



**HAL**  
open science

# Développement et validation d'un système in-situ d'imagerie par résonance de plasmons de surface pour le dosage d'éléments métalliques en eau douce et en milieu marin

Lionel Lartigue

► **To cite this version:**

Lionel Lartigue. Développement et validation d'un système in-situ d'imagerie par résonance de plasmons de surface pour le dosage d'éléments métalliques en eau douce et en milieu marin. Optique [physics.optics]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPAST005 . tel-04059503

**HAL Id: tel-04059503**

**<https://pastel.hal.science/tel-04059503>**

Submitted on 5 Apr 2023

**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.

Développement et validation d'un  
système in situ d'imagerie par résonance  
de plasmon de surface pour le dosage  
d'éléments métalliques en eau douce et  
en milieu marin

*Development and validation of an in situ surface plasmon resonance  
imaging system for the detection of metallic elements in freshwater  
and seawater*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 575 : electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE)

Spécialité du doctorat : Physique

Graduate School : Sciences de l'ingénieur et des systèmes

Référent : Institut d'Optique

Thèse préparée dans l'unité de recherche université Paris-Saclay, Institut d'Optique  
Graduate School, CNRS, Laboratoire Charles Fabry, 91127 Palaiseau France, sous la  
direction de Michael Canva, directeur de recherche, le co-encadrement de Julien  
Moreau, Maître de conférences et de Karine Michel, Ingénieure de recherche.

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 16 janvier 2023, par**

**Lionel Peyo Charles LARTIGUE**

**Composition du jury**

Membres du Jury avec voix délibérative

**Alexandra Fragola**

Professeure des universités, ISMO, Orsay

Présidente & Examinatrice

**Aude Lereu**

Directrice de recherche, Institut Fresnel, Marseilles

Rapportrice & Examinatrice

**Jean-Pierre Cloarec**

Professeur des universités, École centrale de Lyon

Rapporteur & Examineur

**Olivier Soppera**

Directeur de recherche, IS2M, Mulhouse

Examineur



**Titre :** Développement et validation d'un système in-situ d'imagerie par résonance de plasmons de surface pour le dosage d'éléments métalliques en eau douce et en milieu marin

**Mots clés :** Instrumentation optique, Capteur in-situ, Imagerie SPR multi-spectrale, Nanostructuration, Photopolymérisation

**Résumé :** Les ions métalliques provenant de sources naturelles ou d'activités anthropiques sont présents dans les eaux terrestres des nappes phréatiques jusqu'aux grands fonds océaniques. Leur influence sur les biotopes et la santé humaine, même à de très faibles concentrations, est activement étudiée. Jusqu'à présent, la plupart des analyses sont effectuées en laboratoire et il y a un besoin de développer un capteur in-situ pour fournir un moyen de surveillance de terrain.

Les capteurs basés sur la résonance de plasmon de surface (SPR) sont largement utilisés dans le domaine de la biodétection pour la surveillance d'espèces chimiques à des concentrations aussi faibles que le nanomolaires. Le type de capteurs SPR le plus courant est basé sur la mesure des variations de réflectivité d'un film d'or, de 50 nm d'épaisseur, lorsqu'une espèce cible est capturée par des récepteurs chimiques greffés à la surface d'or. La capacité d'imagerie de ce type de capteurs permet la détection simultanée de différentes espèces cibles. De plus, leur faible dynamique de mesure inhérente peut être surmontée par une interrogation des propriétés du plasmon grâce à l'utilisation d'une source de

lumière multi-spectrale. Ainsi, le film d'or est illuminé par un nombre fini de longueurs d'onde différentes et grâce à cet ensemble d'images, la position spectrale de la résonance plasmon est calculée sur l'ensemble du film d'or. L'adsorption d'une espèce chimique sur la surface entraîne un déplacement de cette position spectrale qui est proportionnel à la concentration. Cette source multi-spectrale, ainsi que l'ensemble des capteurs SPR, doit être compacte, économe en énergie et robuste, parmi d'autres contraintes liées à l'application sous-marine.

Afin de détecter les ions métalliques, les polymères à empreinte ionique (IIP) ont été choisis comme récepteurs chimiques spécifiques. La spécificité d'un IIP aux ions imprimés provient à la fois de l'interaction électrostatique et de la géométrie des cavités spécifiques figées dans la matrice de polymère. Une méthode a été développée afin de synthétiser et de greffer ces polymères sous forme de couches minces sur la surface d'or et de contrôler leur épaisseur à l'échelle nanométrique. La détection du cuivre et du zinc a été réalisée à des concentrations de l'ordre de 500 nM dans des échantillons contrôlés et en laboratoire.

**Title :** Development and validation of an in-situ surface plasmon resonance imaging system for the detection of metallic elements in freshwater and seawater

**Keywords :** Optical Instrumentation, In-situ sensor, Multi-spectrale imaging SPR, Nanostructuration, Photopolymerisation

**Abstract :** Metallic ions coming from natural sources or antropogenic activities are present in the Earth waters from phreatic tables to deep oceans. Their influence on the biotopes and the human health, even at very low concentrations, is actively studied. So far, most of the analyzes are done in laboratories and there is a necessity to develop an in-situ sensor to provide a in-field means of monitoring.

Surface Plasmon Resonance (SPR) based sensors are widely used in the biodetection field for the monitoring of chemical species at concentration as low as nanomolar. The most common type of SPR sensors is based on the measure of the reflectivity variations, of a 50 nm thick gold film, when a target chemical specie is captured by molecular probes grafted on the gold surface. The imaging capacity of this type of sensors allow the simultaneous detection of differents chemical species. Moreover, their inherent low working range can be overcome by an interrogation of the plasmon properties through the use of a multispectral light source. Thus, the gold film is illu-

minated by a finite number of different wavelengths and thanks to this set of images, the spectral position of the plasmonic resonance is calculated over the whole gold film. The adsorption of a chemical specie on the surface leads to a shift of this spectral position which is proportional to the concentration. This multispectral source, as well as the whole SPR sensors, needs to be compact, power efficient and robust, among other constraints related to submarine application.

In order to detect metallic ions, Ion Imprinted Polymers (IIP) have been chosen as specific molecular probes. The IIP specificity to imprinted ions comes from both electrostatic interaction and the geometry of specific cavities frozen in the polymer matrix. A method has been developed to synthesize and to graft these polymers as thin films on the gold surface and to control their thickness at the nanometric scale. Detection of copper and zinc has been achieved at concentrations as low as about 500 nM in controlled samples and in a laboratory environment.

*The pessimist sees difficulty in every opportunity.  
The optimist sees opportunity in every difficulty.*

Wilson Churchill

*La Terre est le berceau de l'humanité,  
mais nul ne reste éternellement dans son berceau.*

Konstantin Tsiolkovski

# TABLE DES MATIÈRES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction Générale</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1 Introduction à la notion de plasmon polariton de surface</b>                    | <b>7</b>  |
| 1.1 Fondements . . . . .   | 8         |
| 1.1.1 Une expérience historique . . . . .  | 8         |
| 1.1.2 Plasmon de surface, mode guidé de l'interface métal/diélectrique . . . . .     | 10        |
| 1.1.3 Comment exciter un plasmon de surface? . . . . .                               | 14        |
| 1.2 Le couplage lumière/plasmon de surface . . . . .                                 | 17        |
| 1.2.1 La résonance plasmon . . . . .   | 17        |
| 1.2.2 Confinement de l'énergie électromagnétique à l'échelle nanométrique . . . . .  | 20        |
| 1.3 Les biocapteurs SPR, une application de la plasmonique . . . . .                 | 22        |
| <b>2 Positionnement de l'instrument SURIMI dans le contexte technologique actuel</b> | <b>31</b> |
| 2.1 Techniques de détection d'ions métalliques . . . . .                             | 32        |
| 2.1.1 Techniques de routine de laboratoire . . . . .                                 | 32        |
| 2.1.2 Techniques basées sur les capteurs plasmoniques . . . . .                      | 35        |
| 2.2 Détecteurs plasmoniques portables . . . . .                                      | 43        |
| 2.3 Performances visées pour l'instrument SURIMI . . . . .                           | 46        |
| <b>3 Instrument SPR d'imagerie multi-spectrale</b>                                   | <b>49</b> |
| 3.1 L'imagerie SPR multi-spectrale . . . . .   | 50        |
| 3.1.1 Principes et intérêts . . . . .  | 50        |
| 3.1.2 Structure d'un instrument d'imagerie SPR multi-spectrale . . . . .             | 53        |
| 3.2 Algorithme de reconstruction de la résonance . . . . .                           | 54        |
| 3.2.1 Présentation générale . . . . .  | 54        |
| 3.2.2 Développement de l'algorithme . . . . .  | 57        |
| 3.2.3 Étude des performances de l'algorithme . . . . .                               | 69        |
| 3.3 Instrumentation . . . . .  | 72        |
| 3.3.1 Le système optique . . . . .   | 72        |
| 3.3.2 La cellule de microfluidique . . . . .   | 76        |
| 3.3.3 L'Interface Humain Machine . . . . .   | 77        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.4      | Validation de l'instrument . . . . .  | 79         |
| 3.4.1    | Validation du système optique . . . . .   | 79         |
| 3.4.2    | Expérience validatrice : interaction de séquences d'ADN . . . . .                   | 85         |
| <b>4</b> | <b>Conception d'une biopuce plasmonique spécifique aux ions métalliques</b>         | <b>89</b>  |
| 4.1      | Biomimétisme : les polymères à empreinte . . . . .                                  | 90         |
| 4.1.1    | Principe et intérêts . . . . .  | 90         |
| 4.1.2    | Les polymères à empreinte ionique . . . . .   | 92         |
| 4.1.3    | Synthèse de films minces . . . . .  | 94         |
| 4.2      | Photopolymérisation UV . . . . .  | 98         |
| 4.2.1    | Les premiers pas . . . . .  | 98         |
| 4.2.2    | Photopolymérisation sous atmosphère inerte . . . . .                                | 105        |
| 4.2.3    | Suivi de la photopolymérisation par SPRI. . . . .                                   | 110        |
| 4.3      | Photopolymérisation déclenchée par le plasmon . . . . .                             | 115        |
| 4.3.1    | Principe et intérêt. . . . .  | 115        |
| 4.3.2    | Validation de la méthode. . . . .   | 116        |
| 4.3.3    | Nanostructuration de la surface d'or par des IIP . . . . .                          | 122        |
| 4.3.4    | Étude du processus de photopolymérisation déclenchée par le plasmon . . . . .       | 131        |
|          | <b>Conclusion et perspectives</b>   | <b>140</b> |
| <b>A</b> | <b>Protocole de synthèse d'une SAM d'Allyl Mercaptan sur l'or</b>                   | <b>145</b> |
| <b>B</b> | <b>Protocoles de la préparation des formulations de IIP et de NIP</b>               | <b>149</b> |
| <b>C</b> | <b>Interface Humain Machine de l'instrument MS-SPRI</b>                             | <b>155</b> |
| <b>D</b> | <b>Modèle lorentzien de la résonance plasmon et calcul de sa position spectrale</b> | <b>163</b> |
|          | <b>Remerciements</b>  | <b>178</b> |





# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet SURIMI (SURface plasmon Resonance for In situ detection of Metallic Ions) dirigé par l'Ifremer et financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Il est né du besoin d'un détecteur permettant la mesure in situ de la concentration des ions métalliques présents dans les océans et le reste des eaux de la Terre. Ces ions proviennent pour certains de sources naturelles comme les cheminées volcaniques ou les gisements miniers situés au fond des océans mais également de sources anthropiques liées à l'activité industrielle. Certains de ces ions métalliques comme le cuivre et le zinc sont essentiels à la vie et leur rôle dans le fonctionnement du biotope océanique, notamment au niveau des grands fonds. Ceci est un sujet de recherche d'actualité dans la communauté scientifique. D'autres ions métalliques comme le cadmium et le mercure sont toxiques pour la plupart des être vivants et ce même à l'état de traces. Il est donc important de pouvoir surveiller leurs concentrations dans les différentes eaux de la Terre.

Jusqu'à présent, ces études et surveillances sont majoritairement réalisées en laboratoire sur des échantillons qui ont été prélevés sur le terrain et qui sont donc analysés dans des conditions pouvant être relativement différentes de celles de l'environnement étudié. Notamment, les méthodes actuelles ne permettent pas de réaliser des relevés en continu de la concentration des ions métalliques dans des zones aussi reculées que les grands fonds océaniques. L'étude de leur influence directe sur les écosystèmes d'un biotope donné nécessite le développement d'un détecteur pouvant réaliser le dosage in situ de ces ions.

L'objectif général du projet SURIMI est de développer un détecteur permettant la détection in situ de différents ions métalliques, suffisamment sensible pour détecter des quantités sous forme de traces et suffisamment robuste pour fonctionner dans des environnements très difficiles comme les grands fonds océaniques. Il y a deux applications visées par ce projet : la principale concerne la détection des ions cuivre, nickel, zinc et mercure dans les eaux océaniques et une deuxième consiste à une miniaturisation du détecteur afin d'en faire un instrument portable autorisant la détection de polluants comme le cadmium, le mercure, le plomb ou le nickel dans les eaux des rivières, des nappes phréatiques ou des lacs.

Le projet coordonné par l'Ifremer regroupe plusieurs partenaires qui sont le Bureau de Recherche Géologique et Minière (BRGM), le Laboratoire Sciences Analytiques Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM), le Laboratoire Charles Fabry (LCF), le Laboratoire Nanotechnologies et Na-

nos systèmes (LN2), l'entreprise Klearia et le laboratoire Takuvik.

Ces travaux de thèse ont été essentiellement réalisés au LCF et en étroite collaboration avec le LSABM. Ils portent sur le développement d'un instrument d'imagerie multi-spectral par résonance plasmon portable et d'une biopuce nanostructurée par des plots de polymère à empreinte ionique. Une technologie se basant sur la résonance de plasmon de surface (SPR) a été retenue pour le détecteur SURIMI car elle ne nécessite aucun marquage des espèces à détecter, offre une grande sensibilité et a déjà été déployée dans de nombreux systèmes portables. Le système optique conçu doit être complété par le développement d'une biopuce permettant la capture spécifique de certains ions métalliques. Elle repose sur l'utilisation de polymères à empreintes ioniques dont la recette a été mise au point par le LSABM. Afin que l'utilisation de ce polymère soit compatible avec la détection plasmonique, il a été nécessaire d'adapter ce protocole afin de réaliser la synthèse du polymère sur un film d'or et de contrôler son épaisseur à l'échelle nanométrique.

Ainsi, la première partie de ce manuscrit commence par une introduction très générale au domaine de la plasmonique et à des concepts théoriques nécessaires pour la suite. Elle se termine par un état de l'art sur les technologies actuelles permettant la détection des ions métalliques visés par le projet SURIMI en se concentrant essentiellement sur des technologies plasmoniques portables. Ensuite, le troisième chapitre traite de la conception instrumentale du détecteur et notamment du développement d'un nouvel algorithme permettant de réaliser l'imagerie SPR multi-spectrale en temps réel. Enfin, le dernier chapitre concerne l'élaboration d'un protocole de nanostructuration de la biopuce plasmonique par des plots de polymères à empreinte ionique et met en avant une méthode innovante basée sur la photopolymérisation déclenchée par le plasmon de surface.





# 1

## INTRODUCTION À LA NOTION DE PLASMON POLARITON DE SURFACE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.1 Fondements</b> . . . . .   | <b>8</b>  |
| 1.1.1 Une expérience historique . . . . .   | 8         |
| 1.1.2 Plasmon de surface, mode guidé de l'interface métal/diélectrique. . . . .     | 10        |
| 1.1.3 Comment exciter un plasmon de surface? . . . . .                              | 14        |
| <b>1.2 Le couplage lumière/plasmon de surface</b> . . . . .                         | <b>17</b> |
| 1.2.1 La résonance plasmon . . . . .  | 17        |
| 1.2.2 Confinement de l'énergie électromagnétique à l'échelle nanométrique . . . . . | 20        |
| <b>1.3 Les biocapteurs SPR, une application de la plasmonique</b> . . . . .         | <b>22</b> |

## 1.1. FONDEMENTS

### 1.1.1. UNE EXPÉRIENCE HISTORIQUE

Cette année 1959, Powell et Swan mirent en place une expérience permettant de corroborer les premiers modèles théoriques sur les plasmons de volume et les plasmons de surface proposés quelques années plus tôt par Pines [PINES, 1956] et Ritchie [RITCHIE, 1957]. Ces premiers ont mesuré le spectre d'absorption d'énergie d'un faisceau d'électrons primaires qui a été diffusé par un film métallique par une technique de spectroscopie de perte d'énergie d'électrons (Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS). La mesure a été réalisée en réflexion et répétée pour différentes épaisseurs de films métalliques ultra-purs d'aluminium [POWELL et SWAN, 1959a] et de magnésium [POWELL et SWAN, 1959b], et différentes énergies du faisceau d'électrons primaires. Le type de spectre EELS obtenu dans le cas de l'aluminium est présenté sur la figure 1.1. La caractéristique essentielle de ce type de spectre est la présence d'un double pic qui se répète à intervalles réguliers à la façon d'un fondamental et de ses harmoniques. Ces pics bien définis suggèrent une quantification de la perte d'énergie des électrons primaires du faisceau incident qui peut s'expliquer par l'excitation d'une oscillation collective des électrons de conduction du métal; c'est un plasmon! Dans le cas de l'aluminium, si  $n$  est un entier positif, le pic de plus forte intensité et celui de plus faible intensité se situent tous les  $(n + 1) \times 15,3$  eV et  $(n + 1) \times 10,3$  eV respectivement. Le rapport entre les valeurs des pertes d'énergie associées à ces deux pics est d'environ 1,49 ce qui est légèrement supérieur à  $\sqrt{2}$ .

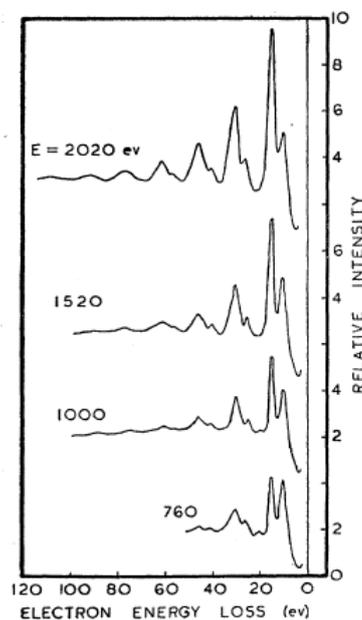


FIGURE 1.1 – Spectre EELS en réflexion de l'aluminium pour différentes énergies d'électrons primaires. Le pic de la diffusion élastique a été retiré [POWELL et SWAN, 1959a].

Il est possible de retrouver, de façon théorique, la valeur de ce rapport par un modèle très simple en faisant appel à la notion de condensateur plan. Le film d'aluminium de l'expérience de Powell et Swan est modélisé par un réseau fixe d'ions positifs sur lequel peuvent se déplacer un gaz d'électrons libres, les interactions entre électrons sont négligées. En l'absence d'une quelconque pertur-

bation, le film métallique est globalement et localement neutre, il n'y a pas de déplacement significatif de charges (figure 1.2 (a)). Une perturbation, de nature quelconque, peut être appliquée au film d'aluminium, déplaçant le gaz d'électrons d'une distance  $+x$  ( $x > 0$ ). Il va alors apparaître une distribution de charges qui n'est localement plus nulle (voir figure 1.2 (b)). Cette nouvelle distribution de charges va créer un champ électrique  $E\mathbf{u}_x$  ( $E > 0$ ). Sous l'effet de ce champ électrique, le gaz d'électrons va se déplacer dans le sens des  $x$  décroissants. Si toute source de frottements est négligée, le gaz d'électrons, sous l'effet de son inertie, va se déplacer d'une distance  $-x$  ( $x > 0$ ) par rapport à sa position d'équilibre (figure 1.2 (a)). Cette nouvelle distribution de charges va créer un champ électrique,  $-E\mathbf{u}_x$ . Un mouvement d'oscillations du gaz d'électrons va alors se mettre en place.

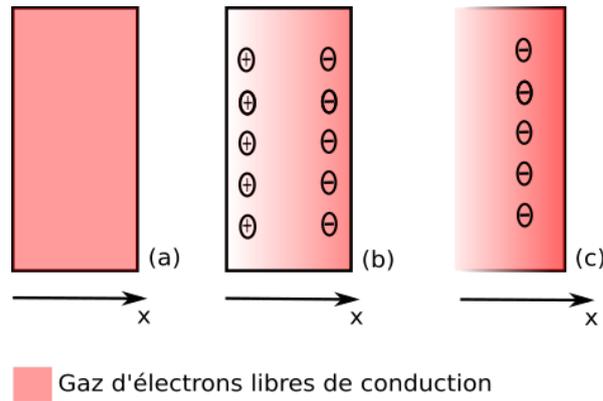


FIGURE 1.2 – (a) Film métallique sans perturbation. Oscillation du gaz d'électrons de conduction dans le cas d'un film métallique (b) et zoom sur l'une des deux interfaces (c)

L'équation du mouvement d'oscillations du gaz d'électrons va s'écrire :

$$m \frac{d^2 x(t)}{dt^2} = -eE(x(t)) \quad (1.1)$$

$m$  et  $e$  étant respectivement la masse et la charge de l'électron.

Afin d'établir une expression explicite de  $E(x(t))$ , la distribution de charge présentée dans la figure 1.2 (b) est assimilée celle d'un condensateur plan. Le champ électrique créé par cette distribution de charge s'écrit donc  $\sigma/\epsilon_0 \mathbf{u}_x$ ,  $\sigma$  étant la valeur absolue de la charge surfacique d'une interface et  $\epsilon_0$  la permittivité diélectrique du vide. Si la densité volumique d'électrons du métal est notée  $n$ , la charge surfacique s'exprime simplement comme :  $n \times e \times x(t)$ . L'équation du mouvement se réécrit donc comme :

$$\frac{d^2 x(t)}{dt^2} + \frac{ne^2}{m\epsilon_0} x(t) = 0 \quad (1.2)$$

C'est l'équation d'un oscillateur harmonique dont la pulsation d'oscillation est :

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\epsilon_0}} \quad (1.3)$$

Dans le cas de l'oscillation d'un gaz d'électrons libres, cette pulsation est appelée pulsation plasma. Elle correspond à la fréquence d'oscillation du gaz d'électrons dans tout le volume du film métallique. Ce type d'oscillations est appelé : plasmon de volume. Par ailleurs, le film ayant une extension spatiale finie, il est intéressant d'étudier ce qu'il se passe au niveau de ses interfaces avec le milieu extérieur (figure 1.2 (c)). Cette situation revient à considérer un métal semi-infini ou bien à se focaliser sur une seule des deux interfaces. Elle peut être modélisée par un plan chargé uniformément avec une densité surfacique de charge notée :  $\sigma$ . Le champs électrique créé par cette unique interface s'écrit donc :  $\sigma/2\epsilon_0\mathbf{u}_x$ . Le facteur 2 traduit le fait qu'il n'y a qu'une interface chargée qui est à l'origine du champs électrique contrairement au cas du condensateur plan pour lequel les champs électriques créés par les deux interfaces, chargées uniformément avec la même densité surfacique de charge  $\sigma$  mais de signe opposée, s'ajoutent. L'équation du mouvement d'oscillations des électrons à l'interface du film métallique s'écrit alors :

$$\frac{d^2 x(t)}{dt^2} + \frac{ne^2}{2m\epsilon_0} x(t) = 0 \quad (1.4)$$

Le mode d'oscillation surfacique du gaz d'électrons à l'interface est appelé : plasmon de surface. La pulsation de ce mode de surface est égale à  $\omega_p/\sqrt{2}$ .

En résumé, sous l'effet d'une perturbation initiale, le gaz d'électrons de conduction peut se mettre à osciller dans le métal. Deux modes sont envisageables : un mode en volume caractérisé par la pulsation plasma  $\omega_p$  et un mode en surface caractérisé par la pulsation  $\omega_p/\sqrt{2}$ . Dans le cas de l'expérience de Powell et Swan, la perturbation est amenée par le faisceau d'électrons primaires. Lorsque ces derniers sont diffusés par le film métallique, ils excitent les plasmons de volume et de surface et transmettent ainsi une partie de leur énergie à ces deux modes. La répartition de cette énergie entre les deux modes est donnée par le rapport entre l'énergie transmise au plasmon de volume et celle au plasmon de surface qui vaut  $\sqrt{2}$  en accord avec la valeur mesurée de 1,49 [POWELL et SWAN, 1959a]. La quantification des échanges d'énergie entre le faisceau d'électrons primaires et le film métallique donne naissance à des harmoniques qui apparaissent dans le spectre EELS présenté sur la figure 1.1.

Dans la suite, seul le mode en surface sera étudié car il possède des propriétés importantes qui peuvent être exploitées afin, entre autres, de trouver une application dans les biocapteurs. Notamment, le confinement naturel de l'énergie électromagnétique de ce mode très proche de la surface le rend très sensible aux changements d'indice de réfraction qui peuvent survenir, par exemple, lors de l'adsorption d'espèce chimique à la surface.

### 1.1.2. PLASMON DE SURFACE, MODE GUIDÉ DE L'INTERFACE MÉTAL/DIÉLECTRIQUE

Il a été vu qu'un plasmon de surface peut être décrit par l'oscillation collective des électrons de conduction à la surface d'un métal qui génère une onde électromagnétique se propageant le long de l'interface. D'un point de vu de l'optique, ce phénomène est à étudier dans le domaine des ondes

guidées. La situation la plus simple pour modéliser ce qu'il se passe dans l'expérience de Powell et Swan, est de ne considérer qu'une seule interface entre le métal et le diélectrique. Cela revient à traiter le cas de deux milieux semi-infini (figure 1.3).

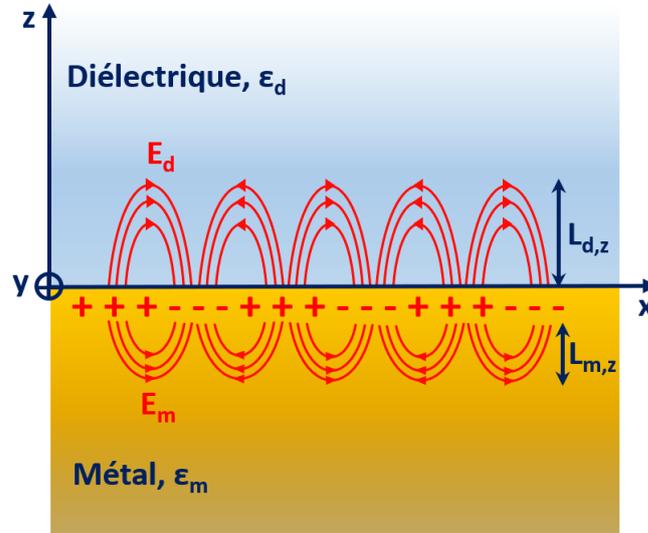


FIGURE 1.3 – Représentation du plasmon de surface qui est un mode électromagnétique guidé à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique. Il génère un champs électrique de polarisation elliptique dans le plan (Oxz). Les distances de pénétration du champ évanescents sont  $L_{d,z} \sim 200 \text{ nm}$  et  $L_{m,z} \sim 20 \text{ nm}$  dans le milieu diélectrique et le milieu métallique, respectivement.

Un mode électromagnétique de ce système correspond à une solution de l'équation d'onde homogène qui découle des équations de Maxwell sans source extérieur :

$$\Delta \mathbf{E} - \frac{\epsilon}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (1.5)$$

avec  $\epsilon$  la permittivité diélectrique du milieu considéré. Cette équation peut être résolue indépendamment dans chacun des deux milieux puis la solution globale est obtenue grâce aux relations de continuité à l'interface.

La prise en compte de la géométrie du système permet de faciliter la résolution du problème. Une onde guidée se propage selon la direction des x croissants le long d'une surface infinie selon la direction y et semi-infinie suivant la direction z. De manière générale, la dépendance temporelle du champs électrique est considérée comme harmonique. Ce dernier peut donc s'écrire sous la forme :  $\mathbf{E}(x,z,t) = \mathbf{E}(z)e^{i(\omega t - \beta x)}$ ,  $\beta$  étant le vecteur d'onde selon la direction de propagation.

L'équation d'Helmholtz pour le champs électrique est obtenue en introduisant cette expression dans l'équation (1.5) :

$$\frac{\partial^2 \mathbf{E}(z)}{\partial z^2} + (\epsilon k_0^2 - \beta^2) \mathbf{E}(z) = 0 \quad (1.6)$$

avec  $k_0$  le vecteur d'onde dans le vide. Cette équation est également valable pour le champ magnétique  $\mathbf{H}$ . Une solution de l'équation (1.6) s'écrit sous la forme :

$$\mathbf{E}(z) = \mathbf{E}_0^+ e^{i\gamma z} + \mathbf{E}_0^- e^{-i\gamma z} \quad \text{où } \gamma^2 = \epsilon k_0^2 - \beta^2 \quad (1.7)$$

Le signe devant  $\gamma$  dans l'argument de l'exponentielle doit rendre compte du caractère évanescent du champ selon la direction  $z$  dans chacun des milieux considérés pour que la solution corresponde à un mode guidée. Avec cette convention de signe, il est nécessaire que la partie imaginaire de  $\gamma$  soit positive dans chacun des deux milieux. Ainsi, dans le milieu diélectrique pour  $z > 0$  (*resp.* métallique pour  $z < 0$ ), la solution qui correspond à une onde guidée à l'interface retient le terme  $\mathbf{E}_0^+ e^{i\gamma z}$  (*resp.*  $\mathbf{E}_0^- e^{-i\gamma z}$ ).

Ensuite, les différentes composantes du champ électromagnétique de l'onde guidée peuvent être obtenues grâce aux équations de Maxwell et en prenant en compte la géométrie du problème. Il vient alors deux jeux d'équations, l'un correspondant à une onde polarisée transverse magnétique (TM) et l'autre polarisée transverse électrique (TE) [MAIER, 2007]. Une onde TM a son champ magnétique strictement suivant la direction  $y$  et son champ électrique suivant les directions  $x$  et  $z$  (fig 1.3). Dans le cas d'une polarisation TM :

$$\begin{aligned} E_x &= -i \frac{1}{\omega \epsilon_0 \epsilon} \frac{\partial H_y}{\partial z} \\ E_z &= -\frac{\beta}{\omega \epsilon_0 \epsilon} H_y \end{aligned} \quad (1.8)$$

avec  $H_y$  qui vérifie l'équation d'onde (1.6).

Les composantes de l'onde électromagnétique polarisée TM peuvent alors s'exprimer dans le milieu diélectrique pour  $z > 0$  :

$$\begin{aligned} H_y &= H_0 e^{-i(\omega t - \beta x)} e^{i\gamma_d z} \\ E_x &= H_0 \frac{\gamma_d}{\omega \epsilon_0 \epsilon_d} e^{-i(\omega t - \beta x)} e^{i\gamma_d z} \\ E_z &= -H_0 \frac{\beta}{\omega \epsilon_0 \epsilon_d} e^{-i(\omega t - \beta x)} e^{i\gamma_d z} \end{aligned} \quad (1.9)$$

et dans le milieu métallique pour  $z < 0$  :

$$\begin{aligned} H_y &= H_0 e^{-i(\omega t - \beta x)} e^{-i\gamma_m z} \\ E_x &= -H_0 \frac{\gamma_m}{\omega \epsilon_0 \epsilon_m} e^{-i(\omega t - \beta x)} e^{-i\gamma_m z} \\ E_z &= -H_0 \frac{\beta}{\omega \epsilon_0 \epsilon_m} e^{-i(\omega t - \beta x)} e^{-i\gamma_m z} \end{aligned} \quad (1.10)$$

Par continuité à l'interface, l'amplitude du champ magnétique  $H_0$  est la même dans les deux milieux.

De plus, la composante tangentielle du champ électrique est continue à l'interface, alors :

$$\frac{\gamma_d}{\epsilon_d} = -\frac{\gamma_m}{\epsilon_m} \quad (1.11)$$

D'après l'équation (1.6), la relation qui lie  $\gamma$  et  $\beta$  permet d'écrire :

$$\begin{aligned} \gamma_d^2 &= \epsilon_d k_0^2 - \beta^2 \\ \gamma_m^2 &= \epsilon_m k_0^2 - \beta^2 \end{aligned}$$

en combinant ces relations avec l'équation (1.11), la relation de dispersion de l'onde guidée se propageant selon la direction  $x$  et polarisée transverse magnétique s'écrit :

$$\beta = \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} k_0 \quad (1.12)$$

C'est la relation de dispersion du plasmon de surface en tant que mode électromagnétique guidé de l'interface. Dans le domaine des ondes guidées, le coefficient  $\sqrt{\epsilon_d \epsilon_m / (\epsilon_d + \epsilon_m)}$  est appelé l'indice de réfraction effectif du guide d'onde. De la même façon, la composante normale du vecteur d'onde s'exprime comme :

$$\gamma_j = |\epsilon_j| \sqrt{\frac{1}{\epsilon_d + \epsilon_m}} k_0, \quad j = d, m \quad (1.13)$$

Pour que l'onde guidée soit propagative dans la direction  $x$ , il faut que la partie réelle de  $\beta$  soit non nulle. Pour qu'elle soit strictement confinée à l'interface entre les deux milieux, il faut que la composante normale de son vecteur d'onde  $\gamma_j$ , soit purement imaginaire. Ces deux conditions imposent des contraintes sur les parties réelles et imaginaires des permittivités des deux milieux.

Dans un premier temps, les parties imaginaires des permittivités vont être considérées comme négligeables ce qui est le cas pour les métaux nobles et les diélectriques dans le proche infrarouge ( $\epsilon_{Au}(\lambda = 750 \text{ nm}) \approx -20 + 1,2i$  et  $\epsilon_{air}(\lambda = 750 \text{ nm}) \approx 1$ ). Ainsi, pour que  $\gamma_j$  soit purement imaginaire, il est nécessaire que la somme  $\epsilon_d + \epsilon_m$  soit négative. De même, pour que  $\beta$  possède une partie réelle non nulle, il faut que le produit  $\epsilon_m \epsilon_d$  soit également négatif. Il faut donc que les parties réelles des permittivités des deux milieux soient de signe opposé et qu'en valeur absolue, l'une soit supérieure à l'autre. Une interface métal/diélectrique remplit donc bien les deux conditions qui permettent d'obtenir une onde guidée de surface. Si la partie imaginaire de la permittivité du métal n'est pas négligée, le vecteur d'onde  $\beta$  possédera une partie imaginaire non nulle ce qui se traduit physiquement par une atténuation du plasmon de surface lors de sa propagation. La valeur absolue dans (1.13) permet d'assurer que la partie imaginaire de  $\gamma_j$  soit positive dans les deux milieux pour respecter la convention de signe choisie.

Un plasmon de surface résulte donc du couplage entre une onde électromagnétique polarisée TM et l'oscillation longitudinale des électrons de conduction à l'interface entre un métal et un di-

électrique. Le champ électrique est quant à lui polarisé elliptiquement dans le plan (Oxz) (fig 1.3). En effet, la composante normale  $\gamma$  du vecteur d'onde présente dans l'expression de la composante  $E_x$  étant complexe, elle introduit donc un déphasage de  $\frac{\pi}{2}$  entre les composantes  $E_x$  et  $E_z$ .

Le traitement mathématique du cas d'une onde polarisée TE est analogue au précédent. La détermination de la relation de dispersion dans ce cas montre qu'il ne correspond pas à un mode guidé de l'interface. En effet, l'équivalent de la relation (1.11) s'écrit :

$$\gamma_d + \gamma_m = 0 \quad (1.14)$$

Or, pour obtenir une onde évanescente, il a été vu que  $\text{Im}(\gamma_d) > 0$  et  $\text{Im}(\gamma_m) > 0$  en accord avec la convention de signe choisie. La condition ci-dessus ne peut donc pas être remplie, il n'existe pas de mode guidé dans le cas d'une polarisation TE pour une interface entre un métal et un diélectrique.

La relation de dispersion qui a été établie dans cette partie va permettre d'étudier les propriétés du plasmon de surface. Dans la suite, le principe d'excitation d'un plasmon de surface va être abordé et une méthode optique sera présentée. En outre, dans la section 1.2.2, les distances de pénétration de l'onde évanescente dans les milieux diélectriques et métalliques vont être calculées.

### 1.1.3. COMMENT EXCITER UN PLASMON DE SURFACE ?

Pour exciter efficacement un mode guidé, il faut respecter la condition d'accord de phase entre l'onde excitatrice et le mode. Cela se traduit par l'égalité du vecteur d'onde d'excitation avec la partie réelle du vecteur d'onde du mode. Afin de visualiser cette condition, il est intéressant de tracer la relation de dispersion dans le cas d'une interface entre l'or et l'air (fig 1.4). La permittivité du milieu diélectrique, indépendante de la fréquence (milieu non dispersif), vaut  $\epsilon_d = 1$ . La permittivité diélectrique de l'or, qui dépend de la longueur d'onde, est exprimée à l'aide du modèle de Drude :

$$\epsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\nu)} \quad (1.15)$$

$\omega_p$  étant la pulsation plasma introduite précédemment et  $\nu$  est le taux d'atténuation décrivant les pertes dans le métal. Ce modèle très simpliste fonctionne correctement dans le visible et proche infrarouge. À titre d'exemple, dans le cas de l'or,  $\omega_p = 13,7 \cdot 10^{15} \text{ rad.s}^{-1}$  et  $\nu = 3 \cdot 10^{13} \text{ s}^{-1}$  [MERMINE et ASHCROFT, 1976]. Ainsi, pour des fréquences qui couvrent le proche infrarouge et le visible, le taux d'atténuation peut être négligé par rapport à la pulsation  $\omega$ . La relation de Drude se simplifie en :

$$\epsilon_m \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}.$$

Une expression analytique approchée de la relation de dispersion peut alors s'écrire :

$$\beta \approx \sqrt{\frac{\epsilon_d \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}\right)}{\epsilon_d + 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}}} k_0 \quad (1.16)$$

D'après la relation ci-dessus, pour des grandes valeurs du vecteur d'onde plasmon  $\beta \rightarrow +\infty$ , la pulsation  $\omega$  tend vers  $\omega_s = \frac{\omega_p}{\sqrt{1+\epsilon_d}}$  qui est la valeur asymptotique sur la figure 1.4. Dans le cas des expériences de EELs, le faisceau d'électrons permet d'exciter un plasmon de surface pour des vecteurs d'onde allant jusqu'à  $3.10^9 \text{ m}^{-1}$ . D'après la relation de dispersion, la pulsation à laquelle est excitée un plasmon de surface, pour des vecteurs d'onde si grands, vaut  $\omega_s$ . Pour une interface métal/vide,  $\epsilon_d = 1$  et  $\omega_s = \frac{\omega_p}{\sqrt{2}}$  qui est en accord avec les observations expérimentales faites par Powell et Swan et présentées dans la partie précédente. La technique EELs est donc très bien adaptée pour aller sonder la relation de dispersion pour  $\beta \rightarrow +\infty$  mais ne convient pas pour explorer la partie linéaire pour  $\beta \rightarrow 0$ . En effet, à cause de la divergence minimale du faisceau d'électrons, la résolution en vecteur d'onde  $\Delta\beta = 3.10^7 \text{ m}^{-1}$  de cette technique est du même ordre de grandeur que la gamme de vecteurs d'onde sur laquelle la relation de dispersion est linéaire [RAETHER, 1988]. Cependant, cette gamme peut-être explorée à l'aide de la lumière.

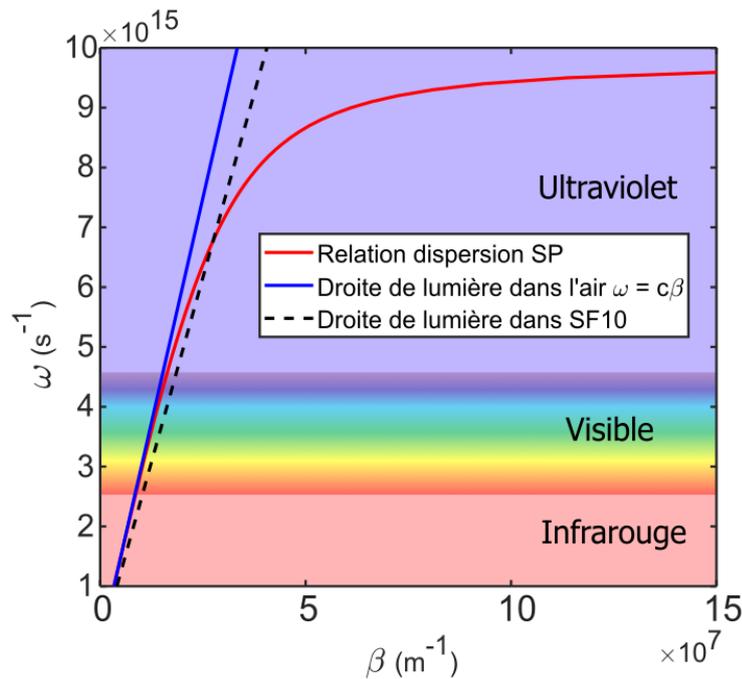


FIGURE 1.4 – Relation de dispersion du plasmon de surface à l'interface or/air (courbe rouge) dans le cas où la permittivité diélectrique de l'or est calculée à l'aide du modèle de Drude.

La droite bleue représente la droite de lumière dans l'air. La relation de dispersion du plasmon est tangente à cette droite pour des faibles fréquences et tend vers une asymptote horizontale, définie par  $\omega = \omega_s$ , pour les grandes valeurs du vecteur d'onde. Pour une fréquence donnée, le vecteur d'onde plasmon est toujours plus grand que le vecteur d'onde de la lumière à cause de l'inertie des électrons du métal qui supportent le plasmon de surface; la réponse des électrons de conduction n'étant pas instantanée. En effet, entre deux changements de direction du champs électrique exciteur, la distance parcourue par les électrons dans le métal est inférieure à la longueur d'onde. Il n'est donc pas possible d'exciter les plasmons de surface (SP) avec une onde lumineuse se propageant

dans l'air car la condition de conservation du vecteur d'onde ne peut pas être atteinte. Toutefois, il existe différentes techniques expérimentales pour parvenir à valider cette condition qui ont toutes pour but d'augmenter le vecteur d'onde de la lumière incidente. Parmi elles, trois méthodes sont présentées sur la figure 1.5.

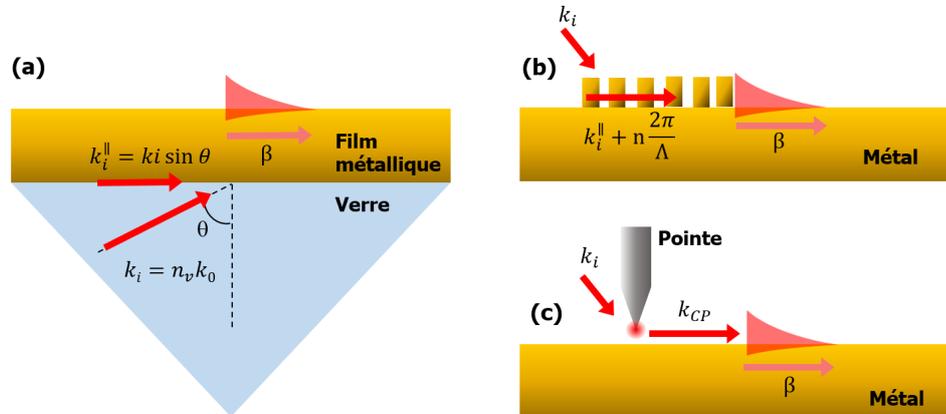


FIGURE 1.5 – Différentes techniques optiques pour exciter un plasmon de surface (SP). **a.** Utilisation d'un prisme d'indice de réfraction  $n_v$ , configuration de Kretschmann. **b.** Utilisation d'un réseau de pas  $\Lambda$ . Le SP est excité par l'ordre  $n$  de diffraction. **c.** Utilisation d'une pointe de dimension sub-longueur d'onde. Le SP se couple avec l'onde diffusée en champ proche par la pointe.

La première correspond à la configuration de Kretschmann (fig 1.5.a). Elle consiste en un empilement multi-couches. Un film métallique est déposé sur un prisme de verre ayant un indice de réfraction  $n_v$ . La norme du vecteur d'onde incident est donc égale à  $n_v k_0$ , avec  $k_0$  le vecteur d'onde de la lumière dans le vide. Pour un angle d'incidence suffisamment élevé, sa projection  $k_i \sin \theta$  peut atteindre le vecteur d'onde plasmon si  $n_v$  est supérieur à l'indice de réfraction du milieu diélectrique ( $n_d = \sqrt{\epsilon_d}$ ) surplombant le métal. En pratique, cet angle d'incidence est plus grand que l'angle de réflexion total à l'interface entre le prisme de verre et le milieu diélectrique. Le plasmon de surface est excité par effet tunnel de l'onde évanescente produite à l'interface verre/métal. Ainsi, pour que le couplage soit possible, il existe une épaisseur du film métallique maximale qui dépend de sa nature. Pour des raisons qui seront discutées dans la suite, il existe également une épaisseur minimale pour un couplage efficace et pour une longueur d'onde incidente donnée. Typiquement, pour un film d'or, l'épaisseur optimale est de 50 nm pour une gamme de longueurs d'onde centrée autour de 700 nm (fig 1.7). Par ailleurs, la condition d'excitation du SP dans la configuration de Kretschmann est montrée graphiquement sur la figure 1.4 dans le cas où le substrat est en SF10. L'intersection de la droite noire en pointillés avec la courbe représentant la relation de dispersion du plasmon permet de lire la valeur maximale du vecteur d'onde du plasmon qui peut être excité. En réalité, l'égalité recherchée est entre la composante tangentielle du vecteur d'onde incident et du vecteur d'onde plasmon. Il faut donc corriger la pente de la courbe en pointillés par un facteur  $\sin \theta$ . L'excitation du plasmon de surface, par la lumière, peut donc être ajustée en modifiant l'angle d'incidence pour des longueurs d'onde dans le visible et dans le proche infrarouge. L'excitation à

l'aide de la lumière permet donc de sonder la partie linéaire de la relation de dispersion.

Le couplage entre la lumière incidente et le plasmon de surface peut également être réalisé à l'aide d'un réseau de diffraction qui structure localement la surface métallique (fig 1.5.b). L'augmentation de la valeur de la composante parallèle du vecteur d'onde incident dépend alors du pas du réseau et de l'ordre diffracté. Historiquement, les anomalies de Wood ont été observées avec cette configuration [WOOD, 1902]. Une troisième méthode consiste à exploiter le champs électromagnétique produit par une pointe de dimension sub-longueur d'onde (fig 1.5.c) éclairée par une onde en champ lointain. En effet, à la façon d'un dipôle, cette pointe produit en champ proche (pour des dimensions inférieures à  $\frac{\lambda}{2\pi}$ ), une onde évanescente dont la composante tangentielle à la surface métallique du vecteur d'onde peut être suffisamment grande pour égaliser celle du vecteur d'onde plasmon.

Grâce à ces différentes techniques, il est donc possible de coupler le plasmon de surface avec la lumière. Ce mode guidé possède des propriétés très particulières pouvant être exploitées de différentes façons. Notamment, le confinement et l'amplification du champs électromagnétique du plasmon lui confère une très grande sensibilité aux plus petites variations de l'indice de réfraction de l'environnement proche de la surface métallique. Ces variations modifient les propriétés optiques de l'interface qui peuvent être mesurées afin de réaliser des biocapteurs. Dans toute la suite de ce manuscrit, seule la configuration de Kretschmann sera considérée.

## 1.2. LE COUPLAGE LUMIÈRE/PLASMON DE SURFACE

### 1.2.1. LA RÉSONANCE PLASMON

Lorsque les conditions sont réunies, il existe une résonance du couplage entre la lumière et le plasmon de surface. L'énergie lumineuse incidente est transmise de façon très efficace au SP. Le film métallique qui se comportait comme un parfait miroir hors résonance devient un absorbeur. L'intensité du faisceau réfléchi à la sortie du prisme diminue rapidement à mesure que le vecteur d'onde incident se rapproche du vecteur d'onde plasmon.

La réponse optique du système peut être obtenue par une modélisation se basant sur les coefficients de réflexions de Fresnel. Soit un système verre/métal/diélectrique pour lequel le film métallique, avec une épaisseur notée  $d$ , est bordé par deux milieux semi-infinis. Le coefficient de réflexion en amplitude du système s'écrit [BORN et WOLF, 1999] :

$$r_{pmd} = \frac{r_{pm} + r_{md} e^{2i\gamma_m d}}{1 + r_{pm} r_{md} e^{2i\gamma_m d}} \quad (1.17)$$

avec, pour une polarisation TM :  $r_{ij} = \frac{\gamma_i \epsilon_j - \gamma_j \epsilon_i}{\gamma_i \epsilon_j + \gamma_j \epsilon_i}$  et  $(i,j) = p,m,d$ .  $\gamma_i$  étant la projection selon la direction  $z$  du vecteur d'onde incident dans le milieu  $i$  (fig 1.3).

Le coefficient de réflexion dépend de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence à travers  $\gamma_i$ .

À partir de l'équation (1.17), il est possible de simuler la réponse optique du système pour différentes longueurs d'onde et différents angles d'incidences. Dans la suite, la réflectivité  $R$  est calculée par normalisation du coefficient de réflexion en intensité pour une polarisation TM par celui pour une polarisation TE :  $R = \frac{|r_{pmd, TM}|^2}{|r_{pmd, TE}|^2}$ . L'étape de normalisation permet de corriger différents biais expérimentaux qui peuvent être présents dans un instrument SPR : l'homogénéité spectrale et spatiale de l'éclairement respectivement de la source et de la biopuce, les aberrations chromatiques des optiques, la réponse spectrale du capteur de la caméra, etc. La valeur de la réflectivité calculée en fonction de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence est représentée sous la forme d'une nappe sur la figure 1.6.a. La bande noire correspond à la résonance plasmon pour laquelle le couplage entre la lumière incidente et le plasmon de surface est maximal. En ajustant l'angle d'incidence, le SP peut être excité à différentes longueurs d'onde et réciproquement. La résonance plasmon est très étroite et intense pour des longueurs d'onde dans le proche infrarouge et s'élargit pour s'éteindre dans le bas du spectre visible. Dans le cas où le métal est de l'or, le SP ne peut plus être excité par la lumière à une longueur d'onde plus petite que 550 nm à cause de l'absorption de la lumière incidente par un mécanisme de transition inter-bandes. Pour exciter un SP à des longueurs d'onde dans le bas du spectre visible, l'or peut être remplacé par de l'argent ou de l'aluminium.

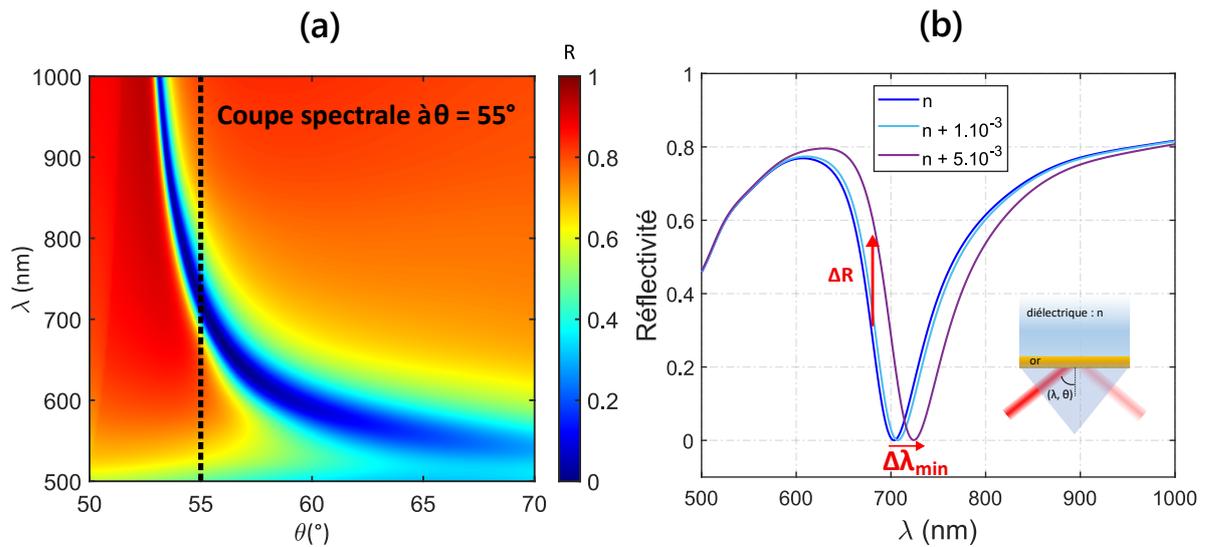


FIGURE 1.6 – **a.** Simulation de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence pour un prisme en SF10, un film d'or de 50 nm d'épaisseur et un milieu diélectrique d'indice de réfraction  $n = 1,333$ . Le système multi-couche est modélisé grâce aux coefficients de Fresnel. La résonance plasmon se manifeste comme une bande noire où la réflectivité est nulle. **b.** Coupe spectrale de la nappe de réflectivité à un angle d'incidence de  $55^\circ$  pour différents indices de réfraction du milieu diélectrique.

Il est possible de réaliser une coupe de la nappe de réflectivité à un angle d'incidence fixé afin de tracer l'évolution de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde d'excitation (fig 1.6).b. La courbe en bleu foncé correspond à la résonance pour un indice de réfraction  $n$  du milieu diélectrique. Si ce dernier augmente pour une raison quelconque, la résonance se décale vers les grandes longueurs d'onde. En effet, la valeur du vecteur d'onde plasmon décrit par la relation (1.12) qui tra-

duit le couplage de la lumière avec le SP, dépend des variations de  $\epsilon_d$ . Le plasmon de surface est très sensible aux petites variations de l'indice de réfraction proche de la surface. Typiquement une variation de l'indice de réfraction de  $5 \cdot 10^{-3}$  RIU (Refractive Index Unit) induit un déplacement de la résonance d'environ 20 nm!

Afin d'étudier plus en détails la résonance plasmon, une expression analytique de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde peut être obtenue à partir d'une approximation de l'expression (1.17). Sous la condition  $|\text{Re}(\epsilon_m)| \gg |\text{Im}(\epsilon_m)| \gg 1$ , un développement limité au premier ordre de l'équation (1.17) autour de  $k_i^{\parallel} = \beta$  donne [KRETSCHMANN, 1971] :

$$R = 1 - \frac{4\Gamma_{abs}\Gamma_{rad}}{(k_i^{\parallel} - (\beta + \Delta\beta))^2 + (\Gamma_{abs} + \Gamma_{rad})^2} \quad (1.18)$$

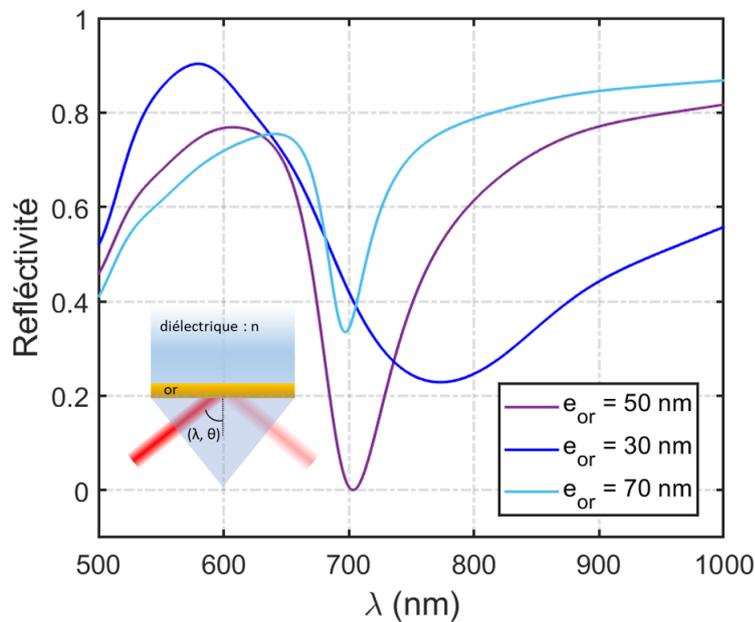


FIGURE 1.7 – Simulation de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde pour différentes épaisseurs de la couche d'or pour un même milieu diélectrique et un angle d'incidence fixé.

La réflectivité prend la forme d'une lorentzienne dont la position de résonance n'est plus donnée par le vecteur d'onde plasmon calculé dans le cas simple d'une interface entre un métal et un diélectrique. En effet, le système constitué du prisme en verre et du film métallique d'épaisseur finie est différent de celui qui a été considéré pour le calcul de (1.12). L'introduction du prisme modifie la condition de couplage du plasmon de surface avec la lumière :  $\beta \rightarrow \beta + \Delta\beta$ .  $\Delta\beta$  dépend des permittivités diélectriques des différents milieux mais également de l'épaisseur du film métallique.  $\Gamma_{abs} = \text{Im}(\beta)$  et  $\Gamma_{rad} = \text{Im}(\Delta\beta)$  correspondent respectivement aux taux d'atténuation liés à l'absorption de l'énergie du plasmon de surface lors de sa propagation à cause des pertes métalliques et aux pertes par radiation d'une partie de l'énergie qui est rétrodiffusée dans le prisme. Dans

la configuration de Kretschmaan, la lumière incidente est partiellement transmise, sous la forme d'une onde évanescente, à travers l'interface prisme/métal pour venir se coupler au plasmon de surface à l'interface métal/diélectrique. Cependant, si le film métallique n'est pas trop épais, le SP peut à nouveau se coupler avec le prisme et perdre de l'énergie par radiation en champs lointain dans la direction du faisceau réfléchi. Ainsi, pour une épaisseur optimale, l'onde rétrodiffusée peut interférer destructivement avec l'onde réfléchie : la réflectivité du système est strictement nulle. Si toutefois l'épaisseur du film métallique est trop petite, les pertes par radiations peuvent devenir importantes et le plasmon de surface perd en intensité ce qui détériore la résonance plasmon (fig 1.7). Pour les conditions de couplage optimales, le champ électromagnétique incident peut être amplifié de façon significative dans un très faible volume autour de l'interface métal/diélectrique. Cet aspect va maintenant être détaillé.

### 1.2.2. CONFINEMENT DE L'ÉNERGIE ÉLECTROMAGNÉTIQUE À L'ÉCHELLE NANOMÉTRIQUE

Le plasmon de surface étant par nature un mode guidé de l'interface, il possède une extension spatiale limitée dans la direction perpendiculaire à l'interface. La distance d'atténuation d'un facteur  $1/e$  de cette onde évanescente est donnée par la partie imaginaire de la composante transverse du vecteur d'onde plasmon :  $L_{j,z} = \frac{1}{\text{Im}(\gamma_j)}$  avec  $j = m, d$ . Cette distance qui s'exprime, entre autres, en fonction de la permittivité du métal est donc dépendante de la longueur d'onde. Dans le cas d'un SP excité à l'interface d'un film d'or et de l'eau pure pour une longueur d'onde de 750 nm,  $\epsilon_{or} \approx -20$  et  $\epsilon_{eau} \approx 1,78$ , alors  $L_{or,z} = 27$  nm et  $L_{eau,z} = 323$  nm. L'extension spatiale de l'onde évanescente est donc d'un ordre de grandeur plus grande dans le diélectrique.

En outre, la partie imaginaire de la permittivité diélectrique du métal n'étant pas strictement nulle, le SP est atténué lors de sa propagation le long de l'interface à cause des pertes dans le métal. La distance d'atténuation d'un facteur  $1/e$  est donnée par la partie imaginaire de la composante tangentielle du vecteur d'onde plasmon :  $L_{j,x} = \frac{1}{\text{Im}(\beta)}$ . Cette distance est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres.

$L_{j,z}$  et  $L_{j,x}$  sont également appelées longueur de pénétration et longueur de propagation du plasmon de surface respectivement. À titre d'exemple, l'évolution de ces grandeurs en fonction de la longueur d'onde est présentée sur la figure 1.8.a pour les métaux les plus fréquemment rencontrés en plasmonique. À noter qu'elles augmentent avec la longueur d'onde.

De manière générale, la réponse d'un oscillateur à la résonance est une amplification du signal d'excitation. Ainsi, le champs électromagnétique incident est amplifié par le couplage avec le plasmon de surface. Le coefficient d'amplification en intensité s'exprime comme le rapport des normes du champ électrique à l'interface métal/diélectrique et du champ électrique incident au carré. Ce rapport correspond au coefficient de transmission en intensité du système multi-couches :  $t_{pmd}^2 = \frac{|\mathbf{E}_{md}|^2}{|\mathbf{E}_{pm}|^2}$ . En utilisant les mêmes approximations qui ont permis d'obtenir (1.18), une expression analytique qui dépend de la longueur d'onde, de l'angle d'incidence et de l'épaisseur du film métallique peut être obtenue [RAETHER, 1988]. Notamment, à la résonance plasmon, le coefficient

d'amplification atteint une valeur maximale  $T_{max} = (t_{pmd}^2)_{max}$  qui s'exprime comme :

$$T_{max} = \frac{1}{\epsilon_d} \frac{\sqrt{|\epsilon'_m|(\epsilon_p - 1) - \epsilon_p} 2\epsilon_m''}{1 + |\epsilon'_m| \epsilon_m''} \quad (1.19)$$

avec  $\epsilon'_m = \text{Re}(\epsilon_m)$  et  $\epsilon_m'' = \text{Im}(\epsilon_m)$ .

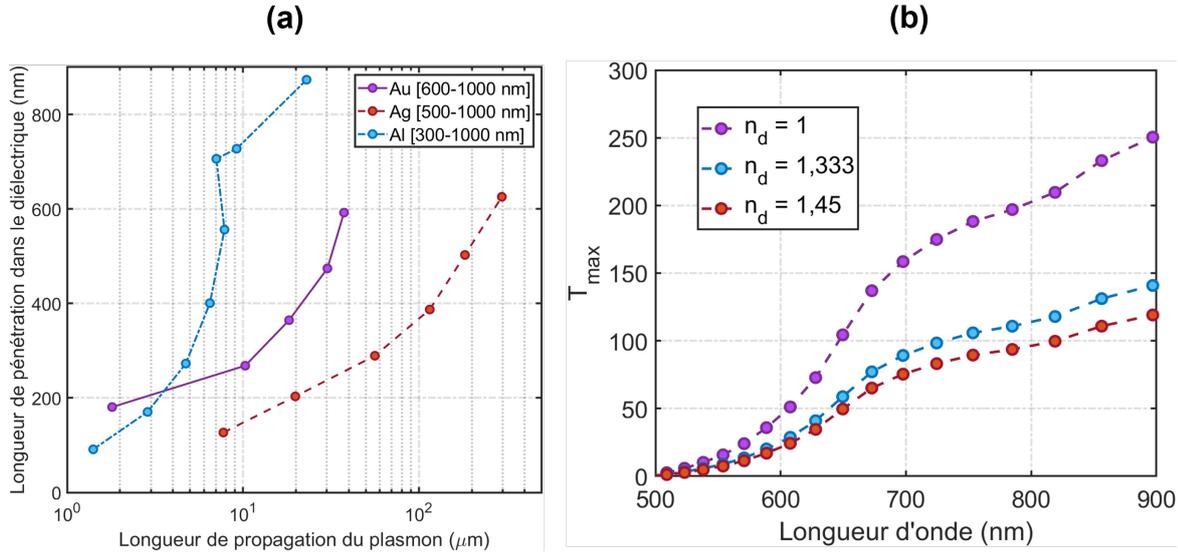


FIGURE 1.8 – **a.** Évolution de la longueur de pénétration et de la longueur de propagation en fonction de la longueur d'onde pour différents métaux en contact avec un milieu diélectrique d'indice de réfraction de 1,333 [MOREAU et LARTIGUE, 2022]. **b.** Évolution du coefficient d'amplification, à la résonance plasmon, en fonction de la longueur d'onde pour différents milieux diélectriques. Le métal est de l'or et le substrat est du verre en SF10. La permittivité diélectrique du métal est calculée à partir des valeurs expérimentales de Johnson et Christy.

L'évolution de  $T_{max}$  en fonction de la longueur d'onde suit l'évolution de la permittivité diélectrique du métal (fig 1.8.b). Pour le calcul de la permittivité diélectrique de l'or, les valeurs expérimentales de Johnson et Christy ont été utilisées [JOHNSON et CHRISTY, 1972]. Pour un métal sans perte ( $\epsilon_m'' = 0$ ), le coefficient d'amplification diverge. De plus, il diminue avec une augmentation de  $\epsilon_d$ . Le champ électrique du plasmon est donc le plus intense lorsque le métal est en contact avec le vide. Dans le cas d'une interface or ( $\epsilon_m = -20, 1 + 1,25i$ ) | eau ( $\epsilon_d = 1,78$ ) et d'un substrat de verre en SF10 ( $\epsilon_p = 2,96$ ), pour une longueur d'onde de la lumière incidente de 750 nm, le maximum du coefficient d'amplification en intensité vaut :  $T_{max} = 103$ .

L'excitation du plasmon de surface avec la lumière permet donc de confiner le champ électromagnétique à l'échelle nanométrique et de l'amplifier de plusieurs ordres de grandeur. Cette propriété très intéressante est exploitée dans la suite de ces travaux de thèse afin de fonctionnaliser le film d'or avec une chimie spécifique aux ions métalliques à détecter dans le cadre du projet SURIMI. Elle se base sur l'utilisation de polymères qui peuvent être synthétisés par photopolymérisation. En choisissant un photo-initiateur adapté, la synthèse peut être menée par illumination plasmonique afin de contrôler l'épaisseur du polymère à l'échelle nanométrique.

Le caractère évanescents du SP peut également être mis à profit afin de réaliser des capteurs de surfaces. En effet, la condition du couplage de la lumière avec le SP est très sensible à l'indice de réfraction sondé par le plasmon qui a une extension de quelques centaines de nanomètres dans le milieu diélectrique.

### 1.3. LES BIOCAPTEURS SPR, UNE APPLICATION DE LA PLASMONIQUE

La notion de biocapteur fait référence à tout capteur permettant la détection d'espèces chimiques – e.g. molécules, hormones, ions métalliques – ou biologiques – e.g. ADN, virus, bactéries. Une caractéristique importante d'un biocapteur est sa capacité à détecter de façon spécifique une espèce cible donnée. Cela passe par de la synthèse chimique permettant de développer des sondes spécifiques à l'espèce à détecter. Un autre aspect important concerne la méthode de traduction de l'interaction biologique spécifique entre les sondes et les espèces cibles en un signal physique mesurable – e.g. mécanique, électrique, optique. Finalement, le biocapteur doit être idéalement réutilisable, la régénération chimique des sondes doit être possible.

La première utilisation du phénomène de résonance de plasmon de surface appliquée à la biodétection remonte à 1983 [LIEDBERG et al., 1983a] où des interactions protéines-anticorps ont été mesurées avec succès. Les biocapteurs plasmoniques se basent sur une méthode de transduction optique. Ils se décomposent en deux grandes catégories en fonction de la nature du plasmon excité. Un biocapteur SPR (Surface Plasmon Resonance) se base sur l'excitation d'un plasmon de surface qui se propage à l'interface entre un film métallique et un milieu diélectrique tandis qu'un biocapteur LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance) repose sur l'utilisation de nanostructures métalliques dans lesquelles un mode plasmonique localisé peut être excité.

Le comportement du plasmon de surface localisé est semblable au plasmon de surface à la différence près qu'ils sont non propagatifs. En effet, les nanostructures ayant des dimensions bien inférieures à la distance de propagation du plasmon de surface (fig 1.8), l'oscillation des électrons de conduction devient stationnaire. Cette oscillation peut néanmoins toujours être excitée par la lumière qui va alors être très fortement absorbée par la nanostructure. La condition de résonance du plasmon localisé dépend de la nature du métal, de la forme de la nanostructure et de son environnement. Typiquement, une solution colloïdale de nanosphères d'or possède une bande d'absorption autour de 550 nm et apparaît donc rouge (fig 1.9).

