

Titre: Analyse polarimétrique de transductions optiques de surface pour applications en biodétection
Title: applications en biodétection

Auteur: Mathieu Maisonneuve
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Maisonneuve, M. (2014). Analyse polarimétrique de transductions optiques de surface pour applications en biodétection [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1403/>
Citation:

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1403/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michel Meunier
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ANALYSE POLARIMÉTRIQUE DE TRANSDUCTIONS OPTIQUES DE
SURFACE POUR APPLICATIONS EN BIODÉTECTION

MATHIEU MAISONNEUVE

DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE PHYSIQUE)

MARS 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

ANALYSE POLARIMÉTRIQUE DE TRANSDUCTIONS OPTIQUES DE SURFACE POUR
APPLICATIONS EN BIODÉTECTION

présentée par : MAISONNEUVE Mathieu

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. PETER Yves-Alain, Doct., président

M. MEUNIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme. BOUDOUX Caroline, Ph.D., membre

M. BERINI Pierre, Ph.D., membre

DÉDICACE

A ma famille et mes amis, sans qui tout cela ne serait jamais arrivé.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse, le Pr Michel Meunier qui m'a guidé pour la réalisation de ce projet ainsi que pour le soutien technique et financier le long de ce doctorat. Je remercie aussi les membres du jury qui ont accepté de siéger à ce comité d'évaluation.

Merci aux membres du réseau stratégique Biopsys de m'avoir immergé dans le monde du biomédical et pour leur assistance technique surtout pour des domaines tels que la chimie de surface ainsi que la biologie et l'hématologie. Je tiens à remercier particulièrement le Pr Chen Wang, le Pr Alexandre Brolo ainsi que Chiara Valsecchi pour ce projet entrepris dans la détection de la leucémie.

Un merci particulier à Sergiy Patskovsky, avec qui j'ai eu beaucoup de discussions intéressantes qu'elles soient reliées ou non à mon doctorat et avec qui j'ai beaucoup appris.

Un grand merci à tous les membres du LP2L (étudiant et stagiaire) qui m'ont accompagné le long de ce doctorat. Je voudrai aussi remercier les étudiants des autres équipes avec qui j'ai passé de très bons moments – merci à Patrick Lavoie (Patou), Paul Blondé (Polo) ainsi qu'à Dilek Isik. Enfin, je voudrai saluer particulièrement les membres de l'équipe originelle avec qui j'ai commencé : Sébastien Besner, Étienne Boulais, Paul Boyer, Julie Fantoni, Rémi Lachaine et David Rioux avec qui j'ai eu des moments mémorables et plus ou moins sérieux.

Un grand merci à ma famille, à celle d'Audrey et aux amis restés en France pour les bons moments passés ensemble. Merci à ma petite sœur Magali et à son conjoint Mathieu de nous avoir accompagnés dans cette aventure canadienne et leur soutien pendant les bons et aussi les mauvais moments.

Je voudrai surtout remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes choix, aider à franchir les étapes, me motiver lors des moments difficiles et qui malgré la distance ont toujours su être présent. Ils sont une source d'inspiration et j'espère être à la hauteur lorsque moi-même j'aurai des enfants.

Finalement, un remerciement spécial à ma conjointe Audrey Aubé qui m'a toujours encouragé, poussé à franchir les étapes et enduré pendant mes études. Merci ma puce d'avoir été présente pour moi tout ce temps-là.

RÉSUMÉ

Les biocapteurs sont actuellement des outils de plus en plus utilisés dans diverses applications telles que l'analyse moléculaire pour la recherche et l'industrie pharmaceutique, le contrôle environnemental dans l'industrie agroalimentaire et surtout dans la détection de marqueurs biologiques pour le diagnostic de maladie ou de cancer. Les technologies utilisant les transductions optiques de surface prennent de plus en plus d'espace dans ces domaines, car elles amènent plusieurs avantages : rapidité de la mesure, sensibilité à l'échelle moléculaire, possibilité de miniaturisation, et sans modification de la substance à étudier (fluorophore ou autres types de marqueurs)... Cependant, elles sont peu présentes dans le domaine médical du fait de leurs méconnaissances et qu'elles peuvent présenter certaines restrictions d'un point de vue de la sensibilité et de la gamme dynamique, ainsi qu'en matière de multiplexage.

Le propos de cette thèse est l'élaboration de biocapteurs à analyse polarimétrique basés sur des transductions optiques de surface telles que la réflexion totale interne ou les phénomènes plasmoniques; afin de proposer une plateforme permettant la détection de marqueurs pour une application biomédicale ou biochimique spécifique. Cette plateforme devra présenter les conditions nécessaires quant à la limite de détection, la gamme dynamique et le multiplexage nécessaire à ce type de test.

Le choix de la polarimétrie a été motivé par le fait que les méthodes de mesure de la polarisation et de la phase sont stables et présentent de faibles niveaux de bruits. Elles reposent sur l'analyse comparative entre deux polarisations orthogonales d'un même faisceau. Cela permet un autoréférencement de la mesure et une immunisation contre le bruit environnemental (dont les variations en température, en pression...). Cette propriété propre à l'étude polarimétrique permet de concevoir des instruments de meilleure résolution et donc d'obtenir une meilleure limite de détection.

Du choix de la polarimétrie découle le choix des transductions optiques de surface, qui présentent généralement une asymétrie dans leurs réponses entre deux polarisations orthogonales. Dans un premier temps, une étude bibliographique a permis de sélectionner plusieurs transductions optiques de surface présentant les meilleures capacités en matière de sensibilité. La première est le cas de la réflexion totale interne où les polarisations parallèles et perpendiculaires au plan d'incidence présentent des réponses différentes lors d'un événement biologique (dépôt de

molécule sur une surface, changement de solution). La résonance plasmonique de surface ainsi que la nanoplasmonique (avec un réseau de nanoligne d'or) affecte seulement une polarisation suite à un évènement biologique, laissant l'autre inerte et propre à être utilisée comme référence. Enfin, ces trois transductions ont été sélectionnées, car elles présentent toutes une limite de détection en matière d'indice inférieure à 10^{-6} RIU (unité d'indice de réfraction ou en anglais « refractive index unit ») ainsi qu'une large gamme dynamique, supérieure à un changement d'indice $\Delta n=10^{-3}$ RIU, qui peut satisfaire aux conditions requises pour la mesure de composés dans les milieux complexes.

Dans un second temps, l'étude et la réalisation de biocapteurs utilisant des transductions sues nommées ont été faites. Pour cela deux transductions ont été étudiées : la réflexion totale interne et les phénomènes plasmoniques sur des structures planaires et sur des nanostructures.

Dans le cas de la réflexion totale interne, un système polarimétrique permettant la séparation de l'information entre un dépôt de couche mince et un changement d'indice de réfraction a été conçu. En effet, la réflexion totale interne a la particularité d'avoir une réponse principalement en polarisation (angulaire) pour l'indice du milieu et en phase pour la couche mince. Le système développé a permis d'obtenir des performances pouvant aller à une limite de détection proche de $LoD=10^{-5}$ RIU (LoD pour « Limit of Detection » ou limite de détection) en matière d'indice et d'une fraction de nanomètre ($\Delta e=0.2\text{ nm}$, e représentant l'épaisseur de la couche biologique) pour la couche mince.

Dans le cas de la résonance plasmonique de surface, plusieurs systèmes ont été étudiés. Le premier porte sur une analyse de phase de la résonance plasmonique de surface (en anglais « Surface Plasmon Resonance » ou SPR). Le système conçu montre des limites de détection en indice de réfraction de $LoD=6*10^{-7}$ RIU, ce qui est très proche de ce qui se fait dans la littérature. Néanmoins, une gamme dynamique limitée nous a menés à étudier la SPR en polarisation avec un suivi de la position spectrale de la résonance. Les performances de ce système montrent une limite de détection aussi basse que $LoD=5*10^{-7}$ RIU tout en ayant une gamme dynamique égale à un changement d'indice $\Delta n=5*10^{-3}$ RIU et pouvant être étendue à $\Delta n=10^{-2}$ RIU.

Enfin, une plateforme nanoplasmonique basée sur un réseau de nanolignes d'or a été étudiée en phase et en polarisation. Dans un premier temps, une étude en phase de système de nanoligne d'or ayant une résonance à $\lambda=630\text{ nm}$ a été réalisée afin de déterminer la géométrie optimale.

Cette dernière a par la suite été intégrée dans un système similaire à celui développé pour la mesure de phase de la résonance plasmonique de surface et a montré des limites de détection de $LoD=3*10^{-6}$ RIU, de 10 à 100 fois meilleures que les résultats obtenus en intensité pour des géométries similaires. Dans la perspective d'obtenir de meilleures sensibilités, une étude de ces structures a été réalisée dans le proche infrarouge – mais les mesures expérimentales obtenues ne permettent pas de visualiser les améliorations prédictes par la théorie.

Enfin, une étude de cas a été réalisée et cette dernière porte sur le dépistage de la leucémie par une étude comparative de deux biomarqueurs présents dans le sérum sanguin. En effet, depuis les deux dernières décennies, de nombreuses études sérologiques ont été réalisées pour permettre la détection, la différenciation de la leucémie et de proposer une méthode de suivie lors de la thérapie. Ces études ont été poussées par la volonté d'avoir une méthode de détection simple, rapide et efficace pour la leucémie – cette dernière étant généralement diagnostiquée par l'utilisation d'une instrumentation lourde, coûteuse et invasive pour les patients (biopsie de la moelle épinière).

D'un point de vue sérologique, la leucémie est généralement marquée par une forte augmentation de lymphocytes B matures, qui induit une hausse d'un type spécifique (monoclonal) d'immunoglobuline (Ig), ne présentant qu'un seul type de structure (chaînes lourdes et légères). De plus, en raison d'une dégénérescence des lymphocytes produits, une détérioration rapide des immunoglobulines se manifeste, laissant la partie supérieure des anticorps (chaînes légères) libres et donc menant à une croissance de leur concentration dans le sérum. Il n'existe que deux types de chaînes légères chez l'humain : le type lambda ou le type kappa. Pour faire suite à ces observations de hausse de concentration, il a donc été proposé la surveillance du taux total (attachées aux Ig ou libres) des chaînes légères kappa et lambda pour dépister la leucémie, sachant qu'un seul type verra sa concentration croître dans le cas d'un patient atteint de leucémie.

De plus, les ratios en concentration pour les patients sains ou atteints sont bien documentés en référence aux nombreuses études réalisées, ce qui permet de fixer les différentes zones déterminant la condition du patient. Cependant, cette méthode de détection reste difficile à mettre en œuvre, surtout pour les technologies optiques. En effet, elle nécessite une instrumentation proposant des limites de détection similaires aux meilleurs systèmes présents sur le marché, tout

en ayant une gamme dynamique étendue du fait de la grande disparité en concentration des chaînes légères d'un patient à un autre.

Dans cette étude de cas, une comparaison des systèmes a été réalisée afin de déterminer la plateforme qui respectait au mieux les conditions nécessaires à la détection de la leucémie. Cette analyse repose sur trois paramètres distincts déterminés en tenant compte de la taille des molécules et de leurs concentrations dans les échantillons utilisés : la limite de détection doit être inférieure à $LoD=10^{-6} RIU$, la gamme dynamique doit être supérieure ou égale à un changement d'indice de $\Delta n=10^{-3} RIU$ et une capacité à réaliser plusieurs mesures simultanément (au moins deux) pour réaliser les analyses comparatives dans les mêmes conditions.

Une fois l'instrument proposant le meilleur compromis déterminé, des tests de dépistage de leucémie sont exécutés avec ce dernier afin de vérifier et de valider ses performances en conditions réelles (plasma sanguin). Pour cela, des tests ont été accomplis en utilisant du sérum humain provenant de 4 patients différents : un contrôle et trois patients atteints de différents types de leucémie lymphocytique chronique.

Les résultats acquis ont été confrontés avec ceux obtenus par des méthodes utilisées dans les hôpitaux. Ces données mesurées présentent des tendances très similaires et nous permettent de proposer ce système comme un outil performant, plus rapide, plus simple d'utilisation et potentiellement portable pour le dépistage de la leucémie.

Finalement, cette thèse propose un grand éventail de technologies optiques pour la biodétection permettant de couvrir un très large spectre d'applications, allant de l'agroalimentaire au biomédical. Une des technologies développées a été utilisée avec succès pour le biomédical montrant la possibilité à ce type de technologies optiques de surface d'être utilisé dans l'analyse de fluide complexe.

ABSTRACT

Biosensors are currently tools increasingly used in diverse applications such as molecular analysis for academic research and pharmaceutical industry, environmental monitoring in the food industry, and also in the detection of biomarkers for disease diagnosis or cancer. Technologies using surface photonic transduction for bio - detection are taking more space because they bring several advantages such as speed measurement, sensitivity at the molecular level, possibility of miniaturization, label free (fluorophore or other types of markers) ... However, they are not used in medical applications as they are unrecognized and they could present some limitations in terms of sensitivity and dynamic range, as well as multiplexing.

The purpose of this thesis is the development of biosensors with polarimetric analysis based on optical transduction occurring at surfaces, such as total internal reflection or plasmonic phenomena; in order to provide a platform for the detection of a specific marker for biomedical application. The proposed platform will must present sufficient limit of detection, dynamic range and multiplexing required for this type of test.

Choice of polarimetry is motivated by the fact that these methods for measuring polarization and phase are stable and present low level of noise. They are based on the comparative analysis between two orthogonal polarizations of a same beam. This permits a self-referencing measurement and immunization against environmental noise (temperature, pressure). These properties enable the design of instruments with better resolution and thus a better detection limit.

Choice of surface photonic transductions is driven by the use of polarimetry. They typically have an asymmetry in their responses between two orthogonal polarizations. Initially, a literature study is performed to select multiple optical transductions occurring at surfaces with the best capabilities for leukemia detection. In the case of total internal reflection, parallel and perpendicular polarizations to plane incidence have different response during a biological event (molecule deposition on a surface, changes in solution). The surface plasmon resonance and the nanoplasmonics (with a nanostructure grating) affect only one polarization after a biological event, leaving the other one inert and suitable for use as a reference. Finally, these three transductions are selected because they all have sensitivity and dynamic range that can meet the needs of the proposed measurement.

Secondly, the design and construction of biosensors using the selected transductions was done. Two transductions were studied: total internal reflection and plasmonic phenomena on planar structures and nanostructures.

In the case of total internal reflection, a polarimetric system has been designed to separate information of thin film deposition and a change in refractive index. Indeed, total internal reflection has the distinction of having a response mainly in polarization (angular) for the index or refraction and phase for thin layer. The developed system obtained performance up to a limit of detection close to $LoD=10^{-5}$ RIU in terms of refractive index of the tested medium and a fraction of a nanometer ($\Delta e=0.2\text{nm}$) for thin films.

In the case of surface plasmon resonance, several systems have been studied. The first is a phase analysis of the surface plasmon resonance (SPR). The system developed shows a limit of detection about $LoD=6*10^{-7}$ RIU, which is close to what is done in the literature. However, a limited dynamic range led us to study the SPR in polarization by monitoring spectral position of the resonance. The performance of this system showed a detection limit as low as $LoD=5*10^{-7}$ RIU while having a dynamic range equal to $\Delta n=5*10^{-3}$ RIU and extendable to $\Delta n=10^{-2}$ RIU.

Finally, nanoplasmonics platforms based on a network of nanoline of gold was studied in phase and polarization. First, a phase study has been performed on gold nanoline having a resonance at $\lambda=630\text{ nm}$ in order to determine the optimum geometry of these structures. This optimum grating has been incorporated into an optical setup similar to the one developed for measuring phase of the surface plasmon resonance system and it showed detection limits of $LoD=3*10^{-6}$ RIU, which is 10 to 100 times better than the results obtained with intensity based platform with similar geometries. In the prospect of better sensitivity, a study of these structures was achieved in the near infrared - but the experimental measurements obtained doesn't show improvement predicted by the theory.

A case study has been performed to test optical platform, which is based on the detection of leukemia through a comparative study of two biomarkers present in blood serum. Indeed, over the past two decades, many serological studies were performed to enable the detection, differentiation of leukemia and also monitoring of the therapy. These studies were driven by the will to get a fast, quick and efficient detection method for leukemia, which is right now

diagnosed using heavy and expensive instrumentations and that are invasive for patients (bone marrow biopsy)

In a serological point of view, leukemia is usually marked by a sharp increase in mature B-cell, accompanied by a rise of a specific (monoclonal) immunoglobulin (Ig), having only one type of structure (heavy and light chains). In addition, due to degeneration of produced B-cell, a rapid deterioration of immunoglobulin occurs, leaving the upper part of antibodies (light chain) free and therefore leading to an increase in their concentration in the serum. There are only two types of light chains in humans: the lambda or kappa -type. Following these observations of increased concentration, it has been proposed monitoring total rate (attached or free Ig) kappa and lambda light chains to detect leukemia, as only one type will increase its concentration in the case of a leukemic patient.

In addition, concentration ratios for healthy or sick patients are well documented with many studies. These allow setting up different areas determining patient conditions. However, this detection method is difficult to implement, especially for optical technologies. Indeed, it requires instrumentation offering similar detection limits to the best systems on the market, while having a wide dynamic range due to the large disparity in concentration of light chains from a patient to another.

In this study, a comparative analysis of systems is conducted to determine the platform that meets the best conditions for the detection of leukemia. This analysis is based on three different parameters determined using data from literature and theoretical model taking into account the size of the molecules and their concentrations in the samples used. The detection limit should be less than $LoD=10^{-6} RIU$ (refractive index unit or unit refractive index), the dynamic range must be greater than or equal to a change in index of $\Delta n=10^{-3} RIU$ and the ability to perform several measurements simultaneously (at least two) to perform comparative analysis under the same conditions.

Once the instrument offering the best compromise determined, leukemia test are executed to verify and validate its performance in real conditions (blood plasma). For this purpose, tests were performed using human serum from four different patients: one control and three patients with different types of chronic lymphocytic leukemia.

The results obtained were compared with those obtained by the methods used in hospitals. As data acquired show similar trends, they allow us to offer this system as a faster, easier powerful tool for the detection of leukemia which could be hand-held in a close future.

Finally, this thesis proposes numerous optical technologies for biodetection purpose allowing to cover a wide spectrum of applications, from food industry to biomedical. One of the developed technologies has been used successfully for biomedical detection showing that these surface optical technologies could be used for complex fluid analysis.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT.....	IX
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVIII
LISTE DES FIGURES	XIX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXVI
LISTE DES ANNEXES	XXVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique	3
1.2 Aspects établis du doctorat.....	4
1.3 But de l'étude.....	5
1.4 Objectifs de la thèse	5
1.5 Organisation de la thèse	7
CHAPITRE 2 TRANSDUCTIONS OPTIQUES POUR LA BIODETECTION.....	9
2.1 Introduction à la biodétection	9
2.2 Rappels théoriques en optique de surface	10
2.2.1 Propriétés fondamentales des ondes électromagnétiques.....	10
2.2.2 Notions de polarisation.....	11
2.2.3 Propriété des ondes électromagnétiques aux interfaces – théories de Fresnel	16
2.3 Concept de plasmon de surface	22
2.3.1 Les métaux et leurs propriétés optiques	23

2.3.2 Le plasmon de surface	25
2.3.3 Mode de propagation du plasmon de surface – relation de dispersion – couplage onde/plasmon.....	26
2.3.4 Méthode d'excitation du plasmon de surface	31
2.3.5 La SPR pour les biocapteurs.....	35
2.4 Revue de littérature des méthodes pour la biodétection.....	39
2.4.1 Guide d'onde interférométrique par double polarisation	39
2.4.2 Miroir résonant.....	42
2.4.3 La réflexion totale interne (ellipsométrique)	44
2.4.4 La résonance plasmonique de surface	45
2.5 Choix des transductions étudiées pour l'analyse des fluides complexes	46
CHAPITRE 3 SECTION EXPERIMENTALE ET TECHNOLOGIQUE.....	49
3.1 Technologie utilisée pour l'analyse polarimétrique.....	49
3.2 Préparation, fabrication et caractérisation des échantillons	52
3.2.1 Nettoyage / préparation des substrats / échantillons	52
3.2.2 Dépôt de métal sur un substrat.....	54
3.2.3 Gravure de motifs sur une couche métallique	55
3.2.4 Caractérisation des échantillons.....	56
3.3 Cellule de mesure pour analyse en milieu liquide	58
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : POLARIMETRIC TOTAL INTERNAL REFLECTION BIOSENSING.....	59
4.1 Auteurs et affiliations	59
4.2 Abstract	59
4.3 Introduction	60
4.4 Instrumental methodology.....	61

4.5	Experimental setup optimization and phase sensitivity	63
4.6	Results and discussion.....	66
4.7	Conclusion.....	67
4.8	Acknowledgement	68
4.9	Compléments : Discussions sur les applications possibles	68
CHAPITRE 5 SENSEUR OPTIQUE BASÉ SUR LA RÉPONSE POLARIMÉTRIQUE DE LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE EN CONFIGURATION KRETSCHMANN.....		71
5.1	Introduction	71
5.2	Rappel sur la réponse plasmonique de surface	71
5.2.1	Réponse angulaire	73
5.2.2	Réponse spectrale.....	74
5.3	Système de mesure de phase	76
5.3.1	Introduction.....	76
5.3.2	Principe et instrumentation	77
5.3.3	Performances de la plateforme proposée.....	80
5.3.4	Discussion et applications possibles	82
5.4	Système de mesure de polarisation	84
5.4.1	Introduction.....	84
5.4.2	Principes	85
5.4.3	Instrument et calibration.....	86
5.4.4	Performances de la plateforme proposée.....	90
5.4.5	Discussion et possibles applications	93
CHAPITRE 6 ARTICLE 2 : PHASE SENSITIVE SENSOR ON PLASMONIC NANOGRATING STRUCTURES.....		95

6.1	Auteurs et affiliations	95
6.2	Abstract	96
6.3	Introduction	96
6.4	Basic idea and approach.....	97
6.5	Instrumental methodology.....	102
6.6	Results and discussion.....	103
6.7	Conclusion.....	105
6.8	Acknowledgement	105
6.9	Résultats complémentaires : analyse polarimétrique des nanostructures dans le proche infrarouge	105
6.9.1	Structure étudiée	107
6.9.2	Résultats expérimentaux.....	108
6.9.3	Estimation des performances et applications possibles pour les plateformes nanoplasmoniques.....	109
CHAPITRE 7 ÉTUDE DE CAS : LA DETECTION DE LA LEUCEMIE VIA UNE ANALYSE DU SÉRUM HUMAIN		112
7.1	Analyse comparative des transductions	112
7.1.1	Définitions des spécifications nécessaires pour la détection de la leucémie	112
7.1.2	Récapitulatif, comparaison et détermination des spécifications des instruments présentés dans cette thèse.....	114
7.2	Article 3 : Leukemic marker detection using a spectro-polarimetric surface plasmon resonance platform	115
7.2.1	Auteurs et affiliations	115
7.2.2	Abstract.....	116
7.2.3	Introduction.....	116

7.2.4 Principle and instrumentation	118
7.2.5 Materials and methods.....	120
7.2.6 Results	124
7.2.7 Discussions	126
7.2.8 Conclusion	127
7.2.9 Acknowledgements	127
7.3 Commentaires et remarques sur l'étude de cas.....	127
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE	130
8.1 Méthodologie du doctorat.....	130
8.2 Forces et défis de ce projet de doctorat	133
8.2.1 Bilan des systèmes développés	133
8.2.2 Forces et défis de l'application proposée dans l'étude de cas	135
8.2.3 Vers une possible commercialisation de l'application de la détection de la leucémie	136
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	139
BIBLIOGRAPHIE	143
ANNEXE	156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Représentation de Jones de plusieurs vecteurs types.....	15
Tableau 2-2 : Comparaison des plateformes vues dans la revue de littérature (avec leurs références pertinentes)	48
Tableau 4-1 : Comparaison des sensibilités selon le prisme.....	69
Tableau 5-1 : Résultats de l'expérience pour la détermination de la meilleure amplitude de modulation.....	80
Tableau 7-1: Récapitulatif des spécifications des instruments développés durant le projet de doctorat.....	114
Tableau 7-2 : Monoclonal and polyclonal immunoglobulins in serum samples of normal control and patients.....	121
Tableau 7-3 : Comparison between estimated and measured ratio.....	126
Tableau 8-1 : Définition de la sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative.	138

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	9
Figure 2-2 : Visualisation de l'état de polarisation linéaire	12
Figure 2-3 : Visualisation de l'état de polarisation circulaire.	12
Figure 2-4 : Visualisation d'un état de polarisation elliptique.	13
Figure 2-5 : Représentation elliptique d'un état de polarisation.....	13
Figure 2-6: Schématisation des deux cas de réflexions / réfraction entre deux milieux – la réflexion dure présentant un déphasage de π après la réflexion et la réflexion molle ne présentant pas ce déphasage dans la réflexion.	17
Figure 2-7 : Système de réflexion et transmission pour le calcul d'une réflexion totale de la couche. Plusieurs contributions provenant de la réflexion à la première interface ainsi que l'interaction de l'onde avec la couche elle-même doivent être prises en compte.	18
Figure 2-8: Cas généralisé d'un système multicouche pour le calcul des coefficients de transmission et de réflexion de ce système.	19
Figure 2-9 : Réflexion sous trois conditions angulaires et dont l'interface présente les propriétés pour l'obtention d'une réflexion totale interne. a- cas d'une onde incidente ayant un angle d'incidence inférieur à l'angle critique, b- cas d'une onde incidente ayant un angle d'incidence égal à l'angle critique – l'onde transmise est parallèle à l'interface, c- cas d'une onde incidente ayant un angle d'incidence supérieur à l'angle critique – pas d'onde radiative transmise.	21
Figure 2-10 : Permittivité diélectrique de l'or – la ligne noire illustre la dépendance de la partie réelle de la fonction diélectrique en fonction de l'énergie (propriété de polarisabilité du support) - la ligne rouge décrit la dépendance de la partie imaginaire de la fonction diélectrique en fonction de l'énergie (propriété de pertes par absorption ou réémission)....	24
Figure 2-11 : Géométrie pour l'analyse du mode de propagation du plasmon. Le milieu du haut est le milieu diélectrique noté d – le milieu du bas est le métal noté m.....	26
Figure 2-12 : Relation de dispersion du plasmon de surface	30

Figure 2-13 : Principe de couplage entre le plasmon de surface et une onde électromagnétique.	30
Figure 2-14 : Schéma de couplage par prisme selon configuration de Kretschmann ou d'Otto....	32
Figure 2-15 : Comparaison des relations de dispersions des ondes EM excitatrices et du plasmon de surface; a- cas de la réflexion totale interne frustrée, b- cas de l'excitation par réseau	33
Figure 2-16 : Schéma illustrant le couplage d'une onde EM incidente sur un réseau avec un plasmon de surface.....	34
Figure 2-17 : Schématisation de la transmission optique extraordinaire.....	35
Figure 2-18 : Principe de biodétection via une transduction plasmonique.....	36
Figure 2-19 : Réponse angulaire du plasmon de surface suite à une variation d'indice de $\Delta n = 10^{-3}$ RIU dans le milieu - la courbe continue est pour l'eau, la courbe en pointillé est pour le diélectrique avec l'indice de l'eau majoré de $\Delta n = 10^{-3}$ RIU. a- changement angulaire de la résonance, b- changement spectral de la résonance.....	38
Figure 2-20 : Étude statique de l'intensité et de la phase selon les mêmes conditions expérimentales présentées dans la première méthode d'analyse.....	38
Figure 2-21 : Système de guide d'onde interférométrique basé sur deux guides d'ondes dont les ondes en sorties vont interférer de la même manière que l'expérience des fentes d'Young. Le guide du haut est le senseur, car exposé au milieu à tester. Le guide du bas est la référence, car isolé optiquement de toute variation.	40
Figure 2-22 : Interférogramme type obtenu avec les guides d'ondes interférométriques — la courbe en noir est pour un déphasage de 0 degré, la courbe en rouge est pour un déphasage de $\Delta\phi = 15^\circ$	41
Figure 2-23 : Système de miroir résonant basé sur un empilement d'une couche à faible indice ($n=1.45$, $e=1000nm$) permettant la réflexion totale interne et d'une couche à haut indice ($n=1.8$ $e=100nm$) servant de guide d'onde pour l'onde évanescante transmise par effet tunnel optique.	42
Figure 2-24 : a- Réponse en intensité sans analyseur – aucun changement d'intensité n'est à noter nous permettant de conclure à l'absence d'interférence constructive ou destructive; b- Réponse en intensité après l'analyseur – mélange de l'information en intensité et en phase	

des polarisations -p et -s. Trois conditions expérimentales observées : en noir – miroir résonant dans l'eau, en rouge – miroir résonant dans l'eau majoré d'une valeur de $\Delta n=10^{-3}$ en indice de réfraction, en bleu – miroir résonant dans l'eau avec la présence d'une couche de $e=10\text{nm}$ d'indice $n=1.47$ sur le guide d'onde.	43
Figure 2-25 : Configuration en réflexion totale interne — l'analyse du faisceau sonde peut-être soit en étudiant la réponse angulaire, soit la réponse spectrale de la réflexion totale interne.	44
Figure 2-26 : Systèmes plasmoniques - a- configuration Kretschmann, b- configuration nanoplasmonique	45
Figure 3-1 : Système d'analyse de phase avec modulation photoélastique	50
Figure 3-2 : a-schéma illustrant le principe de fonctionnement de l'évaporateur thermique ; b- schéma d'un dispositif pour dépôt de matériel par Electron Beam Physical Vapor deposition	54
Figure 3-3: a- Image en microscopie électronique d'un réseau de nanolignes d'or de $\Lambda=600\text{ nm}$ de période ; b- exemple d'image topographique obtenue avec AFM d'un réseau de nanolignes d'or de $\Lambda=1000\text{ nm}$ de période ; c- même image en contraste de phase de la surface.	57
Figure 3-4 : cellule de mesure à un canal (a), deux canaux (b) et pour la nanoplasmonique (c)...	58
Figure 4-1: Optical set-up for polarimetric measurement.Instrumental methodology.....	61
Figure 4-2 : (a) Theoretical angular polarimetric curve (APC) with different initial retardance α . (b) Comparison of APC ($\alpha=-\Delta\phi_{max}$ solid lines) with SPR (dashed lines). Black curves are for tests in water and red curves after 10^{-2} RIU bulk changes; blue curves show influence of surface thin film deposition ($e=10\text{ nm}$, $n=1.45$).	63
Figure 4-3 : (a) Phase sensitivity experiment (phase: black line, polarimetric signal: red line) (b) Experimental results for first harmonic with the same retardance as in Figure 4-2.....	64
Figure 4-4 : (a) Angular Polarimetric Curve with different beam propagation geometry. (b) Working distance minimizing the influence of the convergence/divergence near the focal point; Inset: Measured propagation Gaussian beam near the focal point.	65

Figure 4-5 : (a) Angular variation of the peak position for different refractive index solutions. (b) Responses of the system with different concentrations of Bovine Serum Albumin.	67
Figure 4-6: Comparaison des pics polarimétriques de la réflexion totale interne pour les différents matériaux énoncés précédemment.	70
Figure 5-1: a- partie réelle de la permittivité électrique de la couche mince d'or utilisée pour les tests; b- partie imaginaire de la permittivité diélectrique.....	72
Figure 5-2: a- Courbe en intensité de la réflexion selon la polarisation -p (en noir) et la polarisation -s (en rouge) – les courbes continues sont les courbes pour l'eau, les courbes en pointillés sont pour un milieu d'indice incrémenté d'une valeur de $\Delta n=10^{-3}$ RIU; b - courbe de la réponse en phase selon les mêmes conditions.	73
Figure 5-3: Étude de linéarité de la réponse plasmonique dans le cas angulaire - variation de la position du pic plasmon (symbole et ligne noire) et mesure de phase statique (symbole et ligne rouge).....	74
Figure 5-4: Courbe en intensité de la réflexion selon la polarisation -p (en noir) et la polarisation -s (en rouge) – les courbes continues sont les courbes pour l'eau, les courbes en pointillés sont pour un milieu d'indice incrémenté d'une valeur de $\Delta n=10^{-3}$ RIU; b - courbe de la réponse en phase selon les mêmes conditions.....	75
Figure 5-5 : Étude de linéarité de la réponse plasmonique dans le cas spectral - variation de la position du pic plasmon (symbole et ligne noire) et mesure de phase statique (symbole et ligne rouge).....	75
Figure 5-6: Figure représentant le système optique utilisé pour la mesure de phase pure avec un biocapteur SPR.	77
Figure 5-7: Courbe de calibration du modulateur photo-élastique - les lignes en continu représentent les valeurs de harmoniques pour différentes modulations de phase - courbe en pointillé, comparaison avec les courbes de Bessel.....	79
Figure 5-8: Tests de performance en phase pure. Des sauts successifs de $\Delta\phi=0.05^\circ$ ont été réalisés grâce au compensateur de Soleil-Babinet montrant la grande résolution du système ainsi que sa stabilité sur plusieurs minutes.	81

Figure 5-9: a- Courbe angulaire de phase pour la réponse plasmonique de l'azote (en noir) et de l'argon (en rouge), en incrusté : zoom sur la partie sensible où il est possible de voir l'écart entre les deux courbes; b- Analyse statique de la variation entre l'azote et l'argon en fonction du temps.....	82
Figure 5-10: Comparaison des réponses en position de la résonance et en phase en fonction de la variation d'indice de réfraction du milieu testé.....	84
Figure 5-11: Comparaison des courbes spectrales de réflectivité et de polarisation dans le cas de la résonance plasmonique de surface – en noir courbe en intensité, en rouge courbe en polarisation.....	85
Figure 5-12: Schéma de l'instrument - incrusté: intensité selon la polarisation -p (courbe noire), la polarisation -s (courbe rouge) et la réflectivité (courbe en pointillé).	87
Figure 5-13 : A gauche image au microscope de l'échantillon étudié. A droite, image spectrale d'une portion de l'échantillon (rectangle noir sur l'échantillon) avec en axe des abscisses la longueur d'onde et en ordonné la dimension spatiale.....	88
Figure 5-14 : Représentation de l'effet fantôme selon plusieurs temps d'intégration de la caméra (a,b,c,d,e,f). Le graphe présente le profil de l'acquisition selon une intensité normalisée....	89
Figure 5-15 : Principe de fonctionnement de l'acquisition et de la visualisation des données en mode imagerie / multi-senseur. Dans le mode imagerie, la mesure de la position de la résonance est exécutée pour chaque ligne de la caméra CCD. Dans le mode multi-senseur, cette mesure de la position de la résonance est effectuée pour des groupes définies de ligne – chaque paquet étant assimilé comme une ligne par la caméra (sommation matérielle des lignes de pixels).....	90
Figure 5-16: Mesure des performances avec le mode imagerie - test en phase gazeuse – différence entre air sec (valeur haute) et azote (valeur basse). L'image du haut est la représentation de la réponse spectrale de chaque ligne. L'image du bas sont les courbes de la réponse spectrale pour une ligne (bleue) et pour la moyenne de toute les lignes (rouge).....	91
Figure 5-17: a- Test en milieu liquide avec une succession des solutions ayant différentes concentrations d'éthanol ; b- test de couche mince avec la mesure de l'adsorption de la BSA (bovine serum albumin) en fonction de différentes concentrations massiques.....	92

