Banville *et al.*, 2018; Söllradl, Banville, *et al.*, 2018; Söllradl *et al.*, 2017], ainsi qu'un article soumis à la revue *Biosensors and Bioelectronics*. Dans ces deux articles scientifiques publiés par Thomas Söllradl, les avancées au niveau de la modélisation numérique de dispositifs photoniques ont permis d'optimiser la géométrie des puces MCWG en tenant compte du compromis entre la résolution spatiale en imagerie SPR et de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Les travaux ont également été présentés lors de deux conférences internationales avec comité de sélection.

7.4 Perspectives de recherche

Le système d'imagerie SPR, situé à l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, offre une multitude d'applications dans le domaine de la biologie et de la pharmacologie, particulièrement pour les études de cellules vivantes. Les puces SPR développées au cours de cette thèse présentent un potentiel important pour l'imagerie de haute résolution de phénomènes de surface, notamment pour l'étude de l'adhésion cellulaire et du suivi de l'activité cellulaire de monocouches endothéliales.

Plusieurs perspectives de recherche découlent du travail accompli dans cette thèse, notamment en rapport aux échantillons nanostructurés et au système d'acquisition. Tout d'abord, l'impact de surfaces métalliques nanostructurées apériodiques sur les propriétés du mode guidé serait intéressant à explorer. Cette avenue offre beaucoup de défis, notamment au niveau de la modélisation numérique. En effet, la modification des stratégies de modélisation employées dans cette thèse pourrait permettre d'identifier le ou les modes guidés par ce type de structures. Dans la même voie, une combinaison de plusieurs réseaux périodiques permettrait d'exploiter les propriétés différentes des modes guidés et ainsi de les combiner. Par exemple, des régions avec des épaisseurs différentes offriraient de l'information complémentaire, notamment au niveau de la résolution spatiale (plan de la surface, x-y) et axiale (z). Une autre avenue intéressante est de remplacer le substrat de verre borosilicate par un substrat d'indice plus élevé, par exemple le SF5 ($n \approx 1.66$) ou le SF10 ($n \approx 1.71$), afin de confiner davantage le mode guidé. En effet, des résultats préliminaires ont montré que des longueurs d'atténuation inférieures au micromètre sont possibles avec un verre d'indice de réfraction plus élevé.

Pour ce qui est du système d'acquisition, l'ajout d'un système de déplacement automatique dans le plan de l'échantillon permettrait d'augmenter la surface d'analyse à l'aide d'un algorithme d'assemblage d'images. Une population de cellules plus grande serait alors observable lors d'expériences dynamiques. Des zones aux dimensions de réseau variables pourraient également être imagées durant la même expérience. Ce système d'imagerie et ces puces SPR nanostructurées offrent ainsi une multitude d'applications intéressantes pour l'imagerie de cellules vivantes.

ANNEXE A PROTOCOLES DE FABRICATION

Protocole A1 : Nettoyage des substrats de verre Fisherbrand

1. Propan-2-one (acétone) sous ultrasons durant *5 min*
2. Propan-2-ol (alcool isopropylique, IPA) sous ultrasons durant *5 min*
3. Eau déionisée (eau DI) sous ultrasons pour rinçage durant *5 min*
4. Séchage par jet d'azote (N_2)
5. Déshydratation dans four à étuve durant *5 min* (180 °C)

Protocole A2 : Photolithographie

1. Nettoyage des échantillons
   a. Nettoyage avec acétone/IPA/eau DI sans ultrasons durant *5 min* par étape
   b. Séchage par N_2
2. Étalement statique de résine
   a. KPMR 1005 17.5% dans le solvant Nano SU-8 2000 (vitesse 1500 rpm, *30 s*)
   b. Recuit sur plaque chauffante durant *60 s* (110 °C)
3. Exposition aux UV (Aligneuse OAI 806)*[1]
   - Intensité de la lampe (12 mW/cm^2)
   - Contact à vide du masque et de l'échantillon
   - Durée de l'exposition (*10 s*)
   - Recuit sur plaque chauffante durant *60 s* (110 °C)
4. Développement de la résine par immersion*[2]
   a. Solvant développeur SU-8 durant *30 s*
   b. IPA durant *30 s*
   c. Eau DI durant *30 s*
   d. Séchage par N_2

***Notes :**

1) Les contours de l'échantillon ont été nettoyés après l'enrésinement avec un coton-tige imbibé d'acétone pour faciliter le contact avec le masque lors de l'exposition.

2) Le développement est fait en tenant l'échantillon avec une pince à la verticale en remuant légèrement par mouvement de va-et-vient.

Protocole A3 : Lithographie électronique

1. Nettoyage des échantillons
   a. Nettoyage avec acétone/IPA/eau DI sans ultrasons durant *5 min* par étape
   b. Séchage par N_2
   c. Déshydratation sur plaque chauffante durant *5 min* (180 °C)
2. Étalement statique de résine (2 couches)
   a. PMMA LMW 4% dans l'anisole (vitesse 3000 rpm, *30 s*)
   b. Recuit sur plaque chauffante durant *90 s* (180 °C)
   c. PMMA HMW 2% dans l'anisole (vitesse 3000 rpm, *30 s*)
   d. Recuit sur plaque chauffante durant *90 s* (180 °C)
3. Écriture par sonde ionique focalisée (FIB)
   - Tension (20 kV)

- Distance de travail (5.1 mm)
- Diaphragme (7.5 µm)
- Courant du faisceau (~12-16 pA)

4. Développement des motifs par immersion*[1]
   a. Solution IPA-Eau DI (proportion 9:1) durant *1 min* (~20.5 °C)
   b. Eau DI durant 30 s (~20.5 °C)
5. Dépôt d'or par évaporation (25 nm, vitesse de 2 Å/s)
6. Soulèvement de la résine*[2]
   a. Immersion dans le solvant Remover 1165 chauffé durant *15 min* (~75-80 °C)
   b. Nettoyage avec acétone/IPA/eau DI sans ultrasons durant *5 min* par étape
   e. Séchage par N_2

***Notes :**

1) Le développement est fait en tenant l'échantillon avec une pince à la verticale en remuant légèrement par mouvement de va-et-vient.