Les tests de grossesses ou plus récemment, les tests covid utilisent ce dernier type de nanotechnologie. Dans ce cas, les sondes sont des anticorps spécifiques à la protéine spike qui se trouve sur l'enveloppe du virus Sars-Cov-2. Ces anticorps sont greffés sur des nanoparticules (NPs) d'or qui sont en solution. Lorsque le virus est également introduit dans la solution, les nanoparticules peuvent se fixer à sa surface par interaction spécifique entre les anticorps et la protéine spike. Ainsi, l'environnement à la surface des NPs est modifié ce qui influence la condition de couplage entre la lumière et le plasmon de surface localisé qui se traduit par le déplacement de la résonance plasmon. En l'occurrence, lors d'un test covid, la résonance plasmon se manifeste par une bande d'absorp-

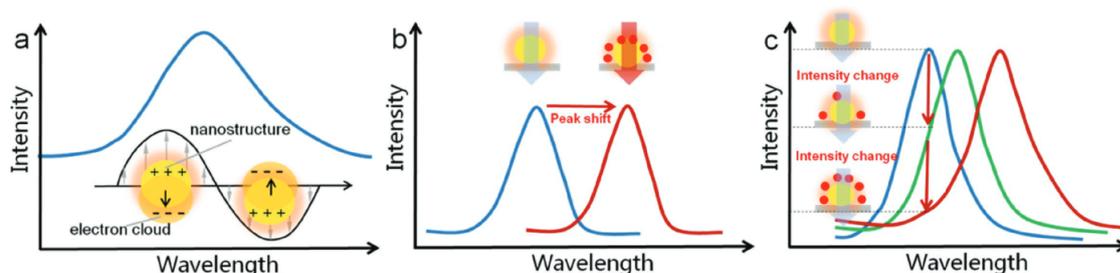


FIGURE 1.9 – **a.** L'excitation d'un plasmon de surface localisé dans une nanoparticule se manifeste par une bande d'absorption dans le spectre de la lumière diffusée. **b.** La longueur d'onde d'absorption dépend de l'indice de réfraction du milieu diélectrique sondé par le plasmon à quelques nanomètres de la surface. **c.** Pour une détection à une longueur d'onde fixée, la variation de l'intensité absorbée est directement proportionnelle au changement de l'indice de réfraction. [Y. WANG et al., 2017]

tion dans le bas du spectre visible ce qui donne la couleur rouge indicatrice que le test est positif. Si l'anticorps spécifique à la protéine spike est remplacé par un anticorps spécifiques à l'hormone de la grossesse beta-HCG, le test covid se transforme simplement en un test de grossesse. La méthode de transduction est la même, seule les sondes spécifiques sont à remplacer. C'est un des grands avantages de la technologie des biocapteurs plasmoniques qui est donc très versatile.

La technologie des biocapteur LSPR se basant sur l'utilisation de nanoparticules métalliques est bien adaptée pour développer des capteurs peu onéreux, souvent jetables et dont l'application ne demande pas une mesure quantitative mais plutôt la mesure d'une concentration relative à une valeur seuil de référence. Dans le cas du développement de l'instrument SURIMI, les contraintes de robustesse, de détection parallèle de plusieurs ions métalliques et de simplicité de conception ont mené au choix de la technologie se basant sur l'excitation de plasmon de surface propagatif sur film d'or, dans une configuration de Kretschmann. L'or est le métal noble de prédilection lorsqu'il est question d'application en biologie car il n'est pas toxique et ne s'oxyde pas aussi facilement que les autres.

La configuration de Kretschmann est la plus couramment utilisée dans les biocapteurs SPR pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elle est peu onéreuse. En effet, une étape essentielle dans la réalisation d'un biocapteur plasmonique est la fabrication de la biopuce, élément central du capteur. La première étape consiste à déposer un film de 50 nm d'or sur un substrat en verre. Le dépôt peut facilement être industrialisé, diminuant les coûts de fabrication. Cette lame d'or est simplement déposée sur le prisme et le contact optique est assuré par une huile d'indice. D'autre part, pour une application dans la biodétection, il est nécessaire de rendre la surface métallique spécifique à l'espèce chimique à détecter (fig 1.10). Suivant les applications, il existe également des protocoles permettant de régénérer les sondes de la biopuce afin de l'utiliser pour une nouvelle détection. Si ce n'est pas le cas, elle peut être facilement remplacée par une nouvelle biopuce tout en gardant l'instrument inchangé. La configuration de Kretschmann peut facilement s'adapter sous différentes formes afin d'interroger différentes propriétés optiques du plasmon de surface. Les mé-

thodes d'interrogation les plus communes, qui seront détaillées dans la suite, sont l'interrogation en réflectivité, l'interrogation angulaire et l'interrogation spectrale. Enfin, elle peut être combinée à un système d'imagerie avec une caméra afin d'imager la surface du métal et ainsi avoir la possibilité de réaliser la détection simultanée de différentes espèces chimiques capturées en différents points de la surface métallique.

Afin de comparer les performances de différents biocapteurs SPR, certaines grandeurs d'intérêts sont à définir :

- la sensibilité : si  $Y$  est la grandeur physique à suivre lors la biodétection SPR, la sensibilité  $S$  du capteur est définie comme la variation de  $Y$  pour une variation donnée de l'indice de réfraction :  $S = \frac{\partial Y}{\partial n}$ ,
- la dynamique de mesure : elle peut être définie comme la gamme d'indice de réfraction du milieu diélectrique pour laquelle la sensibilité est une fonction linéaire de l'indice de réfraction,
- la résolution ( $\sigma_{RI}$ ) : elle correspond à la plus petite variation mesurable de l'indice de réfraction et s'exprime en Refractive Index Unit (RIU). Elle peut être estimée en faisant le rapport du bruit expérimentale ( $\sigma_{exp}$ ) et de la sensibilité ( $S$ ) :  $\sigma_{RI} = \frac{\sigma_{exp}}{S}$  [PILIARIK et HOMOLA, 2009].  $\sigma_{exp}$  englobe toutes les sources potentielles de bruits (bruit de photon, bruit thermique, bruit mécanique, ...).

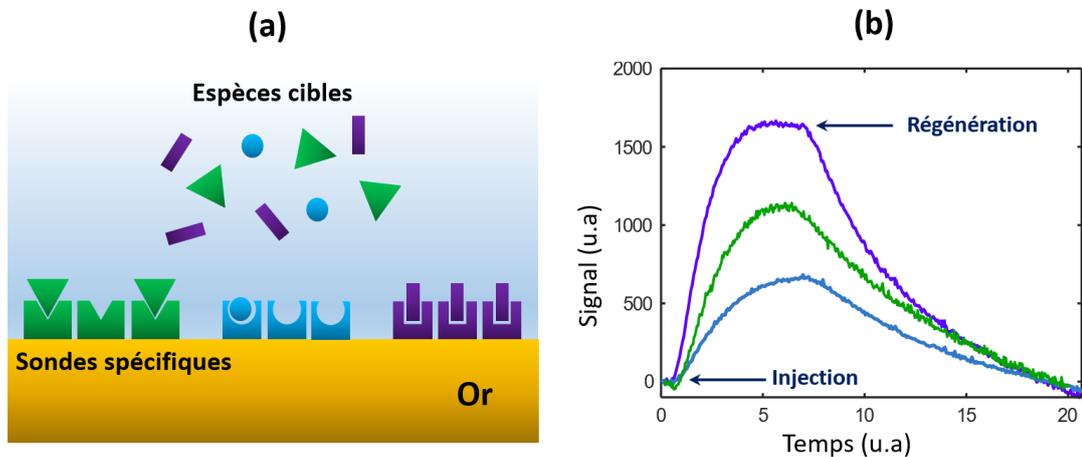


FIGURE 1.10 – **a.** Schéma de principe de la fonctionnalisation de la surface d'un métal pour une application à la biodétection plasmonique. Différentes zones sont fonctionnalisées par des sondes spécifiques à différentes espèces chimiques ou biologiques formant des structures périodiques appelées plots. **b.** Les cinétiques d'interaction entre les cibles et les sondes peuvent être mesurées par l'interrogation en temps réel de différentes propriétés optiques du plasmon de surface.

1. La fonctionnalisation de surface : le principe et l'intérêt de la fonctionnalisation de surface sont présentés sur la figure 1.10. Avec un protocole adapté à la nature de la surface métallique et à la nature des espèces cibles à détecter, des sondes spécifiques peuvent être greffées à l'interface

entre le métal et le milieu diélectrique où est excité le plasmon de surface. Dans le cas d'un biocapteur SPR se basant sur l'utilisation d'un film métallique, des plots composés de différentes sondes spécifiques peuvent également être déposés en différents endroits afin d'obtenir une unique biopuce pouvant détecter plusieurs espèces cibles. Avec une méthode d'interrogation adéquate, les cinétiques d'interactions des différentes sondes spécifiques et des cibles peuvent être extraites en temps réel (fig 1.10.b). Lors de la capture des cibles, le signal dont la nature dépend de la méthode d'interrogation, augmente pour se stabiliser lorsqu'un équilibre physico-chimique est atteint entre les sondes et les cibles. Dans certains cas, il est possible de régénérer la biopuce en injectant à sa surface une solution permettant de séparer les cibles des sondes. La cinétique de libération peut ainsi être mesurée.

Il existe maintenant de très nombreux protocoles très efficaces pour fonctionnaliser la surface d'or par des sondes spécifiques à une grande variété d'espèces cibles [SCARANO et al., 2010]. Le principe de ces protocoles est d'assembler différentes couches chimiques qui vont permettre de fixer les molécules sondes et également de réduire au minimum l'accrochage non spécifique des autres espèces que les cibles. La nature de chaque couche est à adapter en fonction de l'application. La construction des fondations est basée sur l'utilisation de thiols qui se lient par liaisons covalentes à l'or. Des exemples de chimies de surface développées dans l'équipe sont présentés dans la thèse d'Alexandra Sereda [SEREDA, 2014]. Toutefois, pour le projet SURIMI, cet aspect est grandement simplifié par le fait que seules une couche mono-moléculaire (SAM) de thiols surmontée par une couche de polymère sont nécessaires. Ce point sera abordé dans le chapitre 4.

2. Le système de microfluidique : il doit permettre d'amener les cibles au plus proche de la surface afin qu'elles soient capturées par les sondes. De manière générale, les volumes d'échantillons à tester grâce à un biocapteur sont les plus petits possibles afin de limiter le gaspillage ou de respecter des contraintes physiologiques ou environnementales. Dans le cas des biocapteurs SPR, le volume est intrinsèquement limité par l'extension spatiale du plasmon de surface. En effet, l'onde évanescente ne pénètre que sur quelques centaines de nanomètres dans le diélectrique. La mesure d'une interaction au-delà de cette limite n'est donc pas possible. Typiquement, pour un instrument SPR monté au laboratoire Charles Fabry, l'ordre de grandeur du volume de la cuve à la surface de l'or est :  $1 \text{ cm}^2 \times 100 \text{ } \mu\text{m} = 10 \text{ } \mu\text{l}$ . Ce volume reste infiniment grand par rapport au volume sondé par le plasmon de surface. La circulation convective du milieu diélectrique est rendue possible grâce à une pompe péristaltique et l'injection des échantillons à analyser peut se faire à l'aide d'un système de vannes couplant une boucle d'injection avec le circuit principal [SEREDA, 2014].

Le SP est sensible à tout changement d'indice de réfraction du milieu diélectrique. Il peut être engendré par la capture spécifique de cibles par les sondes, par une modification de la composition du milieu diélectrique ou par une évolution de la température. Le dernier cas induit généralement une lente dérive sur le signal SPR mesuré. Cette dérive peut être corrigée avec une étape de traitement du signal mais elle peut également être évitée en maintenant la biopuce et le diélectrique à

une température constante. Pour cela, un module Peltier est généralement utilisé. Il permet de réguler la température à  $\pm 0,01$  °C ce qui correspond, dans le cas où le milieu diélectrique est de l'eau pure, à une variation d'environ  $3.10^{-7}$  RIU de l'indice de réfraction (fig 3.2), qui est de l'ordre de grandeur de la limite de détection de la plupart des instruments SPR.

3. La méthode d'interrogation : le principe d'un capteur plasmonique est de suivre en temps réel l'évolution des propriétés optiques du plasmon de surface lors de l'évolution de l'indice de réfraction sondé. Si toutes les dérives parasites sont corrigées, l'indice de réfraction est uniquement modifié par l'interaction des cibles avec les sondes qui aspire à être mesurée. Pour une configuration de Kretschmann et si la perturbation amenée par le prisme est négligée, la condition de couplage du plasmon de surface avec la lumière incidente s'écrit :

$$\begin{aligned} k_i^{\parallel} &= \text{Re}(\beta) \\ \Leftrightarrow n_p \times \sin\theta &= \text{Re}\left(\sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m(\lambda)}{\epsilon_d + \epsilon_m(\lambda)}}\right) \end{aligned} \quad (1.20)$$

Cette condition dépend donc, entre autres, de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence. Le suivi individuel, en temps réel, de l'évolution de ces deux paramètres correspond aux méthodes d'interrogation spectrale et angulaire. Si toutefois la longueur d'onde et l'angle d'incidence sont fixés à des valeurs proches du point de la résonance plasmon, la réflectivité du métal dépend alors uniquement et sensiblement de l'indice de réfraction sondé par le SP. Le suivi de cette grandeur correspond à la méthode d'interrogation en réflectivité.

Les différentes méthodes d'interrogation vont être présentées succinctement. Pour plus de détails, se référer au chapitre 2 du manuscrit de la thèse d'Alexandra Sereda [SEREDA, 2014].

La méthode d'interrogation spectrale consiste à fixer l'angle d'incidence et à éclairer la biopuce avec une source blanche afin de suivre le profil spectrale de la résonance plasmon (fig 1.6). La lumière réfléchi est analysée à l'aide d'un spectromètre et la position spectrale de la résonance ( $\lambda_{min}$ ) peut être extraite par un ajustement du spectre mesuré en réflexion. Lorsque l'indice de réfraction du milieu diélectrique augmente,  $\lambda_{min}$  augmente également. Le décalage de la résonance est représenté sur la figure 1.6.b. Avec cette configuration, la réponse du plasmon de surface est intégrée sur toute la zone éclairée et la détection simultanée de différentes espèces cibles est limitée à quelques canaux en structurant l'illumination. Afin d'incorporer la possibilité du multiplexage lors de la détection, une caméra peut être utilisée pour mesurer, sur une dimension de son capteur, le spectre de la résonance plasmon [BARDIN et al., 2009]. La deuxième dimension permet d'imager en temps réel une bande de la biopuce sur laquelle ont été greffées des sondes spécifiques de nature différente. Cette méthode d'interrogation démontre une résolution de l'ordre de  $10^{-7}$  RIU et d'une dynamique de mesure supérieure à  $10^{-2}$  RIU. La sensibilité définie comme  $S_\lambda = \left. \frac{\partial \lambda_{min}}{\partial n} \right|_\theta$ , est représentée sur la figure 1.11. Une simulation de la résonance plasmon avant et après un saut d'indice arbitraire de

$3 \cdot 10^{-4}$  RIU permet de calculer  $S_\lambda$  en faisant le rapport de la variation de la position spectrale de la résonance sur l'amplitude du saut d'indice.

Ensuite, il vient la méthode d'interrogation angulaire qui se décline suivant deux formes pour lesquelles la longueur d'onde de la lumière incidente est fixée. Une première consiste à éclairer la biopuce avec un faisceau convergent suivant une seule direction et à réaliser l'image sur une caméra. Ainsi, une des deux dimensions du capteur de la caméra va servir à enregistrer la coupe angulaire de la résonance et l'autre permet de récupérer le spectre angulaire sur différents points de la ligne éclairée. Un ajustement du spectre mesuré en réflexion permet d'extraire la position angulaire de la résonance ( $\theta_{min}$ ). Lorsque l'indice de réfraction du milieu diélectrique augmente,  $\theta_{min}$  augmente également. Une deuxième méthode consiste à utiliser un miroir galvanométrique afin d'imager, sur la caméra, toute la biopuce à des angles d'incidence différents. Ainsi, le multiplexage lors de la dimension peut être étendu aux deux dimensions de la biopuce mais la cadence d'acquisition s'en trouve dégradée. Les performances en terme de résolution et de dynamique de mesure sont équivalentes à la méthode d'interrogation spectrale.

Enfin, la méthode d'interrogation en réflectivité consiste à suivre la variation de la réflectivité de la biopuce pour un couple d'angle et de longueur d'onde d'incidence donné qui définit un point de fonctionnement du capteur. Pour que la sensibilité de l'instrument opérant dans ce mode soit maximale, le couple choisi doit maximiser la dérivée de la réflectivité en fonction de l'angle ou de la longueur d'onde d'incidence. Il coïncide avec le point où la pente de la courbe de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde (*resp.* angle) d'incidence à angle (*resp.* longueur d'onde) fixé est maximale (fig 1.6).b. Lorsque l'indice de réfraction du milieu diélectrique augmente, la réflectivité augmente également. Dans ce mode, l'imagerie en deux dimensions de la biopuce est possible et la cadence d'acquisition est seulement limitée par la caméra et le moyennage temporel. La taille de la zone imagée qui est généralement de l'ordre d' $1 \text{ cm}^2$  permet de suivre une centaine d'interactions différentes en parallèles et en temps réel sur une centaine de plots composés de sondes spécifiques (fig 1.10). Cependant, le choix d'un unique couple d'angle et de longueur d'onde d'incidence restreint la dynamique de mesure à la gamme spectrale sur laquelle la courbe de la réflectivité est linéaire. Cela se traduit en une dynamique de mesure de l'ordre de  $10^{-3}$  RIU pour une résolution d'environ  $10^{-6}$  RIU. La sensibilité définie comme  $S_R = \left. \frac{\partial R}{\partial n} \right|_{\theta, \lambda}$ , est représentée sur la figure 1.11.

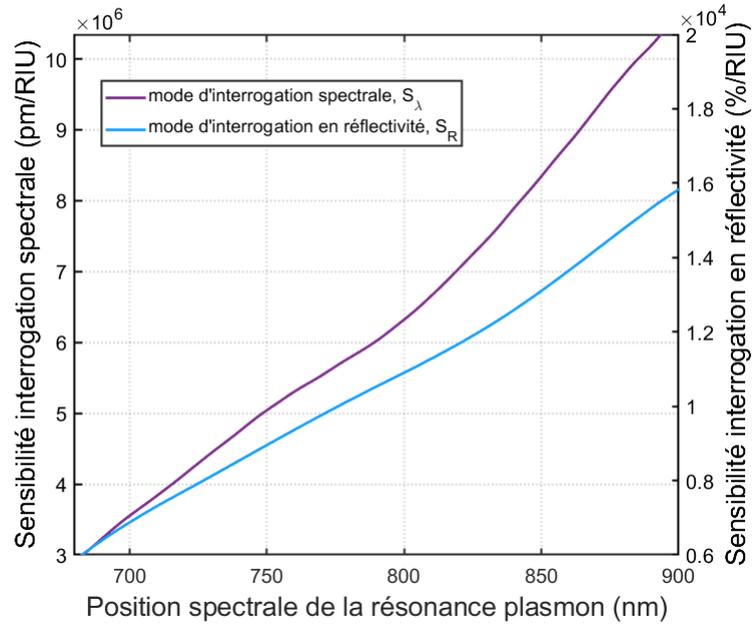


FIGURE 1.11 – Évolution de la sensibilité théorique en fonction de la longueur d'onde pour les modes d'interrogation spectrale et en réflectivité.

Dans le cadre du projet SURIMI, la méthode d'interrogation retenue est une hybridation entre les méthodes d'interrogation spectrale et en réflectivité. La biopuce est éclairée, pour un angle d'incidence fixé (faisceau collimaté), par un nombre fini de longueurs d'onde de façon séquentielle. La biopuce est imagée sur le capteur d'une caméra pour chaque longueur d'onde. Une méthode numérique permet alors d'extraire, à partir d'un nombre fini de longueur d'onde et en temps réel, la position spectrale de la résonance sur chaque pixel de l'image. C'est la méthode d'interrogation d'imagerie multi-spectrale (MS-SPRi).





# 2

## POSITIONNEMENT DE L'INSTRUMENT SURIMI DANS LE CONTEXTE TECHNOLOGIQUE ACTUEL

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>2.1</b> | <b>Techniques de détection d'ions métalliques . . . . .</b>   | <b>32</b> |
| 2.1.1      | Techniques de routine de laboratoire . . . . .                | 32        |
| 2.1.2      | Techniques basées sur les capteurs plasmoniques . . . . .     | 35        |
| <b>2.2</b> | <b>Détecteurs plasmoniques portables . . . . .</b>            | <b>43</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Performances visées pour l'instrument SURIMI . . . . .</b> | <b>46</b> |

À l'issu du projet SURIMI, dont les grandes lignes ont été explicitées en introduction, deux instruments basés sur la technologie SPR seront développés : en priorité, un instrument SPR submersible destiné aux grands fonds océaniques appliqué à la détection d'ions métalliques proche des cheminées volcaniques et en deuxième lieu, un instrument miniaturisé et portable permettant de réaliser des mesures sur le terrain afin de suivre la pollution des cours d'eau par les métaux lourds. Afin de mettre les performances recherchées de ces deux instruments en perspective, il est nécessaire de réaliser un état de l'art du contexte technologique actuel à propos des instruments portables permettant de détecter les ions métalliques. Ainsi, une étude des techniques existantes de détection d'ions métalliques sera présentée dans un premier temps suivie d'une synthèse des différentes technologies SPR portables.

## 2.1. TECHNIQUES DE DÉTECTION D'IONS MÉTALLIQUES

### 2.1.1. TECHNIQUES DE ROUTINE DE LABORATOIRE

Parmi les différentes techniques existantes de détection d'ions métalliques, il en existe trois principales qui sont utilisées de façon régulière en laboratoire et dont les performances vont être prises comme référence.

1. Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS) : elle consiste en une ionisation de l'échantillon à analyser afin d'obtenir un plasma contenant, en autres, les ions métalliques qui sont ensuite détectés grâce à un spectromètre de masse. Ce dernier est constitué d'un compartiment où règne un champ électromagnétique quadrupolaire oscillant dans le temps et d'un électromultiplicateur. Ce champ est généré à l'aide d'un quadrupole qui est constitué de quatre électrodes cylindriques ou coniques formant un tunnel. Au cours de leur voyage dans ce tunnel, les ions vont suivre une trajectoire oscillante. L'amplitude et la période d'oscillation dépendent du rapport masse sur charge de chacun des ions. Ainsi, pour un champ quadrupolaire donné, seul un type d'ions, résonnant avec ce champs, traversera entièrement ce tunnel sans que sa trajectoire ne le fasse heurter une électrode ou ne le dévie hors du tunnel. Au bout de ce dernier est placé un électromultiplicateur qui, sous l'impact des ions métalliques, va générer une cascade d'électrons menant à un courant électrique mesurable. L'échantillon à analyser, qui peut être solide ou liquide, est ionisé par injection dans un plasma d'argon à très haute température (de l'ordre de 10 000°C). La limite de quantification de l'ICP-MS, qui est définie comme 3 fois la limite de détection, est de l'ordre de 0,01 µg/l (0,01 ppb) et dépend de la nature de l'ion à analyser. Tous les éléments facilement ionisables dans le plasma d'argon peuvent être analysés, ce qui représente environ 75 % des éléments métalliques [“Agilent, ICP-MS”, 2022].

2. Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) : c'est une technique de spectroscopie optique qui se base également sur l'ionisation de l'échantillon à analyser. Le plasma est éclairé par une lumière polychromatique, dont le spectre est composé de raies fines atomiques, et l'absorption du plasma à une longueur d'onde donnée est mesurée à l'aide d'un monochromateur couplé à un photomultipli-

cateur. La source lumineuse est une lampe à cathode creuse qui est composée d'un unique élément atomique choisi avec soin pour que son spectre d'émission recouvre le spectre d'absorption des ions métalliques à analyser. Grâce à la relation de Beer-Lambert et à une étape préliminaire de calibration, la concentration d'un ion donné peut être déterminée par mesure de l'absorption à une longueur d'onde du spectre d'absorption de cet ion. La limite de détection de cette technique est légèrement supérieure à celle de l'ICP-MS. Cependant, la mesure est généralement plus rapide et l'instrument est moins complexe [“Agilent, AAS”, 2022]. Un exemple des limites de détection de ces deux techniques pour des ions de différentes natures est présenté dans le tableau 2.1.

| Ions à détecter | ICP-MS                          | AAS                    | ASV                 |
|-----------------|---------------------------------|------------------------|---------------------|
|                 | [SÁNCHEZ TRUJILLO et al., 2012] | [KOJUNCU et al., 2004] | [ZHAO et al., 2014] |
| Cu              | 0.030                           | 0.034                  | 0.017               |
| Zn              | 0.260                           | 0.994                  | 0.092               |
| Ni              | 0.117                           | 0.305                  | -                   |
| Cd              | 0.004                           | 0.010                  | 0.157               |
| Pb              | 0.020                           | 0.290                  | 0.31                |

TABLE 2.1 – Limites de détection de différentes techniques de détection d'ions métalliques exprimées en  $\mu\text{g/l}$  (ppb).

3. Anodic Stripping Voltammetry (ASV) : c'est une technique électrochimique qui consiste à mesurer un courant électrique lors d'un processus d'oxydation des éléments métalliques à détecter. Un détecteur ASV est composé d'un jeu de trois électrodes, d'un potentiomètre et d'un ampèremètre. Le courant électrique est mesuré pour un potentiel ajustable qui est appliqué entre une électrode de travail (WE) et une contre électrode (CE). Une troisième électrode de référence (RE) permet de mesurer la valeur du potentiel appliquée sans que la mesure ne soit influencée par le passage d'un courant électrique. La mesure ASV se déroule en trois phases : la première, dite étape de déposition, consiste à appliquer un potentiel négatif à la WE afin de réduire les ions métalliques présents en solution qui vont alors venir se déposer à la surface de la WE, s'en suit un temps d'attente de stabilisation qui dure quelques secondes puis vient l'étape de libération ("stripping") lors de laquelle un potentiel variable positif est appliqué à la WE afin d'oxyder les éléments métalliques à détecter. Le potentiel auquel est oxydé un élément dépend de sa nature ce qui permet de l'identifier, tandis que la valeur du courant électrique est proportionnelle à la quantité de l'élément métallique en train d'être oxydé. Les éléments métalliques sont oxydés successivement à mesure que le potentiel augmente. La courbe représentant l'intensité du courant électrique en fonction du potentiel présente donc des pics localisés aux potentiels d'oxydation de chacun des ions présents en solution. Cette technique possède une limite de détection généralement plus haute que les deux premières techniques présentées. Cependant, elle ne nécessite pas un opérateur expert pour être mise en oeuvre et elle est également beaucoup moins coûteuse.

Le grand avantage de cette technique est qu'elle peut être adaptée afin de mettre au point des détecteurs ASV portables autorisant un opérateur à réaliser une mesure de terrain. Ainsi, un protocole de fabrication industrielle d'électrodes imprimées sur un substrat de céramique a été proposé

afin de réaliser un détecteur ASV portable piloté à distance par un smartphone [BERNALTE et al., 2020]. Les électrodes sont imprimées par l'application d'or et d'argent sous la forme d'encre, à l'aide d'un pochoir (fig 2.1). L'électrode ainsi conçue peut être reliée à un potentiomètre et connectée à un ampèremètre pour mesurer l'intensité du courant électrique correspondant. Les données expérimentales sont communiquées par bluetooth à un smartphone. Ce détecteur a été appliqué à la mesure de la concentration du plomb, du cuivre et du mercure dans de les eaux du fleuve l'Amazonie avec des limites de détections respectives de  $2,2 \mu\text{g/l}$ ,  $1,5 \mu\text{g/l}$  et  $1,3 \mu\text{g/l}$  pour un temps de mesure de l'ordre de la minute.

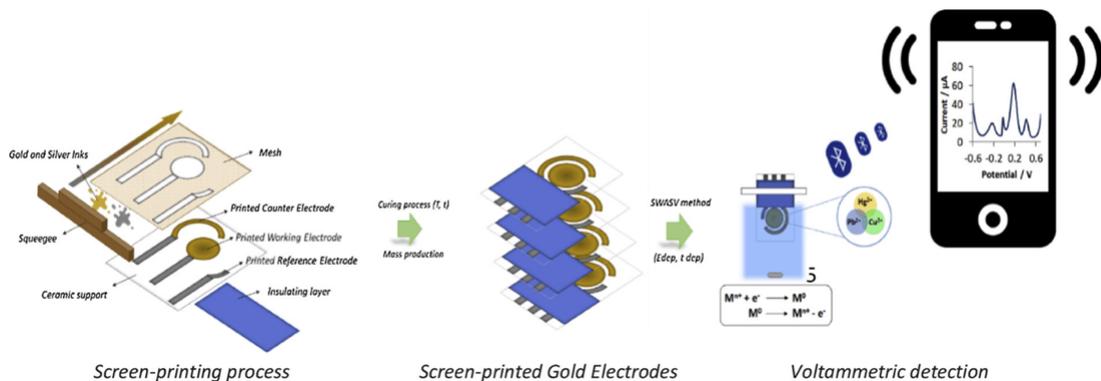


FIGURE 2.1 – Schémas expliquant le procédé de fabrication des électrodes imprimées et montrant le principe de la détection électrochimique [BERNALTE et al., 2020].

La technique ASV peut donc être utilisée afin de construire un détecteur portable avec des limites de détection compatibles avec les recommandations en vigueur de l'OMS [WHO, 2020]. En réalité, son application sur des échantillons de terrain nécessite des étapes d'optimisation qui peuvent compliquer le développement de détecteurs portables se basant sur cette technologie [BORRILL et al., 2019]. Notamment, l'électrode de travail doit être calibrée avec une solution dont la composition doit être identique de celle de l'échantillon de terrain. Dans le cas contraire, la présence de composés organiques ou d'ions interférents peut introduire des biais dans la valeur de l'intensité du courant électrique mesurée. De plus, la mesure par ASV doit être réalisée dans une solution sous agitation calme car les mouvements de convection trop violents peuvent introduire des artefacts qui détériorent la mesure.

Par ailleurs, les instruments se basant sur les technologies ICP-MS et AAS montrent de très bonnes performances en terme de spécificité et de limite de détection. Toutefois, ces techniques ne sont pas compatibles avec le développement de détecteurs portables et nécessitent une lourde préparation de l'échantillon de terrain et affichent un coût d'opération trop élevé. Certaines de ces limites peuvent être dépassées lors du développement d'un détecteur se basant sur la technologie SPR. Quelques exemples d'application à la détection d'ions métalliques vont maintenant être présentés.

### 2.1.2. TECHNIQUES BASÉES SUR LES CAPTEURS PLASMONIQUES

Par essence, le plasmon de surface est sensible aux variations de l'indice de réfraction du milieu diélectrique sondé sur l'extension spatiale de l'onde évanescente qui est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. Par ailleurs, la limite de détection d'un capteur plasmonique est intimement liée à sa résolution ( $\sigma_{RI}$ ) qui est donnée par le rapport du bruit expérimental sur la sensibilité du capteur (voir section 1.3). Cette sensibilité dépend fondamentalement de la permittivité diélectrique du métal utilisé, de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence (eq. 1.20). Pour une méthode d'interrogation donnée, elle est donc essentiellement indépendante de l'instrument. Quant à lui, le bruit expérimental est dominé par le bruit de photons pour des temps d'analyse de quelques minutes (voir section 3.4.1). Il a été vu dans le chapitre précédent que les résolutions théoriques pour les méthodes d'interrogation angulaire et spectrale sont respectivement de l'ordre de  $10^{-7}$  RIU et  $10^{-6}$  RIU.

De plus les valeurs seuils à ne pas dépasser, recommandées par l'OMS, des concentrations des ions métalliques dans l'eau potable vont de  $3 \mu\text{g/l}$  pour le cadmium à  $2000 \mu\text{g/l}$  pour le cuivre. Or, une solution aqueuse de sulfate de cuivre avec une concentration de  $1000 \mu\text{g/l}$  produit un saut d'indice de réfraction par rapport à l'eau pure d'environ  $5 \cdot 10^{-7}$  RIU [DUROU et al., 1973]. Cette faible variation peut donc difficilement être mesurée par l'interrogation des propriétés optiques d'un plasmon de surface se propageant à une simple interface entre un métal et un diélectrique. Autrement dit, la présence des ions métalliques dans l'eau aux concentrations concernées ne modifie pas de manière significative l'indice de réfraction. L'enjeu dans le développement d'un capteur plasmonique est alors d'élaborer des sondes spécifiques aux ions métalliques qui vont permettre d'amplifier la variation de l'indice de réfraction pour une concentration donnée et ainsi d'abaisser la limite de détection. Dans la suite, les performances de plusieurs capteurs plasmoniques se basant sur l'utilisation de sondes spécifiques de différentes natures et sur différentes technologies vont être présentées.

Probablement qu'une des premières applications de la SPR à la détection d'ions métalliques concerne l'utilisation d'un film de polymère dopé par un colorant, le squarylium dye 4 (fig 2.2), qui complexe de façon spécifique les ions cuivre [OCK et al., 2001]. Les molécules de colorant sont ajoutées à un copolymère PVC-PVAc-PVA dans du THF comme solvant puis le tout est déposé, par spin-coating, sous la forme d'un film mince de 12 nm sur un film d'or. L'épaisseur du dépôt de la couche de polymère doit être contrôlée avec précision. En effet, l'extension spatiale du plasmon de surface dans le milieu diélectrique étant limitée à une valeur de l'ordre de 200 nm, la détection d'une espèce chimique au-delà de cette distance n'est pas possible. Il faut donc que l'épaisseur de la couche de polymère soit inférieure ou égale à l'extension spatiale du SP. La biopuce ainsi conçue est ensuite insérée dans un instrument SPR se basant sur la configuration de Kretschmann et fonctionnant en interrogation angulaire par un scan mécanique de l'angle d'incidence. La dynamique de mesure de concentrations, pour laquelle la réponse du capteur est linéaire, s'étend de  $10^{-12}$  M ( $0,1 \text{ ng/l}$ ) à  $10^{-4}$  M ( $10 \text{ mg/l}$ ). La limite de détection de  $0,1 \text{ ng/l}$  annoncée est plus basse de plusieurs

ordres de grandeur par rapport aux techniques classiques citées dans la section précédente. D'une part, cela peut s'expliquer par un processus de concentration des ions dans un volume très proche de la surface où le SP est le plus intense grâce à une chimie de surface adaptée. De plus, la longueur d'onde sélectionnée pour exciter le SP se trouve dans la bande d'absorption du colorant SQ-dye. La complexation des ions cuivre par le colorant provoque un déplacement de cette bande d'absorption se traduisant par une amplification du changement de l'indice de réfraction et donc du signal SPR. La spécificité du capteur vis-à-vis des ions interférents a également été étudiée. La réponse du capteur à ces ions est globalement indépendante de la concentration. Pour la concentration la plus élevée de  $10^{-4}$  M, le décalage angulaire de la résonance est au maximum de  $0,5^\circ$  pour les ions interférents contre un décalage de  $0,7^\circ$  pour la concentration la plus faible de  $10^{-12}$  M des ions cuivre (fig 2.2.a). Ce capteur montre donc une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

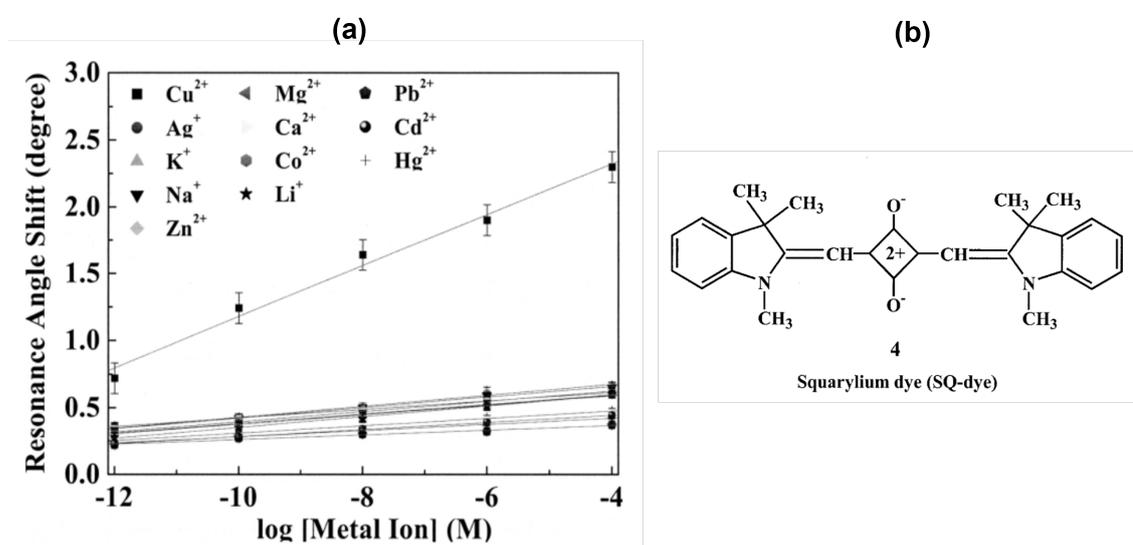


FIGURE 2.2 – a. Variation de la position angulaire de la résonance plasmon en fonction de la concentration molaire des solutions contenant les ions métalliques, injectées à la surface de la biopuce fonctionnalisée par des sondes spécifiques aux ions cuivre. b. Structure chimique de la molécule de colorant utilisée comme sonde spécifique aux ions cuivre [OCK et al., 2001].

De leur côté, FORZANI et al., 2005 ont développé un capteur SPR pour détecter les ions cuivre et les ions nickel basé sur une méthode d'interrogation angulaire, en configuration de Kretschmann, où le faisceau incident est focalisé sur la biopuce et l'intensité du faisceau réfléchi est mesurée à l'aide d'une photodiode quatre quadrants. La biopuce est composée d'un film d'or fonctionnalisé par des peptides qui sont des polymères d'acides aminés. La séquence d'acides aminés peut être ajustée afin d'augmenter la spécificité à un ion en particulier ce qui rend l'utilisation des peptides très avantageuse. Dans cet article, les peptides Gly-Gly-His et (His)<sub>6</sub> ont été choisis pour capturer respectivement les ions cuivre et les ions nickel. La nature du peptide ne doit pas être considérée isolément car les performances de capture des ions par les sondes spécifiques peuvent également être influencées par la couche d'accroche à la surface d'or. Deux thiols différents ont été étudiés pour fixer un même peptide au film d'or : l'acide 11-mercaptopundecanoïc (méthode 1) et la cystea-

mine (méthode 2). En fonction de la méthode choisie, l'agencement spatial du peptide peut être complètement différent (fig 2.3.b) modifiant sa façon d'interagir avec l'ion métallique ce qui a une forte influence sur la réponse SPR (fig 2.3.a). Dans cette étude, la méthode 1 montre une très grande sensibilité aux faibles concentrations en ions cuivre mais au détriment d'une dynamique de mesure très restreinte. La sensibilité obtenue avec la méthode 2 est plus faible mais la dynamique de mesure est plus grande d'au moins un ordre de grandeur. Une analyse similaire a été menée sur la capture des ions nickel par le peptide (His)<sub>6</sub>. Notamment, l'étude de la spécificité des deux peptides étudiés vis-à-vis des deux ions métalliques a révélé que le peptide (His)<sub>6</sub> est spécifique aux ions nickel pour des concentrations inférieures à 170 nM et que le peptide Gly-Gly-His capture préférentiellement les ions cuivre mais également, dans une moindre mesure, les ions nickel. Le capteur SPR ainsi développé affiche une limite de détection, dans le meilleur des cas, d'environ 2 ng/l pour les deux ions et permet la mesure en temps réel des cinétiques d'interaction qui se déroulent sur quelques minutes. La dynamique de mesure dépend fortement de l'ion considéré et de la méthode sélectionnée pour la fonctionnalisation (fig 2.3.a). Ce capteur a été testé avec succès lors de la détection d'ions cuivre dans de l'eau du robinet et les valeurs obtenues ont été comparées avec celles mesurées par spectroscopie d'absorption atomique.

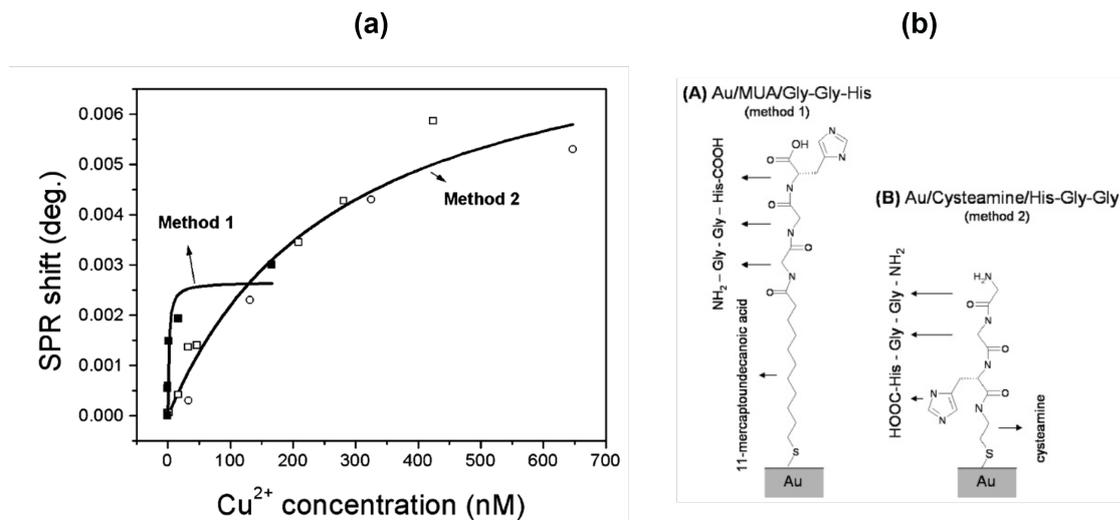


FIGURE 2.3 – **a.** Variation de la position angulaire de la résonance plasmon en fonction de la concentration molaire des ions cuivre en solution pour les deux méthodes de fonctionnalisation du peptide Gly-Gly-His. **b.** Représentation de la structure spatiale du peptide Gly-Gly-His pour les deux méthodes [FORZANI et al., 2005].

Une autre étude, dans laquelle un instrument SPR commercial (Biacore X) est utilisé, met en évidence la forte dépendance de l'interaction de certains ions métalliques avec l'albumine qui est une protéine utilisée comme sonde spécifique [WU et LIN, 2005]. Le Biacore X repose sur la méthode d'interrogation angulaire en configuration de Kretschmann. L'albumine possède la propriété de chélater certains cations métalliques comme le cadmium, le nickel et le zinc. Cette étude met notamment en évidence la grande dépendance de l'efficacité de l'interaction entre l'albumine et les cations à la composition du milieu environnant (pH, salinité, ...). De manière générale, l'in-

fluence de l'environnement sur l'interaction entre les sondes spécifiques et les cibles doit être prise en compte dans l'élaboration d'un capteur SPR.

La configuration de Kretschmann n'est pas la seule à avoir été appliquée à la détection des ions métalliques. Un capteur LSPR se basant sur l'utilisation de nanoparticules d'or permet d'obtenir en 30 minutes une mesure visuelle et quantitative de la concentration d'ions cuivre dans de l'eau pure [FANG et al., 2010].

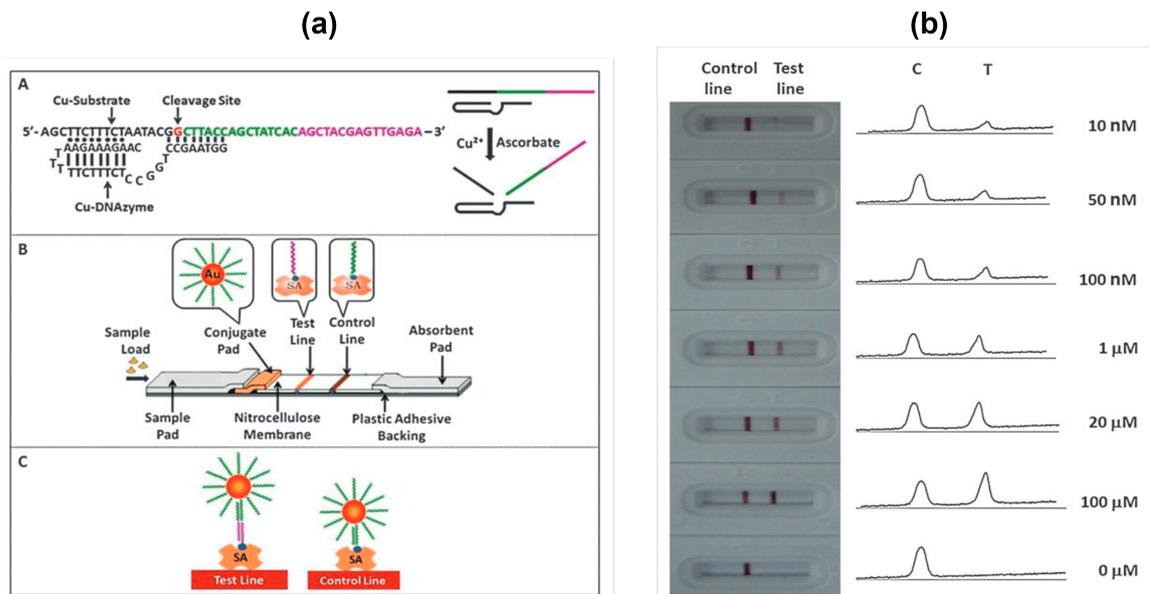


FIGURE 2.4 – a. Schéma représentant le fonctionnement d'un capteur LSPR basé sur l'utilisation de nanoparticules d'or. (A) Structure d'une enzyme ADN spécifique à l'ion cuivre. (B) Schéma du capteur LSPR. (C) Agglomération de NPs d'or sur la ligne de test grâce aux brins d'ADN coupés par l'enzyme en présence d'ion cuivre. b. Photo (à gauche) de la réponse du capteur LSPR et mesure du profil en intensité des zones de test et de contrôle (à droite) pour différentes concentrations d'ions cuivre [FANG et al., 2010].

Le principe général de ce type de capteur est d'introduire des NPs d'or dans la solution contenant les ions métalliques à détecter, à attendre un certain temps d'incubation puis à appliquer le mélange réactionnel sur une zone de dépôt. La solution va migrer par diffusion le long d'un substrat possédant deux zones particulières appelées zone de test et zone de contrôle. Au passage de la solution, la zone de test s'allume si le test est positif et la zone de contrôle s'allume pour signaler que le capteur fonctionne correctement. Les NPs d'or de diamètre 15 nm sont fonctionnalisées par une séquence particulière d'ADN (représentée en vert sur la figure 2.4.a) tandis que la ligne de test est fonctionnalisée par une séquence ADN différente (représentée en violet). Un mélange contenant des brins d'ADN couplés à une enzyme sensible aux ions cuivre est ajouté à la solution aqueuse contenant l'ion métallique à détecter. En présence d'ions cuivre, l'enzyme vient couper le brin d'ADN au niveau du site de clivage qui correspond à une base guanine représentée en rouge (fig 2.4.a) ; libérant ainsi une partie du brin qui est d'un côté complémentaire avec la séquence ADN fixée sur les NPs et de l'autre sur celle fixée sur la ligne de test. Ce bout de brin libéré en présence d'ions cuivre permet donc d'accrocher les NPs au niveau de la ligne de test qui vont alors s'y concen-

trer. Cela se matérialise par une bande rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de NPs fixées et donc, indirectement, à la concentration des ions cuivre (fig 2.4.b). La limite de détection annoncée est de 10 nM (0,64  $\mu\text{g/l}$ ) pour une dynamique de mesure allant jusqu'à 100  $\mu\text{M}$  (6,4 mg/l). Ce détecteur présente également une très bonne spécificité vis-à-vis des ions interférents dont notamment le zinc, le plomb ou le cadmium. L'avantage majeur de cette technique est la lecture facile du résultat de la mesure qui peut même être réalisée par un utilisateur non qualifié. De plus, par la mesure de l'intensité de la bande de test, une valeur quantitative de la concentration des ions cuivre peut être obtenue. Ce type de détecteur jetable est également peu onéreux et peut facilement être industrialisé comme l'a été le test COVID antigénique.

Une troisième technologie de détecteurs plasmoniques repose sur l'utilisation d'une fibre optique. Cette dernière est dénudée sur une ou plusieurs zones en retirant la gaine. Le coeur est ensuite couvert d'un film métallique d'une dizaine de nanomètres d'épaisseur. La méthode d'excitation du plasmon de surface à l'interface entre le film métallique et le superstrat est semblable à celle utilisée dans la configuration de Kretschmann. Une fibre optique guide la lumière de son entrée à sa sortie grâce à la réflexion totale qui se produit à l'interface entre le coeur et la gaine. Le SP peut donc être excité par le mode guidé de la fibre optique et le spectre de la lumière réfléchi par le film métallique peut être analysé par un spectromètre (fig 2.5.b).

Dans leurs travaux, SHRIVASTAV et GUPTA, 2018 ont démontré la possibilité de réaliser la détection parallèle de deux ions métalliques en développant un détecteur SPR à fibre optique associée à des sondes spécifiques issues de la synthèse de nanoparticules de polymère à empreinte ionique. Elles sont synthétisées par l'ajout du sel métallique ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  ou  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) dans un mélange d'épichlorohydrine et de polyéthylène-imine. La taille des NPs comprise entre 50 et 70 nm de diamètre a été estimée par imagerie TEM. Le coeur de la fibre optique a été recouvert, en deux zones distinctes, par des films métalliques de 40 nm d'épaisseur de cuivre et d'argent. Les NPs sont ensuite déposées sur chacune des deux zones par la technique de deep-coating pendant 30 min puis les sites spécifiques sont libérés des ions par rinçage successif dans des solutions d'acide chlorhydrique et d'EDTA à 0,1 M; s'en suit finalement une étape de séchage qui dure 12 h. La position spectrale de la résonance plasmon dépend de la nature du métal considéré. Le dépôt de deux métaux différents sur deux zones distinctes se traduit par deux pics d'absorption dans le spectre de la lumière en sortie de fibre optique. Chacune des deux zones est fonctionnalisée avec des NPs spécifiques à un ion donné. Ainsi, la mesure parallèle du déplacement de la position spectrale de chacune des deux résonances permet d'estimer simultanément la concentration des ions cuivre et plomb présents en solution. Sur la figure 2.5.a est représentée l'évolution de la position spectrale des pics en fonction de la concentration des ions plomb en solution. La position de la résonance plasmon du canal 2, fonctionnalisé par des sondes spécifiques aux ions cuivre, est quasiment indépendante de la concentration des ions plomb tandis qu'une courbe de calibration est obtenue pour le canal 1. Des résultats complémentaires, non montrés ici, sont obtenus lorsque le détecteur est plongé dans une solution contenant uniquement des ions cuivre. Ce détecteur permet donc de discerner sans

ambiguïté les deux ions métalliques testés. Une mesure de la concentration des ions peut être réalisée en 30 secondes et entre deux analyses, le détecteur peut être rincé avec de l'eau ultra-pure afin de libérer les cavités spécifiques des NPs de polymère. Une expérience de détection des ions interférents cobalt, chrome, cadmium et zinc a révélé la bonne spécificité du détecteur. La limite de détection est d'environ  $4.10^{-12}$  g/l et de  $8.10^{-10}$  g/l et la dynamique de mesure est de 0 à 1000  $\mu\text{g/l}$  et de 0 à 1000 mg/l respectivement pour le plomb et pour le cuivre.

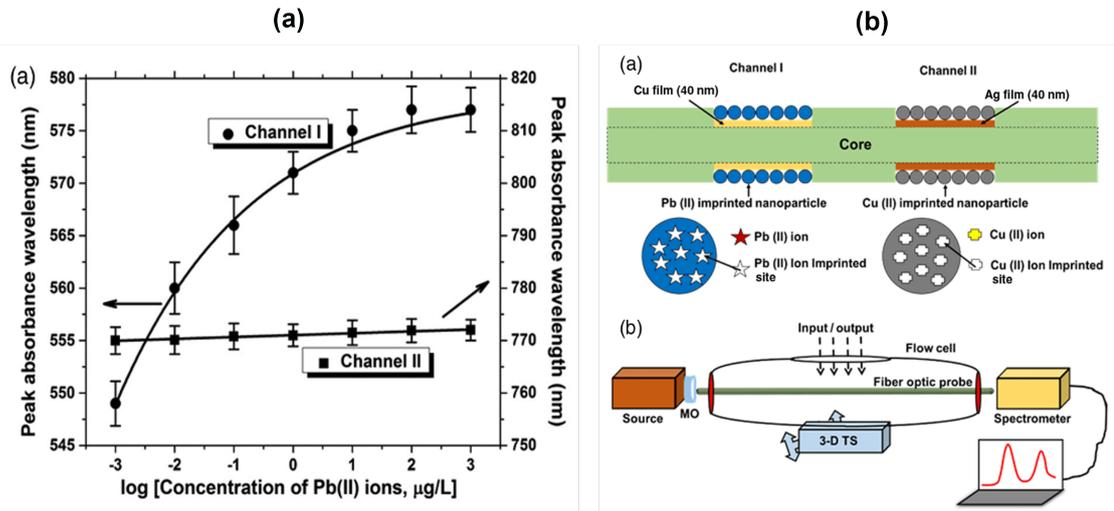


FIGURE 2.5 – **a.** Position de la résonance du plasmon de surface du canal 1 et du canal 2 fonctionnalisés respectivement par des NPs de polymère spécifiques aux ions plomb et cuivre, en fonction de la concentration d'ions plomb en solution. **b.** Schéma représentant l'instrument expérimental. La gaine de la fibre optique est retirée en deux endroits afin de réaliser deux canaux différents pour la détection parallèle d'ions cuivre et plomb. Des dépôts de 40 nm d'épaisseur de deux métaux différents (cuivre et argent) sont réalisés aux endroits dénudés puis fonctionnalisés par des sondes spécifiques [SHRIVASTAV et GUPTA, 2018].

L'utilisation de NPs de polymère a permis d'abaisser énormément la limite de détection des ions métalliques en les concentrant proche de la surface métallique. L'idée est d'augmenter la variation de l'indice de réfraction afin qu'elle soit détectable. Pour cela, il est également possible de combiner la technique SPR avec la technique LSPR. En effet, le choix d'un protocole de fonctionnalisation de surface adapté permet par la suite à des NPs d'or de venir s'agréger et se fixer à la surface d'or en présence de l'espèce cible à détecter. Cet agrégat modifie considérablement l'environnement proche de la surface sondé par le SP amplifiant ainsi le signal SPR. Sur ce principe, un détecteur se reposant sur l'utilisation d'une fibre optique a été développé par YUAN et al., 2019 pour détecter les ions mercure en solution. La gaine de la fibre est retirée sur une zone d'environ 5 mm de longueur puis le coeur est recouvert d'une couche d'accroche de chrome de 2 nm d'épaisseur et enfin d'un film d'or de 60 nm d'épaisseur. La surface est ensuite fonctionnalisée par une couche de 4-MPY (fig 2.6.a). Des NPs d'or de diamètre 17 nm sont également fonctionnalisées par des molécules 4-MPY. L'ion mercure peut alors être chélaté d'une part par un ligand 4-MPY présent sur le film d'or et d'autre part par un ligand 4-MPY fixé sur une NP d'or. La position spectrale de la résonance plasmon est mesurée grâce à un spectromètre. La solution contenant les ions à détecter est placée en contact avec la surface d'or pendant 15 minutes suivi d'un ajout de la solution colloïdale de NPs d'or

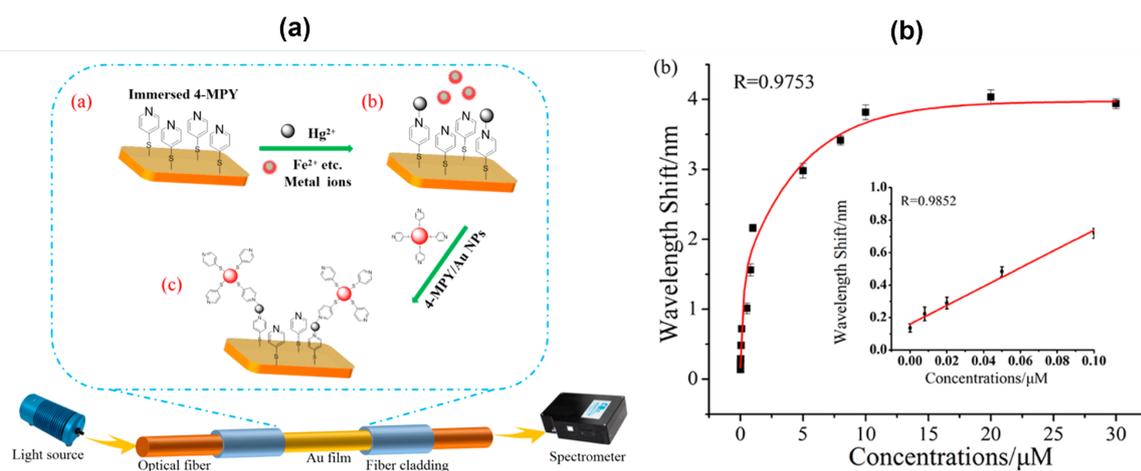


FIGURE 2.6 – **a.** Schémas représentant l'instrument expérimental utilisant une fibre optique dont le coeur est couvert sur une partie d'un film d'or fonctionnalisé par la 4-MPY. **b.** Variation de la position spectrale de la résonance plasmon en fonction de la concentration en ion mercure des solutions testées [YUAN et al., 2019].

fonctionnalisées avec des 4-MPY. Le temps total de mesure est donc de 45 min. La dynamique de mesure est montrée sur la figure 2.6.b et la limite de détection annoncée est de 8 nM (1,6 μg/l). Afin de tester la spécificité aux ions interférents, la variation de la position spectrale de la résonance pour une concentration en ions mercure de 20 μM a été comparée à celles obtenues pour une concentration en interférents de 100 μM. Elle est 8 fois plus grande en présence des ions mercure à faible concentration révélant une très bonne spécificité.

Pour terminer avec les détecteurs se basant sur la technologie des fibres optiques, un cas original utilisant des bactéries E.Coli B40 (inoffensives) a été reporté [HALKARE et al., 2019]. Ces bactéries servent de sondes spécifiques qui peuvent capturer le cadmium et préférentiellement le mercure. Ce détecteur peu onéreux a une limite de détection de l'ordre de 0,5 μg/l et montre une très bonne spécificité vis-à-vis des ions nickel, manganèse, cobalt, zinc et cuivre avec un temps de mesure de l'ordre de 10 minutes.

Finalement, la technologie des détecteurs SPR peut également être combinée avec d'autres afin de réaliser un instrument multimodal qui permet de dépasser les limitations qui peuvent être rencontrées dans la mise en application séparément de chacune des technologies. Ainsi, la détection par ASV peut être hybridée à la LSPR afin de développer un instrument bimodal appliqué à la détection de métaux lourds dans l'eau [N. LI et al., 2016]. L'électrode de travail, habituellement en mercure, a été remplacée par une électrode d'or nanostructurée par des nano-cônes d'hauteur 500 nm et espacés de 350 nm. Le spectre en transmission de cette électrode affiche deux bandes d'absorption à 536 nm et 598 nm. Lors de la détection, l'intensité de la lumière transmise à travers la structure est suivie à la longueur d'onde de 536 nm à l'aide d'une caméra (fig 2.7.b). Pendant la phase de stripping, l'application d'un potentiel ajustable entre la contre électrode et l'électrode de travail permet de déclencher l'oxydation des ions métalliques au niveau de l'électrode de travail et de libérer les ions en solution. Cela modifie les conditions de résonance du plasmon localisé qui se traduit par un

décalage de la bande d'absorption surveillée et donc à une variation de l'intensité lumineuse mesurée par la caméra. Les valeurs mesurées des potentiels d'oxydation permettent l'identification des ions métalliques, sans passer par la fonctionnalisation de surface par des sondes spécifiques, tandis que la mesure de la transmission de la lumière permet de déterminer les concentrations des ions avec un rapport signal à bruit deux fois plus grand que dans le cas d'un simple détecteur ASV. En effet, les limitations d'un détecteur ASV qui ont été mises en évidence dans la section 2.1.1 peuvent être dépassées par une méthode basée sur la LSPR qui est peu sensible au bruit mécanique ou aux mouvements de convection dans la solution étudiée. La mesure des concentrations des différents ions présents en solution prend au total environ 4 minutes et la limite de détection est de  $1 \mu\text{g/l}$ .

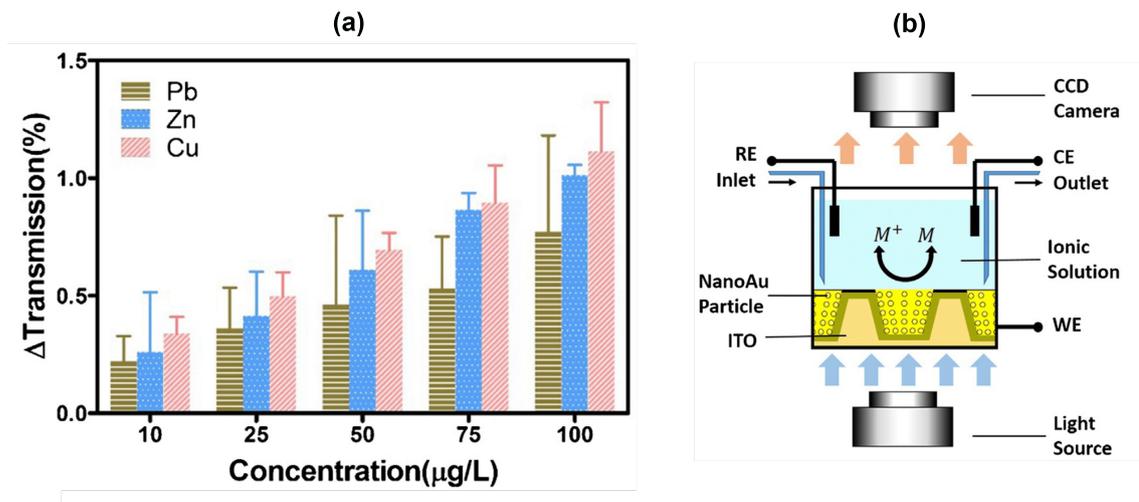


FIGURE 2.7 – **a.** Variation de la transmission mesurée à 536 nm de l'électrode nanostructurée en fonction de la concentration des différents ions des solutions testées **b.** Schémas représentant l'instrument bimodal combinant la détection ASV et LSPR. L'électrode de travail (WE) en or est nanostructurée par des nano-cônes. Un potentiel ajustable est appliqué entre la contre électrode (CE) et l'électrode de travail. L'électrode de référence (RE) permet de mesurer la valeur du potentiel [N. Li et al., 2016].

Les caractéristiques et performances des différentes technologies présentées dans cette section sont résumées dans le tableau 2.8.

| Technologie                               | LOD <sup>a</sup>   | Dyna.Mesure <sup>b</sup>  | Appareil portable | Sondes spécifiques                    | Référence                |
|---|--|---|-------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| SPR, Kretschmann, Interrogation angulaire | Cu <sup>2+</sup> : 0,1 ng/l                                      | 0,1 ng/l – 10 mg/l  | NON               | Colorant dans une matrice de polymère | [Ock et al, 2001]        |
|   | Cu <sup>2+</sup> : 2 ng/l<br>Ni <sup>2+</sup> : 2 ng/l           | Cu <sup>2+</sup> : 2 ng/l – 40 µg/l<br>Ni <sup>2+</sup> : 2 ng/l – 0,2 µg/l | NON               | Peptides                              | [Forzani et al, 2055]    |
| LSPR, NPs or                              | Cu <sup>2+</sup> : 0,64 µg/l                                     | 0,64 µg/l – 6 mg/l  | OUI               | ADN + enzyme                          | [Fang et al, 2010]       |
| SPR, Fibres optiques                      | Cu <sup>2+</sup> : 0,8 ng/l<br>Pb <sup>2+</sup> : 4 pg/l         | Cu <sup>2+</sup> : 0 g/l – 1 g/l<br>Pb <sup>2+</sup> : 0 µg/l – 0,2 µg/l    | OUI               | Nanoparticules de polymère            | [Shrivastav et al, 2018] |
| SPR + LSPR, Fibres Optiques               | Hg <sup>2+</sup> : 1,6 µg/l                                      | 1,6 µg/l – 2 mg/l   | OUI               | 4-MPY                                 | [Yuan et al, 2019]       |
| SPR + ASV                                 | Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup><br>1 µg/l | 1 µg/l – 100 µg/l   | NON               | aucune                                | [Li et al, 2016]         |

<sup>a</sup> Limite de détection

<sup>b</sup> Dynamique de mesure

FIGURE 2.8 – Tableau récapitulatif des différentes technologies de détecteurs plasmoniques présentés dans cette section.

Cette première partie permet une vue d'ensemble des enjeux de la détections d'ions métalliques, des techniques déjà mises au point ainsi que leurs performances et de comprendre les contraintes à prendre en compte pour le développement d'un détecteur permettant le dosage des ions à des faibles concentrations. En plus de respecter ces contraintes, l'instrument SURIMI à développer doit être compact, robuste pour une application en milieu marin et faible en consommation d'énergie : ce doit être un instrument portable. Ainsi, différents exemples d'instruments SPR portables qui ont déjà été développés vont être présentés dans la partie suivante.

## 2.2. DÉTECTEURS PLASMONIQUES PORTABLES

Le développement d'un détecteur portable doit respecter un certain nombre de contraintes : compacité et portabilité, robustesse vis-à-vis des vibrations mécaniques et des chocs, faible consommation d'énergie, ... Il faut également que la miniaturisation de la technologie choisie ne dégrade pas de façon significative ses performances en terme de sensibilité, de dynamique de mesure et de limite de détection. Afin de comparer les différentes solutions proposées entre elles, les critères de comparaison nécessaires seront : la résolution et la dynamique de mesure toutes deux exprimées en RIU, ainsi que la résolution temporelle.

D'après une récente revue sur les capteurs plasmoniques portables [MASSON, 2020], les différentes technologies plasmoniques sont des bonnes candidates pour développer un détecteur portable qui réponde à ces contraintes. En effet, pour ce type de technologie, la limite de détection théorique dépend uniquement du rapport signal à bruit de l'intensité de la lumière collectée par le

capteur utilisé (caméra, spectromètre, matrice de photodiodes, ...) [PILIARIK et HOMOLA, 2009]. En pratique, l'intensité lumineuse fournie par une simple LED et collectée par une caméra moderne permet d'obtenir un rapport signal à bruit suffisamment grand. En plus d'avoir une faible consommation d'énergie, ces deux composants sont peu encombrants et sont donc compatibles avec la miniaturisation d'un détecteur SPR. Les détecteurs plasmoniques portables se déclinent sous de nombreuses formes. Dans la section précédente, des exemples de détecteurs portables se basant sur l'utilisation de nanoparticules d'or ou de fibres optiques ont déjà été présentés. Dans ce dernier cas, une source lumineuse polychromatique et un spectromètre sont utilisés pour interroger les propriétés spectrales du plasmon de surface excité à l'interface du film métallique déposé sur le coeur de la fibre et du milieu diélectrique extérieur. La résolution en indice de réfraction de ce type de système est souvent dégradée par la présence de nombreux modes se propageant dans la fibre. En effet, la surface métallique est illuminée avec autant d'angles d'incidence que l'ouverture numérique de la fibre est grande, ce qui a tendance à élargir la résonance plasmon. Afin d'améliorer la résolution, il est donc nécessaire d'utiliser une fibre à faible ouverture numérique, faible diamètre de coeur et, si possible, qui est monomode.

La configuration de Kretschmaan a également été utilisée lors de la miniaturisation de détecteurs SPR se basant sur les méthodes d'interrogation angulaire et spectrale. Ainsi, un des premiers détecteur SPR portable est le Spreeta 2000 [T. CHINOWSKY et al., 2003] qui utilise la méthode d'interrogation angulaire. Un faisceau divergent émis par une LED ( $\lambda = 830$  nm) est polarisé TM avant d'éclairer la biopuce constituée d'un film d'or déposé sur une lame de verre. Cette dernière est en contact avec un prisme en plastique. Le faisceau réfléchi est renvoyé sur une matrice de photodiodes de 128 pixels à l'aide d'un miroir. Le tout est protégé par une enceinte opaque (fig 2.9). La géométrie du détecteur permet de sonder, simultanément, la résonance plasmon à différents angles d'incidences en différents points de la biopuce. L'angle d'incidence sous lequel la biopuce est éclairée augmente avec l'éloignement de celle-ci avec la LED. Les principales sources de bruit dans ce type de détecteurs sont : le bruit de photons de la matrice de photodiodes, les fluctuations d'intensité lumineuse de la LED et les fluctuations de température. Le bruit de photon peut être diminué par du moyennage temporel des spectres angulaires de la résonance plasmon. Le bruit supplémentaire introduit par les fluctuations de l'intensité lumineuse et de la température donne un bruit corrélé spatialement entre les différents pixels du capteur. Ce bruit peut être corrigé par une méthode de normalisation par la somme des intensités mesurées sur tous les pixels. Ainsi, pour un moyennage temporel de 160 spectres angulaires correspondant à une résolution temporelle de 0.8 s, une résolution de  $1,8 \cdot 10^{-7}$  RIU est obtenue ce qui peut être légèrement surestimé en regard des performances des instruments SPR en laboratoires. La dynamique de mesure testée avec succès est de  $4 \cdot 10^{-2}$  RIU. Ce détecteur seul ne permet pas de réaliser une détection parallélisée de différentes espèces cibles. Toutefois, sa compacité (1,5 cm x 0,7 cm x 3 cm) permet de concevoir un détecteur embarquant plusieurs Spreeta 2000 chacun destiné à détecter une espèce cible donnée. Un tel détecteur composé de 8 Spreeta 2000 permettant une détection simultanée sur 24 canaux a été conçu

[T. M. CHINOWSKY et al., 2007]. Il rentre dans une mallette de dimension (28 cm x 22 cm x 13 cm) pour une masse de 3 kg.