Figure 6-1: a) Schematic representation of the nanograting with period d, ridge size r, slit size s and thickness h; b) Intensity and phase of the light transmitted through the nanoslit array with 600nm period, 450nm ridge size and 100 nm thickness.	97
Figure 6-2: a) Theoretical spectral phase curves for nanograting structures with different ridge sizes; dashed blue line presents a shifted spectral phase curve for r=450nm resulting from a change in refractive index equal to 3×10^{-3} RIU; b) Experimental spectral phase characteristics.	98
Figure 6-3: Theoretical (solid curves; scale on the left) and experimental data (points; scale on the right) for phase sensitivity dependence on the ridge sizes.....	99
Figure 6-4: Theoretical results for optimal grating thickness and corresponding working wavelength position for different ridge sizes; Inserts: Typical phase curves for marked region.	100
Figure 6-5: Experimental phase dependences for different incident angles.....	101
Figure 6-6: AFM sample images and optical set-up for phase measurements.	102
Figure 6-7: (a) Phase sensitivity experiment. b) Determination of optimal incident angle.....	103
Figure 6-8 : Experimental results for phase under the replacement of pure N ₂ by Ar.....	104
Figure 6-9 : a- Étude de la sensibilité des structures nanoplasmoniques (pas de réseaux de $\Lambda=500\text{ nm}$ à $\Lambda=1000\text{ nm}$ par pas de $\delta\Lambda=100\text{ nm}$) en fonction de la longueur d'onde de la résonance – chaque symbole correspond à un pas de réseau – le milieu d'étude étant l'eau; b- Étendue spatiale du plasmon de surface dans le milieu à tester – plus la longueur d'onde de résonance est grande plus la sonde est profonde.	106
Figure 6-10 : a- Figure AFM avec profil montrant les caractéristiques géométriques de l'échantillon; b- Réponse en intensité de l'échantillon selon la polarisation TM (noir) et TE (rouge) pour l'eau (ligne continue) et un milieu d'indice supérieur de $\Delta n=0.01$ RIU (ligne pointillée); c- Réponse en polarisation pour l'eau (ligne continue) et pour le second milieu (ligne pointillée); d- Réponse en phase selon la polarisation TM (noir) et TE (rouge) pour l'eau (ligne continue) et pour le second milieu (ligne pointillée).	108

Figure 6-11: a- Résultats expérimentaux en polarisation de la structure étudiée avec l'eau (courbe noire) et l'éthanol (rouge) comme milieu à analyser; b- résultats expérimentaux en phase pour les mêmes conditions.....	109
Figure 7-1: Chart illustration of a normal (healthy) person and leukemic patients presenting over expression of either κ or λ light chains.....	118
Figure 7-2: a- Optical setup used in the experiments; inset: spectral curve acquired on p-polarization (black continuous), s-polarization (red continuous) and the ratio between the p and the s polarizations (black dashed); b- Characterization test using sequentially a 0.1, 0.2 and 0.5% Vol. ethanol solution	119
Figure 7-3: Schematic illustration of the experimental protocol	122
Figure 7-4: Surface functionalization steps. a- Adsorption of protein G and BSA respectively steps 1 and 2 of Figure 7-3, b- Antibodies adsorption on protein G (step 3 on figure 7-3).	123
Figure 7-5: a- SPR kinetics data of control sample (normal case) of human serum in contact to both anti-kappa- and anti-lambda-modified surfaces; b- Same experiments with the G- λ human serum sample (leukemia patient, see Table 7-2).....	124
Figure 7-6: a- Surface validation results with tested standard κ and λ light chain immunoglobulin on respectively anti- κ and anti- λ surfaces; b- κ - λ ratios – in blue: ratios obtained by standard analytical method for the determination of immunoglobulin (used in hospital); - in red: κ - λ ratios obtained with the proposed SPR method.	125
Figure 7-7 : a – Comparaison des réponses entre le canal 1 et le canal 2 pour un même changement d'indice de réfraction (eau à solution de $C=0.1\%$ Vol. d'éthanol) ; b – Comparaison entre les deux canaux pour une adsorption de couche mince (étapes 1 et 2 décrites dans l'article portant sur la détection de la leucémie).....	129

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AC : partie alternative d'un signal

AFM : Atomic Force Microscopy – microscopie à force atomique

B : induction magnétique

D : déplacement électrique

deg. : degree(s)

DC : partie continu signal

E : champ électrique

FIB : Focus Ion Beam / faisceau d'ion focalisé

H : champ magnétique

I : intensité lumineuse

J_n : nième fonction de Bessel

k : vecteur d'onde

LIDAR : LIght Detection And Ranging – télédétection par laser

LoD : Limit of Detection – limite de détection

M : matrice de transfert dans formalisme d'Abeles et formalisme de Jones

n : indice de réfraction

p : taux de polarisation (formalisme de Stokes)

P : orientation du vecteur polarisation

p- : parallel – pour polarisation parallèle

s- : senkrecht – pour polarisation perpendiculaire

r : coefficient de réflectivité

R : réflexion en intensité

RCWA : Rigorous Couple Waves Analysis – analyse rigoureuse des ondes couplées

RI : refractive index – indice de réfraction

RIU : Refractive Index Unit – unité d'indice de réfraction

RSB / SNR : Ratio Signal sur Bruit – Signal to Noise Ratio

S : sensibilité de la mesure

SEM / MEB : Scanning Electron Microscopy / Microscopie Électronique à Balayage

SPR : Surface Plasmon Resonance – résonance plasmonique de surface

t : coefficient de transmission

T : transmission en intensité

TIR : Total Internal Reflection – réflexion totale interne

ϵ : permittivité diélectrique d'un matériau

ϕ : phase

$\delta\phi$: déphase entre deux polarisations

Γ : coefficient d'amortissement phénomène de résonance

κ : coefficient d'absorption dans les matériaux

λ : longueur d'onde

Λ : période de réseau

ω : pulsation d'une onde

θ : angle

ψ : angle de polarisation

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Liste des contributions de l'auteur.....	156
---	-----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La biodétection est un concept qui existe depuis l'antiquité. Il est en effet possible de dire que les gouteurs ayant servi auprès des rois et empereurs des civilisations antiques ont été les premiers biocapteurs. Ces derniers avaient le rôle de gouter les plats de leurs maîtres et leurs réactions permettaient de déterminer si le plat était empoisonné ou non. Les premiers biocapteurs, tels qu'ils sont conçus actuellement, ont fait leur apparition au 20^{ème} siècle. La première expérience réalisée fut l'immobilisation de protéine sur du charbon actif en 1916 par Nelson et Griffin [1]. En 1922, Hughes créa la première électrode permettant la mesure de pH dans les milieux liquides [2]. Le premier biocapteur a été réalisé par le Dr Leland C. Clark Jr. en 1956. Il consistait à détecter l'oxygène dans le sang [3]. Six ans plus tard, il étudia l'effet d'enzymes sur ce biocapteur et construisit la première électrode enzymatique pour la détection du glucose dans le sang [4].

L'analyse de composés biologiques dans plusieurs domaines tels que le biomédical, l'environnement, l'alimentaire et autres contrôles de procédés est devenue courante [5]. En effet, ces dispositifs permettent de mesurer le taux de glucose dans le sang, d'analyser différents pathogènes présents dans un échantillon sanguin ou de toute autre nature. Ils permettent de mesurer le nombre de bactéries présentes dans des échantillons alimentaires afin de contrôler la fermentation (dans des produits tels que le yogourt, les boissons alcoolisées...) ou de détecter des toxines dans l'air (prévention d'attaque chimique ou bactériologique). Cette détection ou analyse se fait en réalisant une transformation du signal biologique, généralement une interaction entre deux espèces chimiques en un signal mesurable.

Ces dispositifs suivent une chaîne de réactions qui débute par une interaction avec un élément de reconnaissance et l'espèce biologique à observer. Cette réaction est transformée par le biais d'un transducteur en un signal mesurable qui peut être de plusieurs types. La dernière étape de cette chaîne consiste à extraire et analyser cette mesure. Il existe un grand nombre de transductions mentionnées dans la littérature, dont les transductions électriques [6, 7], massiques [8-11], et optiques [12-16]. Plusieurs types de biocapteurs utilisant ces différentes transductions sont disponibles commercialement. Les principaux sont basés sur une mesure du changement de masse avec les microbalances à quartz. Les biocapteurs conductimétriques sont quant à eux basés sur des variations de conductivité/résistivité d'un substrat en présence de matériel biologique et

les biocapteurs optiques sont basés sur des variations de paramètres optiques tels que la diffusion, l'absorption ou le changement d'indice réfractifs d'un média.

Les biocapteurs optiques sont actuellement les plateformes les plus développées pour l'analyse de média biologiques. Ils se retrouvent dans un vaste champ d'application tels que le biomédical, le pharmaceutique, mais aussi l'environnement, l'alimentaire et la défense. Les transductions optiques ont plusieurs avantages par rapport à d'autres mécanismes dont le principal est l'utilisation de la lumière elle-même. En effet, il est possible de multiplexer un grand nombre de signaux en même temps en utilisant plusieurs notamment longueurs d'onde. C'est ce qu'il est possible d'observer par exemple en spectroscopie d'absorption où un large spectre est utilisé pour obtenir la signature d'une molécule. Cette signature est propre à sa structure électronique ou vibratoire/rotationnelle et l'information de chaque état n'interfère pas avec d'autres. De plus, grâce à la lumière, il est aussi possible de sonder à distance sans avoir recours à une connexion filaire avec le transducteur. Un sondage en surface avec la lumière est aussi réalisable en utilisant des phénomènes de surface tels que le guidage d'onde ou la résonance plasmonique de surface qui va donner toute l'information sur la biologie qui est à proximité de cette dernière. Il est aussi à noter que la taille des sondes proposées par ces techniques de surface est du même ordre de grandeur que la biologie permettant une utilisation complète de ces dernières. Ces plateformes optiques proposent aussi de très bonnes sensibilités et limite de détection. Enfin, les biocapteurs optiques profitent du développement de l'instrumentation optique lié aux développements des télécommunications ce qui permet à cette technique d'être peu coûteuse et performante.

Plusieurs phénomènes existent pour transformer le signal biologique en une variation des paramètres du faisceau sonde. Nous pouvons citer les suivants :

- la luminescence (comme la fluorescence);
- l'absorbance (telle que la spectroscopie);
- la diffusion (application dans le « dynamic light scattering »);
- les phénomènes de surface (tels que la réflexion ou la réfraction sur une ou plusieurs interfaces).

Pour chacune de ces techniques, la lumière sert de sonde. Elle interagit avec le milieu et en ressort avec des modifications de ses paramètres qui sont liées à la biologie présente. Ces

paramètres peuvent être autant un changement dans l'intensité lumineuse, qu'une variation de longueur d'onde, ou bien une évolution de la polarisation et/ou de la phase.

Dans cette thèse de doctorat, nous allons focaliser notre attention sur les biocapteurs optiques de surface. En effet, cette technologie, bien connue, fait l'objet de plusieurs commercialisations dont la plus réputée est celle de BiaCore [17] utilisant la résonance plasmonique de surface. Il doit cependant être noté que ce type de biocapteurs optiques de surface est principalement cantonné à des applications analytiques pour la recherche académique [18], ou pour des applications pharmaceutiques [12, 17] – principalement la découverte et l'analyse de composés biochimiques pour le développement de nouveaux médicaments.

Toutefois, ce type de plateforme a beaucoup d'avantages à offrir à d'autres secteurs comme le médical ou le contrôle environnemental. Ces biocapteurs proposent des analyses rapides [19-21], avec de très bonnes sensibilités [22-27]. De nombreuses études portent aussi sur leur miniaturisation [28-31] pour les intégrer dans des systèmes de laboratoire sur puce [31-39] afin de proposer des systèmes à faibles coûts. Enfin, ils ont fait l'objet de plusieurs études sur des thèmes médicaux telles que l'analyse de pathogènes [21, 40-44] ou de marqueurs spécifiques pour la maladie d'Alzheimer [45-47], du S.I.D.A. [48] ou de la tuberculose [49] pour ne citer que ces exemples. Ils se retrouvent aussi dans des applications d'analyse de bactéries dans les milieux du traitement des eaux usées, mais aussi pour le contrôle de contaminants dans les produits agroalimentaires [50-53] ou pour le contrôle de produits fermentés (vin) [54].

1.1 Problématique

L'auteur s'intéresse aux applications de biodétection dans un milieu complexe tels que les fluides humains (comme le sang, urine et tous autres fluides corporels), les eaux usées ainsi que les produits de l'industrie agroalimentaire (dont le lait, produits issus de fermentation,...). Ces applications représentent un défi pour les plateformes optiques, car les liquides à analyser présentent une forte turbidité, ce qui nuit aux techniques nécessitant une transmission du faisceau sonde. De plus, ils sont accompagnés de fortes variations en indice de réfraction, nécessitant d'avoir des systèmes avec de très grandes gammes dynamiques dans le cas de plateformes réfractométriques. Enfin, ces liquides comportent aussi de nombreux composants à analyser, nécessitant parfois des systèmes hautement multiplexés.

La faible présence de plateformes optiques dans ce type d'application montre qu'il reste un travail à réaliser pour les adapter à l'analyse de ce type de fluide. L'intérêt de cette thèse est de développer des systèmes qui sont performants malgré les défis.

Une étude de cas a été réalisée pour démontrer l'application de ces biocapteurs dans des milieux complexes. Elle porte sur le dépistage de la leucémie via une analyse du sérum humain. Cette dernière a pour but d'offrir une plateforme de détection précoce, mais aussi de suivi thérapeutique des patients tout en limitant les coûts de ces méthodologies. Cet intérêt provient du fait qu'il n'existe pas de méthode recommandée pour le dépistage de cette maladie [55] et que cette dernière est généralement détectée lors d'un contrôle sanguin ou lorsque les symptômes apparaissent. Un test de dépistage est, par définition, rapide, peu couteux et présente une bonne sensibilité et spécificité (faible niveau de faux négatifs et de faux positifs). À l'opposé, les techniques actuellement utilisées pour le diagnostic, telles que la cytométrie en flux pour l'analyse des lymphocytes B, la biopsie de la moelle épinière ainsi que des études sérologiques et génétiques, sont généralement longues, dispendieuses et requièrent du personnel hautement qualifié.

Afin de pouvoir répondre à ce besoin, une plateforme de détection optique doit être développée. Pour cela, les méthodes de mesures doivent être étudiées ainsi que les transductions optiques qui permettront de transformer le signal biologique en un paramètre mesurable. De plus, il doit être déterminé quels sont les marqueurs utiles à la détection de la leucémie, mais aussi s'ils sont compatibles avec ce type de biodétection.

1.2 Aspects établis du doctorat

Dans ce doctorat, plusieurs aspects du projet ont été fixés par différentes contraintes matérielles ainsi que pour restreindre le champ d'application de cette thèse.

Le premier aspect fixé pour ce doctorat est l'utilisation de la polarimétrie comme méthode de mesure optique. Ces techniques, qui permettent de mesurer la polarisation et la phase, proposent d'excellents rapports signal sur bruit. Elles utilisent deux polarisations orthogonales d'un même faisceau, permettant de faire un autoréférencement du signal mesuré. De plus, ce type de mesure amène des informations supplémentaires sur les propriétés d'un système comme sa birefringence ou son dichroïsme. Plusieurs applications nécessitant de faibles niveaux de bruits

ont adopté ces mesures polarimétriques. Il peut être cité la détection et l'étude des exoplanètes [56-59], les systèmes de détection à distance comme le LIDAR [60-62], ainsi que dans certains biocapteurs optiques [63-67].

Le second est la méthodologie utilisée pour l'étude de cas : la détection de la leucémie. En effet, elle provient de la collaboration du groupe de recherche du Pr Michel Meunier avec le Pr Wang, hématologue à l'hôpital du Mont Sinaï à Toronto. En effet, ces groupes appartenaient au réseau stratégique du CRSNG (Conseil de Recherche en Science Naturelle et en Génie du Canada) «BIOPSYS (pour « Bioplasmonic System » ou système bioplasmonique) » dont l'un des buts étaient de proposer une plateforme plasmonique pour la détection de la leucémie.

Dans notre cas, la technique de détection utilisée a fait l'objet de nombreuses études qui peuvent être trouvées dans la littérature [68-70]. Cette méthode, dont le principe est basé sur un examen comparatif de différents types d'immunoglobulines dans le sérum, sera expliquée en détail dans l'article retranscrit dans le chapitre 7.

1.3 But de l'étude

Le but de cette étude est d'étudier les réponses polarimétriques de différentes transductions optiques sélectionnées selon un critère de sensibilité, afin de proposer une ou plusieurs solutions viables pour la biodétection dans un milieu complexe.

Elle sera illustrée par une étude de cas : la détection de la leucémie via une analyse sérologique. Cette dernière montrera les capacités d'une plateforme optique à réaliser une biodétection dans le sérum humain, considéré comme un milieu complexe.

1.4 Objectifs de la thèse

Objectif #1 : Détermination des transductions.

Le premier objectif de ce travail consiste à réaliser une étude de la littérature sur les différentes transductions optiques de surface. Cette prospection permettra de déterminer les phénomènes pouvant être couplés à une lecture polarimétrique, c.-à-d. présentant des réponses asymétriques entre deux polarisations orthogonales. Elle permettra de faire une sélection selon des critères de sensibilités, mais aussi de possibilité au multiplexage.

Objectif #2 : Étude des transductions.

Le second objectif de cette thèse est l'étude des transductions sélectionnées. Pour cela plusieurs systèmes optiques permettant une lecture de polarisation, de phase ou une combinaison des deux seront construits. Les différentes transductions seront ensuite étudiées afin d'obtenir des estimations de leurs spécifications selon l'observable utilisé (polarisation et/ou phase). Elles seront finalement testées sur ces instruments et des mesures de performances en matière de limite de détection expérimentales seront poursuivies. Enfin, pour chacun des systèmes développés, une discussion sera faite sur les applications possibles au regard des performances. Cet objectif peut être séparé en trois sous-objectifs représentant chacune des transductions étudiées.

Sous-objectif #1 : Analyse de la réflexion totale interne

Dans ce sous-objectif, la réflexion totale interne sera étudiée avec un système de lecture combinée de phase et de polarisation. L'intérêt de cette technique est qu'elle permet de séparer l'information de l'adsorption d'une couche mince à celle d'un changement d'indice dans la solution.

Sous-objectif #2 : Analyse de la résonance plasmonique de surface en configuration Kretschmann

La résonance plasmonique de surface dans une configuration Kretschmann sera analysée soit en phase, soit en polarisation. L'intérêt de cette plateforme est sa grande sensibilité tout en ayant une gamme dynamique étendue.

Sous-objectif #3 : Analyse de la résonance plasmonique de surface sur des nanostructures.

Le dernier sous-objectif est relié à l'analyse de la transduction plasmonique avec des échantillons nanostructurés. Cette dernière présente l'avantage de pouvoir s'intégrer facilement sur des plateformes microfluidiques et permet de réaliser des tests hautement multiplexés de par la taille des senseurs.

Objectif #3 : Étude de cas : détection de la leucémie.

Ce dernier objectif de ce doctorat porte sur l'étude d'un cas biomédical dont le but est la détection de la leucémie. Pour cela, une analyse comparative des différents systèmes étudiés a été réalisée en matière de limite de détection, mais aussi sur leur étendue dynamique, c'est-à-dire le

changement maximal que ces systèmes peuvent accepter avant de saturer, ainsi que sur leur capacité à fournir un système multiplexé.

Cette analyse comparative sera simultanément confrontée avec une étude théorique de la méthode de détection utilisée – l’analyse du sérum sanguin – dont les spécifications nécessaires quant aux limite de détection, gamme dynamique et multiplexage ont été obtenues théoriquement et en analysant la littérature.

Finalement, des tests sérologiques seront appliqués sur la plateforme proposée en utilisant la chimie de surface développée en collaboration avec le Pr Brolo de l’Université de Victoria. Ils seront d’abord réalisés en utilisant des solutions purifiées et monocloniales d’immunoglobuline afin de valider la chimie de surface. Ils seront suivis par des tests en conditions réelles – passant par l’utilisation de sérums humains de patient sain et atteint de leucémie.

1.5 Organisation de la thèse

Le chapitre 2 présente l’aspect théorique de ce doctorat en faisant un rappel sur les principes électromagnétiques des deux grandes classes de transduction optique – celle utilisant substrat diélectrique ou celle sur un substrat métallique. Il comporte aussi la partie dédiée à la « *détermination des transductions* », via une revue de littérature des différentes transductions optiques et de leurs applications ainsi que l’examen de ces phénomènes afin de déterminer les transductions optiques présentant un potentiel pour la détection de la leucémie.

Le chapitre 3 présente la section expérimentale de cette thèse de doctorat. Il présente les différentes technologies optiques utilisées pour réaliser les systèmes optiques développés. Il fait aussi une description des techniques utilisées pour la fabrication des échantillons qui supportent les transductions étudiées. Enfin, il expose les systèmes fluidiques pour la réalisation des tests de performance et ceux de biodétection.

Les chapitres 4, 5 et 6 sont la partie « *étude des transductions* » de ce doctorat. Ils sont la retranscription de deux articles parus dans le journal *Optics Express* (chapitre 4 et 6) portant respectivement sur l’étude et la mesure de performance de la réflexion totale interne et de la nanoplasmonique. Le chapitre 5 est quant à lui l’analyse en phase et en polarisation de la résonance plasmonique de surface avec, de façon similaire au chapitre 4 et 6, les mesures des performances des deux systèmes proposés.

Enfin le chapitre 7 est « *l'étude de cas* » de ce projet de doctorat. Sa première partie est l'analyse comparative des instruments développés afin de déterminer la meilleure plateforme qui sera utilisée. La seconde partie, qui est une retranscription d'un article soumis au journal « *Biosensor and Bioelectronics* », est dédiée à la méthodologie de la détection de la leucémie ainsi qu'aux résultats obtenus suite aux tests réalisés.

CHAPITRE 2 TRANSDUCTIONS OPTIQUES POUR LA BIODETECTION

Ce chapitre est une introduction aux principes de la biodétection ainsi qu'un rappel des principes fondamentaux en électromagnétisme pour la bonne compréhension des transductions optiques. Il met en exergue, dans un premier temps, les propriétés des ondes électromagnétiques, les phénomènes se produisant aux interfaces (réflexion, transmission et propagation d'onde) ainsi qu'une description théorique du plasmon de surface.

La seconde partie de ce chapitre sera dédiée à une revue de littérature portant sur l'application des différentes transductions optiques pour la biodétection, et ce tant dans les milieux diélectriques (matériaux vitrés et/ou semi-conducteur) que dans les métaux.

Il sera conclu par le choix des transductions optiques qui seront par la suite analysées polarimétriquement afin de déterminer leurs performances en biocapteurs.

2.1 Introduction à la biodétection

Un biocapteur, schématisé sur la Figure 2-1, est un instrument permettant de détecter et d'analyser des composés biochimiques ou biologiques. Pour cela, il utilise des récepteurs spécifiques à l'analyte à étudier. Ce complexe récepteur/analyte va générer un signal biologique (manifesté par l'accroche de molécule, la réaction entre un brin d'ADN et son complémentaire...) qui sera transformé en un signal physique via un transducteur (sondant les propriétés optique, mécanique, thermique ou électrique du complexe). Ce signal physique est par la suite analysé via un système d'acquisition permettant de réaliser la mesure de ce dernier.

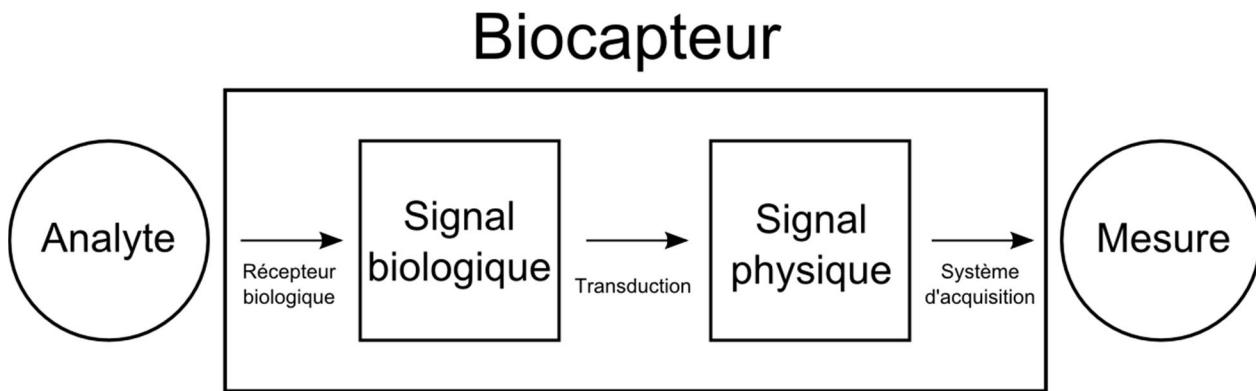


Figure 2-1 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Les biocapteurs sont paramétrés selon trois facteurs de qualité qui sont :

- La plage dynamique : indicatrice de la plage de réponse linéaire d'un biocapteur. Cette dernière présente une limite haute qui peut se manifester de deux manières différentes, soit par une saturation du signal physique à mesurer, soit par les récepteurs dont leur nombre est limité. La limite basse est définie par la limite de détection (LoD pour « Limit of Detection ») du système, c'est-à-dire par la plus petite valeur mesurable. Elle est caractérisée par le rapport $LoD = \frac{\delta}{RSB}$, où δ est le changement de signal mesuré et SNR le rapport signal sur bruit (ou « signal to noise ratio » en anglais pour SNR) défini par $SNR = \left(\frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma}\right)$, où μ_1 sont les moyennes des signaux et σ la moyenne des déviations standards.
- La sensibilité définit la variation du signal physique en fonction du signal biologique. Dans le cas des biocapteurs optiques de surface, elle est généralement définie par le changement du signal physique (position angulaire, spectrale ou changement d'intensité ou de phase) en fonction du changement d'indice effectif dans la solution.
- La spécificité indique la capacité du biocapteur à détecter seulement l'analyte à observer. Cette valeur est intimement liée à la qualité de la chimie de surface (récepteur). En effet, cette dernière a pour but l'accroche spécifique de l'analyte à observer et de limiter toute adsorption non spécifique.

Dans cette thèse de doctorat, l'effort est focalisé sur les transductions optiques de surface. De ce fait, des propriétés telles que l'épaisseur de couche mince ou l'indice de réfraction seront les signaux physiques à mesurer.

2.2 Rappels théoriques en optique de surface

2.2.1 Propriétés fondamentales des ondes électromagnétiques

Une onde électromagnétique (abrégé par EM dans la suite du texte) est par définition la représentation théorique d'un rayonnement électromagnétique. Elle est généralement décrite par une combinaison d'un champ électrique et d'un champ magnétique, toutes deux issues des

équations de Maxwell, dont la propagation dans le temps et l'espace est définie par les équations d'onde suivantes :

$$\nabla^2 \vec{E} = \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}, \quad 2-1$$

$$\nabla^2 \vec{B} = \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2}, \quad 2-2$$

où E et B sont respectivement les vecteurs champ électrique et magnétique de l'onde et ε_0 et μ_0 respectivement les permittivités diélectriques et perméabilité magnétique dans le vide. De ces équations, il est possible de déterminer analytiquement le champ électrique et le champ magnétique de l'onde électromagnétique :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k}_t \vec{r} - \omega t)}, \quad 2-3$$

dans lequel E_0 est l'amplitude initiale du champ électrique, k_t le vecteur d'onde et ω la pulsation du champ. Dans un milieu de propagation sans charges ni courants, ces ondes électromagnétiques sont définies comme transverses. Cela veut dire que le champ électrique, ainsi que le champ magnétique sont toujours perpendiculaires au sens de la propagation. Ceci est expliqué par le fait que la divergence du champ électrique ainsi que celle du champ magnétique sont égales à 0.

2.2.2 Notions de polarisation

La polarisation réfère à l'orientation du champ électrique. Il peut avoir plusieurs configurations dans le plan perpendiculaire à la propagation de l'onde. Dans cette section, un rappel sera fait sur la définition de la polarisation d'une onde ainsi que ses configurations et décrira deux différents formalismes mathématiques utilisés pour caractériser cette polarisation.

2.2.2.1 Définition de la polarisation d'une onde

La polarisation d'une onde électromagnétique, au sens large du terme, peut être définie par la direction du vecteur champ électrique, son amplitude ainsi que la phase de ces différents constituants [71].

Trois différents états de polarisation peuvent être retrouvés dans la nature. Le premier est un état linéaire – c'est-à-dire que l'orientation du champ électrique ne varie pas dans le temps. Il est possible d'imaginer cet état de polarisation comme une combinaison de deux champs électriques

orientés selon les axes y et z, dont les pulsations et les phases seraient égales. Le ratio des amplitudes donnerait alors la tangente de l'orientation du champ dans le plan YoZ, tel qu'il est schématisé sur la Figure 2-2.

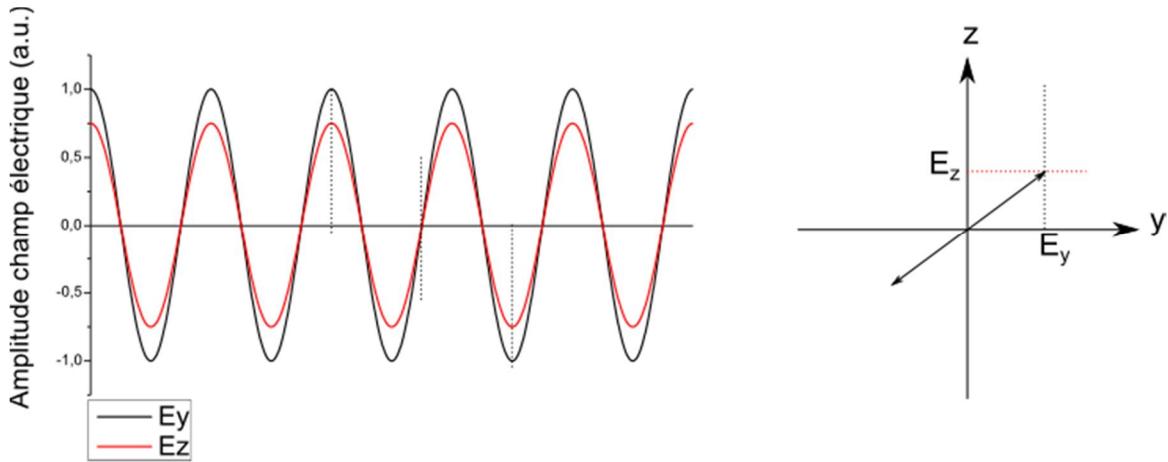


Figure 2-2 : Visualisation de l'état de polarisation linéaire

Le second état de polarisation est circulaire – c'est-à-dire que l'orientation du champ électrique varie circulairement dans le temps et sur le plan YoZ. Il peut être imaginé par une combinaison de deux champs électriques, orientés respectivement selon les axes y et z, dont les pulsations ainsi que les amplitudes seraient égales, mais dont les phases seraient espacées d'une quantité de $+/-\pi/2$, les mettant en quadrature de phase. Dépendamment de la convention, le signe devant cette différence de phase donnera le sens de rotation de la polarisation (gauche ou droite). Cet état de polarisation est illustré sur la Figure 2-3.

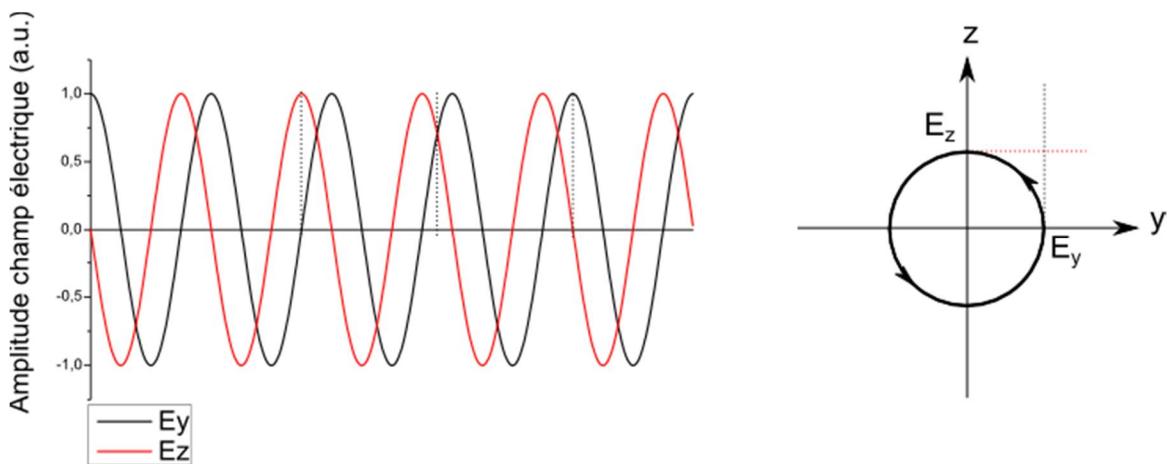


Figure 2-3 : Visualisation de l'état de polarisation circulaire.

Finalement le dernier état de polarisation est elliptique – c'est-à-dire que l'orientation du champ électrique suit la trajectoire d'une ellipse dans le temps sur le plan YoZ. Cet état de polarisation peut être imaginé par une combinaison de deux champs électriques, respectivement orienté selon y et z, dont les pulsations seraient égales, mais leurs amplitudes et leurs phases seraient différentes. Cet état de polarisation est illustré sur la Figure 2-4.

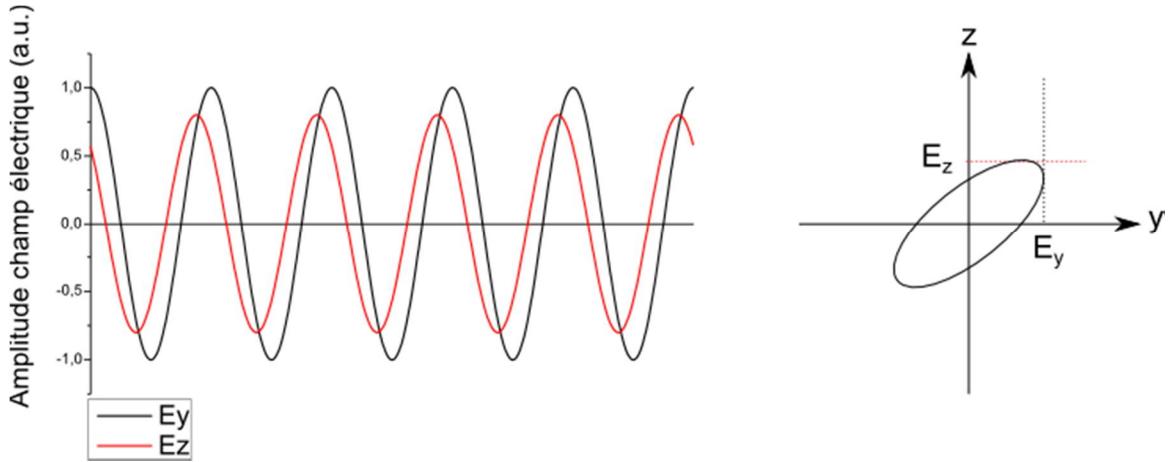


Figure 2-4 : Visualisation d'un état de polarisation elliptique.