2) Une pipette a été utilisée pour faciliter le soulèvement après 15 minutes. Le solvant est poussé doucement sur l'échantillon dans la direction du réseau pour soulever la résine délicatement.

Protocole A4 : Soft UV-NIL

1. Nettoyage des échantillons
   a. Nettoyage avec acétone/IPA/eau DI sans ultrasons durant *5 min* par étape
   b. Séchage par N2
   c. Déshydratation sur plaque chauffante (180 °C) durant *5 min*
2. Fabrication du moule de PDMS dur et de PDMS flexible
   a. Préparation du PDMS dur suivant la recette proposée par [Schmid et Michel, 2000]
   b. Étalement du PDMS sur le moule maître de silicium (vitesse 5000 rpm, *30 s*)
   c. Dégazage dans désicateur (*10 min*)
   d. Préparation du PDMS flexible (agent de cure/base polymère, ratio 1/10)
   e. Dégazage dans désicateur (*20 min*), repos 1h sur surface plane
   f. Recuit sur plaque chauffante durant *24 h* (60 °C)
   g. Traitement par chlorure de triméthylsilyle (TMCS) par dépôt chimique en vapeur
3. Étalement de résine
   a. PMMA950 3% dans l'anisole (vitesse 5000 rpm, *30 s*)
   b. Recuit sur plaque chauffante durant *10 min* (100 °C)
   c. Solution de TiO_2 sol-gel ($TiCl_4$/Éthanol/Eau DI/F127) (vitesse 5000 rpm, *7 s*)
4. Lithographie par nanoimpression*[1]
   - Moule composé de PDMS dur et de PDMS flexible
5. Démoulage
6. Gravure ionique réactive pour graver les couches résiduelles
   a. Gravure du sol-gel durant *13 s*
   b. Gravure du PMMA durant *110 s*
7. Dépôt d'or par évaporation (25 nm, vitesse de 5 Å/s)
8. Soulèvement de la résine
   a. Immersion dans le solvant tichloroéthylène chauffé durant *15 min* (90 °C)
   b. Séchage N_2
9. Gravure ionique réactive durant *30 s*

***Notes :**

1) L'humidité ambiante est très importante lors de la fabrication par soft-UV-NIL. Une humidité entre 40 et 60% est nécessaire lors de l'estampillage par le moule en PDMS afin d'éviter qu'il colle à la surface [Bottein *et al.*, 2018]. Une humidité supérieure à 50% entraine le moule en PDMS à coller sur l'amonil (solution pouvant remplacer le sol-gel pour la nanoimpression [Ji *et al.*, 2010]).

LISTE DES RÉFÉRENCES

Abadian, P. N., Kelley, C. P. et Goluch, E. D. (2014). Cellular Analysis and Detection Using Surface Plasmon Resonance Techniques. Analytical Chemistry, volume 86, numéro 6, p. 2799-2812.

Abbott, N. J., Rönnbäck, L. et Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nature Reviews Neuroscience, volume 7, numéro 1, p. 41-53.

Abelès, F. (1950). La théorie générale des couches minces. Journal de Physique et le Radium, volume 11, numéro 7, p. 307-309.

Bally, M., Halter, M., Vörös, J. et Grandin, H. M. (2006). Optical microarray biosensing techniques. Surface and Interface Analysis, volume 38, numéro 11, p. 1442-1458.

Banville, F. A., Moreau, J., Sarkar, M., Besbes, M., Canva, M. et Charette, P. G. (2018). Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design. Optics Express, volume 26, numéro 8, p. 10616-10630.

Banville, F. A., Söllradl, T., Zermatten, P., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2015). Improved resolution in SPR and MCWG microscopy by combining images acquired with distinct mode propagation directions. Optics Letters, volume 40, numéro 7, p. 1165-1168.

Barnes, W. L., Dereux, A. et Ebbesen, T. W. (2003). Surface plasmon subwavelength optics. Nature, volume 424, numéro 6950, p. 824-30.

Bassil, N., Maillart, E., Canva, M., Lévy, Y., Millot, M.-C., Pissard, S., Narwa, R. et Goossens, M. (2003). One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations. Sensors and Actuators B: Chemical, volume 94, numéro 3, p. 313-323.

Benson, K., Cramer, S. et Galla, H.-J. (2013). Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. Fluids and Barriers of the CNS, volume 10, numéro 1, p. 5.

Berger, C. E. H., Kooyman, R. P. H. et Greve, J. (1994). Resolution in surface plasmon microscopy. Review of Scientific Instruments, volume 65, numéro 9, p. 2829-2836.

Berginski, M. E., Vitriol, E. A., Hahn, K. M. et Gomez, S. M. (2011). High-Resolution Quantification of Focal Adhesion Spatiotemporal Dynamics in Living Cells. (M. Parsons, Dir.)PLoS ONE, volume 6, numéro 7, p. e22025.

Berguiga, L., Orobtchouk, R., Elezgaray, J., Arneodo, A. et Argoul, F. (2017). High-resolution-scanning waveguide microscopy: spatial refractive index and topography quantification. Optics Letters, volume 42, numéro 13, p. 2523-2526.

Berguiga, L., Streppa, L., Boyer-Provera, E., Martinez-Torres, C., Schaeffer, L., Elezgaray, J., Arneodo, A. et Argoul, F. (2016). Time-lapse scanning surface plasmon microscopy of living adherent cells with a radially polarized beam. Applied Optics, volume in press, numéro 6, p. 1216-1227.

Berguiga, L., Zhang, S., Argoul, F. et Elezgaray, J. (2007). High-resolution surface-plasmon imaging in air and in water: V(z) curve and operating conditions. Optics letters, volume 32, numéro 5, p. 509-11.

Besbes, M., Hugonin, J. P., Lalanne, P., van Haver, S., Janssen, O. T. A., Nugrowati, A. M., Xu, M., Pereira, S. F., Urbach, H. P., van de Nes, A. S., Bienstman, P., Granet, G., Moreau, A., Helfert, S., Sukharev, M., Seideman, T., Baida, F. I., Guizal, B. et Van Labeke, D. (2007). Numerical analysis of a slit-groove diffraction problem. Journal of the European Optical Society: Rapid Publications, volume 2, p. 07022.