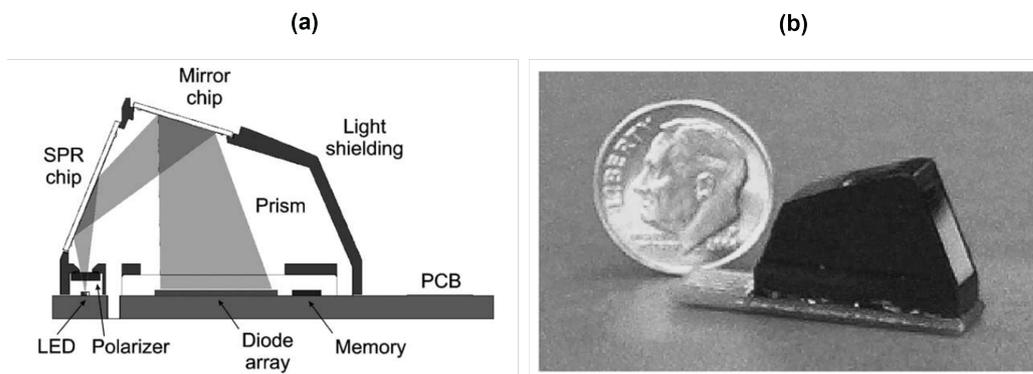


FIGURE 2.9 – a. Schéma représentant la structure interne du détecteur SPR portable Spreeta 2000 fonctionnant dans une configuration de Kretschmaan en interrogation angulaire. b. Photo mettant en avant la compacité du Spreeta 2000 [T. CHINOWSKY et al., 2003].

De leur côté, Affinité instruments ont commercialisé un instrument SPR portable se basant sur la méthode d'interrogation spectrale qui a initialement été développé par BOLDUC et al., 2009. Il se base sur la configuration de Kretschmann avec l'utilisation d'une source polychromatique, d'un polariseur et du spectromètre. Ce dernier peut être remplacé par une caméra et un filtre monochromatique peut être adapté à l'entrée du prisme afin de passer en interrogation en réflectivité débloquant la possibilité de détection simultanée de différentes espèces cibles grâce à l'imagerie. La position spectrale de la résonance plasmon est extraite à l'aide d'un algorithme de localisation du minimum et un traitement du signal basé sur la décomposition en valeurs singulières (SVD) permet de lisser le bruit tout en conservant les signaux traduisant les interactions biochimiques d'intérêt. Une résolution de  $1,5 \cdot 10^{-7}$  RIU est atteinte pour une dynamique de mesure de l'ordre de  $7 \cdot 10^{-2}$  RIU. La résolution temporelle est de 1 s pour un moyennage temporel de 50 spectres.

De plus, avec le développement de smartphone de plus en plus performants, il devient maintenant possible d'exploiter la caméra, la LED du flash et parfois même le processeur afin de construire un instrument SPR ultra-compact. Un premier exemple d'un tel instrument est montré sur la figure 2.10.a. Une fibre optique dont le cœur de  $400 \mu\text{m}$  de diamètre est fonctionnalisé par une couche d'argent de 50 nm d'épaisseur permet de coupler la lumière issue de la LED avec la caméra du smartphone. Un réseau de diffraction en transmission permet de mesurer le profil spectral de la résonance du plasmon de surface excité sur le film d'argent qui est imagé sur le capteur de la caméra. La partie de la fibre recouverte de la couche d'argent peut être immergée dans un liquide d'indice de réfraction ajustable et le profil spectral de la résonance plasmon peut être mesuré (fig 2.10.b). Les profils mesurés sont peu contrastés et assez larges ce qui résulte en une résolution assez faible de  $5,96 \cdot 10^{-4}$  RIU pour une dynamique de mesure de  $3 \cdot 10^{-2}$  RIU. Les données ne sont pas traitées directement à l'aide du smartphone mais un film de la détection est enregistré puis traité à l'aide de Matlab. Cependant, les processeurs des smartphone assez récents sont maintenant

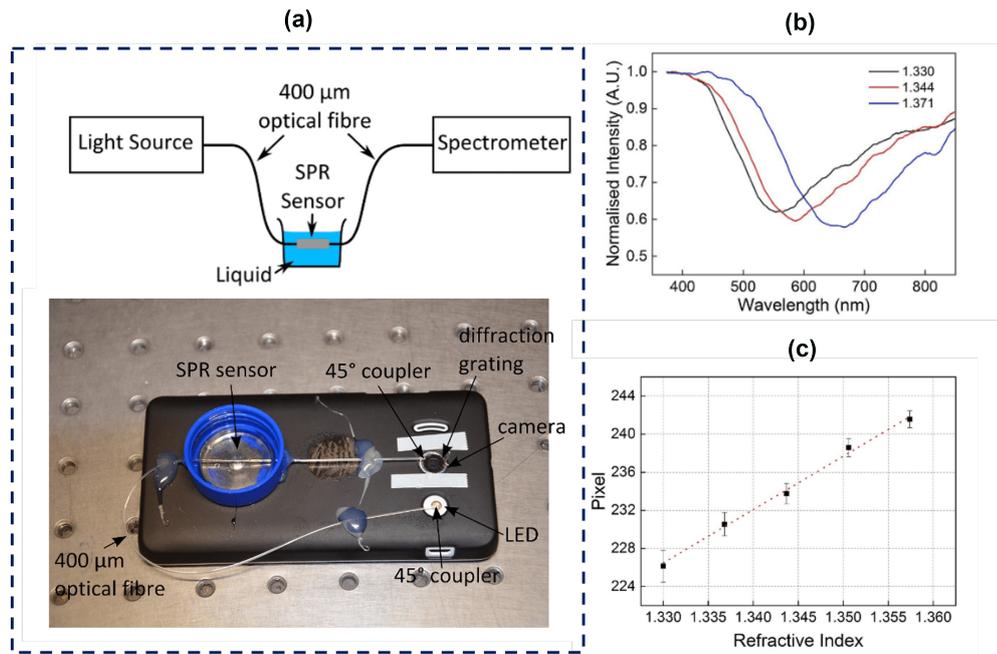


FIGURE 2.10 – a. Schéma et photo de l'instrument SPR portable basé sur l'utilisation d'une fibre optique et d'un smartphone. b. Profil spectral de la résonance plasmon enregistrée à l'aide de la caméra du smartphone. c. Évolution de la position de la résonance plasmon sur une ligne de pixels de la caméra en fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique [BREMER et ROTH, 2015].

suffisamment puissants pour faire fonctionner un logiciel qui traite les données en temps réel. Un tel exemple de détecteur reposant sur l'utilisation d'un Iphone 4 a permis de concevoir un détecteur portable appliqué à la détection d'ions cadmium [GAN et al., 2020]. La résolution temporelle est de l'ordre d'1 min et une valeur de la concentration des ions cadmium peut être obtenue au bout de 10 minutes. La limite de détection est de  $1,12 \mu\text{g/l}$  pour une dynamique de mesure allant de 2 à  $20 \mu\text{g/l}$ .

Finalement, une application d'un détecteur SPR sous-marin destiné à la détection de l'acide domoïque dans l'océan a été reportée [COLAS et al., 2016]. Il se base sur une méthode d'interrogation spectrale en configuration de Kretschmann. La partie optique de l'instrument est insérée dans un cylindre étanche qui est découplé du système de microfluidique qui permet d'amener l'eau de mer à analyser en contact avec la biopuce d'or. Un micro-ordinateur est également embarqué afin de traiter les données et d'en extraire le signal SPR qui est retransmis à la surface à l'aide d'un câble ethernet. L'instrument a été testé et validé à des profondeurs de 10 m et 20 m. La limite de détection de l'acide domoïque est de  $0,1 \mu\text{g/l}$  pour une dynamique de mesure de 0,1 à  $20 \mu\text{g/l}$ .

### 2.3. PERFORMANCES VISÉES POUR L'INSTRUMENT SURIMI

L'application principale visée de l'instrument SURIMI est la détection des ions Ni, Cu, Zn et Hg dans les océans à des profondeurs allant jusqu'au plancher océanique où se situent les cheminées volcaniques. L'instrument sera ensuite miniaturisé afin de le rendre portable pour être utilisé sur le

terrain afin de mesurer la pollution des cours d'eau aux ions Cd, Pb, Hg et Ni.

Ainsi, les contraintes techniques dans la réalisation de l'instrument sont les suivantes :

- il ne faut pas de parties mécaniques mobiles dans le système optique pour limiter les problèmes de désalignements ou de panne,
- il faut qu'il soit compact afin que sa taille soit adaptée au caisson étanche,
- il doit avoir une faible consommation d'énergie,
- il doit pouvoir réaliser la mesure parallèle de la concentration de 4 ions métalliques différents toutes les 5 minutes avec une limite de détection de 0,1  $\mu\text{g/l}$  (ou 0,1 ppb ou 1 nM).

Le plan de conception de l'instrument tient compte de ces contraintes mais également du savoir faire déjà acquis des différents partenaires du projet. Ainsi, la configuration de Kretschmann a été retenue avec une méthode d'interrogation d'imagerie multispectrale dont la preuve de concept a déjà été réalisée lors de précédents travaux au LCF. Elle est effectivement compatible avec la miniaturisation de l'instrument et se base sur l'utilisation de LEDs et d'une caméra CCD qui ont une faible consommation d'énergie. De plus, l'imagerie permet de paralléliser la détection de différents ions par la mesure du signal SPR en différents points de la biopuce. Cette dernière va être constituée d'un film de 50 nm d'or déposé sur un substrat de verre et sera fonctionnalisée par des polymères à empreintes ioniques (IIP) sous la forme de plots. Les protocoles de synthèse des IIP et de fonctionnalisation du film d'or seront développés par l'ESPCI en partenariat avec le LCF.

Finalement, lorsque l'instrument aura été validé en laboratoire, sa marinésation sera réalisée par l'IFREMER et la conception de la cuve et du système de microfluidique, permettant d'amener l'échantillon à analyser en contact avec la biopuce, sera réalisé par Klearia.



# 3

## INSTRUMENT SPR D'IMAGERIE MULTI-SPECTRALE

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>3.1</b> | <b>L'imagerie SPR multi-spectrale</b>                     | <b>50</b> |
| 3.1.1      | Principes et intérêts                                     | 50        |
| 3.1.2      | Structure d'un instrument d'imagerie SPR multi-spectrale. | 53        |
| <b>3.2</b> | <b>Algorithme de reconstruction de la résonance.</b>      | <b>54</b> |
| 3.2.1      | Présentation générale                                     | 54        |
| 3.2.2      | Développement de l'algorithme                             | 57        |
| 3.2.3      | Étude des performances de l'algorithme                    | 69        |
| <b>3.3</b> | <b>Instrumentation</b>                                    | <b>72</b> |
| 3.3.1      | Le système optique  | 72        |
| 3.3.2      | La cellule de microfluidique                              | 76        |
| 3.3.3      | L'Interface Humain Machine.                               | 77        |
| <b>3.4</b> | <b>Validation de l'instrument</b>                         | <b>79</b> |
| 3.4.1      | Validation du système optique.                            | 79        |
| 3.4.2      | Expérience validatrice : interaction de séquences d'ADN   | 85        |

### 3.1. L'IMAGERIE SPR MULTI-SPECTRALE

#### 3.1.1. PRINCIPES ET INTÉRÊTS

Il a été vu, dans le chapitre 1, qu'il existe différentes modalités d'interrogation du plasmon de surface afin de détecter une espèce chimique capturée par la biopuce. Parmi elles, l'interrogation en réflectivité est particulièrement intéressante car elle combine une bonne résolution ( $10^{-6}$  RIU) avec la possibilité de réaliser la détection de différentes espèces chimiques simultanément. En effet, dans ce mode de fonctionnement, un film de la biopuce est enregistré en temps réel. Ainsi, il est possible d'extraire les cinétiques d'interaction de différentes espèces cibles avec différentes sondes spécifiques déposées sur différentes zones de la biopuce sous la forme de plots.

En revanche, ce mode de fonctionnement possède une dynamique de mesure très limitée, de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-3}$  RIU. Son principe de fonctionnement est illustré sur la figure 1.6.b. Une augmentation de l'indice de réfraction du milieu diélectrique entraîne un déplacement de la résonance plasmon vers les grandes longueurs d'onde. Pour une augmentation de l'indice de réfraction de  $1 \cdot 10^{-3}$  RIU, le capteur a toujours une réponse linéaire. Si maintenant le changement de l'indice de réfraction est trop important, le point de fonctionnement quitte la zone où la courbe est linéaire. Une illustration plus précise de la faible dynamique de mesure de la méthode d'interrogation en réflectivité est donnée sur la figure 3.1.a. Le point de fonctionnement (point bleu) a été choisi au maximum de sensibilité avant saut d'indice dans le cas de la résonance représentée par la courbe bleue. Après le saut d'indice de  $5 \cdot 10^{-3}$  RIU, ce point se trouve dans une zone où la sensibilité diminue rapidement (point violet). L'évolution de la sensibilité du plasmon de surface en fonction de la longueur d'onde est représentée après le saut d'indice : elle est nulle pour la longueur d'onde de la résonance et maximale à 700 nm.

De plus, il est possible de simuler numériquement la réflectivité du système en configuration de Kretschmann afin d'étudier quantitativement la réponse du capteur SPR en fonction d'un changement d'indice de réfraction du milieu diélectrique croissant, pour les différentes méthodes d'interrogation. La simulation se base sur le calcul des coefficients de réflexion de Fresnel à chaque interface du système multi-couches composé du prisme, de la couche d'or et du milieu diélectrique. Les résultats de ce type de simulation, pour l'interrogation en réflectivité et l'interrogation d'imagerie multi-spectrale (MS-SPRi) introduite brièvement à la fin du chapitre 1, sont représentés sur la figure 3.1.b. Ainsi, il apparaît que pour l'interrogation en réflectivité, la sensibilité du capteur diminue très rapidement jusqu'à tendre vers zéro à partir de changement d'indice de réfraction supérieur à  $1 \cdot 10^{-2}$  RIU.

Cette dynamique de mesure très limitée peut poser problème lorsque le capteur évolue dans un environnement complexe où l'indice de réfraction du milieu diélectrique peut varier rapidement avec une très grande amplitude. Dans le cadre du projet SURIMI, le capteur va évoluer dans un environnement marin et particulièrement dans les grands fonds océaniques. Un changement de pression, de température ou de la composition chimique de l'environnement peut rendre le capteur inutilisable. Il faut donc basculer sur une autre technologie. Pour exemple, les variations de l'indice

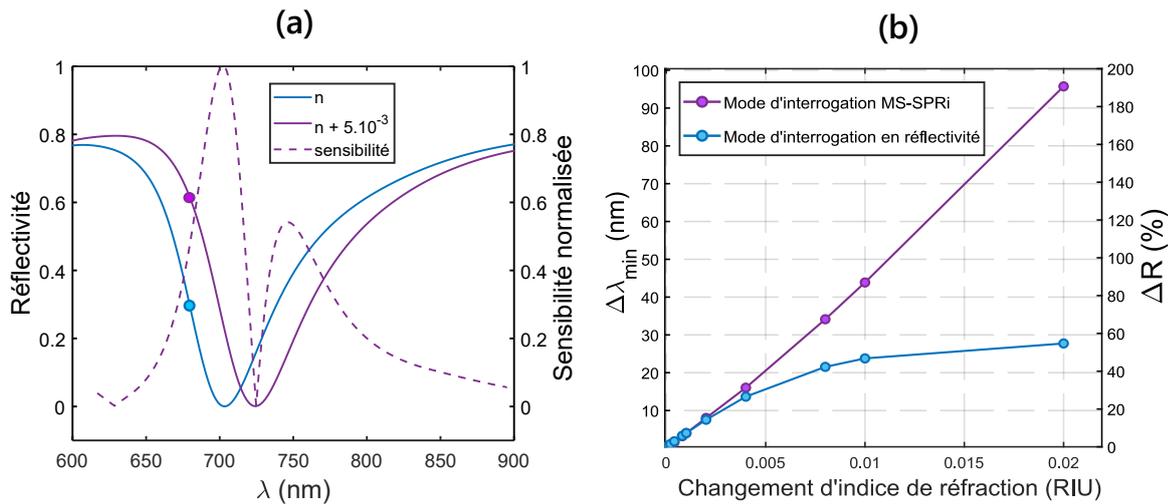


FIGURE 3.1 – **a.** Simulation du déplacement de la résonance plasmon lorsqu'un changement d'indice de réfraction de  $5.10^{-3}$  RIU se produit. La courbe en pointillés représente la sensibilité normalisée de la méthode d'interrogation en réflectivité dans le cas de la résonance après saut d'indice (courbe violette). Les points sont placés pour une longueur d'onde pour laquelle la sensibilité est maximale avant le saut d'indice (courbe bleue). **b** Simulation de l'évolution de la sensibilité en fonction du changement de l'indice de réfraction du milieu diélectrique pour la méthode d'interrogation MS-SPRi (donnée par  $\Delta\lambda_{min}$ ) et celle en réflectivité (donnée par  $\Delta R$ ). Dans le mode d'interrogation en réflectivité, la variation maximale de réflectivité est d'environ 50 %.

de réfraction de l'eau pure en fonction de la pression et de la température sont représentées sur la figure 3.2.

Cette limitation de ce mode d'interrogation est inhérente à l'utilisation d'une *seule* longueur d'onde d'excitation du plasmon pour un angle d'incidence fixé. L'imagerie SPR à une seule longueur d'onde n'est pas robuste à un déplacement de la résonance plasmon trop important. Un moyen de dépasser cette limite est d'échantillonner la résonance plasmon avec *plusieurs* longueurs d'onde. Un modèle théorique de la résonance plasmon peut ensuite être utilisé pour ajuster les valeurs expérimentales des réflectivités mesurées aux différentes longueurs d'onde. Grâce à cet ajustement, le suivi en temps réel du déplacement de la position spectrale de la résonance où la réflectivité est minimale, notée  $\lambda_{min}$ , peut être réalisé.

Il existe deux types de configurations expérimentales permettant l'échantillonnage de la résonance plasmon à plusieurs longueurs d'onde :

- la biopuce est éclairée, pour un angle d'incidence fixé, par une source polychromatique et le spectre de la lumière réfléchi est analysé soit avec un spectromètre [ZHANG et UTTAMCHANDANI, 1988], soit avec un système dispersif et une caméra [BARDIN et al., 2009]. Dans ce dernier cas, une dimension du capteur de la caméra est utilisé pour imager le spectre.
- la biopuce est éclairée, pour un angle d'incidence fixé, séquentiellement par un nombre limité de sources monochromatiques à des longueurs d'onde différentes. Une caméra enregistre séquentiellement les images de la biopuce aux différentes longueurs d'onde.

Dans la première configuration, l'utilisation d'un spectromètre ou d'une dimension du capteur d'une caméra pour imager le spectre de la lumière réfléchie ne permet pas l'imagerie en deux dimensions de toute la biopuce. Ceci limite la détection parallélisée de plusieurs espèces chimiques sur une même biopuce. C'est le mode d'interrogation en longueur d'onde. En revanche, la deuxième configuration permet de conserver l'imagerie mais avec une complexité supplémentaire. La pile d'images de la biopuce prises à différentes longueurs d'onde doit être traitée par un algorithme afin d'extraire la position spectrale de la résonance sur chaque pixel de l'image de la biopuce pour construire une unique image en  $\lambda_{min}$ .

3

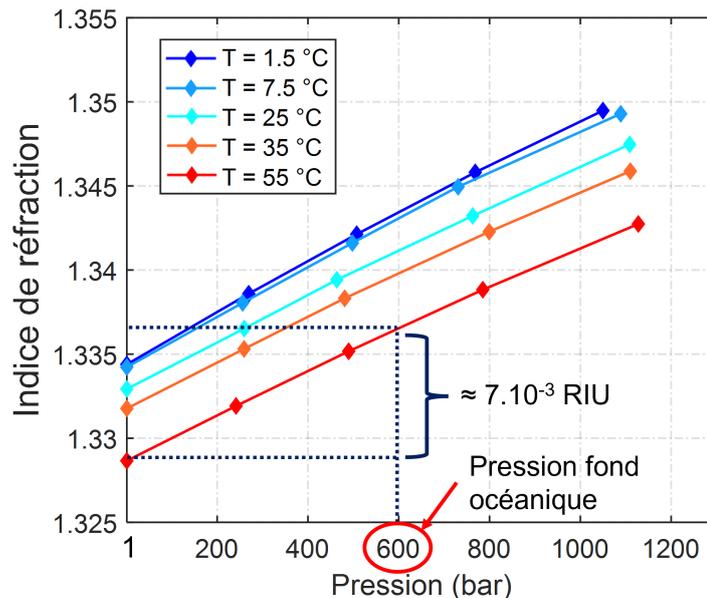


FIGURE 3.2 – Variation de l'indice de réfraction de l'eau pure en fonction de la pression et de la température [WAXLER et WEIR, 1963]. La droite en pointillés est tracée pour une pression égale à celle des fonds océaniques à 6000 m de profondeur. La mesure a été réalisée à 587,562 nm à l'aide d'une lampe à décharge d'hélium.

L'algorithme développé pour la conception de l'instrument SURIMI est détaillé dans la partie 3.2. Notamment, les performances de l'algorithme dans différentes configurations ont été étudiées. Le gain en dynamique de mesure peut déjà être observé sur la figure 3.1 qui représente la réponse du capteur en fonction du changement de l'indice de réfraction du milieu diélectrique. Les grandeurs suivies en temps réel sont  $\lambda_{min}$  et la réflectivité à la longueur d'onde d'excitation dans le cas de l'interrogation en imagerie SPR multi-spectrale (MS-SPRi) et dans le cas de l'interrogation en réflectivité, respectivement. La dynamique de mesure est étendue de plus d'un facteur 20. Ici, la résonance plasmon a été échantillonnée avec seulement 7 longueurs d'onde différentes. Le choix des longueurs d'onde est expliqué par la suite.

Une brève description de l'architecture de l'instrument SURIMI s'inspirant des travaux de thèse d'Alexandra Sereda [SEREDA, 2014] sur le développement d'un premier capteur par imagerie SPR multi-spectrale, va maintenant être présentée.

### 3.1.2. STRUCTURE D'UN INSTRUMENT D'IMAGERIE SPR MULTI-SPECTRALE

L'élément important qui compose un tel instrument est la source lumineuse. Elle doit permettre l'illumination de la biopuce à différentes longueurs d'onde de façon *séquentielle* afin d'échantillonner la résonance plasmon à des longueurs d'onde bien précises. Les paramètres de la source lumineuse à définir lors de son développement sont les suivants : le nombre de longueurs d'onde qui la composent, le pas spectral entre deux longueurs d'onde successives et la puissance lumineuse. Le choix de ces paramètres doit répondre à un certain nombre de critères.

Cette source doit se composer d'un nombre minimum de longueurs d'onde avec un pas spectral adapté afin de couvrir une gamme spectrale suffisamment large qui est à définir en fonction de l'application de l'instrument MS-SPRi. Par ailleurs, il existe un nombre maximum de longueurs d'onde afin de conserver une résolution temporelle compatible avec la mesure en temps réel. En effet, la durée d'acquisition d'une image de la biopuce en  $\lambda_{min}$  comprend le temps total d'acquisition des images en réflectivité prises aux différentes longueurs d'onde de la source, additionné au temps du traitement numérique de ces images. Ces deux contributions à la durée d'acquisition sont à optimiser indépendamment. La durée de la première contribution peut être réduite par une diminution du temps d'exposition de chaque image tout en veillant à conserver un flux lumineux sur le capteur de la caméra suffisamment important pour que le rapport signal à bruit reste satisfaisant. La source lumineuse développée doit donc fournir une puissance lumineuse adaptée. Quant à lui, le temps du traitement numérique peut être réduit par le développement d'un algorithme utilisant des techniques de calculs parallélisés.

Le reste de l'instrument est plus classique et reprend les éléments d'un instrument SPR fonctionnant dans le mode d'interrogation en réflectivité en configuration de Kretschmann. La biopuce est composée d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur déposé sur une lame de verre (SF10 ou BK7) et fonctionnalisé par une chimie de surface spécifique à l'espèce à détecter. Cette biopuce est déposée sur un prisme et le tout est monté en pression contre une cellule de microfluidique. La circulation de l'échantillon à analyser est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique. Dans le bras d'injection de la lumière, un polariseur permet de permuter la polarisation entre TE et TM. Un bras d'imagerie permet d'imager la surface de la biopuce sur le capteur d'une caméra. Le montage expérimental de l'instrument est détaillé dans la partie 3.3.

Une particularité d'un instrument MS-SPRi est la nécessité de synchroniser la caméra avec le déclenchement de la source lumineuse. La caméra enregistre, en continu, des piles de N images prises à N longueurs d'onde différentes qui sont traitées par un algorithme afin de produire une unique image où sur chaque pixel est extraite la position spectrale de la résonance. Le développement de cet algorithme est détaillé dans la partie suivante.

## 3.2. ALGORITHME DE RECONSTRUCTION DE LA RÉSONANCE

### 3.2.1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Dans ses travaux de thèse, A.Sereda [SEREDA, 2014] a mis au point une méthode numérique afin d'extraire la position spectrale de la résonance sur *plusieurs régions d'intérêts (ROIs)* de l'image de la biopuce définies par l'utilisateur grâce à un ajustement des réflectivités expérimentales par un modèle pseudo-lorentzien (3.1). Cette méthode a permis notamment d'extraire des cinétiques d'interaction de séquences d'ADN, de façon simultanée, sur plusieurs zones de la biopuce et dans plusieurs milieux avec différents indices de réfraction. Le choix de définir un nombre fini de ROI et de ne pas extraire  $\lambda_{min}$  sur toute l'image a été fait pour rendre compatible l'utilisation d'un ajustement, qui est chronophage, avec la contrainte de temps réel. Ainsi, la capacité d'imagerie de cet instrument MS-SPRi, définie dans le sens stricte du terme, est perdue lors du traitement numérique. Dans les présents travaux, le développement d'une méthode numérique plus sophistiquée va permettre d'extraire *sur chaque pixel* de l'image de la biopuce, la position spectrale de la résonance plasmon en temps réel. La résolution spatiale de l'image en  $\lambda_{min}$  est alors seulement limitée par la taille des pixels du capteur de la caméra ce qui donne accès à de nouvelles informations sur la dynamique spatiale des phénomènes physico-chimiques liés à l'interaction des sondes spécifiques avec les espèces cibles, e.g., la diffusion des ions métalliques dans des plots de polymères à empreinte ionique.

Dans un premier temps, le choix du modèle retenu pour modéliser la réflectivité proche de la résonance plasmon va être présenté. Cette étape est essentielle afin d'établir la stratégie numérique adaptée à l'extraction de l'information recherchée, à savoir, la position spectrale de la résonance plasmon. Ensuite, son implémentation numérique sera abordée : choix de la méthode numérique et optimisation du temps de calculs.

Il a été vu dans le chapitre 1, le calcul de la réflectivité du système multi-couches — prisme, film d'or et milieu diélectrique — à partir des coefficients de Fresnel. Cette réflectivité dépend d'une part des caractéristiques du système multi-couches et d'autre part de l'angle d'incidence et de la longueur d'onde de la lumière incidente. Dans le cas d'un instrument MS-SPRi, l'angle d'incidence étant fixé, l'évolution de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde peut être visualisée sur la figure 3.3.

Une façon de modéliser la courbe de la résonance plasmon est d'obtenir une expression analytique simplifiée de la réflectivité qui ne dépend que de quelques paramètres. En posant certaines conditions sur la permittivité diélectrique du métal, Kretschmann [KRETSCHMANN, 1971] a proposé une expression lorentzienne de la réflectivité (1.18) qui ne dépend que de trois paramètres. Cette simple modélisation permet de saisir certaines propriétés élémentaires du plasmon de surface comme l'exaltation et le confinement du champ électrique (fig 1.8.b). Cependant, elle ne permet pas d'extraire numériquement la position spectrale de la résonance plasmon avec la précision nécessaire pour une application à la biodétection. Notamment, une étude (voir annexe ??) de ce modèle de la résonance pour une implémentation dans un algorithme d'extraction de  $\lambda_{min}$  a révélé

des discontinuités dans sa réponse. Dans ce but, une expression pseudo-lorentzienne plus précise de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde a été proposée par Kurihara [KURIHARA et al., 2002]. Elle dépend maintenant de 5 paramètres et s'exprime de la façon suivante :

$$R(\lambda) = R_0 \times \left( 1 - D \times \frac{W + A \times (\lambda - \lambda_0)}{W^2 + (\lambda - \lambda_0)^2} \right) \quad (3.1)$$

- $R_0$  est la réflectivité loin de la résonance
- $A$  est le coefficient d'asymétrie de la courbe de la résonance
- $W$  définit la largeur de la résonance
- $D$  définit la profondeur de la résonance
- $\lambda_0$  est lié à la position spectrale de la résonance par la relation :

$$\lambda_{min} = \lambda_0 - \frac{W}{A} \times (1 - \sqrt{1 + A^2})$$

Cette expression est celle d'une lorentzienne qui est rendue asymétrique par la présence du terme linéaire au numérateur. Sa courbe est représentée en pointillés sur la figure 3.3. Les réflectivités expérimentales  $(R_i)_{1 \leq i \leq 5}$  sont correctement ajustées par le modèle aux abords de la résonance. Une réflectivité donnée  $R_i$  est le résultat d'une normalisation de l'intensité du faisceau lumineux réfléchi par le film d'or en polarisation TM par celle mesurée en polarisation TE sans l'effet plasmonique. En dessous de 600 nm, la courbe de la réflectivité obtenue par le modèle tend vers 100 % tandis que la réflectivité simulée chute rapidement. Cette décroissance correspond à la bande d'absorption de l'or qui n'est pas prise en compte dans le modèle présenté. La valeur du minimum de la réflectivité simulée est proche de 0 et s'annule complètement pour un unique couple de longueur d'onde et d'épaisseur du film d'or. En réalité, la valeur minimale que peut atteindre la réflectivité expérimentale est d'environ 10 %. À cause de la divergence angulaire du faisceau incident et de la largeur spectrale de la source lumineuse, la résonance plasmon réelle est plus large et moins profonde. La prise en compte par le modèle de ces contraintes expérimentales passe par augmenter la valeur du paramètre  $W$  et d'abaisser celle du paramètre  $D$  par rapport aux valeurs obtenues dans le cas de l'ajustement de la résonance simulée.

L'algorithme qui doit être développé pour traiter, de façon efficace et optimisée, les données issues de la mesure par MS-SPRi doit respecter certaines contraintes présentées ci-dessous.

La grandeur d'intérêt dans le cas d'un instrument MS-SPRi est la position spectrale de la résonance. Pour extraire sa valeur à l'aide du modèle à 5 paramètres, il faut donc au minimum 5 mesures de réflectivités prises à 5 longueurs d'onde différentes situées aux abords de la résonance. La source lumineuse multi-spectrale à développer pour cet instrument MS-SPRi doit donc comporter un minimum de 5 longueurs d'onde. En outre, la dynamique de mesure sera d'autant plus importante qu'il y a de longueurs d'onde différentes. Cependant, pour des raisons techniques qui sont discutées dans la partie 3.3.1, il y a un maximum de 7 longueurs d'onde qui composent la source multi-spectrale finale. Durant le fonctionnement de l'instrument MS-SPRi, à chaque instant, une

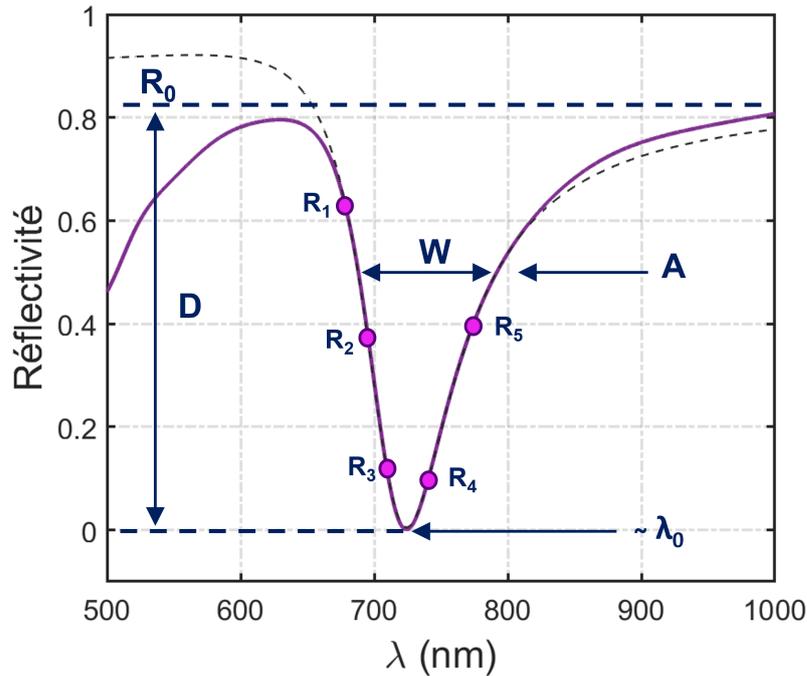


FIGURE 3.3 – Modélisation de la courbe de la résonance plasmon par un modèle à 5 paramètres :  $R_0$ ,  $A$ ,  $W$ ,  $D$ , et  $\lambda_0$ . Le courbe violette en trait plein correspond à la réflectivité simulée à partir des coefficients de Fresnel. La courbe en pointillés noirs correspond à l'ajustement des réflectivités  $(R_i)_{1 \leq i \leq 5}$  aux longueurs d'onde  $(\lambda_i)_{1 \leq i \leq 5}$  qui composent la source lumineuse par le modèle (eq 3.1).

pile de 7 images de réflectivités est donc enregistrée puis traitée par l'algorithme afin d'en extraire une unique image en  $\lambda_{min}$ . Le modèle ne nécessitant que 5 mesures de la réflectivité expérimentale, il faut pouvoir automatiquement sélectionner le bon jeu de 5 longueurs d'onde qui encadrent au mieux la position spectrale de la résonance. Ce jeu de longueurs d'onde ne sera pas forcément le même en tous points de la biopuce. En effet, la fonctionnalisation du film d'or par la chimie de surface peut décaler de façon significative la résonance plasmon. De plus, un changement brutal de l'indice de réfraction du milieu diélectrique peut nécessiter de basculer sur un jeu de longueurs d'onde différent.

D'autre part, les réflectivités expérimentales mesurées au cours du temps sont bruitées. Si toutes les sources de bruits extérieures sont négligeables, le bruit de photons du capteur de la caméra restreint fondamentalement les performances du détecteur. La limite de détection, définie comme la plus petite variation d'indice de réfraction mesurable, est proportionnelle à la valeur du bruit sur les réflectivités expérimentales. De plus, ce bruit peut être amplifié lors du traitement numérique des réflectivités, augmentant ainsi la limite de détection. Elle va donc dépendre de la robustesse de l'algorithme. Une étude qui sera détaillée dans la section 3.2.2 a montré que l'amplification du bruit sur la position spectrale de la résonance, extraite par l'algorithme, dépend fortement du conditionnement du problème numérique à résoudre.

Enfin, le temps de calculs de l'algorithme doit être compatible avec la mesure en temps réel des cinétiques d'interaction des espèces cibles avec les sondes spécifiques de la biopuce. Généralement,

l'ordre de grandeur du temps d'interaction est de 5 à 10 min. Une résolution temporelle raisonnable de la mesure est donc de l'ordre de 5 secondes. Le temps de calculs de l'algorithme a pu être optimisé en parallélisant le traitement de tous les pixels d'une image grâce à l'utilisation des matrices creuses et en sollicitant différents coeurs du processeur de l'ordinateur qui contrôle l'instrument.

### 3.2.2. DÉVELOPPEMENT DE L'ALGORITHME

#### 1. Sélection du bon jeu de réflectivités :

La première fonctionnalité de l'algorithme doit être de pouvoir automatiquement choisir les 5 réflectivités mesurées aux 5 longueurs d'onde parmi les 7 qui composent la source lumineuse et qui sont les plus proches de la résonance plasmon. Cependant, comme expliqué précédemment, la position spectrale de la résonance plasmon n'est pas nécessairement la même en chaque point de la biopuce et il faut donc sélectionner en conséquence le quintuple de réflectivité le mieux adapté pour chaque pixel d'une image. Ainsi, les 5 images en réflectivité recomposées servent ensuite à extraire la position spectrale de la résonance en chaque point de la biopuce. Sur la figure 3.4 l'exemple de deux pixels est traité. La résonance plasmon a lieu pour une longueur d'onde comprise entre  $\lambda_3$  et  $\lambda_4$  pour le pixel bleu et entre  $\lambda_4$  et  $\lambda_5$  pour le pixel violet. Ainsi, les quintuples de réflectivités choisis sont  $R_1^{exp}$  à  $R_5^{exp}$  pour le pixel bleu et  $R_2^{exp}$  à  $R_6^{exp}$  pour le pixel violet.

Dans la suite, les notations suivantes sont adoptées :

- $\{\lambda'_i\}_{1 \leq i \leq 5}$  correspond à l'ensemble des longueurs d'onde qui sont retenues pour l'ajustement de la résonance expérimentale par le modèle. Pour un pixel donné, la longueur d'onde centrale,  $\lambda'_3$ , peut être égale à  $\lambda_3$ ,  $\lambda_4$  ou  $\lambda_5$  en fonction de la position de la résonance sur la biopuce.
- $\{R'_i\}_{1 \leq i \leq 5}$  correspond à l'ensemble des réflectivités mesurées aux longueurs d'onde  $\lambda'_i$ .

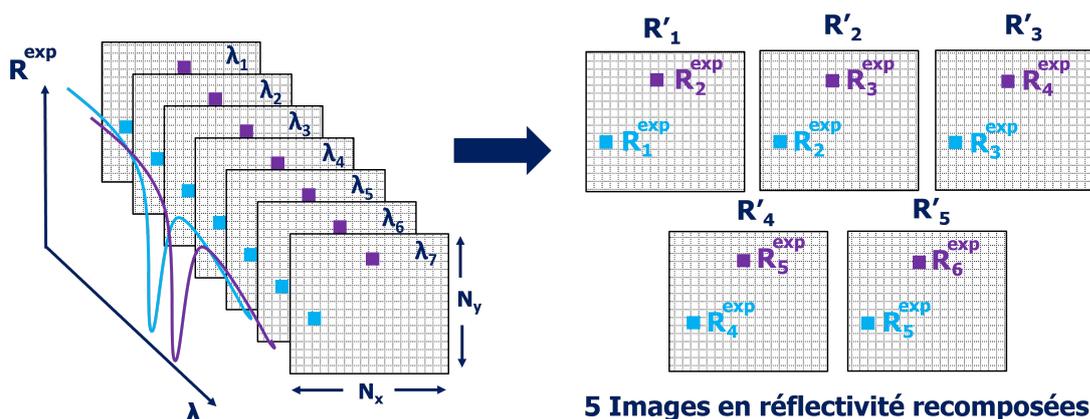


FIGURE 3.4 – Schémas de principe de la reconstitution de 5 images en réflectivité. Sur chaque pixel sont choisies les 5 réflectivités aux 5 longueurs d'onde parmi les 7 qui sont les plus proches de la résonance plasmon. La résonance plasmon a lieu pour une longueur d'onde comprise entre  $\lambda_3$  et  $\lambda_4$  pour le pixel bleu et entre  $\lambda_4$  et  $\lambda_5$  pour le pixel violet.

La première étape consiste à éliminer tous les pixels qui sont complètement hors résonance afin

que la suite de l'algorithme fonctionne correctement. En effet, il est possible que pour certaines zones de la biopuce, le peigne de longueurs d'onde choisi ne soit pas suffisamment large pour encadrer la résonance plasmon. L'extraction de  $\lambda_{min}$  est alors impossible. Hors résonance plasmon, la biopuce se comporte comme un miroir et en première approximation, la réflectivité est proche de 1 et indépendante de la longueur d'onde. Dans ces conditions, les observations expérimentales montrent que la dispersion des valeurs des réflectivités mesurées aux longueurs d'onde de la source lumineuse est alors au maximum de l'ordre de 30 %. Le critère arbitraire retenu pour éliminer ces pixels hors résonance est donc le suivant :

$$\begin{aligned} \text{Si } \max(\{R_i^{exp}\}_{1 \leq i \leq 7}) - \min(\{R_i^{exp}\}_{1 \leq i \leq 7}) \leq 0,3 \\ \text{alors } \{R_i^{exp}\}_{1 \leq i \leq 7} = 1 \end{aligned} \quad (3.2)$$

où  $\{R_i^{exp}\}_{1 \leq i \leq 7}$  est l'ensemble des réflectivités pour un pixel donné. Il aurait été plutôt d'usage de supprimer les pixels hors résonance en associant à leurs réflectivités un "Not a Number" (NaN). Cependant, la suite de l'algorithme d'extraction de  $\lambda_{min}$  fait appel à une méthode d'optimisation dans laquelle il est nécessaire de réaliser des inversions de matrices. Or une matrice contenant un NaN est non inversible et donc numériquement inexploitable comme telle. Sachant que dans une méthode d'optimisation il est essentiel de définir un point de départ hypothétiquement proche de la solution du problème, une technique qui n'est certes pas la plus élégante, mais qui a le mérite d'être simple, consiste à associer aux pixels hors résonance, dont les réflectivités sont strictement égales à 1, un point de départ pour la méthode d'optimisation complètement aberrant. Typiquement, un point de départ pour lequel  $\lambda_0 = 2000$  nm est utilisé. Cette longueur d'onde est très largement en dehors de la gamme spectrale d'excitation du plasmon. Il a été observé que dans ces conditions, l'algorithme converge rapidement, après seulement quelques itérations, sur une solution proche de  $\lambda_0$ . Ainsi, le calcul sur ces pixels hors résonance n'est pas le facteur limitant du temps d'extraction de  $\lambda_{min}$  sur une image complète. L'étape finale du traitement des données, pour reconstruire une image spectrale de la résonance plasmon de la biopuce, est d'associer un NaN aux pixels où la position spectrale de la résonance extraite est inférieure à 600 nm ou supérieure à 900 nm. Ces valeurs seuils ont été choisies de façon cohérente avec la gamme spectrale couverte par les longueurs d'onde disponibles dans la source lumineuse de l'instrument MS-SPRi construit (Tab 3.1 section 3.3.1). En d'autres termes, si la valeur de  $\lambda_{min}$  extraite par l'algorithme sur un pixel est en dehors de cette gamme spectrale, il est éliminé en lui associant un NaN.

La deuxième étape consiste à déterminer pour chaque pixel, la longueur d'onde  $\lambda_k$ , pour laquelle la réflectivité est minimale. Elle va définir quelle sera la réflectivité centrale  $R'_3$  associée à la longueur d'onde centrale  $\lambda'_3$ . Les 4 autres réflectivités à retenir seront celles qui encadrent la réflectivité centrale suivant le schéma (fig 3.4) :

| Si $1 \leq k < 3$  | Si $7 \geq k > 5$  | Sinon                  |
|--------------------|--------------------|------------------------|
| $R'_1 = R_1^{exp}$ | $R'_1 = R_3^{exp}$ | $R'_1 = R_{k-2}^{exp}$ |
| $R'_2 = R_2^{exp}$ | $R'_2 = R_4^{exp}$ | $R'_2 = R_{k-1}^{exp}$ |
| $R'_3 = R_3^{exp}$ | $R'_3 = R_5^{exp}$ | $R'_3 = R_k^{exp}$     |
| $R'_4 = R_4^{exp}$ | $R'_4 = R_6^{exp}$ | $R'_4 = R_{k+1}^{exp}$ |
| $R'_5 = R_5^{exp}$ | $R'_5 = R_7^{exp}$ | $R'_5 = R_{k+2}^{exp}$ |

où les deux premières conditions permettent de traiter les situations où la résonance plasmon n'est pas centrée sur le peigne de longueurs d'onde (fig 3.5).

La recombinaison des 5 images en réflectivité passe par l'utilisation de masques numériques créés en suivant le raisonnement présenté ci-dessus. Soient  $N_x$  et  $N_y$  les nombres de pixels selon x et y respectivement (figure 3.4), ces mêmes masques sont utilisés afin de créer un tableau  $N_x \times N_y \times 5$  contenant les longueurs d'onde correspondantes au tableau  $N_x \times N_y \times 5$  contenant les images en réflectivité recomposées. Une fois cette étape accomplie, les données mises en forme peuvent être traitées pour extraire la position spectrale de la résonance.

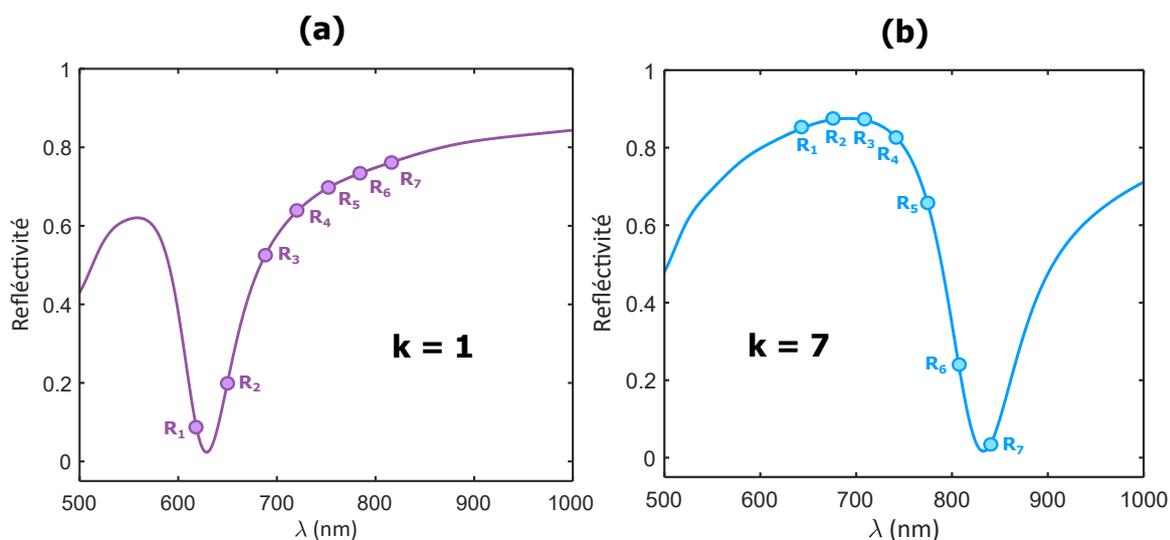


FIGURE 3.5 – Représentation des situations extrêmes où le peigne de longueur d'onde est décentré par rapport à la résonance plasmon avec  $k = 1$  (a) et  $k = 7$  (b).

2. Le choix de la méthode numérique :

Le modèle de la résonance choisi est celui décrit par la relation 3.1. L'objectif est d'utiliser une méthode d'optimisation afin d'extraire la valeur des 5 paramètres de ce modèle à partir d'un ajustement des réflectivités expérimentales. Le critère d'ajustement retenu consiste à minimiser la somme des résidus au carré. Un raisonnement simplifié va être présenté en considérant le cas d'un seul pixel. La généralisation à une image, qui est simplement un ensemble de  $N_x \times N_y$  pixels, passe par des méthodes de calculs parallélisés qui seront décrites dans la suite.

Soient  $\{R(\lambda'_i)\}_{1 \leq i \leq 5}$  l'ensemble des 5 réflectivités calculées avec le modèle, aux longueurs d'onde

expérimentales, et  $\{R'_i\}_{1 \leq i \leq 5}$  l'ensemble des réflectivités expérimentales sélectionnées à l'étape précédente et à ajuster par le modèle. Soit  $\mathbf{X} = [R_0, A, W, D, \lambda_0]$  le vecteur contenant les 5 paramètres du modèle. La  $i$ -ème composante de la fonction vectorielle, contenant les résidus de l'ajustement, s'exprime comme :

$$\begin{aligned} F_i &= R'_i - R(\lambda'_i) \\ &= R'_i - R_0 \times \left(1 - D \frac{W + A(\lambda'_i - \lambda_0)}{W^2 + (\lambda'_i - \lambda_0)^2}\right), \quad 1 \leq i \leq 5 \end{aligned} \quad (3.3)$$

La fonction vectorielle  $\mathbf{F} : \mathbb{R}^5 \mapsto \mathbb{R}^5$  est non linéaire. Soit  $\mathbf{X}^*$  le vecteur contenant les valeurs des paramètres issues de l'ajustement par minimisation de la somme des résidus au carré, il est alors la solution du problème des moindres-carrés non linéaire :

$$\min_{\mathbf{X} \in \mathbb{R}^5} (S(\mathbf{X}) = \|\mathbf{F}(\mathbf{X})\|^2) \quad (3.4)$$

La fonction  $S$  est la somme des résidus au carré  $F_i^2$ . Ce problème non linéaire n'a pas de solution analytique et sera résolu de façon numérique par une méthode itérative. Pour cela, il s'agit de définir un point de départ  $\mathbf{X}_0$  pour le vecteur contenant les paramètres du modèle à déterminer. Il est modifié, lors de la première itération, d'une valeur  $\delta \mathbf{x}$  définie comme le pas de chaque itération ou direction de descente. Si  $S(\mathbf{X}_0 + \delta \mathbf{x}) < S(\mathbf{X}_0)$  alors  $\mathbf{X}_0 + \delta \mathbf{x}$  est choisi comme nouveau point de départ de l'itération suivante. Cette opération est répétée un certain nombre de fois jusqu'à ce qu'un critère d'arrêt, initialement défini, est atteint.

La méthode de la descente du gradient est la plus simple pour résoudre ce type de problème. Elle consiste à suivre la direction opposée au gradient de  $S$ .

$$\delta \mathbf{x} = -\nabla S \quad (3.5)$$

Cette méthode est robuste pour un point de départ  $\mathbf{X}_0$  éloigné de la solution  $\mathbf{X}^*$ . Cependant, à mesure que  $\mathbf{X}$  se rapproche de  $\mathbf{X}^*$ , la vitesse de convergence diminue à la façon de la norme du gradient de  $S$ . La durée de résolution du problème peut donc devenir très importante si la courbure de  $S$ , proche de son minimum, est très faible.

De manière très générale, résoudre un problème des moindres-carrés, i.e. trouver le minimum de  $S$ , revient à déterminer la solution de l'équation vectorielle  $\nabla S = 0$ . Dans le cas du modèle à 5 paramètres, cela peut s'écrire sous la forme d'un système de 5 équations non linéaires. Il peut être linéarisé par un développement de Taylor au premier ordre puis résolu numériquement; c'est la méthode de Newton [GILBERT, 2021]. Le pas  $\delta \mathbf{x}$ , à chaque itération est donné par la relation :

$$\begin{aligned} \nabla S(\mathbf{X}) + \nabla^2 S(\mathbf{X}) \delta \mathbf{x} &= 0 \\ \delta \mathbf{x} &= -(\nabla^2 S(\mathbf{X}))^{-1} \nabla S(\mathbf{X}) \end{aligned} \quad (3.6)$$

avec

$$\nabla S(\mathbf{X}) = J_F^T(\mathbf{X})\mathbf{F}(\mathbf{X}) \quad \text{et} \quad \nabla^2 S(\mathbf{X}) = J_F^T(\mathbf{X})J_F(\mathbf{X}) + \sum_{i=1}^5 F_i(\mathbf{X})\nabla^2 F_i(\mathbf{X}) \quad (3.7)$$

Cette méthode demande, en plus du calcul de la jacobienne  $J_F(\mathbf{X})$  de  $\mathbf{F}$ , de déterminer l'expression de sa hessienne à chaque itération, ce qui peut demander beaucoup de ressources et ralentir la résolution numérique du problème. La méthode de Newton peut être approximée en négligeant le deuxième membre de  $\nabla^2 S(\mathbf{X})$ ; c'est la méthode de Gauss-Newton pour laquelle  $\delta\mathbf{x}$  vérifie :

$$\delta\mathbf{x} = -(J_F^T(\mathbf{X})J_F(\mathbf{X}))^{-1}\nabla S(\mathbf{X}) \quad (3.8)$$

La convergence de la méthode de descente du gradient est linéaire tandis qu'elle est quadratique pour la méthode de Gauss-Newton [GILBERT, 2021]. Un algorithme se basant sur la deuxième méthode sera donc plus rapide. Cependant, cette dernière est moins robuste pour un point de départ éloigné de la solution.

Dans le cas de l'instrument MS-SPRi développé ici, il y a un nombre limité de longueurs d'onde auxquelles sont mesurées les réflectivités qui vont être ajustées par le modèle. Il peut exister des situations où le peigne de longueurs d'onde n'est pas correctement centré par rapport à la position de la résonance. Par exemple, dans la situation extrême où seulement une réflectivité  $R_i^{exp}$  est mesurée à  $\lambda_i < \lambda_{min}$ , les 6 autres étant à  $\lambda_i > \lambda_{min}$ , l'algorithme basé sur la méthode de Gauss-Newton n'arrive pas à converger vers une solution.

Une nouvelle méthode consistant à réaliser une hybridation entre les deux méthodes présentées précédemment a été proposée pour la première fois par Levenberg en 1944 [LEVENBERG, 1944] puis revisitée par Marquardt en 1963 [MARQUARDT, 1963]. L'idée est d'utiliser la méthode de Gauss-Newton (GN), pour sa convergence rapide, corrigée par la méthode de descente du gradient (DG), pour sa robustesse. Cette hybridation se fait par l'introduction d'un nouveau paramètre,  $\mu$ , souvent appelé *paramètre d'atténuation* et de la matrice unité  $I$ . La valeur de ce paramètre va être modifiée à chaque nouvelle itération afin d'ajuster la proportion de chacune des deux méthodes présentes dans l'hybridation. C'est la méthode de Levenberg-Marquardt (LM) pour laquelle le pas  $\delta\mathbf{x}$ , à chaque itération vérifie :

$$(J_F^T(\mathbf{X})J_F(\mathbf{X}) + \mu I)\delta\mathbf{x} = -J_F^T(\mathbf{X})\mathbf{F}(\mathbf{X}) \quad (3.9)$$

Pour des "petites" valeurs de  $\mu$ , (3.9) peut s'approximer comme (3.8) et  $\delta\mathbf{x} \approx \delta\mathbf{x}_{GN}$  tandis que pour des "grandes" valeurs de  $\mu$ ,  $\delta\mathbf{x} \approx -\frac{1}{\mu}\nabla S(\mathbf{X})$  qui se rapproche de la direction donnée par la descente du gradient (3.5). D'après la relation (3.9), l'ordre de grandeur de  $\mu$  est à comparer au maximum des termes diagonaux de  $J_F^T(\mathbf{X})J_F(\mathbf{X})$ . La correction de la méthode de GN par la méthode de DG doit être importante pour les premières itérations si le point de départ est loin de la solution; puis à mesure que  $\mathbf{X}$  converge vers  $\mathbf{X}^*$ , la méthode de LM doit tendre vers la méthode de GN. Ainsi, sur les

premières itérations, le paramètre d'atténuation,  $\mu$ , doit être "grand" et au cours de la résolution, il doit être réduit pour finalement tendre vers 0. Cependant, il peut exister une situation où  $\mathbf{X}$  étant proche de  $\mathbf{X}^*$ , le pas choisi soit trop grand et  $\mathbf{X} + \delta\mathbf{x}$  s'éloigne de  $\mathbf{X}^*$ , alors  $S(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x}) > S(\mathbf{X})$ . Il faut donc mettre en place un garde-fou en augmentant la valeur du paramètre d'atténuation pour réduire l'amplitude du pas et ainsi éviter de dépasser le minimum de  $S$ .

Le choix de la valeur de départ pour le paramètre d'atténuation et la façon de le mettre à jour sont deux aspects importants à étudier pour adapter la méthode de Levenberg-Marquardt au problème à résoudre. Dans son article, Marquardt a proposé un protocole assez basique pour la mise à jour du paramètre d'atténuation :

$$\begin{aligned} \text{Si } S(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x}) < S(\mathbf{X}), \text{ alors } \mu &= \frac{\mu}{10} \\ \text{Si } S(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x}) > S(\mathbf{X}), \text{ alors } \mu &= 10 \times \mu \end{aligned} \quad (3.10)$$

D'autres auteurs se sont depuis intéressés à améliorer le protocole de mise à jour du paramètre d'atténuation. Celui qui a été retenu dans le cadre du développement du présent algorithme a été proposé par Bruun Nielsen [NIELSEN, 1999] qui s'inspire de celui décrit plus tôt par Fletcher [FLETCHER, 1971]. L'idée est d'éviter les variations trop brutales de  $\mu$  d'une itération à la suivante. À mesure que  $\mathbf{X}$  converge vers  $\mathbf{X}^*$ , la décroissance de  $S(\mathbf{X}) = \|\mathbf{F}(\mathbf{X})\|^2 = \mathbf{F}(\mathbf{X})^\top \mathbf{F}(\mathbf{X})$  devient si faible qu'elle peut être modélisée localement par une décroissance linéaire qui peut être exprimée à l'aide du développement limité de  $S(\mathbf{X})$  au premier ordre, noté  $L(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x})$  :

$$L(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x}) = (\mathbf{F}(\mathbf{X}) + J_F(\mathbf{X})\delta\mathbf{x})^\top (\mathbf{F}(\mathbf{X}) + J_F(\mathbf{X})\delta\mathbf{x})$$

Il est alors utile d'introduire une nouvelle grandeur, appelée *gain* et notée  $\rho$  qui compare la décroissance actuelle de  $S$  et celle de son approximation linéaire :

$$\rho = \frac{S(\mathbf{X}) - S(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x})}{L(\mathbf{X}) - L(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x})} \quad (3.11)$$

$$\text{avec } L(\mathbf{X}) - L(\mathbf{X} + \delta\mathbf{x}) = -2\delta\mathbf{x}^\top J_F(\mathbf{X})^\top \mathbf{F}(\mathbf{X}) - \delta\mathbf{x}^\top J_F(\mathbf{X})^\top J_F(\mathbf{X})\delta\mathbf{x}$$

À une itération donnée, si  $\rho > 0$  alors la direction prise par l'algorithme est la bonne, il faut diminuer  $\mu$  et le vecteur paramètre est mis à jour suivant la relation :  $\mathbf{X} = \mathbf{X} + \delta\mathbf{x}$ . Si  $\rho < 0$  alors il faut renouveler l'itération en augmentant  $\mu$ . À mesure que  $\mathbf{X}$  converge vers  $\mathbf{X}^*$ ,  $\rho \rightarrow 1$ . La proposition de Bruun Nielsen pour la mise à jour de  $\mu$  prend en compte la valeur de  $\rho$  à chaque itération :

$$\begin{aligned} - \text{Si } \rho > 0 \text{ alors } \mu &= \mu \times \max(1/3 ; 1 - (2\rho - 1)^3) \text{ et } \nu = 2 \\ \text{et } \mathbf{X} &= \mathbf{X} + \delta\mathbf{x} \\ - \text{Si } \rho < 0 \text{ alors } \mu &= \mu \times \nu \text{ et } \nu = 2 \times \nu \end{aligned} \quad (3.12)$$

Ce protocole de mise à jour permet d'éviter les changements brutaux du paramètre d'atténua-

tion entre deux itérations successives. La fonction  $\rho \mapsto 1 - (2\rho - 1)^3$  permet d'interpoler les valeurs de  $\mu$  proposées par Fletcher (fig 3.6). Ce dernier avait défini des valeurs seuils  $\rho_1 = 0.25$  et  $\rho_2 = 0.75$  du gain pour lesquelles  $\mu$  doit être mis à jour.

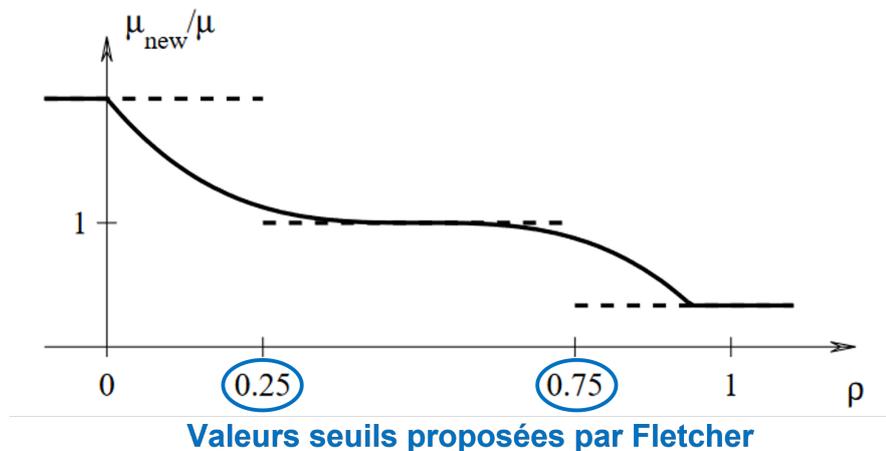


FIGURE 3.6 – Représentation du protocole de mise-à-jour du paramètre d'atténuation  $\mu$  en fonction de la valeur du gain  $\rho$  [NIELSEN, 1999]. Les valeurs seuils  $\rho_1 = 0.25$  et  $\rho_2 = 0.75$  proposées par Fletcher sont également représentées. Le protocole proposé par Bruun Nielsen permet d'obtenir une évolution continue du paramètre d'atténuation en fonction de la valeur du gain calculée à chaque itération.

L'algorithme implémenté dans l'instrument MS-SPRi se base donc sur la méthode d'optimisation des moindres carrés non linéaires de Levenberg-Marquardt [LEVENBERG, 1944, MARQUARDT, 1963] dont le protocole de mise à jour du paramètre d'atténuation utilisé est celui proposé par Bruun Nielsen [NIELSEN, 1999] avec les mêmes valeurs numériques.

### 3. La mise en forme du problème :

Lors du développement d'une méthode numérique de résolution d'un problème d'optimisation, il est important de poser correctement le problème numérique pour qu'il soit bien conditionné. Dans le cas de la méthode de Levenberg-Marquardt, la résolution du problème passe par l'inversion de la matrice  $A = J_F^T J_F$  et par le calcul de la matrice  $A^{-1} J_F^T$  (voir équation (3.9)). Afin que la résolution se déroule correctement, il est nécessaire que le nombre de conditionnement  $\kappa(A^{-1} J_F^T)$  de cette matrice ne soit pas trop élevé. Ce nombre peut être évalué à l'aide de la fonction "cond()" de Matlab ou "numpy.linalg.cond()" de Python. Ce nombre peut être vu comme un coefficient d'amplification du bruit sur les données en entrée de l'algorithme. La résolution d'un problème numérique peut même être rendue impossible par l'utilisation d'une matrice mal conditionnée. En effet, dans ce cas, la convergence de l'algorithme peut être sabotée si entre deux itérations, un pas  $\delta \mathbf{x}$  de trop grande amplitude a été effectué qui est ensuite excessivement amplifié par le nombre de conditionnement  $\kappa(A^{-1} J_F^T)$ . Une valeur de ce nombre la plus petite possible est donc recherchée. Une matrice singulière, qui est donc numériquement non inversible, a un nombre de conditionnement infini. Une discussion intéressante sur le sujet est proposée par Cleve Moler dans un billet de blog

[MOLER, 2017].

Dans le cas du problème d'optimisation à résoudre pour le développement de l'instrument MS-SPRi, se basant sur l'utilisation du modèle (3.1), la mise en forme du problème est passée par l'ajustement des ordres de grandeur des paramètres initiaux. Notamment, plus grande est la disparité des ordres de grandeur des coefficients d'une matrice, plus grand sera le nombre de conditionnement. Les paramètres concernés sont  $\mathbf{X} = [R_0, A, W, D, \lambda_0]$  et les valeurs des longueurs d'onde  $\lambda'_i$  auxquelles sont mesurées les réflectivités sélectionnées pour le calcul. Les ordres de grandeur de ces paramètres peuvent être modifiés artificiellement afin d'améliorer le conditionnement du problème (fig 3.7). Si les longueurs d'onde sont exprimées en nanomètre alors le nombre de conditionnement de la matrice  $A^{-1}J_F^T$  est de l'ordre de  $10^3$ . Dans le cas optimisé, les longueurs d'onde ont été exprimées en dixième de micromètre et, afin de garder la cohérence du modèle (3.1), les paramètres W et D ont été ajustés en conséquence. Cela a permis de diviser le nombre de conditionnement  $\kappa(A^{-1}J_F^T)$  par un facteur de 33. Évidemment, cela ne change rien à la valeur de la position spectrale  $\lambda_{min}$  extraite à l'aide de l'algorithme. Cette simple manipulation permet d'obtenir un problème numérique mieux conditionné et ainsi réduire à la fois les risques de divergence de l'algorithme et l'amplification du bruit sur les données expérimentales.

$$\begin{array}{ccc}
 \mathbf{X}_0 = [R_0 \ A \ W \ D \ \lambda_0] & & \mathbf{X}_0 = [R_0 \ A \ W \ D \ \lambda_0] \\
 = [0.8 \ 0.5 \ 30 \ 30 \ 720] & \longrightarrow & = [0.8 \ 0.5 \ 0.3 \ 0.3 \ 7.2] \\
 \boldsymbol{\lambda}' = [682 \ 713 \ 732 \ 762 \ 799] & & \boldsymbol{\lambda}' = [6.82 \ 7.13 \ 7.32 \ 7.62 \ 7.99] \\
 \boxed{\text{Cond}(A^{-1}J^T) = 1213} & & \boxed{\text{Cond}(A^{-1}J^T) = 36.5}
 \end{array}$$

FIGURE 3.7 – Optimisation du conditionnement de la matrice A en modifiant artificiellement l'ordre de grandeur de certains paramètres physique en entrée de l'algorithme.  $\mathbf{X}_0$  est le vecteur contenant les valeurs initiales des paramètres du modèle à extraire.  $\boldsymbol{\lambda}'$  est le vecteur contenant les longueurs d'onde correspondantes aux réflectivités sélectionnées.

#### 4. Le calcul parallélisé :

L'objectif principal de l'algorithme développé pour l'instrument MS-SPRi est de pouvoir réaliser, en temps réel, l'extraction de la position spectrale de la résonance sur tous les pixels de l'image de la biopuce. Il faut donc généraliser la méthode qui a été développée sur un pixel à un ensemble de  $N_x \times N_y$  pixels. Trois méthodes différentes vont être présentées dans la suite.

La première, la plus simple à implémenter, consiste à réaliser l'extraction de  $\lambda_{min}$  pixel après pixel à l'aide d'une boucle for qui va venir balayer l'image complète. Cette méthode est inefficace et donne des temps incompatibles avec les spécifications de l'instrument dès que la taille de l'image à traiter dépasse quelques milliers de pixels (fig 3.9).

La deuxième implique l'utilisation des matrices creuses qui sont des matrices essentiellement vides. Leur utilisation permet de réaliser, en une opération, la résolution de (3.9) sur toute l'image ;

ce qui revient à vectoriser le calcul par boucle for. L'équation (3.9) pouvant s'écrire sous la forme :

$$K\delta\mathbf{x} = \mathbf{B} \quad (3.13)$$

avec  $K = J_F^T J_F + \mu I$  et  $\mathbf{B} = -J_F \mathbf{F}$ . Dans le cas du calcul sur un seul pixel, la matrice  $K$  est une matrice  $5 \times 5$  dont les composantes s'expriment en fonction des 5 dérivées partielles de la jacobienne calculées pour chacune des 5 réflectivités. Pour une image de  $N_{pix} = N_x \times N_y$  pixels, une matrice creuse  $K$ , de dimensions  $5 * N_{pix} \times 5 * N_{pix}$ , est construite par un remplissage par blocs de sa diagonale où à chaque bloc, de taille  $5 \times 5$ , est associé le système d'équations (3.9) pour chaque pixel.  $\delta\mathbf{x}$  et  $\mathbf{B}$  sont alors des vecteurs  $5 * N_{pix}$ . Ainsi pour une image de  $500 \times 500$  pixels, la matrice  $K$  est une matrice de taille  $1\,250\,000 \times 1\,250\,000$  contenant  $1\,250\,000$  d'éléments non nuls répartis par blocs de  $5 \times 5$  sur la diagonale (fig 3.8). Le calcul de  $\delta\mathbf{x}$  se fait en une étape :  $\delta\mathbf{x} = K^{-1} \mathbf{B}$ . Ici, l'utilisation des matrices creuses permet de vectoriser la boucle for sur  $N_{pix}$  pixels à travers la résolution matricielle de l'équation linéaire (3.9). L'intérêt d'utiliser les matrices creuses est que, malgré leur taille gigantesque, l'espace mémoire nécessaire à leur stockage n'est pas si important car une très grande majorité des éléments qui les composent sont nuls et ne sont donc pas stockés dans la mémoire. Concrètement, la matrice creuse est stockée sous la forme d'un tableau contenant les coordonnées des éléments non nuls et les valeurs associées. Sur la figure 3.9, la courbe rouge et la courbe bleue

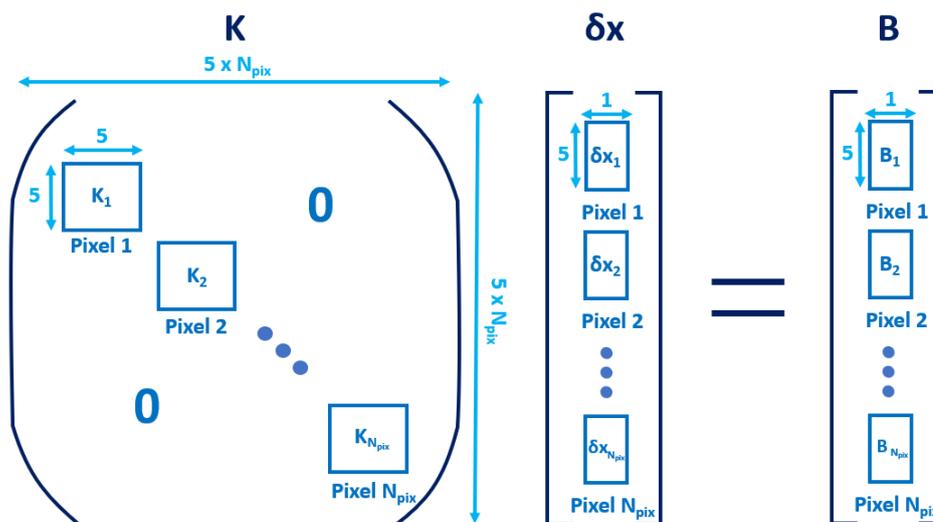


FIGURE 3.8 – Schéma de principe de la résolution de l'équation (3.13) par utilisation de la matrice creuse  $K$ .

représentent les résultats obtenus par utilisation de la boucle for et ceux obtenus par utilisation des matrices creuses respectivement. Cette simulation a été réalisée en utilisant un jeu de 5 images de taille  $N_x \times N_y$  pixels construites à partir d'un jeu de 5 réflectivités expérimentales auxquelles ont été ajoutées une dispersion gaussienne.