2.2.2.2 Paramètres de la polarisation

Afin de pouvoir analyser cette polarisation, des paramètres issus de la description d'une ellipse sont utilisés. En effet, l'état de polarisation elliptique peut être considéré comme le cas le plus général d'un état de polarisation – une ligne ou un cercle n'étant que deux cas particuliers d'une ellipse.

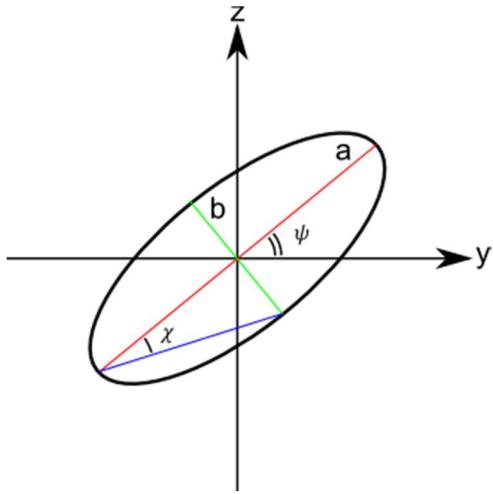


Figure 2-5 : Représentation elliptique d'un état de polarisation

Les paramètres décrivant une ellipse sont en général son grand axe a et son petit axe b . L'inclinaison entre le grand axe et l'axe y donne l'angle de polarisation ψ , et l'arc tangente du ratio entre le grand axe et le petit axe donne son angle d'ellipticité χ —fonction du déphasage entre le champ électrique selon y et selon z . Selon le formalisme utilisé, soit le déphasage est utilisé soit l'ellipticité. La relation liant le déphasage entre les deux champs, $\Delta\phi$, et l'angle d'ellipticité est donnée dans l'équation ci-dessous :

$$\tan(2\chi) = -\sin(2\psi) * \tan(\Delta\phi). \quad 2-4$$

2.2.2.3 Les formalismes

L'analyse mathématique d'un état de polarisation peut se faire selon deux formalismes. Le premier formalisme présenté est celui de Mueller utilisant les paramètres de Stokes. Il a la particularité de prendre en compte les ondes partiellement polarisées. Le second formalisme traité est celui de Jones, formalisme qui sera utilisé dans cette thèse de doctorat.

2.2.2.3.1 Formalisme de Mueller et paramètres de Stokes

Le formalisme de Mueller est une méthode de calcul matriciel de la polarisation, se basant sur la représentation de Stokes de l'état de polarisation. Ces paramètres de Stokes sont une description de la polarisation de la lumière selon un vecteur à quatre éléments. Comme il a été mentionné plus haut, ce formalisme permet de tenir compte du taux de polarisation de la lumière (p) permettant de faire une analyse de lumière incohérente ou partiellement polarisée. Les paramètres de Stokes sont définis par les équations suivantes :

$$\vec{S} = \begin{vmatrix} I \\ p * I * \cos(2\psi) * \cos(2\chi) \\ p * I * \sin(2\psi) * \cos(2\chi) \\ p * I * \sin(2\chi) \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} I(P = 0^\circ) + I(P = 90^\circ) \\ I(P = 0^\circ) - I(P = 90^\circ) \\ I(P = 45^\circ) - I(P = -45^\circ) \\ I(P = CD) + I(P = CG) \end{vmatrix} \quad 2-5$$

dont S est le vecteur de Stokes, I est l'intensité totale de la lumière analysée, p désigne la proportion polarisée de la lumière, ψ et χ étant les paramètres de l'ellipse de polarisation. C'est un formalisme basé sur des mesures expérimentales. En effet, chaque valeur du vecteur est reliée à une somme ou une différence d'intensité entre deux états de polarisation diamétralement opposés. Dans le cas d'un repère cartésien YoZ , le premier paramètre est l'intensité totale et est défini par la somme des amplitudes au carré des champs selon y et selon z . Le second paramètre

est, quant à lui, décrit par la différence des amplitudes aux carrés des champs selon y et z. Ce terme va donc représenter la propension à avoir une polarisation alignée selon ces axes. Une valeur positive donnera une tendance à voir une polarisation selon y et une valeur négative selon z. Le troisième paramètre est la différence des amplitudes aux carrés des champs orientés à 45° et -45° . Similairement, une valeur positive de ces termes montrera un état de polarisation qui tendrait vers une orientation selon un axe à 45° et une valeur négative montrerait une tendance à être orienté à -45° . Finalement le dernier paramètre se caractérise par la différence des champs ayant une polarisation circulaire droite (PCD) à ceux ayant une polarisation circulaire gauche (PCG) – ce qui, de façon analogue aux deux termes précédents, montrerait une propension à avoir une polarisation circulaire droite (termes positifs) ou gauche (termes négatifs).

2.2.2.3.2 Formalisme de Jones

Le second formalisme présenté, et celui utilisé dans cette thèse de doctorat, est le formalisme de Jones. Contrairement à celui de Stokes, il ne prend en compte que les sources entièrement polarisées, ce qui est le cas dans toutes les études menées dans ce doctorat.

L'état de polarisation est défini ici par un vecteur à deux dimensions représentant respectivement la valeur complexe du champ électrique selon l'axe y et z. De ce fait, l'influence de différents composants optiques sur la polarisation est modélisée par des matrices 2x2, permettant le couplage entre les polarisations – comme il peut être constaté pour des polariseurs avec une orientation autre que 0 et 90° [71]. La norme du vecteur représente l'intensité du signal, généralement normalisé à un. Les vecteurs présentés dans le tableau ci-dessous représentent des cas particuliers de polarisation de faisceau.

Tableau 2-1 : Représentation de Jones de plusieurs vecteurs types.

Linéaire selon l'axe y	Linéaire selon l'axe z	Linéaire orienté à 45°	Linéaire orienté à -45°	Circulaire droite	Circulaire gauche
$\begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \end{pmatrix}$	$\frac{-i}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} i \\ 1 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix}$

2.2.3 Propriété des ondes électromagnétiques aux interfaces – théories de Fresnel

Dans cette seconde partie, il sera traité les propriétés des ondes électromagnétiques aux interfaces. Pour cela les notions de réflexion et réfraction sur une interface seront décrites selon la polarisation incidente. Par la suite, les systèmes à multiples interfaces ainsi que la réflexion totale interne, qui sont la base des transductions étudiées, seront présentés.

Ce traitement sera réalisé en utilisant les théories de Fresnel qui découlent des équations de Maxwell ainsi que des conditions aux interfaces pour les champs électrique et magnétique. Pour cela, plusieurs hypothèses doivent être émises. Dans le cas de ces études, il doit être considéré une interface sans rugosité et infinie – ce qui dans le cas pratique peut être assimilé à des longueurs de plan très grandes devant λ , ainsi que des propriétés géométriques de rugosités de l'ordre du nanomètre.

Par convention, nous allons appeler polarisation -p, les champs électriques qui sont colinéaires au plan d'incidence, et polarisation -s, les champs électriques perpendiculaires à ce plan. Tous les champs électriques traités dans cette section auront une composante p et une composante s.

2.2.3.1 Réflexion et réfraction sur une interface

Lorsqu'une onde électromagnétique monochromatique impacte une interface entre deux milieux 1 et 2, une partie de cette onde sera transmise et l'autre réfléchie – comme il est schématisé dans la Figure 2-6.

Il peut être dénoté trois différents types de champs : le champ incident avec l'indice i, le champ réfléchi avec l'indice r et le champ transmis avec l'indice t. Ces trois types de champs peuvent autant indiquer la polarisation -p et -s, notée en exposant. Les vecteurs d'onde pour l'onde incidente et réfléchie ainsi que pour l'onde transmise sont respectivement présentés en équation 2-6 et 2-7.

$$k_i = k_r = n_1 * \frac{\omega}{c} \quad 2-6$$

$$k_t = n_2 * \frac{\omega}{c} \quad 2-7$$

Avec, n_1 l'indice du milieu 1, n_2 l'indice du milieu 2, ω la pulsation de l'onde et c la célérité de la lumière dans le vide.

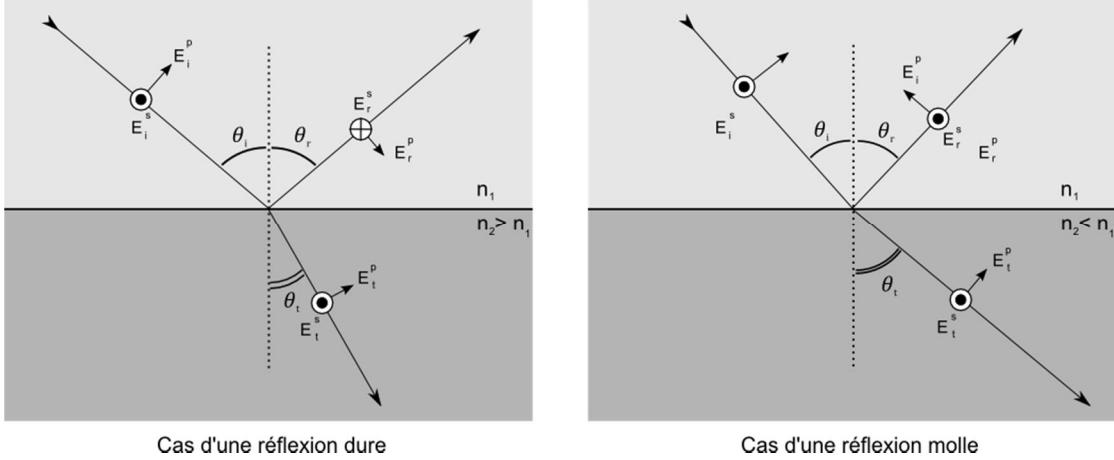


Figure 2-6: Schématisation des deux cas de réflexions / réfraction entre deux milieux – la réflexion dure présentant un déphasage de π après la réflexion et la réflexion molle ne présentant pas ce déphasage dans la réflexion.

Il existe deux types de réflexions, les réflexions dures où l'indice du milieu 2 est plus grand que celui du milieu 1. Dans ce cas, un déphasage de π peut être observé sur l'onde réfléchie. Le second type de réflexion est celle dite molle – dans ce cas l'indice du milieu 1 est plus grand que celui du milieu 2. Dans ce cas, il n'y a pas de déphasage observé sur l'onde réfléchie, mais c'est le seul qui peut présenter un cas de réflexion totale interne (voir section *réflexion totale interne*). Cependant, pour chacun de ces types de réflexion, les coefficients de Fresnel restent les mêmes.

Les coefficients de Fresnel pour la réflexion sont :

$$\text{pour la polarisation } -p \quad \frac{E_r^p}{E_i^p} = r_{1 \rightarrow 2}^p = \frac{n_t \cos(\theta_i) - n_i \cos(\theta_t)}{n_i \cos(\theta_t) + n_t \cos(\theta_i)}, \quad 2-8$$

$$\text{pour la polarisation } -s \quad \frac{E_r^s}{E_i^s} = r_{1 \rightarrow 2}^s = \frac{n_i \cos(\theta_i) - n_t \cos(\theta_t)}{n_i \cos(\theta_i) + n_t \cos(\theta_t)}. \quad 2-9$$

Ainsi que ceux pour la transmission sont égaux à :

$$\text{pour la polarisation } -p \quad \frac{E_t^p}{E_i^p} = t_{1 \rightarrow 2}^p = \frac{2 * n_i \cos(\theta_i)}{n_i \cos(\theta_t) + n_t \cos(\theta_i)} \quad 2-10$$

$$\text{pour la polarisation } -s \quad \frac{E_t^s}{E_i^s} = t_{1 \rightarrow 2}^s = \frac{2 * n_i \cos(\theta_i)}{n_i \cos(\theta_i) + n_t \cos(\theta_t)}. \quad 2-11$$

En utilisant les lois de Snell-Descartes (équation 2-12), ces coefficients peuvent être simplifiés.

$$\text{Loi de Snell-Descartes : } n_1 * \sin(\theta_i) = n_2 * \sin(\theta_t). \quad 2-12$$

$$\text{Réflexion selon la polarisation -p : } r_{1 \rightarrow 2}^p = \frac{\tan(\theta_i - \theta_t)}{\tan(\theta_i + \theta_t)}. \quad 2-13$$

$$\text{Réflexion selon la polarisation -s : } r_{1 \rightarrow 2}^s = \frac{\sin(\theta_i - \theta_t)}{\sin(\theta_i + \theta_t)}. \quad 2-14$$

$$\text{Transmission selon la polarisation -p : } t_{1 \rightarrow 2}^p = \frac{2 * \sin(\theta_t) * \cos(\theta_i)}{\sin(\theta_i + \theta_t) * \cos(\theta_i - \theta_t)}. \quad 2-15$$

$$\text{Transmission selon la polarisation -s : } t_{1 \rightarrow 2}^s = \frac{2 * \sin(\theta_t) * \cos(\theta_i)}{\sin(\theta_i + \theta_t)}. \quad 2-16$$

2.2.3.2 Système à multiples interfaces

Grâce aux réflexions et transmissions définies plus haut, il est possible de déterminer la réponse de systèmes plus complexes comme ceux d'une ou de plusieurs couches minces.

Dans un système simple d'une seule couche, schématisée en Figure 2-7, le formalisme consiste à prendre en compte la réflexion à la première interface ainsi que les transmissions des faisceaux réfléchis à la seconde interface.

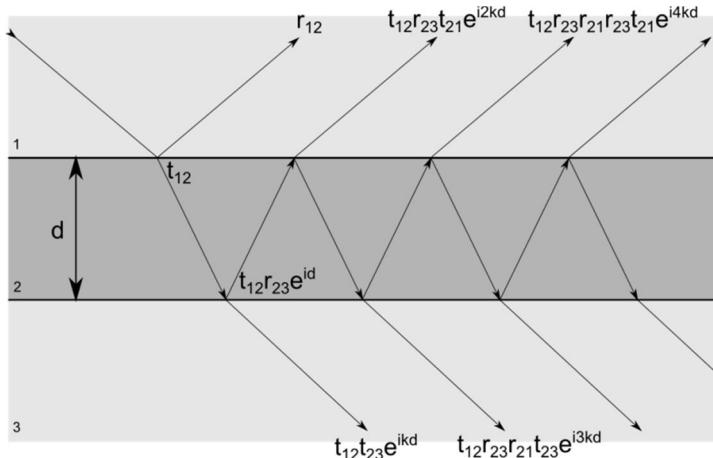


Figure 2-7 : Système de réflexion et transmission pour le calcul d'une réflexion totale de la couche. Plusieurs contributions provenant de la réflexion à la première interface ainsi que l'interaction de l'onde avec la couche elle-même doivent être prises en compte.

La réflectivité totale est la somme de toutes les contributions :

$$r_{123} = r_{12} + t_{12}r_{23}t_{21}e^{2ikd} + t_{12}r_{23}r_{21}r_{23}t_{21}e^{4ikd} + t_{12}r_{23}r_{21}r_{23}r_{21}r_{23}t_{21}e^{6ikd} + \dots, \quad 2-17$$

avec d l'épaisseur de la couche et k le vecteur d'onde dans cette couche. Comme il est possible de l'observer, cette réflectivité suit le schéma d'une suite géométrique avec comme paramètre $q = r_{23}r_{21}e^{2ikd}$. On peut alors écrire :

$$r_{123} = r_{12} + t_{12}r_{23}t_{21}e^{2ikd} * \frac{1}{1-r_{23}r_{21}e^{2ikd}} = \frac{r_{12}+r_{23}(t_{12}t_{21}-r_{12}r_{21})e^{2ikd}}{1-r_{23}r_{21}e^{2ikd}}. \quad 2-18$$

Or, d'après les relations présentées de 2-8 à 2-11, $(t_{12}t_{21} - r_{12}r_{21}) = 1$, nous donnant alors pour la réflexion totale de la couche:

$$r_{123} = \frac{r_{12}+r_{23}e^{2ikd}}{1-r_{23}r_{21}e^{2ikd}} \quad 2-19$$

Dans le cas généralisé d'un système à plusieurs couches, le formalisme matriciel d'Abélès [72] est utilisé dans la suite de cette section. Ce dernier repose sur le calcul des champs réfléchis et transmis à travers un système de plusieurs couches (schématisé sur la Figure 2-8) en définissant chaque couche traversée par l'onde EM par une matrice.

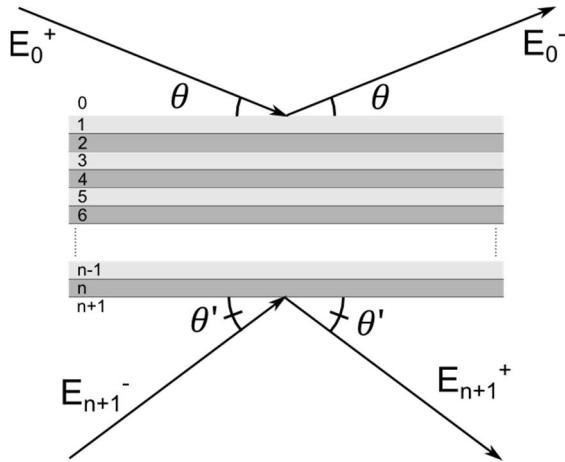


Figure 2-8: Cas généralisé d'un système multicouche pour le calcul des coefficients de transmission et de réflexion de ce système.

Avec ce formalisme, nous avons :

$$\begin{vmatrix} E_0^+ \\ E_0^- \end{vmatrix} = \prod_n M_n * \begin{vmatrix} E_{n+1}^+ \\ E_{n+1}^- \end{vmatrix}. \quad 2-20$$

La matrice de transfert pour une couche n est définie par :

$$M_n = \frac{1}{t_{n,n+1}} * \begin{vmatrix} e^{-ik_n d_n} & r_{n,n+1} * e^{ik_n d_n} \\ r_{n,n+1} * e^{-ik_n d_n} & e^{ik_n d_n} \end{vmatrix}. \quad 2-21$$

À partir de produit matriciel, donnant le produit de matrice \tilde{M} , plusieurs coefficients relatifs à cette superposition peuvent être extraits. Dans le cas de la réflexion, et en prenant comme condition initiale que E_{n+1}^- est nul, cette réflexion est définie par :

$$\begin{vmatrix} E_0^+ \\ E_0^- \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \tilde{M}_{11} * E_{n+1}^+ \\ \tilde{M}_{21} * E_{n+1}^+ \end{vmatrix} \quad 2-22$$

$$R = \frac{E_0^-}{E_0^+} = \frac{\tilde{M}_{21}}{\tilde{M}_{11}} \quad 2-23$$

Ce procédé mathématique présente plusieurs avantages comme celui de donner un système de produit matriciel pour évaluer une multicouche. Cette approche est grandement utilisée dans le calcul des couches anti-réflectrices ou les miroirs basés sur un système de multicouche diélectrique.

Dans le cas pratique pour cette thèse, il a permis de générer plusieurs codes permettant de calculer les sensibilités en matière de couche mince ainsi qu'en indice de réfraction des différents systèmes étudiés. Cependant, son analyse se limite seulement aux couches linéaires, homogènes et isotropes. Les couches présentant des impuretés (inférieure à 10% en volume) peuvent être modélisées par le formalisme de Maxwell-Garnett sur les milieux effectifs [73]. Pour les couches contenant des variations périodiques d'indice, un autre système doit être utilisé (analyse rigoureuse des ondes couplées) [74].

2.2.3.3 Réflexion totale interne et champ évanescent

Le dernier aspect vu dans cette section est la réflexion totale interne. C'est un phénomène se produisant seulement à une interface où l'indice du milieu d'où provient l'onde incidente est plus élevé que celui de l'autre côté de l'interface. Il est obtenu lorsque l'angle d'incidence du rayon impactant l'interface est supérieur ou égal à l'angle critique.

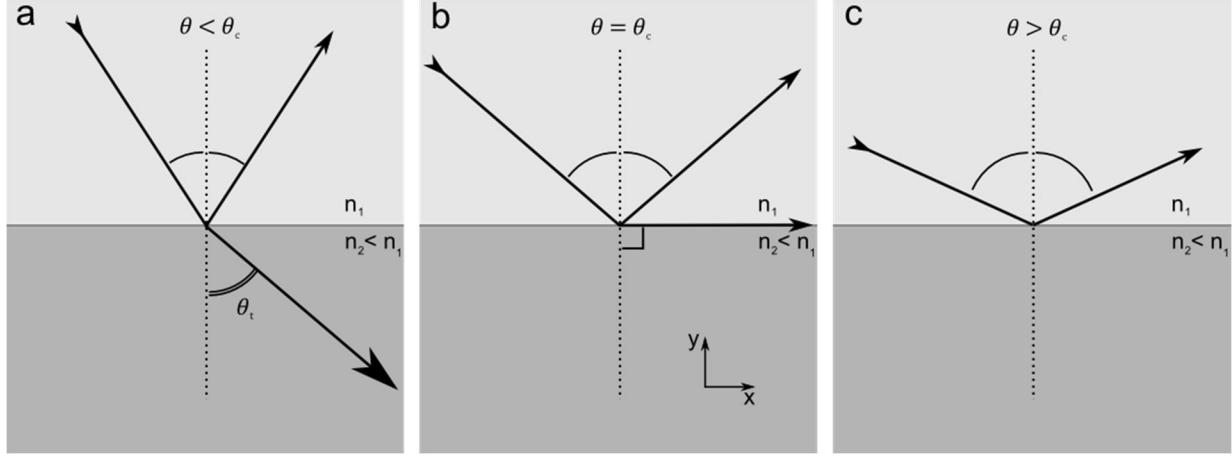


Figure 2-9 : Réflexion sous trois conditions angulaires et dont l'interface présente les propriétés pour l'obtention d'une réflexion totale interne. a- cas d'une onde incidente ayant un angle d'incidence inférieur à l'angle critique, b- cas d'une onde incidente ayant un angle d'incidence égal à l'angle critique – l'onde transmise est parallèle à l'interface, c- cas d'une onde incidente ayant un angle d'incidence supérieur à l'angle critique – pas d'onde radiative transmise.

Cet angle critique, θ_c , est calculé grâce à la relation de Snell-Descartes, lorsque $\theta_t = 90^\circ$.

$$n_1 \sin(\theta_c) = n_2 \rightarrow \sin(\theta_c) = \frac{n_2}{n_1} \quad 2-24$$

Le champ électrique de l'onde transmise peut être aussi calculé. Ce dernier aura un comportement non radiatif pour des angles d'incidence supérieurs à l'angle critique – ce comportement est appelé évanescence de l'onde. Ce champ électrique est défini par l'équation suivante :

$$\vec{E}_t = \vec{E}_{0,t} e^{i(\vec{k}_t \vec{r} - \omega t)} \quad 2-25$$

Avec $\vec{k}_t \vec{r} = k_{t,x}x - k_{t,y}y$ dont $k_{t,x} = k_t \sin(\theta_t)$ et $k_{t,y} = k_t \cos(\theta_t)$.

De plus, en utilisant la loi de Snell-Descartes, nous obtenons :

$$k_t \cos(\theta_t) = \pm k_t \sqrt{1 - \frac{n_1^2 \sin^2(\theta_i)}{n_2^2}} \quad 2-26$$

Or, pour un angle $\theta_i \geq \theta_c$ le contenu de la racine est négatif, et il est possible de réécrire l'équation 2-26 sous la forme suivante :

$$k_t \cos(\theta_t) = \pm ik_t \sqrt{\frac{n_1^2 \sin^2(\theta_i)}{n_2^2} - 1}. \quad 2-27$$

En mettant 2-27 dans 2-25, nous obtenons :

$$\vec{E}_t = \vec{E}_{0,t} e^{-k_t y \sqrt{\frac{n_1^2 \sin^2(\theta_i)}{n_2^2} - 1}} e^{ik_t \sin(\theta_t)x} e^{-i\omega t}, \quad 2-28$$

où nous pouvons observer dans la première exponentielle le caractère évanescence de l'onde. De cela, nous pouvons en déduire l'intensité de l'onde évanescante selon y, égale à l'amplitude au carré du champ électrique :

$$I(y) = I_0 e^{-2k_t y \sqrt{\frac{n_1^2 \sin^2(\theta_i)}{n_2^2} - 1}} = I_0 e^{-\frac{y}{y_0}}, \quad 2-29$$

où $y_0 = \left(2k_t \sqrt{\frac{n_1^2 \sin^2(\theta_i)}{n_2^2} - 1} \right)^{-1}$ désigne la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu. Comme nous pouvons le remarquer, cette valeur peut être ajustée en changeant l'angle d'incidence de l'onde EM. Elle varie d'une valeur égale à l'infini pour $\theta_i = \theta_c$ à $\left(2k_t \sqrt{\frac{n_1^2}{n_2^2} - 1} \right)^{-1}$ pour $\theta_i = \frac{\pi}{2}$. Dans un cas pratique de biodétection, comme celle d'un prisme de verre (indice n=1.5 à 1.7) ayant une interface avec un milieu aqueux (n=1.3 – 1.4), la pénétration de l'onde est généralement de l'ordre de la centaine de nanomètres.

Comme il le sera décrit dans les sections « biodétections », l'onde évanescante est très souvent utilisée comme sonde pour les biocapteurs optiques – ceci est dû au fait qu'elle concentre principalement l'onde EM proche de l'interface (de l'ordre de la centaine de nanomètres) et donc rend cette dernière très sensible au changement d'indice dans cette zone (comme le dépôt d'une couche biologique provoqué par l'adsorption d'une molécule).

2.3 Concept de plasmon de surface

La première observation d'un plasmon de surface a été faite par R.W. Wood en 1902 [75], où il a remarqué des baisses d'intensité sur la lumière diffusée par un réseau métallique, ces dernières n'étant observables seulement pour la polarisation -p. Plusieurs explications de ce phénomène ont été tentées dont celle de Lord Rayleigh [76], qui proposait que ces anomalies apparaissent

lorsque le vecteur d'onde de la lumière diffusée avait une direction colinéaire sur le plan du réseau. Cependant, cette explication ne prédisait pas avec précision la position angulaire ou spectrale des anomalies de Wood. Il a fallu attendre les années 40 pour que Fano propose une première explication théorique de ces anomalies ainsi qu'une clarification sur les hypothèses de Lord Rayleigh [77].

Dans cette section, il sera présenté les propriétés des métaux qui permettent de supporter le plasmon de surface. Par la suite, sa définition, ses propriétés et sa façon de l'exciter seront définies. Cette section se terminera en décrivant les différentes méthodes d'interrogation du plasmon de surface dans un contexte de biodétection, les réponses optiques qu'ils proposent ainsi que les caractéristiques physiques du plasmon comme outil pour sonder les milieux biologiques.

2.3.1 Les métaux et leurs propriétés optiques

La résonance plasmonique de surface se produit seulement sur une interface entre un métal et un diélectrique. Il est donc important de décrire les métaux ainsi que leurs propriétés optiques. Pour cela, les métaux sont considérés comme des milieux linéaire, homogènes et isotropes, avec une permittivité diélectrique ε_m , une perméabilité μ_m et une conductivité définie par σ_m .

Le premier modèle théorique proposé pour décrire les métaux est celui de Paul Drude [78]. Il adopte une approche classique de l'étude des électrons dans le métal et définit la réponse de ce dernier en fonction du mouvement des électrons libres, relié aux valeurs de la conductivité. Ce modèle permet de définir la fonction diélectrique (Système International), selon l'équation suivante :

$$\varepsilon = 4\pi^2 + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\tau} \quad 2-30$$

Où ω_p est la pulsation plasmon, définie plus loin dans cette section et τ le temps entre deux collisions. La fonction diélectrique est l'aspect le plus intéressant, car elle définit l'interaction d'un métal avec une onde électromagnétique. Cette fonction diélectrique varie selon la pulsation ω de l'onde et peut être définie par la relation complexe suivante :

$$\varepsilon_m = \varepsilon'_m + i\varepsilon''_m, \quad 2-31$$

où, ε_m est la permittivité totale, ε'_m la partie réelle de la permittivité et ε''_m la partie imaginaire. Cette relation complexe provient du fait qu'un métal n'est pas un conducteur parfait et qu'il peut

avoir des pertes (synonyme d'absorption de l'onde dans le média). La partie imaginaire, décrivant ses pertes, est toutefois très petite devant la partie réelle, comme il peut l'être observé sur la Figure 2-10, où la permittivité diélectrique de l'or en fonction de l'énergie de l'onde EM incidente est représentée [79, 80].

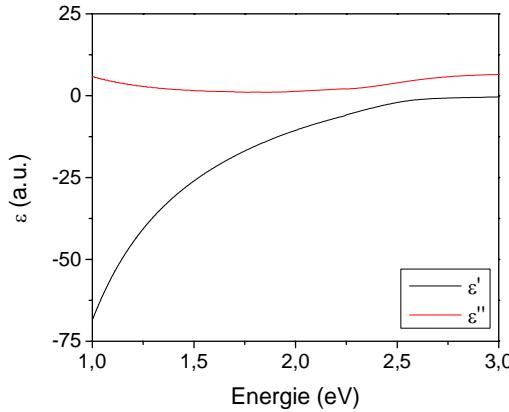


Figure 2-10 : Permittivité diélectrique de l'or – la ligne noire illustre la dépendance de la partie réelle de la fonction diélectrique en fonction de l'énergie (propriété de polarisabilité du support) - la ligne rouge décrit la dépendance de la partie imaginaire de la fonction diélectrique en fonction de l'énergie (propriété de pertes par absorption ou réémission).

Contrairement aux matériaux diélectriques, qui ont une permittivité positive et quasi statique en fonction de la longueur d'onde, celle des métaux présente des valeurs négatives et de fortes variations en fonction de la pulsation de l'onde EM, principalement imputables à la présence d'électrons libres dans le milieu.

De plus, ils peuvent se mettre à osciller de façon collective (résonance) sous l'impulsion d'une onde EM ou électronique. Cette oscillation électronique provient du fait que, lorsque soumis à une excitation (champ électrique, collision électronique), ce nuage électronique va s'éloigner des ions dont la position reste sensiblement la même. Une force de Coulomb attractive est alors exercée sur ce nuage électronique. Lorsque la fréquence de l'excitation est proche de celle de la fréquence propre du nuage, un phénomène de résonance oscillatoire apparaît.

Ce phénomène peut être défini par une pulsation propre, appelée pulsation plasma et est défini par la relation suivante [78]:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\epsilon_0}}. \quad 2-32$$

Similairement au photon pour les ondes EM, cette onde plasma est définie par un quantum de vibration électronique appelé le plasmon et de valeur $\hbar\omega_p$. Cette valeur décrit aussi le seuil en fréquence pour lequel une onde EM peut pénétrer dans un métal – une onde EM ayant une pulsation inférieure à celle du plasmon ne peut pénétrer un métal, elle sera donc réfléchie ou absorbée.

2.3.2 Le plasmon de surface

De façon analogue au plasmon de volume, le plasmon de surface est aussi une oscillation d'un nuage électronique, mais cette dernière se produit à l'interface entre un métal et un diélectrique.

Il existe deux types de plasmon de surface :

- Les plasmons de surface localisés – ces derniers se manifestent seulement autour d'une nanostructure métallique d'où l'aspect localisé, car il ne supporte aucune propagation. Son excitation est obtenue en irradiant la nanostructure avec une onde EM ayant la même fréquence que celle du plasmon de surface — définie par la géométrie et les propriétés diélectriques de la structure. Les nanoparticules de métal noble sont un bon exemple de structure supportant ce type de plasmon
- Les plasmons de surface propagatifs – ce dernier est un type de plasmon délocalisé, car il peut se propager sur l'interface métal diélectrique selon une onde transverse magnétique. Son excitation est obtenue grâce à une double résonance qui sera expliquée plus tard dans cette section.

Dans cette thèse, nous nous limiterons à étudier la seconde classe des plasmons de surface, car les transductions plasmoniques sélectionnées utilisent seulement ceux pouvant avoir une propagation. Une analyse de la relation de dispersion ainsi que de leur résonance sera réalisée. Les développements réalisés dans la suite de cette section 2.3 s'inspire de plusieurs livres de référence dans le domaine des plasmons de surface ainsi que de la physique des solides [78, 81, 82].

2.3.3 Mode de propagation du plasmon de surface – relation de dispersion – couplage onde/plasmon

L'étude du mode de propagation du plasmon se réalise par la résolution des équations de Maxwell à l'interface entre le métal (noté m dans les équations) et le milieu diélectrique (noté d). Dans cette étude, nous considérons être dans un milieu linéaire homogène et isotrope avec une perméabilité magnétique relative de 1. La géométrie utilisée pour cette étude est présentée en Figure 2-11.

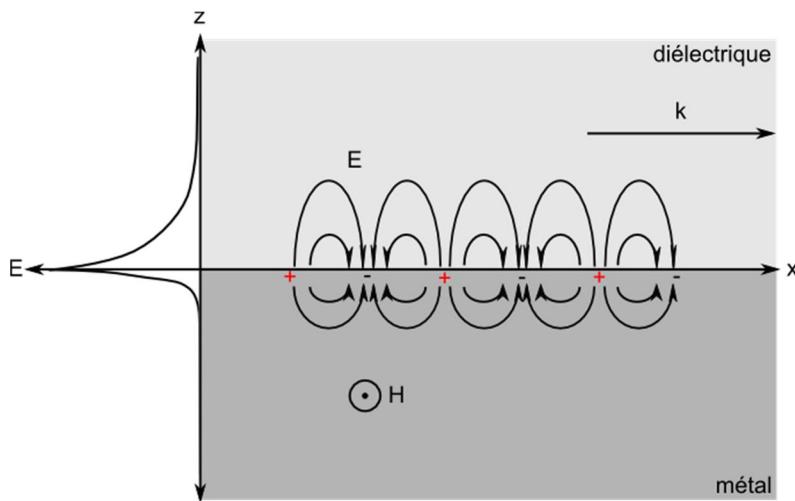


Figure 2-11 : Géométrie pour l'analyse du mode de propagation du plasmon. Le milieu du haut est le milieu diélectrique noté d – le milieu du bas est le métal noté m .

La solution pour ce mode est une onde propagatrice selon x et avec un caractère évanescence selon z . En effet, comme le plasmon est confiné sur l'interface, aucune propagation ne peut avoir lieu dans la direction sortant de cette dernière. Il est alors émis l'hypothèse que l'onde adopte un caractère évanescence dans cette direction.

La résolution des équations de Maxwell¹, présentées dans les équations 2-33 et 2-34, se fait selon la polarisation $-s$ (aussi appelé transverse électrique), c.-à-d. pour un champ électrique orienté selon y , ainsi que pour la polarisation $-p$ (aussi appelé transverse magnétique), c.-à-d. pour un champ magnétique orienté selon y et donc un champ électrique appartenant au plan XoZ .