Beusink, J. B., Lokate, A. M. C., Besselink, G. a J., Pruijn, G. J. M. et Schasfoort, R. B. M. (2008). Angle-scanning SPR imaging for detection of biomolecular interactions on microarrays. Biosensors & bioelectronics, volume 23, numéro 6, p. 839-44.

Biela, S. A., Su, Y., Spatz, J. P. et Kemkemer, R. (2009). Different sensitivity of human endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts to topography in the nano–micro range. Acta Biomaterialia, volume 5, numéro 7, p. 2460-2466.

Bottein, T., Dalstein, O., Putero, M., Cattoni, A., Faustini, M., Abbarchi, M. et Grosso, D. (2018). Environment-controlled sol–gel soft-NIL processing for optimized titania, alumina, silica and yttria-zirconia imprinting at sub-micron dimensions. Nanoscale, volume 10, numéro 3, p. 1420-1431.

Bourassa, P., Söllradl, T., Maltais, J.-S., Charette, P. G., Gendron, L. et Grandbois, M. (2015). Surface Plasmon Resonance to Study Cell Signaling and GPCR Functional Selectivity in Live Cells. *In* Y. Fang (dir.), Label-Free Biosensor Methods in Drug Discovery (p. 183-195). New York, NY : *Springer New York*.

Bousse, L. (1996). Whole cell biosensors. Sensors and Actuators B: Chemical, volume 34, numéro 1-3, p. 270-275.

Bretscher, A. (1985). Identification and localization of immunoreactive forms of caldesmon in smooth and nonmuscle cells: a comparison with the distributions of tropomyosin and alpha-actinin. The Journal of Cell Biology, volume 100, numéro 5, p. 1656-1663.

Byun, K. M., Shuler, M. L., Kim, S. J., Yoon, S. J. et Kim, D. (2008). Sensitivity Enhancement of Surface Plasmon Resonance Imaging Using Periodic Metallic Nanowires. Journal of Lightwave Technology, volume 26, numéro 11, p. 1472-1478.

Cattoni, A., Chen, J., Decanini, D., Shi, J. et Haghiri-Gosnet, A.-M. (2011). Soft UV Nanoimprint Lithography: A Versatile Tool for Nanostructuration at the 20nm Scale. *In* B. Cui (dir.), Recent Advances in Nanofabrication Techniques and Applications. *InTech*.

Cattoni, A., Ghenuche, P., Haghiri-Gosnet, A.-M., Decanini, D., Chen, J., Pelouard, J. et Collin, S. (2011). $\lambda^3/1000$ plasmonic nanocavities for biosensing fabricated by soft UV nanoimprint lithography. Nano letters, volume 11, numéro 9, p. 3557–3563.

Chabot, V. (2013). Plates-formes de microscopie et fluorescence par résonance de plasmons de surface appliquées à l'imagerie cellulaire. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, 194 p.

Chabot, V., Cuerrier, C. M., Escher, E., Aimez, V., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2009). Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. Biosensors & bioelectronics, volume 24, numéro 6, p. 1667-73.

Chabot, V., Miron, Y., Charette, P. G. et Grandbois, M. (2013). Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy. Biosensors and Bioelectronics, volume 50, p. 125-131.

Chabot, V., Miron, Y., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2012). Long range surface plasmon resonance for increased sensitivity in living cell biosensing through greater probing depth. Sensors and Actuators B: Chemical, volume 174, p. 94-101.

Chamtouri, M., Dhawan, A., Besbes, M., Moreau, J., Ghalila, H., Vo-Dinh, T. et Canva, M. (2014). Enhanced SPR Sensitivity with Nano-Micro-Ribbon Grating—an Exhaustive Simulation Mapping. Plasmonics, volume 9, numéro 1, p. 79-92.

Chamtouri, M., Sarkar, M., Moreau, J., Besbes, M., Ghalila, H. et Canva, M. (2014). Field enhancement and target localization impact on the biosensitivity of nanostructured plasmonic sensors. Journal of the Optical Society of America B, volume 31, numéro 5, p. 1223-1231.

Chen, M., Zaytseva, N. V., Wu, Q., Li, M. et Fang, Y. (2013). Microplate-compatible total internal reflection fluorescence microscopy for receptor pharmacology. Applied Physics Letters, volume 102, numéro 19, p. 193702.

Chien, F.-C., Kuo, C. W., Yang, Z.-H., Chueh, D.-Y. et Chen, P. (2011). Exploring the Formation of Focal Adhesions on Patterned Surfaces Using Super-Resolution Imaging. Small, volume 7, numéro 20, p. 2906-2913.

Choi, C.-H., Hagvall, S. H., Wu, B. M., Dunn, J. C. Y., Beygui, R. E. et "CJ" Kim, C.-J. (2007). Cell interaction with three-dimensional sharp-tip nanotopography. Biomaterials, volume 28, numéro 9, p. 1672-1679.

Collin, S. (2014). Nanostructure arrays in free-space: optical properties and applications. Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain), volume 77, numéro 12, p. 126402.

Convert, L., Chabot, V., Zermatten, P.-J., Hamel, R., Cloarec, J.-P., Lecomte, R., Aimez, V. et Charette, P. G. (2012). Passivation of KMPR microfluidic channels with bovine serum albumin (BSA) for improved hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides. Sensors and Actuators B: Chemical, volume 173, p. 447-454.

Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature, volume 407, numéro 6801, p. 258-264.

Cox, S. (2015). Super-resolution imaging in live cells. Developmental Biology, volume 401, numéro 1, p. 175–181.

Cuerrier, C. M., Chabot, V., Vigneux, S., Aimez, V., Escher, E., Gobeil, F., Charette, P. G. et Grandbois, M. (2008). Surface Plasmon Resonance Monitoring of Cell Monolayer Integrity: Implication of Signaling Pathways Involved in Actin-Driven Morphological Remodeling. Cellular and Molecular Bioengineering, volume 1, numéro 4, p. 229-239.

Cunningham, B., Li, P., Lin, B. et Pepper, J. (2002). Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique. (Intergovernmental Panel on Climate Change, Dir.)Sensors and Actuators B: Chemical, volume 81, numéro 2-3, p. 316-328.

Daimon, M. et Masumura, A. (2007). Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. Applied Optics, volume 46, numéro 18, p. 3811-3820.