L'utilisation des matrices creuses permet d'abaisser le temps de calculs mais pas de façon significative. Pour une image de 1 MP, le temps de calcul est d'environ 71 s ce qui est bien trop grand pour une application en temps réel où un échantillonnage temporel d'environ 3 secondes est désiré. Pour une image d'environ 350 x 350 pixels, le temps de calcul dépasse les 5 secondes. De prime abord, il est étonnant que le temps de calcul dans le cas de l'utilisation des matrices creuses soit si important; la résolution matricielle de l'équation (3.9) ne prenant que quelques millisecondes. Il se trouve que l'étape chronophage lors de l'utilisation de cette méthode est le remplissage de la matrice creuse  $K$  à chaque nouvelle itération de l'algorithme lors de sa convergence. En effet, la jacobienne doit être mise à jour à chaque itération. Si le point de départ  $\mathbf{X}_0$  n'est pas trop loin de la solution, comme c'est le cas dans les résultats présentés sur la figure 3.9, il faut en moyenne 7 itérations pour que l'algorithme converge vers la solution. Le temps de calculs est diminué seulement d'environ un facteur 2 pour des images de moins de  $10^5$  pixels et d'environ 1,2 pour des images de plus de  $5 \cdot 10^5$  pixels. L'étape de remplissage de la matrice creuse  $K$  étant limitante, au plus la taille de la matrice à remplir sera importante au plus cette étape sera chronophage. Le gain temporelle de cette méthode par rapport à celle utilisant une simple boucle for diminue donc avec le nombre de pixels à traiter.

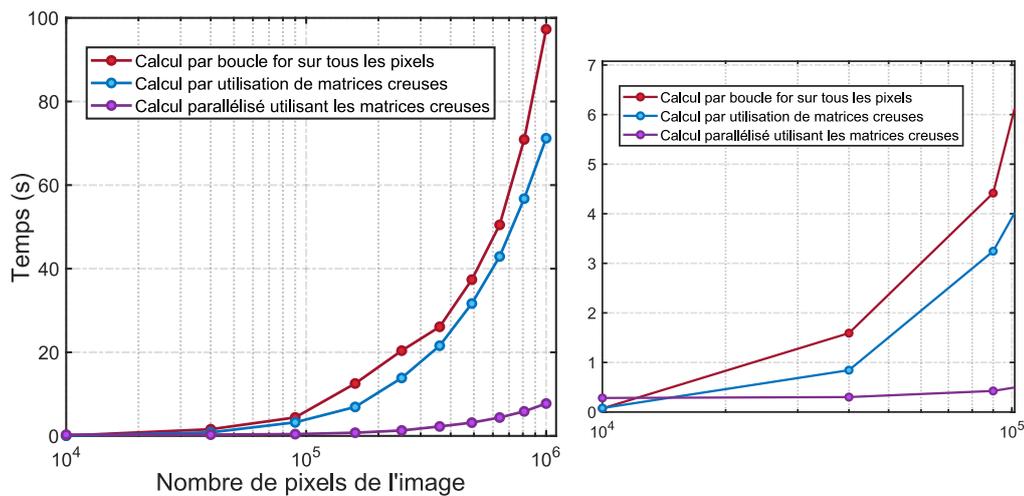


FIGURE 3.9 – Simulation de l'évolution du temps de calcul de l'algorithme en fonction du nombre de pixels, composant une image, à traiter. Trois méthodes de calculs sur tous les pixels de l'image sont présentées. Les images en réflectivité ont été construites à partir d'un jeu de 5 réflectivités expérimentales. Le point de départ donné à l'algorithme pour chacun des cas est le même  $\mathbf{X}_0 = [0.8 \ 0.4 \ 0.4 \ 0.4 \ 7.2]$  pour une position spectrale de la résonance à extraire :  $\lambda_{min} = 736$  nm. La simulation a été réalisée sous Matlab avec un processeur à 10 coeurs.

Une troisième stratégie consiste à ajouter un niveau de parallélisation supplémentaire en sollicitant plusieurs coeurs du processeur. Cette option est par exemple réalisable grâce à l'implémentation d'une boucle "parfor" dans Matlab. Elle permet de distribuer automatiquement les itérations indépendantes de la boucle for entre les différents coeurs sollicités. Elle est adaptée au problème

présenté car chaque pixel à traiter de l'image de la biopuce est indépendant. La boucle parfor permet d'obtenir une image spectrale de la biopuce dans des temps acceptables (environ 10 secondes pour une image de 1 MP). Cependant, la méthode peut encore être optimisée en combinant le calcul parallélisé avec la vectorisation du problème grâce aux matrices creuses. En effet, d'après l'analyse précédente sur la méthode utilisant les matrices creuses, il en ressort que pour des images de tailles moyennes, i.e. de l'ordre de  $10^5$  pixels, le temps de calcul de l'algorithme est compatible avec la contrainte de temps réel. L'idée est alors de découper l'image de la biopuce en N plus petites vignettes qui seront chacune traitée dans une itération d'une boucle parfor. Pour une itération de la boucle parfor l'extraction de  $\lambda_{min}$  sur tous les pixels d'une de ces vignettes de la biopuce se fera suivant la méthode décrite précédemment par le calcul matriciel utilisant les matrices creuses.

Il s'agit maintenant d'estimer le nombre N de vignettes à traiter qu'il faut découper dans l'image principale. L'ordre de grandeur de la taille maximale que peut avoir une vignette est donné par la limite décrite précédemment qui est de  $10^5$  pixels. L'image principale va être découpée en N bandes uniquement selon la direction y (fig 3.4). Elle aurait pu également être découpée en cadrillage de N sous-images carrées mais cela demande un développement plus complexe et comme chaque pixel est indépendant, la forme de découpe des vignettes n'a pas d'importance. Pour un nombre N = 10 et une image de 1 MP de la région fonctionnalisée de la biopuce, des vignettes de  $10^5$  pixels sont obtenues. Avec cette méthode, en utilisant 10 coeurs d'un processeur, une image de 1 MP peut être obtenue en environ 5 secondes. En réalité, le traitement d'une image de cette taille là n'est pas nécessaire. En effet, le rapport signal à bruit nécessaires aux mesures SPR impose toujours un certain moyennage spatiale et pour la taille du capteur CMOS utilisé dans l'instrument (voir section 3.3.1), la taille de l'image finale est d'environ 400 x 400. Le temps d'extraction de la position spectrale de la résonance sur une image de cette taille là est de moins de 1 seconde.

Sur la figure 3.10 est représentée le fonctionnement de l'algorithme développé avec ses deux niveaux de parallélisation qui permettent une extraction en temps réel de  $\lambda_{min}$  sur toute une image de la biopuce :

L'algorithme développé permet ainsi d'extraire une image spectrale de la résonance plasmon de la biopuce, d'une taille de 400 x 400 pixels en moins d'une seconde. Cet algorithme fonctionne sur la base d'un modèle à 5 paramètres. Pour chaque pixel, 5 réflectivités sont extraites d'un lot de 7 mesurées afin d'augmenter la grande dynamique de fonctionnement. Dans le cadre de l'instrument MS-SPRi développé dans ces travaux de thèse, la dynamique de mesure, exprimée en RIU, est au moins 10 fois supérieure à celle obtenue pour un instrument SPR classique fonctionnant en interrogation en réflectivité (fig 3.1).

Dans la partie suivante, une étude de la sensibilité et de la robustesse de l'algorithme va être présentée. Notamment, l'influence de la largeur spectrale des LEDs utilisées sur les performance de l'algorithme va être étudiée.

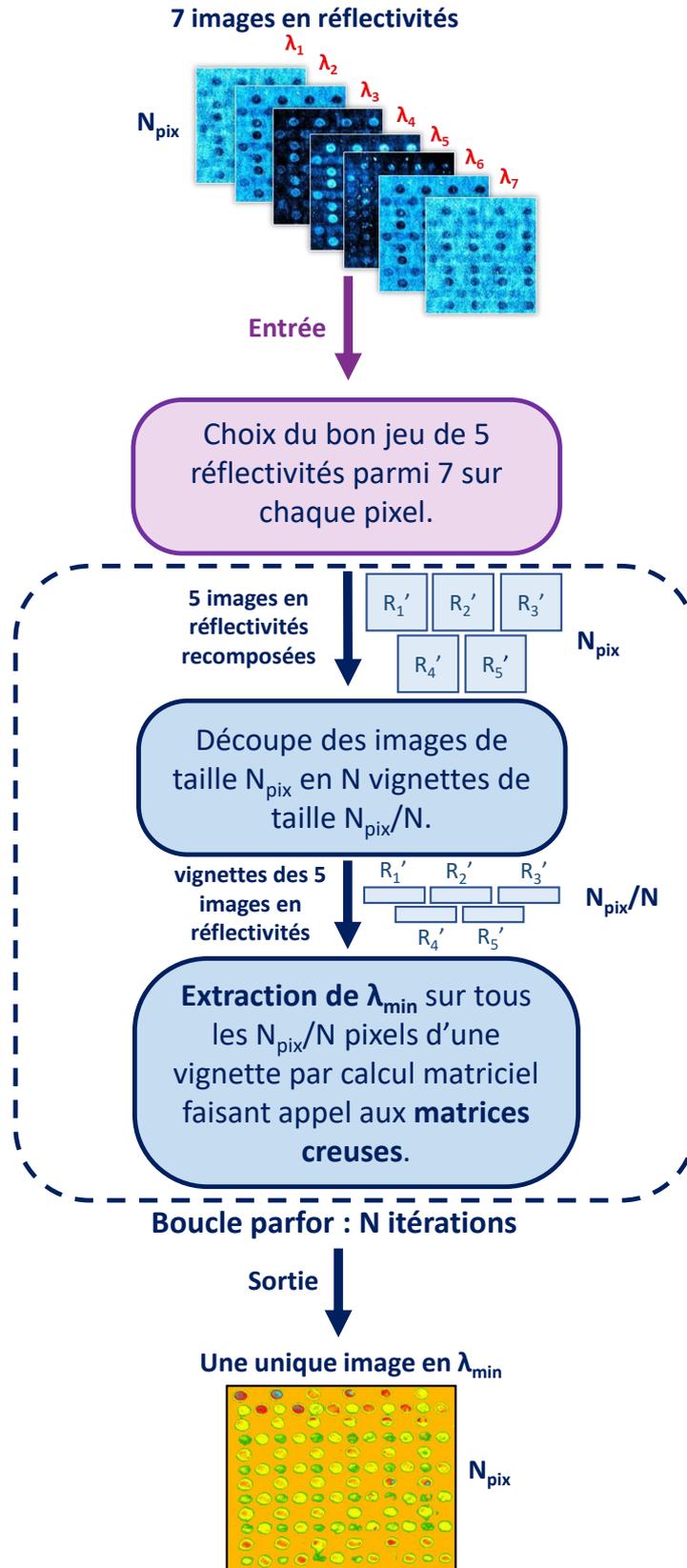


FIGURE 3.10 – Schéma block de l'algorithme d'extraction de la position spectrale de la résonance sur toute une image de la biopuce en temps réel.

### 3.2.3. ÉTUDE DES PERFORMANCES DE L'ALGORITHME

Afin d'essayer de comprendre le comportement de l'algorithme en conditions réelles, il est intéressant de simuler son comportement lorsque des réflectivités bruitées lui sont fournies en entrée. Il est également important de tester la robustesse de l'algorithme dans des conditions défavorables où la résonance plasmon n'est pas strictement alignée avec le spectre de la source lumineuse. L'étude de l'influence du pas spectral entre deux longueurs d'onde successives qui composent la source lumineuse mais aussi de l'influence de la largeur spectrale à chaque longueur sur les performances de l'algorithme doit être réalisée. Pour cela, la résonance plasmon est simulée sur une certaine gamme spectrale afin d'en extraire un jeu de 7 réflectivités aux longueurs d'onde souhaitées. Pour étudier la robustesse de l'algorithme au bruit, il est possible de rajouter un bruit gaussien aux réflectivités simulées à l'aide d'un générateur numérique de nombres aléatoires.

Le protocole suivi pour cette étude est le suivant :

1. Définition de la gamme spectrale de l'étude. La résonance plasmon va être simulée sur cette gamme spectrale. Ici, elle a été choisie telle que  $\lambda_{min}$  soit comprise entre 690 nm et 790 nm. Elle coïncide avec la gamme de fonctionnement optimale pour un instrument MS-SPRi utilisant une caméra visible proche infra-rouge. C'est dans cette gamme que la sensibilité de l'instrument sera la meilleure et le bruit de mesure le plus faible (fig 1.11).
2. Définition des caractéristiques de la source lumineuse simulée : pas spectral entre chaque LED et largeur spectrale de chaque LED. Le spectre de la source lumineuse simulée doit respecter la contrainte de la source réelle de l'instrument MS-SPRi qui comporte 7 longueurs d'onde.
3. Simulation de la résonance plasmon sur la gamme spectrale définie en 1 basée sur le calcul des coefficients de Fresnels à chaque interface du système multicouches (prisme - film d'or - milieu diélectrique).
4. Pour simuler la largeur spectrale  $\Delta\lambda$  d'une source réelle, la courbe de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde, pour une position spectrale de la résonance fixée, est convoluée avec une courbe gaussienne de largeur à mi-hauteur  $\Delta\lambda$ . Les 7 réflectivités aux 7 longueurs d'onde qui composent le spectre de la source lumineuse peuvent ensuite être extraites du résultat de cette convolution. La longueur d'onde centrale  $\lambda_4$ , du spectre de la source lumineuse est choisie égale à la longueur d'onde centrale de la gamme spectrale de l'étude, i.e.  $\lambda_4 = 740$  nm.
5. Enfin, en première approximation, un bruit aléatoire d'amplitude 0,04 % est ajouté, de façon identique aux 7 réflectivités grâce à la fonction `randn()` de Matlab. Pour une réflectivité de 40 %, qui correspond à une valeur mesurée dans une des pentes de la résonance, un bruit d'amplitude 0.04 % donnerait un rapport signal à bruit (RSB) de 1000. Cette valeur est environ 4 fois plus faible que le RSB réel de l'instrument final développé (voir section 3.4.1) et correspond à la situation où le bruit sur les réflectivités est dominé par le bruit introduit par

le système de lecture de la caméra mais qui peut être facilement corrigé. La simulation est donc réalisée pour un cas très défavorable.

6. Les 7 réflectivités et les 7 longueurs d'onde correspondantes sont enfin adressées en entrée de l'algorithme pour en extraire  $\lambda_{min}$ .

Les résultats de l'étude des performances de l'algorithme sur l'extraction de la position spectrale de la résonance sont présentés sur la figure 3.11 :

3

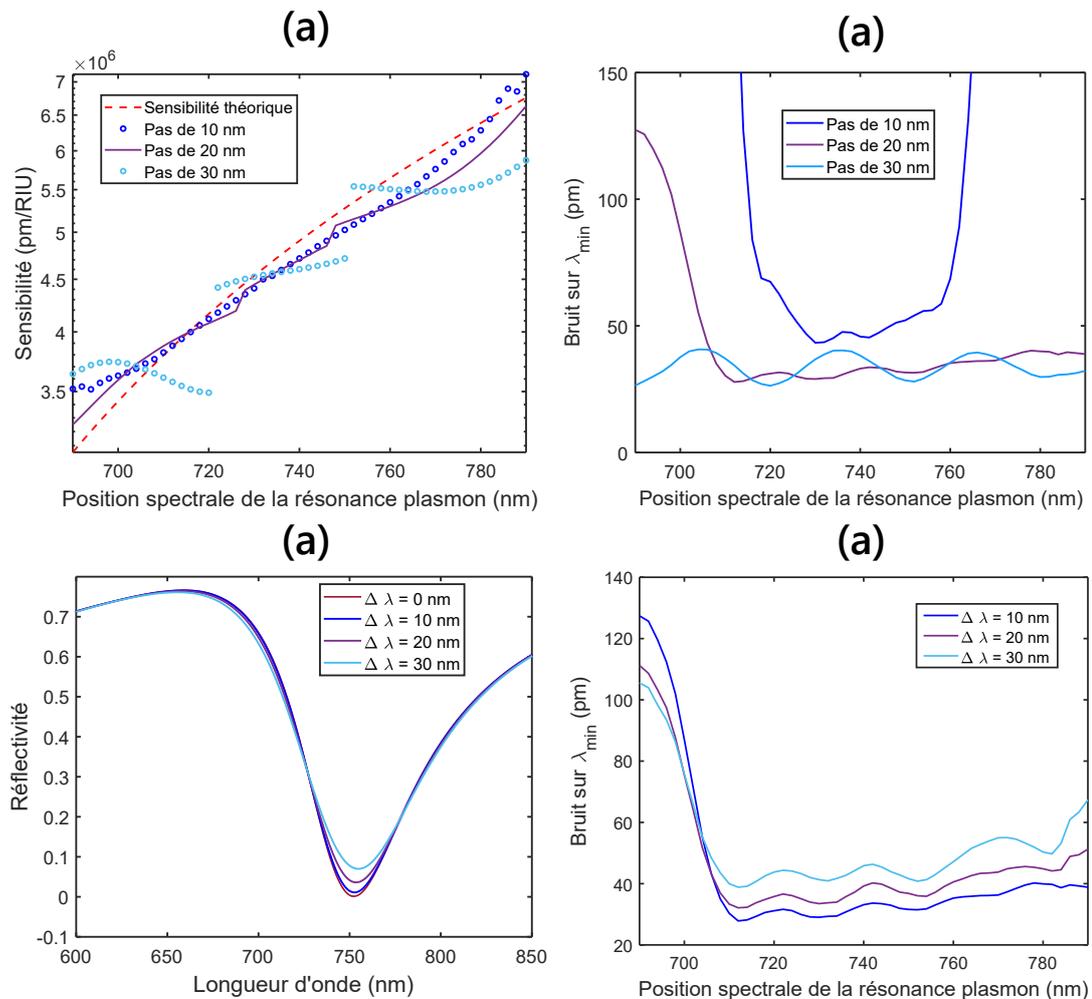


FIGURE 3.11 – Résultats des performances de l'algorithme pour différents pas spectraux entre deux longueurs d'onde successives et différentes largeurs spectrales des sources qui composent la source lumineuse multi-spectrale. Ces résultats sont obtenus à partir de réflectivités simulées. **a** : Sensibilité de l'algorithme à un saut d'indice de réfraction fixé. La sensibilité théorique [HOMOLA, 2006] a également été représentée pour comparaison. **b** : Évolution du bruit sur la position spectrale de la résonance extraite par l'algorithme en fonction de la position théorique pour différents pas spectraux. Un bruit de 0,04 % a été ajouté aux réflectivités simulées afin de modéliser des réflectivités réelles bruitées. **c** : Réflectivité en fonction de la longueur d'onde pour différentes largeurs spectrales des sources lumineuses qui composent la source multi-spectrale. **d** : Évolution du bruit sur la position spectrale de la résonance extraite par l'algorithme en fonction de la position théorique pour différentes largeurs spectrales.

La source multi-spectrale qui équipe l'instrument MS-SPRi est composée de 7 sources monochromatiques. Le pas spectral entre deux longueurs d'onde successives doit être choisi afin d'ob-

tenir une couverture spectrale suffisamment étendue tout en permettant une extraction de  $\lambda_{min}$  optimale. Si le pas spectral est trop grand, les réflectivités mesurées ne sont pas assez proches de la résonance plasmon ce qui mène à un sous-échantillonnage autour du minimum de réflectivité. Typiquement, il faut qu'au moins 4 réflectivités sur les 5 soient inférieures à 70 %. Dans le cas contraire, des artefacts sur l'extraction de  $\lambda_{min}$  peuvent apparaître. C'est le cas si le pas spectral vaut 30 nm, la sensibilité simulée de l'instrument est très éloignée de la sensibilité théorique et montre un comportement discontinu (fig 3.11.a). L'axe des ordonnées de la figure 3.11.a est en échelle logarithmique afin d'améliorer la visibilité des différentes courbes. En pratique, la sensibilité réelle de l'instrument est toujours calibrée grâce à l'injection d'une solution de calibration à la surface de la biopuce provoquant une variation d'indice de réfraction connue. Cependant, l'étape de calibration n'est pas suffisamment efficace pour corriger le comportement discontinu observé pour le pas spectral de 30 nm. Pour des pas spectraux de 10 et 20 nm, la sensibilité a un comportement plus continu et plus proche de la sensibilité théorique. Le pas spectral a également une influence sur le bruit sur  $\lambda_{min}$  calculée par l'algorithme. Plus le pas spectral est petit, plus la gamme spectrale sur laquelle le bruit est acceptable rétrécit (fig 3.11.b). Pour un pas spectral de 10 nm, le bruit augmente très rapidement lorsque la position de la résonance s'éloigne à plus de 20 nm de la longueur d'onde centrale  $\lambda_4$ .

Enfin, la largeur spectrale de chacune des 7 sources est une propriété intrinsèque. Son influence sur les performances de l'algorithme est étudiée en modélisant le spectre de chaque source par une fonction gaussienne de FWHM égale à la largeur spectrale. L'échantillonnage spectrale de la résonance plasmon par une source non strictement monochromatique, revient à convoluer la courbe de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde, avec le spectre gaussien des sources. Cela a tendance à élargir la résonance plasmon, à diminuer son amplitude et à décaler sa position vers les grandes longueurs d'onde (fig 3.11.c). L'effet de la largeur spectrale sur le bruit sur la position spectrale de la résonance extraite par l'algorithme a été étudié. Le pas spectral retenu pour cette étude est de 20 nm. Une augmentation de 25 % du bruit est constatée lorsque la largeur spectrale passe de 10 nm à 30 nm (fig 3.11.d). Le bruit est directement lié à la résolution de l'instrument et donc à la limite de détection. Un rapide calcul d'ordre de grandeur permet de mettre en perspective ces résultats de simulation. Pour  $\lambda_{min} = 740$  nm, un RSB de 1000, un pas spectral de 20 nm et une largeur spectrale de 10 nm, la sensibilité et le bruit valent respectivement  $5.10^6$  pm/RIU et 40 pm. Ce qui donne une résolution d'environ  $8.10^{-6}$  RIU qui est d'un ordre de grandeur au-dessus de l'état de l'art mais qui reste très largement acceptable. Notamment, le RSB de 1000 utilisé pour la simulation est très largement sous-estimé. En outre, un autre ordre de grandeur auquel se référer concerne l'amplitude du déplacement de la position spectrale de la résonance lors de l'interaction entre des espèces cibles et des sondes spécifiques. Les amplitudes de ces signaux SPR d'interaction spécifique, qui dépendent évidemment de la concentration, varient de quelques centaines de picomètres à quelques nanomètres.

### 3.3. INSTRUMENTATION

L'algorithme de traitement des images en réflectivité est une partie importante de l'instrument MS-SPRi développé. Il a largement été détaillé dans la partie précédente et validé sur des données simulées. La deuxième partie concerne le montage expérimental en lui-même. Il est décrit en détails dans la suite et une étude de ses performances sur des données réelles sont présentées.

## 3

#### 3.3.1. LE SYSTÈME OPTIQUE

Le schéma représentant l'instrument MS-SPRi développé est présenté sur la figure 3.13. Le système optique est constitué principalement d'une source lumineuse multi-spectrale, permettant l'échantillonnage de la résonance plasmon à différentes longueurs d'onde, d'un prisme de verre surmonté de la biopuce, d'un bras d'imagerie qui permet de collecter la lumière réfléchi par la biopuce et à imager cette dernière sur le capteur d'une caméra. Le système optique, ainsi que les systèmes de microfluidique et celui de pilotage de l'instrument sont détaillés dans la suite.

##### 1. La source lumineuse :

Elle est composée de 7 LEDs qui émettent à 7 longueurs d'onde différentes. Une LED donnée est injectée, par simple contact physique, dans une fibre optique de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre de coeur qui est montée sur un simple adaptateur SM1. Les 7 fibres optiques sont ensuite collées en nid d'abeilles à une fibre de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre de coeur (fig 3.12.b). Le bundle de fibres a été réalisé par l'entreprise Idil. Les LEDs proviennent de chez Roitner-Lasertechnik et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 3.1.

|      | Longueur d'onde (nm) | Largeur spectrale (nm) | Référence     |
|------|----------------------|------------------------|---------------|
| LED1 | 662                  | 21                     | LED 660N-03AU |
| LED2 | 683                  | 23                     | LED 680-02AU  |
| LED3 | 716                  | 26                     | LED 710-01AU  |
| LED4 | 737                  | 26                     | LED 740-01AU  |
| LED5 | 762                  | 25                     | LED 770-03AU  |
| LED6 | 800                  | 29                     | LED 800-01AU  |
| LED7 | 836                  | 45                     | LED 830-06AU  |

TABLE 3.1 – Caractéristiques optiques des LEDs qui composent la source lumineuse mesurées au spectromètre Ocean Insight Flame

Comme expliqué précédemment, la source développée pour ce projet possède 7 longueurs d'onde afin d'étendre la dynamique de mesure de l'instrument. Les valeurs des longueurs d'onde ont été choisies pour couvrir une large partie de la bande spectrale où le plasmon de surface peut être excité. La sensibilité de la caméra sur cette bande spectrale a également été prise en compte dans ce choix. Le pas spectral du peigne de longueurs d'onde est en moyenne d'environ 25 nm. La FWHM de chaque LED est donnée dans le tableau 3.1. À noter que le choix du pas spectral entre chaque

LED n'est pas strictement en accord avec les résultats des simulations. Ces dernières ont été réalisées après que la source lumineuse ait été câblée. Les performances actuelles de l'instrument, qui répondent totalement au cahier des charges établi, pourraient donc être encore améliorées en optimisant le pas spectral.

L'allumage des LEDs est piloté par une Raspberry Pi 3 équipée d'une carte d'électronique de puissance. Un code en Python, développé en collaboration avec Christophe Hecquet du Laboratoire Charles Fabry, permet de régler le temps d'exposition de chaque LED et le temps de pause entre l'allumage successive de deux LEDs. Le signal d'allumage des LEDs sert également à déclencher l'enregistrement de la caméra afin de synchroniser l'émission de la source lumineuse avec la prise d'images. Typiquement, un cycle correspond à l'allumage successive des 7 LEDs. L'ordre de grandeur du temps d'allumage d'une LED est d'environ 20 ms. Il est précisément choisi pour chaque LED afin qu'elles fournissent toute des intensités comparables qui permettent de quasiment saturer le capteur de la caméra.

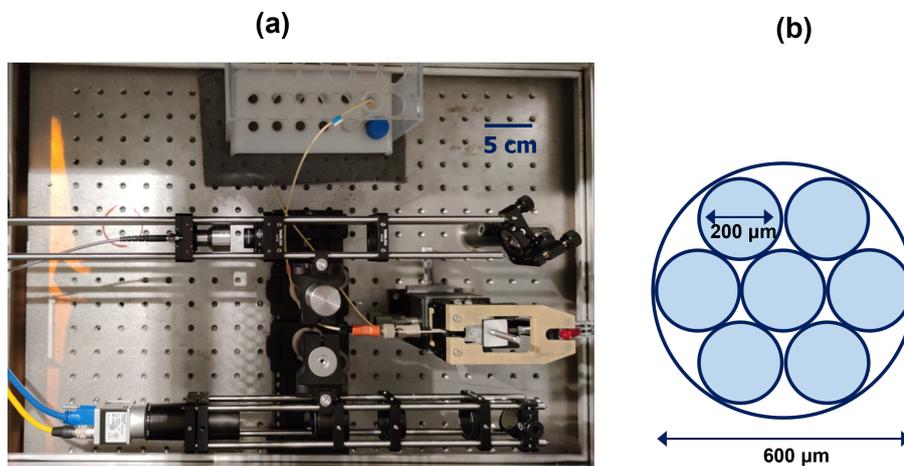


FIGURE 3.12 – **a** : Photo du montage expérimental. Le bras d'injection est en haut avec le collimateur fibré et le polariseur. Le bras d'imagerie est en bas avec notamment la caméra qui transmet les images au PC de contrôle à travers un câble USB3 bleu. Le prisme surmonté d'une lame d'or est placé verticalement contre le bloc en titane connectée au système microfluidique (non visible sur la photo) par les deux tuyaux d'entrée et de sortie. Une échelle de taille a été ajoutée en haut à droite. **b** : collage en nid d'abeilles des 7 fibres de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre de coeur à une fibre de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre de coeur pour former le bundle de fibres.

## 2. Bras d'injection de la lumière :

La sortie de la fibre de 600  $\mu\text{m}$  est couplée à un collimateur (F810SMA-780, Thorlabs) de focale 36 mm qui donne un faisceau collimaté de diamètre  $1/e^2$  de 7,5 mm et de divergence angulaire 0,96°. Un polariseur (LPVIS050-MP2, Thorlabs) permet de modifier la polarisation entre TE et TM. La prise d'images en polarisation TE permet de normaliser les images en polarisation TM afin de corriger les inhomogénéités d'éclairement sur la biopuce entre les différentes LEDs et d'obtenir les 7 réflectivités TM/TE. Les images TE sont enregistrées une seule fois lors d'une étape d'initialisation en début d'expérience. Un premier miroir (PF10-03-P01, Thorlabs) de renvoi permet de diriger le faisceau vers le prisme. La configuration en "M" retenue pour le trajet optique permet de gagner

en compacité. Elle se rapproche également de la configuration de la version finale de l'instrument SURIMI marinisé par l'IFREMER. Le prisme qui peut être en BK7 ou en SF10, en fonction de l'application, est surmonté de la lame d'or. Cette dernière est composée : d'un substrat en verre (BK7 ou SF10), recouvert d'un film d'accroche de chrome ou de titane de 3 nm d'épaisseur puis d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur. Cette dernière épaisseur est cruciale afin d'avoir un bon couplage de la lumière incidente avec le plasmon de surface (fig 1.7). Pour l'épaisseur optimale, le minimum de la réflectivité est proche de 0 et la résonance est étroite. Le prisme et la lame d'or sont mis en pression contre la cuve de microfluidique à l'aide d'une sauterelle mécanique.

### 3. Bras d'imagerie :

Un deuxième miroir de renvoi, identique au premier, permet de récupérer la lumière réfléchie par le film d'or. Un télescope constitué de deux lentilles convergentes ( $L_1$  et  $L_4$ , de focales 100 mm permet de faire l'image de la biopuce sur le capteur de la caméra tout en gardant un faisceau collimaté et donc un éclairage uniforme sur le capteur. La focale a été choisie afin de pouvoir construire un prototype suffisamment compacte tout en gardant une marge de manoeuvre sur le positionnement du bloc supportant le prisme. Afin d'exciter le plasmon de surface, l'angle d'incidence du faisceau incident est très grand (plus de  $45^\circ$ ), ce qui donne une image écrasée de la biopuce dans la direction de propagation du plasmon de surface. Le coefficient d'écrasement, qui dépend évidemment de l'angle d'incidence, est de l'ordre de 2 sur ce montage. Ainsi, un système d'imagerie anamorphique constitué d'une lentille cylindrique convergente  $L_2$  (LJ1629RM-B, Thorlabs) de focale 150 mm et d'une lentille cylindrique divergente  $L_3$  (LK1431RM-B, Thorlabs) de focale -75 mm permet de corriger l'écrasement de l'image.

Dans le cadre du projet SURIMI, la caméra sera installée dans un système embarqué sous-marin. Elle doit donc être peu onéreuse et compacte afin de pouvoir être facilement remplacée si elle est détériorée lors de l'opération de l'instrument dans les grands fonds. La caméra retenue est la Basler Ace A2000-165umNIR avec un capteur CMOS de 2048x1088 pixels qui est un cube de 29 mm de côté. Les images en niveaux de gris codés sur 12 bits sont transférées par USB3 et l'enregistrement peut être déclenché par l'envoi d'un signal TTL de 5 V sur un port d'entrée. Son rendement quantique atteint une valeur maximale de 60 % pour une longueur d'onde de 600 nm. La profondeur d'un puits du capteur est de  $13,5 \text{ ke}^-$  et le courant d'obscurité est de  $125 \text{ e}^-/\text{s}$ .

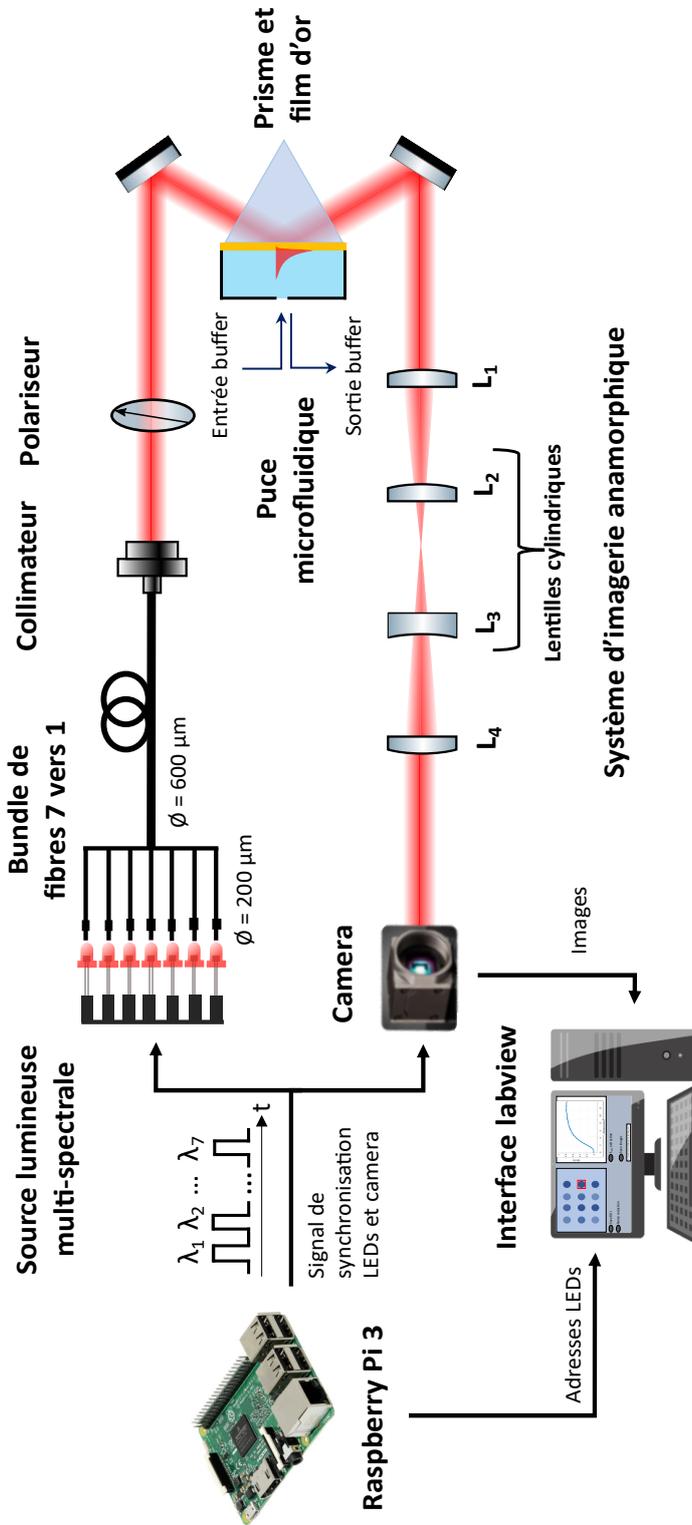


FIGURE 3.13 – Schémas de l'instrument d'imagerie SPR multi-spectrale.

### 3.3.2. LA CELLULE DE MICROFLUIDIQUE

Son rôle a été décrit dans la section 1.3. Elle est constituée d'un bloc en titane percé de deux trous permettant la circulation du milieu à analyser (fig 3.14). Une feuille de Mylar de  $90\ \mu\text{m}$  d'épaisseur sert de joint entre le bloc de titane et la lame d'or. Cette feuille est découpée par un disque de diamètre 1 cm qui délimite la cuve de microfluidique. Une forme rectangulaire est également découpée dans la feuille afin de réduire la surface du joint mise en pression ce qui améliore l'étanchéité.

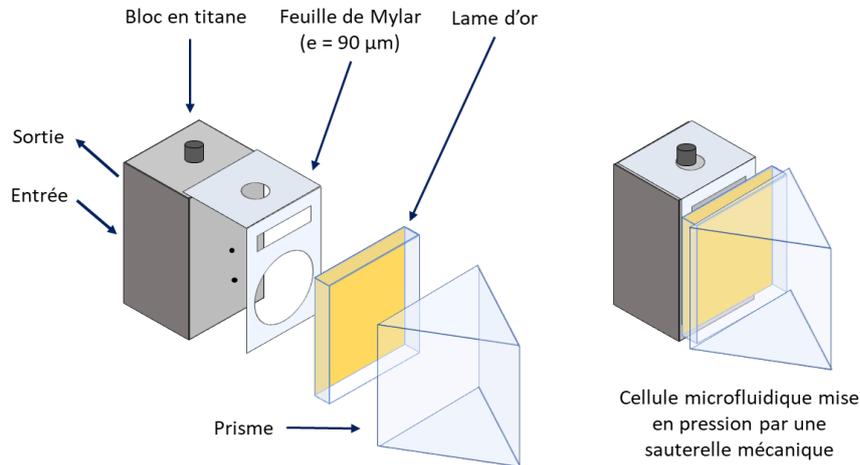


FIGURE 3.14 – À gauche, vue éclatée de la cellule de microfluidique. À droite, vue de la cellule de microfluidique lorsque le prisme est mis en pression contre la cuve en titane.

Une pompe peristaltique permet de faire circuler le milieu dans le système microfluidique avec un débit variable. L'ordre de grandeur du débit est de  $50\ \mu\text{l}/\text{min}$ . Elle est couplée à un dégazeur qui supprime les bulles d'air en entrée de circuit. En effet, si une bulle d'air vient à pénétrer dans la cuve de microfluidique, il est très probable qu'elle y reste bloquée, empêchant la mesure du signal SPR. Un système d'injection composé d'une boucle d'injection, d'une seringue et d'une vanne permet d'introduire l'échantillon à analyser sans couper le flux dans le système de microfluidique. Cela évite les variations de débit dans la cuve et qui donneraient des pics, non désirés, sur le signal SPR mesuré. L'échantillon est prélevé à l'aide d'une seringue de 1 ml de volume pour être injecté dans la boucle d'injection de  $500\ \mu\text{l}$  de volume. Le liquide en surplus est éliminé via une sortie dédiée. Au moment de l'injection, il suffit de tourner une vanne, la boucle d'injection est alors connectée au circuit principal et l'échantillon est poussé par le milieu qui tourne en continu. Il entre dans la cuve de microfluidique par le trou du bas et sort par le trou du haut pour être récupéré dans un récipient poubelle. Le système microfluidique est à l'extérieur du compartiment contenant le système optique.

### 3.3.3. L'INTERFACE HUMAIN MACHINE

L'Interface Humain Machine (IHM) a été codée en Labview. Des captures d'écran de l'IHM en fonctionnement, avec les détails des différentes fenêtres, boutons et curseurs, sont montrées dans l'annexe B.

#### 1. Pilotage de la caméra :

Le temps d'exposition peut être soit fixé à une valeur renseignée par l'expérimentateur ou fixé par la durée du signal de déclenchement. Un moyennage spatial (binning) peut être appliqué et la résolution du moyennage en nombre de pixels peut être choisie. Les images sont enregistrées par piles de 7 images et stockées sous formes de matrices de niveaux de gris.

#### 2. Prétraitement des données :

L'IHM récupère l'adresse des LEDs, envoyée par la Raspberry Pi 3, de façon synchronisée avec la capture des images. Elles sont ensuite triées automatiquement afin d'associer à chaque image d'une même pile, la longueur d'onde d'illumination correspondante. Un moyennage temporel est réalisé par moyennage d'un certain nombre de piles. Ce nombre peut être défini par l'expérimentateur. Par défaut, il est réglé sur 7 car c'est un nombre suffisant pour obtenir un niveau de bruit de photons satisfaisant sans trop dégrader la résolution temporelle. En effet, le temps d'allumage de chaque LED, qui dépend de la LED en question, est de l'ordre de 20 ms et le temps entre l'allumage de deux LEDs successives est de 20 ms. Le temps de pause entre deux cycles successifs, pendant lesquels les 7 LEDs auront été allumées, est d'environ 60 ms. Ainsi, le temps global d'un cycle est de  $7 \times 20 + 6 \times 20 + 60 = 320$  ms. Enfin, avec un moyennage temporel de 7 images, une pile de 7 images triées et moyennées est obtenue toutes les 2,2 s. Ce temps définit la résolution temporelle de l'instrument qui pourrait être amélioré en diminuant les différents temps mis en jeu. Le temps d'allumage est directement relié à l'intensité lumineuse captée par la caméra et ne peut pas être trop diminué au risque de dégrader le rapport signal à bruit. Toutefois, le couplage entre les LEDs et les fibres optiques pourrait être amélioré afin de collecter plus de lumière pour ensuite diminuer le temps d'allumage. En suivant le même raisonnement, la puissance lumineuse émise peut être augmentée en changeant de technologie et en utilisant des LEDs CMS. Les temps d'attente peuvent également être diminués en respectant la cadence de traitement des données par Labview qui est discutée ci-dessous. La résolution temporelle de 2,2 s est tout à fait acceptable lors de mesures d'interaction spécifique.

En début d'expérience, une étape d'initialisation permet d'enregistrer une pile d'images en polarisation TE, sans plasmon de surface. En cours d'expérience, le polariseur étant réglé sur la position TM, la pile d'images en polarisation TM est divisée par celle en TE afin d'obtenir une pile d'images de réflectivités normalisées. La normalisation par les images TE permet de corriger l'inhomogénéité de l'éclairement sur la biopuce.

Le prisme étant un élément dispersif, les images de la biopuce aux différentes longueurs d'onde ne se forment pas au même endroit sur le capteur de la caméra. Elles sont légèrement décalées

les unes par rapport aux autres dans une direction. Il peut être intéressant de recentrer ces images avant le traitement par l'algorithme afin d'améliorer la résolution spatiale sur l'image en  $\lambda_{min}$  calculée. Il est donc possible de recentrer numériquement les images par rapport à celle prise à plus faible longueur d'onde qui est choisie arbitrairement comme image de référence. Pour cela, l'expérimentateur doit renseigner le décalage maximum, exprimé en nombre de pixels, qu'il existe entre la première et la septième image. L'ordre de grandeur de ce décalage est d'environ 20 pixels. Ainsi, le décalage entre deux images successives est d'environ 3 pixels, ce qui est de l'ordre de grandeur du moyennage spatial appliqué aux images en réflectivités avant le traitement par l'algorithme. Ce décalage n'est donc pas si limitant en pratique.

### 3. Extraction de $\lambda_{min}$ :

L'IHM communique avec un script Matlab contenant l'algorithme d'extraction de la position spectrale de la résonance plasmon. La pile d'images de 7 réflectivités et enregistrées pour 7 longueurs d'onde différentes est transférée à Matlab puis traitée par l'algorithme qui ressort une unique image en  $\lambda_{min}$  de la biopuce.

La communication des images entre Labview et Matlab étant relativement lente, l'extraction de la position spectrale de la résonance en temps réel ne peut pas être effectuée sur une image complète. En effet, les piles d'images en attente de transfert vers Matlab s'accumulent dans une file d'attente ce qui sature la mémoire RAM de l'ordinateur en quelques minutes. Labview se met en défaut et il faut relancer l'expérience. Pour contourner ce problème, une fonction de recadrage permet de sélectionner une zone restreinte de l'image de la biopuce à traiter en temps réel. Ainsi, l'IHM n'est plus limitée par la communication entre Labview et Matlab. Cependant, les images brutes non recadrées sont enregistrées sur le disque dur de l'ordinateur. Elles pourront, après l'expérience, être traitées avec Matlab afin d'analyser les cinétiques d'interactions mesurées.

### 4. L'affichage :

Une première fenêtre permet d'afficher les images brutes de la biopuce pour chaque longueur d'onde. Une seconde fenêtre permet d'afficher l'image en  $\lambda_{min}$  de la biopuce. Sur cette fenêtre peuvent être dessinées des régions d'intérêts (ROI) sur lesquelles le signal SPR au cours du temps va être extrait. Ce dernier est affiché sur un graphe. Jusqu'à 5 ROI peuvent être affichées simultanément. Une dernière fenêtre permet d'afficher une image en variation de la position spectrale de la résonance plasmon. Au moment de l'injection de l'échantillon, une commande donnée par l'expérimentateur permet d'enregistrer l'image en  $\lambda_{min}$  correspondante qui sert d'image de référence. Ensuite, à chaque nouvelle acquisition, l'image de référence va être soustraite à l'image en  $\lambda_{min}$  et affichée dans la fenêtre adéquate. Cette fenêtre permet de visualiser la variation de la position spectrale de la résonance sur chaque pixel de l'image au cours du temps. L'amplitude de variation de  $\lambda_{min}$  lors d'une interactions entre des espèces cibles et les sondes est souvent inférieure au nanomètre. Une si faible variation ne serait pas visible sur une image en  $\lambda_{min}$  mais l'est beaucoup plus

sur une image en  $\Delta\lambda_{min}$ .

L'instrument MS-SPRi développé et présenté dans cette partie comporte une nouvelle sorte de source lumineuse composée de 7 LEDs à des longueurs d'onde différentes qui permettent d'échantillonner efficacement la résonance plasmon sur une gamme spectrale qui va de 690 nm à 790 nm. La seule partie mobile qu'il comporte est le polariseur. L'instrument finale à développer dans le cadre du projet SURIMI ne doit contenir aucune partie mobile. Le polariseur sert simplement à enregistrer un jeu de 7 réflectivités en polarisation TE en début d'expérience. Une autre façon d'obtenir les images de la biopuce en polarisation TE est d'injecter à sa surface un saut d'indice suffisamment grand pour décaler la résonance plasmon hors de la gamme spectrale couverte par la source lumineuse. Les images enregistrées ne dépendent alors plus de la polarisation car l'effet plasmonique n'est plus présent. Il suffit donc de remplacer le polariseur réglable par un polariseur fixé sur la polarisation TM.

Les performances de l'instrument MS-SPRi sont évaluées dans la suite. Notamment, une étude du rapport signal à bruit est réalisée afin d'estimer la résolution, et donc la limite de détection, de l'instrument. De plus, sa capacité à mesurer des interactions spécifiques pour différentes concentrations de sondes et d'espèces cibles est étudiée.

### 3.4. VALIDATION DE L'INSTRUMENT

#### 3.4.1. VALIDATION DU SYSTÈME OPTIQUE

Le critère pertinent à regarder pour valider le système optique est le rapport signal à bruit (RSB) mesuré sur les images de la biopuce. Un capteur SPR est très sensible, entre autres, aux fluctuations sur les réflectivités mesurées qui vont servir à extraire la position spectrale de la résonance. Ce bruit peut avoir plusieurs origines.

Tout d'abord, la valeur d'une réflectivité à une longueur d'onde donnée dépend de la position de la résonance. Si celle-ci n'est pas stable, i.e. si l'indice de réfraction perçu par le plasmon fluctue, cela va introduire un bruit sur la réflectivité. Les raisons potentielles de son instabilité sont les variations de températures ou l'adsorption/désorption d'espèce non désirées à la surface de la biopuce. Par exemple, si la température augmente,  $\lambda_{min}$  diminue avec l'indice de réfraction. Ces variations sont généralement très lentes, sur des temps de quelques minutes, et ne participent pas au bruit sur les réflectivité mais se manifestent par une dérive lente de  $\lambda_{min}$ .

Une autre source de bruit provient directement des fluctuations de l'intensité de la source lumineuse. Elles peuvent découler de l'échauffement des LEDs lors de leur temps d'allumage qui peut notamment modifier leurs longueurs d'onde d'émission (fig 3.15). Pour un temps d'allumage de 30 secondes, la longueur d'onde d'émission augmente de 300 pm pour un courant d'alimentation de 50 mA. Si la longueur d'onde d'émission se trouve dans une des pentes de la résonance plasmon (fig 1.6.b), une variation de 300 pm résulte en une variation d'environ 3 % de la réflectivité qui est du même ordre de grandeur que les variations de réflectivité induites par interaction spécifique entre

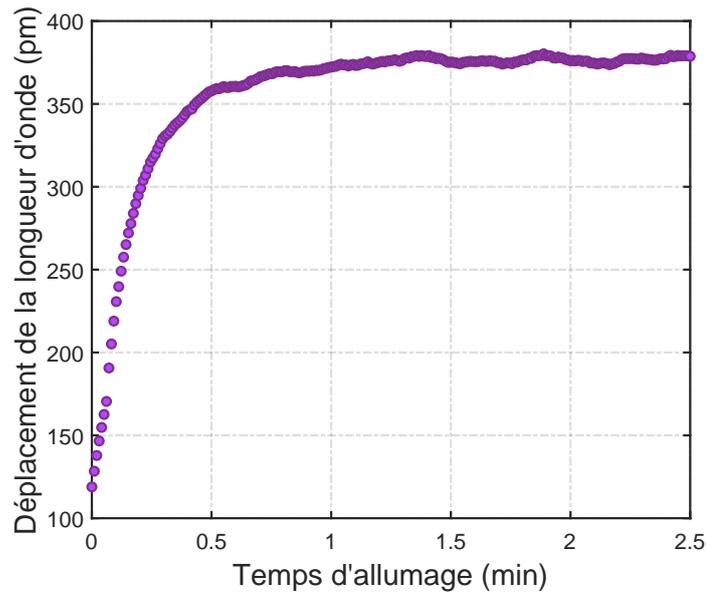


FIGURE 3.15 – Déplacement de la longueur d'onde d'émission d'une LED en fonction de son temps d'allumage. La mesure a été effectuée à l'aide d'un spectromètre UV-visible.

les cibles et les sondes; ce qui est fatal à la détection SPR. Ce problème avait été identifié dans les travaux d'une précédente doctorante de l'équipe [SEREDA, 2014]. Néanmoins, dans le cas de l'instrument MS-SPRi les LEDs ne sont allumées que pendant quelques millisecondes et n'ont pas le temps de chauffer pour qu'un effet notable soit observable sur le bruit de la réflectivité.

De plus, il faut prendre en compte le bruit d'obscurité de la caméra qui trouve son origine dans les électrons qui sont générés thermiquement, pour un pixel donné, lorsque le capteur ne reçoit pourtant aucun photon. La génération de ces électrons suit une distribution poissonnienne et le bruit qui en résulte ( $\sigma_D$ ) dépend, pour une température donnée, du courant d'obscurité ( $I_D$ ) et du temps d'exposition ( $T_{exp}$ ) :  $\sigma_D = \sqrt{I_D T_{exp}}$ . Dans le cas de l'instrument MS-SPRi se basant sur l'utilisation de la caméra Basler Ace A2000-165umNIR,  $I_D = 125 \text{ e}^-/\text{s}$  et  $T_{exp} = 20 \text{ ms}$ , le bruit d'obscurité sur un pixel vaut donc  $\sigma_D \approx 1,6 \text{ e}^- \text{ RMS}$ . Or, le nombre d'électrons par niveaux de gris d'un pixel de la caméra est de  $13,5 \text{ ke}^-/2^{12} \approx 3,3 \text{ e}^-$ . Dans ces conditions, le bruit d'obscurité est donc négligeable car inférieur, en nombres d'électrons, à un niveau de gris.

Finalement, la dernière contribution au bruit sur les réflectivités est le bruit de photons. Il est lié à l'arrivée aléatoire des photons sur le capteur. Le nombre de photons qui arrivent sur un pixel, pendant la durée d'exposition, suit une distribution poissonnienne. Le RSB lié au bruit de photons s'exprime en fonction des caractéristiques du capteur et du flux lumineux [SEREDA, 2014].

$$RSB_{photons\ détectés} = \sqrt{\frac{S \times N_{pixels} \times N_{images} \times N_{e^{-}/puits}}{2^{N_{bits}} \times \eta}} \quad (3.14)$$

- $S$  est le signal mesuré sur une ROI du capteur, exprimé en niveaux de gris
- $N_{pixels}$  est le nombre de pixels utilisés pour le moyennage spatial.
- $N_{images}$  est le nombre d'images utilisées pour le moyennage temporel.
- $N_{e^{-}/puits}$  est le nombre d'électrons par puits du capteur
- $N_{bits}$  est le nombre de bits de la caméra
- $\eta$  est le rendement quantique

Le  $RSB_{photons\ détectés}$  est représenté par la droite rouge de pente 1/2 sur la figure 3.16 dans le cas de la caméra Basler Ace A2000-165umNIR ( $\eta = 60\%$ ,  $N_{e^{-}/puits} = 13,5\ ke^{-}$  et  $N_{bits} = 12$ ) et pour un moyennage temporel de 7 images. Il augmente comme la racine carré du nombre de pixels. Le RSB expérimental est représenté en bleu. Il a été extrait sur 100 ROIs réparties sur toute une image pour un film de 10 minutes d'un film d'or simple, dans l'eau pure et en polarisation TE. Les barres d'erreur représentent la dispersion du RSB calculé sur les 100 ROI. La taille d'une ROI peut être modifiée afin d'augmenter le moyennage spatial. Le RSB sature à peine au-dessus de 1000 lorsque la taille de la ROI augmente, signifiant que la mesure des réflectivités n'est pas limitée par le bruit de photons. Toutefois l'étude de l'évolution du RSB en fonction du nombre d'images moyennées, pour le même jeu de données expérimentales et pour une taille de ROI fixée à 40x40 pixels, suit l'évolution du bruit de photons. Ces observations suggèrent que la source de bruit supplémentaire est indépendante du temps mais qu'il existe une corrélation spatiale entre les différents pixels.

Une étude du fonctionnement de la caméra a révélé que cette corrélation spatiale est liée au système de lecture des pixels du capteur. Celui-ci est virtuellement découpé, suivant la direction 2048 pixels, en 16 canaux de 128 pixels. Une lecture par impulsions permet de lire tous les canaux en parallèles. Le processus est répété séquentiellement sur les 1088 lignes du capteur. Il semblerait que ce processus de lecture induise une corrélation des signaux issus de tous les pixels d'une même ligne qui sont lus simultanément et introduit un bruit sur les intensités mesurées très largement supérieur au bruit de photons. La documentation de la caméra renseigne sur un bruit de lecture d'une valeur de  $13\ e^{-}$  RMS. La profondeur des puits de chaque pixel étant de  $13,5\ ke^{-}$ , ce bruit de lecture résulte en un RSB de  $13,5\ ke^{-} / 13\ e^{-} \approx 1000$  pour un pixel du capteur ce qui est cohérent avec la valeur limite du RSB affichée sur la figure 3.16. À cause de la corrélation spatiale, ce bruit ne peut être diminué que par un moyennage temporel, qui est très limité sauf à dégrader la résolution temporelle de l'instrument. Or un RSB de 1000 n'est pas suffisant pour répondre aux spécifications demandées.

Ce bruit étant corrélé spatialement, il peut être corrigé par soustraction du signal sur une ROI de référence. Des ROIs de référence sont choisies sur l'image de la biopuce dans des zones où elle n'est pas fonctionnalisée par une chimie spécifique. Les intensités mesurées en polarisation TM

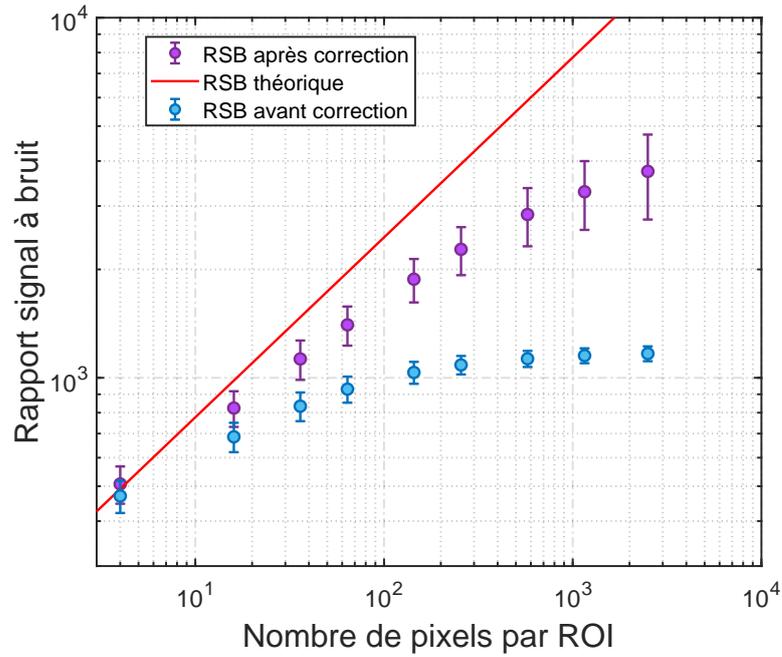


FIGURE 3.16 – Rapport signal à bruit de la réflectivité mesurée pour la LED1 en fonction du nombre de pixels utilisés pour le moyennage spatial sur une ROI d'une taille donnée. En rouge est représenté le RSB dans le cas où seul le bruit de photons sur le capteur de la caméra est pris en compte. Les valeurs expérimentales en bleues et en violettes correspondent au RSB avant et après correction du bruit de lecture de la caméra. Un moyennage temporel de 7 images a été réalisé.

sur les ROIs définies pour extraire les cinétiques d'interaction ( $I_{TM}(t)$ ) sont soustraites, en temps réel, par les intensités mesurées sur les ROIs de référence ( $I_{TM}^{ref}(t)$ ). Soit  $I_{TM}^0 = I_{TM}(t = 0)$  la valeur de l'intensité mesurée sur une ROI, pour une longueur d'onde donnée, avant la correction et  $I_{TM}^{ref,0} = I_{TM}^{ref}(t = 0)$  sont équivalentes sur une ROI de référence. Soit  $\alpha = I_{TM}^0 / I_{TM}^{ref,0}$  un coefficient de normalisation qui permet de prendre en compte la différence entre les valeurs moyennes de  $I_{TM}(t)$  et de  $I_{TM}^{ref}(t)$ . La reconstruction des intensités ( $I_{TM}^c(t)$ ) mesurées aux 7 longueurs d'onde, corrigées du bruit lié au système de lecture des pixels des capteurs, se fait suivant la relation :

$$I_{TM}^c(t) = I_{TM}^0 + (I_{TM}(t) - \alpha I_{TM}^{ref}(t)) \quad (3.15)$$

La courbe violette sur la figure 3.16 représente le RSB sur l'intensité de la LED 1 après la correction détaillée précédemment. Pour un moyennage spatial sur une ROI de  $50 \times 50 = 2500$  pixels, un RSB de presque 4000 est mesuré qui est une valeur adaptée dans le cadre de la détection SPR. Cette étape de correction du bruit de lecture n'est pas chronophage car elle consiste simplement à l'addition de tableaux de valeurs. Elle ne détériore donc pas les performances de l'algorithme.

Une étude du comportement spatial de ce bruit a mis en évidence qu'il suffit de définir 3 ou 4 ROIs de références, équitablement réparties suivant la direction 1088 pixels afin de corriger correctement les signaux sur tous les pixels d'une image de la biopuce. L'efficacité de cette étape de correction afin d'améliorer le RSB peut être observée sur la figure 3.17. Les résultats présentés concernent

une zone restreinte de l'image de la biopuce qui donne une idée de la taille de la zone fonctionnalisée par les sondes spécifiques qui est du même ordre de grandeur que la taille de la cuve de microfluidique découpée dans le Mylar. Dans cette étude, le RSB est mesurée sur  $15 \times 19 = 285$  ROIs ayant chacune une taille de  $50 \times 50$  et étant réparties dans la zone étudiée. Sur la figure 3.17.b est représenté le cas des images brutes pour lequel le RSB sature autour de 1000 quelque soit la ROI. Il a été observé que la distribution spatiale du bruit du capteur n'est pas homogène. Il existe une forte corrélation suivant la direction d'une ligne qui trouve son origine dans le système de lecture des 16 canaux décrit précédemment, mais il existe également une faible corrélation suivant la direction d'une colonne. En effet, si une seule ROI de référence est définie pour la correction, le rapport signal à bruit est grandement amélioré le long de la ligne comme cela est attendu mais un meilleur RSB est également mesuré sur le reste de l'image (fig 3.17.c). Cette observation suggère qu'un nombre limité de ROIs est suffisant pour obtenir un RSB acceptable sur toute la zone étudiée. Dans le cas d'une correction avec trois ROIs de référence (fig 3.17.e), le RSB est supérieur à 6000 proche des ROIs et légèrement supérieur à 4000 sur le reste de l'image.

Les performances de cet instrument MS-SPri développé au LCF sont les suivantes :

- résolution de l'instrument :  $\delta n = 10^{-6}$  RIU (pour un écart-type du bruit à  $3\sigma$ ) avec un moyennage spatial de  $30 \times 30$  pixels et un moyennage temporel de 7 images en réflectivité ( $T_{exp} = 20$  ms pour une image),
- taille du champ imagé :  $1 \text{ cm}^2$  ( $1000 \times 2000$  pixels),
- durée d'acquisition d'une image en  $\lambda_{min}$  de  $500 \times 500$  pixels : 3 secondes.

Cet instrument qui est maintenant opérationnel et prêt à être testé lors de la détection de la capture d'espèces cibles par la biopuce. L'expérience qui a été choisie pour cette étape consiste à mesurer les cinétiques d'interaction entre brins d'ADN complémentaires. C'est une expérience test relativement facile à mettre en oeuvre pour laquelle le protocole de fonctionnalisation de la biopuce par la chimie spécifique est bien maîtrisé au LCF

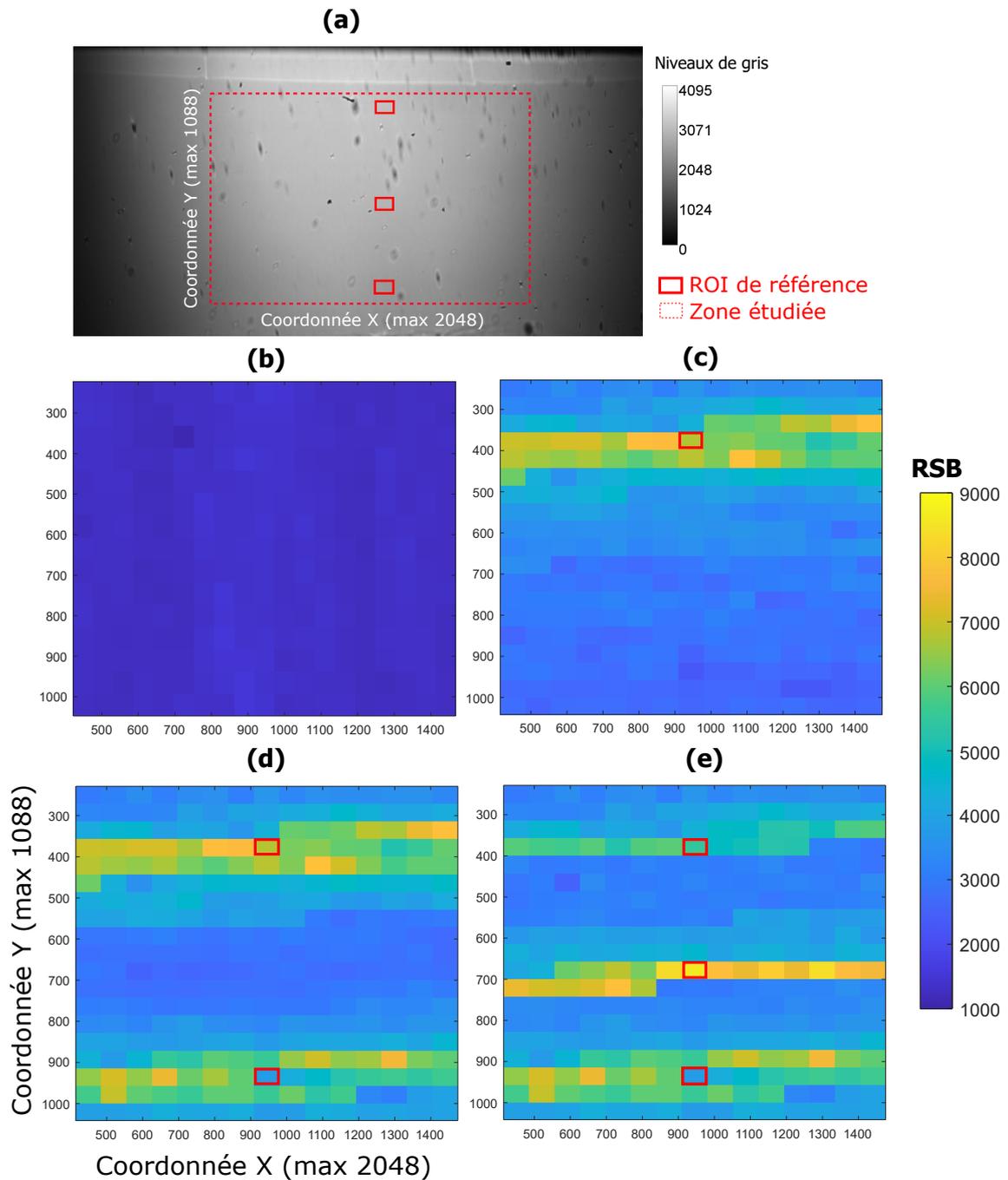


FIGURE 3.17 – Correction du bruit de lecture corrélé spatialement du capteur de la caméra. **a.** Image en niveaux de gris d'une surface d'or nue, dans l'eau, en polarisation TE. La zone étudiée pour la correction du bruit est délimitée par le cadre en pointillés rouges. L'intensité mesurée sur une zone de référence au cours du temps permet de corriger le bruit de lecture sur le reste de l'image suivant la relation 3.15. Le rapport signal à bruit (RSB) extrait sur 15x19 ROIs de 50x50 pixels équitablement réparties dans la zone étudiée est représenté sans la correction du bruit **(b)** et avec correction en utilisant 1 zone de référence **(c)**, 2 zones de référence **(d)**, 3 zones de référence **(e)**.

### 3.4.2. EXPÉRIENCE VALIDATRICE : INTERACTION DE SÉQUENCES D'ADN

L'objectif de cette expérience est de mettre en avant les performances de l'instrument en terme d'imagerie, de sensibilité et de résolution de l'instrument MS-SPRi. Une étude exhaustive de l'interaction des séquences ADN cibles avec les séquences ADN sondes n'est pas le but de cette partie.

La conception de la biopuce pour ce type de détection consiste à fonctionnaliser le film d'or par des séquences d'ADN mono-brin, complémentaires de séquences d'ADN mono-brin qui seront injectées dans le système de micro fluidique. Ces séquences dites "sondes" font typiquement une vingtaines de bases et se terminent par une fonction biotine. Elles sont fixées à la surface par une liaison streptavidine-biotine. La streptavidine est initialement greffée sur le film d'or suivant un protocole se basant sur la liaison or-thiol [SPADAVECCHIA et al., 2009]. Une sonde est donc composée, hormis la couche d'accroche, d'une fonction biotine surmontée d'un espaceur constitué de 10 bases thymines puis d'une séquence de calibration puis finalement d'une séquence spécifique. Deux séquences spécifiques différentes ont été utilisées : une séquence naturelle de 20 bases (notée WT : Wild type) et une séquence pour laquelle une base sur les 20 a été modifiée (notée MT : Mutated Type). Les sondes sont déposées sur le film d'or sous la forme de plots de 300  $\mu\text{m}$  de diamètre à l'aide d'un spotteur à aiguille.