¹ Dans cette section, seules les équations importantes ou qui seront réutilisées dans la suite de ce manuscrit seront numérotées. Toutes les équations sont notées selon la convention du système international (SI)

$$\nabla \vec{E} = 0 \text{ et } \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}. \quad 2-33$$

$$\nabla \vec{H} = 0 \text{ et } \vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}. \quad 2-34$$

Résolution pour la polarisation -s :

Dans ce cas, nous définissons une solution des équations maxwell par le champ électrique suivant orienté selon l'axe des y :

$$\vec{E} = E_0 e^{\pm \kappa z} e^{-ik_x x} e^{-i\omega t} \vec{y}. \quad 2-35$$

Avec k_x , le vecteur d'onde selon x – direction de propagation et κ , le coefficient d'atténuation de l'onde selon z – dû au fait de l'évanescence de l'onde dans cette direction. Le signe +/- provient du sens dans lequel on voit l'onde évanescante – par convention le signe sera – pour les z positifs (milieu diélectrique) et + pour les z négatifs (milieu métallique)

Ce coefficient κ , provenant du vecteur d'onde k_z , est défini par la relation suivante :

$$ik_z = \kappa = \sqrt{k_x^2 - k^2}.$$

Avec $k = \sqrt{\epsilon} \frac{\omega}{c}$. Sachant que les conditions aux interfaces donnent une continuité des composantes tangentielles du champ électrique et magnétique, nous pouvons formuler la relation suivante :

$$\vec{H}_{t,m} = \vec{H}_{t,d}.$$

En considérant que l'aimantation dans le milieu est nulle, cette relation peut être écrite en utilisant l'induction magnétique :

$$\frac{B_{x,m}}{\mu_0} = \frac{B_{x,d}}{\mu_0}.$$

Or, l'induction magnétique étant définie par l'équation 2-32, nous obtenons :

$$\vec{B} = \frac{1}{i\omega} \begin{vmatrix} \pm \kappa E_y \\ 0 \\ -k_x E_y \end{vmatrix}.$$

Avec $E_y = E_0 e^{\pm \kappa z} e^{-ik_x x} e^{-i\omega t}$. Nous pouvons donc formuler l'égalité de la manière suivante :

$$\frac{\kappa_m E_{y,m}}{\mu_0} = -\frac{\kappa_d E_{y,d}}{\mu_0}.$$

Or comme la condition de continuité nous donne l'égalité des champs électriques tangentiels, la relation peut être réduite à :

$$\kappa_m = -\kappa_d.$$

Ce qui, suite à la définition de κ , est équivalent à :

$$\varepsilon_m = \varepsilon_d.$$

Une telle égalité ne peut pas être atteinte pour deux milieux différents. La seule façon d'atteindre cette égalité serait d'avoir le même milieu de part et d'autre de l'interface. Le mode de propagation plasmonique de surface n'est donc pas permis selon cette polarisation. Ceci confirme les observations du Pr Wood, faites-en 1902, où il stipulait que ces baisses d'intensité n'étaient observables que pour la polarisation $-p$.

Résolution pour la polarisation $-p$:

De manière similaire à la résolution faite pour la polarisation $-s$, nous pouvons définir une solution des équations de Maxwell par le champ magnétique suivant orienté selon l'axe des y :

$$\vec{H} = H_0 e^{\pm \kappa z} e^{-ik_x x} e^{-i\omega t} \vec{y}, \quad 2-36$$

avec k_x , le vecteur d'onde selon x – direction de propagation et κ , le coefficient d'atténuation de l'onde selon z – dû au fait de l'évanescence de l'onde dans cette direction.

Ce coefficient κ , provenant du vecteur d'onde k_z , est défini par la relation suivante :

$$ik_z = \kappa = \sqrt{k_x^2 - k^2}.$$

Avec $k = \sqrt{\varepsilon \frac{\omega}{c}}$. Afin de calculer le mode, les conditions aux interfaces seront utilisées car elles nous donnent une continuité des composantes tangentielles du champ électrique et magnétique, ainsi que la continuité des composantes normales du déplacement électrique. Dans un premier temps, nous calculons le déplacement électrique, relié au champ magnétique via l'équation de Maxwell présenté en équation 2-34.

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}.$$

$$\vec{D} = \frac{1}{i\omega} \begin{vmatrix} \mp\kappa H_y \\ 0 \\ k_x H_y \end{vmatrix}.$$

Or, la composante selon z du déplacement électrique est égale de part et d'autre de l'interface, ce qui nous donne, sachant que les composantes selon y du champ magnétique, l'égalité des vecteurs d'onde selon la direction x.

$$k_{x,m} = k_{x,d}.$$

Maintenant, si on regarde la continuité des champs électriques selon la direction x, nous obtenons :

$$E_{x,m} = E_{x,d},$$

$$\frac{D_{x,m}}{\varepsilon_0 \varepsilon_m} = \frac{D_{x,d}}{\varepsilon_0 \varepsilon_d},$$

$$\frac{-\kappa_m H_{y,m}}{\varepsilon_0 \varepsilon_m} = \frac{\kappa_d H_{y,d}}{\varepsilon_0 \varepsilon_d}.$$

Or comme les champs magnétiques selon y sont égaux de part et d'autre de l'interface, nous pouvons réécrire l'égalité de la manière suivante :

$$\frac{-\kappa_m}{\varepsilon_m} = \frac{\kappa_d}{\varepsilon_d}.$$

En utilisant la définition de κ et sachant que les k_x sont égaux de part et d'autre de l'interface, cette dernière égalité peut être réécrite selon une solution d'un mode guidé défini par la relation de dispersion suivante, et illustrée en Figure 2-12:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}.$$

Ce mode guidé représente le plasmon de surface se propageant le long de l'interface. Ce mode ne peut exister si et seulement si $\varepsilon_m < -\varepsilon_d$.

Comme tout mode de propagation, le mode plasmonique nécessite un accord de phase entre le mode et l'onde excitatrice. Cela se produit lorsque le vecteur d'onde et l'énergie du plasmon et de l'onde EM sont les mêmes. On parle alors de double résonance.

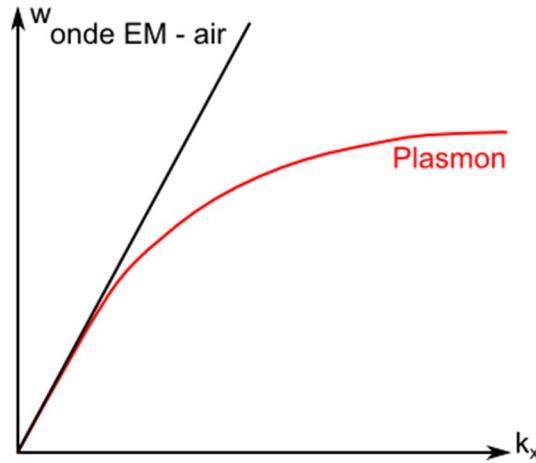


Figure 2-12 : Relation de dispersion du plasmon de surface

2.3.3.1 Le couplage onde-plasmon – principe

Afin d'obtenir un couplage entre un plasmon et onde EM, ces deux entités doivent être en accord de phase – signifiant qu'elles doivent avoir la même pulsation (ou énergie) ainsi que le même vecteur d'onde.

Cette double condition de résonance peut aussi être visualisée en comparant les relations de dispersions du plasmon et de l'onde EM incidente (Figure 2-13a). La relation de dispersion de la lumière dans l'air est décrite par la ligne noire ainsi que celle du plasmon par la courbe en rouge – celle dans un prisme en bleue et celle diffractée par un réseau en vert.

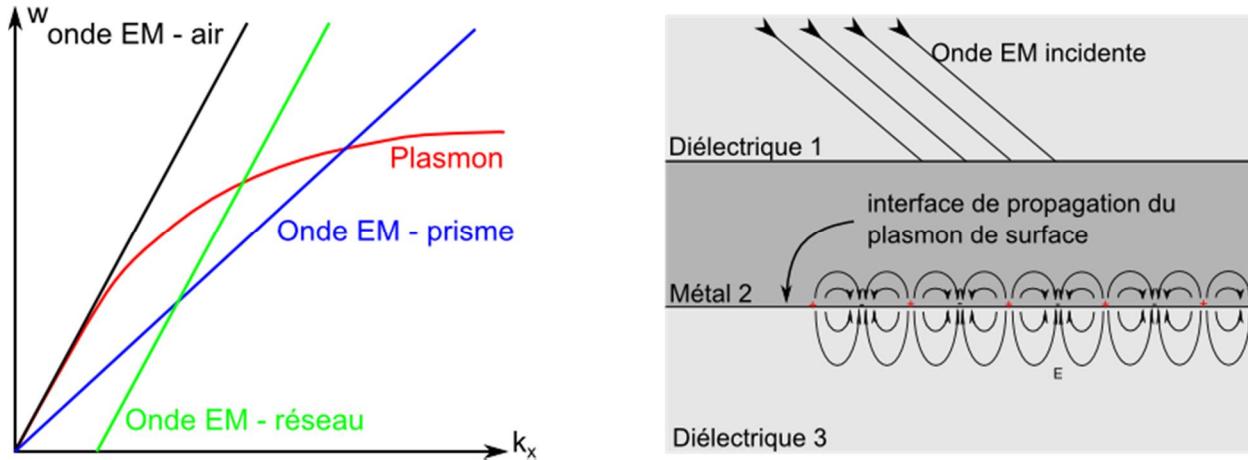


Figure 2-13 : Principe de couplage entre le plasmon de surface et une onde électromagnétique.

Il est à constater que les courbes noires et rouge ne se croisent jamais menant donc à la conclusion suivante : il ne peut y avoir d'excitation du plasmon de surface dans l'air sur une interface plane. Pour cela, la relation de dispersion de la lumière doit être agrandie soit en ajoutant une composante en vecteur d'onde (réseau – ligne verte) ou en la multipliant le vecteur d'onde (prisme – ligne bleue). Dans ce dernier cas, un média diélectrique (prisme) dont l'indice de réfraction est supérieur à celui présent sur l'interface où le plasmon doit être excité est utilisé. L'onde évanescante générée à la frontière diélectrique 1 / métal permet alors l'excitation du plasmon de surface sur l'interface métal / diélectrique 3 –géométrie visualisée sur la Figure 2-13b.

Le couplage inverse peut aussi se produire – on parle alors de mode de fuite du plasmon de surface. Dans ce cas-ci, il se découpe de son mode de propagation à l'interface pour devenir un mode radiatif.

Cet effet est très présent dans les cas d'excitation par réseau – ce dernier permettant au mode confiné à la surface de radier en ajoutant ou en enlevant une composante en vecteur d'onde. Ce phénomène est aussi observé lorsque la surface supportant le plasmon est rugueuse (rugosité permet le découplage en jouant le rôle de dipôle discret).

Il est aussi possible de l'observer lorsque nous sommes en présence de la configuration représentée en Figure 2-13b et que la couche métallique est fine (généralement inférieure à $e=40\text{ nm}$). Ce découplage est le chemin inverse de couplage. Si le champ évanescant du plasmon est encore assez fort à l'interface entre le diélectrique 1 et le métal, il peut alors donner une onde radiative dont la composante en x de k est la même que celle du plasmon.

2.3.4 Méthode d'excitation du plasmon de surface

2.3.4.1 Méthode par réflexion totale interne frustrée

La méthode la plus couramment utilisée pour exciter un plasmon de surface est la réflexion totale interne frustrée via l'utilisation d'un prisme. Il existe deux types de configuration, l'une de type Kretschmann-Raether [83, 84] où la couche d'or est directement apposée sur le prisme, l'autre de type Otto [85] qui présente un écart d'air entre le prisme et le film d'or où est supporté le plasmon de surface Figure 2-14.

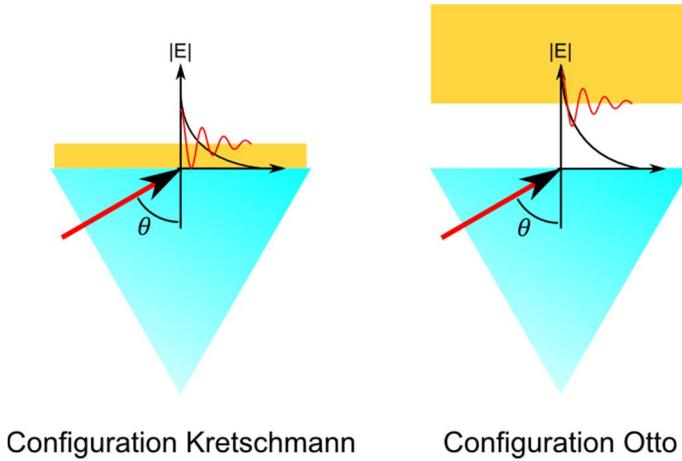


Figure 2-14 : Schéma de couplage par prisme selon configuration de Kretschmann ou d'Otto.

Dans chacune de ces configurations, le vecteur d'onde de la composante tangentielle du faisceau incident est augmenté par la valeur de l'indice de réfraction du prisme, et il peut être écrit de la façon suivante :

$$k_x = \sqrt{\epsilon_{\text{prisme}}} * \frac{\omega}{c} * \sin \theta.$$

Avec ϵ_{prisme} la permittivité diélectrique du prisme et θ l'angle d'incidence de l'onde EM. Comme il est possible de l'observer sur la Figure 2-15a, le couplage est obtenu lorsque la relation de dispersion de l'onde EM (courbe bleu pointillée) croise celle du plasmon de surface (en rouge). La courbe en bleue continue représente la relation de dispersion de l'onde EM dans le prisme à incidence rasante ($\theta=90^\circ$)

Dans le cas de la configuration Kretschmann, l'épaisseur de la couche d'or doit être suffisamment fine pour que l'onde évanescente générée à l'interface prisme/couche d'or puisse atteindre la seconde interface sans avoir été totalement absorbée. Dans la plupart des articles de la littérature, une épaisseur $e=50 \text{ nm}$ (dont e représente l'épaisseur de la couche métallique) est couramment utilisée dans les biocapteurs plasmoniques utilisant cette configuration.

Une analyse plus poussée, utilisant le modèle des couches minces présenté précédemment, montre que pour une longueur d'onde de $\lambda=632.8 \text{ nm}$ (laser HeNe) et avec l'eau comme milieu diélectrique (représentant mieux l'application proposée dans ce doctorat), une épaisseur de $e=48.1 \text{ nm}$ représente l'épaisseur optimale en matière de baisse d'intensité et de finesse de pic

pour un angle de résonance $\theta_{SPR}=72.226^\circ$. Il est à noter que le minimum de la courbe obtenue ne provient pas seulement du couplage entre l'onde et le plasmon. Les multiples réflexions à l'intérieur de la couche participent à cette baisse d'intensité créant une situation d'interférence destructive pour cette épaisseur à cette longueur d'onde.

Dans le cas de la configuration Otto, l'écart d'air (ou de tout autre milieu ayant un indice de réfraction plus bas que celui du prisme noté e') entre le prisme et la couche d'or doit être suffisamment petit pour permettre à l'onde évanescante générée à l'interface prisme/diélectrique d'atteindre la couche métallique. La même analyse a été faite pour une longueur d'onde de $\lambda=632.8\text{ nm}$. Dans ce cas, selon le modèle il existe deux épaisseurs e optimales de l'écart. La première est égale à $e'=152.8\text{ nm}$ avec un pic plasmon à $\theta_{SPR}=85.322^\circ$ et la seconde est de $e'=290.3\text{ nm}$ proposant un pic plasmon à $\theta_{SPR}=73.785^\circ$. Ces minces épaisseurs sont cependant le tendon d'Achille de cette méthode de couplage, car il est très complexe de faire passer des fluides dans des canaux dont la taille est de l'ordre de la centaine de nanomètres.

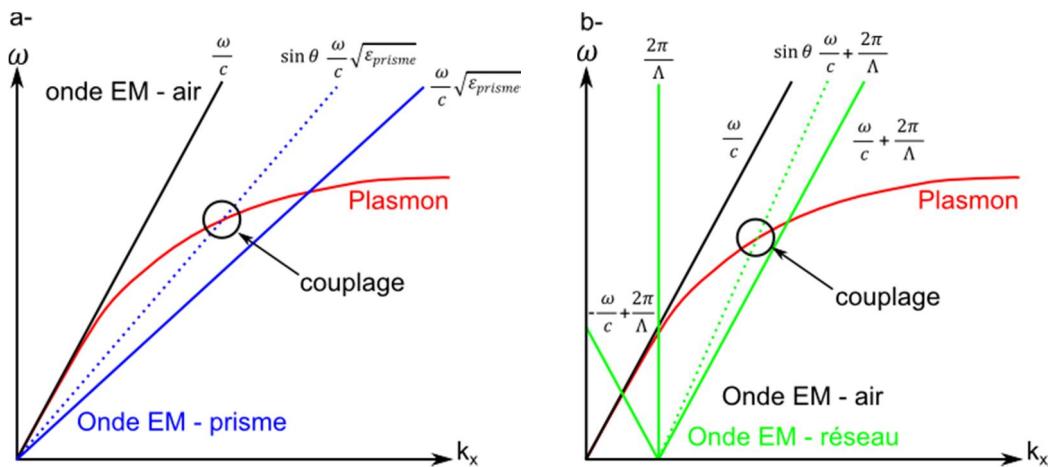


Figure 2-15 : Comparaison des relations de dispersions des ondes EM excitatrices et du plasmon de surface; a- cas de la réflexion totale interne frustrée, b- cas de l'excitation par réseau

2.3.4.2 Méthode par diffraction – réseaux et nanoplasmonique

La seconde méthode utilisée pour exciter les plasmons de surface se base sur l'emploi de réseau de diffraction périodique, tel qu'illustré sur la Figure 2-16.

Ce dernier permet à l'onde EM incidente d'être diffractée, gagnant une composante égale à +/- un multiple du vecteur d'onde du réseau comme montré dans l'équation ci-dessous [86].

$$k_{x,diffracté} = k_{x,incident} \pm p \frac{2\pi}{\Lambda} = \sin(\theta) \frac{\omega}{c} \pm p \frac{2\pi}{\Lambda}.$$

Avec p , un entier strictement positif et Λ , la période du réseau. Comme il est possible de l'observer sur la Figure 2-15b, le couplage est obtenu lorsque la relation de dispersion de l'onde EM diffractée (courbe pointillée verte) croise celle du plasmon (courbe continue rouge). Les courbes continues vertes correspondent de gauche à droite respectivement à la limite basse des vecteurs d'onde atteignable pour l'onde EM (rasante dans le sens opposé à la propagation du plasmon, lorsque $\theta=-90^\circ$), la relation de dispersion arrivant à incidence normale ($\theta=0^\circ$) et la limite haute du vecteur d'onde (incidence rasante dans le sens de la propagation du plasmon où $\theta=90^\circ$).

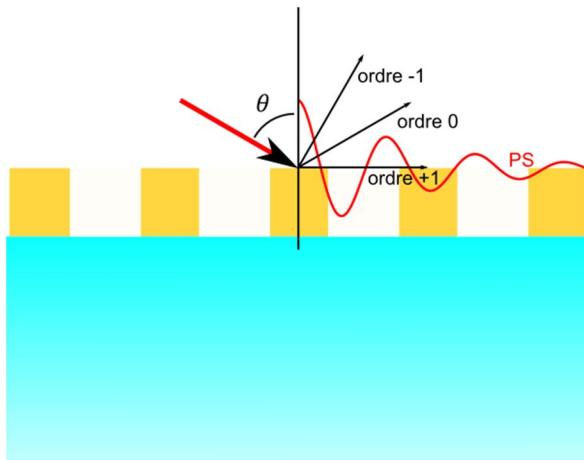


Figure 2-16 : Schéma illustrant le couplage d'une onde EM incidente sur un réseau avec un plasmon de surface.

La nanoplasmonique utilise le même principe pour exciter un plasmon de surface, la différence étant que les nanostructures sont du même ordre ou plus petite que la longueur d'onde utilisée. Il est alors possible d'observer ce qu'il est appelé transmission optique extraordinaire (venant de l'anglais « Extraordinary Optical Transmission » ou EOT) [87, 88]. Contrairement aux configurations en réseau traditionnel où la réponse plasmonique est regardée en réflexion, la nanoplasmonique se réfère principalement à une analyse en transmission. Ce phénomène de transmission extraordinaire est simplement expliqué par le fait que l'onde EM incidente sur la nanostructure est transformée en partie en plasmon de surface via le réseau. Ce plasmon se propage le long de la structure avant que ce dernier réémette une onde radiative de l'autre côté de la nanostructure. Ce processus est schématisé sur la Figure 2-17.

Dépendant des structures utilisées et de la géométrie de ces dernières, l'intensité transmise peut être maximale, grâce à une interférence constructive de l'onde transmise et de la réémission du plasmon, ou elle peut être minimale, induite par une interférence destructive entre l'onde transmise et de la réémission du plasmon.

Ces structures sont très intéressantes à étudier, car présentent les mêmes caractéristiques qu'une configuration en réseau, mais permettent l'analyse en transmission et en incidence normale, simplifiant de ce fait le système optique.

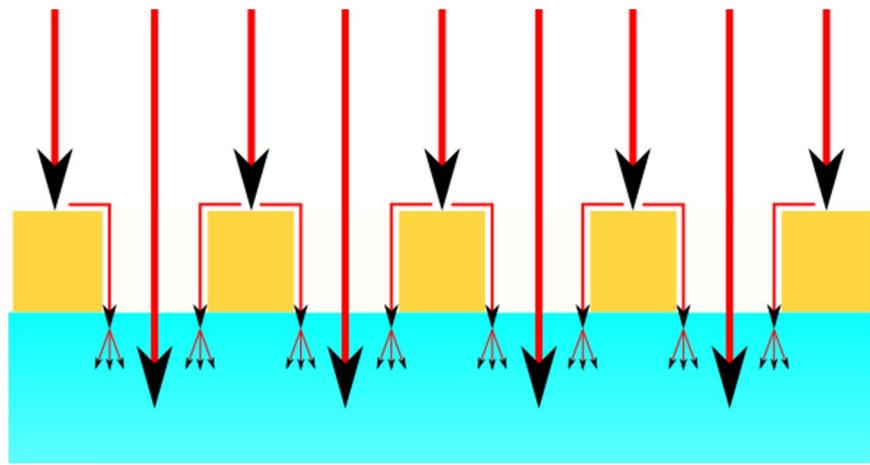


Figure 2-17 : Schématisation de la transmission optique extraordinaire.

2.3.5 La SPR pour les biocapteurs

2.3.5.1 Principe

Le principe d'un biocapteur utilisant la résonance plasmonique comme transduction est expliqué dans la Figure 2-18. Cette dernière permet de transformer un signal biologique en un observable – ici un changement des propriétés de l'onde réfléchie. Le signal biologique dans le cas d'un plasmon de surface va changer l'indice du milieu vu par la sonde plasmonique – défini par son onde évanescente. Il doit être remarqué que cette sonde est incapable de distinguer un changement d'indice du diélectrique ou une adsorption d'une couche mince sur le film d'or – ces deux variations menant à un changement d'indice du milieu effectif observé par la sonde plasmonique.

L'onde EM incidente est la radiation qui va permettre l'excitation du plasmon de surface. Elle peut avoir des caractéristiques fixes en longueur d'onde ou en angle d'incidence, ou elle peut proposer la variation de l'un des deux paramètres ou des deux paramètres.

Le système de couplage représente la configuration qui permet l'excitation du plasmon de surface. Comme il a été vu précédemment, il peut être un système utilisant un prisme (configuration Kretschmann ou Otto) ou un système utilisant la diffraction (coupleur utilisant un réseau ou une structure nanoplasmonique).

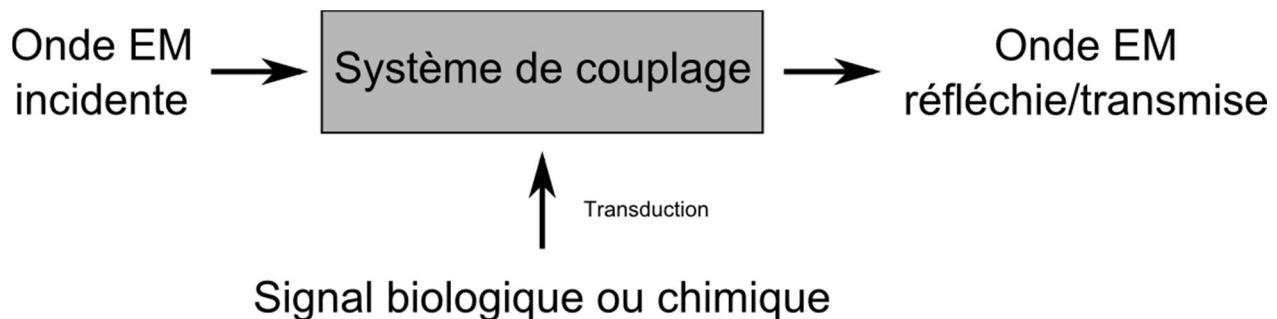


Figure 2-18 : Principe de biodétection via une transduction plasmonique.

Le signal biologique ou chimique est le signal qui va créer la perturbation en indice de réfraction au niveau de l'interface. Ce dernier peut être le changement de la solution testée ou alors le dépôt d'une couche biologique à la suite d'une adsorption non spécifique de protéine sur la surface d'or (physisorption) ou à une adsorption spécifique induite par la présence de récepteur sur cette surface.

La transduction est la façon dont le signal biologique est transformé en signal physique mesurable. Dans le cas de la plasmonique, cette dernière est le changement d'indice de réfraction dans la sonde plasmonique généré par le changement de solution ou par l'adhésion d'une couche mince sur le film d'or.

L'onde EM transmise/réfléchie contient l'information plasmonique. Cette dernière est accompagnée d'un changement d'intensité et de phase. Dans le cas d'une mesure avec longueur d'onde et angle fixé – un changement d'intensité et de phase sera noté. Dans le cas où l'un des paramètres est scanné, la position du minimum d'intensité sera changée ainsi que celle du saut de phase.

2.3.5.2 Caractéristique physique de la sonde

Le dernier point abordé sur la résonance plasmonique est la caractéristique physique de la sonde. En effet, cette dernière est représentée par l'extension spatiale de l'onde évanescante du plasmon de surface dans le milieu diélectrique. Comme il a été mentionné précédemment, elle ne peut faire la distinction entre l'ajout d'une couche mince ou le changement d'indice de tout le milieu diélectrique, car elle n'est sensible qu'au changement de l'indice effectif du milieu dans lequel elle pénètre.

Cette extension spatiale dans le milieu est calculée à partir des solutions trouvées dans la section 2.3.3 et est décrite, dans le milieu i, par la relation suivante :

$$L_{\text{pénétration},i} = \left[\frac{2\pi}{\lambda} \Re \left(\sqrt{\frac{\epsilon_m + \epsilon_d}{\epsilon_i^2}} \right) \right]^{-1}$$

Où l'indice i peut désigner soit le métal ou le diélectrique, λ est la longueur d'onde d'excitation dans le vide et les ϵ sont les permittivités diélectriques dans le métal (m) et dans le diélectrique (d). Dans le cas pratique de l'eau comme milieu diélectrique, et dont la longueur d'onde d'excitation est de $\lambda=650 \text{ nm}$, la profondeur de la sonde est d'environ de $L=250 \text{ nm}$.

2.3.5.3 Mode d'interrogation et réponse optique de la SPR

Que ce soit dans une configuration utilisant un prisme comme coupleur ou un réseau, il existe plusieurs façons de sonder la réponse du plasmon de surface aux variations du milieu diélectrique testé.

La première méthode utilisée est de faire un suivi en temps réel de la position de la résonance, soit de manière spectrale ou angulaire. Cette technique est la plus répandue dans les systèmes commerciaux. Cette réponse est observable sur la Figure 2-19 où la méthode angulaire a été calculée pour une longueur d'onde d'excitation de $\lambda=632.8 \text{ nm}$, et la méthode spectrale a été étudiée avec un angle d'incidence de $\theta=70^\circ$. Les milieux étudiés sont l'eau et l'eau majorée d'une variation d'indice de $\Delta n=10^{-3} \text{ RIU}$.

Cette analyse est réalisée en mesurant la position (spectrale ou angulaire) du minimum de l'onde réfléchie. Pour cela un système d'imagerie 1D ou 2D est employé afin de détecter les différentes intensités selon l'angle ou la longueur d'onde. Après traitement des données, généralement une

interpolation polynomiale ou une analyse du barycentre de la courbe, la position de la résonance est définie et suivie en temps réel — la variation de cette position représentant la mesure d'un changement d'indice dans le milieu (causé par un changement de solution ou l'adhésion d'une couche mince).

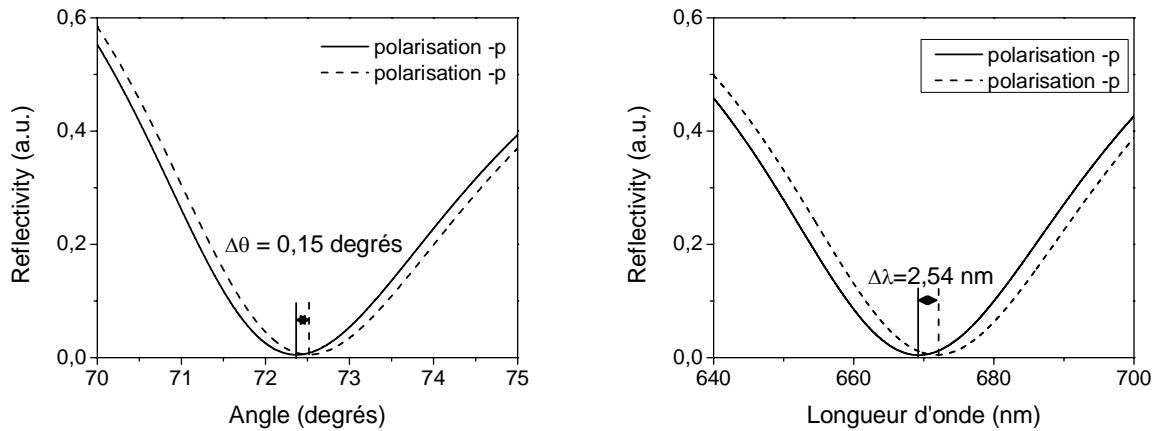


Figure 2-19 : Réponse angulaire du plasmon de surface suite à une variation d'indice de $\Delta n = 10^{-3}$ RIU dans le milieu - la courbe continue est pour l'eau, la courbe en pointillé est pour le diélectrique avec l'indice de l'eau majoré de $\Delta n = 10^{-3}$ RIU. a- changement angulaire de la résonance, b- changement spectral de la résonance.

La seconde approche, pour observer la réponse du plasmon, est de faire une mesure statique – à longueur d'onde et angle fixe – de la variation d'intensité ou de la phase.

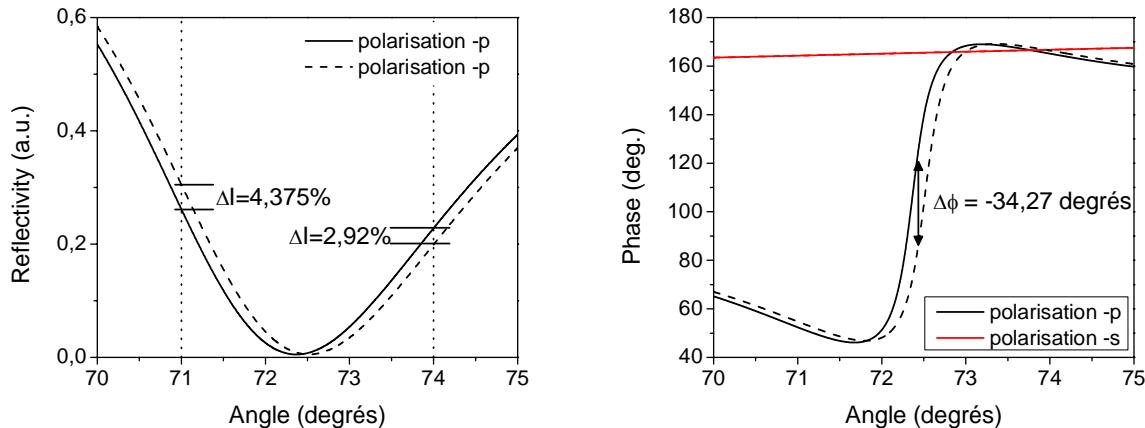


Figure 2-20 : Étude statique de l'intensité et de la phase selon les mêmes conditions expérimentales présentées dans la première méthode d'analyse.

Afin d'alléger le texte, seule l'observation angulaire sera présentée comme illustration — Figure 2-20. Les paramètres de l'étude sont : une longueur d'excitation de $\lambda=632.8\text{nm}$, des angles d'observation pour le changement d'intensité de $\theta=71^\circ$ et de $\theta=74^\circ$. Celui pour la phase est de $\theta=72.5^\circ$. Cette différence dans l'angle d'observation provient de la position de la variation linéaire (ou pseudo-linéaire) de l'intensité ou de la phase. En effet, cette variation se produit très proche de la résonance pour la phase, alors que cette dernière se produit de chaque côté de la résonance pour l'intensité.

Cette étude est réalisée en regardant le changement en intensité ou en phase du faisceau réfléchi. Dans de telles applications, des systèmes de mesure d'intensité ou de phase utilisant une détection synchrone sont utilisés afin de pouvoir filtrer les bruits provenant de la source ou d'autres composants du système optique. La variation en intensité ou en phase représente la mesure d'un changement d'indice dans le milieu.

Dans ces deux types de mesure, le plasmon est incapable de distinguer le changement d'indice du milieu d'une adsorption d'une couche mince sur le film d'or. Ceci est dû au fait que l'onde évanescante générée par le plasmon est sensible au changement de l'indice effectif du milieu défini par une pondération de l'indice du milieu dont l'onde évanescante pénètre – soit provoqué par un changement d'indice du diélectrique dans son entièreté, soit par l'ajout d'une couche mince qui va altérer la perception en indice de cette onde.

2.4 Revue de littérature des méthodes pour la biodétection

Dans cette section, une revue de littérature a été réalisée sur les méthodes de biodétection basée sur l'utilisation de la polarimétrie comme mesure du faisceau sonde. Pour profiter au maximum des capacités de la polarimétrie, elles doivent présenter une asymétrie partielle ou complète de leur réponse entre deux polarisations orthogonales. Quatre types de transductions se distinguent par leur possibilité à exploiter de manière efficace la polarimétrie – les guides d'ondes, les miroirs résonants, la réflexion totale interne et la résonance plasmonique de surface.

2.4.1 Guide d'onde interférométrique par double polarisation

Le premier système présenté est celui utilisant des guides d'ondes dans un schéma interférométrique et avec une analyse en polarisation. Il utilise l'onde évanescante générée par le

mode se propageant dans le guide senseur pour détecter la présence d'une couche mince sur ce dernier. Cette technique est activement étudiée depuis les 10 dernières années et un système commercial a été proposé par la compagnie Farfield Group Ltd. La structure consiste en un système de multicouche (Figure 2-21) présentant alternativement de bas indices de réfraction (couche grise) et de hauts indices (couche bleue), dont le faisceau laser est injecté dans ces dernières.