Dalby, M. J., Giannaras, D., Riehle, M. O., Gadegaard, N., Affrossman, S. et Curtis, A. S. G. (2004). Rapid fibroblast adhesion to 27nm high polymer demixed nano-topography. Biomaterials, volume 25, numéro 1, p. 77-83.

de Bruijn, H. E., Kooyman, R. P. H. et Greve, J. (1993). Surface plasmon resonance microscopy: improvement of the resolution by rotation of the object. Applied Optics, volume 32, numéro 13, p. 2426-2430.

Fang, Y. (2006). Label-Free Cell-Based Assays with Optical Biosensors in Drug Discovery. ASSAY and Drug Development Technologies, volume 4, numéro 5, p. 583-595.

Fang, Y. (2011). Label-Free Biosensors for Cell Biology. International Journal of Electrochemistry, volume 2011, p. 1-16.

Fang, Y. (2015). Combining label-free cell phenotypic profiling with computational approaches for novel drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery, volume 10, numéro 4, p. 331-343.

Fang, Y. et Ferrie, A. M. (2007). Optical biosensor differentiates signaling of endogenous PAR1 and PAR2 in A431 cells. BMC Cell Biology, volume 8, numéro 1.

Fang, Y., Ferrie, A. M., Fontaine, N. H., Mauro, J. et Balakrishnan, J. (2006). Resonant Waveguide Grating Biosensor for Living Cell Sensing. Biophysical Journal, volume 91, numéro 5, p. 1925-1940.

Fang, Y., Frutos, A. et Verklereen, R. (2008). Label-Free Cell-Based Assays for GPCR Screening. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, volume 11, numéro 5, p. 357-369.

Ferrie, A. M., Deichmann, O. D., Wu, Q. et Fang, Y. (2012). High resolution resonant waveguide grating imager for cell cluster analysis under physiological condition. Applied Physics Letters, volume 100, numéro 22, p. 223701.

Ferrie, A. M., Wu, Q., Deichmann, O. D. et Fang, Y. (2014). High frequency resonant waveguide grating imager for assessing drug-induced cardiotoxicity. Applied Physics Letters, volume 104, numéro 18, p. 183702.

Ferrie, A. M., Wu, Q. et Fang, Y. (2010). Resonant waveguide grating imager for live cell sensing. Applied Physics Letters, volume 97, numéro 22, p. 223704.

Fultz, M. E., Li, C., Geng, W. et Wright, G. L. (2000). Remodeling of the actin cytoskeleton in the contracting A7r5 smooth muscle cell. Journal of Muscle Research and Cell Motility, volume 21, numéro 8, p. 775-787.

Giaever, I. et Keese, C. R. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically. Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 88, numéro 17, p. 7896-7900.

Giaever, I. et Keese, C. R. (1993). A morphological biosensor for mammalian cells. Nature, volume 366, numéro 6455, p. 591-592.

Giebel, K.-F., Bechinger, C., Herminghaus, S., Riedel, M., Leiderer, P., Weiland, U. et Bastmeyer, M. (1999). Imaging of Cell/Substrate Contacts of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy. Biophysical Journal, volume 76, numéro 1, p. 509–516.

Gillibert, R., Sarkar, M., Bryche, J.-F., Yasukuni, R., Moreau, J., Mondher Besbes, Barbillon, G., Bartenlian, B., Canva, M. et Chapelle, M. L. de la (2016). Directional surface enhanced Raman scattering on gold nano-gratings. Nanotechnology, volume 27, numéro 11, p. 115202.

Goedhart, J. et Gadella, T. W. J. (2009). Fluorescence resonance energy transfer imaging of PKC signalling in living cells using genetically encoded fluorescent probes. Journal of The Royal Society Interface, volume 6, numéro suppl_1.

Gopinath, S. C. B. (2010). Biosensing applications of surface plasmon resonance-based Biacore technology. Sensors and Actuators B: Chemical, volume 150, numéro 2, p. 722-733.

Graczyk, M., Cattoni, A., Rösner, B., Seniutinas, G., Löfstrand, A., Kvennefors, A., Mailly, D., David, C. et Maximov, I. (2018). Nanoimprint stamps with ultra-high resolution: Optimal fabrication techniques. Microelectronic Engineering, volume 190, p. 73-78.

Gu, Z., Kordowska, J., Williams, G. L., Wang, C.-L. A. et Hai, C.-M. (2007). Erk1/2 MAPK and caldesmon differentially regulate podosome dynamics in A7r5 vascular smooth muscle cells. Experimental Cell Research, volume 313, numéro 5, p. 849-866.

Hackett, L. P., Seo, S., Kim, S., Goddard, L. L. et Liu, G. L. (2017). Label-free cell-substrate adhesion imaging on plasmonic nanocup arrays. Biomedical Optics Express, volume 8, numéro 2, p. 1139.

He, R.-Y., Chang, G.-L., Wu, H.-L., Lin, C.-H., Chiu, K.-C., Su, Y.-D. et Chen, S.-J. (2006). Enhanced live cell membrane imaging using surface plasmon-enhanced total internal reflection fluorescence microscopy. Optics Express, volume 14, numéro 20, p. 9307.

He, R.-Y., Lin, C.-Y., Su, Y.-D., Chiu, K.-C., Chang, N.-S., Wu, H.-L. et Chen, S.-J. (2010). Imaging live cell membranes via surface plasmon-enhanced fluorescence and phase microscopy. Optics Express, volume 18, numéro 4, p. 3649.

He, R.-Y., Su, Y.-D., Cho, K.-C., Lin, C.-Y., Chang, N.-S., Chang, C.-H. et Chen, S.-J. (2009). Surface plasmon-enhanced two-photon fluorescence microscopy for live cell membrane imaging. Optics Express, volume 17, numéro 8, p. 5987.

Hecht, E. (1997). Optics. (K. Guardino, Dir.) (*3rd Editio*.). *Addison Wesley Longman*.

Hecht, E. (2016). Optics (5e éd.). *Addison-Wesley*.