La séquence de calibration sonde est la même quelque soit la nature des plots sondes. En début d'expérience, la mesure de la réponse des plots à l'injection de la séquence de calibration cible permet par la suite de corriger, par normalisation, la dispersion de réactivité et de concentration des plots de même nature [HOTTIN et al., 2012]. Afin d'observer un effet de la concentration sur les cinétiques d'interaction entre séquences d'ADN, une configuration basée sur 4 types de plots a été envisagée :

0. un plot de référence ne contenant pas de séquence d'ADN. Il permettra de corriger les signaux mesurés des potentielles dérives qui peuvent être mesurées au cours de l'expérience comme par exemple la dérive thermique.
1. un plot WT d'une concentration de 7  $\mu\text{M}$ .
2. un plot WT d'une concentration de 2  $\mu\text{M}$ .
3. un plot MT d'une concentration de 7  $\mu\text{M}$ .

L'algorithme développé permet à l'instrument MS-SPRi de donner une image spectrale de toute la biopuce en temps réel. Cela permet facilement à l'expérimentateur de venir sélectionner des zones de la biopuce afin d'en extraire les signaux d'intérêts. Ici, une image en  $\lambda_{min}$  de 500 x 340 pixels est obtenue environ toutes les trois secondes. Un moyennage temporel de 7 images et un moyennage spatial (binning) de 2x2 pixels ont été appliqués. Sur la figure 3.18.a, une image en variation de la position spectrale de la résonance est présentée correspondante à la fin de la capture des cibles par les sondes après l'injection d'une solution de cibles WT à une concentration de 100 nM. À ce moment, les plots sont saturés signifiant que toutes les sondes sont liées à des cibles. Lors de la capture, les différents plots s'allument avec une intensité plus ou moins grande. La matrice de plots

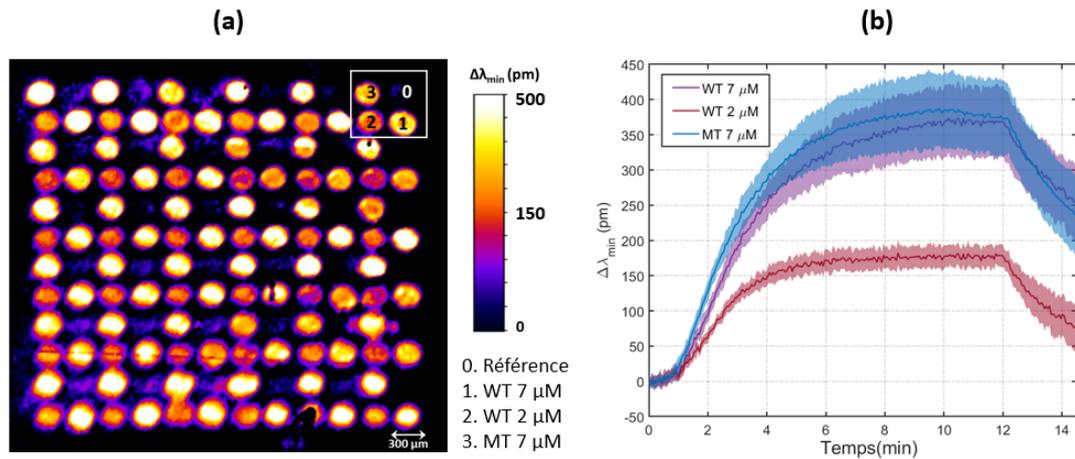


FIGURE 3.18 – **a** : Image en variation de  $\lambda_{min}$  à la fin des injections d'une solution de WT à 100 nM. La biopuce consiste en un film d'or fonctionnalisé par des sondes ADN sous la forme d'une matrice de plots, de 300  $\mu\text{m}$  de diamètre, déposés à l'aide d'un spotteur. Une sous-matrice 4x4, représentée par le carré blanc en haut à droite de l'image, est répétée 6 fois dans les deux directions de l'image. **b** : Cinétiques extraites sur deux groupes (WT 7  $\mu\text{M}$  et WT 2  $\mu\text{M}$ ) de 36 plots, de mêmes natures mais de concentrations différentes après l'injection d'une solution cible de WT à 100 nM suivie d'une injection d'une solution aqueuse à pH = 12 de régénération après 12 minutes.

qui apparaît est la répétition d'un motif élémentaire : une sous matrice 4 x 4. Les plots de références, ne contenant pas de sondes ADN, restent éteints. L'intensité des plots WT 2  $\mu\text{M}$  est moins importante car les sondes y sont en concentration plus faible. En outre, les plots WT 7  $\mu\text{M}$  et MT 7  $\mu\text{M}$  ont une réponse similaire à l'injection d'une solution de cibles WT à 100 nM. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les séquences WT et MT ne possèdent qu'une base différente sur les 20 qui les composent. Après la capture, une solution aqueuse à pH = 12 de régénération est injectée afin de libérer les brins cibles des brins sondes. L'étude complète des cinétiques de rinçage pourraient permettre de mettre en évidence la spécificité des sondes. Cette étude n'a pas été menée ici.

En définissant des groupes de ROI correspondants aux groupes de plots de même nature, les cinétiques d'interactions peuvent être extraites. Sur la figure 3.18.b, l'effet de la concentration des plots sondes est clairement visible sur la valeur du décalage spectral au niveau du plateau. C'est ce qui est attendu, la détection SPR étant quantitative par nature. La détection parallèle de différentes espèces chimiques à différentes concentrations est rendue possible grâce à la capacité d'imagerie. Une autre caractéristique importante de l'instrument MS-SPRi qui a été étudiée sur des données simulées dans la partie 3.4.1, concerne la résolution ou limite de détection de l'instrument. Ici, le bruit mesuré sur les signaux, pour un moyennage temporel de 7 images et un moyennage spatial sur des ROIs de 30 x 30 pixels, est d'environ 30 pm pour trois écarts-types. La position spectrale de la résonance lors de cette détection est d'environ 744 nm. D'après la sensibilité simulée à cette longueur d'onde (fig 3.11.a), la résolution de l'instrument à  $3\sigma$  est de  $\frac{30 \text{ pm}}{4,7 \cdot 10^6 \text{ pm/RIU}} = 6,4 \cdot 10^{-6}$  RIU. Cette valeur est meilleure que celle obtenue avec les valeurs simulées car le RSB expérimental sur la mesure des réflectivités, après correction du bruit de lecture de la caméra, est d'environ 4000. Un RSB de 1000 avait été arbitrairement choisi pour les simulations.

Cette simple expérience ne permet pas d'exploiter la propriété principale d'un instrument MS-SPRi, à savoir sa très grande dynamique de mesure par rapport à celle d'un instrument SPR fonctionnant en interrogation en réflectivité. En effet, la fonctionnalisation du film d'or par les sondes ADN n'entraînent pas une dispersion spatiale suffisamment grande. La position spectrale de la résonance plasmon est quasiment la même sur les plots et sur l'or. Cependant, ce ne sera pas le cas en ce qui concerne une biopuce fonctionnalisée par des plots de polymères à empreintes ioniques (Imprinted Ions Polymers, IIP) qui font quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur et ont un indice de réfraction proche de 1,5. Dans ce cas, il peut exister un décalage de plusieurs dizaines de nanomètres de la résonance plasmon entre les plots et le film d'or. Cet aspect sera traité dans le chapitre suivante.



# 4

## CONCEPTION D'UNE BIOPUCE PLASMONIQUE SPÉCIFIQUE AUX IONS MÉTALLIQUES

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.1 Biomimétisme : les polymères à empreinte</b> . . . . .                       | <b>90</b>  |
| 4.1.1 Principe et intérêts. . . . .   | 90         |
| 4.1.2 Les polymères à empreinte ionique . . . . .                                   | 92         |
| 4.1.3 Synthèse de films minces . . . . .  | 94         |
| <b>4.2 Photopolymérisation UV.</b> . . . . .  | <b>98</b>  |
| 4.2.1 Les premiers pas . . . . .  | 98         |
| 4.2.2 Photopolymérisation sous atmosphère inerte . . . . .                          | 105        |
| 4.2.3 Suivi de la photopolymérisation par SPRi . . . . .                            | 110        |
| <b>4.3 Photopolymérisation déclenchée par le plasmon</b> . . . . .                  | <b>115</b> |
| 4.3.1 Principe et intérêt . . . . .   | 115        |
| 4.3.2 Validation de la méthode. . . . .   | 116        |
| 4.3.3 Nanostructuration de la surface d'or par des IIP . . . . .                    | 122        |
| 4.3.4 Étude du processus de photopolymérisation déclenchée par le plasmon . . . . . | 131        |

Parmi tous les composants d'un instrument SPR, il y en a un qui est d'une importance toute particulière : la biopuce plasmonique. Elle est le coeur de l'instrument qui lui permet de passer d'un simple instrument de mesure d'indice de réfraction à un détecteur ultra-sensible qui peut détecter, de façon spécifique, des espèces chimiques à des concentrations extrêmement faibles.

Le principe de fonctionnement d'une biopuce plasmonique a été expliqué dans le chapitre 1 et des exemples de sondes spécifiques à des ions métalliques ont été détaillés dans la section 2.1.2 traitant des capteurs plasmoniques appliqués à la détection de ces ions. Elles se basent sur l'utilisation de peptides, de protéines ou d'ADN. Deux exemples de sondes spécifiques conçues à partir de polymères ont été décrits. C'est ce dernier type de chimie de surface qui sera exploité afin de concevoir la biopuce de l'instrument SURIMI. En effet, les polymères sont de très bons candidats pour concevoir une chimie de surface peu onéreuse, réutilisable et surtout résistante aux conditions extrêmes liées à la détection des ions métalliques dans des milieux complexes (rivières et océans) et à des pressions très élevées.

Dans un premier temps, une brève introduction aux polymères à empreinte sera abordée afin d'expliquer leur principe de fonctionnement sans pour autant rentrer dans des détails techniques qui sortent du cadre de ce manuscrit ; l'optimisation de la recette de la formulation de photopolymérisation étant réalisée par le LSABM de l'ESCPI partenaire du projet SURIMI. En revanche, ce chapitre est essentiellement consacré à l'adaptation de cette formulation à la synthèse de films minces sur une surface d'or compatible avec la détection SPR. Ainsi, une méthode assez classique de photopolymérisation UV va être présentée et ses résultats et ses limites seront discutés. Enfin, une approche innovante de photopolymérisation déclenchée par le plasmon sera étudiée et ses résultats encourageants seront mis en avant.

## 4.1. BIOMIMÉTISME : LES POLYMÈRES À EMPREINTE

### 4.1.1. PRINCIPE ET INTÉRÊTS

Les polymères à empreinte peuvent être pensés comme une forme de biomimétisme. Leur synthèse et leur utilisation permet de reproduire des interactions spécifiques selon un mécanisme de clé/serrure caractéristique, par exemple, du fonctionnement des anticorps. Les premiers développements de polymères à empreinte remontent aux années 1980 et ont été décrits en détails pour la première fois par Wulff [WULFF, 1995]. Ils existent sous de nombreuses formes et ont été synthétisés pour des espèces empreintes de natures très différentes comme par exemple des ions, des protéines ou même des bactéries. Leur utilisation se retrouve dans des domaines très variés comme par exemple, l'extraction en phase solide ou notamment la biodétection. Des références bibliographiques sur les domaines d'applications et sur les formes d'espèces empreintes explorées peuvent être obtenues dans la récente revue de Ernesto Paruli sur la photopolymérisation des polymères à empreinte moléculaire [PARULI et al., 2021].

Le principe de la synthèse et le mode d'opération d'un polymère à empreinte sont représentés sur la figure 4.1. Dans une première étape, un complexe est formé par incubation de l'espèce

empreinte dans une solution contenant des monomères. Le choix de la nature du monomère va évidemment dépendre de celle de l'espèce empreinte afin de favoriser la formation du complexe. Cette étape d'incubation dure généralement quelques heures pour laisser le temps au complexe de se former et de se stabiliser. Dans une seconde étape, un agent réticulant est ajouté à la solution. Par un apport d'énergie extérieur adéquat, l'agent réticulant polymérise autour des monomères figeant ainsi le complexe dans une matrice rigide. Enfin, une étape de rinçage permet d'éliminer les espèces empreintes de la matrice de polymère libérant des cavités dont la géométrie est fixée par celle du complexe entre l'espèce empreinte et les monomères. Le polymère est alors prêt à être utilisé pour la capture de l'espèce ciblée. La spécificité de la cavité a une origine double : la géométrie de la cavité, qui a imprimé l'encombrement spatial de l'espèce empreinte, et l'interaction privilégiée de cette dernière avec les monomères qui ont été figés par l'agent réticulant.

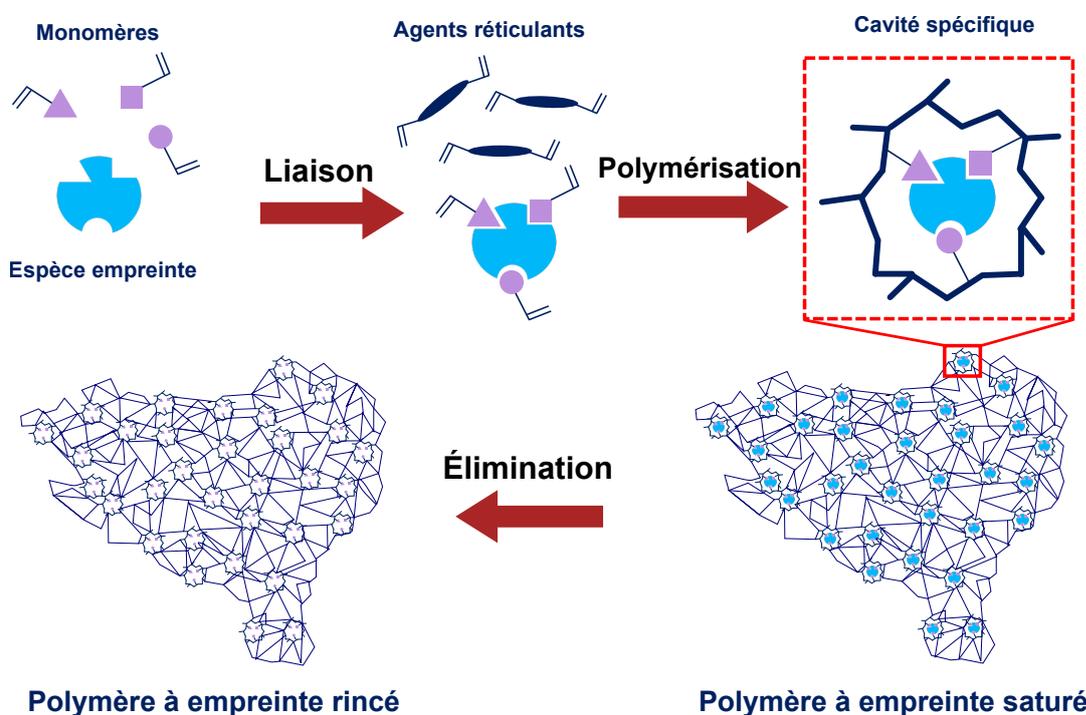


FIGURE 4.1 – Schéma de principe de la synthèse d'un polymère à empreinte. Des monomères se lient autour d'une espèce empreinte puis subissent une réaction de polymérisation en présence d'un agent réticulant formant un polymère à empreinte qui est saturé. Il est rincé dans une dernière étape afin de libérer les cavités spécifiques des espèces empreintes.

Lors de la conception d'une recette de polymère à empreinte, un aspect important concerne la nature de l'espèce empreinte et de l'interaction spécifique recherchée qui restreint grandement le choix du monomère. L'interaction des monomères avec l'espèce empreinte peut prendre différentes formes : liaison covalente, liaison hydrogène, liaison de Van der Waals, etc. Le complexe formé entre le monomère et l'espèce empreinte est figé dans la matrice de polymère qui, une fois rincée, laisse place à des cavités spécifiques donc l'accessibilité dépend grandement du choix de l'agent réticulant. Cette matrice doit posséder des propriétés adaptées à la diffusion des espèces cibles vers

les cavités spécifiques. Le type d'agent réticulant influe essentiellement sur la densité et la rigidité de la matrice de polymère. Il joue donc directement un rôle dans les performances du polymère à empreinte. Par exemple, plus un polymère sera dense, moins les espèces cibles pourront diffuser facilement jusqu'aux cavités spécifiques afin d'y être capturées. Il y a donc un compromis à trouver entre densité et résistance du polymère afin de choisir en conséquence l'agent réticulant adapté. Un autre ingrédient à choisir, non représenté sur la figure 4.1, est le solvant. Ce dernier doit avoir une affinité suffisamment grande avec l'espèce empreinte, les monomères et l'agent réticulant pour les solubiliser correctement. Cependant, son interaction avec le complexe formé doit être suffisamment faible pour ne pas perturber l'interaction spécifique entre le monomère et l'espèce empreinte. Le dernier composé chimique de la recette est l'initiateur. C'est ce dernier qui absorbe l'énergie extérieure apportée et passe dans un état instable radicalaire qui va réagir très rapidement avec l'agent réticulant et le monomère afin de déclencher le processus de polymérisation.

Le choix de l'initiateur est conditionné par la nature de l'énergie excitatrice apportée. La polymérisation thermique consiste à chauffer la formulation de polymérisation à des températures allant jusqu'à 60°C. Elle est adaptée à la synthèse de polymère en volume. De son côté, la photopolymérisation consiste à exciter l'initiateur avec de la lumière UV ou visible. L'avantage de cette dernière méthode est qu'elle permet de structurer facilement le polymère par l'utilisation de masque opaque à la lumière utilisée. C'est cette méthode qui est utilisée dans ces travaux de thèse afin de synthétiser des plots de polymère localisés sur une surface d'or.

Dans le cadre du projet SURIMI, l'espèce empreinte est un ion métallique; il est alors question de polymère à empreinte ionique (IIP). La recette de IIPs spécifiques aux ions ciblés par le projet a été développée par le LSABM à l'ESCPI et elle est présentée dans les grandes lignes dans la partie suivante.

#### 4.1.2. LES POLYMÈRES À EMPREINTE IONIQUE

Dans la section 2.1.2, deux instruments SPR basés sur l'utilisation de IIPs comme sondes spécifiques ont été reportés. La première concerne l'utilisation d'un colorant qui chélate de façon préférentielle les ions cuivre et qui est figé dans une matrice de polymère sous la forme d'un film fin de 12 nm d'épaisseur déposé par spin-coating sur une surface d'or [OCK et al., 2001]. La deuxième se base sur la synthèse de nanoparticules de polymères spécifiques aux ions cuivre ou aux ions plomb et qui sont déposées par dip-coating sur des film d'argent et de cuivre respectivement [SHRIVASTAV et GUPTA, 2018]. Dans ces deux applications, le IIP n'est pas synthétisé de façon in-situ sur le film métallique mais simplement déposé par séchage. Cette méthode de dépôt n'est pas adaptée pour obtenir un film mince de IIP solidement accroché à la surface d'or qui peut résister à l'épreuve du temps et aux conditions extrêmes dans lesquelles peut évoluer l'instrument SURIMI.

Deux publications plus récentes rapportent sur la synthèse in-situ de IIP de zinc [JALILZADEH et al., 2019] et de cadmium [BAKSHPOUR et DENIZLI, 2020] par photopolymérisation UV dont la

recette de IIP se rapproche de celle développée par le LSABM pour laquelle le monomère utilisé est l'acide méthacrylique (MAA), l'agent réticulant est l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) et l'initiateur est l'azobisisobutyronitrile (AIBN). Les structures de ces réactifs sont représentées sur la figure 4.2. Le monomère MAA se lie par liaison ionique avec l'ion métallique après déprotonation de l'oxygène le plus électronégatif du groupe carboxyle. L'initiateur AIBN est un initiateur de type 1 qui se scinde en deux radicaux libres après avoir été excité par la chaleur ou par la lumière. Ces radicaux déclenchent la polymérisation de l'agent réticulant EGDMA avec le MAA au niveau des doubles liaisons C = C.

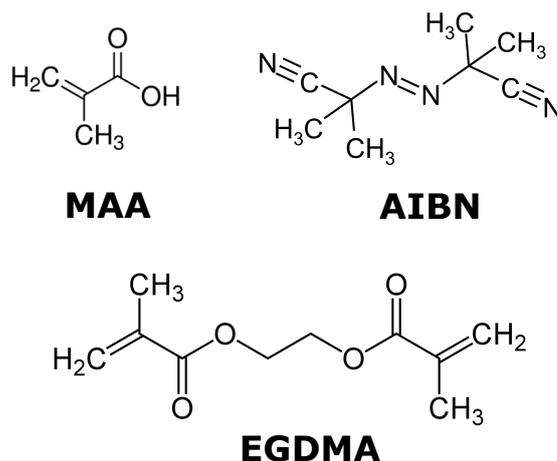


FIGURE 4.2 – Réactifs de la recette développée par le LSABM : acide méthacrylique (MAA), éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) et azobisisobutyronitrile (AIBN).

Le LSABM réalise la synthèse des IIP par voie thermique et en volume. Le monolithe de IIP ainsi obtenu est ensuite broyé pour obtenir des grains d'environ 30  $\mu\text{m}$  de diamètre, puis ils sont conditionnés par compression dans une cartouche. Les ions empreintes sont éliminés à l'aide de plusieurs cycles de rinçage avec de l'acide nitrique à 3 M libérant ainsi les cavités spécifiques. L'ordre de grandeur de la taille des cavités spécifiques est donné par le rayon ionique des ions empreintes qui sont relativement semblables (tab 4.3). L'espèce chimique utilisée pour le rinçage doit, par ses propriétés, entrer en compétition avec les ions empreintes vis-à-vis de l'interaction avec le monomère. Dans cette recette, l'étape d'élimination consiste à protoner à nouveau l'oxygène le plus électronégatif du groupe carboxyle afin de rompre la liaison ionique entre le MAA et l'ion métallique. Cela a une implication forte pour l'utilisation de ces IIPs pour la détection SPR : le contrôle de la capture et de la libération des ions métalliques par le IIP passe par la régulation du pH du milieu de détection.

Les travaux du LSABM sur les IIPs conditionnés en cartouches, ont montré que leur spécificité se manifeste durant l'étape de libération des ions dans un milieu acide. En effet, lors de la première étape de capture (étape dite de percolation), les ions sont retenus de façon non spécifique par le polymère. Ceci peut s'expliquer par un effet des dimensions des cavités et de la nature de l'inter-

action électrostatique entre l'ion métallique et le monomère qui sont peu différentes d'un ion à un autre. Cependant, lors d'une deuxième étape de libération (étape dite de lavage) par rinçage avec une solution acide, les ions qui sont préférentiellement retenus par un polymère donné sont ceux qui ont servi à imprimer les cavités spécifiques lors de la synthèse de ce polymère.

| Cobalt (Co <sup>2+</sup> ) | Nickel (Ni <sup>2+</sup> ) | Cuivre (Cu <sup>2+</sup> ) | Zinc (Zn <sup>2+</sup> ) |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 65 pm                      | 69 pm                      | 73 pm                      | 74 pm                    |

FIGURE 4.3 – Rayons ioniques de différents ions cibles à détecter dans le cadre du projet SURIMI.

## 4

La recette pour la synthèse en volume des IIPs et les protocoles de rinçage ont été optimisés par le LSABM sur le critère de la spécificité. Le défi de ces travaux de thèse est d'adapter ces protocoles pour réaliser une synthèse de films minces de IIPs à la surface du film d'or afin de concevoir la biopuce plasmonique.

### 4.1.3. SYNTHÈSE DE FILMS MINCES

Il a été vu dans le chapitre 1 que la distance d'atténuation du plasmon dans le milieu diélectrique, définie comme la distance à partir de laquelle l'intensité du SP a été multipliée par un facteur  $1/e$ , est de l'ordre de 200 nm (fig 1.8.a). Elle est par ailleurs d'autant plus faible que la permittivité diélectrique du milieu est élevée. En tant que capteur de surface, un détecteur SPR est donc capable de mesurer l'indice de réfraction du milieu diélectrique dans un volume défini par l'extension spatiale du plasmon et par la surface de la biopuce. Tout ce qui se passe au-delà de ce volume ne peut pas être détecté par le plasmon de surface. Lors de la conception d'une biopuce plasmonique, il faut donc veiller à ce que l'épaisseur de la couche de sondes spécifiques soit comprise dans ce volume. Il est donc important de limiter l'épaisseur du film de IIP, synthétisé de façon in situ sur la surface d'or, afin que le changement d'indice de réfraction induit par la capture des ions cibles soit détectable par le plasmon de surface.

Afin de se faire une idée plus précise de ce phénomène, l'évolution de la sensibilité d'un capteur SPR en fonction de l'épaisseur du film de polymère synthétisé a été simulée dans deux situations différentes faisant écho à deux scénarios expérimentaux antagonistes (fig 4.4). Le critère permettant de différencier les deux situations est choisi qualitativement sur le coefficient de diffusion des espèces cibles dans le film de polymère. Pour réaliser cette simulation, le capteur SPR est modélisé par un système multi-couches composé d'un prisme en SF10 ( $n_p = 1,72$ ), d'un film d'or de 50 nm d'épaisseur, d'une couche de polymère d'épaisseur variable ( $n_{poly} = 1,50$ ) et d'un milieu diélectrique semi-infini constitué d'eau pure ( $n = 1,333$ ). L'ordre de grandeur de  $n_{poly}$  a été choisi de façon cohérente avec la valeur qui a été mesurée expérimentalement et qui est présentée dans la suite. La sensibilité est calculée comme le rapport du déplacement de la position spectrale de la résonance plasmon par l'amplitude du changement d'indice de réfraction qui se produit dans le film de polymère et d'amplitude  $\Delta n = 10^{-3}$  RIU. Cette valeur arbitraire permet de simuler semi-quantitativement la réponse

du polymère lors de la capture d'espèces cibles pour une concentration donnée. Elle est choisie suffisamment grande afin de donner un signal SPR cohérent avec ce qu'il peut être observé expérimentalement. L'angle d'incidence a été ajusté pour chaque épaisseur du film de polymère afin de calculer la sensibilité pour une position spectrale de la résonance plasmon fixée autour de 795 nm. Ainsi, l'influence de la dépendance de la permittivité diélectrique de l'or avec la longueur d'onde, sur la valeur de la sensibilité, peut être négligée (fig 1.11).

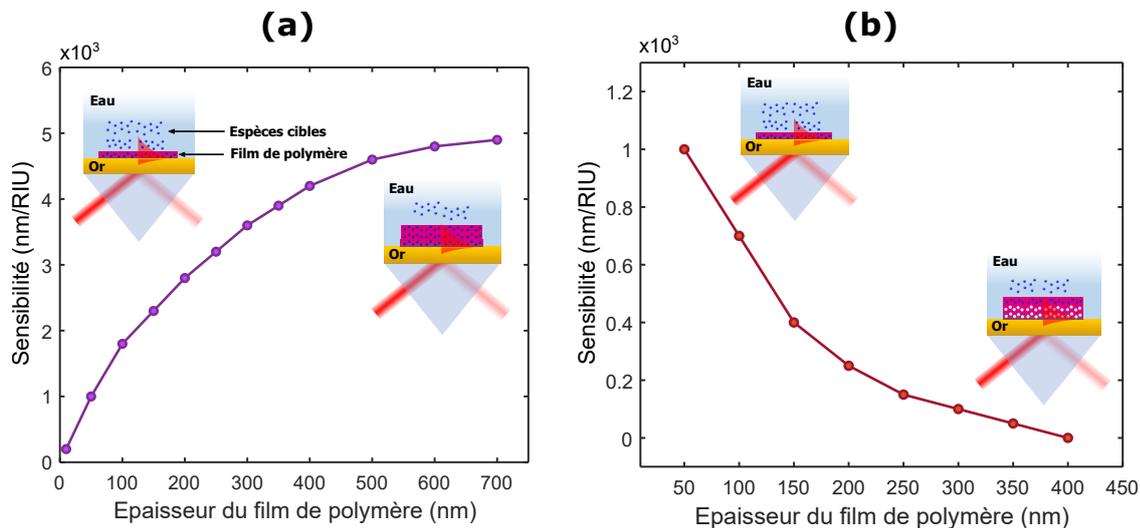


FIGURE 4.4 – Simulation de la sensibilité d'une biopuce fonctionnalisée par un polymère à empreinte d'indice de réfraction 1,50 en fonction de l'épaisseur du film de polymère dans la situation où il est saturé (a) et dans le cas où la détection des espèces cibles est limitée par la diffusion à une profondeur de 50 nm dans le film (b). L'extension spatiale du plasmon de surface est représentée par le profil d'intensité de l'onde évanescente en rouge.

Dans la première situation, il est supposé que le temps de diffusion des espèces cibles dans le film de polymère est négligeable devant le temps de capture au bout duquel un équilibre chimique est atteint et que toutes les cavités spécifiques sont occupées; le coefficient de diffusion est infini. Dans ce cas, la sensibilité du capteur augmente avec l'épaisseur du film de polymère jusqu'à tendre vers une limite qui est atteinte lorsque l'épaisseur dépasse l'extension spatiale du plasmon de surface. Au-delà, les espèces cibles sont trop éloignées de la surface pour être détectables. Ainsi, dans cette situation idéale où la détection n'est pas limitée par le phénomène de diffusion, l'épaisseur optimale du film de polymère est strictement égale à l'extension spatiale du SP.

Dans la deuxième situation, le coefficient de diffusion des espèces cibles dans le film de polymère est supposé faible et tel que seulement les 50 premiers nanomètres du polymère sont saturés en un temps raisonnable pour la détection SPR. Ainsi, la couche saturée de polymère s'éloigne de la surface d'or à mesure que l'épaisseur du polymère augmente jusqu'au point où elle sort du volume de détection sondé par le plasmon de surface rendant la détection des espèces cibles par SPR impossible. Dans cette situation hypothétique, l'évolution de la sensibilité avec l'épaisseur du film est opposée à celle observée dans la première situation et diminue rapidement pour tendre vers zéros. L'épaisseur optimale est donc fixée par le coefficient de diffusion pour un temps d'analyse

raisonnable de quelques minutes. Dans le cas présenté ci-dessus, elle vaut 50 nm.

Finalement, une situation réelle se trouve quelque part entre ces deux situations simulées. Il existe probablement une épaisseur optimale du film de polymère dont la valeur dépend du coefficient de diffusion des espèces cibles dans le film pour un temps de détection contraint.

Il existe principalement trois méthodes pour synthétiser un film mince de polymère sur la surface d'or : la polymérisation thermique, l'électropolymérisation et la photopolymérisation. Seule la dernière méthode permet de structurer la biopuce avec des plots de polymères par synthèse localisée à l'aide d'un masque opaque à la lumière excitatrice. Une source lumineuse dans le proche ultraviolet est le plus souvent utilisée pour la photopolymérisation car il existe de nombreux photo-initiateurs qui se décomposent facilement en radicaux libres à ces longueurs d'onde. Typiquement, le photo-initiateur AIBN utilisé dans la recette de IIP du LSABM possède une bande d'absorption centrée autour de 350 nm.

Deux récents articles d'un même groupe de recherche rapportent la synthèse de nanofilms de IIP appliqués à la détection d'ions zinc [JALILZADEH et al., 2019] et cadmium [BAKSHPOUR et DENIZLI, 2020] par photopolymérisation UV. L'agent réticulant et le photo-initiateur utilisés sont les mêmes que dans la recette du LSABM, respectivement l'EGDMA et l'AIBN. Une source UV d'une puissance de 100 W avec une longueur d'onde d'émission de 365 nm est utilisée. Un protocole de synthèse de films de polymère à empreinte ionique (IIP) et de polymère non imprimé (NIP) avec une épaisseur de l'ordre de 50 nm est décrit dans ses grandes lignes. La formulation de polymérisation est préparée en mélangeant le monomère, l'agent réticulant et le photo-initiateur puis 10  $\mu$ l de cette solution sont déposés sur la surface d'or. La solution est étalée par spin coating puis irradiée pendant 40 min. L'éclairement reçu par la formulation de polymérisation au niveau de la surface n'est pas donné et le solvant utilisé n'est pas précisé. Ce protocole de synthèse de nanofilms est une adaptation direct du protocole de photopolymérisation thermique du LSABM et a donc le mérite d'être théoriquement simple. Cependant, des difficultés dans le contrôle de l'épaisseur ont été rencontrées lors de la mise en application de ce type de protocole et sont détaillées dans la section suivante. Notamment, l'irradiation sur toute l'épaisseur de quelques micromètres de la formulation de polymérisation déposée sur la surface d'or produit des films trop épais.

Afin d'obtenir un contrôle plus fin de l'épaisseur et une meilleure reproductibilité, il peut être intéressant d'essayer de forcer la polymérisation à démarrer puis à croître depuis la surface d'or. Un moyen d'y parvenir est de retirer le photo-initiateur de la solution pour le greffer directement au niveau de la surface d'or. Ainsi, sous irradiation UV, la polymérisation démarre exclusivement à la surface où est présent le photo-initiateur. Un exemple d'application de cette méthode pour la conception d'une biopuce SPR appliquée à la détection d'un antibiotique est rapporté par LUO et al., 2016. La surface d'or est dans un premier temps fonctionnalisée par une mono-couche de dodecanethiol puis est incubée pendant 1 à 2 heures dans une solution de benzophenone. La benzophenone est un photo-initiateur qui, d'après cet article, peut se fixer à la mono-couche de thiol

par "liaison hydrophobique". En parallèle, la formulation de polymérisation composée de l'acide itaconique comme monomère et de l'EGDMA comme agent réticulant, est préparée. Quelques microlitres sont ensuite déposés sur la surface d'or fonctionnalisée par la benzophénone puis est recouverte d'une lamelle de microscope et d'un masque UV (fig 4.5.a). Le masque permet d'irradier localement une zone de la surface d'or afin d'y imprimer des plots de MIP de 2 mm de diamètre et d'épaisseur variable en fonction du temps d'irradiation (fig 4.5.b). L'épaisseur du film de polymère est mesurée par profilométrie. Par cette méthode, un bon contrôle de l'épaisseur est obtenu en jouant sur le temps d'irradiation à éclaircissement constant.

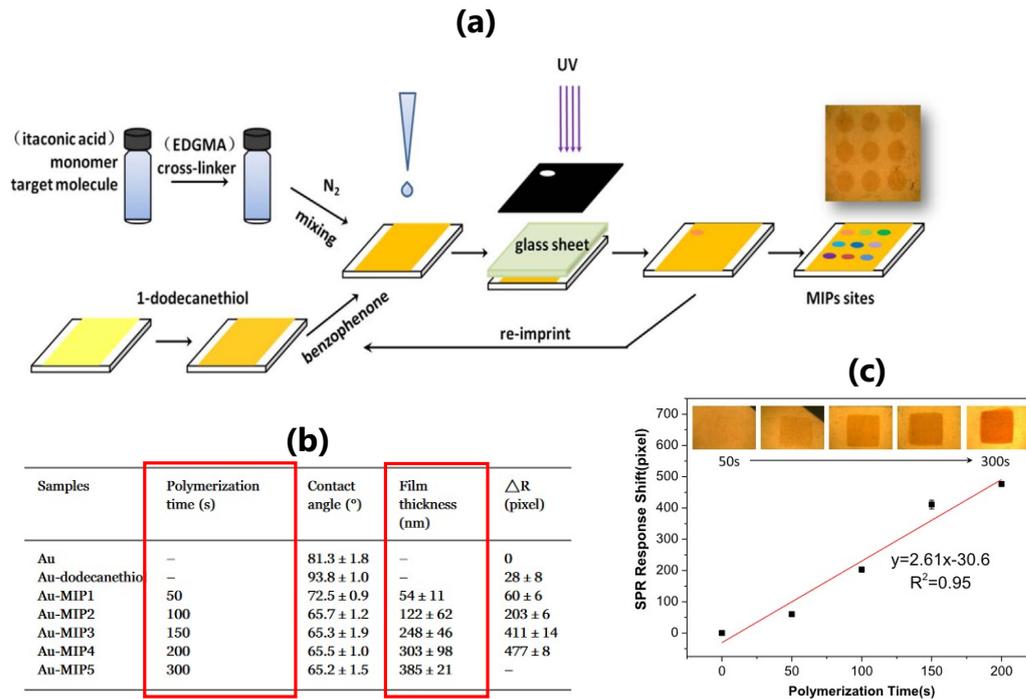


FIGURE 4.5 – **a.** Schéma représentant le protocole de synthèse des plots de MIP sur la surface d'or. **b.** Tableau résumant les valeurs des épaisseurs des plots de MIP pour les différents temps d'irradiation. **c.** Réponse SPR de la biopuce en fonction de l'épaisseur du film de MIP synthétisé [LUO et al., 2016]

## 4.2. PHOTOPOLYMÉRISATION UV

### 4.2.1. LES PREMIERS PAS

En se basant sur les résultats de la littérature décrits plus haut, un protocole de photopolymérisation UV qui se décompose en 5 étapes a été développé : fonctionnalisation de la surface d'or par une mono-couche de thiols, préparation de la formulation de polymérisation, dépôt de la solution sur la surface d'or, illumination par la lumière UV et développement du polymère par rinçage de la lame d'or dans différents bains de solvants.

La première étape consiste à fonctionnaliser la surface d'or par une mono-couche (SAM "Self Assembled Monolayer") hydrophobe constituée d'allyl mercaptan ( $\text{HS-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ) qui est un thiol se terminant par une liaison vinylique. L'allyl mercaptan se lie avec la surface d'or par liaison covalente entre un atome de soufre de la fonction thiol et un atome d'or. La fonction vinylique de l'allyl mercaptan permet de lier le polymère de façon covalente à la surface d'or durant l'étape de photopolymérisation UV. Cette couche a donc pour rôle premier de fixer solidement le polymère mais sert également de couche de passivation afin de protéger la surface d'or. En effet, lors de la détection SPR, il est nécessaire de limiter les interactions non spécifiques des espèces chimiques avec la couche d'or qui peuvent interférer avec la détection des espèces cibles. Le protocole détaillé de la réalisation de cette SAM est décrit en annexe A. Il consiste dans un premier temps à nettoyer la surface d'or à l'aide d'un plasma cleaner suivi d'un bain d'eau oxygénée et d'un bain d'éthanol. Dans un second temps, la surface d'or nettoyée est ensuite incubée pendant 12h dans une solution d'allyl mercaptan et d'éthanol.

La deuxième étape consiste à préparer la formulation de polymérisation qui sera déposée sur la surface d'or. Le protocole pour l'élaboration de cette formulation a été développé par le LSABM et il est détaillé dans l'annexe B. Il existe deux protocoles afin de préparer un polymère à empreinte ionique (IIP) et un polymère non imprimé (NIP). Le protocole permettant de préparer un IIP contient le MAA, l'EGDMA, l'AIBN (voir fig 4.2) et un sel métallique, e.g.  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  ou  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  en tant que réactifs. Le solvant utilisé est l'acétonitrile qui permet de solubiliser correctement les différents réactifs. Il a également un rôle très important en tant qu'agent porogène. Il permet d'augmenter la porosité du polymère afin d'augmenter sa perméabilité aux ions métalliques qui diffusent vers les cavités spécifiques pour y être capturés. Dans un premier temps, lors de la préparation de la solution, le sel métallique est dissout dans un certain volume d'acétonitrile puis le monomère (MAA) est ajouté à cette solution. Elle est ensuite protégée de la lumière et mise sous agitation pendant une durée déterminée par la nature de l'interaction entre l'ion métallique à imprimer et le monomère. C'est pendant ce temps de complexation que se forme le complexe entre les monomères et les ions métalliques. À l'issue de cette étape de complexation, l'agent réticulant (EGDMA) est ajouté ainsi que le photo-initiateur. La formulation de polymérisation pour la synthèse du NIP est préparée en mélangeant directement le MAA et l'EGDMA, sans le sel métallique, dans un volume identique d'acétonitrile et sans temps de complexation. La solution est alors prête à être déposée sur la surface d'or pour réaliser la photopolymérisation UV.

Cette troisième étape consiste à réaliser un dépôt homogène de la formulation de polymérisation sur la surface d'or. Différentes méthodes ont été testées comme, par exemple, le spin coating ou le dépôt direct de quelques microlitres sur la surface à l'aide d'une micropipette. Ces deux techniques ne donnent pas un résultat satisfaisant à cause de l'évaporation de l'acétonitrile qui rend le dépôt inhomogène et qui modifie la composition de la solution. La méthode qui est effectivement utilisée dans la suite est représentée sur la figure 4.6. Dans un premier temps,  $6 \mu\text{l}$  de solution sont déposés sous la forme de deux lignes de volumes égaux de part et d'autre de la surface d'or à l'aide d'une micropipette. Ce volume permet de recouvrir entièrement la surface d'une lame d'or de dimension  $19 \times 25 \text{ mm}$ . Sans trop attendre, une lamelle de microscope de  $170 \mu\text{m}$  d'épaisseur est approchée parallèlement et mise en contact avec la surface permettant d'étaler les deux lignes de dépôts qui se rencontrent au centre de la lame. Il a été constaté que la solution est très inhomogène aux abords de la zone de dépôt avec la présence de bulles et d'agrégats. En revanche, avec cette méthode d'étalement, la solution qui se trouve dans la zone qui sera éclairée par les UV est complètement homogène.

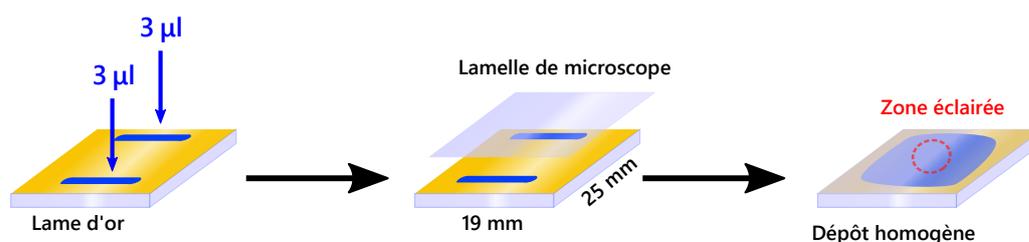


FIGURE 4.6 – Schéma représentant la méthode pour réaliser un dépôt homogène de la formulation de polymérisation sur la surface d'or. La solution est divisée en deux volumes de  $3 \mu\text{l}$  qui sont déposés suivant deux lignes, de part et d'autre de la surface d'or à l'aide d'une micropipette. La surface est ensuite recouverte d'une lamelle de microscope de  $170 \mu\text{m}$  d'épaisseur qui permet d'étaler la solution et de la protéger de l'évaporation et de l'atmosphère. Un dépôt homogène est alors obtenu au niveau de la zone éclairée.

Dans une quatrième étape, la source UV utilisée pour réaliser la photopolymérisation est la lampe Utarget  $365 \text{ nm}$  de chez Uwave [“UTARGET”, 2022]. Elle possède 9 niveaux de puissance et affiche un éclairement maximal de  $1200 \text{ mW}/\text{cm}^2$  (fig 4.7.b). Une bague d'ajustement permet de choisir graduellement entre un faisceau collimaté et un faisceau focalisé. En position collimatée, la tâche d'éclairement a une forme de carré de côté environ  $8 \text{ mm}$  pour une distance de travail d'environ  $3 \text{ cm}$ . Un étalonnage de cette source UV a été réalisé à l'aide d'un spectromètre UV-visible afin de pouvoir, par la suite, comparer semi-quantitativement l'effet de la puissance d'éclairement sur la cinétique de polymérisation. Les droites d'étalonnage pour les deux configurations du faisceau sont représentées sur la figure 4.7.a. La mesure ayant été réalisée au spectromètre, elle ne permet pas d'obtenir une valeur quantitative de la puissance mais seulement une amplitude codée sur 16 bits ; c'est pourquoi toutes les amplitudes ont été normalisées par l'amplitude maximale mesurée dans le cas d'un faisceau focalisé et pour le 9<sup>ème</sup> niveau de puissance. Les mesures ont été réalisées en utilisant le montage de photopolymérisation UV décrit dans une prochaine section sur la figure 4.13.

La lumière UV est collectée à la surface de la lame d'or à l'aide d'une fibre optique et son intensité est mesurée par le spectromètre.

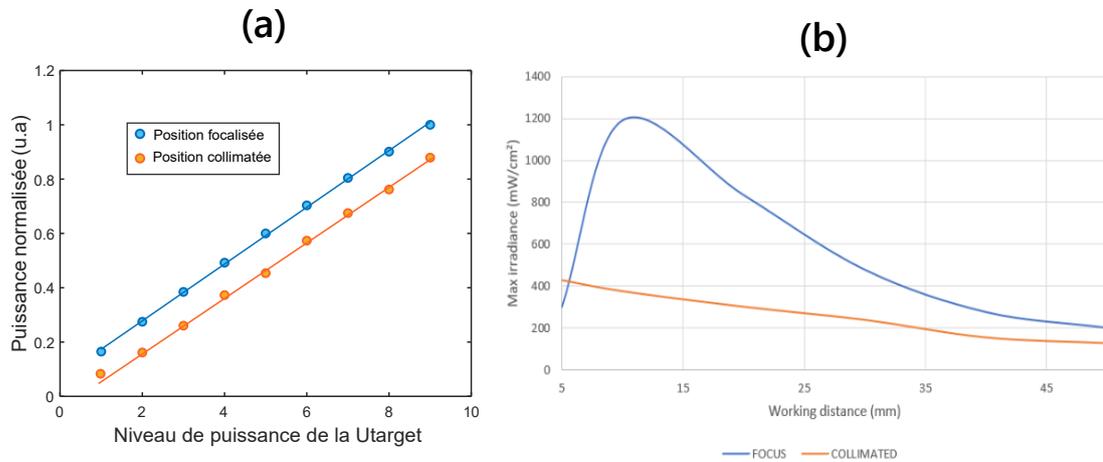


FIGURE 4.7 – **a.** Droites d'étalonnages de la puissance de la lampe Utargot en fonction du niveau de puissance choisi dans les configurations collimatées et focalisées. Les puissances sont normalisées par rapport à celle mesurée pour le niveau 9 en position focalisée. Leurs valeurs relatives ont été mesurées à l'aide d'un spectromètre UV-visible au niveau de la surface d'or dans la configuration représentée sur la figure 4.13. **b.** Évolution de la puissance en fonction de la distance de travail pour le niveau de puissance 9 [“UTARGET”, 2022].

Les premiers essais ont été réalisés en irradiant directement avec des UV une goutte de formulation de polymérisation de quelques microlitres de volume déposée simplement sur la surface d'or. Des problèmes d'évaporation du solvant déjà cités plus haut ont été constatés mais il est également apparu que le contact avec l'atmosphère bloque la réaction de photopolymérisation. En effet, l'atmosphère est un réservoir de dioxygène qui est une molécule connue pour être un inhibiteur des réactions de polymérisation radicalaires. Les premiers films de polymère ont alors été obtenus en irradiant, en incidence normale, la formulation de polymérisation recouverte d'une lamelle de microscope. Un exemple de film obtenu pour un temps d'irradiation de 10 min à puissance maximale et pour une distance de travail d'environ 3 cm est présenté sur la figure 4.8. Le film de polymère est transparent et solidement accroché à la surface d'or. Une image en réflectivité de la résonance plasmon de la lame d'or a été réalisée dans l'eau (fig 4.8.a). L'angle et la longueur d'onde d'incidence ont été choisis afin d'obtenir une résonance plasmon sur la partie non recouverte par le film de polymère où la réflectivité est donc proche de 0. Tout d'abord, il est important de remarquer que l'extension latérale du film de polymère coïncide très bien avec les dimensions et la forme carrée de la tâche d'éclairement de la source UV utilisée et décrite précédemment. Cela confirme la possibilité de structurer localement une même biopuce avec différents plots de IIP spécifiques à des ions différents par photopolymérisation. Cependant, la résonance plasmon n'a pas pu être observée sur la partie recouverte par le film de polymère quelques soient les valeurs de l'angle et de la longueur d'onde d'incidence utilisées. Il faut noter que les valeurs extrêmes de l'angle d'incidence et de la longueur d'onde sont limitées en pratique, respectivement, à environ  $\{\theta\}_{min} = 80^\circ$  à cause de l'encombrement spatial et aux alentours de  $\{\lambda\}_{max} = 900$  nm à cause de la sensibilité de la caméra. Par

ailleurs, les motifs visibles à la surface du film sur l'image en réflectivité correspondent à des franges d'interférences et leurs allures dépendent de l'angle et de la longueur d'onde d'incidence. Le film étant transparent et homogène, il agit comme une lame à face parallèle donnant lieu à des franges d'égale épaisseur dont les déformations donnent une idée de la planéité de la surface supérieure du film.

Plusieurs mesures de l'épaisseur du dépôt ont été réalisées par Pengchao Cao, doctorant au LSABM, par profilométrie et ont révélé que le film a une épaisseur de quelques micromètres (fig 4.8.b). Cette épaisseur est infiniment grande comparée à l'extension spatiale du plasmon de surface et le film de polymère peut donc être considéré comme un milieu diélectrique infini d'indice de réfraction  $n_{poly}$ . La valeur de  $n_{poly}$  peut alors être estimée indirectement en prenant en compte ces observations. En effet, de manière très générale, dans la configuration de Kretschmaan, un SP ne peut pas être excité à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique si l'indice de réfraction de ce dernier est supérieur ou égal à celui du substrat recouvert du film métallique. Ici, le substrat est un verre en BK7 d'indice  $n = 1,51$ . L'impossibilité d'exciter le plasmon de surface sur la zone recouverte par le film de polymère implique que  $n_{poly}$  est proche de 1,51. Une mesure plus précise de cette valeur sera présentée dans la section suivante.

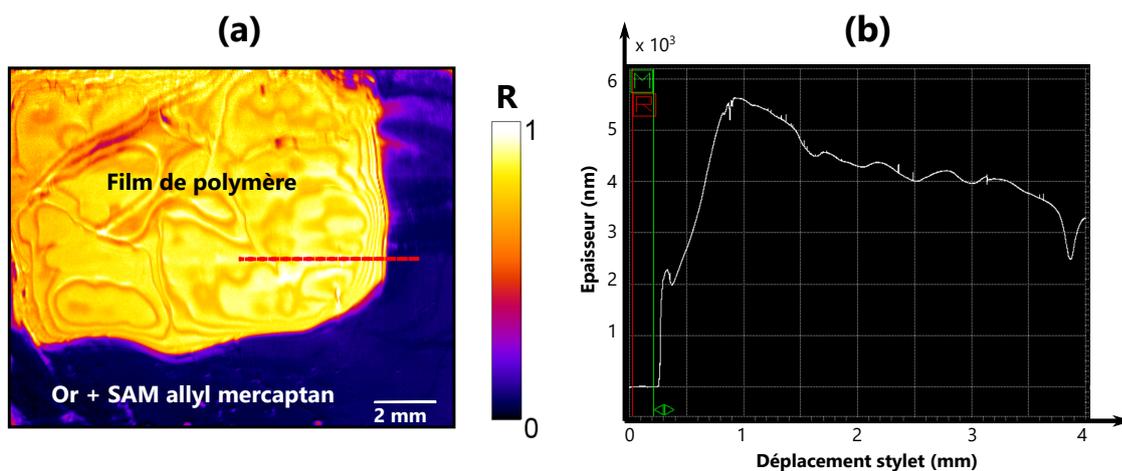


FIGURE 4.8 – **a.** Image en réflectivité de la résonance plasmon d'une surface d'or avec un dépôt de polymère dit "trop épais" de quelques micromètres d'épaisseur et pour un substrat en BK7. La zone polymérisée coïncide avec la forme de la zone éclairée par la source UV Utargat 365 nm [“UTARGET”, 2022]. **b.** Profil réalisé au profilomètre suivant la ligne de coupe matérialisée par la ligne rouge en pointillés sur l'image de gauche.

Les deux paramètres qui peuvent être ajustés afin de contrôler l'épaisseur du film de polymère sont la durée et la puissance d'irradiation. L'idée initiale a été de travailler à des faibles puissances (niveau 2 ou 3 de la Utargat) afin d'espérer obtenir une cinétique de polymérisation suffisamment lente et donc un meilleur contrôle de l'épaisseur. En pratique, il a été observé qu'une cinétique en deux temps semble avoir lieu avec un seuil à partir duquel la croissance du polymère devient si rapide que tout le volume délimité par la surface d'or, la lamelle de microscope et la zone irradiée polymérise. Un film de quelques micromètres d'épaisseur est alors obtenu. De plus, si l'irradiation

UV est coupée avant ce seuil, un film très fin se forme avec une épaisseur maximale qui vaut environ 30 nm. Ainsi, diminuer la puissance d'irradiation ne permet pas de ralentir la cinétique de la réaction de polymérisation mais déplace simplement le seuil vers des durées d'irradiation plus importantes.

Une synthèse de quelques résultats de photopolymérisation UV pour différentes puissances d'irradiation est présentée dans le tableau 4.9.b. Les puissances reportées dans la colonne de gauche correspondent aux valeurs normalisées issues de la droite d'étalonnage (fig 4.7.a) et s'expriment en  $W_n$ ; c'est-à-dire qu'une puissance normalisée qui vaut 1 est mesurée pour une configuration focalisée et pour le 9<sup>ème</sup> niveau de puissance de la  $U_{target}$ . Il découle de ces résultats qu'il existe une énergie seuil à fournir à la formulation de polymérisation pour qu'elle polymérise entièrement.

L'allure de cette cinétique observée est représentée sur la figure 4.9.a qui est découpée en trois zones :

- pour  $t < \tau$ , le film de polymère a une épaisseur inférieure à 30 nm,
- pour  $t \approx \tau$ , le film de polymère a une épaisseur proche de 30 nm, qui est adaptée pour la détection SPR,
- pour  $t > \tau$ , le film de polymère a une épaisseur de plusieurs micromètres qui n'est pas exploitable pour la détection SPR.

La zone centrée autour de la durée seuil de polymérisation s'étend sur seulement quelques dizaines de secondes indépendamment de la puissance d'illumination. L'étroitesse de cette zone de transition limite le contrôle de l'épaisseur du film de polymère et la reproductibilité du dépôt. En effet, si une biopuce a réussi à être fabriquée avec quelques plots de IIP avec une épaisseur d'environ 25 nm, la plupart des essais ont donné des plots très fins de moins de 15 nm. Or, l'importance de pouvoir étudier la réponse SPR des plots de polymère en fonction de leur épaisseur a été évoquée dans la section 4.1.3. Il est donc nécessaire d'améliorer le contrôle de l'épaisseur.

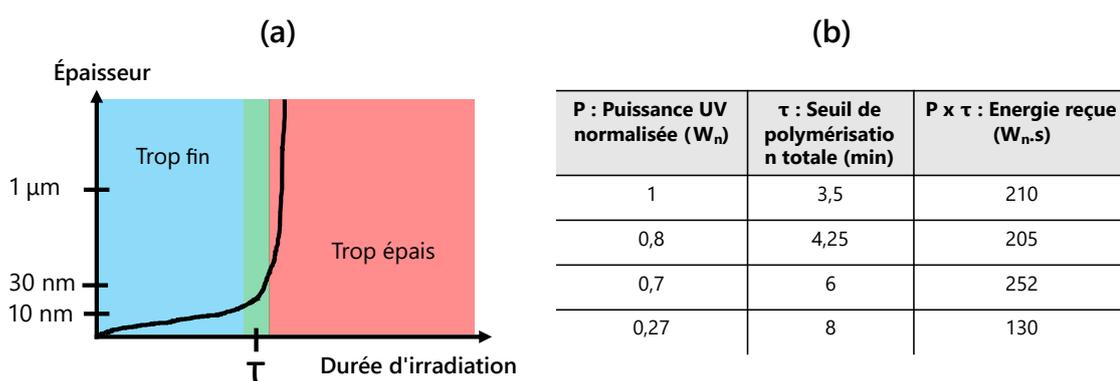


FIGURE 4.9 – a. Schémas représentant l'allure de la cinétique de la polymérisation en deux temps observée. b. Tableau récapitulatif des essais réalisés de photopolymérisation UV.

Ces observations sont cohérentes avec une étude dans la littérature sur l'influence du dioxygène dissout en solution sur la cinétique de photopolymérisation radicalaire d'une formulation basée

sur l'utilisation d'acrylates en tant que monomère [PYNNAERT et al., 2013]. La formulation étudiée est principalement composée de l'acrylate Ebecryl 604 et l'Igracure 184 est utilisé comme photo-initiateur de type 1 qui fonctionne donc comme le AIBN. Les auteurs insistent sur la faible viscosité du mélange (60 mPa.s à température ambiante), sans solvant, qui favorise la diffusion du dioxygène. Cette valeur peut être comparée aux viscosités des réactifs présents dans la recette du LSABM qui sont présentées dans le tableau 4.10. Le PETA est un monomère qui sera utilisé dans la suite dans un nouveau protocole de photopolymérisation déclenchée par le plasmon. La recette développée par le LSABM présente donc une faible viscosité et rentre dans le cadre de l'étude citée précédemment.

|                   | MAA | EGDMA | ACN | PETA |
|-------------------|-----|-------|-----|------|
| Viscosité (mPa.s) | 1,3 | 3 à 8 | 0,3 | 340  |

FIGURE 4.10 – Viscosités à température ambiante de différents composés utilisés dans la synthèse des IIPs.

Dans cette étude, Pynaert et al. ont suivi la cinétique de photopolymérisation grâce à une technique de spectroscopie FTIR dans les cas où leur formulation est en contact avec l'atmosphère et où elle est protégée par un film de polypropylène. Le taux de conversion, ou taux de polymérisation est obtenu grâce à la mesure de l'aire sous la bande à  $1636\text{ cm}^{-1}$  qui correspond à une double liaison carbone C=C. Lors de la réaction, à mesure que les monomères se lient entre eux par l'intermédiaire de cette liaison vinylique, sa concentration diminue au cours du temps. Cette dernière est donc un bon indicateur à suivre afin de déterminer l'état d'avancement de la polymérisation. L'évolution de ce taux de conversion est représentée sur la figure 4.11.a pour un éclairage de  $145\text{ mW.cm}^{-2}$ . Dans la configuration où la formulation est protégée de l'atmosphère (courbe en trait pointillé), la cinétique a une allure classique et le taux de conversion atteint sa valeur maximale au bout de quelques secondes signifiant que le polymère a été correctement formé. Néanmoins, en présence de dioxygène, l'allure en double vagues de la cinétique est plus intrigante.

Le processus de photopolymérisation radicalaire présente un premier régime où le taux de polymérisation augmente lentement signifiant que la formation du polymère est limitée et un second régime où la vitesse de réaction est plus grande où le taux de polymérisation atteint rapidement sa valeur maximale. Cette expérience peut être répétée pour différentes valeurs de l'éclairage et l'évolution du taux de conversion en fonction de l'énergie apportée à la formulation peut être étudiée (fig 4.11.b). Il apparaît qu'il existe une valeur seuil de l'énergie (entre  $20$  et  $40\text{ J.cm}^{-2}$ ) à fournir pour que le taux de conversion atteigne sa valeur maximale. Ces résultats sont en total accord avec les observations faites pour la recette du LSABM (fig 4.9).

Pynaert et al. ont proposé un schéma réactionnel pour expliquer la cinétique en deux temps de la photopolymérisation radicalaire (fig 4.12.a). Sous l'irradiation UV, le photo-initiateur se décompose dans une première étape pour réagir préférentiellement avec le dioxygène dissout en solution pour former un hydroperoxyde qui est un réactif intermédiaire. Ce processus limite la croissance du polymère; c'est l'étape d'inhibition. Sous l'effet des UVs, les hydroperoxydes peuvent également se dissocier en deux espèces radicalaires qui, en l'absence d'oxygène qui a été entièrement consommé,

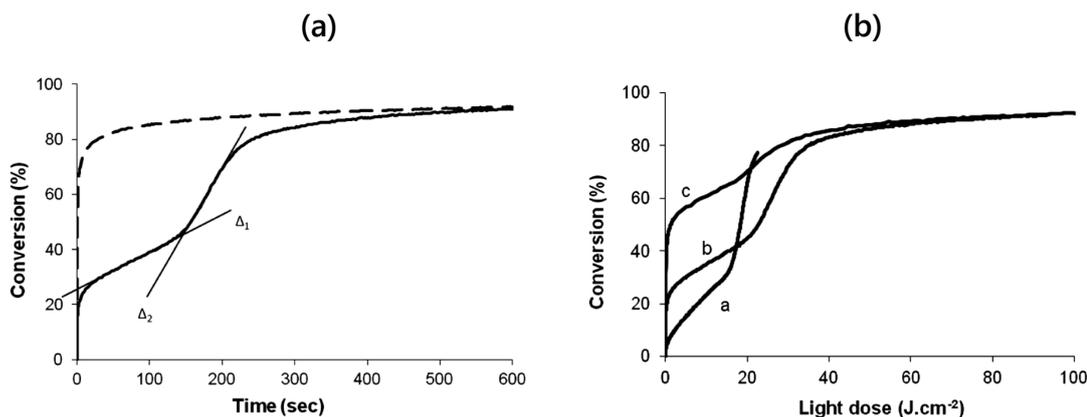


FIGURE 4.11 – Analyse par une technique de spectroscopie FTIR en temps réel de la photopolymérisation radicalaire UV d'une formulation basée sur l'utilisation d'acrylates en tant que monomères [PYNNAERT et al., 2013]. **a.** Suivi de la cinétique de photopolymérisation UV dans le cas d'une formulation en contact avec l'atmosphère (courbe en trait plein) et sous atmosphère inerte (courbe en pointillé). **b.** Évolution du taux de polymérisation en fonction de l'énergie apportée à la formulation pour différents éclaircissements : (a)  $35 \text{ mW.cm}^{-2}$ , (b)  $145 \text{ mW.cm}^{-2}$ , (c)  $500 \text{ mW.cm}^{-2}$

vont réagir avec les monomères afin de former le polymère; c'est l'étape de la deuxième vague. La cinétique de cette seconde étape est plus violente car il n'y a plus d'inhibiteurs présents en solution pour bloquer la réactivité des espèces radicalaires. Ce schéma réactionnel est confirmé par la mesure en parallèle du taux de conversion et de la concentration en hydroperoxydes présents en solution (fig 4.12.b). Cette dernière augmente rapidement pour atteindre une valeur maximale d'environ  $4.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  après 600 secondes d'exposition aux UVs. Cette valeur maximale est proche de la concentration initiale du photo-initiateur qui vaut environ  $5.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  traduisant le fait qu'une grande partie de ce dernier a été consommé pour former des hydroperoxydes. Dans un second temps, lorsque l'inhibition par le dioxygène n'est plus prépondérante, la concentration en hydroperoxydes chute brutalement avec une augmentation du taux de conversion signalant la formation du polymère.

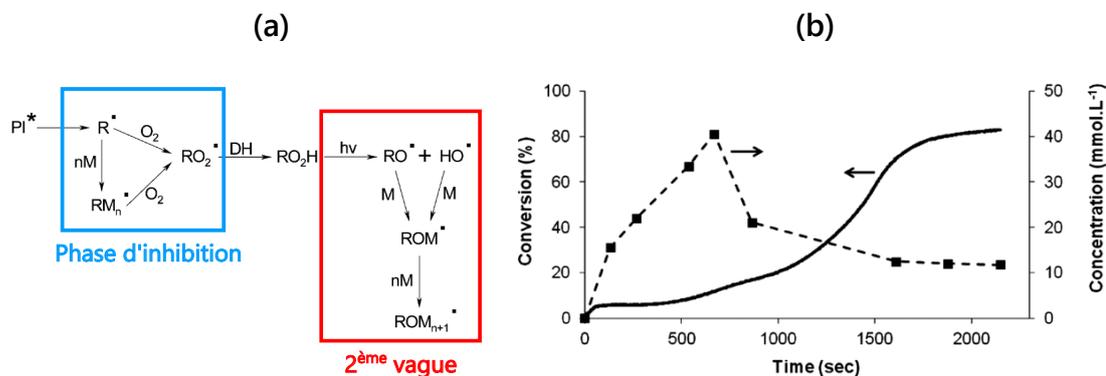


FIGURE 4.12 – **a.** Schéma réactionnel de la photopolymérisation en présence de dioxygène dissout en solution. Les couleurs renvoient à celles employées sur la figure 4.9.a. **b.** Évolutions de la concentration en hydroperoxyde (courbe trait pointillé) et du taux de polymérisation (courbe trait plein) en fonction du temps pour un éclaircissement de  $35 \text{ mW.cm}^{-2}$  [PYNNAERT et al., 2013].

Ce qu'il faut retenir de cette étude qui vient confirmer les observations réalisées lors des premiers essais de synthèse de films minces de IIP, c'est que la présence de dioxygène dissout en solution implique non seulement l'existence d'un seuil d'énergie à dépasser pour démarrer la polymérisation mais modifie également la cinétique de réaction. La présence de la seconde vague dans le cas d'une photopolymérisation radicalaire limite grandement la capacité de contrôle de l'épaisseur du film synthétisé. Afin d'essayer de dépasser cette limite, il est nécessaire de se débarrasser au maximum du dioxygène et de travailler sous atmosphère inerte. En ce sens, un nouveau protocole est détaillé dans la section suivante.

#### 4.2.2. PHOTOPOLYMÉRISATION SOUS ATMOSPHÈRE INERTE

Tout d'abord, il faut insister sur le fait que durant l'étape de complexation entre les monomères et les ions métalliques qui se passe dans un flacon en verre, il existe un volume d'environ 20 ml inoccupé par la solution qui joue le rôle de réservoir à dioxygène. Ainsi, afin d'éliminer le dioxygène dissout en solution, ce volume inoccupé est quotidiennement renouvelé par du diazote au cours de l'étape de complexation qui peut durer plusieurs jours. Cela permet de déplacer l'équilibre de la réaction de dissolution du dioxygène dans la solution vers une libération de ce dernier et de le remplacer par du diazote.

Ensuite, la synthèse du film de polymère sur la surface d'or est réalisé dans une boîte à gants du LCF. Elle peut être également remplie d'azote afin d'abaisser la concentration en dioxygène jusqu'à une valeur d'environ 12 % contre 21 % en atmosphère libre. Cette concentration ne peut pas être diminuée d'avantage car la boîte à gants n'est pas équipée d'un système de ventilation permettant le renouvellement complet de son atmosphère par du diazote. Le montage utilisé pour réaliser la synthèse est présenté sur la figure 4.13.

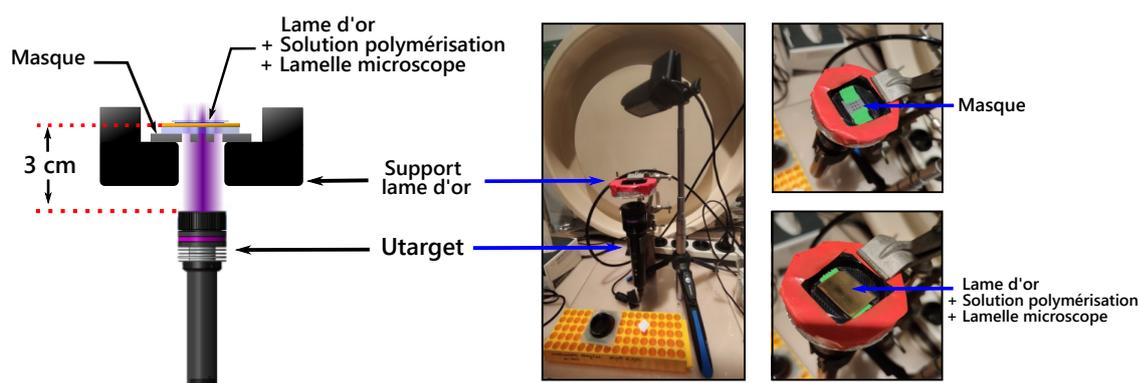


FIGURE 4.13 – Schéma représentant le montage utilisé pour la photopolymérisation UV sous atmosphère quasi-inerte (à gauche) et photos du montage réalisé dans une boîte à gants (à droite).