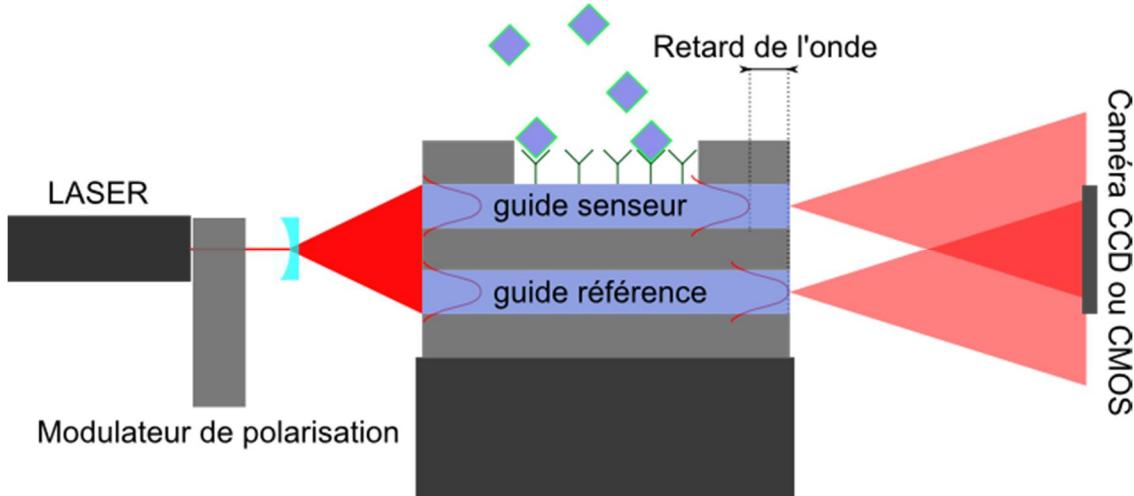


Figure 2-21 : Système de guide d'onde interférométrique basé sur deux guides d'ondes dont les ondes en sorties vont interférer de la même manière que l'expérience des fentes d'Young. Le guide du haut est le senseur, car exposé au milieu à tester. Le guide du bas est la référence, car isolé optiquement de toute variation.

Deux modes se propagent dans ces deux guides. Le premier, le guide senseur, est en contact avec la biologie à déetecter et verra une interaction de l'onde évanescante du mode avec cette dernière. Cette interaction induira alors un retard dans la propagation. Le second guide sert de référence, car il n'est pas en contact avec la biologie. Par la suite, ces modes se découplent de l'autre côté du guide générant deux ondes radiatives ayant un retard de phase entre elles. Ces deux ondes interfèrent entre elles générant un interférogramme présenté à la Figure 2-22. Ce dernier est très similaire à celui obtenu pour l'expérience des fentes d'Young, soit la valeur absolue d'une série d'oscillation pondérée par un sinus cardinal.

Tout changement d'indice dans la zone sondée par l'onde évanescante sur le guide senseur va générer un déplacement de ces franges d'interférence. Ce changement de phase peut être écrit selon la relation suivante :

$$\Delta\phi = k_{mode} d \Delta n_{eff}.$$

Dans cette équation, $\Delta\phi$ est le changement de phase observé, k_{mode} est le vecteur d'onde du mode se propageant dans les guides d'onde, égale à $\frac{2\pi}{\lambda}$, Δn_{eff} la variation de l'indice de réfraction effectif sondé par l'onde évanescante et d la longueur du guide d'onde en contact avec la biologie. Similairement à l'onde évanescante reliée au plasmon de surface — cette dernière est incapable de distinguer le changement du milieu ou l'addition d'une couche mince. Cependant, cette technique propose un moyen de distinguer ces deux informations en utilisation des polarisations différentes.

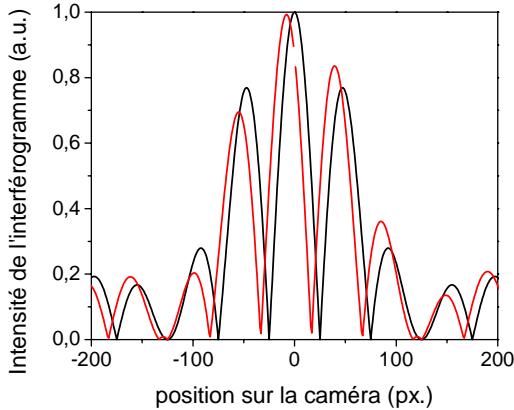


Figure 2-22 : Interférogramme type obtenu avec les guides d'ondes interférométriques — la courbe en noir est pour un déphasage de 0 degré, la courbe en rouge est pour un déphasage de $\Delta\phi=15^\circ$.

En effet, l'utilisation de la polarisation TE (analogue à la polarisation s dans le cas de la résonance plasmonique de surface) et TM (analogue à la polarisation p) dans ce système permet de pouvoir dissocier l'information de l'indice de réfraction de la couche de l'épaisseur. Ceci provient du fait que les ondes évanescentes selon la polarisation TE et TM ne s'étendent pas sur la même profondeur. Après une analyse comparative des réponses, il peut être déterminé avec précision l'indice de la couche ainsi que son épaisseur. Avec ces informations et celle relative à la molécule adsorbée, une estimation de la couverture de surface en unité de masse par mm² peut être faite.

Les guides d'ondes sont utilisés pour de nombreuses applications, principalement portées sur l'analyse de l'adsorption d'une couche même sur le guide d'onde ainsi que le changement de

conformation des molécules. On retrouve cette technique surtout dans l'étude de l'hybridation de l'ADN ainsi que son changement de conformation [89-92], mais aussi dans l'analyse des couches minces et la cinétique d'accroche [93-96], pour la mesure de la cristallisation de molécule [97, 98] ou dans l'étude cinétique entre un anticorps et son antigène [99, 100], application proche de ce qui est proposé pour la détection de la leucémie.

2.4.2 Miroir résonant

Le second système présenté est celui utilisant la technique de la réflexion totale interne frustrée par miroir résonant et dont la configuration est présentée à la Figure 2-23. Cette technique se base sur l'excitation d'un mode de propagation dans une couche à haut indice (dernière couche sur la Figure 2-23 – bleue foncé) via une onde évanescante générée à l'interface prisme/espaceur. Ce mode va au fur et à mesure de sa propagation faire fuir une partie de son énergie vers le prisme en prenant le chemin inverse (onde évanescante à l'interface guide d'onde/espaceur radie de nouveau dans le prisme). Cette technique a été commercialisée par la compagnie IASys.

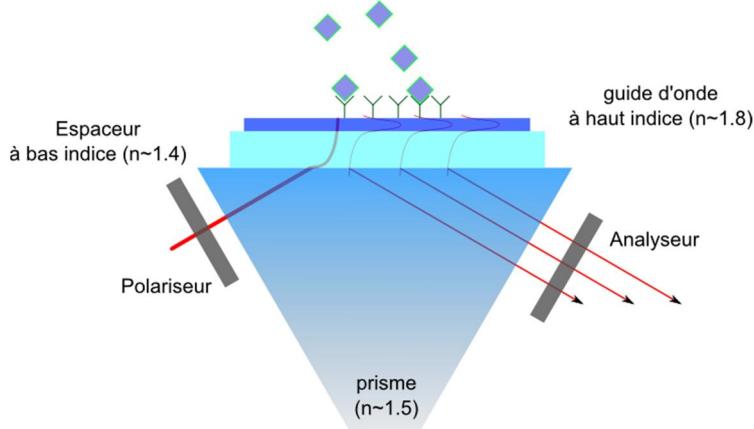


Figure 2-23 : Système de miroir résonant basé sur un empilement d'une couche à faible indice ($n=1.45$, $e=1000nm$) permettant la réflexion totale interne et d'une couche à haut indice ($n=1.8$ $e=100nm$) servant de guide d'onde pour l'onde évanescente transmise par effet tunnel optique.

L'intensité réfléchie étant le mélange d'ondes réémises ne présente pas d'interférence constructive ni destructive telle qu'observée sur la Figure 2-24a. Cependant, un changement de phase abrupt apparaît pour la différence de phase entre la polarisation $-p$ et $-s$. Ce dernier est à un

angle spécifique – angle où il y a accord de phase entre l'onde incidente dans le prisme et le mode du guide d'onde. Dans le cas de la géométrie proposée, il est possible d'obtenir deux accords de phase (double saut de phase obtenu — Figure 2-24a).

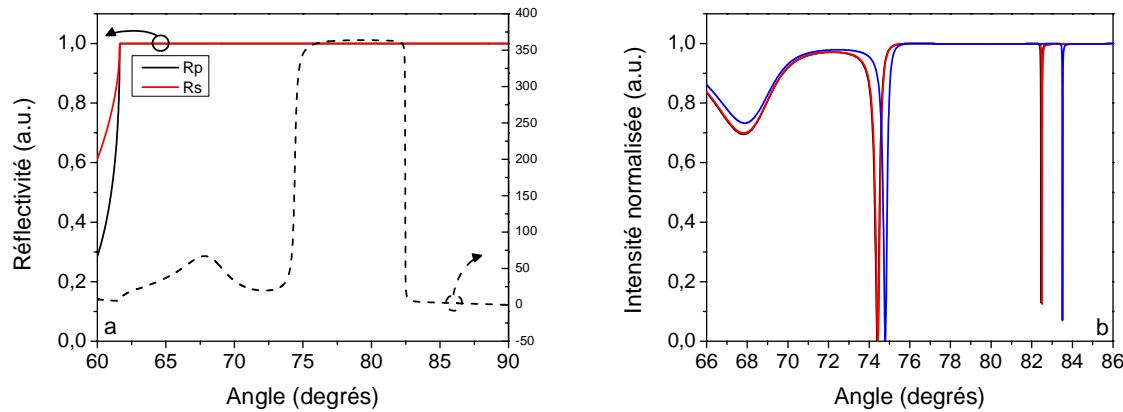


Figure 2-24 : a- Réponse en intensité sans analyseur – aucun changement d'intensité n'est à noter nous permettant de conclure à l'absence d'interférence constructive ou destructive; b- Réponse en intensité après l'analyseur – mélange de l'information en intensité et en phase des polarisations -p et -s. Trois conditions expérimentales observées : en noir – miroir résonant dans l'eau, en rouge – miroir résonant dans l'eau majoré d'une valeur de $\Delta n=10^{-3}$ en indice de réfraction, en bleu – miroir résonant dans l'eau avec la présence d'une couche de $e=10\text{nm}$ d'indice $n=1.47$ sur le guide d'onde.

Afin de simplifier le système de mesure, un système polariseur/analyseur croisé est utilisé et nous fournit l'intensité décrite par la relation suivante :

$$I = \frac{1}{4} [R_p^2 + R_s^2 + 2R_p R_s \cos(\phi_p - \phi_s)]$$

Dont R_p et R_s sont les amplitudes de la réflexion selon la polarisation -p et -s respectivement et ϕ_p et ϕ_s sont les phases des polarisations -p et -s. Ce système permet de mélanger les informations de phase et d'intensité des polarisations -p et -s afin que l'intensité réfléchie devienne une série de pics en fonction de l'angle comme il est possible de l'observer sur la Figure 2-24b.

Les applications du miroir résonant sont principalement liées à l'analyse d'adsorption de couche mince. La plupart des études trouvées dans la littérature ont été réalisées à partir du système

commercial proposé par la compagnie IASys [101]. Elles portent sur l'analyse cinétique de réaction anticorps-anticorps [102-105], dans l'analyse et la découverte de nouvelles molécules médicamenteuses [13], la détection de molécules via des récepteurs spécifiques [106-108] ou la détection de maladie via des biomarqueurs spécifiques [104, 109, 110] ce qui est proche de la méthode de détection proposée pour le dépistage de la leucémie.

2.4.3 La réflexion totale interne (ellipsométrique)

Une technique d'intérêt dans le cadre d'une mesure polarimétrique est la réflexion totale interne. En effet, cette dernière permet de réaliser des mesures ellipsométriques sans que le faisceau sonde traverse le milieu testé – comme c'est le cas dans le cadre d'une ellispométrie normale. Cette technique repose sur la mesure séparée ou combinée de la polarisation et de la phase du faisceau réfléchi afin d'analyser et de différencier le milieu ainsi que la couche mince se déposant sur le prisme. Ce dernier peut se faire à angle fixe avec une lecture spectrale des paramètres polarimétriques ou inversement à longueur d'onde fixe, mais avec une lecture angulaire. Il existe aussi plusieurs systèmes présentant une lecture statique (angle et longueur d'onde fixée) de la polarisation et de la phase.

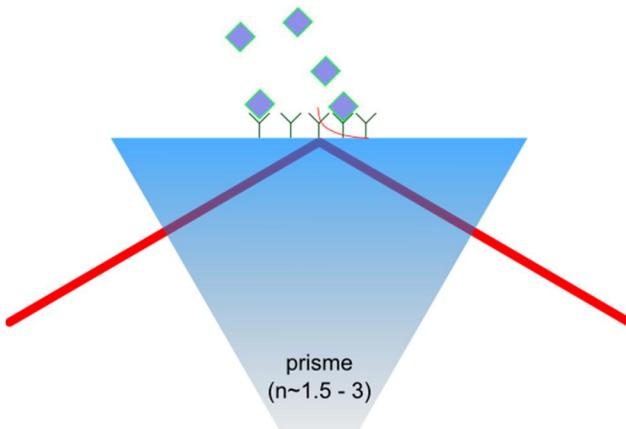


Figure 2-25 : Configuration en réflexion totale interne — l'analyse du faisceau sonde peut-être soit en étudiant la réponse angulaire, soit la réponse spectrale de la réflexion totale interne.

Les applications de la réflexion totale interne sont principalement l'analyse de couches minces métalliques [111] et biologiques [112]. Il a été aussi analysé sa limite de détection pour les gaz [30] et dans les liquides [113, 114] dont ces derniers proposent résolution proche de celle

proposée par la SPR. Il est aussi possible de trouver plusieurs papiers relatant de la réflexion totale interne ellipsométrique assistée par une couche métallique (généralement une couche d'or de $e=50nm$) [115-117]. Dans ces études, ils réalisent une analyse ellipsométrique de la résonance plasmonique de surface afin d'obtenir des informations telles que l'épaisseur de la couche ainsi que son indice de réfraction.

2.4.4 La résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est devenue depuis les deux dernières décennies la transduction dominante pour les biocapteurs optiques. De nombreuses applications commerciales ont aussi émergé, favorisant son utilisation par rapport aux autres technologies. Cette technologie peut être analysée sous trois aspects : les méthodes conventionnelles de mesure de la position de la résonance (angulaire ou spectrale), l'analyse en phase et les systèmes utilisant les nanostructures plasmoniques.

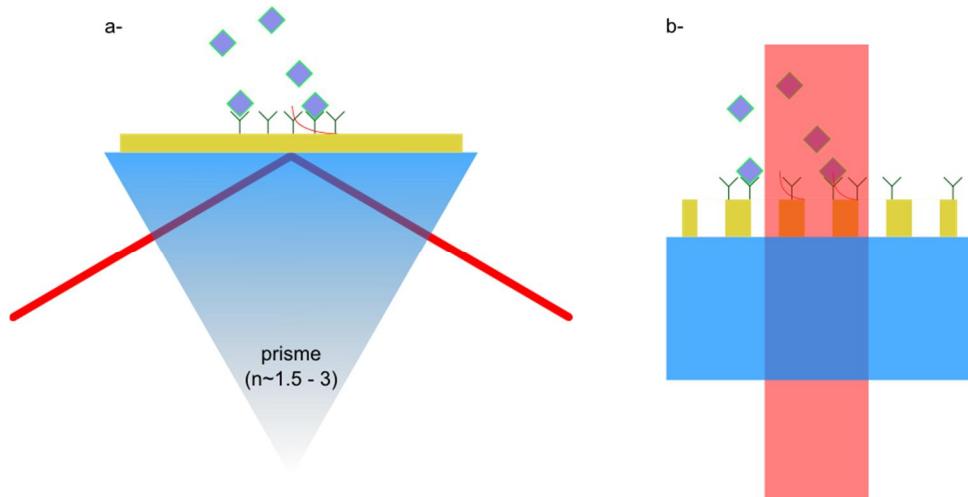


Figure 2-26 : Systèmes plasmoniques - a- configuration Kretschmann, b- configuration nanoplasmonique

Les systèmes conventionnels mesurant la position angulaire ou spectrale de la résonance sont utilisés dans une multitude de domaines. Il est possible de les retrouver dans l'analyse de cinétique d'accroche entre molécules [118-122], la découverte de molécules médicamenteuses [12-14, 17] ou la détection de différentes maladies [45-49, 123, 124]. De nombreuses études sur les systèmes sont aussi réalisées comme il est possible de le voir par cette revue de littérature

proposée par Piliarik et al. [125], où les limites de détections sont toujours repoussées par les innovations instrumentales.

Les systèmes de mesure de phase sont aussi des plateformes qui font l'objet d'une intense activité de recherche. Ces systèmes, qui ont la particularité d'offrir des limites de détection très basses, jusqu'à 100 fois moindre que celle proposée par les systèmes SPR conventionnels, sont aussi utilisés dans différents domaines. On les retrouve dans la détection d'analytes [63, 126-128] mais aussi dans le diagnostic médical avec la détection de biomarqueurs (immunoglobuline) [129, 130].

Enfin, les systèmes utilisant les nanostructures plasmonique sont aussi depuis la dernière décennie l'objet de nombreuses études. Apportant une structure plasmonique qui peut être lue en incidence normale, elle permet une meilleure intégration de la microfluidique dans les plateformes plasmonique [131-134] ainsi qu'une détection plus rapide, car le fluide peut passer à travers les structures [21, 134-136]. Ce type de plateforme est utilisé principalement pour la détection d'analyte. De nouvelles applications, comme la détection de maladie [137] via des marqueurs présents dans le sérum fait leur apparition.

2.5 Choix des transductions étudiées pour l'analyse des fluides complexes

Finalement, la dernière étape de ce chapitre et du premier objectif de ce projet de doctorat est le choix des transductions qui seront utilisées et étudiées. Ce choix est basé sur une analyse comparative des limites de détections des plateformes proposées dans la section précédente. Elle peut être synthétisée par le Tableau 2-2.

Les valeurs présentées dans ce tableau sont celles exposées dans les articles cités ou estimées (par l'auteur) des résultats présentés dans ces articles. Ces données ont été aussi recoupées avec plusieurs revues de littérature ou livres traitants sur les biocapteurs [138-141].

Il peut être remarqué que la résonance plasmonique de surface présente les meilleures sensibilités (en intensité et en phase) que ce soit en matière d'indice de réfraction ou en couverture de surface. De ce fait, c'est la première à être sélectionnée pour étude dans cette thèse.

Malgré une faible limite de détection en matière d'indice de réfraction, la nanoplasmonique offre tout de même des sensibilités similaires en couverture de surface. Ceci provient de la localisation du plasmon qui le rend plus sensible au dépôt de couche mince. De plus, ses qualités éprouvées pour le multiplexage en font un sérieux candidat pour l'analyse biomédicale nécessitant généralement l'étude de plusieurs marqueurs simultanément. Cela fait d'elle la deuxième transduction sélectionnée.

Finalement, la réflexion totale interne, les miroirs résonants ainsi que les guides d'onde présentent tous trois des résolutions similaires. Dans ce cas-ci, la réflexion totale interne a été sélectionnée, car peu d'étude avait été réalisée pour les milieux biologiques, ce qui avait suscité l'intérêt de l'auteur. De plus, cette technique peut être couplée à d'autres techniques comme la fluorescence ou la spectroscopie vibrationnelle – ce qui peut augmenter ses champs d'application. Enfin, c'est une technique qui permet de séparer l'information de l'indice de réfraction du milieu à celle de la couche mince, ce qui peut être un avantage à notre mesure pour l'immuniser contre les sources de bruit agissant sur le milieu.

Tableau 2-2 : Comparaison des plateformes vues dans la revue de littérature (avec leurs références pertinentes).

plateforme	Limite de détection en indice de réfraction effectif (RIU)	Limite de détection en couverture de surface (pg.mm⁻²)
Guide d'onde [92, 94, 97, 141]	N.D.	~ 5 pg.mm ⁻²
Miroir résonant [101, 102, 108, 141]	10^{-6} RIU (IASys)	~ 5 pg.mm ⁻²
Réflexion totale [29, 30, 113]	10^{-6} RIU	N.D.
SPR (intensité) [17, 27, 81, 125]	10^{-6} RIU (BiaCore)	~ 1pg.mm ⁻²
SPR (phase) [127, 142-144]	10^{-8} RIU	N.D.
Nanoplasmonique [134, 145-148]	10^{-5} RIU	~ 2-3pg.mm ⁻²

CHAPITRE 3 SECTION EXPERIMENTALE ET TECHNOLOGIQUE

Ce chapitre est consacré aux aspects expérimentaux et technologiques du projet de doctorat. Dans un premier temps, une revue des technologies et composants optiques utilisés pour la réalisation des systèmes polarimétriques sera faite. Par la suite, les protocoles et les instruments utilisés pour préparer, fabriquer et caractériser les échantillons seront décrits. Enfin, une description du système de livraison des liquides à analyser vers le biocapteur sera présentée.

3.1 Technologie utilisée pour l'analyse polarimétrique

La polarimétrie est l'analyse de l'état de polarisation d'un faisceau lumineux. Cette dernière consiste à déterminer l'axe de polarisation d'un faisceau, le retard entre deux polarisations afin de caractériser la biréfringence (circulaire ou linéaire), ainsi qu'une éventuelle absorption spécifique selon une polarisation pour définir le dichroïsme (circulaire ou linéaire) de l'objet analysé.

Cette étude peut être faite suivant deux types de formalisme : le formalisme de Jones qui décrit la polarisation de la lumière suivant un vecteur à deux éléments; ou le formalisme de Stokes qui repose sur une description de la lumière à l'aide d'un vecteur à quatre éléments, et qui peut, contrairement au formalisme de Jones, représenter le taux de polarisation d'une lumière non cohérente.

Cette analyse polarimétrique est réalisée en utilisant des polarimètres qui peuvent fonctionner suivant deux principes : ceux exploitant l'interférométrie pour déterminer l'état de polarisation du faisceau sonde ou ceux basés sur des filtres polarisants, lames d'onde et autres modulateurs de polarisation (temporel, spatial ou spectral).

Dans le cadre de ce doctorat, les systèmes optiques réalisés utilisent principalement la propagation de la lumière en espace libre, seule la deuxième classe de polarimètres a été étudiée pour des raisons de compacité et de simplicité. De plus, ils permettent de réduire le bruit environnemental.

Contrairement à l'interférométrie, où plusieurs faisceaux sont utilisés et donc interagissent différemment avec l'espace qu'ils traversent, la polarimétrie propose l'interférence entre les polarisations d'un même faisceau par le biais d'un analyseur qui permet de regrouper la projection de deux polarisation orthogonales sur une seule.

Le modulateur photo-élastique est un composant optique qui utilise le phénomène de photoélasticité appliquée à un substrat transparent (généralement du verre). Lors de l'application d'un stress mécanique (tension ou compression), le substrat devient biréfringent, c'est-à-dire qu'il présente des indices de réfraction différents entre l'axe du stress et l'axe perpendiculaire à ce dernier.

Il en résulte une différence de vitesse de propagation entre deux polarisations orthogonales. Cette application de stress peut se faire de façon sinusoïdale à la fréquence de résonance du matériau, déterminé par sa masse et sa raideur (déterminé par le module de Young du matériel), qui dans le cas du système utilisé est de $f=50\text{ kHz}$ (le modulateur utilisé est celui proposé par Hinds, le modèle PEM-100 avec une tête I/FS50 dont le matériau est du « fused silica » ou un verre pur amorphe).

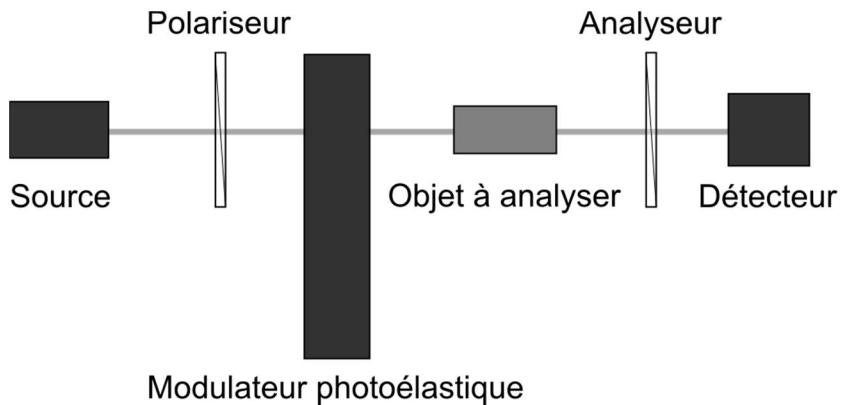


Figure 3-1 : Système d'analyse de phase avec modulation photoélastique

Un système conventionnel de mesure de phase repose sur une configuration décrite sur la Figure 3-1. Il est constituée du modulateur photo-élastique orienté à 0° avec l'échantillon ou le système à analyser est pris en sandwich entre un polariseur et un analyseur respectivement orienté à $\theta=45^\circ$ et $\theta=-45^\circ$. La valeur du champ électrique \vec{E}_f sortant de ce système est définie dans l'équation 3-1 selon le formalisme de Jones.

$$\vec{E}_f = \begin{vmatrix} E_{fs}^p \\ E_f^s \end{vmatrix} = M_A * M_{SPR} * M_{PEM} * \vec{E}_i$$

$$\vec{E}_f = \begin{vmatrix} 1 & -1 \\ -1 & 1 \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} R_p * e^{i\phi_p} & 0 \\ 0 & R_s * e^{i\phi_s} \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} e^{i\theta/2} & 0 \\ 0 & e^{-i\theta/2} \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} 1/\sqrt{2} \\ 1/\sqrt{2} \end{vmatrix} \quad 3-1$$

Dans l'équation 3-1, M_A , M_{SPR} et M_{PEM} représentent respectivement les matrices décrivant l'analyseur, le bloc SPR et le modulateur photo-élastique. Le vecteur initial \vec{E}_i est défini par le premier polariseur dont les valeurs pour chaque composante sont égales à $1/\sqrt{2}$. R_p est la norme de la réflectivité selon la polarisation -p, R_s est la norme de la réflectivité selon -s et ϕ_p et ϕ_s sont respectivement la phase selon la polarisation -p et -s. θ représente la modulation de phase induite par le modulateur photo-élastique. Elle est égale à $\theta = A_\theta * \sin(2 * \pi * f * t)$ avec A_θ l'amplitude de modulation en phase et f la fréquence de modulation. Le faisceau sonde est alors détecté par une photodiode dont le signal en sortie est décrit par l'équation 3-2.

$$I = \vec{E}_f * \overrightarrow{\vec{E}_f} = \frac{1}{2} * R_p^2 + \frac{1}{2} * R_s^2 + R_p * R_s * \cos(A_\theta * \sin(2\pi ft) + (\phi_p - \phi_s)) \quad 3-2$$

Cette intensité est analysée par une détection synchrone en utilisant comme référence la fréquence de résonance du modulateur photo-élastique. La décomposition en série de Fourier du signal acquis est présentée dans les équations 3-3, 3-4 et 3-5, représentant respectivement la composante continu, la première et la seconde harmonique du signal, et où il est possible d'observer l'information de polarisation et de phase.

$$DC = \frac{1}{2} * R_p^2 + \frac{1}{2} * R_s^2 \quad 3-3$$

$$F1 = 2 * J_1(A_\theta) * R_p * R_s * \cos(\phi_p - \phi_s) \quad 3-4$$

$$F2 = 2 * J_2(A_\theta) * R_p * R_s * \sin(\phi_p - \phi_s) \quad 3-5$$

Avec J_n la fonction de Bessel avec l'amplitude de modulation comme paramètre. L'extraction de la phase $(\phi_p - \phi_s)$ et de la polarisation ψ est montrée dans les équations 3-6 et 3-7.

$$\psi = 1/2 * \sin^{-1} \left(1/2 * \sqrt{(F1/DC)^2 + (F2/DC)^2} \right) \quad 3-6$$

$$(\phi_p - \phi_s) = \tan^{-1} \left(F2 * J_1(A_\theta) / F1 * J_2(A_\theta) \right) \quad 3-7$$

3.2 Préparation, fabrication et caractérisation des échantillons

Deux types d'échantillons ont été réalisés, le premier appliqué à la réflexion totale interne n'utilise qu'un prisme et ne nécessite qu'un nettoyage conventionnel pour les pièces optiques. Le second type d'échantillon est celui utilisé pour la plasmonique (SPR et nanoplasmonique). Ils sont constitués d'un substrat (verre, plastique ou silicium) ainsi que d'une couche métallique de $e=50\text{ nm}$ dans le cas d'un senseur planaire ou de $e=100\text{ nm}$ dans le cas d'un senseur à motif périodique. Différents procédés ont été utilisés pour préparer les substrats ainsi que pour le dépôt des couches minces métalliques. Dans le cas des échantillons nanoplasmonique, il sera présenté différentes techniques permettant d'obtenir de telles nanostructures. Finalement, une caractérisation de chaque échantillon a été réalisée – principalement pour obtenir les informations sur l'épaisseur et les propriétés diélectriques des couches minces ainsi que pour déterminer leur topographie, spécifiquement pour les échantillons structurés.

3.2.1 Nettoyage / préparation des substrats / échantillons

Pour permettre une bonne adhérence des couches minces sur un substrat ou pour préparer un échantillon pour une expérience, il est nécessaire de bien nettoyer ces derniers. En effet, la présence de contaminants organiques ou inorganiques peut engendrer une mauvaise adhésion des couches métalliques. De plus, il engendrera également une mauvaise fonctionnalisation des échantillons pour la biologie cible, et donc peut amener à une adsorption non spécifique plus grande. Il existe deux types de nettoyage, le premier utilisant des solvants ou des acides et le second, une gravure au plasma réactive seulement aux composés organiques.

3.2.1.1 Nettoyage chimique

3.2.1.1.1 Nettoyage avec solvant

La première méthode de nettoyage utilisée pour la préparation des échantillons est une succession de bain à ultrasons utilisant différents solvants pendant dix minutes. Les solvants utilisés sont :

- L'acétone pour ses propriétés de dissolution des résines et autres polymères utilisés dans les procédés de microfabrication.

- L’isopropanol pour ses propriétés dégraissantes et dissolvantes permettant d’enlever les polluants organiques constitués de corps gras.
- L’eau qui permet de rincer l’échantillon ou le substrat.

3.2.1.1.2 Nettoyage avec le PIRANHA

Dans un second temps, un nettoyage utilisant un mélange réactif et exothermique d’acide sulfurique et de peroxyde d’hydrogène est réalisé. Pour cela, sous une hotte et avec l’équipement de protection réglementaire (sarreau anti acide, lunettes et gant résistant à l’acide), 3 volumes d’acide sulfurique concentré (15 ml, grade microélectronique) sont versés dans un bêcher de 50 ml, qui contient le ou les échantillons. Ensuite, un volume de peroxyde d’hydrogène (5 ml) est ajouté, initiant la réaction d’une durée de 20 minutes. Enfin, l’échantillon est abondamment rincé avec de l’eau et la solution ainsi que l’eau de rinçage sont disposées dans les bocaux prévus à cet effet.

3.2.1.2 Nettoyage physique

La méthode de nettoyage utilisant des principes physiques est basée sur une gravure par plasma en utilisant de l’oxygène comme élément graveur. Elle a l’avantage de graver uniquement les résidus organiques, car le plasma d’oxygène est réactif seulement aux composés carbonés.

Le nettoyage se réalise selon le procédé suivant : l’échantillon est disposé dans un plasma asher où un vide de 10^{-3} mbar est maintenu. Par la suite, l’oxygène est inséré avec un débit constant de 50 sccm (unité de « standard cubic centimeter per minute » ou centimètre cube par minute) et la haute tension est activée pour générer le plasma à une puissance de $P=200$ W. Il sera maintenu pendant 5 minutes afin d’enlever toutes les couches organiques restantes sur la surface.

Cette méthode a plusieurs avantages dont le fait qu’elle soit facile à utiliser et comporte moins de danger que des nettoyages à l’acide, tout en ayant un résultat similaire pour la propreté de surface.

3.2.2 Dépôt de métal sur un substrat

3.2.2.1 Évaporation thermique

La première méthode utilisée pour déposer des couches d'or sur un substrat de verre est l'évaporation thermique. C'est une technique basée sur un chauffage intense d'un fil d'or, disposé dans un creuset (élément chauffant), qui se vaporise et se redépose sur un substrat tel que montré sur la Figure 3-2a. Comme les échantillons produits ont été utilisés pour la résonance plasmonique de surface dans une configuration Kretschmann avec une longueur d'onde d'excitation à $\lambda=650nm$, plusieurs substrats ayant une couche de 50nm d'or ont été produits.

La méthode de l'évaporation technique présente l'avantage d'être relativement simple à utiliser. Cependant, dans le cas de notre appareil, elle comporte plusieurs inconvénients dont le fait de ne pouvoir déposer qu'un matériau (ici de l'or ou Au). En effet, l'or adhère très peu sur le verre sans couche d'adhésion (couche de titane ou chrome de $e=5nm$) et donc crée des surfaces qui se dégradent très rapidement. De plus, l'appareil utilisé n'avait pas de microbalance à quartz pour faire un suivi en temps réel de la déposition de la couche – nous donnant peu d'indication du dépôt de la couche en temps réel.

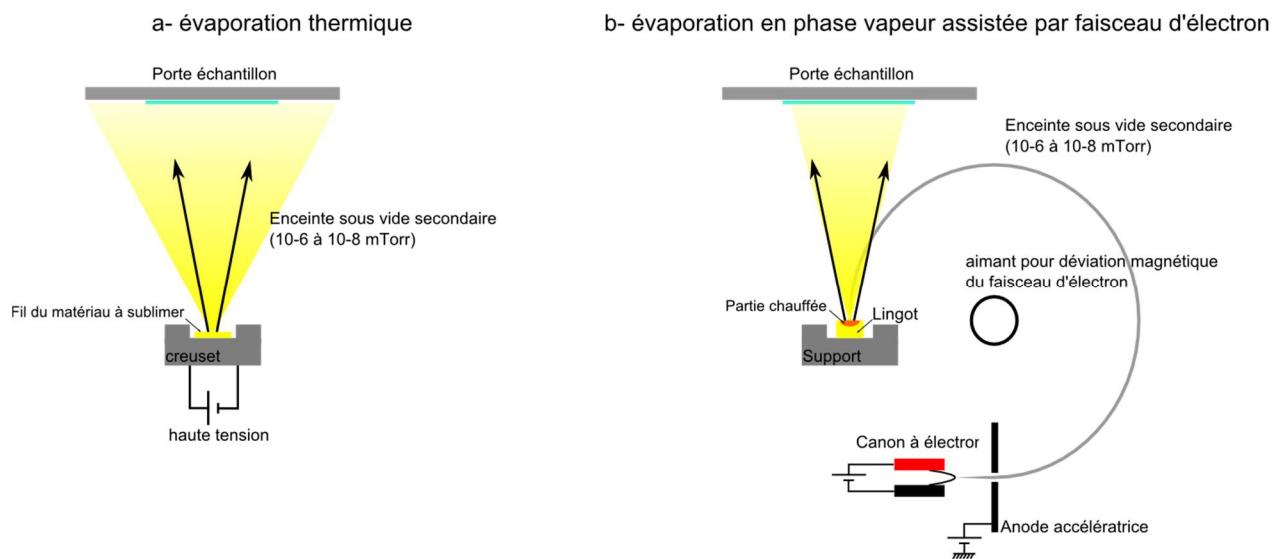


Figure 3-2 : a-schéma illustrant le principe de fonctionnement de l'évaporateur thermique ; b-schéma d'un dispositif pour dépôt de matériel par Electron Beam Physical Vapor deposition

3.2.2.2 Dépôt par E-Beam

La seconde méthode utilisée pour déposer les couches minces est le dépôt par évaporation induite par un faisceau d'électrons. Elle consiste à irradier une cible métallique par un faisceau d'électrons à haute vitesse, afin de vaporiser cette dernière (cf. Figure 3-2b). La vapeur générée se redépose sur le substrat formant alors une couche mince.