Hell, S. W., Sahl, S. J., Bates, M., Zhuang, X., Heintzmann, R., Booth, M. J., Bewersdorf, J., Shtengel, G., Hess, H., Tinnefeld, P., Honigmann, A., Jakobs, S., Testa, I., Cognet, L., Lounis, B., Ewers, H., Davis, S. J., Eggeling, C., Klenerman, D., Willig, K. I., Vicidomini, G., Castello, M., Diaspro, A. et Cordes, T. (2015). The 2015 super-resolution microscopy roadmap. Journal of Physics D: Applied Physics, volume 48, numéro 44, p. 443001.

Homola, J. (2006). Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors (1re éd.). *Springer*.

Howe, C. L., Webb, K. F., Abayzeed, S. A., Anderson, D. J., Denning, C. et Russell, N. A. (2019). Surface plasmon resonance imaging of excitable cells. Journal of Physics D: Applied Physics, volume 52, numéro 10, p. 104001.

Huang, B., Bates, M. et Zhuang, X. (2009). Super-Resolution Fluorescence Microscopy. Annual Review of Biochemistry, volume 78, numéro 1, p. 993–1016.

Huang, B., Yu, F. et Zare, R. N. (2007). Surface Plasmon Resonance Imaging Using a High Numerical Aperture Microscope Objective. Analytical Chemistry, volume 79, numéro 7, p. 2979–2983.

Jamil, M. M. A., Denyer, M. C. T., Youseffi, M., Britland, S. T., Liu, S., See, C. W., Somekh, M. G. et Zhang, J. (2008). Imaging of the cell surface interface using objective coupled widefield surface plasmon microscopy. Journal of Structural Biology, volume 164, numéro 1, p. 75-80.

Ji, R., Hornung, M., Verschuuren, M. A., van de Laar, R., van Eekelen, J., Plachetka, U., Moeller, M. et Moormann, C. (2010). UV enhanced substrate conformal imprint lithography (UV-SCIL) technique for photonic crystals patterning in LED manufacturing. Microelectronic Engineering, volume 87, numéro 5-8, p. 963-967.

Johnson, P. B. et Christy, R. W. (1972). Optical Constants of the Noble Metals. Physical Review B, volume 6, numéro 12, p. 4370-4379.

Kabashin, A. V., Evans, P., Pastkovsky, S., Hendren, W., Wurtz, G. A., Atkinson, R., Pollard, R., Podolskiy, V. A. et Zayats, A. V. (2009). Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing. Nature Materials, volume 8, numéro 11, p. 867-871.

Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F. et Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. Nature, volume 468, numéro 7323, p. 580-4.

Kano, H. et Knoll, W. (2000). A scanning microscope employing localized surface-plasmon-polaritons as a sensing probe. Optics Communications, volume 182, numéro 1-3, p. 11-15.

Kaverina, I. (2003). Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. Journal of Cell Science, volume 116, numéro 24, p. 4915-4924.

Kim, D. J. et Kim, D. (2010). Subwavelength grating-based nanoplasmonic modulation for surface plasmon resonance imaging with enhanced resolution. Journal of the Optical Society of America B, volume 27, numéro 6, p. 1252-1259.

Kim, D.-H., Han, K., Gupta, K., Kwon, K. W., Suh, K.-Y. et Levchenko, A. (2009). Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. Biomaterials, volume 30, numéro 29, p. 5433-5444.

Kim, D.-H. et Wirtz, D. (2013). Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. The FASEB Journal, volume 27, numéro 4, p. 1351-1361.

Kim, K., Choi, J.-W., Ma, K., Lee, R., Yoo, K.-H., Yun, C.-O. et Kim, D. (2010). Nanoisland-Based Random Activation of Fluorescence for Visualizing Endocytotic Internalization of Adenovirus. Small, volume 6, numéro 12, p. 1293-1299.

Kim, K., Kim, D. J., Cho, E.-J., Suh, J.-S., Huh, Y.-M. et Kim, D. (2009). Nanograting-based plasmon enhancement for total internal reflection fluorescence microscopy of live cells. Nanotechnology, volume 20, numéro 1, p. 015202.

Kim, K., Kim, D. J., Moon, S., Kim, D. et Byun, K. M. (2009). Localized surface plasmon resonance detection of layered biointeractions on metallic subwavelength nanogratings. Nanotechnology, volume 20, numéro 31, p. 315501.

Kim, K., Lee, W., Chung, K., Lee, H., Son, T., Oh, Y., Xiao, Y.-F., Ha Kim, D. et Kim, D. (2017). Molecular overlap with optical near-fields based on plasmonic nanolithography for ultrasensitive label-free detection by light-matter colocalization. Biosensors and Bioelectronics, volume 96, p. 89-98.

Kim, K., Oh, Y., Lee, W. et Kim, D. (2010). Plasmonics-based spatially activated light microscopy for super-resolution imaging of molecular fluorescence. Optics Letters, volume 35, numéro 20, p. 3501.

Kim, S. A., Byun, K. M., Kim, K., Jang, S. M., Ma, K., Oh, Y., Kim, D., Kim, S. G., Shuler, M. L. et Kim, S. J. (2010). Surface-enhanced localized surface plasmon resonance biosensing of avian influenza DNA hybridization using subwavelength metallic nanoarrays. Nanotechnology, volume 21, numéro 35, p. 355503.

Kim, S., Jung, U. T., Kim, S.-K., Lee, J.-H., Choi, H. S., Kim, C.-S. et Jeong, M. Y. (2015). Nanostructured Multifunctional Surface with Antireflective and Antimicrobial Characteristics. ACS Applied Materials & Interfaces, volume 7, numéro 1, p. 326-331.

Kim, S.-H., Chegal, W., Doh, J., Cho, H. M. et Moon, D. W. (2011). Study of cell-matrix adhesion dynamics using surface plasmon resonance imaging ellipsometry. Biophysical journal, volume 100, numéro 7, p. 1819-1828.

Kretschmann, E. et Raether, H. (1968). Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. Zeitschrift für Naturforschung A, volume 23, numéro 12, p. 2135-2136.

Kreysing, E., Hassani, H., Hampe, N. et Offenhäusser, A. (2018). Nanometer-Resolved Mapping of Cell–Substrate Distances of Contracting Cardiomyocytes Using Surface Plasmon Resonance Microscopy. ACS Nano, volume 12, numéro 9, p. 8934-8942.