Un support percé d'un trou permet d'irradier la surface d'or par le dessous. Cette configuration a été choisie afin d'avoir la possibilité de travailler à des puissances plus faibles sans utiliser de densité optique supplémentaire. En effet, le film d'or de 50 nm est suffisamment fin pour être en partie

transparent aux UVs. Le facteur d'atténuation de l'intensité de la lumière UV incidente mesuré vaut environ 24. Cette configuration permet également de placer facilement un masque en aluminium en dessous de la lame d'or afin de structurer localement la surface. Le masque utilisé est une matrice 3x3 avec des trous dont les diamètres valent 1 mm. La lampe Utarget est réglée en position focalisée et elle est positionnée à 3 cm de la surface d'or. Les différents éléments de ce montage sont fixés par des pinces à une potence afin de toujours travailler dans les mêmes conditions d'éclairage. Le dépôt de la solution selon le protocole décrit sur la figure 4.6 est également réalisé dans la boîte à gants. Un flux de diazote est dispersé sur la surface d'or afin d'éliminer le dioxygène en surface avant de déposer la lamelle de microscope. Les résultats obtenus dans cette configuration, après l'inertage de la formulation de polymérisation par du diazote, sont résumés dans la colonne de droite du tableau 4.14. Pour comparaison, les précédentes valeurs seuils mesurées en présence de dioxygène sont ajoutées dans la colonne de gauche. La première conclusion est que l'existence du seuil de polymérisation totale persiste après l'étape d'inertage par le diazote. Le contrôle de l'épaisseur à l'échelle nanométrique reste compliqué avec cette configuration car le processus en deux temps de la formation du polymère est toujours prédominant. Cependant, la dose d'énergie à fournir à la solution pour déclencher la polymérisation sur tout le volume irradié a été divisée par un facteur compris entre 3 et 4. Ce résultat confirme bien que la présence d'oxygène en solution est l'origine de ce seuil d'énergie ce qui est cohérent avec les observations de Pynaert et al.

| Avant l'inertage par N <sub>2</sub>           |  |   | Après l'inertage par N <sub>2</sub>           |  |   |
|---|--|---|---|--|---|
| P : Puissance UV normalisée (W <sub>n</sub> ) | τ : Seuil de polymérisation totale (min) | P x τ : Energie reçue (W <sub>n</sub> .s) | P : Puissance UV normalisée (W <sub>n</sub> ) | τ : Seuil de polymérisation totale (min) | P x τ : Energie reçue (W <sub>n</sub> .s) |
| 1   | 3,5                                      | 210                                       | 1   | -  | -   |
| 0,8   | 4,25                                     | 205                                       | 0,8   | 1  | 48  |
| 0,7   | 6  | 252                                       | 0,27  | 2,5                                      | 40  |
| 0,27  | 8  | 130                                       | 0,15  | 7  | 63  |

FIGURE 4.14 – Tableau récapitulatif des essais réalisés de photopolymérisation UV avant et après l'utilisation d'azote pour éliminer en partie l'oxygène dissout en solution.

Avec cette nouvelle configuration, il a été néanmoins possible de développer une esquisse de biopuce qui est présentée sur la figure 4.15. Elle a été obtenue pour un temps d'irradiation de 2 min au niveau 2 de puissance de la lampe Utarget qui correspond à une puissance normalisée de 0,27 W<sub>n</sub>. Les plots sont diffusants et semblent granuleux. La figure 4.15.a montre l'image de la biopuce qui a été extraite par l'algorithme développé pour l'imagerie SPRi multi-spectrale et présenté dans la section 3.2.2. En supposant que l'indice de réfraction du film de polymère vaut 1,5, l'épaisseur des plots peut être estimée à partir de la position spectrale de la résonance plasmon extraite sur chaque pixel. La matrice de 3x3 trous du masque utilisé pour structurer la surface d'or est matérialisée par les cercles en traits pointillés blancs. Au sein d'un même plot de diamètre 1 mm, le film de polymère est relativement homogène. Cependant, il y a manifestement un problème d'homogénéité de la nanostructuration des différents plots qui peut être en partie lié à un éclairage qui

n'est pas uniforme sur toute la zone irradiée. La structure hétérogène de cette biopuce suggère que l'éclairement était plus intense sur la partie supérieure du masque où l'état de polymérisation des plots est le plus avancé. Toutefois, cela ne permet pas d'expliquer les différences observées entre les plots d'une même ligne qui peuvent provenir de la diffusion locale du dioxygène et plus probablement de l'inhomogénéité du dépôt de la formulation de monomères qui est critique dans ces expériences de photopolymérisation en surface (voir section 4.3.3).

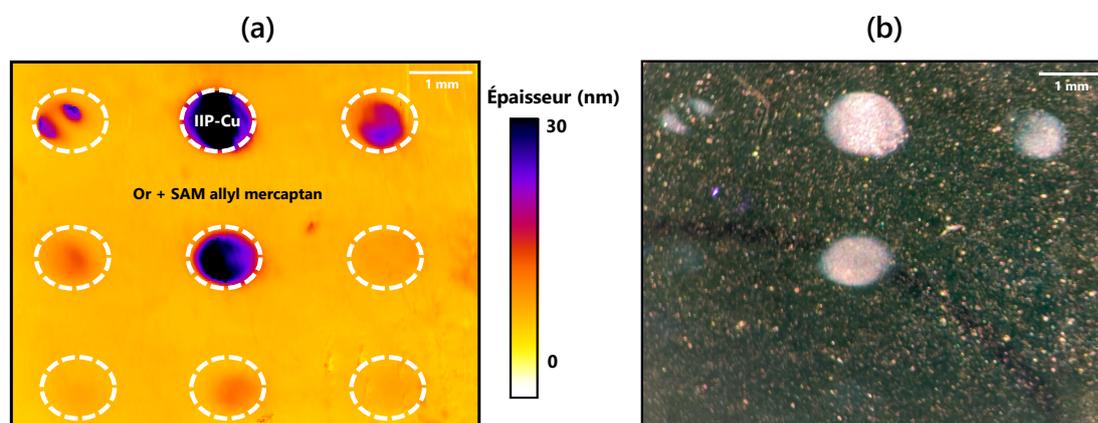


FIGURE 4.15 – **a.** Image de la surface d'or fonctionnalisée par des plots de IIP spécifiques aux ions cuivre. L'épaisseur du polymère a été estimée pour un indice de réfraction de 1,5. Les cercles blanc en pointillé indiquent les zones irradiées par les UVs lors de la photopolymérisation. **b.** Photo de la biopuce.

Après l'étape de synthèse, la biopuce a été incubée durant trois jours dans une solution d'acide nitrique 3 M, renouvelée quotidiennement, afin d'éliminer les ions empreintes. Elle est alors prête à être utilisée dans l'instrument d'imagerie SPR multi-spectrale qui a été conçu et présenté dans le chapitre 3.

La détection d'ions cuivre a été réalisée dans différentes solutions à des concentrations allant de 1 à 300 ppm. Pour rappel, la limite de détection visée par l'instrument SURIMI est de 0,1 ppb (0,1  $\mu\text{g/l}$ ). Ces solutions aqueuses sont préparées par dilutions successives à partir d'une même solution mère de concentration 1000 ppm avec de l'eau ultra-pure. Le pH des solutions est ajusté à une valeur de 5,5 par l'ajout d'acide nitrique. Cette valeur optimale a été déterminée lors des travaux menés par le LSABM sur la dépendance de la capacité de rétention des ion par les IIPs en fonction du pH. En effet, l'interaction spécifique entre le MAA et les ions empreintes qui passe par le groupe carboxyle déprotoné nécessite donc un pH suffisamment élevé. Notamment, après l'étape de capture, les ions cibles peuvent être éliminés du polymère par rinçage avec une solution aqueuse d'acide nitrique à un pH = 2. Le buffer est de l'eau ultra-pure avec un pH  $\approx$  5,5 et circule en continu à la surface de la biopuce avec un flux de 70  $\mu\text{l/min}$ . Le pH de l'eau ultra-pure est ajusté naturellement par la dissolution du  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère pour atteindre une valeur comprise entre 5,5 et 5,7. Les solutions sont injectées, de la moins à la plus concentrée, à l'aide de la boucle d'injection ayant un volume de 500  $\mu\text{l}$ . Ainsi, environ 7 minutes après l'injection, le retour du buffer dans la cuve de microfluidique est automatique.

Les cinétiques mesurées au niveau du plot central de la biopuce dans le cas d'une injection d'une solution de cuivre concentrée à 100 ppm et d'une solution de sucrose dont la concentration a été choisie pour provoquer un saut d'indice de réfraction de  $10^{-4}$  RIU sont affichées sur la figure 4.16. Les signaux sont extraits sur deux ROIs de 20x20 pixels placées sur le plot central de IIP mais dont l'inhomogénéité se caractérise par deux zones où la position spectrale de la résonance plasmon est différente d'environ 25 nm. La réponse de la biopuce à l'injection de la solution de sucrose est en accord avec la réponse attendue pour un simple saut d'indice (S.I) de réfraction. En effet, le signal carré enregistré pour la variation de  $\lambda_{min}$  indique une variation brutale de l'indice de réfraction du milieu environnant dont l'amplitude est proportionnelle à la concentration en molécules de sucrose injectées. La dispersion des réponses SPR au S.I des différentes zones permet d'établir une calibration de la sensibilité. Ici, elle est relativement homogène sur les différentes ROIs étudiées. Une réponse semblable est mesurée au niveau de la surface d'or dans le cas de l'injection de la solution de cuivre à 100 ppm signifiant l'absence d'interaction spécifique (fig 4.16.a). En revanche, les signaux mesurés sur les ROIs 1 et 2 ont une allure plus complexe qui se distingue en quatre phases. La première, avec une variation de  $\lambda_{min}$  très rapide, correspond au S.I et montre une amplitude du même ordre de grandeur que celle mesurée sur l'or. La deuxième phase, dite de capture avec une variation plus lente, est caractéristique d'une cinétique d'interaction spécifique des ions avec le polymère. Cette phase se termine par un retour dans le milieu environnant lorsque le volume de la boucle d'injection a entièrement circulé dans la cuve de microfluidique. La troisième phase se manifeste par une diminution du signal SPR dont l'amplitude est cohérente avec le saut d'indice initial. Enfin, vient la quatrième phase dite de rinçage pendant laquelle le polymère libère progressivement les ions initialement capturés dans le milieu environnant.

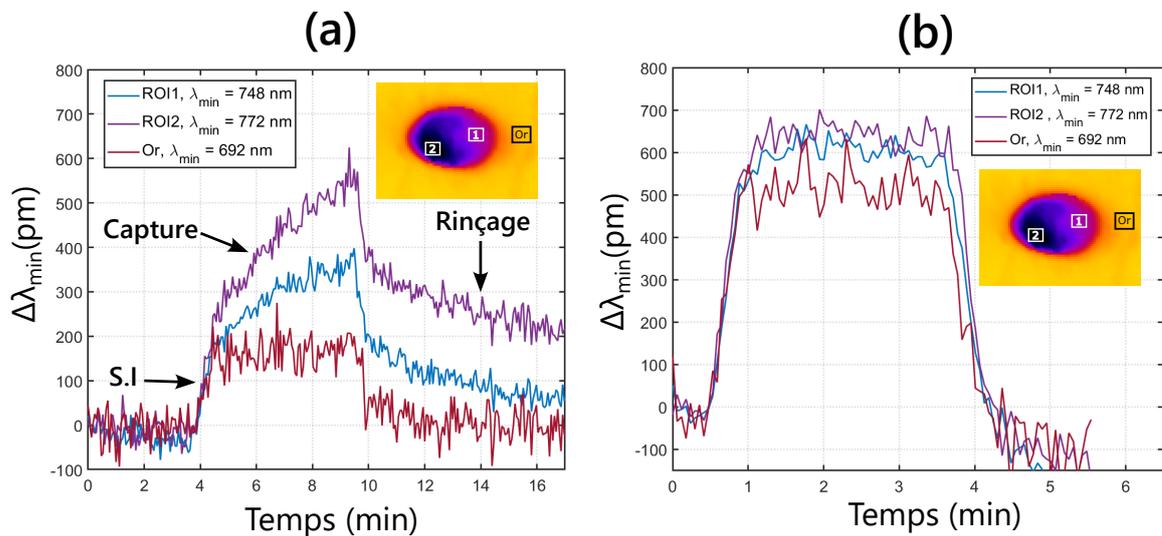


FIGURE 4.16 – Variation de la position spectrale de la résonance plasmon en fonction du temps dans le cas de l'injection (a) d'une solution de cuivre concentrée à 100 ppm et (b) d'une solution de sucrose provoquant un saut d'indice de réfraction de  $10^{-4}$  RIU.

L'étude du comportement de cette biopuce pour différentes concentrations a montré que la limite de détection (LOD) se situe autour de 10 ppm. Cette LOD très élevée peut s'expliquer par une capacité de rétention des ions très limitée. En effet, à l'issue de l'étape d'injection et au retour dans le buffer, il a été observé que les plots de IIPs sont rincés naturellement. Ce processus de rinçage naturel est visible sur les cinétiques de détection d'ions cuivre dans une solution concentrée à 100 ppm (fig 4.16.a) où la cinétique de capture et celle de rinçage ont des allures très semblables. Ce comportement n'est pas cohérent avec l'étude réalisée sur la capacité de rétention des IIPs en cartouche par le LSABM (section 4.1.2) dans laquelle ils ont montré que les ions empreintes ne sont libérés des cavités spécifiques que lors de l'étape d'éluion avec une solution d'acide nitrique 5 % (pH  $\approx$  0). Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par une disponibilité limitée des cavités spécifiques des plots de IIPs de la biopuce soit parce que celles-ci sont déjà occupées par les ions empreintes, soit parce que la synthèse n'a pas généré de sites de capture utilisables. Cependant, après plusieurs jours d'incubation de la biopuce dans différentes solutions de HNO<sub>3</sub> 3 M afin d'éliminer les ions empreintes, aucune différence notable sur la capacité de rétention n'a été observée. Cette biopuce n'a pas permis de réaliser une étude quantitative de la détection d'ions métalliques en solution.

Toutefois, la grande inhomogénéité des plots de IIPs synthétisés fait de cette biopuce une bonne candidate pour valider les performances de l'instrument d'imagerie SPR multi-spectrale développé. En effet, dans cette série d'expériences, des cinétiques peuvent être mesurées sur une large gamme de la position spectrale de la résonance plasmon. Celle-ci coïncide avec la gamme étudiée lors des simulations présentées dans la section 3.2.2 et qui s'étend de 690 nm (surface d'or) à 770 nm (plot de IIP). À noter que l'amplitude importante du bruit sur les signaux SPR, qui vaut en moyenne 50 pm, provient du bruit introduit par la caméra et qui n'a pas été corrigé dans cette expérience. En effet, la méthode de correction du bruit présentée dans la section 3.4.1 se base sur la soustraction du signal SPR mesuré sur une ROI d'intérêt (ici ROIs 1 et 2) par celui mesuré sur une ROI de référence prise généralement sur l'or. Cette méthode a donc pour effet secondaire de supprimer les signaux induits par un saut d'indice ou par une dérive thermique par exemple. Ainsi, il n'aurait pas été possible de visualiser le S.I dû à la solution de sucrose ou celui dû à la solution de cuivre à 100 ppm mesuré sur la surface d'or. Il peut également être remarqué que l'amplitude du bruit mesurée sur la surface d'or est environ deux fois plus grande que celles mesurées sur les plots de IIP qui sont, par ailleurs, du même ordre de grandeur. Ces observations sont cohérentes avec la simulation de la réponse de l'algorithme lorsque le RSB est limité à une valeur de 1000 à cause du bruit de lecture de la caméra (fig 3.11.b). En effet, l'intervalle entre deux LEDs consécutives du peigne de la longueur d'onde de la source multi-spectrale est en moyenne de 25 nm (tab 3.1). Dans cette situation, l'amplitude du bruit augmente à mesure que le peigne de longueur d'onde se décentre de la résonance plasmon et double de valeur lorsqu'une seule mesure de réflectivité est réalisée à  $\lambda < \lambda_{min}$ . L'amplification du bruit sur le signal extrait au niveau de la surface d'or provient donc d'un centrage très défavorable du peigne de longueur d'onde de la source lumineuse par rapport à  $\lambda_{min}$ . Cependant, cette

expérience de détection valide la capacité de l'instrument MS-SPRi développé d'extraire, avec une bonne sensibilité et une bonne résolution, la variation de la position de la résonance plasmon sur une gamme spectrale très étendue.

Pour conclure, les nombreux essais effectués de photopolymérisation UV dans la configuration expérimentale simple présentée (fig 4.13), ont montré que l'ajustement de la puissance et de la durée d'irradiation ne permet pas un contrôle efficace de l'épaisseur du film de polymère. L'inconvénient principale de cette configuration est qu'elle n'autorise pas la surveillance de l'évolution de l'épaisseur du film en temps réel qui paraît être nécessaire pour la nanostructuration de la biopuce. Par ailleurs, dans les rares cas où les plots synthétisés sont utilisables pour une application SPR, ils ont montré une efficacité de capture des ions très faibles et très éloignées des objectifs du projet. Un moyen de surveillance qui a été trouvé est de suivre la cinétique de photopolymérisation grâce à la SPRi à l'aide d'un instrument SPRi du LCF qui a été modifié pour l'occasion.

4

#### 4.2.3. SUIVI DE LA PHOTOPOLYMERISATION PAR SPRi

La nouvelle configuration expérimentale pour le suivi de la photopolymérisation UV en SPRi est représentée sur la figure 4.17.b. Elle est adaptée à partir de l'instrument bimodale SPRi et Raman qui a été construit dans le cadre de l'ANR PYRANEX par Aurore Olivéro [OLIVÉRO, 2016].

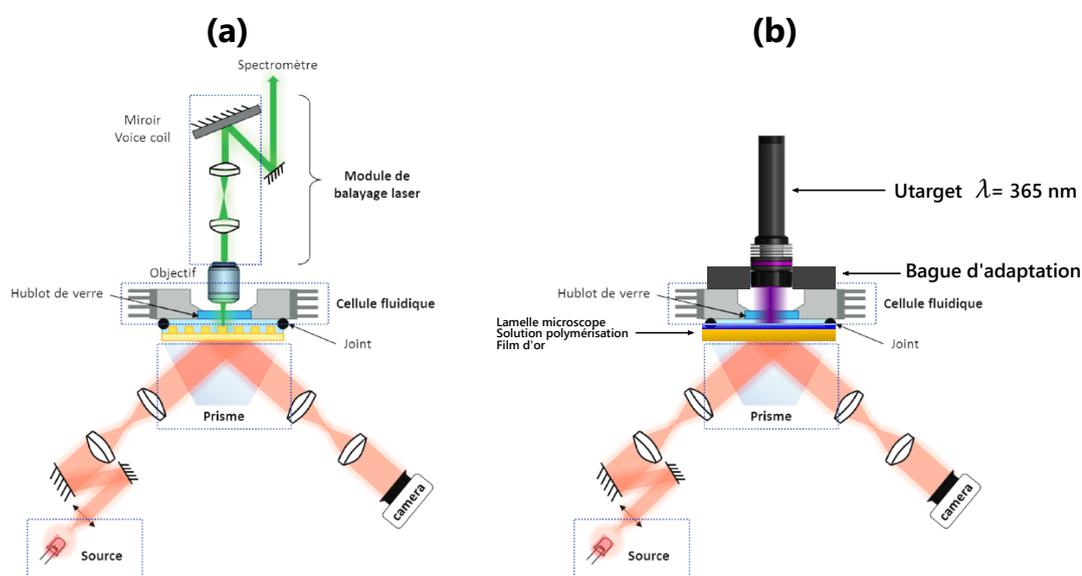


FIGURE 4.17 – **a.** Schéma représentant l'instrument SPRi et Raman développé dans le cadre de l'ANR PYRANEX [OLIVÉRO, 2016]. **b.** Adaptation de la source UV Utarget 365 nm [“UTARGET”, 2022] afin de suivre la formation du polymère par photopolymérisation UV grâce à la SPRi.

Le module d'illumination Raman a été retiré pour y insérer à la place la lampe Utarget. La lame d'or recouverte de la formulation de polymérisation et de la lamelle de microscope est montée sur le prisme et mise en pression contre un hublot à travers lequel peut se propager la lumière UV. La me-

sure de la cinétique de photopolymérisation UV est réalisée par le suivi de la réflectivité de la surface d'or à une longueur d'onde de 735 nm. Avec ce type de montage, la photopolymérisation est déclenchée par l'irradiation UV par le dessus de la surface d'or et sur toute l'épaisseur du film de solution coincé entre celle-ci et la lamelle de microscope. Un masque avec un mono-trou d'un diamètre de 2 mm est déposé sur la partie supérieure du hublot. La puissance de la lampe Utarget est réglée sur le niveau 2 en position focalisée. La distance entre la zone d'émission de la lampe et la surface d'or est d'environ 2 cm. Une feuille de Mylar est également fixée au niveau de la zone d'émission afin de servir de diffuseur pour homogénéiser la tâche d'éclairage. D'après la figure 4.7, dans cette configuration, l'éclairage avant la diffusion par la feuille de Mylar est de l'ordre de  $200 \text{ mW/cm}^2$ .

La méthode de dépôt de la formulation de polymérisation est identique à celle décrite sur la figure 4.6 et aucune étape d'inertage par du diazote n'a été réalisée. Dans cette configuration, l'éclairage reçu par la surface d'or est environ 24 fois plus grand que dans celle qui a permis de fabriquer la biopuce présentée sur la figure 4.15 car le faisceau incident ne subit cette fois-ci pas d'absorption par le film d'or.

Les cinétiques de la formation du polymère pour deux durées d'irradiation différentes sont montrées sur la figure 4.18. La variation de la réflectivité en fonction du temps a été extraite sur une ROI placée au centre de la zone irradiée. Cette dernière peut être visualisée sur les vignettes incrustées sur la figure 4.18 pour différents instants. La forme de la zone irradiée coïncide avec le motif du masque utilisé.

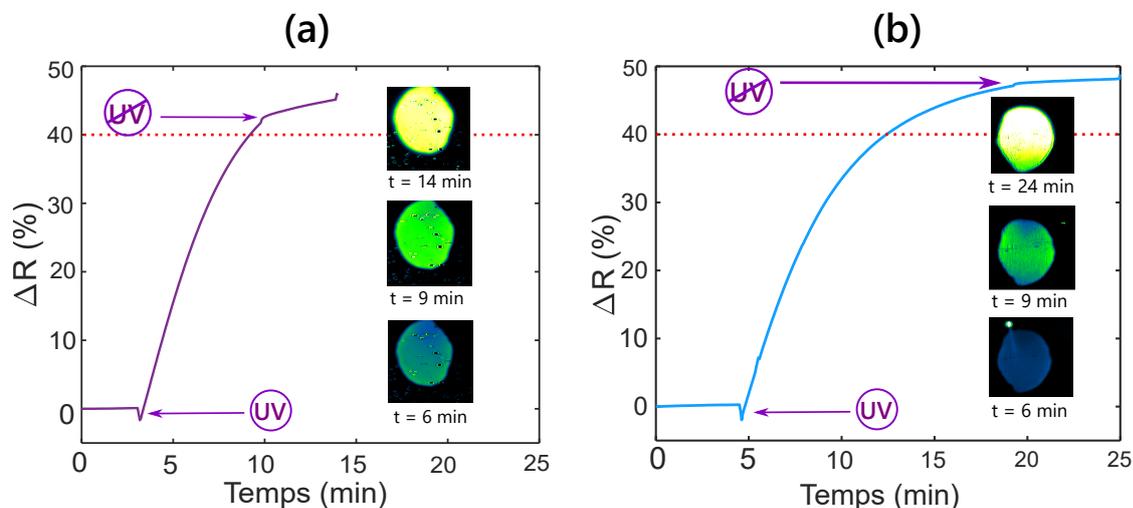


FIGURE 4.18 – Suivi de la variation de la réflectivité en fonction du temps grâce au montage adapté à partir de l'instrument SPRI PYRANEX dans le cas de la photopolymérisation UV pour une durée d'irradiation de 5 min (a) et 15 min (b). Les vignettes incrustées montrent les images en variations de réflectivités de la surface d'or et de la zone irradiée à différents instants.

Lors de l'allumage de la lampe Utarget, une diminution de 1 ou 2 % de la réflectivité est observée sur moins de 10 secondes indiquant une diminution de l'indice de réfraction sondé par le plasmon de surface. Cette diminution peut s'expliquer par un échauffement localisé de la formulation de polymérisation lors de l'absorption du rayonnement UV. Ce phénomène se reproduit avec une am-

plitude opposée lors de l'extinction de la lampe. Quelques secondes après le début de l'irradiation, la variation de réflectivité augmente rapidement pour dépasser les 40 % après 5 à 7 minutes. Cette augmentation est proportionnelle à celle de l'indice de réfraction du milieu en contact avec la surface d'or qui est probablement induite par la formation du polymère. Si les indices de réfraction du film de polymère et de la solution de polymérisation sont connus, il est possible de relier la variation de la réflectivité à l'épaisseur du film formé. Toutefois, il est important de noter que pour la durée d'irradiation de 15 minutes (fig 4.18.b),  $\Delta R$  tend vers une valeur limite d'environ 48 % plusieurs minutes avant que la lampe Utarget ne soit coupée. Cette observation ne signifie pas que la polymérisation est terminée mais plutôt que la sensibilité de l'instrument SPRi en interrogation en réflectivité tend rapidement vers 0 lorsque la résonance plasmon se déplace de plusieurs dizaines de nanomètres. En effet, l'instrument a initialement été réglé pour que son point de fonctionnement se trouve à environ 40 % en réflectivité afin d'avoir une sensibilité maximale. Ainsi, pour  $\Delta R \approx +40\%$ , le point de fonctionnement se retrouve en dehors de la partie linéaire de la courbe de la résonance plasmon et atteint une zone où la réflectivité n'est plus influencée par le SP (fig 1.6.b).

Une première estimation de la valeur de l'indice de réfraction du polymère ( $n_{poly}$ ) a déjà été proposée dans la section précédente. Elle se base sur le fait que le plasmon de surface n'a pas pu être excité sur une zone recouverte par un film de IIP de quelques micromètres d'épaisseur déposé sur une lame d'or avec un substrat en BK7 (fig 4.8). Cependant, si ce substrat est remplacé par un verre en SF10 d'indice de réfraction suffisamment grand de 1,72, le SP peut être excité à des angles et des longueurs d'onde atteignables expérimentalement pour un film de polymère infini d'indice de réfraction proche de 1,51. La position de la résonance plasmon dépend de façon équivalente de  $n_{poly}$  et de l'épaisseur du film de polymère ( $e_{poly}$ ) de sorte qu'il n'est pas possible de déterminer leur valeur à partir de la mesure de cette position. Cependant, par un ajustement de l'entièreté du profil de la résonance plasmon expérimentale l'indétermination peut être levée et une mesure du couple ( $e_{poly}, n_{poly}$ ) peut être obtenue [TILKENS, 2000]; mais cela doit passer par une étape de calibration précise de la mesure de l'angle d'incidence. Toutefois, pour une épaisseur du milieu diélectrique infinie, la position de la résonance plasmon ne dépend plus que de l'indice de réfraction qui peut alors facilement être déduit. La procédure de la mesure expérimentale de  $n_{poly}$  est décrite sur la figure 4.19.

Le profil angulaire de la résonance plasmon a été mesuré sur 5 ROIs réparties sur une zone homogène du film de polymère pour une longueur d'onde incidente de 750 nm. La valeur moyenne de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence externe sur ces 5 ROIs est représentée par les ronds violets et la dispersion à  $3\sigma$  des mesures est matérialisée par les barres d'erreurs. Le profil angulaire de la résonance plasmon est simulé pour différentes valeurs de  $n_{poly}$  pour une épaisseur  $e_{poly}$  et pour une longueur d'onde de 750 nm. La position angulaire de la résonance simulée est égale à celle de la résonance expérimentale pour une valeur de  $n_{poly} = 1,495$  (courbe violette en trait plein). Pour obtenir une valeur précise de cet indice de réfraction et les incertitudes associées, il aurait fallu réaliser une étape de calibration de la mesure de l'angle d'incidence d'excitation. De plus, l'indice de

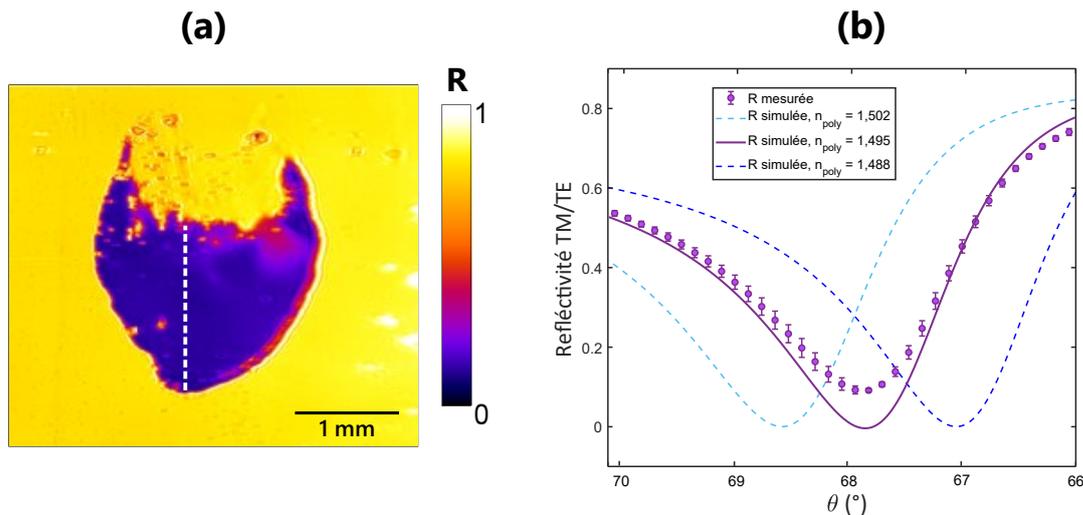


FIGURE 4.19 – **a.** Image en réflectivité de la résonance plasmon d'une lame d'or et d'un dépôt de polymère dit "trop épais" de quelques micromètres d'épaisseur dont la cinétique de formation est représentée sur la figure 4.18.b. Le substrat du film d'or est un verre en SF10 **b.** Mesure du profil angulaire de la résonance plasmon pour une longueur d'onde de 750 nm sur 5 ROIs réparties le long de la ligne blanche en pointillés sur l'image de gauche. Trois profils angulaires de la résonance plasmon ont été simulés pour différents indices de réfractifs supposés du film de polymère.

réfraction de la formulation de polymérisation peut être déterminé avec la même méthode et une valeur de 1,44 a été obtenue. Une méthode plus précise pour la mesure de  $n_{poly}$ , est présentée dans la section suivante se basant cette fois-ci sur l'interrogation spectrale de la résonance plasmon et sur la mesure par profilométrie de  $e_{poly}$  dans le cas d'un film de quelques centaines de nanomètre d'épaisseur.

Les ordres de grandeur des indices de réfraction de la formulation de polymérisation et du film de polymère peuvent maintenant être utilisés pour estimer la valeur de la variation de la réflectivité en fonction de l'épaisseur du film de polymère formé dans le cas des cinétiques présentées sur la figure 4.18. Il apparaît que pour un  $\Delta R \approx 40\%$  mesurée pour le point de fonctionnement sélectionné pour le suivi SPRi à une longueur d'onde de 750 nm (fig 4.18), l'épaisseur théorique du film de polymère formé attendue est d'environ 35 nm. Il s'agit d'une épaisseur minimale car au-delà, le suivi SPRi n'est plus possible car le déplacement de la résonance plasmon est trop important par rapport à la dynamique de mesure de l'interrogation en réflectivité.

De façon surprenante, après la synthèse et le développement du plot de IIP dont la cinétique est représenté sur la figure 4.18.a, l'épaisseur du film formé a été mesurée par l'interrogation angulaire du plasmon de surface. En supposant que  $n_{poly} = 1,495$ , il vient que  $e_{poly} \approx 10$  nm. Cette faible épaisseur est incohérente avec la valeur estimée plus haut à partir de la variation de réflectivité de 40 %. Une explication possible est que la sensibilité du plasmon de surface s'étend sur quelques centaines de nanomètres au-dessus de la surface. Or, dans la configuration étudiée, l'irradiation UV est réalisée par le dessus et la photopolymérisation est déclenchée sur une hauteur de plusieurs micromètres dans la solution. Vraisemblablement, le polymère commence à croître dans tous le

volume sans pour autant s'accrocher à la surface d'or proche de laquelle sa croissance est détectée par SPR. Si l'irradiation UV est coupée avant que le polymère synthétisé en volume ne soit accroché à la surface, il sera éliminé lors de l'étape de développement lors de laquelle la surface d'or est nettoyée par des bains successifs d'acétonitrile, d'éthanol et d'eau. Pour un temps d'irradiation plus important, le polymère qui a terminé sa croissance dans le volume irradié, s'accroche à la surface menant à un film de plusieurs micromètres d'épaisseur (fig 4.19.a). Ces observations permettent de conclure que cette configuration n'autorise pas un meilleur contrôle de l'épaisseur du film formé à cause de sa croissance non homogène dans le volume irradié de la dynamique de mesure trop limitée de la SPRi.

4

Néanmoins, la capacité d'imagerie du mode d'interrogation en réflectivité apporte des informations intéressantes sur le développement du polymère. En effet, les images en réflectivités enregistrées durant la synthèse permettent peut être d'expliquer pourquoi un morceau du plot de IIP ne s'est pas correctement accroché à la surface (fig 4.19.a). Cette zone sans polymère coïncide avec la zone où la variation de la réflectivité est moins importante et qui peut être visualisée sur la vignette incrustée pour un temps  $t = 9$  min sur la figure 4.18.b. La capacité d'imagerie permet également de constater que le diamètre du plot de IIP croît d'environ 15 % tout au long de l'irradiation ce qui confirme donc que la croissance verticale du plot n'est pas uniforme sur toute la zone irradiée.

Pour conclure, dans cette section, la possibilité de suivre en temps réel, par SPRi, la cinétique de formation du film de polymère a été démontrée. Il a notamment été compris que la croissance du polymère n'est pas uniforme et qu'il peut croître en volume sans pour autant s'accrocher à la surface. Cependant, il n'a pas été possible de mettre au point une méthode basée sur la photopolymérisation UV et la recette initiale du LSABM permettant de contrôler l'épaisseur du film formé à l'échelle nanométrique. La limitation principale réside dans le comportement fortement non-linéaire de la cinétique de polymérisation radicalaire en présence de dioxygène comme inhibiteur dissout en solution.

Une nouvelle direction va maintenant être empruntée et débute par une nouvelle collaboration avec Olivier Soppera, directeur de recherche au IS2M de Mulhouse, qui travaille sur la photopolymérisation déclenchée par le plasmon de surface localisé dans des nanoparticules métalliques. Le principe de cette méthode et son énorme avantage sur la photopolymérisation UV pour la nanostructuration vont être présentés dans la suite.

## 4.3. PHOTOPOLYMÉRISATION DÉCLENCHÉE PAR LE PLASMON

### 4.3.1. PRINCIPE ET INTÉRÊT

Le plasmon de surface, de part ses propriétés particulières de confinement et d'amplification du champ électromagnétique en champ proche, décrites dans le chapitre d'introduction (fig 1.8), est un support privilégié pour transférer localement de l'énergie à l'échelle nanométrique. Par exemple, pour un indice de réfraction de 1,45 correspondant à l'ordre de grandeur de l'indice de réfraction de la formulation de photopolymérisation, la longueur de pénétration du plasmon de surface dans ce milieu est de l'ordre de 200 nm. De plus, le facteur d'amplification de l'intensité du SP, calculée comme la norme au carré du champ électrique, est d'environ 50 pour une longueur d'onde d'excitation de 633 nm. Ces deux propriétés très intéressantes peuvent être exploitées afin de nanostructurer une surface métallique par un film de polymère synthétisé par photopolymérisation déclenchée par le plasmon (Plasmon Triggered Photopolymerization, PTP) avec une épaisseur compatible pour des applications dans la détection SPR.

Le nombre de publications traitant de ce sujet a considérablement augmenté sur les 25 dernières années (fig 4.20.a) mais concernent uniquement le cas de photopolymérisation à la surface de nanoparticules métalliques par excitation d'un plasmon de surface localisé. À ce jour, il n'y a, a priori, aucune publication décrivant l'application de cette méthode aux films métalliques par excitation d'un plasmon de surface propagatif. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer : les techniques de synthèse de nanoparticules métalliques avec différentes géométries sont maintenant bien maîtrisées, l'excitation du plasmon de surface localisé ne dépend pas de l'angle d'incidence et ne nécessite pas un montage optique aussi élaboré que dans le cas d'une configuration de Kretchmaan et enfin, la polymérisation peut être réalisée par incorporation des NPs directement dans la formulation de photopolymérisation. De plus, le confinement du champs électromagnétique est beaucoup plus important dans le cas d'un plasmon de surface localisé excité à la surface d'une NP métallique que dans le cas d'un SP excité à la surface d'un film métallique.

Un schéma de principe de la PTP dans le cas de nanosphères d'argent comme supports métalliques est montré sur la figure 4.20.b. La formulation de photopolymérisation est composée d'un monomère, d'un agent réticulant et éventuellement d'un solvant. Un photo-initiateur (PI) de type 2, constitué d'un colorant (Eosine) et d'une amine tertiaire (MDEA), est rajouté à la formulation. Ce type de PI fonctionne en deux temps : le colorant absorbe la lumière incidente pour passer dans un état excité qui va alors interagir avec l'amine tertiaire pour créer une espèce radicalaire permettant d'initier la polymérisation. Les NPs sont, dans un premier temps, déposées sur un substrat de verre puis recouvertes par la formulation de photopolymérisation. L'ensemble est ensuite irradié par de la lumière à une longueur d'onde résonante avec l'excitation du plasmon de surface localisé (LSP) et avec l'excitation du colorant. Une lumière polarisée linéairement peut être utilisée afin d'exciter le LSP selon un axe privilégié. Il est nécessaire, en premier lieu, de déterminer l'énergie à fournir à la formulation pour déclencher la polymérisation en champ lointain. Cette énergie qui dépend de la formulation mais également de la concentration en inhibiteurs présents en solution est calculée par

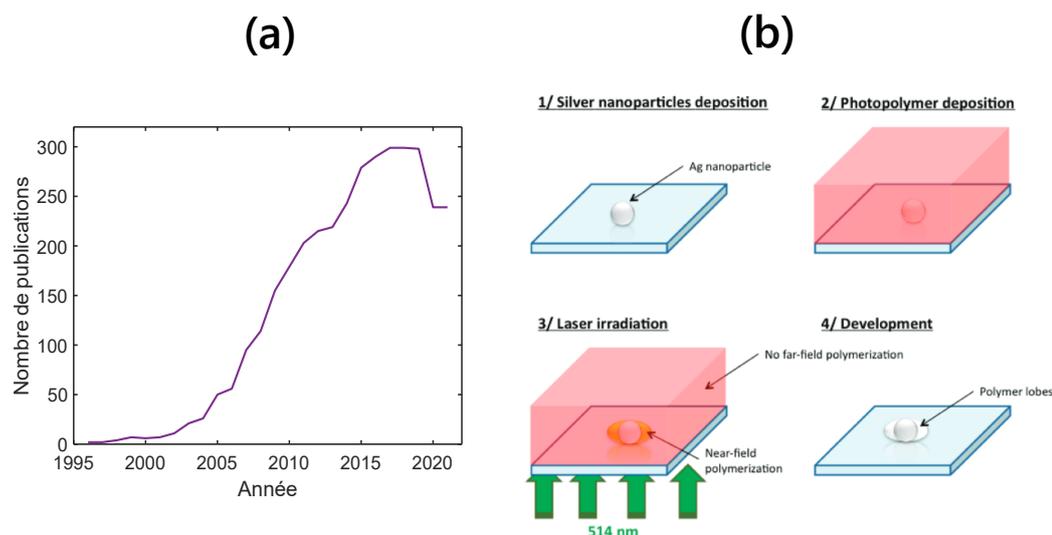


FIGURE 4.20 – **a.** Évolution du nombre de publications – avec pour mots clés : nanoparticules, surface plasmon, polymer – en fonction des années. **b.** Schéma représentant le principe de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon excité dans une nanoparticule [DEEB et al., 2011].

le produit de la puissance d'irradiation et de la durée d'inhibition. Ainsi, pour que la polymérisation ne soit déclenchée seulement qu'en champ proche, par le LSP, au voisinage de la surface de la nanoparticule, la formulation est irradiée pour une énergie inférieure à l'énergie seuil déterminée en champ lointain. Grâce à l'amplification de l'intensité lumineuse incidente par le LSP de plus d'un ordre de grandeur sur quelques dizaines de nanomètres proche de la surface de la NP, la réaction de photopolymérisation reste confinée. Une dernière étape de développement consiste à nettoyer le substrat avec un solvant afin d'éliminer la grande majorité de la formulation qui n'a pas réagi et ainsi récupérer la NP sur laquelle a été greffé un film de polymère d'une épaisseur de quelques nanomètres.

Dans la partie suivante, une adaptation de ce protocole est proposée afin de réaliser la nanostructuration d'un film d'or par des plots de polymère avec une épaisseur maximale de l'ordre de 200 nm. Le type de géométrie et la nature du métal imposent des contraintes respectivement sur la simplicité du montage optique et sur le choix du photo-initiateur.

#### 4.3.2. VALIDATION DE LA MÉTHODE

La première adaptation concerne le choix du colorant qui compose le photo-initiateur. Il faut que sa bande d'absorption coïncide avec celle du plasmon de surface. Ce dernier est excité efficacement à la surface d'un film d'or pour des longueurs d'onde supérieures à 600 nm (fig 1.6.a). En dessous de cette valeur, l'excitation du SP est concurrencée par le processus d'absorption interbande de la structure électronique de l'or. Ainsi, le colorant choisi est le bleu de méthylène qui a une bande large d'absorption centrée sur 665 nm (fig 4.21.a) et qui peut également fonctionner en synergie avec le MDEA pour former des espèces radicalaires qui vont initier la polymérisation.

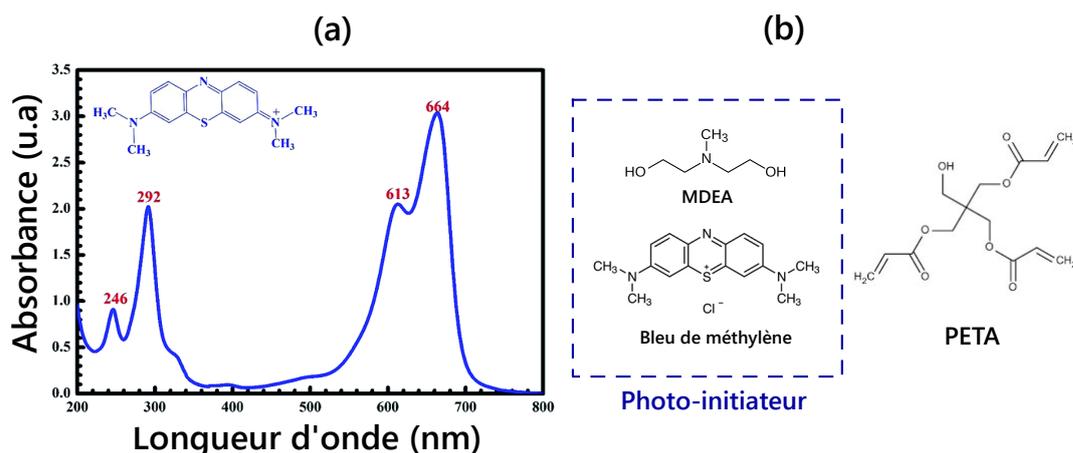


FIGURE 4.21 – a. Spectre d'absorption du bleu de méthylène [DINH et al., 2019]. b. Structures des molécules utilisées pour la photopolymérisation déclenchée par le plasmon.

Le montage optique permettant de réaliser la PTP sur une couche d'or se base sur une configuration de Kretschmaan en interrogation en réflectivité. Il a été adapté à partir d'un instrument SPRi déjà existant au LCF qui est très polyvalent de part les possibilités de modifier l'angle d'incidence et la longueur d'onde d'excitation avec une grande dynamique. Le grand avantage de cet instrument SPRi est qu'il est capable d'imager, en temps réel, la formation du film de polymère en trois dimensions ce qui n'a, a priori, jamais été reporté. La version adaptée de ce montage pour une application à la PTP est représentée sur la figure 4.22. Le monochromateur couplé à une lampe halogène, comme source lumineuse originelle de l'instrument, a été remplacée par un laser hélium-néon avec une puissance de 5 mW, assez élevée pour pouvoir déclencher la photopolymérisation. Le laser He-Ne a une longueur d'onde d'émission de 632,8 nm qui se trouve dans la bande d'absorption du bleu de méthylène et qui est adaptée pour exciter le plasmon de surface. La lumière émise par le laser est injectée dans une fibre multi-modes à l'aide de deux objectifs de microscopes. Un collimateur achromatique permet d'obtenir un faisceau collimaté avec un diamètre de 13,2 mm et une divergence angulaire de 0,45°. Un polariseur motorisé permet de fixer la polarisation linéaire du faisceau incident. Ce dernier traverse un prisme en SF10 pour se réfléchir sur la surface d'or et ensuite être imagé sur une caméra à l'aide d'un système optique disposant d'un grandissement ajustable. Le bras d'injection de la lumière et le bras d'imagerie sont montés sur des plateformes motorisées autorisant le réglage précis de l'angle d'incidence.

À cause de la grande cohérence temporelle de la lumière émise par le laser et notamment de l'utilisation d'une fibre optique multi-modes, une figure de speckle apparaît sur la surface d'or résultant de l'interférence entre les différents modes de propagation dans la fibre optique et mène à un éclaircissement très inhomogène. Cela a deux effets néfastes sur le suivi en temps réel de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon par SPRi. Le premier est que la qualité de l'image de la surface d'or enregistrée par la caméra est détériorée par les grains de speckle, rendant impossible la mesure en SPRi. Le second concerne l'uniformité spatiale de la réaction de polymérisation dont

le seuil de déclenchement est d'autant plus bas que l'éclairement est élevé. Elle va donc avoir tendance à se déclencher préférentiellement sur les grains de speckle. Ainsi, dans le but d'uniformiser l'éclairement, un brouilleur de speckle a été fabriqué à partir d'un haut parleur alimenté par un GBF et d'un adaptateur qui permet de tenir la fibre optique. Un signal sinusoïdale avec une fréquence de 180 Hz et une amplitude de 20 V est appliqué au haut parleur qui transmet le mouvement d'oscillation à la fibre optique induisant une déformation locale de son rayon de courbure. Les modes de propagation dans la fibre optique sont ainsi mélangés, ce qui améliore grandement l'homogénéité de l'éclairement ainsi que la qualité de l'image de la surface d'or sur laquelle persiste un résidu de speckle suffisamment faible pour autoriser la mesure en SPRI.

4

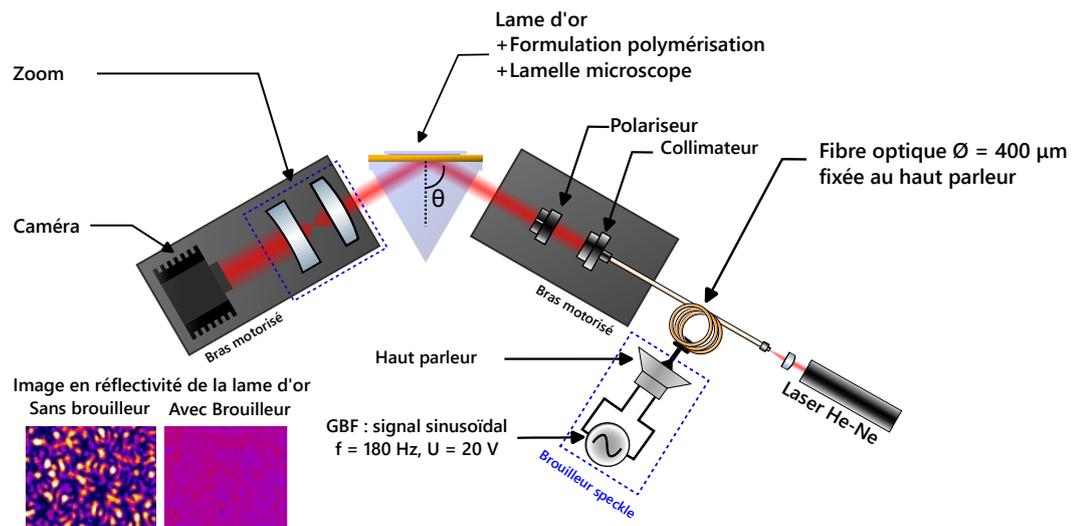


FIGURE 4.22 – Schéma de la vue du dessus du montage optique utilisé pour réaliser la photopolymérisation déclenchée par le plasmon avec le suivi en temps réel en configuration de Kretschmaan. Le bras d'injection de la lumière et le bras d'imagerie sont montés sur des plateformes motorisées afin de pouvoir régler facilement l'angle d'incidence.

Finalement, un diaphragme ou un masque peuvent être ajoutés entre le polariseur et le prisme afin d'irradier des zones bien délimitées sur la surface d'or. Aucun système d'imagerie n'est utilisé pour conjuguer le diaphragme ou le masque avec la surface d'or et il faut donc les placer au plus proche du prisme afin d'obtenir un éclairement le plus uniforme possible sur la zone irradiée. Dans le cas contraire, le profil de l'éclairement prend la forme d'une courbe gaussienne.

Une première formulation de photopolymérisation, envoyée par l'équipe d'Olivier Soppera de l'IS2M a été utilisée pour valider la technique et le montage optique. Elle est composée du photo-initiateur (bleu de méthylène dissout dans le MDEA) et du PETA en tant que monomère (fig 4.21.b). La composition exacte de cette formulation de test n'a pas été communiquée. Cependant, les quantités de matières des réactifs de la formulation de IIP de zinc et de NIP pour la photopolymérisation déclenchée par le plasmon. Les résultats de ces premiers essais fructueux sont présentés sur la figure 4.23.

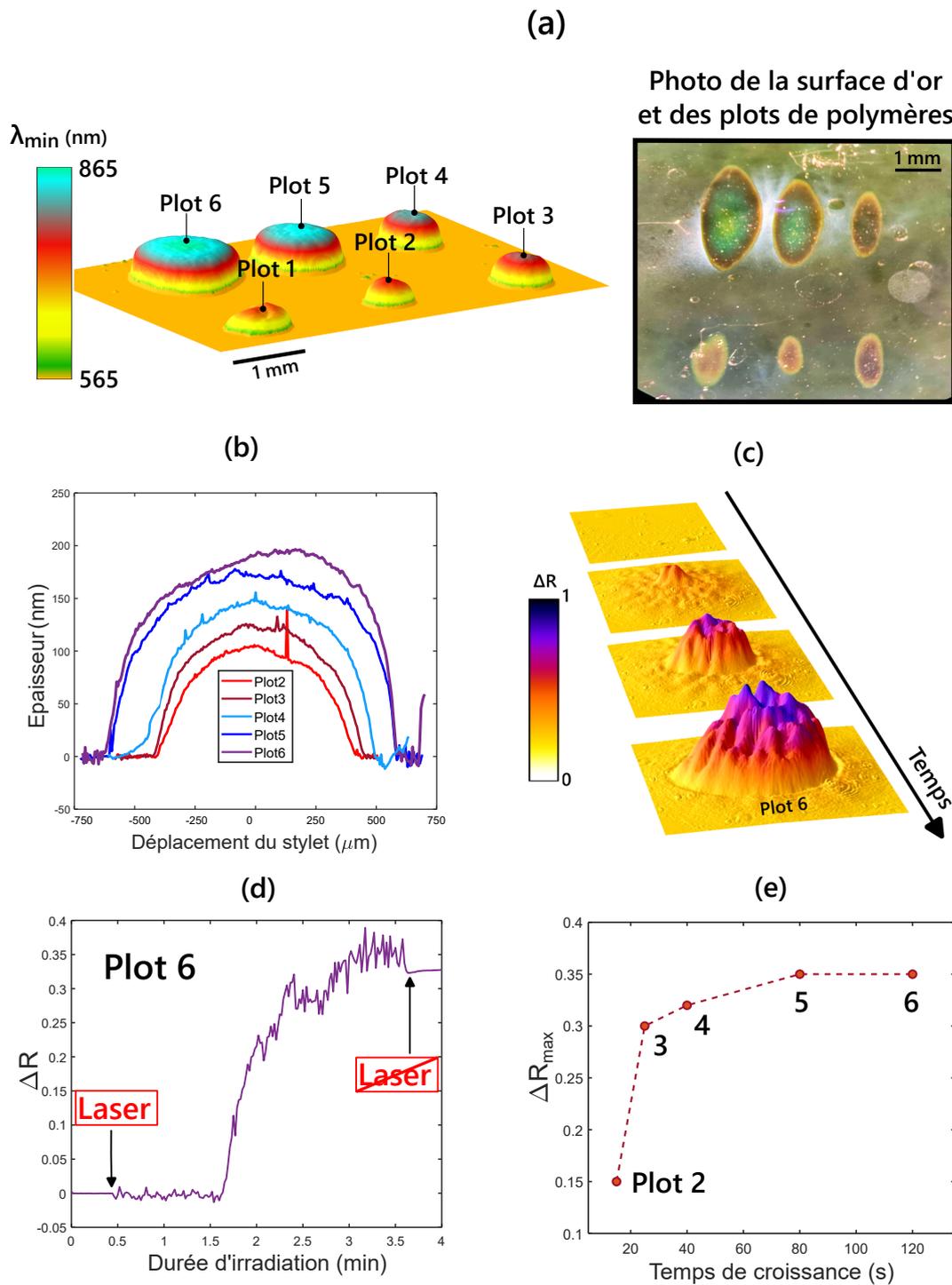


FIGURE 4.23 – **a.** Vision 3D de la position spectrale de la résonance plasmon mesurée sur la surface d'or structurée par des plots de polymères de différentes épaisseurs et différents diamètres. **b.** Mesure de l'épaisseur des plots par profilométrie. **c.** Évolution de la réflectivité lors de la croissance du plot 6 mesurée en imagerie SPR. **d.** Variation de la réflectivité en fonction du temps sur une ROI située au centre du plot 6 lors de sa croissance. **e.** Variation maximale de la réflectivité mesurée en fonction du temps de croissance du plot de polymère.

Un film d'or déposé sur un substrat en SF10 a été structuré par 6 plots de polymère ayant des épaisseurs et des diamètres différents. Une image en  $\lambda_{min}$  de cette surface, obtenue grâce à l'al-

gorithme présenté dans le chapitre 3, permet de visualiser les plots de polymères (fig 4.23.a). Un diaphragme avec un diamètre d'environ 2 mm a été inséré dans le bras d'injection afin d'irradier successivement différentes zones de la surface. La puissance d'irradiation est la même pour chaque plot. À la sortie de la fibre optique, la puissance lumineuse est de 3,5 mW. La moitié de cette puissance incidente est absorbée lors du passage dans le polariseur. L'éclairement sur la surface d'or par le faisceau collimaté de diamètre 13,2 mm est alors d'environ 1,3 mW/cm<sup>2</sup>. D'après l'analyse théorique présentée dans la section 1.2.2, le facteur d'amplification de l'intensité par l'excitation du SP vaut environ 50 (fig 1.8.b) pour une longueur d'onde d'irradiation de 633 nm et un indice de réfraction de la formulation de photopolymérisation qui a été estimé à 1,45. Ainsi, l'éclairement reçu par la formulation déposée sur la surface d'or est d'environ 65 mW/cm<sup>2</sup>. Le temps d'irradiation a été augmenté progressivement entre la polymérisation du premier et du sixième plot. Le temps de croissance pour un plot donné peut être lu sur la figure 4.23.e. Ce temps est mesuré entre l'instant où la polymérisation démarre et l'instant où le laser est éteint. Le déclenchement de la polymérisation est repéré par la variation de la réflectivité mesurée à la longueur d'onde du laser (fig 4.23.d). En effet, lorsque le polymère commence à croître, l'indice de réfraction proche de la surface d'or est modifié ce qui déplace la position de la résonance plasmon. Initialement, l'angle d'incidence est réglé pour que la résonance plasmon se situe autour de 633 nm afin que l'amplification de l'intensité lumineuse incidente par le SP soit maximale.

Différents régimes sont observés dans la cinétique de formation du plot de polymère. Tout d'abord, l'allumage du laser a un effet clairement visible sur le bruit de la variation de la réflectivité qui provient du résidu de speckle qui n'a pas complètement été uniformisé par le brouilleur de speckle. L'amplitude de ce bruit est par ailleurs plus élevée à mesure que la réflectivité augmente et donc que la position spectrale de la résonance plasmon s'éloigne de la longueur d'onde du laser. Le couplage entre le plasmon de surface et la lumière laser diminue et donc l'intensité réfléchie de cette dernière et également l'intensité des grains de speckle augmentent. Cette augmentation est également visible sur la figure 4.23.c qui montre la croissance, en trois dimensions, du plot de polymère. Les pics et creux observés au niveau du sommet du plot proviennent essentiellement du bruit de speckle. Ensuite, après l'allumage du laser, une période plus ou moins longue d'attente précède le départ de la polymérisation. Dans le cas de la synthèse du plot n°6, cette période dure un peu plus d'une minute. Cette période peut s'expliquer par le mécanisme d'inhibition par le dioxygène dissout en solution déjà décrit précédemment (fig 4.12.a). Les radicaux produits par le photo-initiateur sous irradiation du laser réagissent très rapidement avec le dioxygène. Lorsque ce dernier est complètement consommé, les radicaux nouvellement générés peuvent déclencher la polymérisation. Cela suppose a priori que la quantité initiale de photo-initiateur est évidemment beaucoup plus importante que le dioxygène présent en solution (fig 4.12.b). La réaction dure quelques minutes et, dans le cas du plot n°6, s'arrête naturellement après une variation maximale de la réflectivité mesurée d'environ 35 %. Initialement, l'angle d'incidence a été réglé pour obtenir la résonance plasmon à la longueur d'onde du laser pour laquelle la réflectivité mesurée est d'environ 10 %. Ainsi, suite à un

$\Delta R_{max} \approx 35\%$ , la longueur d'onde du laser se trouve toujours dans l'intervalle spectral où la résonance plasmon a lieu. Cela signifie que cette valeur  $\Delta R_{max}$  ne provient pas d'une limitation de la dynamique de mesure, comme cela avait pu être observé lors du suivi de la photopolymérisation UV (fig 4.18), mais témoigne plutôt de l'arrêt naturel de la réaction. Cette observation peut être expliquée par deux effets qui se cumulent : premièrement, à mesure que le polymère croît en hauteur, il s'éloigne de la surface d'or où le SP est le plus intense et, deuxièmement, le SP perd lui-même en intensité car la position spectrale de la résonance plasmon s'éloigne de la longueur d'onde du laser à laquelle il est excité. Ainsi, il arrive que l'intensité lumineuse n'est plus assez importante pour générer suffisamment de radicaux libres pour lutter contre l'inhibition par le dioxygène. C'est en partie le même phénomène qui est à l'origine de la dynamique particulière de la croissance latérale du plot de polymère qui peut être observée sur la figure 4.23.c : le polymère commence à croître au centre de la zone irradiée avec une cinétique rapide et croît latéralement avec une cinétique plus lente. En effet, à cause du profil gaussien de l'éclairement sur la zone irradiée, il est maximum au centre et diminue en se rapprochant des bords. Cet aspect sera étudié plus en détails dans la section 4.3.4.

Par soucis de simplicité, seule la cinétique du plot 6 est présentée ici pour laquelle la polymérisation a été menée jusqu'à son terme. Pour les autres plots, le laser a été coupé au cours de la réaction qui s'arrête instantanément considérant la résolution temporelle d'environ 2 s dans le cas de ces expériences. Les valeurs des réflectivités maximales mesurées avant l'arrêt naturel ou non de la réaction sont données sur la figure 4.23.e en fonction du temps de croissance. Les mesures des épaisseurs des plots de polymère (fig 4.23.b), réalisées par Amine Khitous, doctorant au IS2M, montrent qu'il est alors possible de contrôler l'épaisseur des plots, à l'échelle nanométrique, en coupant l'irradiation laser manuellement. Elles montrent également la forme très régulière des plots avec des bords bien définis, une surface supérieure relativement plate et une structure homogène. Cette qualité des plots synthétisés se manifeste par leurs couleurs vives visibles sur la photo affichée sur la figure 4.23.a. Ces couleurs proviennent d'un phénomène d'interférence en lumière blanche dont la manifestation dépend de l'épaisseur optique du plot. À noter qu'à cause de l'anisotropie de la croissance du polymère, un plot moins épais a également un diamètre plus petit. La surface d'or a donc été structurée avec succès par des plots dont l'épaisseur varie entre 100 nm et 190 nm.

À l'aide des mesures d'épaisseur réalisées au profilomètre et de l'image en  $\lambda_{min}$  de la surface d'or nanostructurée par les plots de polymère, il est possible de simuler exactement le système multi-couches et d'en estimer assez précisément l'indice de réfraction des plots (tab 4.24). Lors d'une première étape, le système simulé se décompose en un substrat en SF10 recouvert d'un film de 50 nm d'or et d'un milieu diélectrique semi-infini composé d'eau pure. Cette configuration initiale permet de déterminer l'angle d'incidence pour lequel la position spectrale de la résonance plasmon sur l'or survient pour une longueur d'onde mesurée  $\lambda_{min} = 565$  nm (fig 4.23.a). Ensuite, afin de simuler un plot de polymère, un film d'indice de réfraction à déterminer et d'une épaisseur fixée à celle mesurée par profilométrie est ajoutée au-dessus de la surface d'or. La valeur de l'indice de réfraction est alors ajustée pour que la position spectrale de la résonance plasmon simulée soit

égale à celle qui a été mesurée. L'incertitude principale sur l'estimation de l'indice de réfraction par cette méthode provient de la valeur de l'épaisseur mesurée qui sert à simuler le plot. En prenant en compte la planéité et l'état de la surface supérieure du plot, il est raisonnable de considérer que l'incertitude sur la mesure de l'épaisseur est de l'ordre de  $\pm 5$  nm. Ce qui mène à une incertitude sur l'indice de réfraction, déterminée numériquement, de  $\pm 3.10^{-3}$  RIU. Les indices de réfractifs mesurés sont très similaires d'un plot à l'autre avec une tendance à décroître avec l'épaisseur. Cela pourrait être lié à une densité du polymère qui diminue avec l'éloignement à la surface où l'amplification de l'éclairement est maximale.

4

| n° plot | épaisseur mesurée (nm) | $\lambda_{min}$ mesurée (nm) | n estimé |
|---------|------------------------|------------------------------|----------|
| 2       | 100                    | 745                          | 1,523    |
| 3       | 125                    | 775                          | 1,517    |
| 4       | 150                    | 800                          | 1,512    |
| 5       | 170                    | 828                          | 1,512    |
| 6       | 190                    | 840                          | 1,507    |

FIGURE 4.24 – Estimation de l'indice de réfraction des plots de polymère en simulant la résonance plasmon à partir des épaisseurs mesurées par profilométrie et de la position spectrale mesurée  $\lambda_{min}$ .

Finalement, ces résultats montrent qu'il est possible de structurer la surface d'or par des plots de polymère avec une épaisseur ajustable et limitée par l'extension spatiale du plasmon de surface. Cette méthode permet également le suivi en temps réel de la formation du plot. Il a été observé qu'il existe une durée d'inhibition avant que la polymérisation ne démarre et qui est liée au dioxygène dissout en solution. Cette période d'attente n'avait pas été observée lors du suivi en temps réel de la photopolymérisation UV (fig 4.18) indiquant que le temps d'inhibition était trop court pour être facilement observable. Cela peut s'expliquer par un éclairement environ trois fois plus grand dans le cas de la photopolymérisation UV et une section efficace d'absorption du photo-initiateur dans l'UV probablement plus importante que celle dans le visible.

Il s'agit maintenant d'utiliser la photopolymérisation déclenchée par le plasmon pour nanostructurer la surface d'or par des polymères à empreintes ioniques à partir de la recette développée par le LSABM.

#### 4.3.3. NANOSTRUCTURATION DE LA SURFACE D'OR PAR DES IIP

Les premiers essais ont été réalisés sur la formulation du polymère non imprimé sans l'acétonitrile. Ce choix est motivé par l'envie de rester au plus proche de la recette de l'IS2M qui a bien fonctionné et qui ne contient pas de solvant. De plus, l'utilisation de l'acétonitrile qui est peu visqueux (tab 4.10) a tendance à grandement diminuer la viscosité de la formulation ce qui facilite la diffusion du dioxygène et par conséquent, l'inhibition de la réaction. La formulation de photopo-

lymérisation étudiée dans un premier temps ne contient donc que le MAA en tant que monomère, l'EGDMA comme agent réticulant et le photo-initiateur. Trois plots ont été obtenus pour lesquels l'éclairement est le même mais la durée d'irradiation et la taille du diaphragme sont différentes. Une nouvelle source laser He-Ne polarisée linéairement et avec une puissance de 20 mW a remplacé celle de 5 mW précédemment utilisée. Un polariseur placé sur le trajet optique du faisceau laser avant injection dans la fibre optique permet d'ajuster la puissance lumineuse fournie. L'éclairement reçu par la formulation dans cette nouvelle configuration, pour la puissance maximale, est de  $260 \text{ mW/cm}^2$ . Les plots de NIP sans solvant ont été synthétisés successivement suivant l'ordre donné par leur numérotation. Le diamètre du diaphragme utilisé dans le cas des plots n°1 et n°3 est le même tandis qu'il est environ deux fois plus grand dans le cas du plot n°2.

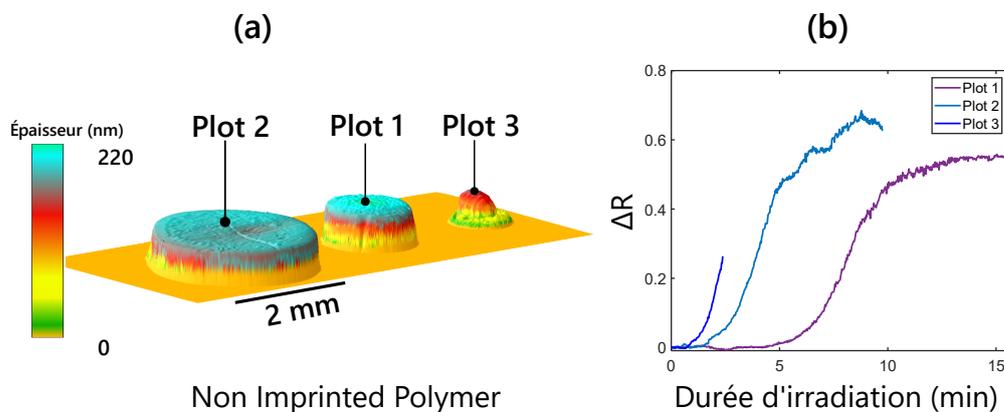


FIGURE 4.25 – **a.** Vision 3D de la surface d'or structurée par des plots de polymères de différentes épaisseurs et différents diamètres et pour un indice de réfraction  $n_{poly} = 1,50$ . **b.** Variation de la réflectivité en fonction du temps sur une ROI située au centre des plots lors de leur croissance.

L'éclairement reçu par la formulation de photopolymérisation, dans cette nouvelle configuration, est environ 4 fois supérieur à celui mesuré dans l'étude de la partie précédente pour lequel le temps d'inhibition par le dioxygène était de l'ordre d'une minute. Un éclairement 4 fois plus élevé signifie, en première approximation, un taux de production de radicaux libres et donc un taux de consommation du dioxygène 4 fois plus grand. Il est alors attendu que la durée d'inhibition soit divisée par un facteur 4. Or, dans le cas de la formulation de NIP sans solvant, le temps d'inhibition est de l'ordre de 5 minutes pour le plot n°1. À éclairement équivalent, la durée d'inhibition dans le cas de la formulation du NIP est donc plus grande d'environ un ordre de grandeur par rapport à celle de la formulation basée sur l'utilisation du PETA comme monomère (fig 4.21.b). Cette durée d'inhibition plus grande peut s'expliquer principalement par le coefficient de diffusion du dioxygène qui augmente lorsque la viscosité de la formulation diminue. Pour un taux de renouvellement du dioxygène plus important dans la zone irradiée, la durée d'inhibition augmente. Cet aspect sera également détaillé dans la section 4.3.4.

La viscosité de la formulation peut être estimée par la loi empirique d'Arrhénius donnant la viscosité d'un mélange ( $\eta_m$ ) en fonction de la viscosité de ses constituants ( $\eta_i$ ) et de leur fraction

molaire ( $x_i$ ) :

$$\log(\eta_m) = \sum_{i=1}^n x_i \log(\eta_i) \quad (4.1)$$

L'évolution de la viscosité de deux formulations, calculée à partir de la loi d'Arrhénius, en fonction du volume d'acétonitrile ajouté, est montrée sur la figure 4.26. La viscosité de la formulation du polymère non imprimé sans solvant du LSABM (composée seulement du MAA, du EGDMA et du photo-initiateur) qui est donnée par la courbe bleue pour  $V_{ACN} = 0 \mu\text{l}$ , vaut 5,9 mPa.s. Pour comparaison, si l'EGDMA est remplacé par le PETA (courbe violette), la viscosité du mélange sans acétonitrile vaut alors 133 mPa.s. La formulation du IS2M qui a été étudiée précédemment a quant à elle une viscosité beaucoup plus élevée et plus proche de celle du PETA ( $\eta_{PETA} = 340 \text{ mPa.s}$ ) car elle ne contient pas de MAA qui diminue celle du mélange (tab 4.10). Il n'est alors pas étonnant de constater une différence si importante entre les durées d'inhibition mesurées pour ces deux formulations confirmant le rôle important de la diffusion du dioxygène sur le déclenchement de la photopolymérisation.