Cette technique présente plusieurs avantages dont le fait d'avoir des vitesses de dépôt très lentes (jusqu'à 1nm par minute) permettant de générer des couches minces ayant peu de défauts. Dans le cas de l'appareil utilisé, qui présente un système multicible, il est possible de déposer une couche de chrome ou de titane sur le substrat de verre pour une meilleure adhésion de la couche d'or. De plus, cet appareil est équipé d'une microbalance à quartz permettant de surveiller l'épaisseur déposée en temps réel.

3.2.3 Gravure de motifs sur une couche métallique

Une partie du projet de ce doctorat a été d'analyser la réponse optique de senseurs nanoplasmoniques utilisant la résonance plasmonique de surface sur les nanostructures métalliques. Plusieurs techniques existent pour réaliser ce type d'échantillon et sont basées sur celles qui existent dans le secteur de la microélectronique. On peut dénoter les techniques suivantes :

- gravure par faisceau d'ions;
- lithographie optique;
- lithographie optique interférométrique;
- lithographie par faisceau d'électron.

Dans le cadre de ce projet, seule la technique de gravure par faisceau d'ions a été utilisée. Les échantillons ont été fabriqués par un membre du groupe du Pr Michel Meunier : André-Pierre Blanchard Dionne. La gravure par faisceau d'ions est une technique qui permet d'éroder de la matière sur un matériau (métallique ou semi-conducteur) en utilisant un faisceau d'ions. Elle est réalisée en utilisant une sonde ionique focalisée (ou FIB) qui consiste en un système à deux colonnes : une utilisée pour l'accélération des faisceaux d'électrons afin de visualiser les échantillons, et une colonne ionique qui accélère des ions de gallium pour la gravure du substrat.

Ces ions de gallium accélérés arrivent avec une énergie nécessaire pour enlever de la matière au substrat assisté ou non d'un gaz.

3.2.4 Caractérisation des échantillons

La dernière partie de cette section porte sur l'analyse des échantillons fabriqués. En effet, des informations telles que l'épaisseur de la ou des couche(s) mince(s) ainsi que leur(s) constante(s) diélectrique(s) permettent de simuler et de comprendre la réponse optique de ces échantillons. Une analyse topographique de ces derniers a été réalisée afin de déterminer la rugosité de surface qui, dans le cas de la SPR, est importante car elle peut limiter la propagation de l'onde plasmonique et donc la sensibilité. L'étude topographique dans le cas des échantillons nanostructurés est aussi très importante car elle permet de vérifier la géométrie de ces derniers.

3.2.4.1 Analyse ellipsométrique

L'ellipsomètre (dans notre cas, le V-VASE de J.A. Woollam, Lincoln, NB, USA) est un instrument qui permet de mesurer les propriétés géométriques (épaisseur) et diélectriques d'une ou de plusieurs couches minces déposées sur un substrat en mesurant les changements en intensité et polarisation du faisceau sonde transmis et/ou réfléchi par l'échantillon.

Dans le cas des échantillons planaires étudiés, une combinaison de la mesure en intensité en transmission et de la polarisation en réflexion a été employée permettant de déterminer simultanément les propriétés diélectriques et l'épaisseur de la couche étudiée. En effet, la mesure de l'absorbance (intensité en transmission) permet d'avoir de l'information sur l'épaisseur de la couche mince ainsi que son coefficient d'absorption tel que défini par la loi de Beer-Lambert. L'analyse polarimétrique en réflexion permet d'obtenir des informations sur les propriétés diélectriques de la couche mince ainsi que sur son épaisseur. Ces dernières sont issues de l'interaction entre le faisceau sonde et des différentes interfaces de la couche mince.

La redondance dans l'obtention d'information permet de valider sur deux expériences radicalement différentes les paramètres de la couche mince. Les résultats obtenus expérimentalement sont paramétrés à l'aide d'un modèle de couche mince utilisant le formalisme de Fresnel et dont les variables en sortie sont l'épaisseur et les propriétés diélectriques de la couche analysée.

Dans le cas des échantillons nanostructurés (par exemple, un réseau de nanolignes), une analyse en polarisation a été réalisée tant en transmission qu'en réflexion afin de valider les modèles mathématiques utilisés pour les caractériser. De plus, une analyse spectro-angulaire de la diffraction de ces échantillons a été exécutées afin de déterminer la période de ces échantillons nanostructurés.

3.2.4.2 Analyse en microscopie électronique

Le microscope électronique à balayage est un outil qui permet de visualiser et de caractériser des structures sur des échantillons. Il a été principalement utilisé dans le cas des échantillons nanoplasmoniques qui nécessitaient une visualisation afin de contrôler leurs propriétés géométriques. Un exemple d'image d'un échantillon nanoplasmonique est présenté en Figure 3-3a.

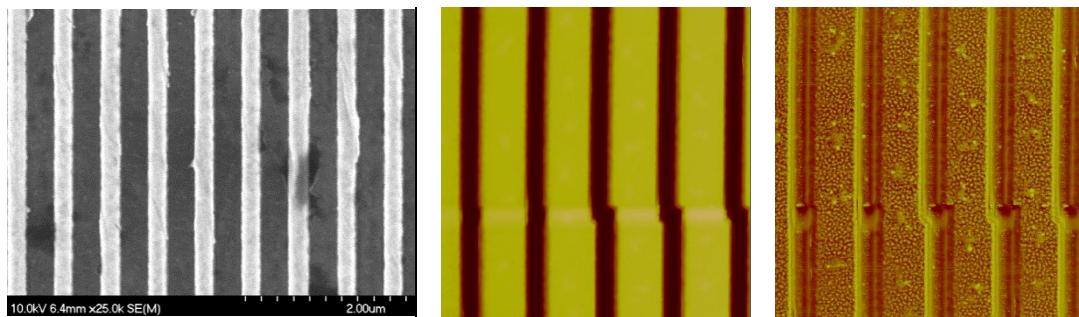


Figure 3-3: a- Image en microscopie électronique d'un réseau de nanolignes d'or de $\Lambda=600\text{ nm}$ de période ; b- exemple d'image topographique obtenue avec AFM d'un réseau de nanolignes d'or de $\Lambda=1000\text{ nm}$ de période ; c- même image en contraste de phase de la surface.

3.2.4.3 Analyse en microscopie à sonde locale

Dans le cadre de l'étude des échantillons nanoplasmoniques, un microscope à force atomique (AFM) a aussi été utilisé pour vérifier les paramètres géométriques des échantillons, mais aussi pour déterminer la rugosité des surfaces d'or. Un exemple d'image topographique de réseau de nanolignes obtenu par AFM est montré en Figure 3-3b. La Figure 3-3c est la même image mais avec un contraste de phase, i.e. un contraste relié au décalage de la vibration de la pointe de l'AFM et de son excitation. Cette information permet de mettre l'emphase sur la rugosité et les défauts présents sur la surface (principalement dû à la redéposition du matériel gravé), dont les propriétés matérielles sont différentes de celle de la surface.

3.3 Cellule de mesure pour analyse en milieu liquide

Trois cellules de mesure ont été utilisées pour réaliser les tests avec les différentes plateformes. La première, présentée sur la Figure 3-4a, est une cellule d'injection à un canal utilisée pour la réflexion totale interne et la résonance plasmonique de surface. L'échantillon est placé en sandwich entre un joint d'étanchéité disposé sur la cellule et le prisme. Le volume d'injection de cette cellule est d'environ $V=50\mu l$.

La seconde est similaire à la première mais comporte deux canaux. Elle est schématisée sur la Figure 3-4b et son volume d'injection par canal est d'environ $V=15\mu l$.

La dernière cellule a été utilisée pour les échantillons nanoplasmoniques et permet une analyse en transmission. Elle consiste en un sandwich de deux plaques minces de plexiglas avec l'échantillon et un joint d'étanchéité faisant office de canal. Le volume d'injection est d'environ $V=20\mu l$ et cette dernière est présenté en Figure 3-4c.

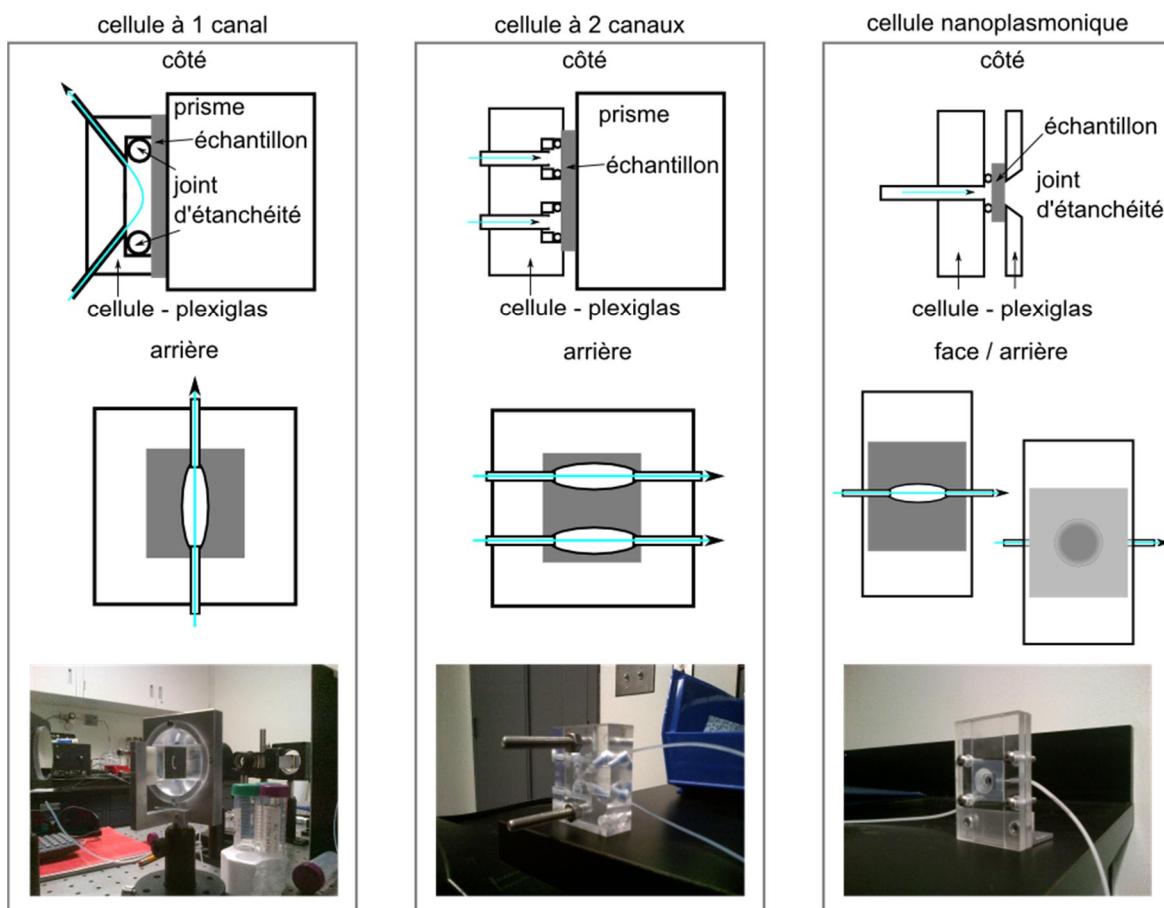


Figure 3-4 : cellule de mesure à un canal (a), deux canaux (b) et pour la nanoplasmonique (c).

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : POLARIMETRIC TOTAL INTERNAL REFLECTION BIOSENSING

Ce chapitre retranscrit l'article publié dans le journal *Optics Express* en 2011. Il présente une nouvelle approche basée sur une analyse combinée en polarisation et en phase de la réflexion totale interne.

En effet, un signal polarimétrique issu de la modulation en phase du faisceau sonde permet d'extraire une courbe ressemblant à un pic, dont la position angulaire indique l'information de l'angle critique et donc de l'indice de réfraction de la solution. Cette courbe révèle également des données reliées à la couche mince via sa hauteur. Cette dernière dépend du cosinus de la différence de phase entre la polarisation -p et -s.

De ce fait, cette technique permet de dissocier l'information de la solution ambiante et celle de la couche mince sur le prisme. De plus, elle présente des limites de détection similaire à des systèmes basés sur la résonance plasmonique et qui font foi de référence dans la littérature.

4.1 Auteurs et affiliations

Les auteurs sont Mathieu Maisonneuve, le Dr. In Hyouk Song, le Dr. Sergiy Patskovsky et le Pr. Michel Meunier. La contribution de Mathieu Maisonneuve a été la construction du système optique ainsi que son amélioration, les différents tests de caractérisation réalisés ainsi que l'écriture de l'article. Le Dr In Hyouk Song a participé en préparant les échantillons pour l'accroche de molécule biologique sur le prisme. Le Dr Sergiy Patskovsky ainsi que le Pr Michel Meunier ont participé à la rédaction de l'article. Tous sont affiliés au laboratoire plasmonique et procédés laser du département de Génie Physique de l'École Polytechnique de Montréal et le Dr. In Hyouk Song est aussi affilié au *Department of Engineering technology* du *Texas State University* basé à San Marcos au Texas.

4.2 Abstract

In this paper, a concept of polarimetric total internal reflection (TIR) biosensor based on the method of temporal phase modulation is presented. Measurements of the phase difference between s- and p- polarized light combined with their amplitudes allow simultaneous detection of the bulk refractive index and thickness of the surface biofilms. Obtained experimental sensitivity

is better than 10^{-5} in terms of refractive index unit and 0.5 nm in biolayer thickness. Relatively simple technological implementation of the TIR sensors on the base of inexpensive and transparent substrates opens a number of novel applications in biosensing and microscopy.

4.3 Introduction

Real time label-free optical transduction-based bio and chemical sensors have become increasingly popular in the last years [149]. Efficient methods for controlling the course of biological (chemical) binding/recognition events on the sensor surface normally employ evanescent waves, as in the cases of integrated planar [150] and fibre waveguides [151], or Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensors [81]. The detection limit of commercial SPR devices with angular or spectral interrogation methods are about 1×10^{-6} refractive index units (RIU) and can be further improved down to 10^{-8} RIU using phase-sensitive SPR schemes [113]. However, the coincidence of the extremely sharp phase jump at SPR that provides very high sensor sensitivity with the minimum of reflected intensity poses certain limitation on the SPR method implementation. For this reason, TIR geometry, even with much smoother phase dependences, could be rather effective for the surface thin film investigation due to the fact that all the light intensity is totally reflected and available for the phase measurement. In addition, conventional SPR method usually cannot resolve the similar influence on the sensor response of the surface thin film formation or bulk RI changes that often occur during biological or chemical reactions. In order to overcome this drawback, additional surface characterization or more complicated SPR methods are required [152, 153].

The main difference between SPR and TIR geometries consists in the presence of a thin gold film on the transparent substrate. For the bulk RI testing, SPR angular shift is slightly higher than the critical angle change, but TIR shows higher sensitivity in terms of change in reflected amplitude [154]. Absence of the surface metal film is also beneficial when the TIR method for surface testing is combined with transmission imaging for DNA chip, cell culture and microscopy investigation. Furthermore, as surface chemistry of glass and plastic is well known, TIR method could provide simple, efficient and low cost solution to portable biosensing.

In this paper, we propose polarimetric TIR biosensing set-up, where angular dependences of both phase and intensity of the reflected light allow to measure simultaneously the medium bulk

refractive index and dynamic of deposition and thickness of biological thin films. The proposed methodology opens opportunities for the implementation of low-cost phase-sensitive TIR sensor designs for field and multi-sensing applications.

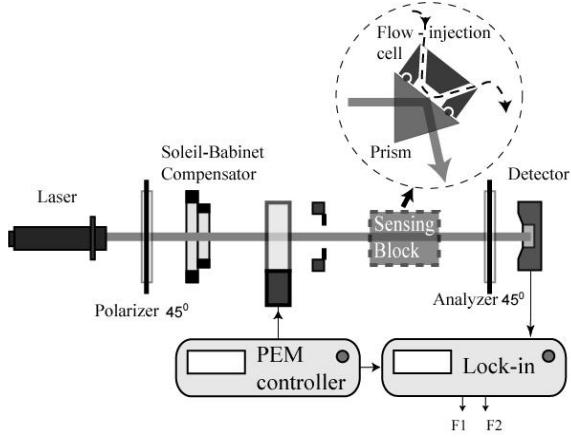


Figure 4-1: Optical set-up for polarimetric measurement.Instrumental methodology

4.4 Instrumental methodology

In the proposed polarimetric set-up, light from a 5 mW stabilized He-Ne laser with 632.8 nm wavelength is passed through a Glan-Taylor polarizer to provide a 45° linearly polarized beam, as shown in Figure 4-1. The light is directed to a Photoelastic Modulator (PEM, HINDS I/FS50) after passing through a Soleil-Babinet compensator (SBC), which serves to optimize the initial phase retardation. The PEM is used to sinusoidally modulate the phase of the p-component at a frequency of 50 kHz. Due to the normal incidence of the light, no spatial displacement between s- and p- polarized component is introduced by PEM. However, static phase retardation in PEM should be considered in theoretical modeling [155]. The beam is then directed to a TIR sensing block that consists of a SF11 or BK7 coupling prism placed on the high precision 0-20 goniometer (Thorlabs NR360S). In the experiments in air, a 45° prism was used whereas all tests in liquids were performed with a 60° prism connected to the flow injection cell with a 20 μ l working volume. Glass slides with functionalized surface, in immersion contact (Cargile Lab) with the prism, were used for biosensing whereas in the simplified set-up the base of the prism was used for tests.

The final periodic signal obtained by the detector with 45° oriented analyzer is decomposed into harmonics using a lock-in amplifier. Since the time domain signal is periodic and continuous, the

harmonics of a frequency spectrum is modeled using a Fourier transform method. Thus, the first two harmonics are given by [23]:

$$F_1 = 2J_1(M)R_p R_s \sin(\alpha + (\phi_p - \phi_s)) \quad (4-1)$$

$$F_2 = 2J_2(M)R_p R_s \cos(\alpha + (\phi_p - \phi_s)) \quad (4-2)$$

Here, α is the initial phase retardance introduced by the SBC. R_p , ϕ_p and R_s , ϕ_s are reflection and phase under p- and s- polarization, respectively. J_n indicates a Bessel function of order n and M, the modulation amplitude. Phase retardation $\phi = \phi_p - \phi_s$ and intensity, I , can be derived from Eq. (4-1) and (4-2) and are given by [11]:

$$\phi + \alpha = \tan^{-1}\left(\frac{F_1 J_2(M)}{F_2 J_1(M)}\right) \quad \text{and} \quad I = R_p R_s = \sqrt{\left(\frac{F_1}{J_1(M)}\right)^2 + \left(\frac{F_2}{J_2(M)}\right)^2} \quad (4-3)$$

Using the Fresnel Formalism [156], we have performed theoretical modelling for the angular dependence of the first harmonic with different initial phase retardance α . The most characteristic curves are presented on Figure 4-2 (a). We obtain for $\alpha = 0$ a behaviour similar to the angular dependence of phase retardation between s- and p- component for TIR [29]. For the surface thin film testing in TIR configuration, application of phase difference as sensing parameter looks very promising [30]. At $\alpha = 90^\circ$, the curve is similar to the TIR angular intensity dependence where critical angle position follows the medium bulk RI. But, in this paper, we propose a method to test bulk RI as well as properties of thin films by measuring angular polarimetric curve (APC) obtained at $\alpha = -\Delta\phi_{\max}$, where $\Delta\phi_{\max}$ is the maximum possible phase difference at total reflection for given prism material. Indeed, this curve is a combination of the two parameters: intensity and phase, where angular position of the peak is sensitive only to the bulk RI and absolute value at the peak follows the dynamic of the surface film deposition (Figure 4-2 (b)). It is impossible to obtain similar results for SPR or TIR responses.

Figure 4-2 (b) presents theoretical results for the biosensing application of the proposed polarimetric TIR geometry (solid curves) in comparison with SPR method (dashed curves). As one can conclude, angular shift of the APC peak is comparable with SPR response for a bulk refractive index change equal to 10^{-2} RIU. Nevertheless, almost identical response could be obtained for SPR sensor after depositing a 10 nm thin film with 1.45 RI (dashed red and blue line in Figure 4-2 (b)).

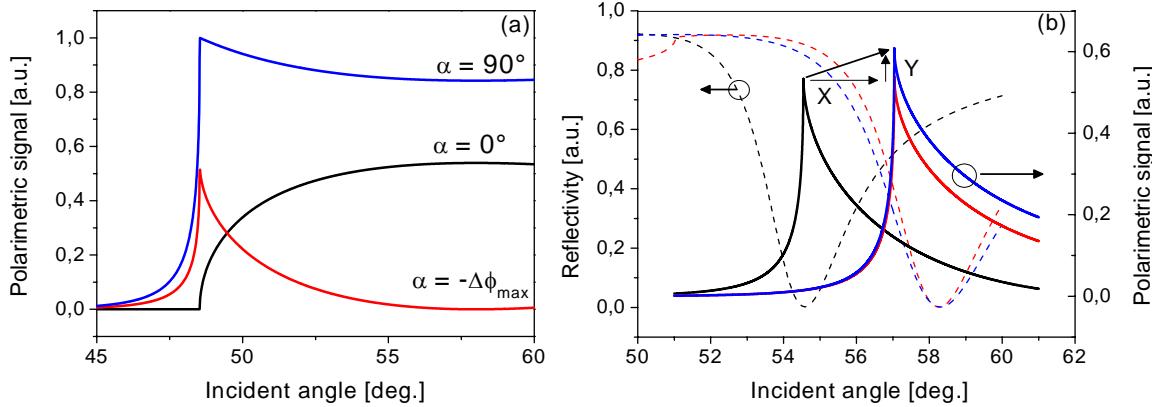


Figure 4-2 : (a) Theoretical angular polarimetric curve (APC) with different initial retardance α . (b) Comparison of APC ($\alpha=-\Delta\phi_{max}$ solid lines) with SPR (dashed lines). Black curves are for tests in water and red curves after 10^2 RIU bulk changes; blue curves show influence of surface thin film deposition ($e=10\text{ nm}$, $n=1.45$).

This makes very difficult to test independently bulk refractive index changes and formation of thin biofilms on the surface. In contrast, APC preserves angular peak position (after bulk change) and shows only intensity changes after thin film deposition (red and blue solid curves in Figure 4-2 (b)). Here we propose to use these properties for biosensing, where angular peak position corresponds to the bulk refractive index changes (X displacement) and integral amplitude changes of APC or absolute value at the peak follows the dynamic of surface thin films formation (Y displacement). Note that APC is sharper than SPR resonance curve and, as sensing parameter, we measure the angular position and absolute value at maximum amplitude, as opposed to the SPR method where position of the minimum value of the curve is detected. Finally, TIR method sensitivity could be optimized with different prism materials, where higher prism refractive index provides higher phase changes and correspondingly, higher thin film sensitivity but lower angular shift to the bulk RI changes [29].

4.5 Experimental setup optimization and phase sensitivity

In order to estimate the efficiency of the polarimetric experimental set-up for the proposed TIR biosensing methodology, several calibration tests were performed. In the absence of the sensing block, we measured responses of the first and second harmonic to the small phase retardation

introduced with a SBC. Optimal signal-to-noise ratio for the phase measurements (Eq. (4-3)) was obtained at 154° phase modulation depth (M), which provides equal Bessel function $J_1 = J_2$ that after tuning α results in equal harmonics intensities and therefore optimal conditions for the noise elimination (Figure 4-3 (a) black line). Phase response provides information about surface films and obtained high phase sensitivity in $5.2 \times 10^{-3}^\circ$ confirms efficiency of our polarimetric set-up that also could be used for direct phase measurements at fixed incident angle.

As follows from Eq. (4-1) and (4-2) for independent harmonic measurements, best results were obtained for phase modulation depth providing a maximum detected signal at $M = 105^\circ$ for the first harmonic and at $M = 175^\circ$ for the second. Due to the overall better performance of the electronic equipment at 50 kHz and better phase sensitivity equal to 0.02° for the first harmonic, all further tests were performed at $M = 105^\circ$ (Figure 4-3 (a) red line). Should be noted that while net phase measurements provides better sensitivity for the thin film testing, more complete biosensing information could be obtained using independent harmonic testing, where combined intensity-phase signal allows simultaneous investigation of bulk RI and surface thin films.

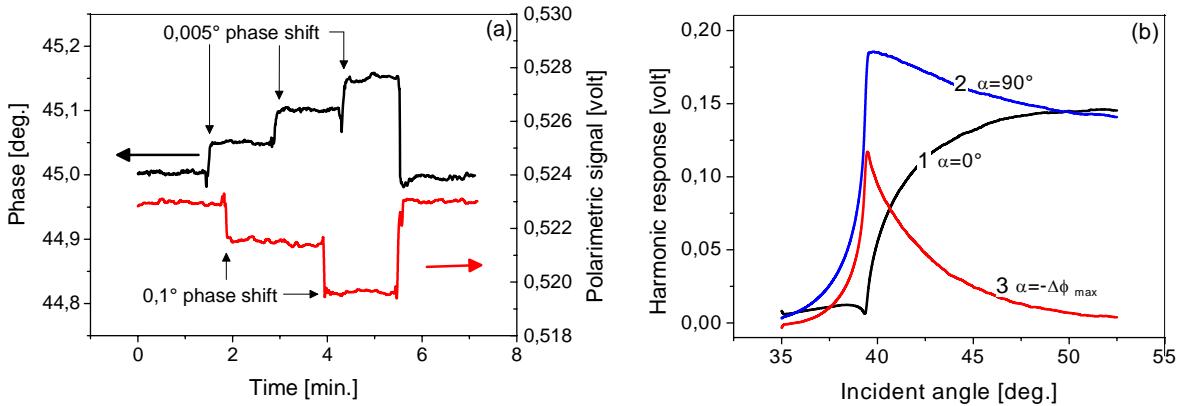


Figure 4-3 : (a) Phase sensitivity experiment (phase: black line, polarimetric signal: red line) (b) Experimental results for first harmonic with the same retardance as in Figure 4-2.

Experimental measurement has been performed to confirm our theoretical consideration shown in Figure 4-2 (a). The initial retardance $\alpha = \Delta\phi_{max}$ is a key component to obtain an optimal APC. Experimentally, the angular phase dependence was measured (Equation (4-3)) and the system was fixed at an incident angle corresponding to the maximum phase difference between s- and p-polarization (for SF11 prisms: 43° and 68.59° in air and in water, respectively). By adjusting manually the SBC, the amplitude of the first harmonic of the polarimetric signal was set equal to

zero and resulting APC was measured (Figure 4-3 (b), curve 3). Position of the SBC was then kept for others experiences. Polarimetric curve obtained with phase retardance equal to 0° and 90° are also shown in Figure 4-3 (b) (curve 1 and 2 respectively).

The sensitivity of the proposed TIR methodology depends on the precision of the APC peak amplitude and angular position determination. Angular resolution is provided by the high precision rotating stages while peak sharpness and half-width depends on angular phase retardance and requires application of a well collimated incident beam. In this work, collimated laser light (collimation test was performed on a distance 20 m with a precision 0.01°) with 2 mm spot was used and corresponding APC is presented on Figure 4-4 (a). Then, 0.1° convergent or divergent beam was employed and equal decreasing of the APC peak amplitude accompanied with a peak broadening was obtained (Figure 4-4 (a)). These results show the importance of the proper set-up calibration and could be used as initial beam calibration method: maximum reflected amplitude at fixed angle near the peak corresponds to the condition of well collimated beam on the sensor surface.

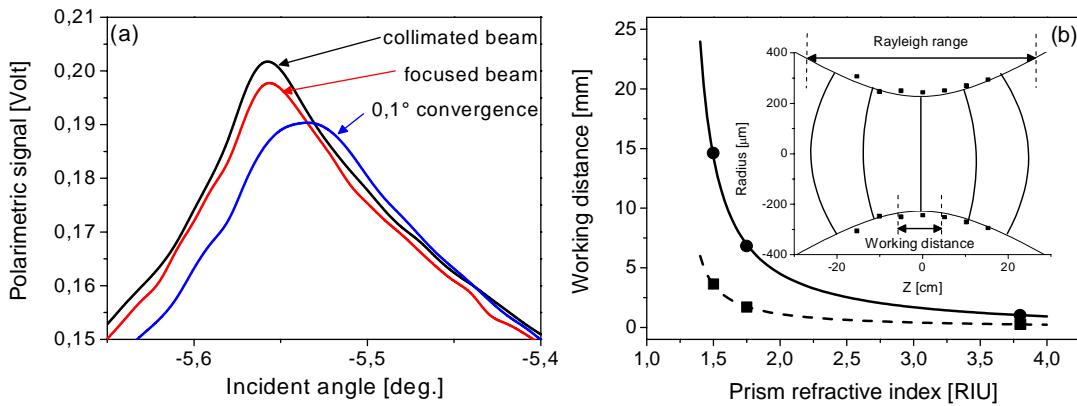


Figure 4-4 : (a) Angular Polarimetric Curve with different beam propagation geometry.
(b) Working distance minimizing the influence of the convergence/divergence near the focal point; Inset: Measured propagation Gaussian beam near the focal point.

Also, we have found that using focused Gaussian beam gives APC close to the optimal (Figure 4-4 (a) red line). Explanation follows from the fact that Gaussian beam is quasi parallel at the focal point (inset in Figure 4-4 (b)) [157]. Indeed, in our case we employed a low NA optic ($NA = 9 \times 10^{-4}$) that results in a long Rayleigh range of 285 mm that provides nearly collimated beam with a $400 \mu\text{m}$ spot size and a flat phase at the point of incidence. The inset in Figure 4-4 (b)

shows results of theoretical calculations and experimental data for a beam waist measured with a CCD beam shaper (Ophir-Spiricon). We have calculated the influence of the TIR coupling prism material on the working distance (Figure 4-4 (b)) where the beam divergence/convergence has an effect on the sensitivity lower or comparable to sensitivity value of 0.005° (dashed line) for the phase and 0.02° (continuous line) for the first harmonic). In this work, a SF11 prism was used that provides a rather long working distance (6.72 mm) whereas TIR system build on the Si will require positioning of the sensor surface in less than 1mm from the beam focal point. Thus, focused beam phase sensitive method is important in the design of portable micro fluidic multi-sensor or imaging systems where spot size provides resolution and sensitivity.

4.6 Results and discussion

To evaluate the sensing performance of the TIR polarimetric system and to estimate the sensitivity to the bulk refractive index changes, we have performed a series of experiments where aqueous solutions of NaCl with different RI [15] were introduced into flow-injection cell in contact with glass slides cleaned by “piranha” solution. Figure 4-5 (a) presents sensor response as the angular position of the APC peak was measured in real time. For numerical analysis of the obtained APC, polynomial curve fitting method of forth order was used. Taking into account the level of noises (1.6×10^{-3} deg.), the experimental detection limit for the bulk RI was estimated better than 10^{-5} RIU, which is comparable to SPR sensitivity ($10^{-5} \sim 10^{-6}$ RIU).

To demonstrate the proposed biosensing methodology, we have performed experimental tests where adsorption of the thin biofilms on the surface is accompanied by the bulk RI changes. In order to form a thin biolayer on the sensing surface, different concentrations of Bovine Serum Albumin (BSA) in the phosphate buffered saline (PBS) were prepared and introduced into flow-injection cell. Glass slides with different surface functionalization in immersion contact with the SF11 prism were used as sensing surfaces. Clean glass was first tested and only bulk refractive index change was detected. Indeed, the existence of an electrostatic repulsion between the protein and the clean glass surface [158] prevents BSA layer deposition. Then, experimental results for 20 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrated BSA were obtained on the glass functionalized with 3-(aminopropyl)-triethoxysilane (Sigma-Aldrich) [159, 160], where surface amino-groups promote the non-specific binding of the BSA (Figure 4-5 (b)).

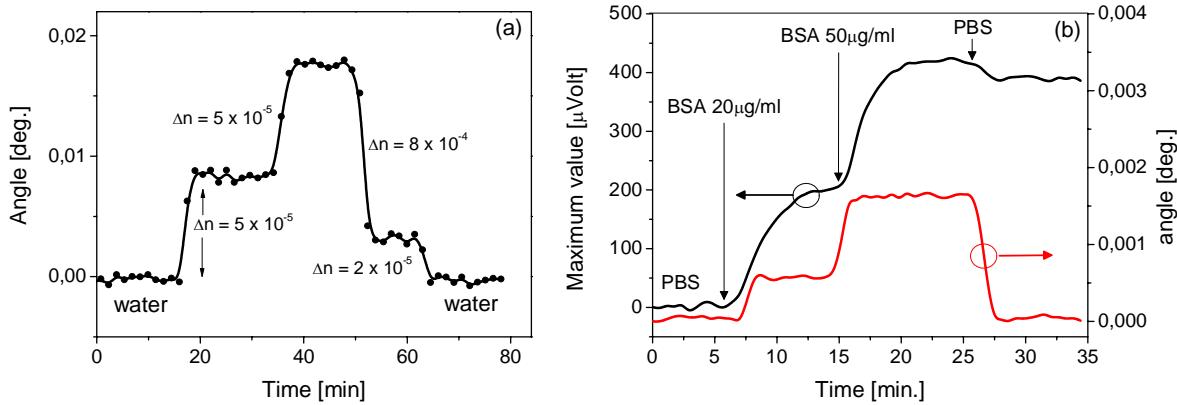


Figure 4-5 : (a) Angular variation of the peak position for different refractive index solutions. (b) Responses of the system with different concentrations of Bovine Serum Albumin.

Here the black line represents data for the APC peak maximum value corresponding to the thin biolayer formation and the red line shows the angular position of the peak maximum which is linked to the bulk refractive index of the solution. These information (bulk and thin layer) are completely different in their dynamic (change in the red line are quicker than black line which follows binding dynamic of BSA on amino-group) and in their level (continuous line does not return to the initial baseline due to the adsorption of BSA compared to the red one where solution returns to PBS). We can conclude from this figure that both bulk and thin layer information could be obtained independently.