Krug, S. M., Fromm, M. et Günzel, D. (2009). Two-Path Impedance Spectroscopy for Measuring Paracellular and Transcellular Epithelial Resistance. Biophysical Journal, volume 97, numéro 8, p. 2202-2211.

Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy (*3rd ed*.). New York : *Springer*.

Lal, S., Link, S. et Halas, N. J. (2007). Nano-optics from sensing to waveguiding. Nature Photonics, volume 1, numéro 11, p. 641-648.

Laplatine, L. (2015). Résolution spatiale en microscopie par résonance de plasmon de surface à couplage par prisme. Thèse de doctorat, Université de Grenoble, 145 p.

Laplatine, L., Leroy, L., Calemczuk, R., Baganizi, D., Marche, P. N., Roupioz, Y. et Livache, T. (2014). Spatial resolution in prism-based surface plasmon resonance microscopy. Optics Express, volume 22, numéro 19, p. 22771-22785.

Lecaruyer, P., Canva, M. et Rolland, J. (2007). Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended Rouard method. Applied Optics, volume 46, numéro 12, p. 2361.

Liebermann, T. et Knoll, W. (2000). Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, volume 171, numéro 1-3, p. 115-130.

Liu, P. Y., Chin, L. K., Ser, W., Chen, H. F., Hsieh, C.-M., Lee, C.-H., Sung, K.-B., Ayi, T. C., Yap, P. H., Liedberg, B., Wang, K., Bourouina, T. et Leprince-Wang, Y. (2016). Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. Lab on a Chip, volume 16, numéro 4, p. 634-644.

Live, L. S., Dhawan, A., Gibson, K. F., Poirier-Richard, H.-P., Graham, D., Canva, M., Vo-Dinh, T. et Masson, J.-F. (2012). Angle-dependent resonance of localized and

propagating surface plasmons in microhole arrays for enhanced biosensing. Analytical and Bioanalytical Chemistry, volume 404, numéro 10, p. 2859-2868.

Loesberg, W., Teriet, J., Vandelft, F., Schon, P., Figdor, C., Speller, S., Vanloon, J., Walboomers, X. et Jansen, J. (2007). The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. Biomaterials, volume 28, numéro 27, p. 3944-3951.

Malic, L., Cui, B., Tabrizian, M. et Veres, T. (2009). Nanoimprinted plastic substrates for enhanced surface plasmon resonance imaging detection. Optics Express, volume 17, numéro 22, p. 20386.

Maltais, J.-S., Denault, J.-B., Gendron, L. et Grandbois, M. (2012). Label-free monitoring of apoptosis by surface plasmon resonance detection of morphological changes. Apoptosis, volume 17, numéro 8, p. 916-925.

Masson, J.-F. (2017). Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. ACS Sensors, volume 2, numéro 1, p. 16-30.

McGuiness, R. (2007). Impedance-based cellular assay technologies: recent advances, future promise. Current Opinion in Pharmacology, volume 7, numéro 5, p. 535-540.

Nguyen, H., Park, J., Kang, S. et Kim, M. (2015). Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. Sensors, volume 15, numéro 5, p. 10481-10510.

Ni, Q., Mehta, S. et Zhang, J. (2018). Live-cell imaging of cell signaling using genetically encoded fluorescent reporters. The FEBS Journal, volume 285, numéro 2, p. 203-219.

Novotny, L. (2010). Strong coupling, energy splitting, and level crossings: A classical perspective. American Journal of Physics, volume 78, numéro 11, p. 1199-1202.

Oh, Y., Lee, W., Son, T., Kim, S. Y., Shin, J.-S. et Kim, D. (2014). Live cell imaging based on surface plasmon-enhanced fluorescence microscopy using random nanostructures, volume 8954, p. 89540E. *International Society for Optics and Photonics*.

Oh, Y., Son, T., Kim, S. Y., Lee, W., Yang, H., Choi, J., Shin, J.-S. et Kim, D. (2014). Surface plasmon-enhanced nanoscopy of intracellular cytoskeletal actin filaments using random nanodot arrays. Optics Express, volume 22, numéro 22, p. 27695-27706.

Olympus (2019). Resolution Criteria and Performance Issues. Microscopy Resource Center.

Opal, S. M. et van der Poll, T. (2015). Endothelial barrier dysfunction in septic shock. Journal of Internal Medicine, volume 277, numéro 3, p. 277-293.

Otsu, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, volume 9, numéro 1, p. 62-66.

Otto, A. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. Zeitschrift f?r Physik A Hadrons and nuclei, volume 216, numéro 4, p. 398-410.

Pancrazio, J. J., Whelan, J. P., Borkholder, D. A., Ma, W. et Stenger, D. A. (1999). Development and application of cell-based biosensors. Annals of Biomedical Engineering, volume 27, numéro 6, p. 697-711.

Patching, S. G. (2014). Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, volume 1838, numéro 1, p. 43-55.

Peterson, A. W., Halter, M., Tona, A., Bhadriraju, K. et Plant, A. L. (2009). Surface plasmon resonance imaging of cells and surface-associated fibronectin. BMC Cell Biology, volume 10, numéro 1, p. 16.

Peterson, A. W., Halter, M., Tona, A. et Plant, A. L. (2014). High resolution surface plasmon resonance imaging for single cells. BMC Cell Biology, volume 15, numéro 1, p. 35.

Peterson, A. W., Halter, M., Tona, A., Plant, A. L. et Elliott, J. T. (2018). Mass measurements of focal adhesions in single cells using high resolution surface plasmon resonance microscopy. Plasmonics in Biology and Medicine XV, volume 10509, p. 1050905. *International Society for Optics and Photonics*.

Petryayeva, E. et Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. Analytica Chimica Acta, volume 706, numéro 1, p. 8-24.

Progatzky, F., Dallman, M. J. et Lo Celso, C. (2013). From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. Interface Focus, volume 3, numéro 3, p. 20130001-20130001.

Raether, H. (1988). Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. Springer Tracts in Modern Physics (Vol. 111).

Rav-Acha, A. et Peleg, S. (2005). Two motion-blurred images are better than one. Pattern Recognition Letters, volume 26, numéro 3, p. 311-317.