Elle peut également expliquer les différentes valeurs de durée d'inhibition mesurées pour les trois plots qui ont été synthétisés successivement et avec un même ordre de grandeur pour la valeur de l'éclairement. La formation du polymère, dans le cas du plot n°3, a démarré pour une durée d'irradiation d'environ 30 secondes qui est donc plus courte que celle du premier plot synthétisé. Cela peut s'expliquer par le fait que le dioxygène présent dans la solution, à "longue" distance de la zone irradiée aurait été consommé par la synthèse des deux premiers plots. Le délai entre la fin de la synthèse du plot n°2 et le début de l'irradiation pour la synthèse du plot n°3 n'a duré que quelques minutes ce qui n'aurait pas été suffisant pour le dioxygène se trouvant à "longue" distance de diffuser à nouveau vers la zone irradiée. La concentration en inhibiteurs n'aurait donc pas le temps de se rétablir à sa valeur initiale entre la synthèse successive de deux plots. Ce point sera discuté avec une approche plus quantitative dans la section 4.3.4.

Les résultats présentés jusqu'ici ont montré qu'il est possible de synthétiser, sur un film d'or, des plots de polymère avec une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètres et pour deux agents réticulants différents : le PETA et l'EGDMA grâce à la photopolymérisation déclenchée par le plasmon. Néanmoins, la viscosité de la formulation de photopolymérisation semble avoir une incidence importante sur le processus de formation du plot. Dans la recette du LSABM, l'acétonitrile, en tant que solvant organique, est utilisé d'une part pour solubiliser le sel métallique contenant les ions empreinte et d'autre part pour augmenter la porosité du polymère afin d'augmenter la capacité de ce dernier à capturer les ions cibles. Or, d'après la figure 4.26, la viscosité de la formulation dépend fortement de la quantité d'acétonitrile ajoutée. Pour exemple, la quantité d'acétonitrile dans la recette initiale du LSABM varie de 1 ml à 3 ml pour la synthèse respective d'un IIP de cuivre et d'un IIP de zinc. Ainsi, la viscosité des formulations basées sur l'EGDMA et le PETA en tant qu'agent réticulant est divisée par un facteur 6 et 40 respectivement après l'ajout d'1 ml d'acétonitrile.

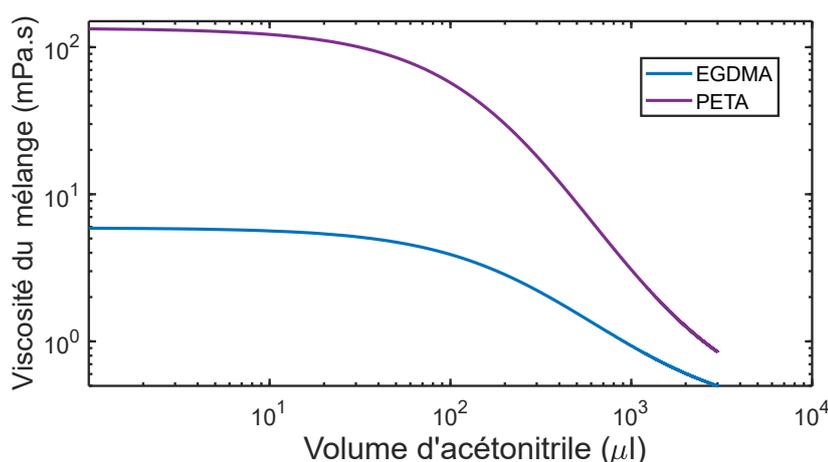


FIGURE 4.26 – Évolution de la viscosité de la formulation de photopolymérisation en fonction du volume d'acétonitrile ajouté. Le modèle proposé par Arrhénius (4.1) a été utilisé pour calculer la viscosité du mélange à partir des viscosités de chacun des réactifs.

La faible viscosité de ces formulations avec l'acétonitrile a mené à des durées d'inhibition si élevées qu'il n'a pas été possible en pratique d'observer la formation d'un polymère avec la valeur maximale de l'éclairement délivrée par le laser. De plus, l'ajout d'acétonitrile dilue la formulation et conduit à une concentration plus faible du photo-initiateur présent dans la solution ce qui a aussi pour effet de retarder le déclenchement de la photopolymérisation. Il a alors été tenté d'augmenter la quantité de photo-initiateur afin de compenser l'effet de dilution et la faible viscosité. L'idée est que pour une valeur de l'éclairement donnée, une augmentation de la concentration en photo-initiateur conduit à un taux de production des radicaux et donc à un taux de consommation du dioxygène plus importants. La quantité de photo-initiateur (PI) dans la formulation à base d'EGDMA a donc été doublée (concentration de 2X, X étant la concentration dite normale) pour un volume d'acétonitrile de 500  $\mu\text{l}$ . Pour cette quantité de PI, la solution est presque saturée en colorant et il n'est pas envisageable d'augmenter d'avantage la quantité de PI à moins d'éventuellement augmenter le volume en acétonitrile.

Avec cette nouvelle formulation, seuls des plots de polymères non imprimés ont pu être synthétisés mais il n'a pas été évident d'obtenir des résultats reproductibles à cause de l'inhomogénéité du dépôt de la solution à la surface d'or probablement dû au fait que la concentration en PI est proche de sa solubilité dans le mélange. De plus, il n'a pas été possible de synthétiser des plots de IIP à partir de cette formulation pour une raison qui n'a pas été clairement identifiée. Cependant, il était notable qu'après l'ajout du PI dans la formulation de IIP, l'homogénéité de la solution se dégradait et ce même si le PI n'était pas en excès. Ainsi, il a vraiment été difficile d'obtenir un dépôt homogène de cette formulation de IIP sur la surface d'or. A posteriori, l'origine de l'inhomogénéité du dépôt a été identifiée comme un phénomène de précipitation du bleu de méthylène, dans une moindre mesure, lorsque la formulation est déposée sur la surface puis, de façon plus flagrante, lorsqu'elle

est étalée par la lamelle de microscope. Il semblerait que cette formulation peu visqueuse s'étale trop rapidement pour que le colorant reste solidaire du reste du mélange. Cela a pour effet de sur-concentrer le PI au niveau des lignes de dépôt et de le sous-concentrer au niveau de la zone à irradier pour déclencher la photopolymérisation (fig 4.27.a). Ce phénomène n'avait pas été observé dans le cas de la formulation sans ACN car la viscosité du mélange était alors suffisamment élevée pour que ce dernier reste homogène lors de la phase d'étalement.

Ce protocole de dépôt a par la suite été amélioré en passant d'un dépôt en lignes à un dépôt en goutte pour un volume total identique (fig 4.27.b). Un dépôt complètement homogène a été obtenu pour une concentration du PI allant jusqu'à 1,5X; au-delà, le dépôt n'est plus homogène.

4

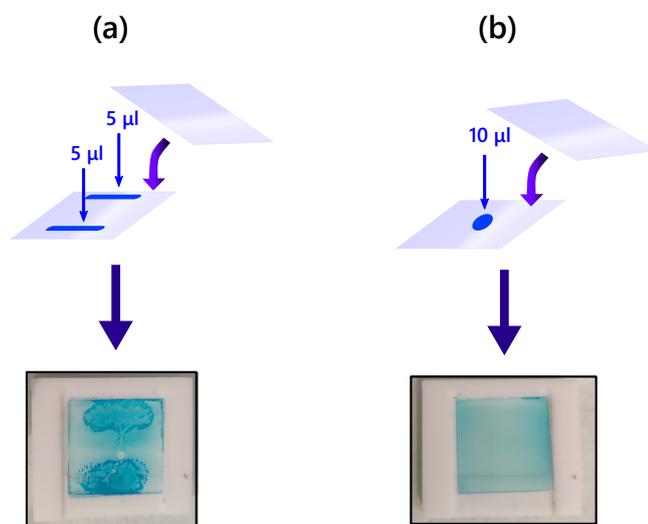


FIGURE 4.27 – Schéma représentant la méthode de dépôt en lignes (a) ou au centre (b) de la formulation de photopolymérisation sur une lamelle de microscope pour une concentration en PI de 1,5X.

En regard de ces précédents résultats, afin de réussir à synthétiser des plots de IIP de zinc et de pouvoir faire des tests de détection, l'EGDMA présent dans la recette initiale du LSABM a été remplacé par le PETA en tant qu'agent réticulant, ce qui permet d'augmenter grandement la viscosité de la formulation et donc de favoriser la photopolymérisation. Un volume de 500  $\mu\text{l}$  d'acétonitrile a été utilisé pour solubiliser de façon efficace le sel métallique de zinc tout en conservant une viscosité suffisamment élevée. Pour les expériences de détection, il est souhaitable de synthétiser les plots sous la forme d'une matrice de moins de 1  $\text{cm}^2$ , correspondant à la surface de la cuve de microfluidique de l'instrument MS-SPRi (fig 3.14). Un masque composé d'une ligne de 5 ouvertures circulaires, ayant chacune un diamètre de 800  $\mu\text{m}$ , a été inséré sur le trajet optique de la lumière incidente, au niveau de la face d'entrée du prisme. La concentration du photo-initiateur pour cette formulation est de 2X. Comme dans les expériences précédentes, le dépôt de la formulation du NIP sur la surface d'or est homogène mais ce n'est pas le cas pour la formulation du IIP dont la photopolymérisation a donné des plots fragmentés visibles sur la figure 4.28.a. La biopuce conçue est composée de 3 lignes de 5 plots de IIP de zinc et d'une ligne de plots de NIP. Ces derniers sont com-

plètement homogènes. L'échelle de calibration donnant l'épaisseur des plots a été estimée par la mesure de la position spectrale de la résonance plasmon et en prenant un indice de réfraction pour le polymère de 1,52. La valeur de cet indice a été choisi en prenant en compte les valeurs reportées dans le tableau 4.24.

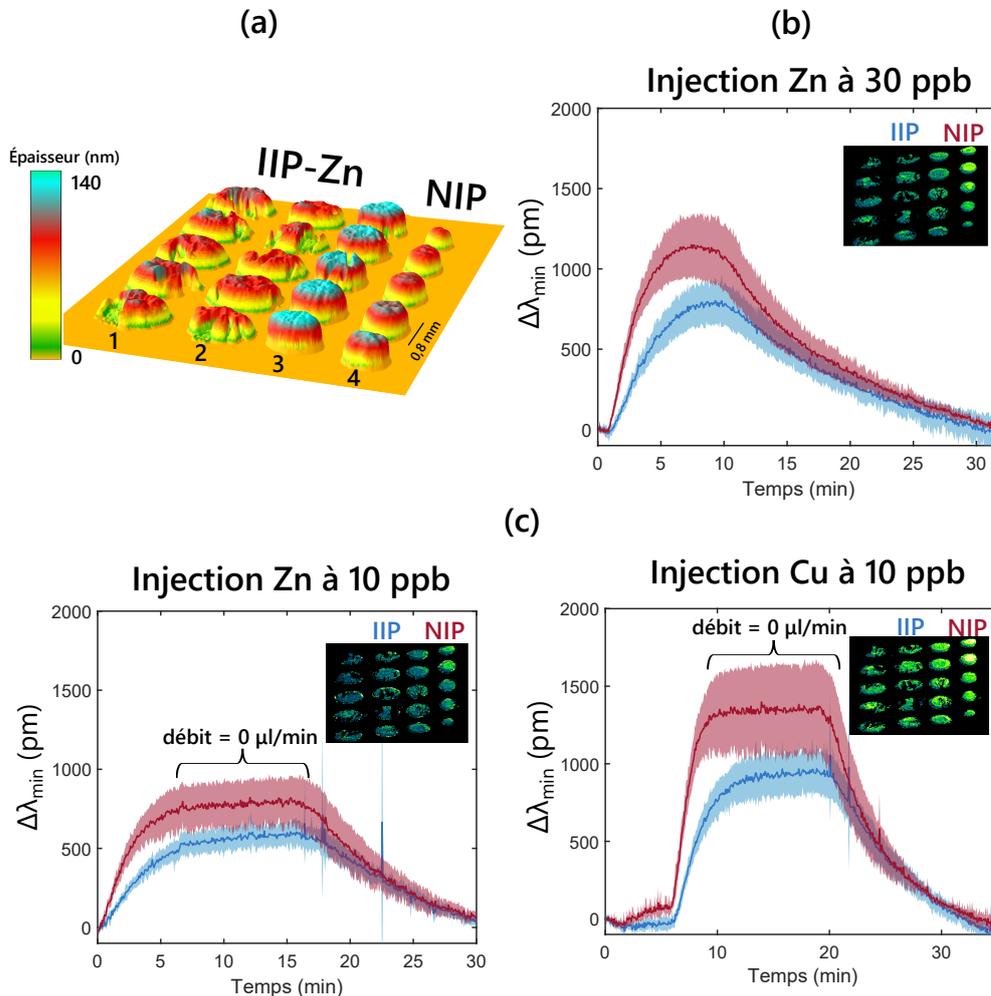


FIGURE 4.28 – **a.** Vision 3D de la surface d'or structurée par des plots de polymères de différentes épaisseurs et différents diamètres. **b.** Variation de la position spectrale de la résonance plasmon mesurée à l'aide de l'instrument MS-SPRi pour une injection d'une solution de zinc concentrée à 30 ppb et pour un débit constant de 70  $\mu\text{l}/\text{min}$  sur des plots de IIP de zinc (en bleu) et de NIP (en rouge). **c.** Le cas d'injections de solution d'ions zinc et cuivre concentrées à 10 ppb pour lequel la pompe péristaltique a été coupée pendant environ 10 minutes. Les vignettes inscrites montrent l'amplitude de  $\Delta\lambda_{min}$  extraite sur chaque pixel de l'image de la biopuce à la fin de la période de capture des ions par les plots de polymère.

Malgré l'inhomogénéité des plots de IIP, les performances de détection de cette biopuce ont été testées avec des solutions d'ions cuivre et zinc à différentes concentrations (fig 4.28 et fig 4.29).

Initialement, l'instrument MS-SPRi utilisé pour ces expériences de détection, a été réglé afin que le peigne de longueurs d'onde de la source multi-spectrale soit centré sur la résonance plasmon qui se produit au niveau de la surface structurée par les plots de polymère. Ces derniers étant relativement épais, il n'a pas été possible de trouver un réglage pour lequel la résonance plasmon peut être observée simultanément sur la surface d'or et sur les plots de polymère. Le peigne de 7 longueurs

d'onde n'étant pas suffisamment large vis-à-vis de l'étendue de distribution spatiale de la position spectrale de la résonance plasmon à la surface de la biopuce. Les cinétiques ont été mesurées, pour chacune des injections, sur une dizaine de ROIs de 30x30 pixels réparties sur les zones homogènes des plots de IIPs et sur 5 ROIs de 30x30 placées au centre des plots de NIP. La valeur moyenne de ces cinétiques est représentée en trait plein et les dispersions des réponses extraites sur les différentes ROIs sont indiquées par les bandes en couleur plus claire.

Lors d'une première expérience, deux solutions d'ions zinc à des concentrations de 10 et 30 ppb et une solution d'ions cuivre à une concentration de 10 ppb ont été préparées par dilutions successives à partir de deux solutions mères à une concentration de 1000 ppm, avec de l'eau ultra-pure. Le pH des solutions finales est donné par le  $\text{pH} \approx 5,6$  de l'eau ultra-pure qui s'est acidifiée naturellement par l'absorption d'une partie du  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère. Le buffer qui circule en continu à la surface de la biopuce est également de l'eau Ultra-pure. Sauf mention contraire, pour ces expériences, le débit du buffer est de  $70 \mu\text{l}/\text{min}$ .

Tout d'abord, deux cinétiques de détection d'ions zinc dans une solution concentrée à 30 ppb sont présentées sur la figure 4.28.b. L'amplitude de la variation de la position spectrale de la résonance plasmon est de l'ordre du nanomètre ce qui montre une sensibilité proche de celle recherchée pour le projet SURIMI. Elle est du même ordre de grandeur pour les plots de IIPs et les plots de NIP. Il n'y a pas de différence significative lors de la capture des ions par les plots de polymère de natures différentes. Ce résultat est cohérent avec ce qui a été observé par le LSABM lors de l'étude de la spécificité et de la sélectivité des IIPs et des NIPs conditionnés en cartouches. Tous les deux capturent efficacement les ions cibles. C'est sur l'étape d'élimination des ions par percolation d'une solution acide que la spécificité des IIPs se manifeste (section 4.1.2). La durée de capture est légèrement inférieure à 10 minutes et  $\Delta\lambda_{min}$  atteint une valeur maximale avant le retour automatique de la circulation du buffer à la surface de la biopuce à partir de la dixième minute. Il s'en suit une période de rinçage qui avait également été observée lors des essais effectués avec les IIP synthétisés par photopolymérisation UV (fig 4.16). Les ions ne sont pas retenus par le polymère et sont libérés dans le buffer malgré son pH relativement élevé.

En outre, l'influence du débit sur la capacité de capture des plots a été brièvement étudiée lors de la détection d'ions cuivre et zinc à des concentrations de l'ordre de 10 ppb. La pompe péristaltique a été coupée pendant environ 10 minutes à partir de l'instant où  $\Delta\lambda_{min}$  a atteint sa valeur maximale. Le but de cette manipulation était de vérifier si la capacité de capture était limitée par le retour trop prompt du buffer à cause du volume fini de la boucle d'injection. Lorsque le régime stationnaire a été atteint et pour un débit nul, les plots de polymères semblent être à l'équilibre chimique avec la solution contenant les ions métalliques. Il n'y a pas de capture supplémentaire. Cela signifie que l'amplitude des signaux est fixée par l'équilibre chimique entre la capture et la libération des ions métalliques; ces derniers n'étant retenus ni par le polymère imprimé ni par le polymère non imprimé. Il est donc légitime de se demander si les cavités spécifiques ont été correctement formées lors de la synthèse en surface des polymères à empreinte ionique. La nature de

l'agent réticulant a peut être un rôle important à jouer dans la formation de ces cavités. En effet, celui qui a été utilisé est le PETA alors que la recette du LSABM a été optimisée en se basant sur l'utilisation de l'EGDMA.

La dispersion de la réponse des plots est en moyenne de l'ordre de 33 % de la variation moyenne de la position spectrale de la résonance. Elle peut s'expliquer par l'inhomogénéité des plots fragmentés et par les différentes épaisseurs des plots. Néanmoins, grâce à la capacité d'imagerie et à la grande dynamique de mesure de l'instrument MS-SPRi, la valeur de  $\Delta\lambda_{min}$  peut être extraite sur chacun des plots. La distribution spatiale des différentes réponses des plots peut être visualisée sur les vignettes incrustées sur les figures 4.28.b et c. Les amplitudes des signaux mesurés sur les plots de NIP comparativement aux plots de IIP sont en moyenne 1,4 fois plus grandes et le temps caractéristique de capture est quant à lui, en moyenne, 1,8 fois plus petit pour les plots de NIP. Les rapports signal à bruit à  $1\sigma$  des signaux mesurés lors de l'injection de la solution de cuivre à 10 ppb sont de 78 et de 56 respectivement pour les plots de NIP et les plots de IIP.

De manière générale, sur l'ensemble des cinétiques de détection mesurées, la spécificité de la capture des ions métalliques par les plots de IIPs en comparaison des plots de NIP n'a pas été observée. Les cinétiques mesurées sur les deux familles de plots ont essentiellement la même forme. Une calibration de la réponse des plots en fonction de la concentration des ions présents en solution n'a donc pas pu être réalisée. Néanmoins, l'amplitude des signaux mesurés pour les concentrations étudiées est sans commune mesure avec les résultats présentés dans la section précédente sur la biopuce structurée par des plots de IIPs de zinc synthétisés par photopolymérisation UV (fig 4.16). La limite de détection de cette nouvelle biopuce est au moins trois ordres de grandeur plus faible que la précédente.

Finalement, la réponse de la biopuce à des espèces interférentes a également été étudiée. Pour cela, une solution de sucrose et une solution d'ADN à des concentrations de 100 ppb ont été préparées. Cette concentration a été choisie suffisamment faible pour provoquer un saut de l'indice de réfraction inférieur à la limite de détection de l'instrument mais suffisamment élevée afin de pouvoir évaluer la spécificité de façon catégorique.

Il est nécessaire de préciser que lors des premiers essais de détection réalisés avec cette biopuce, sa grande sensibilité a permis de mettre en évidence un problème de pollution aux ions métallique de la boucle d'injection. Cette dernière a été entièrement démontée et nettoyée mais elle n'a pas pu être entièrement décontaminée. Avant chaque série d'expériences de détection, une fraction du buffer (eau ultra-pure) en circulation a été prélevée puis injectée à l'aide de la boucle d'injection à la surface de la biopuce. Un signal SPR est alors mesuré avec une amplitude de l'ordre de  $\Delta\lambda_{min} = 400\text{pm}$  et correspond au niveau de pollution présent dans la boucle d'injection. Cependant, l'amplitude du signal mesurée pour ce résidu de pollution est largement inférieure (fig 4.29.a) aux amplitudes mesurées lors des injections de solutions d'ions métalliques à des concentrations de l'ordre du ppb et sera donc négligée dans un premier temps.

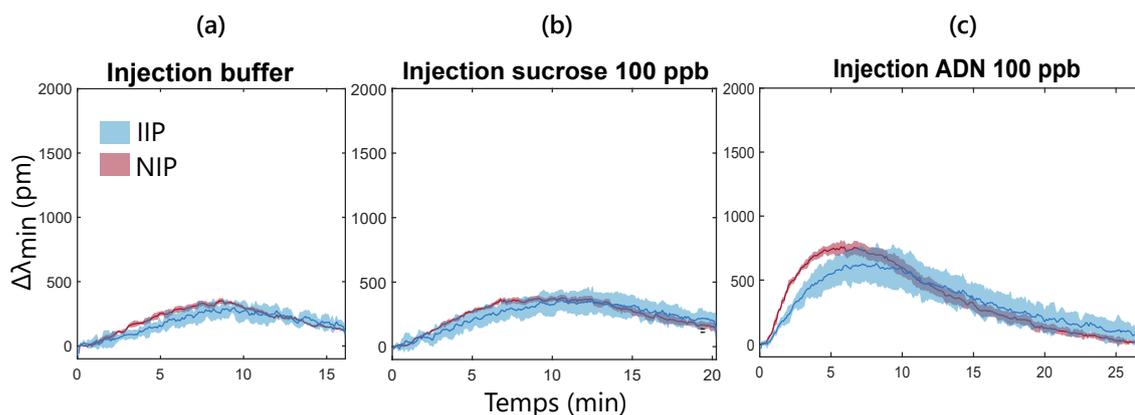


FIGURE 4.29 – Variation de la position spectrale de la résonance plasmon en fonction du temps lors des injections successives du buffer (eau ultra-pure), d'une solution de sucrose et d'une solution d'ADN.

Les amplitudes des variations de la position de la résonance plasmon pour les injections des solutions de sucrose et d'ADN à 100 ppb sont inférieures au nanomètre et témoignent en partie du niveau de pollution résiduel de la boucle d'injection. Pour comparaison, les amplitudes mesurées pour l'injection de l'ADN à 100 ppb sont très proches de celles mesurées après l'injection d'une solution d'ions zinc à 10 ppb, soit 10 fois moins concentrée. Par ailleurs, les temps de capture et de rinçage, qui sont par nature très sensibles à la concentration, sont également équivalents. Ces résultats montrent que les plots de polymère ne sont pas sensibles à des molécules organiques comme le sucrose et l'ADN.

Pour conclure, malgré les formes des plots fragmentés de IIP, les ions cuivre et zinc ont été détectés jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10 ppb avec un rapport signal à bruit supérieur à 50 témoignant de la grande sensibilité de cette biopuce couplée avec l'instrument MS-SPRi. Pour rappel, la limite de détection visée par le projet SURIMI est de l'ordre de 0,1 ppb. La spécificité de la détection des ions métalliques vis-à-vis de molécules organiques a également été démontrée.

Cependant, la spécificité des polymères à empreinte ioniques par rapport aux polymères non imprimés, synthétisés en surface, sous la forme de films minces d'épaisseurs nanométriques, n'a pas été observée. Par ailleurs, elle a pour le moment été observée et quantifiée par le LSABM pour des polymères synthétisés en volume. La géométrie et la forme du IIP ont peut être leur importance. De plus, la nature de l'agent réticulant utilisé est potentiellement critique pour obtenir la spécificité recherchée et il est maintenant nécessaire d'adapter la méthode de nanostructuration de la surface d'or pour la recette optimisée du LSABM utilisant l'EGDMA en tant qu'agent réticulant.

Afin de parvenir à maîtriser la synthèse des IIPs et des NIPs à partir de l'EGDMA et en présence d'acétonitrile, une étude du processus de formation du polymère a été entreprise et quelques résultats préliminaires sont présentés dans la section suivante.

#### 4.3.4. ÉTUDE DU PROCESSUS DE PHOTOPOLYMÉRISATION DÉCLENCHÉE PAR LE PLASMON

Dans cette étude, le montage utilisé pour le suivi en temps réel de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon a été amélioré afin de diminuer considérablement le bruit en réflectivité introduit sur les images de la surface d'or à cause du speckle (fig 4.30). L'idée est de découpler la source lumineuse qui sert à déclencher la polymérisation de celle qui permet son suivi en temps réel par SPRI. Ainsi, un coupleur de fibres (TT400T2S2B, Thorlabs) 90 :10 a été ajouté en amont de la fibre principale afin de récolter la lumière émise par le laser He-Ne dans la fibre d'entrée bleue et celle d'une LED avec une longueur d'onde d'émission de 610 nm dans la fibre d'entrée blanche. La lumière en sortie de la fibre blanche est composée à 90 %, en terme de puissance, de la lumière émise par le laser et à 10 % par celle émise par la LED. Ce coupleur permet de conserver un maximum de puissance laser afin de déclencher la photopolymérisation. Pour compenser la faible puissance de la lumière émise par la LED et après passage par le coupleur, le temps d'exposition a dû être augmenté ce qui limite la résolution temporelle de l'instrument à environ 3,5 secondes.

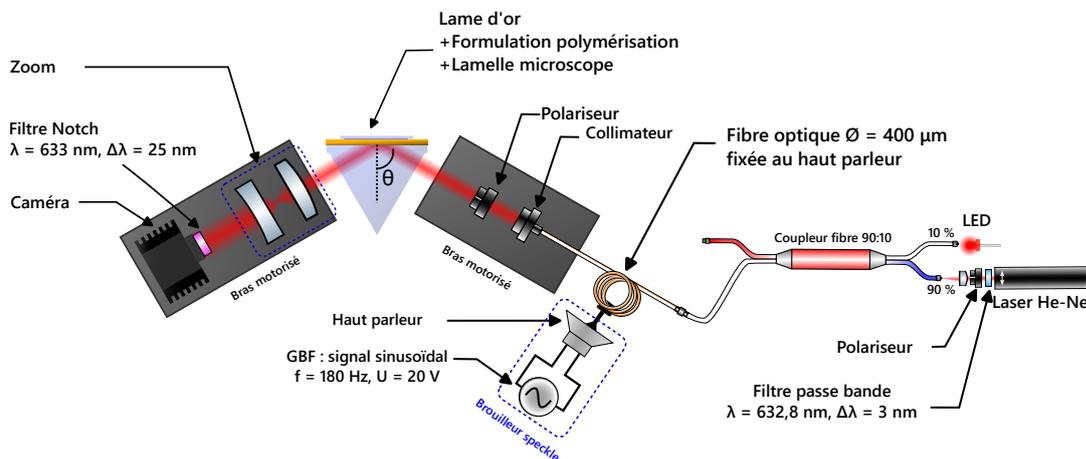


FIGURE 4.30 – Schéma de la vue du dessus de la seconde version du montage optique utilisé pour réaliser la photopolymérisation déclenchée par le plasmon avec le suivi en temps réel en configuration de Kretschmaan. Un coupleur à fibres optiques permet d'injecter, dans une unique fibre, la lumière issue du laser assez puissante pour réaliser la photopolymérisation et la lumière émise par une LED permettant de réaliser la mesure SPRI. Un filtre Notch centré sur 633 nm permet d'absorber la lumière émise par le laser et d'éliminer le speckle sur l'image en réflectivité.

Un filtre passe bande centré sur une longueur d'onde de 632,8 nm pour une largeur spectrale de 3 nm est placé avant à la sortie du laser. Il permet d'épurer le spectre de la lumière émise et d'éliminer des raies qui, malgré leur intensité très faible, produisent un éclairage parasite qui vient perturber la mesure de la réflectivité de la surface d'or par la caméra. La puissance maximale récupérée à la sortie de la fibre principale orange est d'environ 8,5 mW, soit un éclairage d'environ 6,2 mW/cm<sup>2</sup> à la sortie du collimateur. Enfin, la dernière modification correspond à l'ajout d'un filtre Notch (NF633-25, Thorlabs) centré sur une longueur d'onde de 633 nm pour une largeur spectrale de 25 nm et qui permet de couper la lumière émise par le laser avant qu'elle ne soit collectée par le capteur de la caméra. De ce fait, l'image en réflectivité de la surface d'or mesurée à la

longueur d'onde de la LED n'est pas dégradée par le speckle produit par la lumière laser. La qualité de l'image et le rapport signal à bruit sur la variation de la réflectivité en cours du temps sont ainsi grandement améliorés. Finalement, l'angle d'incidence est ajusté au début de chaque essai pour que le plasmon de surface soit excité de façon résonante à la longueur d'onde du laser He-Ne et la cinétique de formation du polymère est mesurée à la longueur d'onde de la LED.

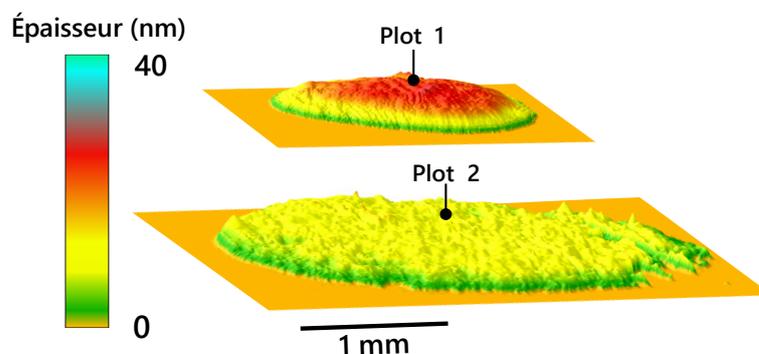


FIGURE 4.31 – Image des plots extraite à partir de mesures réalisées en imagerie SPR multi-spectrale. La calibration de l'épaisseur des plots a été réalisée en supposant que l'indice de réfraction vaut 1,495 (fig 4.19).

Pour illustrer les capacités de ce nouveau banc optique dans l'étude des phénomènes de photopolymérisation, une formulation de NIP avec l'EGDMA comme agent réticulant, pour un volume d'acétonitrile de  $500 \mu\text{l}$  et une concentration du photo-initiateur de  $1,5X$  a été préparée. Le protocole de dépôt décrit sur la figure 4.27.b a été suivi afin d'obtenir un dépôt homogène et reproductible de la formulation de photopolymérisation sur la surface d'or. Dans la suite, les résultats concernant la synthèse de deux plots de NIP vont être étudiés. À noter que les plots n°1 et n°2 ont été synthétisés successivement à partir du même dépôt de la formulation de photopolymérisation.

Tout d'abord, les profils de ces plots sont montrés sur la figure 4.31. Leur épaisseur a été estimée en comparant la position spectrale de la résonance plasmon mesurée avec celle simulée pour un indice de réfraction de 1,495 déterminé précédemment (fig 4.19). Il apparaît que l'épaisseur de ces deux plots varie entre 15 nm et 40 nm ce qui correspond aux plots les plus fins obtenus dans ces travaux de thèse par la méthode de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon.

Les cinétiques de croissance verticale des polymères, mesurés sur une ROI situé au centre des plots, sont visibles sur la Fig 4.32.a. L'irradiation du plot n°1 a été coupée après environ 40 minutes, ce qui correspond à une variation de réflectivité maximale d'environ  $\Delta R_{max} = 0,2$ . Alors que pour le second plot, l'irradiation a été coupée au bout de 10 minutes ( $\Delta R = 0,15$ ). Il a été observé que la variation de la réflectivité reflétant la croissance du polymère n'évolue plus lorsque l'illumination laser est arrêtée. Cela démontre la possibilité de contrôler l'épaisseur des plots en chronométrant la durée d'illumination. Un temps d'inhibition beaucoup plus court pour le second plot ( $t_{inhib} = 3 \text{ min}$ ) que pour le premier ( $t_{inhib} = 13 \text{ min}$ ) est observé. Entre la synthèse de ces deux plots, il s'est écoulé quelques minutes pendant lesquelles l'échantillon a été déplacé afin d'irradier une zone

proche de la première, sans retirer la lamelle de microscope qui recouvre la formulation. Il sera expliqué dans la suite qu'une partie du dioxygène présent dans la solution étant déjà consommé, cela permet un démarrage plus rapide de la seconde polymérisation.

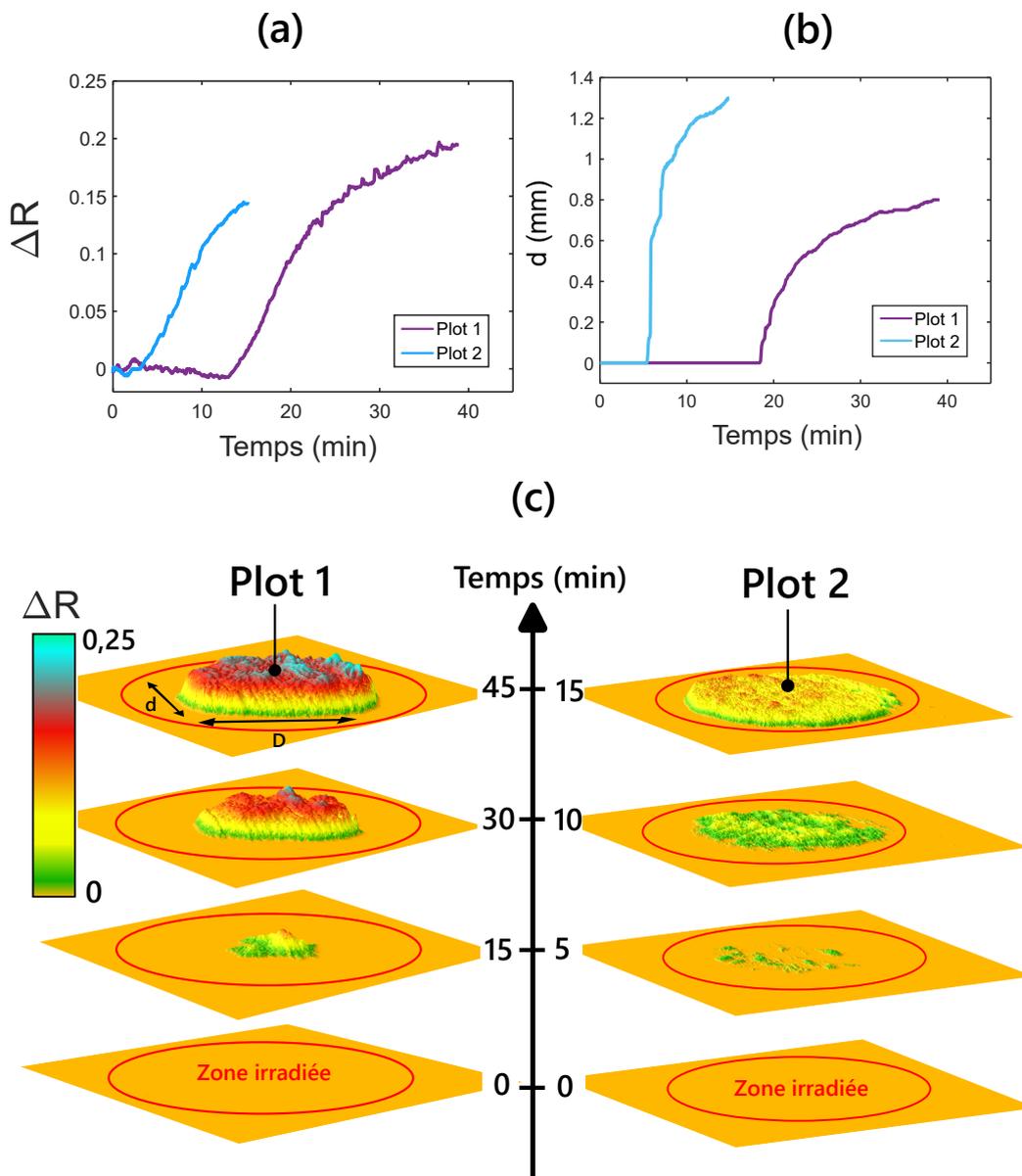


FIGURE 4.32 – **a.** Variation de la réflectivité en fonction du temps lors de la formation des plots de NIP. **b.** Variation du petit diamètre des plots en fonction du temps. **c.** Images SPRi prises à différents instants lors de la formation du plot n°1 et du plot n°2. Les plots ont une forme finale ovale à cause de la projection du faisceau lumineux incident sur la surface d'or pour un angle d'incidence non nul. Le petit et le grand diamètre sont notés  $d$  et  $D$  respectivement.

Grâce à ce nouveau montage, il est également possible de suivre la croissance latérale du polymère (fig 4.32.b). Comme le faisceau lumineux incident arrive avec un angle d'incidence de l'ordre de  $60^\circ$ , la zone irradiée sur la surface d'or est étirée dans une direction et prend la forme d'une ellipse avec un petit et un grand diamètre notés respectivement  $d$  et  $D$  (fig 4.32.c). Le petit diamètre est

mesuré selon la direction perpendiculaire au plan d'incidence et il est du même ordre de grandeur que le diamètre du diaphragme. L'évolution de  $d$  en fonction du temps montre une croissance du plot depuis le centre vers l'extérieur de la zone irradiée. En revanche, le diamètre du plot n°2, qui est relativement grand dès le déclenchement de la polymérisation n'augmente que très peu au cours du temps. Ces différences de comportement se retrouvent sur les images SPR mesurées à différents instants de la photopolymérisation (fig 4.32.c). Une dernière observation très importante concerne la croissance du polymère qui s'arrête instantanément, relativement à la résolution temporelle de l'instrument, lorsque le laser He-Ne est coupé.

## 4

Ces observations font échos aux résultats décrits dans l'article de DEEB et al., 2011, sur l'étude de l'influence de la diffusion sur la croissance d'un polymère synthétisé grâce au plasmon de surface localisé dans des NPs d'argent. Le photo-initiateur utilisé est l'eosine Y qui fonctionne, comme le bleu de méthylène, en synergie avec le MDEA. Dans cet article, les auteurs ont observé que l'épaisseur du polymère est plus importante pour une faible intensité et une longue durée d'irradiation. Ils expliquent que ces conditions sont favorables aux processus de régénération et de diffusion de l'eosine Y dans le volume nanométrique irradié par le plasmon de surface localisé. Ces deux processus permettent d'entretenir la génération de radicaux ce qui a pour effet de consommer efficacement le dioxygène au voisinage de la surface des NPs et de limiter l'inhibition de la réaction. Il faut noter que la croissance du polymère est surveillée par spectroscopie FTIR et par mesure AFM avec un suivi en temps réel limité. Il est donc intéressant de souligner que le montage optique pour le suivi en temps réel de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon (fig 4.30) permet d'accéder à de nouvelles informations sur la formation du film de polymère.

Les observations expérimentales présentées ci-dessus vont être dans un premier temps interprétée qualitativement puis un premier modèle simple du processus de croissance du polymère par PTP va être discuté.

En premier lieu, la différence dans les durées d'inhibitions lors de la synthèse des plots n°1 et n°2 peut s'expliquer par une certaine inertie de la régénération du dioxygène dans la solution de photopolymérisation. La durée d'inhibition dépend de la concentration en inhibiteurs présents en solution et de la puissance lumineuse. La diffusion du dioxygène depuis la solution vers la zone irradiée a donc une grande influence sur le déclenchement de la polymérisation. La formulation étudiée ici, pour un volume de 500  $\mu\text{l}$  d'acétonitrile, a une viscosité proche de 1,5 mPa.s (fig 4.26) qui est environ 200 fois plus faible que celle de la formulation à base de PETA qui a été utilisée comme preuve de principe (fig 4.23.a). Ainsi, dans la formulation de NIP avec solvant, la diffusion du dioxygène est favorisée par la faible viscosité. Durant les 15 premières minutes d'irradiation pour le plot n°1, le dioxygène diffuse de la solution vers la zone irradiée inhibant la réaction tout en étant consommé. Une zone de déplétion du dioxygène, avec pour épicycle la zone irradiée, s'étend au cours du temps dans la solution. Lorsque la concentration en dioxygène passe en dessous du seuil donné par la concentration des radicaux générés à un éclaircissement donné, la polymérisation démarre. Tout au long de cette dernière, le dioxygène continue d'être consommé. Ainsi, à la fin de la

synthèse du plot n°1, la concentration en inhibiteurs proche de la zone irradiée est très faible de sorte que lorsque une deuxième zone proche de la celle-ci est irradiée quelques minutes après, la croissance du polymère démarre rapidement. Autrement dit, lors de la synthèse du plot n°1, le dioxygène présent en solution a été largement consommé de part le long temps d'irradiation et la faible viscosité qui a favorisé sa diffusion vers la zone irradiée. Cette hypothèse permet d'expliquer la décroissance de la durée d'inhibition pour des plots synthétisés successivement à quelques minutes d'intervalles dans une formulation peu visqueuse. En revanche, dans le cas d'une formulation avec une viscosité très élevée, la diffusion du dioxygène peut être négligée et la durée d'inhibition ne dépend donc que de la quantité d'inhibiteurs présents localement dans la zone irradiée (fig 4.23.a).

Aux premiers abords, il paraît très étonnant que la photopolymérisation puisse se déclencher plusieurs dizaines de minutes après le début de l'irradiation. À première vue, lors de cette phase d'inhibition, le photo-initiateur est dépensé pour produire des radicaux libres qui sont tout de suite consommés par le dioxygène. Pour que la photopolymérisation démarre, il faut donc que la quantité en photo-initiateur dans la zone irradiée soit plus grande que celle du dioxygène dissout en solution dont la concentration est comprise entre  $1.10^{-3}$  à  $1.10^{-2}$  mol/l [SATO et al., 2014]. Or, si c'est le cas pour le MDEA présent à une concentration d'environ  $4.10^{-1}$  mol/l, cela ne l'est pas pour le bleu de méthylène dont la concentration est de  $4.10^{-3}$  mol/l. Cette contradiction peut être expliquée par les processus de diffusion et de régénération du colorant qui semblent être déterminants dans le cas de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon [DEEB et al., 2011]. Ces deux processus, permettant de renouveler le colorant dans le volume irradié, sont plus efficaces que celui de photoblanchiment du colorant avec lequel ils entrent en compétition durant la phase d'inhibition par le dioxygène. Le mécanisme de régénération du colorant est traité de façon détaillée dans un article de AVENS et BOWMAN, 2009.

En outre, l'extension verticale et latérale du plot de polymère dépendent également de la diffusion du dioxygène relativement à la puissance d'irradiation, mais dans des proportions différentes. Verticalement, le profil de l'éclairement suit une loi de décroissance exponentielle caractéristique du plasmon de surface. Le taux de production des radicaux est donc plus important au niveau de la surface et puis décroît rapidement sur quelques centaines de nanomètres. Lorsque l'éclairement n'est plus suffisant, le taux de production de radicaux devient inférieur au taux de consommation par le dioxygène et la réaction s'arrête. Ainsi, pour synthétiser des plots plus épais à partir de la formulation de NIP étudiée ici, il est nécessaire d'augmenter la puissance d'irradiation.

En ce qui concerne l'évolution du diamètre du plot, la grande différence de la cinétique du plot n°2 par rapport aux plots n°1 peut également être expliquée par un effet très marqué de la diffusion du dioxygène. En effet, il est supposé que le plot n°2 a été synthétisé dans une zone déplétée en inhibiteur menant à une durée d'inhibition plus courte mais également à une croissance verticale plus homogène dans la zone irradiée (fig 4.32.c). Afin de confirmer cette hypothèse, il reste à réaliser plusieurs essais de déplétion avec des temps d'irradiation croissants.

Les observations précédentes ont conduit à proposer un modèle de la croissance du film de polymère prenant en compte le phénomène de diffusion du dioxygène et sa consommation par la réaction de photopolymérisation. L'objectif ici est de disposer d'un modèle numérique simple, capable de reproduire les cinétiques de croissance mesurées expérimentalement. À terme, cela permettra d'optimiser plus efficacement ces processus de photopolymérisation. Dans ce travail préliminaire, un simple modèle de diffusion en deux dimensions est utilisé. En effet, la longueur caractéristique verticale est fixée par l'épaisseur de liquide de quelques microns entre le substrat et la lamelle. Ceci est à comparer au diamètre typique de la zone éclairée qui est de 1 mm. Il est supposé que la consommation du dioxygène par la réaction suit une cinétique d'ordre 1 dont la constante de cinétique est fixée par le taux de production des radicaux qui est lié à la puissance d'irradiation.

L'équation de diffusion du dioxygène peut être déduite de la loi de Fick en notant  $D$  le coefficient de diffusion du dioxygène et  $C_{O_2}(\mathbf{r}, t)$  sa concentration à la position  $\mathbf{r}$  et à l'instant  $t$ . Le taux de production des radicaux dans la zone irradiée étant noté  $k$ , l'équation qui régit la distribution de dioxygène dans la zone irradiée est :

$$\frac{\partial C_{O_2}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D\Delta C_{O_2}(\mathbf{r}, t) - kC_{O_2}(\mathbf{r}, t) \quad (4.2)$$

Dans le reste de la formulation, il est supposé qu'il n'y a aucun radical. Cela est justifié par l'observation expérimentale suivante : la croissance verticale ou horizontale du polymère s'arrête instantanément lorsque le laser He-Ne est éteint. Ainsi, les radicaux, de part leur très forte réactivité, sont consommés immédiatement et n'ont donc pas le temps de diffuser. Cela conduit à une équation de la distribution d'oxygène donnée par :

$$\frac{\partial C_{O_2}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D\Delta C_{O_2}(\mathbf{r}, t) \quad (4.3)$$

Cette équation peut être résolue numériquement pour obtenir l'évolution de la distribution spatiale de la concentration de dioxygène en fonction du temps. Il faut pour cela fixer les valeurs des différents paramètres qui entrent en jeu. La valeur du coefficient de diffusion pour la formulation contenant 500  $\mu\text{l}$  d'acétonitrile (noté  $D$ ) a été estimée à partir de celle dans l'eau (noté  $D_{H_2O}$ ) et de la loi de Stoke-Einstein qui stipule que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la viscosité. Soit  $D_{H_2O} = 2.10^{-3} \text{ mm}^2.\text{s}^{-1}$  [XING et al., 2014] et  $\eta_{H_2O} = 1 \text{ mPa.s}$  pour l'eau et  $\eta_f = 1,5 \text{ mPa.s}$  pour la formulation (fig 4.26), alors :

$$D = \frac{\eta_{H_2O}}{\eta_f} . D_{H_2O} \quad (4.4)$$

Il vient que  $D = 1,3.10^{-3} \text{ mm}^2.\text{s}^{-1}$ .

La concentration initiale de dioxygène dissout en solution est normalisée et le taux de production des radicaux a été déterminé par un ajustement des courbes de croissance du plot de polymère (fig 4.34.a) et vaut  $k = 1.10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Un exemple d'évolution du profil  $C_{O_2}(\mathbf{r}, t)$  est présentée sur la figure 4.33 pour un pas temporel de 3 minutes sur une durée totale de la réaction de 40 minutes. Après le début de l'irradiation, la concentration en dioxygène diminue rapidement pour tendre vers une valeur minimum au centre de la zone irradiée. Afin de modéliser le déclenchement et ensuite la croissance du plot de polymère, un critère a été fixé sur la concentration seuil de dioxygène à partir de laquelle la réaction démarre. Au-delà de cette valeur seuil, les radicaux générés ne sont plus totalement consommés par le dioxygène et peuvent déclencher la polymérisation. Elle est représentée par la droite en pointillé rouge sur la figure 4.33.

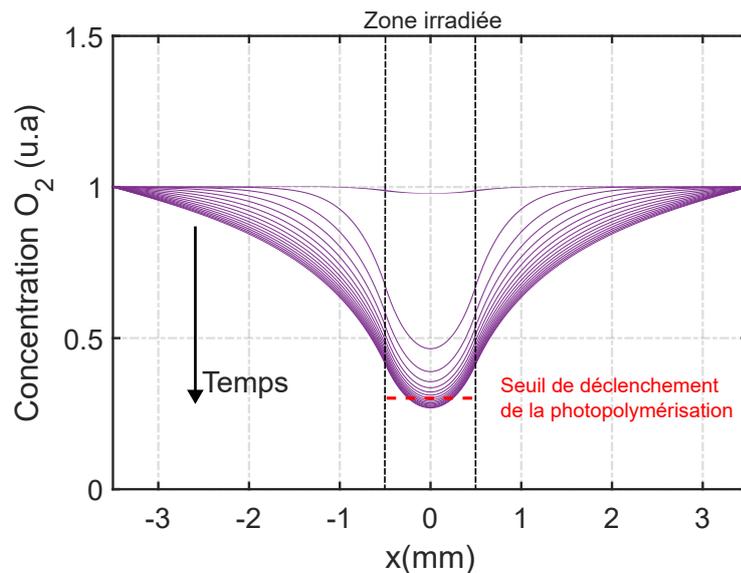


FIGURE 4.33 – Simulation de l'évolution du profil de la concentration du dioxygène dans la formulation de photopolymérisation suivant une direction latérale. Les paramètres utilisés pour cette simulation sont  $D_{O_2} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k = 1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La zone irradiée, de diamètre 1 mm, est matérialisée par les droites en pointillés noires et la concentration seuil, fixée à 0,3, est représentée par la droite en pointillé rouge. Le pas de temps entre chaque courbe est de 3 minutes pour une durée totale de photopolymérisation de 40 minutes.

Pour valider ce modèle, la cinétique de croissance latérale du plot n°1, mesurée par SPR dans l'expérience décrite plus haut, a été ajustée en utilisant le taux de production des radicaux  $k$  et le seuil de dioxygène comme paramètres libres. La valeur du petit diamètre  $d$  est normalisée par la valeur de la largeur à mi-hauteur de la zone éclairée par le laser, notée  $L_e$ . De plus, en utilisant les mêmes valeurs de  $k$  et du seuil déterminées précédemment, il est possible d'ajuster la cinétique du second plot. Celui-ci ayant été synthétisé après le premier plot et donc dans une solution déjà en partie déplétée en dioxygène, ce modèle permet d'estimer que la concentration en dioxygène initiale au niveau de la zone irradiée est alors d'environ 80 %. Cela implique qu'une diminution d'environ 20 % de la concentration de dioxygène dans la solution modifie considérablement la durée d'inhibition et l'extension latérale finale du plot de polymère. La croissance du plot de polymère par cette méthode de synthèse est donc très fortement influencée par la diffusion du dioxygène.

Bien que ce modèle simplifie grandement les phénomènes physico-chimiques mis en jeu, il permet de reproduire de façons satisfaisante ces quelques résultats expérimentaux.

L'influence de la diffusion du dioxygène sur la durée d'inhibition peut également être visualisée sur la figure 4.34.b. L'évolution de cette dernière en fonction du coefficient de diffusion révèle un caractère fortement non-linéaire. Il existe une valeur critique de  $D_{O_2}$  à partir de laquelle la diffusion renouvelle rapidement le dioxygène dans le volume irradié menant à durée d'inhibition qui augmente très rapidement. Dans le cas de la formulation de photopolymérisation du LSABM, la viscosité est telle que la durée d'inhibition dépend fortement de la diffusion ce qui est cohérent avec les observations expérimentales.

4

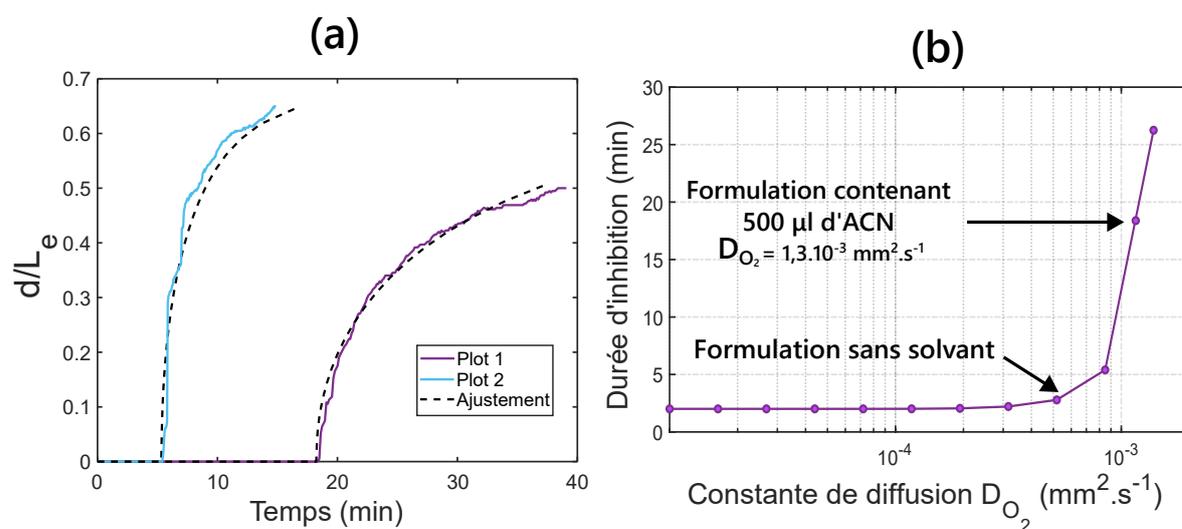


FIGURE 4.34 – **a.** Ajustement par le modèle de l'évolution du petit diamètre du plot normalisé par la largeur à mi-hauteur de l'éclairage noté,  $L_e$ . Les valeurs des paramètres obtenus à l'issue de l'ajustement sont  $D_{O_2} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k = 1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , un seuil de 0,3 et une concentration initiale de dioxygène de 0,78 avant la synthèse du plot n°2. **b.** Simulation de l'évolution de la durée d'inhibition en fonction du coefficient de diffusion du dioxygène dans la formulation de photopolymérisation.

Finalement, cette étude et ce modèle préliminaires conduisent à une meilleure intuition du processus de photopolymérisation déclenchée par le plasmon dans le cas des formulations peu visqueuses. D'autres aspects méritent encore d'être approfondis dans le but d'optimiser la méthode de PTP pour arriver à synthétiser des plots de IIPs à partir de la formulation du LSABM. Par exemple, afin de compléter l'étude expérimentale, il serait intéressant de mesurer les cinétiques de réaction de la formulation à base d'EGDMA mais pour un volume croissant d'acétonitrile afin de sonder la partie non-linéaire de la courbe représentant l'évolution de la durée d'inhibition en fonction de la constante de diffusion. De plus, l'influence de la puissance d'irradiation sur la cinétique de croissance latérale du plot de polymère, pour une formulation donnée, reste à être étudiée. L'ajustement des cinétiques pour une même constante de diffusion et une même valeur seuil mais pour une puissance d'irradiation différente permettrait d'examiner son impact sur la valeur de la constante  $k$ .

En outre, ce premier modèle qui donne des résultats intéressants sur l'évolution du diamètre des plot ne traite pas de la croissance verticale. Cette dernière dépend a priori du profil évanescent de l'intensité du plasmon de surface qui est plus compliqué à modéliser mais qui mérite d'être développé.



# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés pendant cette thèse à caractère multi-disciplinaires ont été menés suivant deux axes principaux : le premier est le développement d'un instrument d'imagerie SPR multi-spectrale appliqué à la détection et le second concerne l'élaboration d'une méthode de nanostructuration d'une surface d'or par des plots de polymères à empreinte ionique afin de fabriquer une biopuce plasmonique spécifique aux ions métalliques. In fine, l'instrument du projet SURIMI se trouve à la confluence de ces deux axes.

Le chapitre 3 de ce manuscrit traite du cheminement suivi lors de la conception et de la validation d'un prototype de cet instrument final. Un montage optique compacte (50x25x20 cm) d'imagerie SPR multi-spectrale a été assemblé. En particulier, pour ce projet, il a été nécessaire de construire une nouvelle source lumineuse multi-spectrale, sans partie mobile, se basant sur l'utilisation de 7 LEDs à 7 longueurs d'onde différentes et d'un bundle de fibres 7 vers 1. Le pilotage de ces LEDs en terme de temps d'exposition, d'intensité lumineuse et de séquence d'allumage est réalisé grâce à une Raspberry Pi 3 commandée par un code écrit en Python en collaboration étroite avec Christophe Hecquet du Laboratoire Charles Fabry. Une interface graphique codée en Labview permet de surveiller en temps réel les interactions qui ont lieu à la surface de la biopuce avec la possibilité de suivre simultanément les cinétiques de capture de différentes espèces cibles par des sondes spécifiques de la biopuce grâce à la capacité d'imagerie. Une caméra compacte et bon marché a été utilisée dans cet instrument. Il a été montré, après un traitement simple appliqué aux images brutes mesurées par la caméra, que le rapport signal à bruit (RSB) sur la mesure des réflectivités des LEDs à la surface de la biopuce est compatible avec la détection SPR et tend vers le RSB uniquement lié au bruit de photons.

Afin que le simple montage optique d'imagerie SPR décrit ci-dessus évolue en un détecteur MS-SPRi capable de suivre la variation de la position spectrale de la résonance plasmon en temps réel, sur chaque pixel de l'image de la biopuce et à partir d'un nombre restreint de mesures de réflectivités à des longueurs d'onde différentes, il a été nécessaire de développer un algorithme adapté. Il consiste à résoudre un problème d'optimisation à partir d'un modèle analytique à 5 paramètres du profil spectral de la résonance plasmon. La résolution pour un pixel donné de l'image de la biopuce passe par l'utilisation de la méthode de Levenberg-Marquardt et elle est généralisée à l'ensemble

de l'image par la vectorisation du problème en passant par l'application du concept de matrices creuses et par une parallélisation des calculs sur les différents coeurs du processeur de l'ordinateur. Les performances de l'instrument MS-SPRi ont d'abord été évaluées à l'aide de simulations qui ont par la suite été validées lors d'expériences réelles de détection SPR. Ainsi, il est possible d'obtenir une image de 400x400 pixels de la zone fonctionnalisée de la biopuce en moins d'une seconde et de mesurer simultanément les cinétiques d'interaction de différentes espèces chimiques avec les sondes spécifiques avec une résolution sur la variation de l'indice de réfraction de l'ordre de  $6.10^{-6}$  RIU.

## 4

Dans le chapitre 4, le développement de la biopuce spécifique aux ions métalliques a été abordé. Une première méthode basée sur la photopolymérisation UV inspirée de deux publications sur les IIPs dans la littérature a été explorée. Bien que très simple à mettre en application, cette méthode a montré une limite rédhibitoire dans le contrôle de l'épaisseur du film de polymère formé à la surface de l'or. L'origine de cette limite a été démontrée provenir de l'inhibition de la réaction de photopolymérisation par le dioxygène dissout en solution. Il a été observé qu'il existe une énergie lumineuse seuil à fournir à la formulation pour déclencher la photopolymérisation qui suit une cinétique de réaction fortement non linéaire menant à des films de polymère trop épais vis-à-vis de l'extension spatiale du plasmon qui est de l'ordre de 200 nm.

Afin de dépasser cette limite, une application innovante de la photopolymérisation déclenchée par le plasmon (PTP) à la nanostructuration de film d'or a été étudiée. Elle est inspirée de plusieurs publications de la littérature concernant la synthèse de films de polymères à la surface de nanoparticules mécaniques mais n'avait jamais été appliquée, jusqu'à ce jour, à la structuration de films métalliques. Une première application a permis de valider cette méthode à partir d'une formulation simple contenant seulement le photo-initiateur et un monomère (PETA). Cependant, son application à la recette du LSABM a révélé la forte influence de la diffusion du dioxygène sur la croissance du polymère. La viscosité relativement faible de cette formulation entrave le processus de formation de plots de polymère afin de structurer la surface d'or. Cependant, en remplaçant l'EGDMA initialement présent dans la recette du LSABM par le PETA, il a été possible de concevoir une biopuce nanostructurée par des plots de IIP de zinc et des plots de NIP à des épaisseurs de l'ordre de 150 nm. Cette biopuce a été utilisée pour réaliser la détection d'ions cuivre et zinc. La grande sensibilité des plots de polymères synthétisés par PTP a permis de détecter les ions métalliques à des concentrations de l'ordre de 10 ppb (environ 500 nM) avec un rapport signal à bruit de 50. La spécificité de ces plots aux ions métalliques a été validée en étudiant leur interaction avec des molécules organiques telles que le sucre et l'ADN à des concentrations de 100 ppb. Cependant, la spécificité des IIPs en comparaison avec les NIPs n'a pas été observée et il n'a donc, pour le moment, pas été possible d'identifier la nature des ions métalliques détectés.

La nanostructuration de la surface d'or par PTP a été menée sur un instrument SPR fonction-

nant en interrogation en réflectivité du Laboratoire Charles Fabry. La capacité d'imagerie en temps réel de cet instrument a permis d'imager *in vivo* et en 3 dimensions, la formation du polymère. Cette nouvelle approche offre la possibilité d'étudier l'influence de paramètres comme la puissance d'irradiation, le coefficient de diffusion du dioxygène, la viscosité de la formulation ou encore la taille de la zone irradiée, sur le profil et l'épaisseur du film de polymère formé. Elle mène à une meilleure compréhension des forces à l'oeuvre dans le processus de synthèse du polymère en surface et peut ainsi permettre une plus grande reproductibilité et efficacité de la nanostructuration de la surface d'or.

Ces nouvelles connaissances permettront éventuellement d'optimiser la méthode de nanostructuration afin de pouvoir synthétiser des plots de IIPs en surface à partir de la recette originelle du LSABM et d'éventuellement observer la spécificité attendue des polymères à empreinte ionique. En effet, il reste encore à comprendre si les problèmes de spécificités des IIPs par rapport aux différents ions et aux NIPs proviennent de la structure des cavités spécifiques, du protocole d'élimination des ions empreinte après la synthèse ou du protocole de rinçage au cours de la détection.

Enfin, une calibration de l'instrument MS-SPRi fonctionnant avec la biopuce spécifique aux ions métalliques devra être réalisée. Dans un second temps, l'instrument sera testé sur des échantillons réels, prélevés sur le terrain et éventuellement dopés par une concentration d'ions métalliques connues. Finalement, l'instrument pourra être marinisé et son déploiement sur le terrain pourra être mis en oeuvre avec une première campagne de mesure aux abords des côtes bretonnes et éventuellement dans des eaux plus profondes des océans coordonnée par l'Ifremer. En parallèle, l'instrument sera d'avantage miniaturisé en collaboration avec la société Klearia afin de pouvoir être facilement transportable par un agent du BRGM pour réaliser des mesures de pollution, sur le terrain, au niveau des nappes phréatiques et des cours d'eau.



**A**

**PROTOCOLE DE SYNTHÈSE D'UNE SAM  
D'ALLYL MERCAPTAN SUR L'OR**

## A

## Matériel

2-Propene-1-thiol (allyl mercaptan) (Sigma Aldrich ref : W203501)

Solvant : Ethanol (Normapur 99 % uniquement!)

## Remarques importantes

- Toujours utiliser de l'eau ultrapure.
- Faire attention avec l'éthanol, il en existe 2 types : de l'éthanol non purifié et de l'éthanol dit "Normapur" qui contient une très faible quantité d'eau. Il est impératif d'utiliser ce dernier pour la fonctionnalisation Cystéamine qui est très sensible à l'eau.
- Pour les différentes phases de rinçage, utiliser des bains plutôt que des rinçages à la pissette qui laisse des traces sur les lamelles.
- Ne jamais sécher les lames d'or nu après un bain dans l'éthanol : même le Normapur laisse des traces de séchage sur l'or. Ne sécher qu'après un bain dans l'eau ultrapure.
- Pour sécher les lamelles aux différentes étapes de la chimie, les poser à la verticale et souffler avec une pissette vide. Ne pas utiliser l'air comprimé qui, souvent, n'est pas suffisamment filtré.
- L'allyl mercaptan a une odeur très forte et désagréable, le manipuler toujours sous la hotte aspirante.
- Le stockage de l'allyl mercaptan se fait en préparant des aliquots d'environ 30  $\mu$ l de volume. Du parafilm est enroulé autour du capuchon de l'aliquot afin d'améliorer l'étanchéité. Les aliquots sont ensuite placés dans un pot de confiture dont l'étanchéité du bouchon a également été améliorée en utilisant du parafilm. Le pot de confiture est stockée au réfrigérateur à 4°C. Le flacon d'origine de l'allyl mercaptan est stocké dans la soute, à l'extérieur du bâtiment.

## Protocole de nettoyage des lames d'or

1. Passer les lamelles au nettoyeur plasma. (O<sub>2</sub>, 0.6 mbar pendant 10 min)
2. Nettoyer chaque bêcher, éprouvette avec de l'eau ultrapure et bien sécher.
3. Préparer la solution de nettoyage : dans une éprouvette, verser 5ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydrogène peroxyde), et 15 ml d'eau ultrapure. Recouvrir les lamelles d'or avec la solution de nettoyage (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /H<sub>2</sub>O) et chauffer à 70°C pendant 10 min (formation de petites bulles).
4. Éteindre le chauffage, attendre 5 min et rincer les lames avec de l'eau ultrapure (bain et non à la pissette!).
5. Rincer les lamelles dans l'éthanol pur (Normapur) : bain de « transition » entre l'eau et l'éthanol qui sera utilisé dans la prochaine étape.

6. Laisser tremper les petites lamelles dans un b cher d'éthanol pur (Normapur) pendant 1h environ pour éliminer les r siduals organiques et éliminer l'activation de la surface par le plasma cleaner.

## Synthèse de la SAM d'allyl mercaptan

1. Prendre le pot de confiture contenant des aliquots contenant environ 30 l d'allyl mercaptan dans le réfrigérateur (4 C).
2. Prelever 7,5  l d'allyl mercaptan.
3. Verser les 7,5  l d'allyl mercaptan dans 30ml d'éthanol (Normapur) dans un falcon neuf (concentration de 2 mM). Mélanger jusqu'à homog nisation de la solution.
4. Prendre un récipient en verre : déposer les 4 lamelles d'or nettoyées (en faisant attention à mettre la face couverte d'or en haut!).
5. Verser la solution d'allyl mercaptan sur les 4 lamelles et fermer hermétiquement le récipient avec du parafilm recouvert de papier aluminium pour éviter l'oxydation des thiols.
6. Laisser les lamelles dans la solution 12h environ.



# B

## PROTOCOLES DE LA PRÉPARATION DES FORMULATIONS DE IIP ET DE NIP

Dans cette annexe, les protocoles de préparation de formulation de IIP et de NIP sont détaillés pour les techniques de photopolymérisation UV et photopolymérisation déclenchée par le plasma. Le premier protocole a été développé par Pengchao Cao doctorant au LSABM et le deuxième protocole a été développé par une collaboration entre le LSABM, le LCF et Olivier Soppera et Amine Khitous du IS2M.

## Photopolymérisation UV

Les étapes à suivre lors de l'élaboration des formulations de IIP et de NIP pour la photopolymérisation UV sont décrites ci-dessous. Pour l'exemple, il a été choisi de décrire le protocole de préparation d'un IIP de cuivre. Pour préparer un IIP différent, il suffit simplement de changer la nature de l'espèce empreinte dans l'étape n°2.

Les quantités de matières des différents réactifs mis en jeu sont données dans le tableau B.1.

| Recette Cu-IIP |  | Purity  | phase  | M(g/mol) | D(g/mL) | mmol | m(mg)  | V(μL)  |
|----------------|--|---------|--------|----------|---------|------|--------|--------|
| Template ion   | Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 99,999% | solid  | 295,6    | -       | 0,5  | 147,8  | -      |
| Monomer        | MAA  | 99,999% | liquid | 86,09    | 1,015   | 2    | 172,2  | 169,6  |
| Cross-linker   | EGDMA  | 99,999% | liquid | 198,22   | 1,051   | 10   | 1982,2 | 1886,0 |
| Initiator      | AIBN   | 98%     | solid  | 164,21   | -       | 0,12 | 20,0   | -      |
| Solvent        | ACN  | -       | -      | -        | -       | -    | -      | 1 mL   |

| Recette Zn-IIP |  | Purity  | phase  | M(g/mol) | D(g/mL) | mmol | m(mg)  | V(μL)  |
|----------------|--|---------|--------|----------|---------|------|--------|--------|
| Template ion   | Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 99,999% | solid  | 297,4    | -       | 0,5  | 148,7  | -      |
| Monomer        | MAA  | 99,999% | liquid | 86,09    | 1,015   | 2    | 172,2  | 169,6  |
| Cross-linker   | EGDMA  | 99,999% | liquid | 198,22   | 1,051   | 10   | 1982,2 | 1886,0 |
| Initiator      | AIBN   | 98%     | solid  | 164,21   | -       | 0,12 | 20,0   | -      |
| Solvent        | ACN  | -       | -      | -        | -       | -    | -      | 3 mL   |

FIGURE B.1 – Tableaux récapitulatifs des quantités de matière mises en jeu pour les formulations de IIP de cuivre et de IIP de zinc dans le cas de la photopolymérisation UV

Procédure à suivre pour préparer les formulations :

1. 15 min avant manipulation : sortir le MAA du réfrigérateur (T = 5°C).
2. Peser l'espèce empreinte Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 147,8 mg dans un flacon en verre de 10 ml avec un bouchon et le protéger de la lumière avec du papier aluminium.
3. Ajouter le solvant ACN 1 mL dans le flacon; agitation 1 - 2 min jusqu'à homogénéisation. Pour la préparation du NIP, dans un autre flacon, ajouter le solvant ACN 1 mL.
4. Ajouter MAA 169,6 μL distillés et aliquotés sous azote dans les flacons IIP et NIP séparément.
5. Agitation magnétique de la formulation avec bouchon fermé (complexation du monomère MAA et des espèces empreintes) pendant 3 jours.
6. A l'issue du temps d'agitation (complexation), ajouter l'agent réticulant EGDMA distillé et aliquoté sous azote 1886,0 μL dans les deux flacons (IIP et NIP); agiter pendant 1 - 2 min

pour l'homogénéisation. (Verser de l'EGDMA dans un flacon ou l'utiliser un petit embout-la pipette P1000 n'entre pas dans un vial).