The proposed methodology enables to control the thin layer formation and bulk RI changes independently in contrast to the SPR sensor where usually the combination of responses is monitored. Sensitivity of the system could be estimated by considering the value of 1.45 of the BSA monolayer refractive index [161]. Using our theoretical prediction for 0.02° phase resolution, the experimental detection limit is estimated to an average thickness of 0.5 nm biolayer and could be improved for direct phase measurements.

4.7 Conclusion

In this paper, we demonstrated polarimetric biosensing TIR system based on the method of temporal phase modulation. Measurements of the phase difference between s- and p- polarized light combined with their amplitudes allow to obtain information about medium refractive index changes as well as dynamics and thickness of the deposited thin biofilms. Obtained phase

resolution of 0.02° corresponds theoretically to a sensitivity of 0.5 nm in bilayer thickness and tested sensitivity for the bulk refractive index is better than 10^{-5} RIU. The higher refractive index platforms such as high refractive index dielectrics and silicon offer even higher sensitivities for biofilms tests. Microfabrication technology on the glass, optical polymers or silicon enables construction of low-cost integrated biosensing systems.

4.8 Acknowledgement

The authors acknowledge the financial contribution from the NSERC Strategic Network for Bioplasmonic Systems (Biopsys) and from the Canada Research Chair on laser micro/nano-engineering of materials.

4.9 Compléments : Discussions sur les applications possibles

La réflexion totale interne présente une alternative intéressante en matière de biodétection. En effet, elle permet de séparer l'information du changement de solution à celle de l'adsorption d'une couche mince à la surface du prisme. De plus, contrairement à des surfaces métalliques (telles que l'or) il n'y a pas d'effet miroir de charge, ce qui limite l'adsorption non-spécifique liée à la physisorption (accroche par voie physique de molécule sur la surface : force de Van Der Waals, force électrostatique) de quelconques molécules dans le milieu.

De plus, elle présente une gamme dynamique très grande pour les couches minces car la technique proposée repose sur une variation linéaire de la phase, similaire à celle que l'on retrouve sur l'ellipsométrie – elle peut donc être considérée sans limite théorique. La gamme en matière d'indice de réfraction du milieu est limitée théoriquement par l'indice de réfraction du prisme. Expérimentalement, elle est bornée par la lecture angulaire du système, égale à 2.5° , soit un changement d'indice de 1.5×10^{-3} RIU.

Grâce à ces informations, il est possible de déterminer des applications dans lesquelles la réflexion totale interne polarimétrique pourrait être utilisée. Au vu de ses capacités à différencier changement de milieu à l'adsorption d'une couche mince, cette dernière serait très utile dans la détection de composés dans des milieux turbides et inhomogènes.

Des applications de détections de polluants et de pathogènes à différentes étapes du traitement des eaux usées peuvent être considérées. En effet, ces milieux présentent une turbidité très élevée

rendant presque impossible les mesures en transmission ainsi que de fortes variations d'indices de réfraction. De plus, la densité de polluants et pathogènes est élevée dans ces milieux, ce qui ne nécessite pas forcément une grande sensibilité mais plutôt une gamme étendue de la dynamique.

Toujours dans des applications liées à des milieux turbides présentant de fortes variations d'indice, ce type de senseur peut être aussi considéré dans la détection de pathogènes dans le secteur agroalimentaire (dans des cas tels que la détection de la listeria ou de l'escherichia coli). Dans ce cas d'application, une bonne limite de détection est nécessaire pour détecter des traces de ces pathogènes. Une utilisation de prisme à plus haut indice (verre ayant des indices proches de 2 ou prismes en matériau semi-conducteur – silicium et germanium) sera nécessaire pour avoir la sensibilité nécessaire, tel que nous pouvons le constater sur le tableau suivant synthétisant le changement de phase par nanomètre de couche à l'angle critique. Dans ce tableau, nous avons pris pour indice de la couche $n=1.46$ à $\lambda=632.8\text{ nm}$ et suivant une dispersion similaire au SiO_2 : $n=1.446$ et $n=1.438$ respectivement à $\lambda=1360\text{ nm}$ et $\lambda=2\text{ }\mu\text{m}$ et pour le milieu ambiant, un indice égal à celui de l'eau – cas d'une couche de petites molécules denses [111, 162].

Tableau 4-1 : Comparaison des sensibilités selon le prisme.

Prisme	BK7	SF10	SF11	LaSF9	Si	Ge
Indice	1.515	1.72317	1.7786	1.84497	3.49713	4.10415
prisme	@ 632.8nm	@632.8nm	@632.8nm	@632.8nm	@1360nm	@2000nm
Sensibilité						
deg./nm	0.047	0.139	0.157	0.178	0.272	0.257

Il peut être aussi considéré des applications lors des procédés de fabrication de produit laitier (yogourt, crème laitière) et celle des spiritueux (bière, vin) pour l'analyse en concentration des fermentations nécessaires à ces procédés de fabrication. De manière similaire aux traitements des eaux usées, la charge en ferment est très élevée, ce qui nécessite une instrumentation proposant une gamme étendue.

Finalement, des applications en réfractométrie peuvent être considérées et dans ce cas particulier des systèmes utilisant des prismes à plus haut indice devront être utilisés pour obtenir un pic

mieux défini (contraste et largeur à mi-hauteur) afin d'avoir une meilleure résolution, tel qu'il est montré en Figure 4-6 pour la même liste de prisme.

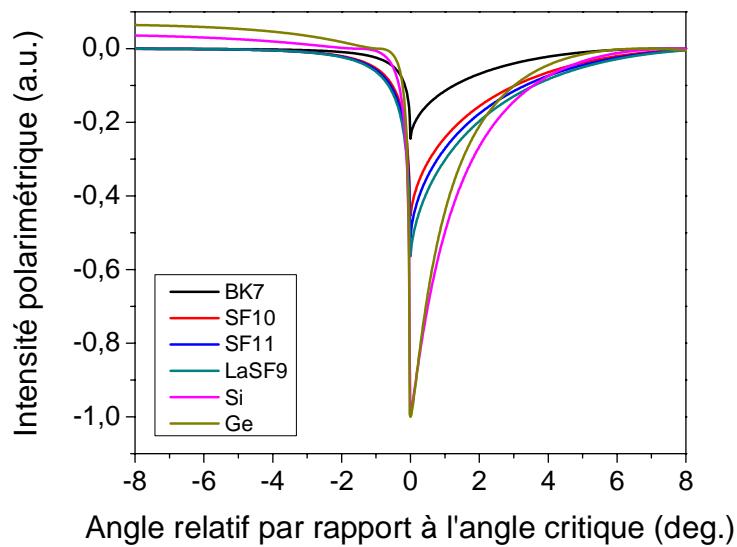


Figure 4-6: Comparaison des pics polarimétriques de la réflexion totale interne pour les différents matériaux énoncés précédemment.

CHAPITRE 5 SENSEUR OPTIQUE BASÉ SUR LA RÉPONSE POLARIMÉTRIQUE DE LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE EN CONFIGURATION KRETSCHMANN

5.1 Introduction

L'étude de la réponse polarimétrique de la transduction plasmonique dans une configuration planaire (i.e. configuration de Kretschmann) est la suite logique de la réflexion totale interne car cette étude implique une géométrie similaire. La différence est l'ajout d'un mince film d'or sur la surface supérieure du prisme qui permet l'excitation d'un plasmon de surface. Ce dernier, comme il a été décrit dans le chapitre 2, entre en résonance avec l'onde incidente lorsqu'il existe un accord de phase entre ces deux entités, i.e. une égalité des pulsations et des vecteurs d'onde. A cette résonance, il est possible d'observer une réflexion totale frustrée induite par un transfert de l'énergie de l'onde électromagnétique au plasmon.

Ce chapitre débutera par un rappel de la réponse en polarisation et en phase de la résonance plasmonique de surface dans différentes configurations (angulaire et spectrale). Par la suite, un système de mesure de phase pure sera présenté et adapté à la résonance plasmonique de surface angulaire. L'intérêt d'étudier ce système est sa grande sensibilité due à une transition abrupte de la phase au point de résonance. Dans cette section il sera présenté l'instrument conçu avec les tests de calibrations et les mesures de performance. Une discussion générale fera le point sur cette technique proposée en posant ses avantages et ses inconvénients. Enfin, un système d'imagerie spectro-polarimétrique (lecture de polarisation) sera proposé avec la SPR. Cette section suivra le même schéma que la précédente, avec une présentation de l'instrument, de ses caractéristiques ainsi que ses performances. Elle sera clôturée par une discussion portant sur les avantages et les inconvénients de la technique proposée.

5.2 Rappel sur la réponse plasmonique de surface

Comme il a été vu dans le chapitre 2, la résonance plasmonique de surface a lieu lorsqu'il y a un accord de phase entre l'onde incidente et le plasmon de surface. Cette résonance aboutit à un transfert d'énergie qui peut être visualisé, sur la polarisation $-p$, par un minimum dans l'intensité du faisceau sonde ainsi qu'un saut de phase. Les réponses plasmoniques présentées sont issues de

simulation dont les paramètres de permittivité diélectrique de la couche minces d'or proviennent des tests de caractérisations ellipsométriques. L'épaisseur de la couche étudiée est de $e=50\text{ nm}$ et les courbes de la partie réelle et imaginaire de l'indice de réfraction sont présentées en Figure 5-1.

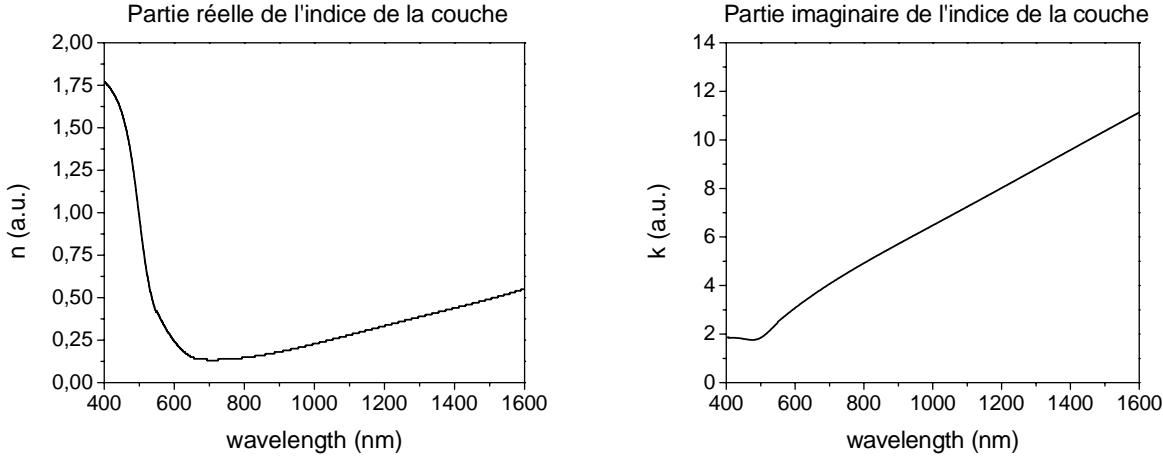


Figure 5-1: a- partie réelle de la permittivité électrique de la couche mince d'or utilisée pour les tests; b- partie imaginaire de la permittivité diélectrique

Le milieu de test utilisé dans ces simulations est l'eau à $T=20^\circ \text{ celsius}$, dont la partie imaginaire est considéré nulle (très inférieure à 1 dans la gamme de longueur d'onde étudiée). La partie réelle est quant à elle définie par une équation de Sellmeier (équation ci-dessous) dont les paramètres sont issus de la référence [163].

$$n = \sqrt{1 + \frac{B_1 * \lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2 * \lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3 * \lambda^2}{\lambda^2 - C_3} + \frac{B_4 * \lambda^2}{\lambda^2 - C_4}} \quad 5-1$$

Avec $B_1 = 5.684027565 * 10^{-1}$, $B_2 = 1.726177391 * 10^{-1}$, $B_3 = 2.086189578 * 10^{-2}$ et $B_4 = 1.130748688 * 10^{-1}$, et $C_1 = 5.101829712 * 10^{-3}$, $C_2 = 1.821153936 * 10^{-2}$, $C_3 = 2.620722293 * 10^{-2}$ et $C_4 = 1.069792721 * 10^1$.

Finalement le milieu de couplage pour chaque système est un prisme fait de verre Schott N-BK7, décrit lui aussi par une équation de Sellmeier dont les paramètres sont donnés dans la référence [164].

5.2.1 Réponse angulaire

L'excitation du plasmon de surface peut se faire à longueur d'onde fixe. Dans ce cas, une variation d'angle permet de retrouver les conditions d'accord de phase permettant son excitation. Les conditions choisies pour cette étude est une excitation du plasmon pour une longueur d'onde $\lambda=632.8\text{ nm}$ un prisme de BK7 et une couche d'or de $e=50\text{ nm}$.

La Figure 5-2 présente la réponse en intensité et en phase de la courbe SPR, les courbes en noir représente la polarisation $-p$, affectée par le plasmon, et celles en rouge la polarisation $-s$ non affectée par le plasmon.

Les angles utilisés sur l'axe des abscisses représentent les angles à l'intérieur du prisme – lors de la simulation, la couche de verre est considérée comme semi-infinie. Afin de visualiser l'effet d'un changement d'indice, une valeur de 10^{-3} en indice de réfraction a été ajoutée à celle de l'eau.

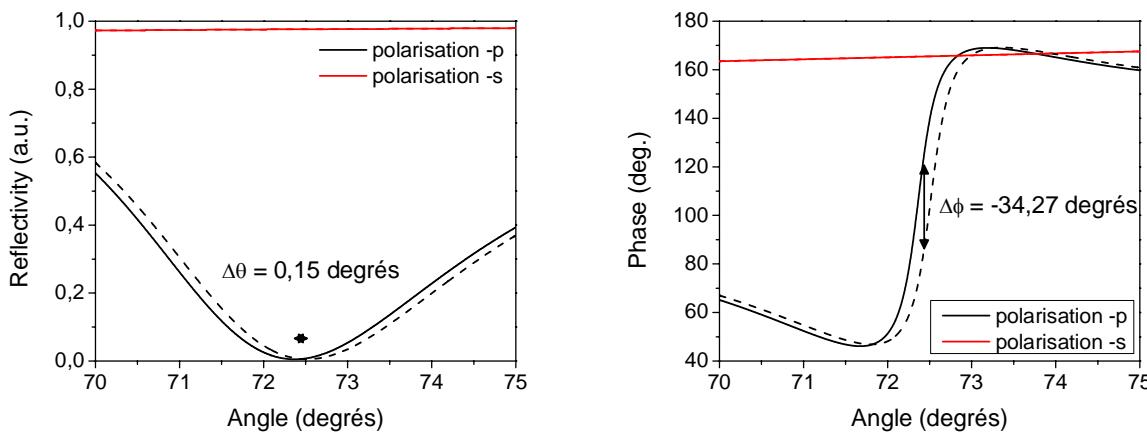


Figure 5-2: a- Courbe en intensité de la réflexion selon la polarisation $-p$ (en noir) et la polarisation $-s$ (en rouge) – les courbes continues sont les courbes pour l'eau, les courbes en pointillés sont pour un milieu d'indice incrémenté d'une valeur de $\Delta n=10^{-3} \text{ RIU}$; b - courbe de la réponse en phase selon les mêmes conditions.

Comme il est possible de l'observer sur la Figure 5-2, la variation en position angulaire du pic plasmon est de $\Delta\theta=0.15^\circ$ et celle en phase est de $\Delta\phi=34.27^\circ$ pour une variation d'indice de 10^{-3} RIU. Connaissant les résolutions des instruments en lecture angulaire ($\delta\theta\sim 10^{-4} \text{ deg.}$ [125]) et de phase ($\delta\phi=5*10^{-3} \text{ deg.}$ [165]), les ratio signal sur bruit (ou « signal to noise ratio » en anglais pour SNR) peuvent être estimés : $SNR_{angulaire} = 1500$ et $SNR_{phase} = 6850$.

Une étude théorique de la linéarité des réponses en fonction de l'indice de réfraction a été réalisée tant en position angulaire qu'en phase et est présentée sur la Figure 5-3. Pour la phase, comme nous utilisons un système statique (angle et longueur d'onde fixe), la position en angle de la mesure est celle de la résonance plasmonique dans l'eau. Sur cette figure, il est possible d'observer que la lecture de la position du pic plasmon présente une très grande gamme de linéarité (linéaire sur toute l'étude, soit une variation d'indice de 0.05) alors que la lecture de phase statique présente une linéarité limitée à un changement d'indice de $\Delta n=5*10^{-4}$.

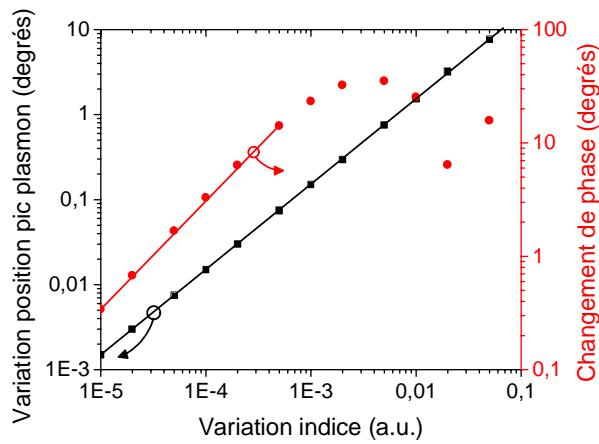


Figure 5-3: Étude de linéarité de la réponse plasmonique dans le cas angulaire - variation de la position du pic plasmon (symbole et ligne noire) et mesure de phase statique (symbole et ligne rouge).

5.2.2 Réponse spectrale

L'excitation du plasmon peut aussi se faire à angle fixe. Dans ce cas, une variation de longueur d'onde permet de retrouver les conditions d'accord de phase permettant son excitation. Les conditions choisies pour cette étude est un angle à l'intérieur du prisme de $\theta=70^\circ$, un prisme de BK7 et une couche d'or de $e=50\text{ nm}$ d'épaisseur.

Afin de visualiser l'effet d'un changement d'indice, une valeur de $\Delta n=10^{-3}$ en indice de réfraction a été ajoutée à celle de l'eau. Selon ce que nous pouvons observer sur la Figure 5-4, la variation en longueur d'onde de la position du pic plasmonique varie de quelques nanomètres ($\Delta\lambda=2.54\text{ nm}$) alors que le changement de phase est de $\Delta\phi=53.1^\circ$. Similairement au cas

angulaire, la résolution spectrale des systèmes étant de $\delta\lambda=0.005\text{ nm}$, le $SNR_{spectral} = 1108$ et celui de la phase est de $SNR_{phase} = 10620$.

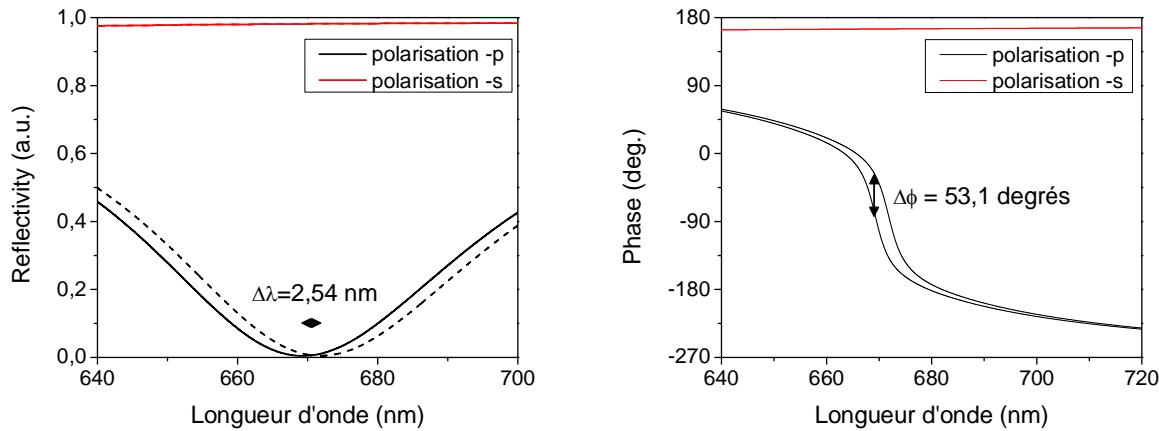


Figure 5-4: Courbe en intensité de la réflexion selon la polarisation -p (en noir) et la polarisation -s (en rouge) – les courbes continues sont les courbes pour l'eau, les courbes en pointillés sont pour un milieu d'indice incrémenté d'une valeur de $\Delta n = 10^{-3}\text{ RIU}$; b - courbe de la réponse en phase selon les mêmes conditions.

Une étude de la linéarité des réponses a été effectuée dans le cas de l'interrogation spectrale et le résultat de ce dernier est présenté en Figure 5-5. La tendance est dans ce cas-ci similaire à celle observée sur l'interrogation angulaire.

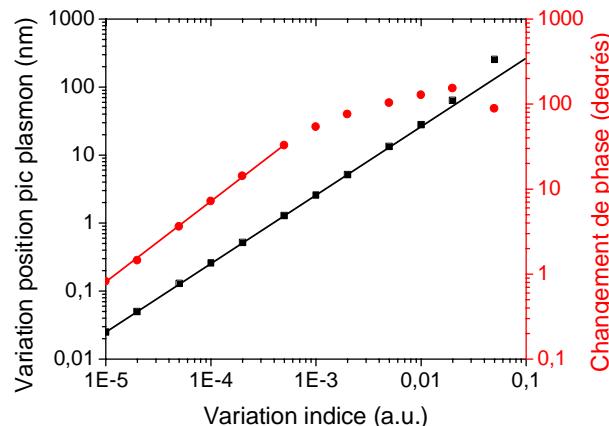


Figure 5-5 : Étude de linéarité de la réponse plasmonique dans le cas spectral - variation de la position du pic plasmon (symbole et ligne noire) et mesure de phase statique (symbole et ligne rouge).

En effet, la lecture de la position de la longueur d'onde d'excitation est linéaire sur presque toute la plage étudiée (linéaire pour un changement d'indice inférieur à $\Delta n=0.02$) alors que nous pouvons observer une saturation de la réponse dans le cas de la lecture de phase statique (linéarité pour un changement d'indice inférieur à $\Delta n=10^{-3}$). Dans le cas de la phase statique, le protocole est le même que celui utilisé dans l'interrogation angulaire, i.e. la longueur d'onde de lecture est celle de la résonance plasmonique dans l'eau.

5.3 Système de mesure de phase

5.3.1 Introduction

La résonance plasmonique de surface est devenue en quelques décennies l'une des technologies les plus utilisées dans la gamme des biocapteurs optiques. Cependant, comme il a été noté dans le chapitre 2, ces dispositifs présents sur le marché peuvent souffrir d'un manque de sensibilité pour certaines applications, surtout pour les analyses requérant des analytes avec de faibles concentrations. Ces derniers utilisent principalement une lecture angulaire ou spectrale de l'intensité pour faire un suivi de la position de résonance en temps réel afin d'extraire les données dynamiques et statique de l'analyse. Les dispositifs présents sur le marché offrent généralement une limite de détection en indice de réfraction de 10^{-5} à 10^{-6} RIU. Ces valeurs équivalent à une concentration surfacique de molécule de l'ordre de plusieurs dizaines de picogramme par millimètre carré ou d'une concentration de l'ordre de la dizaine à centaine de nanomolaire.

Dans cette section, nous proposons d'utiliser la lecture en phase pour amener une meilleure limite de détection. En effet, comme il est possible de l'observer dans la section précédente, la phase présente un saut lors de la résonance ce qui la rend très sensible à de petites variations d'indices et donc à une faible adsorption de molécule. De plus, dans la littérature, la phase a été souvent étudiée avec divers types de système optique et ont chacun montré une augmentation significative de la limite de détection du système. Dans cette étude, l'instrument proposé repose sur une modulation photo-élastique de l'état de polarisation afin d'avoir une lecture de phase pure. Il présente plusieurs avantages dont le principal est son immunisation au bruit environnemental comparé à des techniques utilisant l'interférométrie, comme il a été indiqué dans la section 3.1.

Une présentation du système et de ses composantes sera faite et suivra ainsi que la calibration de ces dernières. Enfin, une caractérisation des performances du système sera réalisée sans le bloc

biocapteur (SPR), pour déterminer la résolution en phase du système, ainsi qu'avec le bloc SPR pour déterminer la limite de détection de la plateforme.

5.3.2 Principe et instrumentation

5.3.2.1 Principe et instrument

Dans cette section, il est proposé d'utiliser un système similaire à celui présenté dans le chapitre 4, qui repose sur une modulation photo-élastique de l'état de polarisation. Cette technique a pour avantage sa vitesse de modulation ($f=50\text{ kHz}$) qui permet d'obtenir un faible niveau de bruit (grande réduction de la contribution du bruit en $1/f$). Elle permet aussi une détection synchrone amenant la possibilité de filtrer en fréquence les signaux acquis par le photo-détecteur.

Le système est décrit sur la Figure 5-6. Il utilise comme source un laser HeNe avec une longueur d'onde $\lambda=632.8\text{ nm}$.

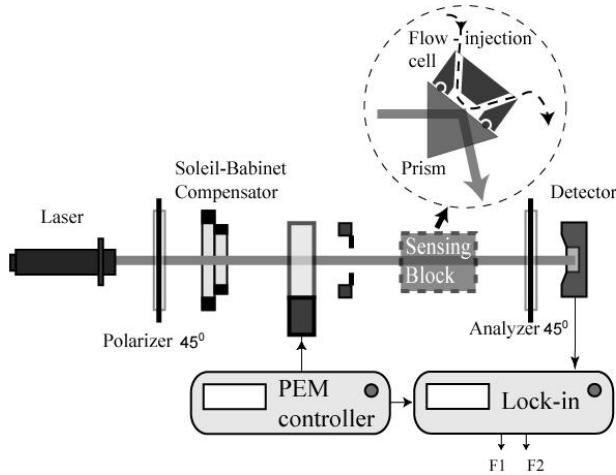


Figure 5-6: Figure représentant le système optique utilisé pour la mesure de phase pure avec un biocapteur SPR.

Le faisceau émis passe par un polariseur orienté à 45° afin d'avoir un vecteur champ électrique initial avec les mêmes amplitudes selon l'axe des x et des y. Ce rayon laser passe ensuite par un compensateur de Soleil-Babinet, qui permettra la calibration et la mesure des performances en phase du système avant de passer à travers un modulateur photo-élastique générant la modulation de l'état de polarisation. Par la suite, ce faisceau passe à travers un prisme qui est en contact optique (huile d'immersion $n_D=1.516$) avec une lame de microscope couverte d'un film d'or de $e=50\text{ nm}$. La surface de cette couche mince est elle-même en contact avec le milieu à analyser.

Enfin, le rayon laser passe à travers un analyseur orienté à -45° avant d'être détecté par la photodiode. Le signal généré est par la suite analysé par deux amplificateurs synchrones dont les fréquences de référence sont respectivement F1 et F2.

Le principe de fonctionnement de ce système repose sur l'analyse des premières harmoniques du signal détecté afin d'extraire l'information de phase pure. Ceci passe par l'utilisation du formalisme vu dans le chapitre 3 où l'intensité détectée par la photodiode sera égale à :

$$I = E * \bar{E} = \frac{1}{2} * R_p^2 + \frac{1}{2} * R_s^2 + R_p * R_s * \cos(A_\theta * \sin(2\pi f t) + \Delta\varphi + (\phi_p - \phi_s)) \quad 5-2$$

Où R_p , R_s , ϕ_p et ϕ_s sont respectivement la polarisation et la phase selon la polarisation -p et -s. A_θ est l'amplitude de modulation en phase du modulateur, f sa fréquence de modulation et $\Delta\varphi$ est le déphasage induit par le retardateur de phase. L'analyse en Fourier permet d'obtenir les deux premières harmoniques, décrites dans les équations 5-3 et 5-4, où J_n représente des fonctions de Bessel d'ordre n avec pour paramètre l'amplitude de modulation de modulateur photo-élastique.

$$F1 = 2 * J_1(A_\theta) * R_p * R_s * \cos(\Delta\varphi + \phi_p - \phi_s) \quad 5-3$$

$$F2 = 2 * J_2(A_\theta) * R_p * R_s * \sin(\Delta\varphi + \phi_p - \phi_s) \quad 5-4$$

De ces équations, il est possible d'extraire l'information de phase, tel qu'il montré dans l'équation 5-5.

$$\Delta\varphi + (\phi_p - \phi_s) = \tan^{-1}\left(\frac{F2 * J_1(A_\theta)}{F1 * J_2(A_\theta)}\right) \quad 5-5$$

Finalement, cette mesure de phase est suivie en temps réel (2 points par seconde) pour faire des expériences de calibrations afin de caractériser le système ou de détection pour déterminer ses performances.

5.3.2.2 Calibration du modulateur photo-élastique

La calibration du modulateur photo-élastique est une étape permettant l'optimisation du système optique afin d'avoir la mesure de phase la moins bruitée. Dans un premier temps, il doit être déterminé la relation entre la modulation de phase affichée par le contrôleur et celle mesurée. Pour cela, nous procédons à une mesure des différentes harmoniques en fonction de l'amplitude de modulation de phase et avec un déphasage statique fixé. Dans le cas de la mesure effectuée, le

déphasage statique a été fixé à $\Delta\phi=45^\circ$ (ou $\pi/4$) de façon à avoir la même valeur provenant du terme de phase. Ce déphasage a été réalisé avec le compensateur de Soleil-Babinet dont la calibration a été rigoureusement vérifiée de façon à obtenir exactement le retard de phase voulu. Une analyse comparative, basée sur la position des maxima, a été réalisée entre les courbes acquises et les fonctions de Bessel du premier (J_1) et du second ordre (J_2). Tel qu'il est montré sur la Figure 5-7, ces deux groupes de courbe montrent un très bon accord dans la position des maxima pour une amplitude de modulation A_θ allant de 0 à 270° . Cependant, il peut être noté une variation au sujet de l'amplitude des courbes mesurées et celle des fonctions de Bessel, provenant d'un déphasage statique induit par le modulateur photo-élastique. La valeur de ce retard a été mesurée en ne mettant aucun retard de phase initial (dispositif de retard de phase enlevé du système) et est en moyenne égale à $\Delta\phi=-3.9^\circ$.

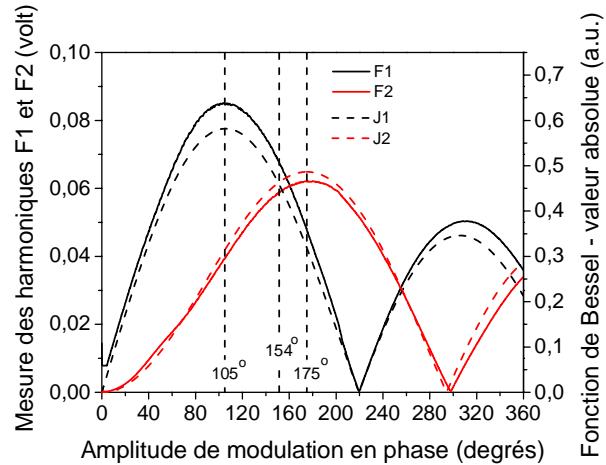


Figure 5-7: Courbe de calibration du modulateur photo-élastique - les lignes en continus représentent les valeurs de harmoniques pour différentes modulations de phase - courbe en pointillé, comparaison avec les courbes de Bessel

Dans un second temps, la détermination de l'amplitude de modulation idéale en matière de bruit a été mise en œuvre. Pour cela, une étude du rapport signal sur bruit a été entreprise pour 3 modulations différentes, montré sur la Figure 5-7 par les 3 lignes verticales en pointillés. La première, à $A_\theta=105^\circ$, a été choisie car elle se situe au maximum de la première fonction de Bessel – i.e. variation du signal maximale pour la première harmonique. La seconde à $A_\theta=154^\circ$ est le point de croisement des fonctions de Bessel du premier et du second ordre, menant alors à une variation du signal égale entre les deux harmoniques. Enfin, la dernière, pour une amplitude

de modulation à $A_\theta=175^\circ$, qui est le maximum de la seconde fonction de Bessel - i.e. variation du signal maximale pour la seconde harmonique.

Tableau 5-1 : Résultats de l'expérience pour la détermination de la meilleure amplitude de modulation

Amplitude de modulation (deg.)	Déphasage induit (deg.)	Niveau de bruit (deg.)	Rapport signal sur bruit
105	1	7.8×10^{-3}	128.2
154	1	5.2×10^{-3}	192.3
175	1	1.5×10^{-2}	66.7

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 5-1 où nous constatons que l'amplitude de modulation ayant le meilleur rapport signal sur bruit est à $A_\theta=154^\circ$, correspondant à une variation égale entre les deux harmoniques. Ceci peut être expliqué par le fait qu'à cette valeur d'amplitude de modulation les niveaux de bruit sont similaires sur les deux harmoniques et donc peuvent être filtrés plus facilement lors du calcul de la phase. On se retrouve avec une division des amplitudes des harmoniques pour le calcul de phase tout en ayant matériellement les mêmes dynamiques et sources de bruit pour chacune des harmoniques. Dans les deux autres cas, il faut utiliser les coefficients de Bessel pour obtenir la bonne valeur de phase et il va se trouver que l'une des harmoniques aura sa source de bruit amplifié par ce coefficient – du fait que sur la mesure de chaque harmonique nous avons la même dynamique et la même source de bruit matériel.

5.3.3 Performances de la plateforme proposée

5.3.3.1 Résolution en phase pure

Dans un premier temps la détermination de la résolution du système en phase pure a été réalisée sans le bloc SPR (pour éviter l'ajout de source de bruit). Pour cela, l'amplitude de modulation de phase a été mise à $A_\theta=154^\circ$ et les tests ont été réalisés pour un déphasage proche de 45° . Ces

paramètres ont pour conséquences d'avoir des intensités égales sur la première et deuxième harmonique permettant d'avoir des conditions optimales pour le traitement du signal et le calcul de phase. Pour avoir une dynamique rapide du système, le temps d'intégration de la détection synchrone a été mise à $\tau=300\text{ ms}$.

Les résultats de ce test nous montrent qu'il est possible d'obtenir une résolution en phase de $\delta\phi=5.2*10^{-3}\text{ deg.}$, ce qui en théorie nous permettrait d'avoir une limite de détection en indice de réfraction de $LoD=1.47*10^{-7}\text{ RIU}$ avec la SPR à sensibilité de phase – en prenant comme point d'origine le point de pente maximale de la courbe de phase.