Ray, A., Lee, O., Win, Z., Edwards, R. M., Alford, P. W., Kim, D.-H. et Provenzano, P. P. (2017). Anisotropic forces from spatially constrained focal adhesions mediate contact guidance directed cell migration. Nature Communications, volume 8, p. 14923.

Rianna, C., Calabuig, A., Ventre, M., Cavalli, S., Pagliarulo, V., Grilli, S., Ferraro, P. et Netti, P. A. (2015). Reversible Holographic Patterns on Azopolymers for Guiding Cell Adhesion and Orientation. ACS Applied Materials & Interfaces, volume 7, numéro 31, p. 16984-16991.

Rothenhäusler, B. et Knoll, W. (1988). Surface-plasmon microscopy. Nature, volume 332, numéro 6165, p. 615-617.

Sahl, S. J., Hell, S. W. et Jakobs, S. (2017). Fluorescence nanoscopy in cell biology. Nature Reviews Molecular Cell Biology, volume 18, p. 685.

Sarkar, M. (2015). Hybrid surface plasmon modes in metallic nanostructures: Theory, numerical analysis and application to bio-sensing. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay, 284 p.

Sarkar, M., Besbes, M., Moreau, J., Bryche, J.-F., Olivéro, A., Barbillon, G., Coutrot, A.-L., Bartenlian, B. et Canva, M. (2015). Hybrid Plasmonic Mode by Resonant Coupling of Localized Plasmons to Propagating Plasmons in a Kretschmann Configuration. ACS Photonics, volume 2, numéro 2, p. 237-245.

Sarkar, M., Bryche, J.-F., Moreau, J., Besbes, M., Barbillon, G., Bartenlian, B. et Canva, M. (2015). Generalized analytical model based on harmonic coupling for hybrid plasmonic modes: comparison with numerical and experimental results. Optics express, volume 23, numéro 21, p. 27376–27390.

Schmid, H. et Michel, B. (2000). Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography. Macromolecules, volume 33, numéro 8, p. 3042-3049.

Schröder, R., Janssen, N., Schmidt, J., Kebig, A., Merten, N., Hennen, S., Müller, A., Blättermann, S., Mohr-Andrä, M., Zahn, S., Wenzel, J., Smith, N. J., Gomeza, J., Drewke, C., Milligan, G., Mohr, K. et Kostenis, E. (2010). Deconvolution of complex G protein–coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. Nature Biotechnology, volume 28, numéro 9, p. 943-949.

Schuck, P. (1997). Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. Annual review of biophysics and biomolecular structure, volume 26, numéro 1, p. 541-66.

Scott, C. W. et Peters, M. F. (2010). Label-free whole-cell assays: expanding the scope of GPCR screening. Drug Discovery Today, volume 15, numéro 17-18, p. 704–716.

Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A. et Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. Nature Methods, volume 5, numéro 5, p. 417-423.

Skoog, S. A., Kumar, G., Narayan, R. J. et Goering, P. L. (2018). Biological responses to immobilized microscale and nanoscale surface topographies. Pharmacology & Therapeutics, volume 182, p. 33-55.

Söllradl, T., Banville, F. A., Chabot, V., Canva, M., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2017). Metal clad waveguide (MCWG) based imaging using a high numerical aperture microscope objective. Optics Express, volume 25, numéro 3, p. 1666-1679.

Söllradl, T., Banville, F. A., Fröhlich, U., Canva, M., Charette, P. G. et Grandbois, M. (2018). Label-free visualization and quantification of single cell signaling activity using metal-clad waveguide (MCWG)-based microscopy. Biosensors and Bioelectronics, volume 100, p. 429-436.

Söllradl, T., Chabot, K., Fröhlich, U., Canva, M., Charette, P. G. et Grandbois, M. (2018). Monitoring individual cell-signaling activity using combined metal-clad waveguide and surface-enhanced fluorescence imaging. The Analyst, volume 143, numéro 22, p. 5559-5567.

Somekh, M. G., Liu, S. G., Velinov, T. S. et See, C. W. (2000a). Optical V(z) for high-resolution 2π surface plasmon microscopy. Optics Letters, volume 25, numéro 11, p. 823-825.

Somekh, M. G., Liu, S. G., Velinov, T. S. et See, C. W. (2000b). High-resolution scanning surface-plasmon microscopy. Applied Optics, volume 39, numéro 34, p. 6279–6287.

Somekh, M. G., Stabler, G., Liu, S., Zhang, J. et See, C. W. (2009). Wide-field high-resolution surface-plasmon interference microscopy. Optics Letters, volume 34, numéro 20, p. 3110-3112.

Son, T., Lee, C., Seo, J., Choi, I.-H. et Kim, D. (2018). Surface plasmon microscopy by spatial light switching for label-free imaging with enhanced resolution. Optics Letters, volume 43, numéro 4, p. 959.

Son, T., Lee, W. et Kim, D. (2017). Localized surface plasmon enhanced cellular imaging using random metallic structures, volume 10080, p. 100800E. *International Society for Optics and Photonics*.

Son, T., Seo, J., Choi, I.-H. et Kim, D. (2017). Label-free quantification of cell-to-substrate separation by surface plasmon resonance microscopy. Optics Communications.

Stabler, G., Somekh, M. G. et See, C. W. (2004). High-resolution wide-field surface plasmon microscopy. Journal of microscopy, volume 214, numéro Pt 3, p. 328-33.

Stepanova, M. et Dew, S. (dir.) (2012). Nanofabrication: techniques and principles. Wien ; New York : *Springer*.

Tabarin, T., Pageon, S. V., Bach, C. T. T., Lu, Y., O'Neill, G. M., Gooding, J. J. et Gaus, K. (2014). Insights into Adhesion Biology Using Single-Molecule Localization Microscopy. ChemPhysChem, volume 15, numéro 4, p. 606-618.

Tan, H.-M., Pechprasarn, S., Zhang, J., Pitter, M. C. et Somekh, M. G. (2016). High Resolution Quantitative Angle-Scanning Widefield Surface Plasmon Microscopy. Scientific Reports, volume 6, numéro 1.

Tanaka, T. et Yamamoto, S. (2003). Laser-scanning surface plasmon polariton resonance microscopy with multiple photodetectors. Applied optics, volume 42, numéro 19, p. 4002-7.