- Ajouter 20 mg d'initiateur AIBN respectivement dans les deux solutions (IIP et NIP); agiter jusqu'à dissolution complète (2 min).

B

## Photopolymérisation déclenchée par le plasmon (PTP)

Les étapes à suivre lors de l'élaboration des formulations de IIP et de NIP pour la photopolymérisation UV sont décrites ci-dessous. Pour l'exemple, il a été choisi de décrire le protocole de préparation d'un IIP de cuivre. Pour préparer un IIP différent, il suffit simplement de changer la nature de l'espèce empreinte dans l'étape n°2.

Les quantités de matières des différents réactifs mis en jeu sont données dans le tableau B.1.

| Recipe Zn-IIP |   | Purity  | phase  | M(g/mol) | D(g/mL) | mmol   | m(mg)  | V(μL)  |
|---------------|---|---------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|
| Template ion  | Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 99,999% | solid  | 297,4    | -       | 0,5    | 148,7  | -      |
| Monomer       | MAA   | 99,999% | liquid | 86,09    | 1,015   | 2      | 172,2  | 169,6  |
| Cross-linker  | EGDMA   | 99,999% | liquid | 198,22   | 1,051   | 10     | 1982,2 | 1886,0 |
| Initiator PTP | Methylene Blue  |         | solid  | 319,85   |         | 0,0073 | 2,3    |        |
|               | MDEA  |         | liquid | 119,16   | 1,038   | 0,73   | 87,0   | 83,8   |
| Solvent       | ACN   | -       | -      | -        | -       | -      | -      | 3 mL   |

Proportions molaires du photo-initiateur par rapport au nombre de liaisons vinylique impliquées dans le polymérisation :

- C=C/MDEA : 30/1
- MDEA/MB : 100/1

FIGURE B.2 – Tableaux récapitulatifs des quantités de matière mises en jeu pour la formulation de IIP de zinc dans le cas de la PTP.

Procédure à suivre pour préparer les formulations :

- 15 min avant manipulation : sortir le MAA du réfrigérateur (T = 5°C).
- Peser l'espèce empreinte Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 147,8 mg dans un flacon en verre de 10 ml avec un bouchon et le protéger de la lumière avec du papier aluminium.
- Ajouter le solvant ACN 1 ml dans le flacon; agitation 1 - 2 min jusqu'à homogénéisation. Pour la préparation du NIP, dans un autre flacon, ajouter le solvant ACN 1 mL.
- Ajouter MAA 169,6 μl distillés et aliquotés sous azote dans les flacons IIP et NIP séparément.
- Agitation magnétique de la formulation avec bouchon fermé (complexation du monomère MAA et des espèces empreintes) pendant 3 jours.

**B**

6. A l'issue du temps d'agitation (complexation), ajouter l'agent réticulant EGDMA distillé et aliquoté sous azote 1886,0  $\mu\text{l}$  dans les deux flacons (IIP et NIP); agiter pendant 1 - 2 min pour l'homogénéisation. (Verser de l'EGDMA dans un flacon ou l'utiliser un petit embout-la pipette man P1000 n'entre pas dans un vial).
7. Peser 2,3 mg d'initiateur MB (Bleu de méthylène) et l'ajouter respectivement dans les deux solutions (IIP et NIP); ajouter 83,8  $\mu\text{l}$  de MDEA puis agiter jusqu'à dissolution complète du MB. La formulation prend alors une couleur bleu foncée.





**C**

**INTERFACE HUMAIN MACHINE DE  
L'INSTRUMENT MS-SPRI**

L'Interface Humain Machine (IHM) développée pour le pilotage de l'instrument MS-SPRI et la surveillance en temps réel des interactions qui ont lieu à la surface de la biopuce a été codée en Labview. Sur une première interface, dénommée "IHM principale" dans la suite, la variation de la position spectrale de la résonance plasmon peut être suivie en temps réel. Sur une seconde interface, dénommée "IHM secondaire" dans la suite, la variation de l'intensité de chaque LEDs peut être surveillée afin de détecter d'éventuels problèmes de puissance ou de fluctuations de l'intensité de la source lumineuse multi-spectrale. Les différentes fonctionnalités de l'interface sont détaillées dans la suite.

L'IHM est lancée à l'aide du bouton "exécuter" de Labview qui est symbolisé par la petite flèche pointant vers la droite.

Il apparaît une fenêtre demandant s'il est nécessaire de réaliser l'étape d'initialisation pendant laquelle une image de la biopuce, pour une polarisation TE, est enregistrée pour chacune des 7 LEDs. Avant de répondre "Yes", il faut vérifier que le polariseur est réglé sur la polarisation TE (position 0°). Si les images en polarisation TE ont déjà été enregistrées, répondre "Non" et elles seront automatiquement chargées dans Labview depuis le dossier de sauvegarde.

## IHM principale :

### Fenêtres :

1. **Resonance position image** : affiche l'image en  $\lambda_{min}$  extraite à partir des 7 images en réflectivité de la biopuce.
2. **Cinetic lambda min** : affiche  $\lambda_{min}$  ou  $\Delta\lambda_{min}$  en fonction du temps mesurés sur des régions d'intérêts (ROIs).
3. **lambda\_min variations** : affiche la différence entre l'image en  $\lambda_{min}$  à l'instant t avec l'image en  $\lambda_{min}$  de référence.

### Curseurs :

1. **Value min of lmin (nm)** : règle la valeur minimale de  $\lambda_{min}$  pour la carte de couleurs de l'image affichée dans la fenêtre "Resonance position image".
2. **Value max of lmin (nm)** : règle la valeur maximale de  $\lambda_{min}$  pour la carte de couleurs de l'image affichée dans la fenêtre "Resonance position image".

### Boutons :

1. **Display cinetic lambda min** : ouvre une fenêtre demandant si le polariseur est réglé sur la polarisation TM (position 90°). Si ce n'est pas le cas, l'utilisateur peut faire le réglage à la main et ensuite répondre "Yes" pour activer l'affichage des différentes fenêtres ainsi que la possibilité d'interagir avec toutes les autres fonctionnalités de l'interface.

# IHM principale

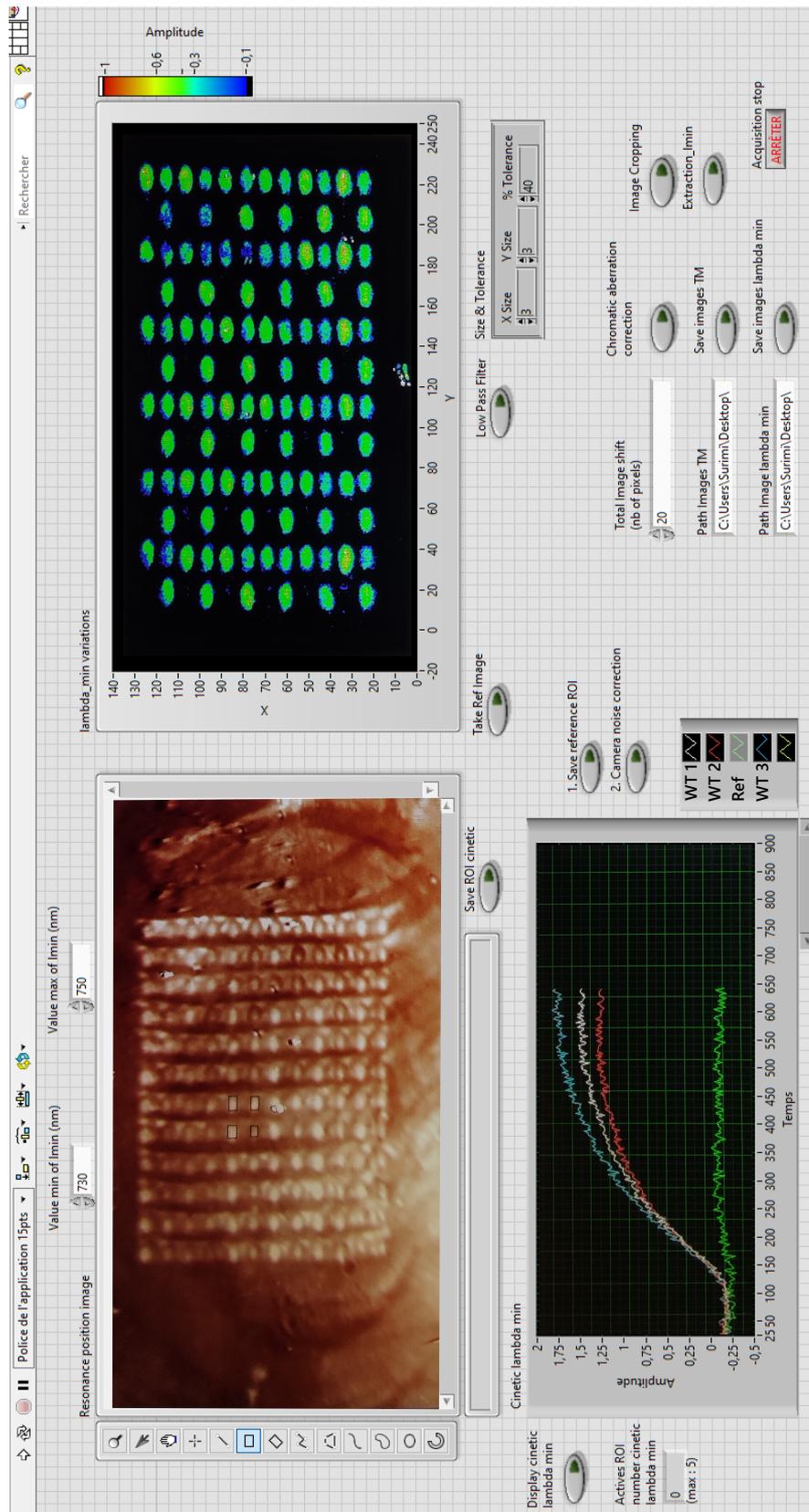


FIGURE C.1 – Capture d'écran de l'IHM principale.



2. **Save ROI cinetic** : enregistre les coordonnées des ROIs qui ont été préalablement dessinées à l'aide de l'outil "rectangle" de la fenêtre "Resonance position image". Attention, si plus d'une ROI doit être dessinée, maintenir la touche "Ctrl" du clavier enfoncée pour dessiner une autre ROI. Active dans un second temps l'affichage de la position spectrale de la résonance plasmon, extraite et moyennée sur tous les pixels de la ROI, au cours du temps dans la fenêtre "Cinetic lambda min".

3. **Take Ref Image** : enregistre l'image en  $\lambda_{min}$  à cet instant donné. Active la soustraction des images en  $\lambda_{min}$  suivantes par cette image de référence. Affiche la variation de  $\lambda_{min}$  au cours du temps dans la fenêtre "Cinetic lambda min". Active l'affichage de la fenêtre "lambda min variations".

3. **1. Save reference ROI** : enregistre les coordonnées des régions d'intérêts (ROI) de référence qui ont été préalablement dessinées à l'aide de l'outil "rectangle" de la fenêtre "Resonance position image". Ces ROIs sont utilisées dans un second temps pour corriger le bruit sur l'intensité des LEDs introduit par le système de lecture de la caméra Basler Ace A2000-165umNIR.

4. **2. Camera noise correction** : active la correction du bruit de lecture de la caméra.

5. **Low pass filter** : active un moyennage spatial sur l'image en  $\Delta\lambda_{min}$  dans la fenêtre "lambda min variations". Le nombre de pixels utilisés pour le moyennage et la fréquence de coupure du filtre passe bas sont ajustables dans la fenêtre "Size & Tolerance".

6. **Chromatic aberration correction** : active la correction de l'aberration chromatique qui provient de la dispersion du prisme et qui résulte en un décalage horizontal des images des différentes LEDs. Cette fonction recale les images des LEDs n°2 à n°7 avec l'image de la LED n°1. La valeur maximale du décalage, exprimée en nombre de pixels, doit être renseignée par l'utilisateur dans la fenêtre "Total image shift".

7. **Save images TM** : active l'enregistrement des images en polarisation TM dans le dossier dont le chemin est renseigné dans la fenêtre "Path Images TM".

8. **Save images lambda min** : active l'enregistrement des images en  $\lambda_{min}$  dans le dossier dont le chemin est renseigné dans la fenêtre "Path Images lambda min".

9. **Image Cropping** : ouvre une nouvelle fenêtre dans laquelle est affichée l'image en polarisation TM de la LED n°3. Active la sélection d'une zone de l'image, à l'aide de l'outil "Rectangle", sur laquelle la position spectrale de la résonance plasmon est extraite par l'algorithme d'extraction.

10. **Extraction lambda min** : active l'extraction de  $\lambda_{min}$  sur tous les pixels de la zone définie à l'aide de la fonction "Image Cropping".

11. **Acquisition stop** : arrête l'acquisition et la caméra.

## IHM secondaire :

### Fenêtres :

1. **LED intensity image** : affiche l'image en intensité de la LED sélectionnée par le curseur "n°LED displayed".

2. **LED intensity** : affiche les valeurs des intensités des LEDs extraites sur la ROI dessinée dans la fenêtre "LED intensity image".

3. **Nb of elements in the pre processing queue** : affiche le nombre d'images présentes dans la file d'attente avant de subir le pré-traitement (tri des images).

4. **Nb of elements in the processing queue** : affiche le nombre d'images présentes dans la file d'attente avant de subir traitement (moyennage temporel, correction de l'aberration chromatique, extraction de  $\lambda_{min}$ , etc).

### Curseurs :

1. **Number of images for averaging** : règle le nombre d'images à utiliser pour le moyennage temporel.

2. **Number of LEDs** : nombre de LEDs de la source lumineuse multi-spectrale.

3. **LEDs wavelengths** : valeurs des longueurs d'onde de la source lumineuse multi-spectrale qui sont utilisées par l'algorithme pour extraire  $\lambda_{min}$ .

### Curseurs :

1. **Display LED intensity** : active l'affichage des fenêtres "LED intensity image" et "LED intensity".

# IHM secondaire

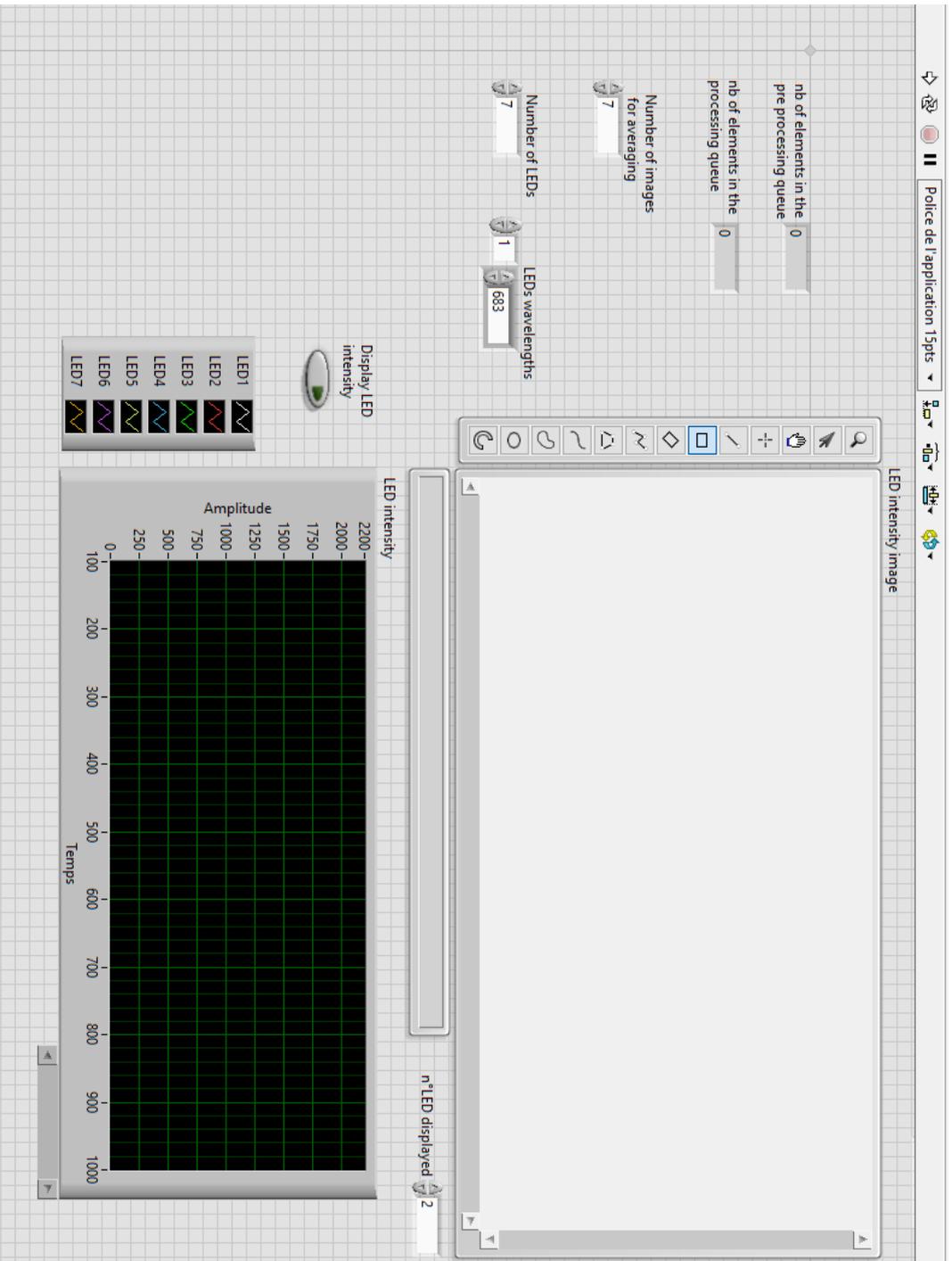


Figure C.2 – Capture d'écran de l'IHM secondaire





# D

## **MODÈLE LORENTZIEN DE LA RÉSONANCE PLASMON ET CALCUL DE SA POSITION SPECTRALE**

Il existe différentes façons de modéliser l'allure de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde de la résonance plasmon. Une première expression analytique de la réflectivité du système prisme/film métallique/milieu diélectrique peut être obtenue à partir des coefficients de Fresnel, proche de la résonance plasmon et en supposant que la partie imaginaire de la permittivité diélectrique du métal est très inférieure à la partie réelle [KRETSCHMANN, 1971]. L'expression de la réflectivité est alors une lorentzienne :

$$R(\lambda) = 1 - \frac{1 - R_{min}}{1 + \Lambda^2 \left( \frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\lambda_{min}} \right)^2} \quad (D.1)$$

$R_{min}$  correspond à la réflectivité minimale de la résonance plasmon,  $\Lambda$  est un paramètre déterminant la largeur spectrale de la résonance et  $\lambda_{min}$  est la position du minimum de la réflectivité.

Si l'approximation sur la permittivité diélectrique du métal n'est pas faite, l'expression de la réflectivité est donnée par l'équation 3.1 qui est une lorentzienne asymétrique qui a été utilisée dans la modélisation de la résonance dans l'algorithme principal d'extraction de  $\lambda_{min}$  dans le cadre de ces travaux de thèse.

L'avantage de l'expression D.1, définie par seulement 3 paramètres, est qu'elle permet d'obtenir une expression analytique de la position spectrale de la résonance plasmon à partir d'un jeu de trois réflectivités ( $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$ ) mesurées à 3 longueurs d'onde différentes ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  et  $\lambda_3$ ) :

$$\frac{1}{\lambda_{min}} = \frac{1}{\lambda_1} - \frac{\Delta\lambda}{\lambda_2^2} \times \frac{7P_2 - 3P_1}{6P_2 - 2P_1} \quad (D.2)$$

avec

$$P_1 = \frac{2}{1 - R_3} - \frac{1}{1 - R_2} - \frac{1}{1 - R_1}$$

$$P_2 = \frac{1}{1 - R_3} - \frac{1}{1 - R_2}$$

Cette expression de la position spectrale de la résonance est indépendante des deux autres paramètres,  $R_{min}$  et  $\Lambda$ , qui définissent la lorentzienne. Elle ne dépend exclusivement que de paramètres expérimentaux connus ou mesurables. Ainsi, il n'est pas nécessaire de réaliser un ajustement des réflectivités expérimentales par le modèle pour obtenir les trois paramètres.

Le calcul de la position spectrale de la résonance se fait donc en combinant des images en réflectivité de la biopuce prises à des longueurs d'onde différentes. La combinaison de ces images par addition ou soustraction est très efficace et très rapide. Ainsi, le grand avantage de cette méthode est

de pouvoir obtenir la position spectrale de la résonance plasmon sur tous les pixels d'une image en quelques dizaines de millisecondes. Cependant, d'après la figure D.1, l'ajustement de la résonance plasmon par le modèle lorentzien qui passe par les trois points expérimentaux les plus proches du minimum, donne une position spectrale de la résonance qui n'est pas fidèle à la réalité. Un écart de quasiment 4 nm est observé pour cette configuration. Pour une application à la détection SPR, où la grandeur d'intérêt est la variation de la position de  $\lambda_{min}$ , une erreur systématique sur la détermination de  $\lambda_{min}$  n'est pas un problème si la valeur de cette erreur ne varie pas de façon significative lors de la mesure d'une interaction chimique. En effet, elle sera corrigée lors de la soustraction de  $\lambda_{min}$  mesurée après l'interaction par celle mesurée avant l'interaction.

D

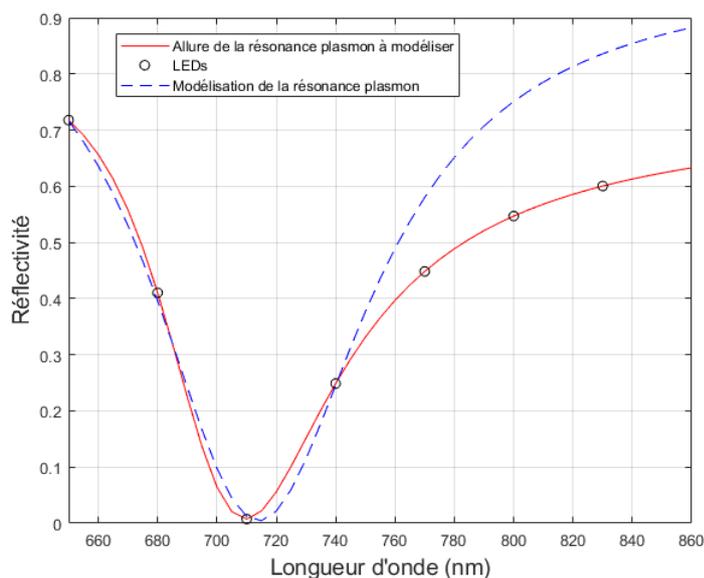


FIGURE D.1 – Évolution réelle de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde (courbes en trait plein) modélisée par une fonction lorentzienne (courbe en pointillés). Les ronds noirs représentent les positions spectrales des différentes LEDs composant la source lumineuse.

Dans toute la suite, une source lumineuse composée de 7 longueurs d'onde sera considérée. Le modèle lorentzien de la résonance plasmon étant défini par trois paramètres (eq D.1), seules trois mesures expérimentales de la réflectivité à 3 longueurs d'onde différentes sont nécessaires pour déterminer la valeur de ces paramètres. L'intérêt de mesurer la réflectivité à 7 longueurs d'onde est d'augmenter la dynamique de mesure en sélectionnant les trois longueurs d'onde les plus proches de la résonance plasmon. Il y a donc 5 triplets de longueurs d'onde disponibles pour le calcul de la position spectrale de la résonance.

La première étape de l'algorithme est de calculer, sur tous les pixels de l'image de la biopuce, la valeur de  $\lambda_{min}$  grâce à l'expression D.2. Ce calcul est réalisé pour tous les 5 triplets de longueurs d'onde disponibles afin de générer un jeu de 5 positions spectrales de la résonance pour chaque pixel de l'image. La deuxième étape consiste à ne retenir qu'une seule valeur de  $\lambda_{min}$  suivant un

critère de sélection. Ce critère consiste à comparer la valeur calculée de  $\lambda_{min}$  pour chaque triplet, à la longueur d'onde centrale respective de chaque triplet. La valeur de  $\lambda_{min}$  retenue sera celle qui est la plus proche de la longueur d'onde centrale du triplet qui a servi au calcul.

Soient  $(i,j) \in \mathbb{N}^2$ ,  $\{\lambda_{min,i}\}_{1 \leq i \leq 5}$  le jeu des différentes valeurs de  $\lambda_{min}$  calculées et  $\{\lambda_j\}_{1 \leq j \leq 7}$  le jeu de longueurs d'onde qui composent la source lumineuse, la valeur de  $\lambda_{min,i}$  retenue sera celle qui minimisera la distance :  $|\lambda_{i+1} - \lambda_{min,i}|$  pour  $1 \leq i \leq 5$ . Un exemple du fonctionnement de l'algorithme est présenté sur la figure D.2 dans le cas d'une source lumineuse composée de 5 longueurs d'onde et pour une surface d'or recouverte de trois gouttes de la protéine BSA qui décale légèrement la position de la résonance plasmon :

D

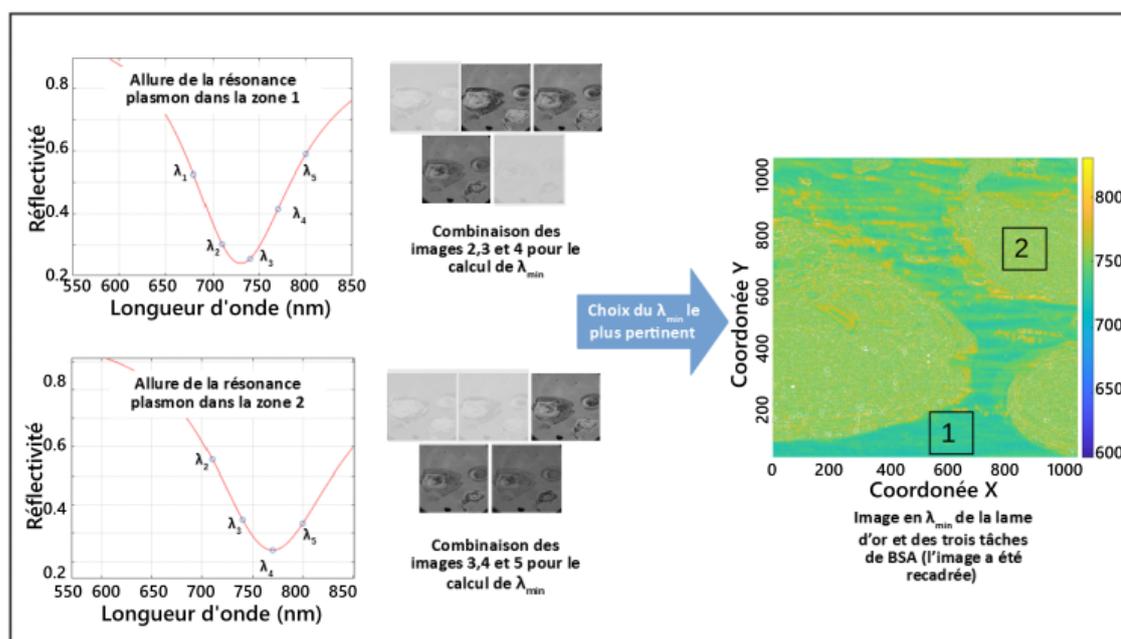


FIGURE D.2 – Représentation graphique du fonctionnement de l'algorithme de combinaison d'images pour le calcul de la position de la résonance dans le cas d'une lame d'or sur laquelle ont été déposées trois gouttes de BSA.

Les performances de cet algorithme ont été testées en simulation. Pour une position spectrale théorique de la résonance, un ensemble de 7 réflectivités qui correspondent aux 7 longueurs d'onde des LEDs ont été simulées à l'aide d'un code Matlab se basant sur le calcul des coefficients de Fresnel du système prisme/film d'or/milieu diélectrique. Ces réflectivités ont ensuite été utilisées par l'algorithme pour en tirer une valeur de  $\lambda_{min}$ . Cette opération a été répétée sur une dynamique spectrale allant de 670 nm à 760 nm. La position spectrale de la résonance calculée a été tracée en fonction de la position spectrale théorique (voir figure D.3). La droite noire sert de point de comparaison afin d'obtenir la justesse de l'algorithme définie par :

$$justesse = \lambda_{min}^{calculé} - \lambda_{min}^{théorique}$$

D'après la figure D.3, la justesse de l'algorithme à 3 paramètres montre de grandes variations sur

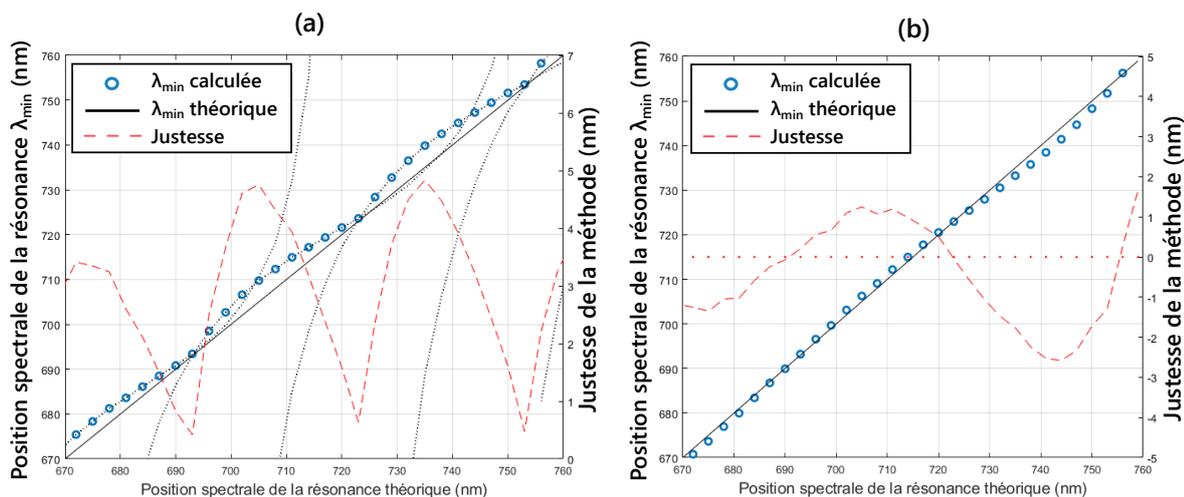


FIGURE D.3 – **a.** Représentation graphique de la justesse du calcul de la position spectrale de la résonance par l’algorithme à 3 paramètres. Les courbes en pointillées représentent les différentes positions spectrales calculées pour chaque triplet. **a.** Représentation graphique de la justesse du calcul de la position spectrale de la résonance par l’algorithme à 5 paramètres.

l’intervalle spectral étudié. Notamment, la justesse est toujours positive, ce qui signifie que la position spectrale de la résonance calculée est toujours surestimée. De plus, la justesse peut atteindre jusqu’à 5 nm. Les différentes courbes en pointillées représentent, chacune, la position spectrale de la résonance calculée pour le triplet correspondant. Elles permettent de mettre en évidence le changement de triplet dans la construction du  $\lambda_{min}$  final. Un changement de triplet s’opère lorsque deux courbes en pointillées se croisent dans des régions où la justesse est maximale. Il convient alors de se demander quel impact sur la mesure, peut avoir cette grande disparité des valeurs de la justesse. A priori, le fait que la justesse ne soit pas strictement nulle n’est pas un problème pour la mesure d’une cinétique en SPR car la grandeur qui est pertinente n’est pas la valeur de  $\lambda_{min}$  mais sa variation au cours du temps; ainsi la valeur de départ de  $\lambda_{min}$  n’a pas vraiment d’importance. Cependant, la justesse n’étant pas constante en fonction de la longueur d’onde, la sensibilité à un saut d’indice ne va pas être la même sur toute la dynamique de la mesure et peut même montrer de très grandes variations. Pour comparaison, la même étude a été réalisée pour l’algorithme à 5 paramètres qui se base sur le modèle donné par l’équation 3.1 et qui a été optimisé dans ces travaux de thèse. Les variations de la justesse sont moins importantes et plus douces.

Ces variations brutales de la position spectrale de la résonance calculée induit des discontinuités dans la réponse de l’algorithme à 3 paramètres à un changement d’indice de réfraction. Pour cette méthode numérique, il existe donc des régions où la résonance plasmon ne peut pas être exploitée afin de réaliser la détection. En effet, ces discontinuités détériorent complètement la réponse de l’instrument. Ces régions sont centrées autour des positions spectrales où un changement de triplet a lieu (693 nm, 723 nm et 753 nm sur la figure D.3). C’est pour cette raison que la modélisation de la résonance plasmon par une lorentzienne n’est pas adaptée pour la détection SPR sur une grande dynamique spectrale.



# BIBLIOGRAPHIE

- Agilent, AAS. (2022). Récupérée octobre 9, 2022, à partir de <https://www.agilent.com/en/support/atomic-spectroscopy/atomic-absorption/flame-atomic-absorption-instruments/how-does-aas-work-aas-faqs>
- Agilent, ICP-MS. (2022). Récupérée octobre 9, 2022, à partir de <https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/what-is-icp-ms-icp-ms-faqs>
- ARAKAWA, E. T., WILLIAMS, M. W., HAMM, R. N., & RITCHIE, R. H. (1973). Effect of damping on surface plasmon dispersion. *Physical Review Letters*, 31(18), 1127-1129. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.31.1127>
- AVENS, H. J., & BOWMAN, C. N. (2009). Mechanism of cyclic dye regeneration during eosin-sensitized photoinitiation in the presence of polymerization inhibitors. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 47(22), 6083-6094. <https://doi.org/10.1002/pola.23649>
- BAKSHPOUR, M., & DENIZLI, A. (2020). Highly sensitive detection of cd(II) ions using ion-imprinted surface plasmon resonance sensors. *Microchemical Journal*, 159, 105572. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105572>
- BALDO, M. A., DANIELE, S., CIANI, I., BRAGATO, C., & WANG, J. (2004). Remote stripping analysis of lead and copper by a mercury-coated platinum microelectrode. *Electroanalysis*, 16(5), 360-366. <https://doi.org/10.1002/elan.200302836>
- BARDIN, F., BELLEMMAIN, A., ROGER, G., & CANVA, M. (2009). Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7), 2100-2105. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.023>
- BERINI, P. (2009). Long-range surface plasmon polaritons. *Advances in Optics and Photonics*, 1(3), 484. <https://doi.org/10.1364/AOP.1.000484>
- BERNALTE, E., ARÉVALO, S., PÉREZ-TABORDA, J., WENK, J., ESTRELA, P., AVILA, A., & DI LORENZO, M. (2020). Rapid and on-site simultaneous electrochemical detection of copper, lead and mercury in the amazon river. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 307, 127620. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127620>
- BOLDUC, O., LIVE, L., & MASSON, J. (2009). High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta*, 77(5), 1680-1687. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.006>

- BORN, M., & WOLF, E. (1999). *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light* (7<sup>e</sup> éd.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139644181>
- BORRILL, A. J., REILY, N. E., & MACPHERSON, J. V. (2019). Addressing the practicalities of anodic stripping voltammetry for heavy metal detection : a tutorial review. *Analyst*, 144(23), 6834-6849. <https://doi.org/10.1039/C9AN01437C>
- BREMER, K., & ROTH, B. (2015). Fibre optic surface plasmon resonance sensor system designed for smartphones. *Optics Express*, 23(13), 17179-17184. <https://doi.org/10.1364/OE.23.017179>
- CENNAMO, N., D'AGOSTINO, G., PORTO, G., BIASIOLO, A., PERRI, C., ARCADIO, F., & ZENI, L. (2018). A molecularly imprinted polymer on a plasmonic plastic optical fiber to detect perfluorinated compounds in water. *Sensors*, 18(6), 1836. <https://doi.org/10.3390/s18061836>
- CHINOWSKY, T. M., SOELBERG, S. D., BAKER, P., SWANSON, N. R., KAUFFMAN, P., MACTUTIS, A., GROW, M. S., ATMAR, R., YEE, S. S., & FURLONG, C. E. (2007). Portable 24-analyte surface plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9), 2268-2275. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.11.026>
- CHINOWSKY, T., QUINN, J., BARTHOLOMEW, D., KAISER, R., & ELKIND, J. (2003). Performance of the spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 91(1), 266-274. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00113-8)
- COLAS, E., CRASSOUS, M.-P., LAURENT, S., LITAKER, R. W., RINNERT, E., LE GALL, E., LUNVEN, M., DELAUNEY, L., & COMPÈRE, C. (2016). A surface plasmon resonance system for the underwater detection of domoic acid : domoic acid detection using SPR. *Limnology and Oceanography : Methods*, 14(7), 456-465. <https://doi.org/10.1002/lom3.10104>
- de BRUIJN, H. E., ALTENBURG, B. S., KOOYMAN, R. P., & GREVE, J. (1991). Determination of thickness and dielectric constant of thin transparent dielectric layers using surface plasmon resonance. *Optics Communications*, 82(5), 425-432. [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(91\)90353-F](https://doi.org/10.1016/0030-4018(91)90353-F)
- de BRUIJN, H. E., KOOYMAN, R. P. H., & GREVE, J. (1990). Determination of dielectric permittivity and thickness of a metal layer from a surface plasmon resonance experiment. *Applied Optics*, 29(13), 1974. <https://doi.org/10.1364/AO.29.001974>
- DEEB, C., ECOFFET, C., BACHELOT, R., PLAIN, J., BOUHELIER, A., & SOPPERA, O. (2011). Plasmon-based free-radical photopolymerization : effect of diffusion on nanolithography processes. *Journal of the American Chemical Society*, 133(27), 10535-10542. <https://doi.org/10.1021/ja201636y>
- DEL ROSSO, T., SÁNCHEZ, J. E. H., CARVALHO, R. D. S., PANDOLI, O., & CREMONA, M. (2014). Accurate and simultaneous measurement of thickness and refractive index of thermally evaporated thin organic films by surface plasmon resonance spectroscopy. *Optics Express*, 22(16), 18914. <https://doi.org/10.1364/OE.22.018914>

- DINH, V.-P., HUYNH, T.-D.-T., M. LE, H., NGUYEN, V.-D., DAO, V.-A., QUANG HUNG, N., ANH TUYEN, L., LEE, S., YI, J., DU NGUYEN, T., & V. TAN, L. (2019). Insight into the adsorption mechanisms of methylene blue and chromium( iii ) from aqueous solution onto pomelo fruit peel. *RSC Advances*, 9(44), 25847-25860. <https://doi.org/10.1039/C9RA04296B>
- DUROU, C., GIRAUDOU, J.-C., & MOUTOU, C. (1973). Refractive indexes of aqueous solutions of copper(II) sulfate, zinc sulfate, silver nitrate, potassium chloride, and sulfuric acid for helium-neon laser light at  $\theta = 25^\circ$ . *Journal of Chemical & Engineering Data*, 18(3), 289-290. <https://doi.org/10.1021/je60058a018>
- FANG, Z., HUANG, J., LIE, P., XIAO, Z., OUYANG, C., WU, Q., WU, Y., LIU, G., & ZENG, L. (2010). Lateral flow nucleic acid biosensor for  $\text{Cu}^{2+}$  detection in aqueous solution with high sensitivity and selectivity. *Chemical Communications*, 46(47), 9043-9045. <https://doi.org/10.1039/C0CC02782K>
- FANO, U. (1941). The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). *Journal of the Optical Society of America*, 31(3), 213. <https://doi.org/10.1364/JOSA.31.000213>
- FLETCHER, R. (1971). *Modified Marquardt Subroutine for Non-Linear Least Squares*. (AERER6799). Atomic Energy Research Establishment, Harwell (England). Récupérée août 19, 2022, à partir de <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/AERER6799.xhtml>
- FORZANI, E. S., ZHANG, H., CHEN, W., & TAO, N. (2005). Detection of heavy metal ions in drinking water using a high-resolution differential surface plasmon resonance sensor. *Environmental Science & Technology*, 39(5), 1257-1262. <https://doi.org/10.1021/es049234z>
- FUCHS, Y., LINARES, A. V., MAYES, A. G., HAUPT, K., & SOPPERA, O. (2011). Ultrathin selective molecularly imprinted polymer microdots obtained by evanescent wave photopolymerization. *Chemistry of Materials*, 23(16), 3645-3651. <https://doi.org/10.1021/cm2009829>
- FUCHS, Y., SOPPERA, O., & HAUPT, K. (2012). Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications—a review. *Analytica Chimica Acta*, 717, 7-20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.026>
- GALL, D. (2016). Electron mean free path in elemental metals. *Journal of Applied Physics*, 119(8), 085101. <https://doi.org/10.1063/1.4942216>
- GAN, Y., LIANG, T., HU, Q., ZHONG, L., WANG, X., WAN, H., & WANG, P. (2020). In-situ detection of cadmium with aptamer functionalized gold nanoparticles based on smartphone-based colorimetric system. *Talanta*, 208, 120231. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120231>
- GENET, C., & EBBESEN, T. W. (2007). Light in tiny holes. *Nature*, 445(7123), 39-46. <https://doi.org/10.1038/nature05350>
- GILBERT, J. C. (2021, mars). *Fragments d'Optimisation Différentiable - Théories et Algorithmes* (Master) [Master]. Récupérée août 15, 2022, à partir de <https://hal.inria.fr/hal-03347060>
- HALKARE, P., PUNJABI, N., WANGCHUK, J., NAIR, A., KONDABAGIL, K., & MUKHERJI, S. (2019). Bacteria functionalized gold nanoparticle matrix based fiber-optic sensor for monitoring heavy me-

- tal pollution in water. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 281, 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.119>
- HERZOG, N., KIND, J., HESS, C., & ANDRIEU-BRUNSEN, A. (2015). Surface plasmon & visible light for polymer functionalization of mesopores and manipulation of ionic permselectivity. *Chemical Communications*, 51(58), 11697-11700. <https://doi.org/10.1039/C5CC03507D>
- HOMOLA, J. (2008). Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews*, 108(2), 462-493. <https://doi.org/10.1021/cr068107d>
- HOMOLA, J. (2006, janvier 1). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors* (T. 4). Springer. <https://doi.org/10.1007/b100321>
- HOMOLA, J., & YEE, S. S. (1998). Novel polarization control scheme for spectral surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 51(1), 331-339. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00208-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00208-1)
- HONG, S., KANG, T., MOON, J., OH, S., & YI, J. (2007). Surface plasmon resonance analysis of aqueous copper ions with amino-terminated self-assembled monolayers. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 292(2), 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.06.031>
- HOTTIN, J., MOREAU, J., BELLEMAIN, A., & CANVA, M. (2012). Biochip data normalization using multifunctional probes. *Analyst*, 137(13), 3119-3125. <https://doi.org/10.1039/C2AN35120J>
- HUANG, S.-C., LEE, G.-B., CHIEN, F.-C., CHEN, S.-J., CHEN, W.-J., & YANG, M.-C. (2006). A microfluidic system with integrated molecular imprinting polymer films for surface plasmon resonance detection. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(7), 1251-1257. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/7/019>
- JALILZADEH, M., ÇIMEN, D., ÖZGÜR, E., ESEN, C., & DENIZLI, A. (2019). Design and preparation of imprinted surface plasmon resonance (SPR) nanosensor for detection of zn(II) ions. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 56(9), 877-886. <https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1617634>
- JOHNSON, P. B., & CHRISTY, R. W. (1972). Optical constants of the noble metals. *Physical Review B*, 6(12), 4370-4379. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.6.4370>
- KAMECHE, E., HENI, W., TELITEL, S., GE, D., VIDAL, L., DUMUR, F., GIGMES, D., LALEVÉE, J., MARGUET, S., DOUILLARD, L., FIORINI-DEBUISCHERT, C., BACHELOT, R., & SOPPERA, O. (2020). Plasmon-triggered living photopolymerization for elaboration of hybrid polymer/metal nanoparticles. *Materials Today*, 40, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.03.023>
- KHITOUS, A., LIN, C.-F., KAMECHE, E., ZAN, H.-W., MALVAL, J.-P., BERLING, D., & SOPPERA, O. (2021). Plasmonic au nanoparticle arrays for monitoring photopolymerization at the nanoscale. *ACS Applied Nano Materials*, 4(9), 8770-8780. <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c01377>
- KOJUNCU, Ý., BUNDALEVSKA, J. M., AY, Ü., ČUNDEVA, K., STAFILOV, T., & AKÇIN, G. (2004). Atomic absorption spectrometry determination of cd, cu, fe, ni, pb, zn, and TI traces in seawater

- following flotation separation. *Separation Science and Technology*, 39(11), 2751-2765. <https://doi.org/10.1081/SS-200026751>
- KOVACS, G. J., & SCOTT, G. D. (1978). Attenuated total reflection angular spectra of a film bounded by dielectric slabs. *Canadian Journal of Physics*, 56(9), 1235-1247. <https://doi.org/10.1139/p78-164>
- KRETSCHMANN, E. (1971). Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei*, 241(4), 313-324. <https://doi.org/10.1007/BF01395428>
- KUMAR, D. N., REINGEWIRTZ, S., SHEMESH, M., SUCKEVERIENE, R., & SHTENBERG, G. (2022). DNAzyme-based biosensor for sub ppb lead ions detection using porous silicon fabry-pérot interferometer. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 362, 131761. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131761>
- KURIHARA, K., NAKAMURA, K., & SUZUKI, K. (2002). Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 86(1), 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(02\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(02)00146-6)
- LASCHI, S., PALCHETTI, I., & MASCINI, M. (2006). Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 114(1), 460-465. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.05.028>
- LÉPINAY, S., KHAM, K., MILLOT, M.-C., & CARBONNIER, B. (2012). In-situ polymerized molecularly imprinted polymeric thin films used as sensing layers in surface plasmon resonance sensors : mini-review focused on 2010–2011. *Chemical Papers*, 66(5). <https://doi.org/10.2478/s11696-012-0134-6>
- LEVENBERG, K. (1944). A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quarterly of Applied Mathematics*, 2(2), 164-168. <https://doi.org/10.1090/qam/10666>
- LI, N., ZHANG, D., ZHANG, Q., LU, Y., JIANG, J., LIU, G. L., & LIU, Q. (2016). Combining localized surface plasmon resonance with anodic stripping voltammetry for heavy metal ion detection. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 231, 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.042>
- LI, X., & HUSSON, S. M. (2006). Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces : a surface plasmon resonance study. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(3), 336-348. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.04.016>
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C., & LUNSTRÖM, I. (1983a). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299-304. [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7)
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C., & LUNSTRÖM, I. (1983b). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299-304. [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7)

- LIN, V. S.-Y., MOTESHAREI, K., DANCIL, K.-P. S., SAILOR, M. J., & GHADIRI, M. R. (1997). A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor. *Science*, 278(5339), 840-843. <https://doi.org/10.1126/science.278.5339.840>
- LIU, S., LI, M., GONG, C., & GAO, H. (2016). Effects of light source on the performance of a kretschmann surface plasmon resonance sensor. *Laser Physics*, 26(6), 065006. <https://doi.org/10.1088/1054-660X/26/6/065006>
- LUO, Q., YU, N., SHI, C., WANG, X., & WU, J. (2016). Surface plasmon resonance sensor for antibiotics detection based on photo-initiated polymerization molecularly imprinted array. *Talanta*, 161, 797-803. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.049>
- LYNN, N. S., & HOMOLA, J. (2016). (bio)sensing using nanoparticle arrays : on the effect of analyte transport on sensitivity. *Analytical Chemistry*, 88(24), 12145-12151. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03002>
- LYNN, N. S., ŠPRINGER, T., SLABÝ, J., ŠPAČKOVÁ, B., GRÁFOVÁ, M., ERMINI, M. L., & HOMOLA, J. (2019). Analyte transport to micro- and nano-plasmonic structures. *Lab on a Chip*, 19(24), 4117-4127. <https://doi.org/10.1039/C9LC00699K>
- MAIER, S. A. (2007). *Plasmonics : fundamentals and applications*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-37825-1>
- MALIK, L. A., BASHIR, A., QUREASHI, A., & PANDITH, A. H. (2019). Detection and removal of heavy metal ions : a review. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1495-1521. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00891-z>
- MARQUARDT, D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, 11(2), 431-441. <http://www.jstor.org/stable/2098941>
- MASSON, J.-F. (2020). Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. *The Analyst*, 145(11), 3776-3800. <https://doi.org/10.1039/D0AN00316F>
- MERMIN, N., & ASHCROFT, N. (1976, janvier 2). *Solid State Physics* (New édition). Brooks/Cole.
- MIYAN, R., WANG, X., ZHOU, J., ZENG, Y., QU, J., HO, H.-P., ZHOU, K., GAO, B. Z., CHEN, J., & SHAO, Y. (2021). Phase interrogation surface plasmon resonance hyperspectral imaging sensor for multi-channel high-throughput detection. *Optics Express*, 29(20), 31418. <https://doi.org/10.1364/OE.433052>
- MOLER, C. (2017). *What is the condition number of a matrix?* [Cleve's corner : cleve moler on mathematics and computing]. Récupérée août 19, 2022, à partir de <https://blogs.mathworks.com/cleve/2017/07/17/what-is-the-condition-number-of-a-matrix/>
- MOREAU, J., & LARTIGUE, L. (2022). Plasmons polaritons de surface. *Photoniques*, (115), 46-50. <https://doi.org/10.1051/photon/202211246>
- NAWAZ, T., AHMAD, M., YU, J., WANG, S., & WEI, T. (2020). The biomimetic detection of progesterone by novel bifunctional group monomer based molecularly imprinted polymers prepared in UV light. *New Journal of Chemistry*, 44(17), 6992-7000. <https://doi.org/10.1039/C9NJ06387K>

- NENNINGER, G. G., PILIARIK, M., & HOMOLA, J. (2002). Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmons. *Measurement Science and Technology*, 13(12), 2038-2046. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/13/12/332>
- NIELSEN, H. B. (1999). DAMPING PARAMETER IN MARQUARDT'S METHOD. *IMM Department of Mathematical Modelling*.
- OCK, K., JANG, G., ROH, Y., KIM, S., & KOH, K. (2001). Optical detection of cu<sup>2+</sup> ion using a SQ-dye containing polymeric thin-film on au surface, 5.
- OLIVÉRO, A. (2016, décembre 16). *Développement d'un instrument plasmonique bimodal couplant SPRI et SERS pour la détection et l'identification de molécules biologiques* [thèse de doct., Université Paris Saclay (COMUE)]. Récupérée octobre 31, 2022, à partir de <https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-01469228>
- OTTO, A. (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei*, 216(4), 398-410. <https://doi.org/10.1007/BF01391532>
- PARULI, E. I., SOPPERA, O., HAUPT, K., & GONZATO, C. (2021). Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers. *ACS Applied Polymer Materials*, 3(10), 4769-4790. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00661>
- PETERLINZ, K., & GEORGIADIS, R. (1996). Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy. *Optics Communications*, 130(4), 260-266. [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(96\)00238-6](https://doi.org/10.1016/0030-4018(96)00238-6)
- PICHON, V., & CHAPUIS-HUGON, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—a review. *Analytica Chimica Acta*, 622(1), 48-61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.057>
- PILIARIK, M., & HOMOLA, J. (2009). Surface plasmon resonance (SPR) sensors : approaching their limits? *Optics Express*, 17(19), 16505-16517. <https://doi.org/10.1364/OE.17.016505>
- PINES, D. (1956). Collective energy losses in solids. *Reviews of Modern Physics*, 28(3), 184-198. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.28.184>
- POWELL, C. J., & SWAN, J. B. (1959a). Origin of the characteristic electron energy losses in aluminum. *Physical Review*, 115(4), 869-875. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.115.869>
- POWELL, C. J., & SWAN, J. B. (1959b). Origin of the characteristic electron energy losses in magnesium. *Physical Review*, 116(1), 81-83. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.116.81>
- PYNAERT, R., BUGUET, J., CROUTXÉ-BARGHORN, C., MOIREAU, P., & ALLONAS, X. (2013). Effect of reactive oxygen species on the kinetics of free radical photopolymerization. *Polymer Chemistry*, 4(8), 2475. <https://doi.org/10.1039/c3py21163k>
- RAETHER, H. (1988). *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer Berlin, Heidelberg.
- RAMAKERS, G., WACKERS, G., TROUILLET, V., WELLE, A., WAGNER, P., & JUNKERS, T. (2019). Laser-grafted molecularly imprinted polymers for the detection of histamine from organocataly-

- zed atom transfer radical polymerization. *Macromolecules*, 52(6), 2304-2313. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b02339>
- RITCHIE, R. H. (1957). Plasma losses by fast electrons in thin films. *Physical Review*, 106(5), 874-881. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.874>
- SÁNCHEZ TRUJILLO, I., VEREDA ALONSO, E., GARCÍA DE TORRES, A., & CANO PAVÓN, J. M. (2012). Development of a solid phase extraction method for the multielement determination of trace metals in natural waters including sea-water by FI-ICP-MS. *Microchemical Journal*, 101, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.11.003>
- SARID, D. (1981). Long-range surface-plasma waves on very thin metal films. *Physical Review Letters*, 47(26), 1927-1930. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.47.1927>
- SATO, T., HAMADA, Y., SUMIKAWA, M., ARAKI, S., & YAMAMOTO, H. (2014, décembre 1). *Solubility of Oxygen in Organic Solvents and Calculation of the Hansen Solubility Parameters of Oxygen* [ACS Publications]. <https://doi.org/10.1021/ie502386t>
- SCARANO, S., MASCINI, M., TURNER, A. P., & MINUNNI, M. (2010). Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(5), 957-966. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.039>
- SEREDA, A., MOREAU, J., CANVA, M., & MAILLART, E. (2014). High performance multi-spectral interrogation for surface plasmon resonance imaging sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.049>
- SEREDA, A. (2014, novembre 25). *Imagerie multi-spectrale par résonance des plasmons de surface : développement et applications* [thèse de doct., Université Paris Sud - Paris XI]. Récupérée août 6, 2022, à partir de <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01127017>
- SEREDA, A., MOREAU, J., BOULADE, M., OLIVÉRO, A., CANVA, M., & MAILLART, E. (2015). Compact 5-LEDs illumination system for multi-spectral surface plasmon resonance sensing. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 209, 208-211. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.080>
- SHRIVASTAV, A. M., & GUPTA, B. D. (2018). Ion-imprinted nanoparticles for the concurrent estimation of Pb(II) and Cu(II) ions over a two channel surface plasmon resonance-based fiber optic platform. *Journal of Biomedical Optics*, 23(1), 1-8. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.1.017001>
- ŠPAČKOVÁ, B., LYNN, N. S., SLABÝ, J., ŠÍPOVÁ, H., & HOMOLA, J. (2018). A route to superior performance of a nanoplasmonic biosensor : consideration of both photonic and mass transport aspects. *ACS Photonics*, 5(3), 1019-1025. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.7b01319>
- SPADAVECCHIA, J., MOREAU, J., HOTTIN, J., & CANVA, M. (2009). New cysteamine based functionalization for biochip applications. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 143(1), 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.09.007>
- SPRAGUE, R. A. (1972). Surface roughness measurement using white light speckle. *Applied Optics*, 11(12), 2811. <https://doi.org/10.1364/AO.11.002811>

- SQUIRES, T. M., MESSINGER, R. J., & MANALIS, S. R. (2008a). Making it stick : convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature Biotechnology*, 26(4), 417-426. <https://doi.org/10.1038/nbt1388>
- SQUIRES, T. M., MESSINGER, R. J., & MANALIS, S. R. (2008b). Making it stick : convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature Biotechnology*, 26(4), 417-426. <https://doi.org/10.1038/nbt1388>
- TILKENS, B. G. (2000). Uncertainties in the values obtained by surface plasmon resonance. *Optical Engineering*, 39(2), 363. <https://doi.org/10.1117/1.602372>
- UNGER, C., & LIEBERZEIT, P. A. (2021). Molecularly imprinted thin film surfaces in sensing : chances and challenges. *Reactive and Functional Polymers*, 161, 104855. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104855>
- UTARGET. (2022). Récupérée octobre 30, 2022, à partir de <https://www.uwave-uv.com/fr/produits/pointeurs/utarget>
- VIAL, A., GRIMAULT, A.-S., MACÍAS, D., BARCHIESI, D., & de la CHAPELLE, M. L. (2005). Improved analytical fit of gold dispersion : application to the modeling of extinction spectra with a finite-difference time-domain method. *Physical Review B*, 71(8), 085416. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.71.085416>
- WANG, D., LOO, J., CHEN, J., YAM, Y., CHEN, S.-C., HE, H., KONG, S., & HO, H. (2019). Recent advances in surface plasmon resonance imaging sensors. *Sensors*, 19(6), 1266. <https://doi.org/10.3390/s19061266>
- WANG, X., ZENG, Y., ZHOU, J., CHEN, J., MIYAN, R., ZHANG, H., QU, J., HO, H.-P., GAO, B. Z., & SHAO, Y. (2021). Ultrafast surface plasmon resonance imaging sensor via the high-precision four-parameter-based spectral curve readjusting method. *Analytical Chemistry*, 93(2), 828-833. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03347>
- WANG, Y., ZHOU, J., & LI, J. (2017). Construction of plasmonic nano-biosensor-based devices for point-of-care testing. *Small Methods*, 1(11), 1700197. <https://doi.org/10.1002/smt.201700197>
- WAXLER, R., & WEIR, C. (1963). Effect of pressure and temperature on the refractive indices of benzene, carbon tetrachloride, and water. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A : Physics and Chemistry*, 67A(2), 163. <https://doi.org/10.6028/jres.067A.016>
- WHO. (2020). *Guidelines on core components of infection prevention and control programmes at the national and acute health care facility level*. World Health Organization. Country Office for Thailand. Récupérée octobre 8, 2022, à partir de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331750>
- WING FEN, Y., & MAHMOOD MAT YUNUS, W. (2013). Surface plasmon resonance spectroscopy as an alternative for sensing heavy metal ions : a review. *Sensor Review*, 33(4), 305-314. <https://doi.org/10.1108/SR-01-2012-604>

- WOOD, R. W. (1902). On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Proceedings of the Physical Society of London*, 18(1), 269-275. <https://doi.org/10.1088/1478-7814/18/1/325>
- WU, C.-M., & LIN, L.-Y. (2005). Utilization of albumin-based sensor chips for the detection of metal content and characterization of metal–protein interaction by surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 110(2), 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.01.047>
- WULFF, G. (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates— a way towards artificial antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(17), 1812-1832. <https://doi.org/10.1002/anie.199518121>
- XING, W., YIN, M., LV, Q., HU, Y., LIU, C., & ZHANG, J. (2014, janvier 1). 1 - oxygen solubility, diffusion coefficient, and solution viscosity. In W. XING, G. YIN & J. ZHANG (Éd.), *Rotating electrode methods and oxygen reduction electrocatalysts* (p. 1-31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63278-4.00001-X>
- XU, R.-X., YU, X.-Y., GAO, C., LIU, J.-H., COMPTON, R. G., & HUANG, X.-J. (2013). Enhancing selectivity in stripping voltammetry by different adsorption behaviors : the use of nanostructured mg–al-layered double hydroxides to detect cd(ii). *The Analyst*, 138(6), 1812. <https://doi.org/10.1039/c3an36271j>
- YUAN, H., JI, W., CHU, S., LIU, Q., QIAN, S., GUANG, J., WANG, J., HAN, X., MASSON, J.-F., & PENG, W. (2019). Mercaptopyridine-functionalized gold nanoparticles for fiber-optic surface plasmon resonance hg<sup>2+</sup> sensing. *ACS Sensors*, 4(3), 704-710. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01558>
- ZENG, Y., WANG, L., WU, S.-Y., HE, J., QU, J., LI, X., HO, H.-P., GU, D., GAO, B., & SHAO, Y. (2017). Wavelength-scanning SPR imaging sensors based on an acousto-optic tunable filter and a white light laser. *Sensors*, 17(1), 90. <https://doi.org/10.3390/s17010090>
- ZHANG, L.-M., & UTTAMCHANDANI, D. (1988). Optical chemical sensing employing surface plasmon resonance. *Electronics Letters*, 24(23), 1469-1470. <https://doi.org/10.1049/el:19881004>
- ZHAO, D., GUO, X., WANG, T., ALVAREZ, N., SHANOV, V. N., & HEINEMAN, W. R. (2014). Simultaneous detection of heavy metals by anodic stripping voltammetry using carbon nanotube thread. *Electroanalysis*, 26(3), 488-496. <https://doi.org/10.1002/elan.201300511>
- ZHU, S., YU, A. W., HAWLEY, D., & ROY, R. (1986). Frustrated total internal reflection : a demonstration and review. *American Journal of Physics*, 54(7), 601-607. <https://doi.org/10.1119/1.14514>
- ZUO, P., YIN, B.-C., & YE, B.-C. (2009). DNAzyme-based microarray for highly sensitive determination of metal ions. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 935-939. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.024>





# REMERCIEMENTS

*19 février 2023*

Nous y sommes. Un mois après ma soutenance de thèse de doctorat, arrivés au bout de ce manuscrit, au bout de cette grande aventure scientifique et humaine, au bout de ce long cycle universitaire... Jamais je n'aurais imaginé, à l'aube de mes études supérieures, m'engager pleinement dans cette voie. Au début passionné d'aéronautique, jeune lycéen, je passais mes weekends et une partie de mes vacances à l'aéroclub et décrochai même ma licence de pilote privé avant mon bac et mon permis voiture! C'est avec l'ambition d'en faire mon métier que je débutai une classe préparatoire.

Bons ou mauvais, les hasards de la vie firent que je m'éloignai de ce chemin pour en rejoindre un autre, tout aussi excitant, si ce n'est plus. Au début, au cours de ma progression, ce chemin devenant sinueux, se ramifiait, grimpait, se lézardait au gré des obstacles. Bientôt, il devenait évident, flagrant, unique. Enfin, il s'estompait, aboutissant sur cette sente qui se hissait vers ce col... À chaque intersection, chaque tournant, chaque ramification se trouve un enseignant, un ami, un membre de ma famille. Je remercie chaleureusement toutes ces personnes avec qui j'ai partagé un bout d'histoire et qui m'ont conseillé et indiqué la voie. En outre, il y en a plusieurs que j'aimerais particulièrement mettre à l'honneur dans les quelques lignes qui vont suivre...

\*\*\*

Mes premiers remerciements s'adressent à Julien Moreau qui m'a accepté au sein de l'équipe biophotonique du LCF pour mon stage de master et qui m'a ensuite fait confiance pour devenir un des acteurs principaux du projet SURIMI en me proposant de continuer sur une thèse. Il y a 5 ans je suis arrivé sur Paris avec l'envie de pousser ma formation scientifique jusqu'au plus haut niveau universitaire et ainsi de découvrir un nouveau monde tout en apprenant un maximum de nouvelles compétences. Ainsi, ces quelques années sous ton encadrement ont répondu à bien plus que toutes mes espérances et je peux affirmer que tu es un directeur de thèse d'exception! Ta pédagogie et ta patience semblent être des qualités innées qui, couplées à ta grande culture scientifique et générale et ta passion pour la physique, m'ont permis d'en apprendre énormément. Ton implication auprès de tes doctorants et du LCF n'est plus à démontrer. Plus généralement, l'Institut d'Optique a beaucoup de chance de te compter parmi ses enseignants-chercheurs! Je te remercie pour m'avoir toujours répondu avec le sourire lorsque j'avais besoin d'aide et particulièrement de m'avoir plusieurs fois accompagné en salle de manip' jusqu'à tard dans l'après-midi ou tôt dans la soirée.

Dans mon équipe d'encadrement je remercie également Michael Canva pour toutes les discussions scientifiques très intéressantes que l'on a pu partager toujours dans une ambiance très bienveillante et pour toutes tes remarques très constructives sur les diverses présentations de mes travaux de thèse. Enfin, merci à Karine Michel pour les quelques discussions et interactions que l'on a pu avoir autour du projet SURIMI et pour ton accueil au BRGM. J'espère que nous aurons l'occasion de travailler un peu plus ensemble au cours de mon post-doctorat lors des phases de test de l'instrument!

Comme mentionné en introduction de ces remerciements, une thèse est une grande aventure humaine et mes réussites durant ces quatre années de doctorat je les dois en grande partie à l'équipe Biophotonique. Je remercie donc les permanents de l'équipe : Julien Moreau, Nathalie Westbrook, Frédérique Pain et Arnaud Dubois, qui ont toujours su installer un climat de confiance dans lequel les doctorants ont pu évoluer avec joie et enthousiasme lesquels, par ailleurs, j'aimerais également saluer. Merci à Weikai pour ta bonne humeur constante, pour m'avoir fait découvrir la mousse au chocolat vegan, pour toutes nos discussions de couloir et pour le temps passé en labo de chimie le vendredi après-midi. Merci à Marlo, personnage haut en couleur, pour les bons moments que nous avons vécus à Porquerolles et à Annecy, pour toutes nos discussions autour de la plasmonique et pour m'avoir fait découvrir tant de nouvelles expressions comme la fameuse "t'es Gucci!". J'ai adoré goûter tes productions culinaires comme les inédites crêpes tourbillons! Merci à Camille pour avoir apporté un peu de chaleur et de fraîcheur dans notre bureau. C'est toujours un plaisir d'échanger avec toi sur les techniques de traitement d'images, les debriefings de séminaires et sur tes travaux de thèse. Merci à Colline pour ta bonne humeur et pour m'avoir offert une plante d'aloé vera que j'essaie de garder en vie; pour le moment je m'en débrouille bien... Merci à Marc pour ta gentillesse et les discussions sur l'imagerie speckle que l'on a eues. Tu as toujours pris le temps de répondre à mes questions. Merci également pour m'avoir fait découvrir les pâtisseries libanaises, je suis un vrai fan!

J'aimerais également remercier deux personnes ne faisant pas officiellement partie de l'équipe Biophotonique mais qui sont activement impliqués dans ses activités. Tout d'abord merci Christophe Hecquet pour toute l'aide que tu m'as apportée et tout ce que tu m'as appris, particulièrement pendant mon stage et le début de ma thèse. Tu as toujours répondu positivement lorsque j'avais besoin d'aide et sans jugement même face à mes questions les plus bêtes sur des aspects techniques lors du développement de l'instrument SURIMI. Je remercie également Jean-François Bryche avec qui j'ai passé des bons moments à Porquerolles et Annecy. Les discussions que l'on a pu avoir m'ont beaucoup apporté. Tu as toujours été de bons conseils durant ma thèse.

J'ai vécu quatre merveilleuses années à vos côtés et je ne regrette rien. C'est passé si vite ...

Je remercie mon jury de thèse composé d'Alexandra Fragola, d'Olivier Soppera, de Jean-Pierre Cloarec et d'Aude Lereu d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie tout particulièrement



sont encore sur Paris, rendez-vous pour une partie de molky au parc de Sceaux lors du retour des beaux jours.

Les amis de la Tricolore Sportive de Massy pour m'avoir accepté dans ce club de gymnastique ce qui m'a permis d'évacuer mes frustrations et m'a plusieurs fois redonné la motivation dans mon quotidien de thésard. Merci à Tibo, Seb, Denis, Vincent, Alexei, Guillaume, Guilhem, Rémi, Jules, Noah, Hugo, Félix, Antoine, Damien, Lou, Coco, Marie, Caroline...

\*\*\*

Pour finir, avec ces travaux de thèse, j'espère avoir humblement apporté une pierre au grand édifice de la connaissance humaine et j'aimerais déposer ce manuscrit, à la façon d'un caillou sur un cairn, afin de guider les générations futures dans cette grande aventure scientifique et humaine...

Derrière ce col, à son franchissement, se distingue une autre sente qui descend dans la vallée. Cette sente se transforme progressivement en un sentier puis en un chemin qui se dirige vers de nouveaux sommets, probablement plus hauts les uns que les autres...