Taylor, D. L., Woo, E. S. et Giuliano, K. a (2001). Real-time molecular and cellular analysis: the new frontier of drug discovery. Current Opinion in Biotechnology, volume 12, numéro 1, p. 75-81.

Tiruppathi, C., Malik, A. B., Del Vecchio, P. J., Keese, C. R. et Giaever, I. (1992). Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 89, numéro 17, p. 7919-7923.

Toma, K., Kano, H. et Offenhäusser, A. (2014). Label-Free Measurement of Cell–Electrode Cleft Gap Distance with High Spatial Resolution Surface Plasmon Microscopy. ACS Nano, volume 8, numéro 12, p. 12612-12619.

Toomre, D. et Bewersdorf, J. (2010). A New Wave of Cellular Imaging. Annual Review of Cell and Developmental Biology, volume 26, numéro 1, p. 285-314.

Traub, M. C., Longsine, W. et Truskett, V. N. (2016). Advances in Nanoimprint Lithography. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, volume 7, numéro 1, p. 583-604.

Tripathy, A., Pahal, S., Mudakavi, R. J., Raichur, A. M., Varma, M. M. et Sen, P. (2018). Impact of Bioinspired Nanotopography on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Chitosan. Biomacromolecules, volume 19, numéro 4, p. 1340-1346.

Tripathy, A., Sen, P., Su, B. et Briscoe, W. H. (2017). Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces. Advances in Colloid and Interface Science, volume 248, p. 85-104.

Vander, R. et Lipson, S. G. (2009). High-resolution surface-plasmon resonance real-time imaging. Optics Letters, volume 34, numéro 1, p. 37.

Vial, B. (2013). Study of open electromagnetic resonators by modal approach. Application to infrared multispectral filtering. (Theses). Thèse de doctorat, Ecole Centrale Marseille.

Vieu, C., Carcenac, F., Pépin, A., Chen, Y., Mejias, M., Lebib, A., Manin-Ferlazzo, L., Couraud, L. et Launois, H. (2000). Electron beam lithography: resolution limits and applications. Applied Surface Science, volume 164, numéro 1-4, p. 111-117.

Wang, W., Foley, K., Shan, X., Wang, S., Eaton, S., Nagaraj, V. J., Wiktor, P., Patel, U. et Tao, N. (2011). Single cells and intracellular processes studied by a plasmonic-based electrochemical impedance microscopy. Nature Chemistry, volume 3, numéro 3, p. 251-257.

Wang, W., Wang, S., Liu, Q., Wu, J. et Tao, N. (2012). Mapping Single-Cell–Substrate Interactions by Surface Plasmon Resonance Microscopy. Langmuir, volume 28, numéro 37, p. 13373-13379.

Wang, W., Yang, Y., Wang, S., Nagaraj, V. J., Liu, Q., Wu, J. et Tao, N. (2012). Label-free measuring and mapping of binding kinetics of membrane proteins in single living cells. Nature Chemistry, volume 4, numéro 10, p. 846-853.

Watanabe, K., Horiguchi, N. et Kano, H. (2007). Optimized measurement probe of the localized surface plasmon microscope by using radially polarized illumination. Applied optics, volume 46, numéro 22, p. 4985-90.

Watanabe, K., Matsuura, K., Kawata, F., Nagata, K., Ning, J. et Kano, H. (2012). Scanning and non-scanning surface plasmon microscopy to observe cell adhesion sites. Biomedical Optics Express, volume 3, numéro 2, p. 354-359.

Watanabe, K., Ryosuke, M., Terakado, G., Okazaki, T., Morigaki, K. et Kano, H. (2010). High resolution imaging of patterned model biological membranes by localized surface plasmon microscopy. Applied Optics, volume 49, numéro 5, p. 887-891.

Wei, S.-C., Yang, P.-T., Wu, T.-H., Lu, Y.-L., Gu, F., Sung, K.-B. et Lin, C.-W. (2015). Characteristic investigation of scanning surface plasmon microscopy for nucleotide functionalized nanoarray. Optics Express, volume 23, numéro 15, p. 20104.

Wonju Lee, Kyujung Kim et Donghyun Kim (2012). Electromagnetic Near-Field Nanoantennas for Subdiffraction-Limited Surface Plasmon-Enhanced Light Microscopy. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, volume 18, numéro 6, p. 1684-1691.

Xie, C., Hanson, L., Cui, Y. et Cui, B. (2011). Vertical nanopillars for highly localized fluorescence imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences, volume 108, numéro 10, p. 3894-3899.

Yanase, Y., Hiragun, T., Yanase, T., Kawaguchi, T., Ishii, K. et Hide, M. (2013). Application of SPR Imaging Sensor for Detection of Individual Living Cell Reactions and Clinical Diagnosis of Type I Allergy. Allergology International, volume 62, numéro 2, p. 163-169.

Yanase, Y., Suzuki, H., Tsutsui, T., Hiragun, T., Kameyoshi, Y. et Hide, M. (2007). The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. Biosensors and Bioelectronics, volume 22, numéro 6, p. 1081–1086.

Yeatman, E. et Ash, E. A. (1987). Surface plasmon microscopy. Electronics Letters, volume 23, numéro 20, p. 1091-1092.

Yeatman, E. M. (1996). Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing. Biosensors & bioelectronics, volume 11, numéro 6-7, p. 635-649.

Yeh, P. (2005). Optical Waves in Layered Media (1re éd.). *Wiley-Interscience*.

Yu, H., Shan, X., Wang, S. et Tao, N. (2017). Achieving High Spatial Resolution Surface Plasmon Resonance Microscopy with Image Reconstruction. Analytical Chemistry, volume 89, numéro 5, p. 2704-2707.

Zaytseva, N., Miller, W., Goral, V., Hepburn, J. et Fang, Y. (2011). Microfluidic resonant waveguide grating biosensor system for whole cell sensing. Applied Physics Letters, volume 98, numéro 16, p. 163703.

Zeng, Y., Hu, R., Wang, L., Gu, D., He, J., Wu, S.-Y., Ho, H.-P., Li, X., Qu, J., Gao, B. Z. et Shao, Y. (2017). Recent advances in surface plasmon resonance imaging: detection speed, sensitivity, and portability. Nanophotonics, volume 6, numéro 5, p. 1017–1030.