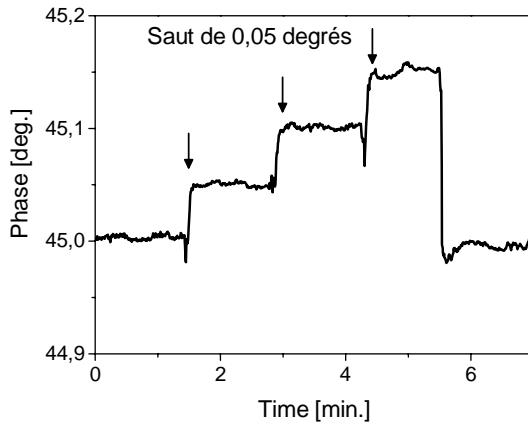


Figure 5-8: Tests de performance en phase pure. Des sauts successifs de $\Delta\phi=0.05^\circ$ ont été réalisés grâce au compensateur de Soleil-Babinet montrant la grande résolution du système ainsi que sa stabilité sur plusieurs minutes.

5.3.3.2 Performance avec SPR en phase gazeuse

Dans un second temps, des tests de performances ont été réalisés avec le bloc SPR afin de déterminer la limite de détection de l'instrument proposé.

Pour cela, un test consistant à faire passer une série de gaz différent (Argon et Azote) sur le biocapteur SPR est réalisé. Similairement au test de résolution de phase, l'amplitude de modulation a été paramétrée à $A_\theta=154^\circ$ et le déphasage initial a été fixé à 45° de façon à avoir le traitement de signal optimal.

La première série de mesure a été réalisée afin d'avoir la courbe plasmonique en phase des deux gaz (Figure 5-9a). Elles ont été mesurées afin de déterminer la position angulaire idéale pour la

mesure statique, qui est égale à $\theta=43.75^\circ$ pour cette expérience. Nous pouvons aussi constater que le changement de phase entre les deux courbes pour un même angle est environ égal à $\Delta\phi=2.3^\circ$, ce qui est 3 fois plus élevé que la valeur théorique calculé, $\Delta\phi=0.68^\circ$. Ceci peut être expliqué par un défaut sur le goniomètre dont l'erreur sur sa position est de $\Delta\theta=0.005^\circ$ – engendrant une erreur de lecture de phase de l'ordre de $\Delta(\Delta\phi)=1.5^\circ$.

La seconde mesure consiste en une lecture de la phase de façon statique (angle et longueur d'onde fixe) et faire varier le gaz dans le temps à travers une cellule de mesure (première cellule présentée dans le chapitre 3). Le résultat de cette expérience est montré en Figure 5-9b où nous pouvons constater que la variation en phase entre les deux gaz est plus proche de la valeur prédicta théoriquement. Le rapport signal sur bruit (SNR) pour cette expérience est de $SNR=9.6$ avec un changement d'indice de réfraction égal à $\Delta n=2*10^{-5} RIU$, nous donnant une limite de détection en matière d'indice de réfraction égale à $LoD=6.6*10^{-7} RIU$.

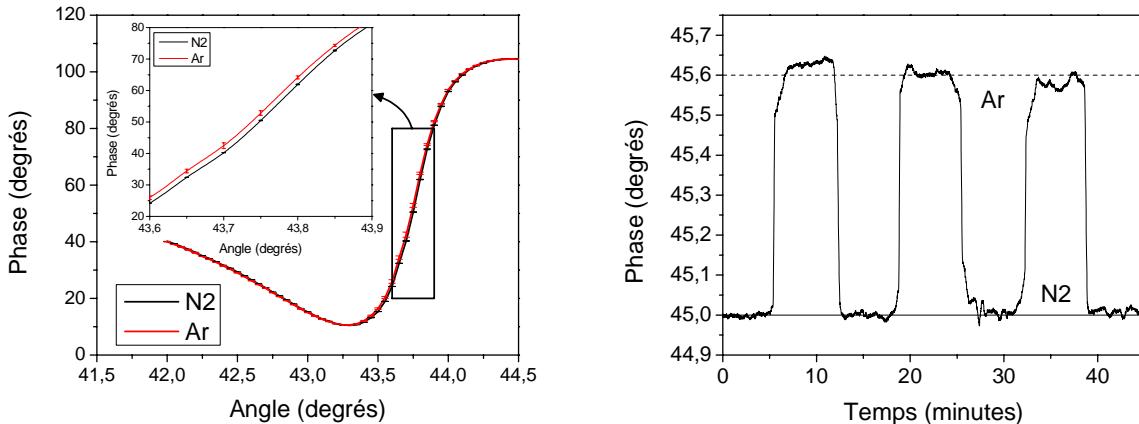


Figure 5-9: a- Courbe angulaire de phase pour la réponse plasmonique de l'azote (en noir) et de l'argon (en rouge), en incrusté : zoom sur la partie sensible où il est possible de voir l'écart entre les deux courbes; b- Analyse statique de la variation entre l'azote et l'argon en fonction du temps.

5.3.4 Discussion et applications possibles

Dans cette section, il a été présenté un système de mesure de phase polarimétrique appliquée à la résonance plasmonique de surface. Cette combinaison a permis d'obtenir un instrument

proposant une limite de détection en indice de réfraction de $LoD=6.6*10^{-7}$, soit jusqu'à 100 fois meilleure comparée à plusieurs plateformes proposées dans le commerce ou la littérature.

Cependant, ce système possède une gamme dynamique limitée, de l'ordre de $Dn=5*10^{-4} RIU$ en variation d'indice de réfraction, comparée aux techniques de mesure de position du pic plasmon qui offre une linéarité jusqu'à 100 fois supérieure.

Cette limite peut néanmoins ne pas être une contrainte dans le cadre d'application utilisant des solutions purifiées, évitant toute adsorption non spécifique pouvant saturer le signal, et avec de très faibles concentrations de molécules à étudier.

Des applications dans le domaine de la chimie analytique peuvent être considérées ainsi que dans le développement de nouveaux médicaments pour l'industrie pharmaceutique. En effet, ces dernières, dont le but est de découvrir la fonction d'une molécule, se réalisent dans des solutions purifiées avec de très faibles concentrations de l'analyte, dû à son coût élevé.

Un autre type d'application serait la détection de traces de polluants et de pathogènes dans des milieux relativement purs et ne présentant pas de fortes variations d'indice. Pour cela, nous pouvons imaginer une application utilisant la SPR en mesure de phase au bout de la ligne de traitement des eaux usées, ou dans le contrôle des eaux de bâtiments publics (hôpital, services gouvernementaux, tour à bureau) – là où le liquide à analyser présente les prérequis en matière de stabilité en indice de réfraction – pour détecter des traces de bactérie ou de polluant chimique. Un cas pratique serait la détection des bactéries provoquant la légionellose, dont des milliers de cas sont référencés chaque année en Europe et au Canada et sachant qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, un vaccin [166].

Finalement, cette même détection peut être réalisée dans les milieux gazeux. Des applications de surveillance dans le secteur militaire ou public de pathogènes, toxines ou polluants peuvent être considérées : la détection du gaz sarin ou moutarde dans les lieux publics (par exemple lors de l'attentat de 1994 dans la ville de Matsumoto, Japon et en 1995 dans le métro de Tokyo, Japon) ainsi que la surveillance des sites industriels utilisant le phosgène (utilisé dans l'industrie pharmaceutique) – connu pour être un agent suffocant.

5.4 Système de mesure de polarisation

5.4.1 Introduction

Comme nous avons pu le voir dans la section précédente, la mesure de phase comporte un grand avantage qui est sa résolution pouvant être jusqu'à 100 fois meilleure comparée aux systèmes conventionnels, mais a aussi un inconvénient qui est sa gamme dynamique limitée. En effet, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 5-10, la variation théorique de la phase pour les faibles changements d'indice est très grande mais sature rapidement (courbe en rouge), comparé à la variation de la position spectrale du pic plasmon qui varie moins abruptement mais de façon linéaire. Cependant, les techniques de lecture du pic plasmon sont moins performantes que celle basée sur la phase dû aux bruits provenant des sources de lumière ainsi que le type de détecteur, généralement un système d'imagerie CCD ou CMOS.

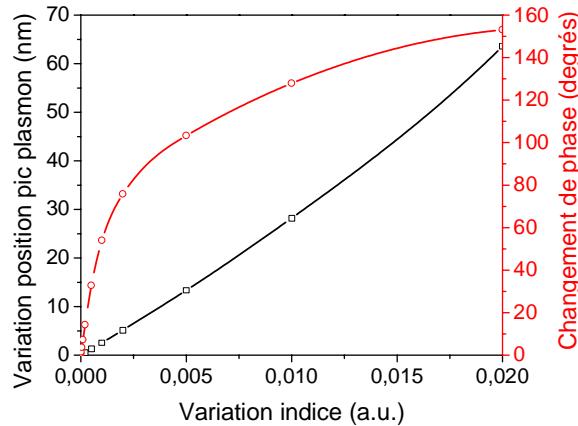


Figure 5-10: Comparaison des réponses en position de la résonance et en phase en fonction de la variation d'indice de réfraction du milieu testé.

Nous proposons dans cette section un système d'imagerie spectro-polarimétrique basé sur une analyse spectrale des polarisations $-s$ et $-p$, affectée par la résonance plasmonique de surface, et ayant la capacité à réaliser plusieurs mesures simultanément. L'intérêt de la polarisation est de pouvoir améliorer la résolution de l'instrument comme il le sera démontré dans la suite de ce chapitre.

Dans un premier temps, le principe de fonctionnement de ce dispositif ainsi qu'une description de l'instrument seront exposés. Par la suite, cette section traitera des modes de fonctionnement

proposés par le dispositif et une présentation des performances en matière d'indice de réfraction et de mesure de couches minces sera révélée.

5.4.2 Principes

Ce système repose sur trois principes bien distincts. Le premier est une analyse de la polarisation, d'un point de vue ellipsométrique, de la courbe SPR. Cette polarisation est calculée en prenant l'arc-tangente du ratio entre la réflexion selon la polarisation $-p$ et $-s$. Ceci permet d'avoir une référence à travers la polarisation $-s$ qui n'est pas affectée par la résonance plasmonique de surface et contient l'information de la signature spectrale de la source. En effet, cette dernière peut être problématique dans certains types de lampe à haute intensité (par exemple celle basée sur le Xenon, Deutérium) dont la densité spectrale contient des pics reliés aux transitions électroniques des gaz excités, ou pour les diodes électroluminescentes dont la densité spectrale est généralement décrite par une distribution gaussienne.

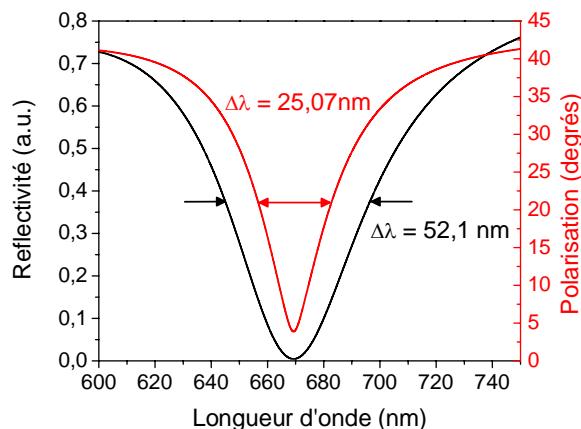


Figure 5-11: Comparaison des courbes spectrales de réflectivité et de polarisation dans le cas de la résonance plasmonique de surface – en noir courbe en intensité, en rouge courbe en polarisation.

De plus, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 5-11, la polarisation permet d'avoir un pic plus étroit spectralement, menant alors à une meilleure résolution sur la mesure du minimum. La réflectivité normalisée, calculée en faisant le ratio entre la polarisation $-p$ et $-s$ (courbe noire) a une largeur à mi-hauteur égale à $\Delta\lambda=52.1\text{nm}$ alors que la polarisation (courbe en rouge) présente

une largeur à mi-hauteur deux fois moindre, égale à $\Delta\lambda=25.1nm$. La résolution du système peut alors être améliorée d'un facteur 2 grâce à ce type de mesure.

Le second principe est l'analyse spectrale de la courbe en polarisation. En effet, cette dernière permet d'avoir une réponse linéaire sur une très grande gamme dynamique, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 5-10. L'intérêt d'avoir une telle gamme est la possibilité de réaliser des tests biomédicaux avec des échantillons réels sans la contrainte d'une possible saturation du signal. En effet, ces échantillons présentent des concentrations de molécules à détecter plus élevées et leur analyse est souvent accompagnée de mécanismes d'adsorption non-spécifique et ce malgré l'utilisation de récepteurs spécifiques.

Le dernier point est l'utilisation d'un système d'imagerie afin de permettre de multiplexage de différentes mesures. En effet, dans le cadre d'analyses biomédicales, les concentrations de plusieurs marqueurs sont simultanément mesurées afin de détecter une quelconque maladie. La nécessité du multiplexage vient du fait qu'il est nécessaire de faire ces mesures dans les mêmes conditions afin de pouvoir les analyser selon une même base et un même référentiel (par exemple une même plateforme pour un patient analysé, température de l'analyse, substrat où l'analyse a été réalisée ...).

5.4.3 Instrument et calibration

5.4.3.1 Instrument

L'instrument, schématisé sur la Figure 5-12, est composé d'une diode électroluminescente à émission blanche (Thorlabs MWWHL3) comme source. Cette dernière utilise une diode électroluminescente de nitrate de gallium GaN émettant autour des 450nm recouverte d'une couche phosphorescente permettant d'obtenir un spectre allant de 450nm jusqu'à 800nm. Le faisceau généré est amené au système de détection à l'aide d'une fibre multimode. Les rayons émergeant de la fibre sont collimatés avec une lentille achromatique, puis passent à travers un polariseur orienté à 0° durant la mesure de la courbe SPR (polarisation -p) ou à 90° lors de l'acquisition de la référence (polarisation -s). Comme la source est non polarisée, l'intensité sortant du polariseur dans les deux cas est égale.

Ils passent ensuite à travers un prisme en contact optique (huile d'immersion $n_D=1.516$) avec une lame de microscope recouverte sur une face d'une couche mince d'or ($e=50nm$). Cet assemblage

prisme/lame de microscope est attaché à une cellule de mesure fluidique à deux canaux (deuxième cellule présentée dans le chapitre 3).

La réflexion du faisceau passe à travers un analyseur à 45° , afin d'avoir la même polarisation dans le spectro-imageur lors de l'acquisition de la référence ou de la courbe plasmonique (même efficacité de dispersion du réseau dans les deux types de mesure). Le faisceau passe ensuite par une lentille achromatique qui est dans une configuration 4f afin d'avoir une image 1:1 de l'échantillon sur la fente d'entrée du monochromateur.

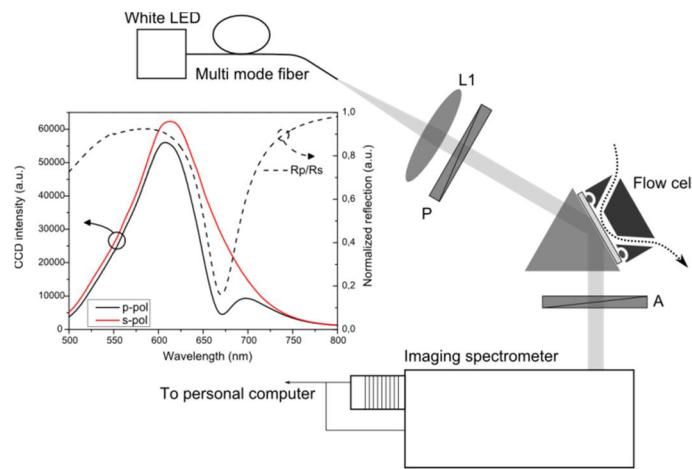


Figure 5-12: Schéma de l'instrument - incrusté: intensité selon la polarisation -p (courbe noire), la polarisation -s (courbe rouge) et la réflectivité (courbe en pointillé).

Finalement, une caméra CCD (Andor Newton 971) acquiert la dispersion de la lumière par le réseau ($G=150$ lignes/mm ou $G=600$ lignes/mm) du monochromateur ($L_f=500$ mm). Cet instrument propose deux modes de fonctionnements, le premier dédié à l'imagerie linéaire et le second pour des applications de détection multiplexée.

5.4.3.2 Mode imagerie

Le premier mode présenté est celui proposant de faire une image unidimensionnel de l'échantillon.

Un exemple d'image générée dans ce mode est présenté dans la Figure 5-13. L'image de gauche est une représentation de l'échantillon et le rectangle noir figure la fente d'entrée du monochromateur. L'image de droite présente la figure obtenue par la caméra CCD, avec en axe des abscisses la longueur d'onde et en axe des ordonnées la dimension y de l'échantillon.

Ce mode peut autant être utilisé pour réaliser de l'imagerie unidimensionnelle que de la détection hautement multiplexé. En effet, l'image spectrale présentée en Figure 5-13 représente un échantillon d'or avec 5 canaux différents dont les courbes SPR de chaque canal peuvent être extraites.

Cependant ce mode présente certaines contraintes liées à la nature de la caméra utilisée. Ces contraintes sont liées à la technique de lecture de la caméra CCD qui consiste à déplacer ligne par ligne les charges accumulés par les capteurs CCD vers la zone de mesure des charges. Comme la caméra ne propose pas d'obturateur, le capteur CCD est continuellement insolé lors de la lecture des pixels. Cet effet est représenté dans la Figure 5-14, où nous pouvons observer l'image spectrale d'un point source généré par un laser HeNe et dont l'effet fantôme se produit le long de l'axe des ordonnées.

Pour pallier à cet effet, un temps d'acquisition beaucoup plus grand que le temps de mesure est requis. Une analyse du même point source a été réalisée avec plusieurs temps d'acquisition (Figure 5-14) et montre que l'effet peut être considéré comme négligeable qu'à partir d'un temps d'intégration de $\tau=1$ seconde.

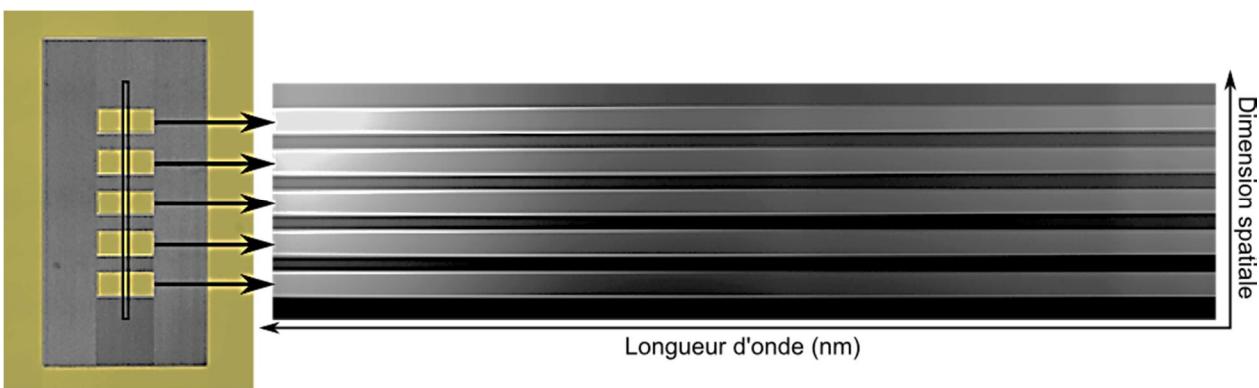


Figure 5-13 : A gauche image au microscope de l'échantillon étudié. A droite, image spectrale d'une portion de l'échantillon (rectangle noir sur l'échantillon) avec en axe des abscisses la longueur d'onde et en ordonné la dimension spatiale.

La mesure de la courbe SPR en polarisation ainsi que la détermination du minimum est réalisé pour chaque ligne. Le principe de mesure des données est schématisé dans la Figure 5-15. Ces données sont assemblées de façon à ce que l'axe des ordonnées reste dédié à la dimension spatiale. Cependant, l'axe des abscisses devient l'axe du temps et la valeur du pixel représente la position de la résonance.

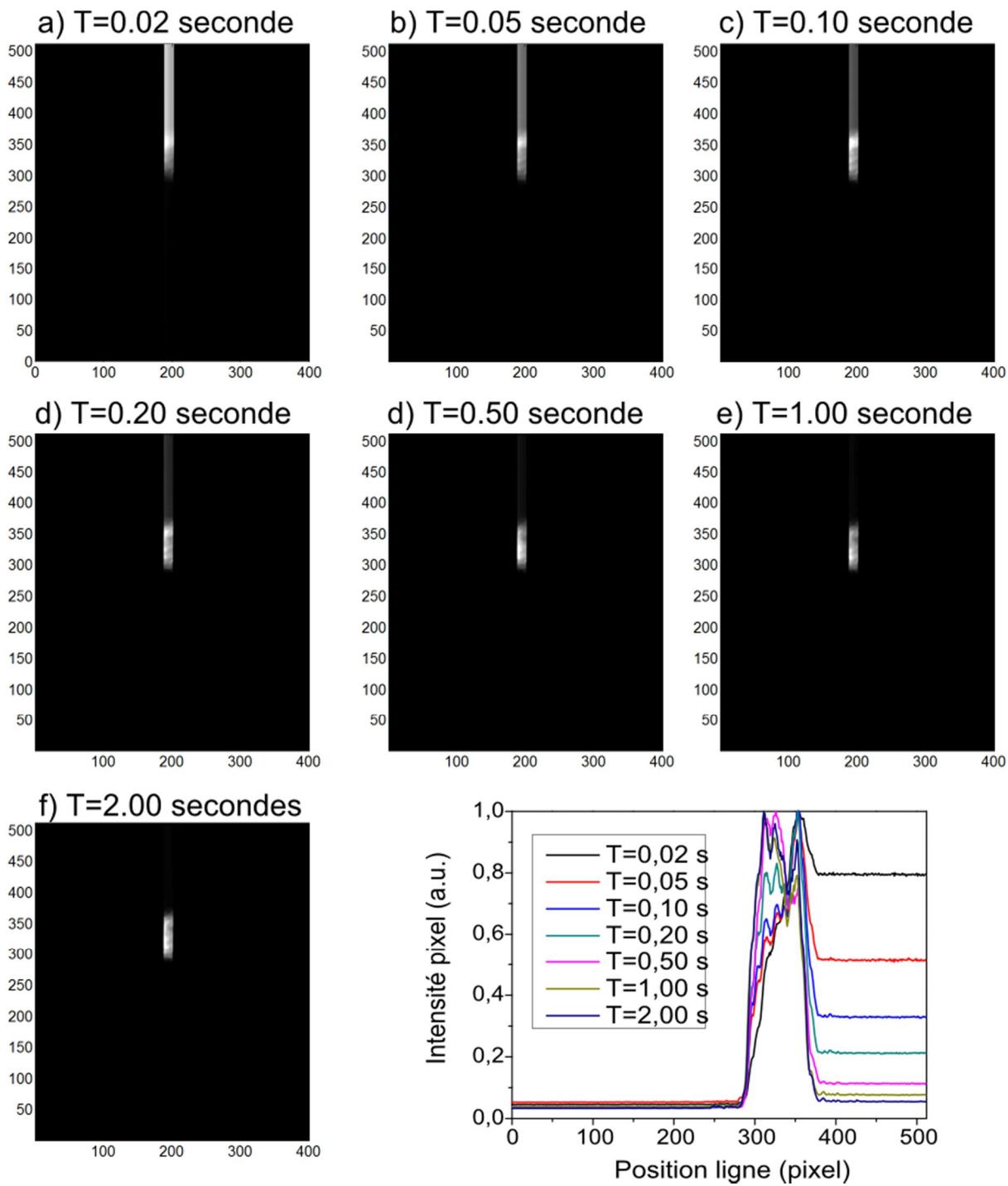


Figure 5-14 : Représentation de l'effet fantôme selon plusieurs temps d'intégration de la caméra (a,b,c,d,e,f). Le graphe présente le profil de l'acquisition selon une intensité normalisée.

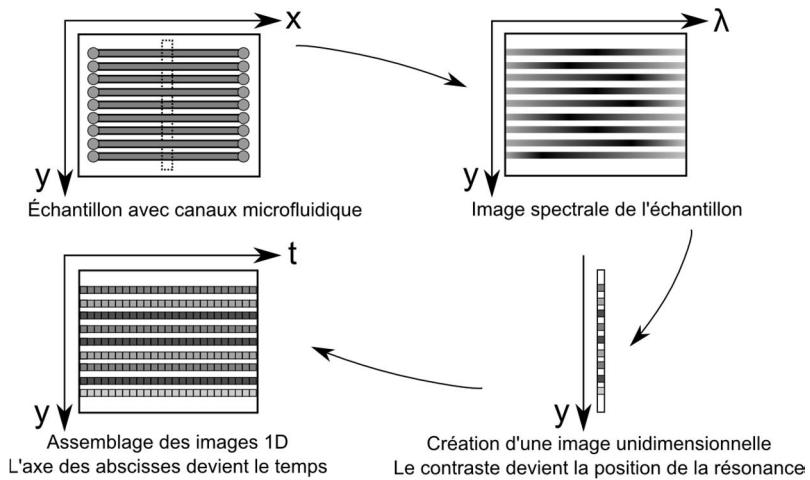


Figure 5-15 : Principe de fonctionnement de l'acquisition et de la visualisation des données en mode imagerie / multi-senseur. Dans le mode imagerie, la mesure de la position de la résonance est exécutée pour chaque ligne de la caméra CCD. Dans le mode multi-senseur, cette mesure de la position de la résonance est effectuée pour des groupes définis de ligne – chaque paquet étant assimilé comme une ligne par la caméra (sommation matérielle des lignes de pixels).

5.4.3.3 Mode multi-senseur

Le second mode proposé est un mode multi-senseur en utilisant l'option *multitrack* proposé par la caméra. Cette option permet de contourner le problème d'obturateur de la caméra en définissant plusieurs paquets de lignes sur la caméra et dont leur lecture est regroupée (chaque paquet est considéré comme une seule ligne de pixel et la lecture se fait par le biais d'une sommation matérielle de la valeur des pixels). Les lignes non sélectionnées dans les paquets ne sont pas lues permettant un transfert plus rapide des charges.

Similairement au mode imagerie, la mesure de la courbe SPR en polarisation est réalisée et la position du minimum de la courbe est déterminée pour chaque paquet. Par la suite, ces positions des minimums dans le temps sont enregistrées dans des vecteurs et visualisées à l'aide de courbes sur des graphes 2D dont l'abscisse est le temps et l'ordonnée la position des minimums. Ce mode est celui qui a été utilisé par la suite pour toutes les expériences de détection en milieu liquide.

5.4.4 Performances de la plateforme proposée

Dans cette section, des tests permettant la mesure des performances du système seront présentés. Ces derniers couvriront les deux modes d'analyse proposé par ce dernier. Le mode imagerie sera

testé en phase gazeuse et les performances du mode multi-senseur seront mesurés en utilisant des tests en milieu liquide.

5.4.4.1 Mode imagerie – test en milieu gazeux

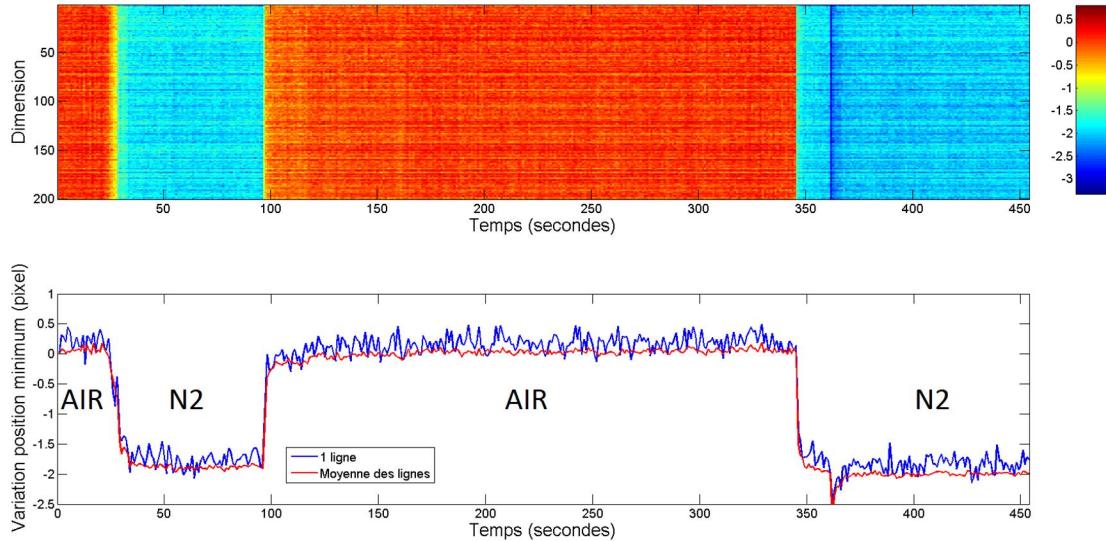


Figure 5-16: Mesure des performances avec le mode imagerie - test en phase gazeuse – différence entre air sec (valeur haute) et azote (valeur basse). L'image du haut est la représentation de la réponse spectrale de chaque ligne. L'image du bas sont les courbes de la réponse spectrale pour une ligne (bleue) et pour la moyenne de toutes les lignes (rouge).

Des tests en phase gazeuse ont été réalisés avec le mode imagerie pour déterminer sa limite de détection. La réponse spectrale de la SPR en mode imagerie a été mesuré avec un échantillon d'or en contact avec de l'azote ou de l'air. Les mesures de cette expérience sont présentées sur la Figure 5-16.

Grâce à ces données, il est possible de déterminer le rapport signal sur bruit pour une ligne, qui est égal à $SNR=5.6$, et pour la moyenne de toutes les lignes, égal à $SNR=16.1$. A partir de ces données et sachant que la variation d'indice entre l'air et l'azote est de 10^{-4} , il est possible de calculer les limites de détection pour chaque cas de figure. Pour une ligne, la limite est de $LoD=1.7*10^{-5} RIU$ et pour la moyenne des lignes, cette limite est de $LoD=6.25*10^{-6} RIU$.

5.4.4.2 Mode multi-senseur – Test en milieu liquide

Des tests en milieu liquide ont été réalisés en utilisant le mode multi-senseur. Dans cette expérience, la mesure de la position spectrale du SPR a été réalisée sur un canal d'une largeur de *100 pixels* (paquet de 100 lignes de pixel). Le test consistait en une variation successive d'eau et de solutions d'éthanol avec différentes concentrations volumiques ($C_{vol}=0.1\%, 0.2\% \text{ et } 0.5\% Vol.$). Les résultats de ces mesures sont consignés sur la Figure 5-17a.

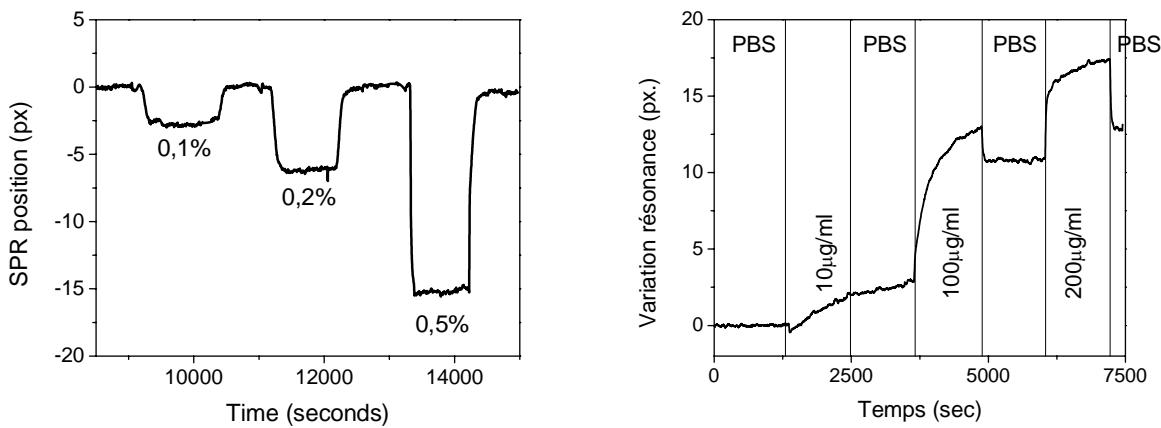


Figure 5-17: a- Test en milieu liquide avec une succession des solutions ayant différentes concentrations d'éthanol ; b- test de couche mince avec la mesure de l'adsorption de la BSA (bovine serum albumin) en fonction de différentes concentrations massiques.

Pour cette expérience, dont la longueur d'onde centrale a été de $\lambda=700 nm$ et le réseau utilisé est de $G=600 l/mm$, le rapport signal sur bruit est en moyenne de $SNR=24.1$, avec un niveau de bruit de $\delta pixel=0.116 pixel$ équivalent à $\delta\lambda=0.015 nm$ (3 fois la déviation standard sur la ligne de base), ce qui donne une limite de détection en variation d'indice égale à $LoD = 5*10^{-7} RIU$ en prenant en compte l'indice de réfraction des solutions d'éthanol ($\Delta n(0.1\%) = 1.1*10^{-5}$).

5.4.4.3 Mode multi-senseur – Test d'adsorption de couche mince biologique

Finalement, des tests d'adsorptions de couche mince ont été réalisés avec le mode multi-senseur. Les paramètres de cette mesure sont les mêmes que ceux utilisés pour les tests en milieu liquide. Une succession de différentes concentrations d'albumine provenant du sérum bovin a été injectée dans la cellule de mesure afin d'observer les différentes dynamiques d'adsorption de cette molécule sur une surface d'or.

D'après les résultats observés sur la Figure 5-17b, nous pouvons conclure que la plus basse concentration massique de BSA qui soit détectable par le système est de $C_{massique}=350\text{ng/ml}$, soit une concentration molaire de $C=5.26*10^{-9}\text{ mol.l}^{-1}$.

5.4.5 Discussion et possibles applications

Dans cette section, il a été présenté un système d'imagerie de polarisation spectrale appliquée à la résonance plasmonique de surface. Cette combinaison a permis d'obtenir une plateforme proposant une limite de détection en indice de réfraction de $LoD=5*10^{-7}\text{ RIU}$, plus basse que celle obtenue par la sensibilité de phase et jusqu'à 100 fois meilleure comparée aux plateformes conventionnelles.

De plus, ce système possède une gamme dynamique étendue, pouvant aller à un changement d'indice de $\Delta n=5*10^{-3}\text{ RIU}$ expérimentalement, mais pouvant être améliorée jusqu'à $\Delta n=2*10^{-2}\text{RIU}$ (changement de réseau), ce qui le rend très intéressant pour les mesures biomédicales requérant en même temps une bonne résolution et une grande gamme dynamique. Il a aussi une excellente sensibilité en matière de concentration molaire, avec une limite de détection pour la BSA de l'ordre de la nanomolaire, soit une limite aussi bonne (et parfois meilleure en considérant la possibilité de faire des analyses sur plus de deux canaux) que celle des meilleurs systèmes commerciaux (BiaCore, BioNavis, Reichert Technologies).

Finalement, ce système, par le biais de l'utilisation d'un système d'imagerie, peut permettre de réaliser plusieurs tests simultanément (ici deux canaux, mais améliorable à plusieurs dizaines de détections simultanées).

Grâce à ces spécifications, ce système peut être utilisé à l'analyse de milieux complexes mais présentant peu de variation en indice. En effet, contrairement à la réflexion totale interne, la réponse plasmonique est similaire pour une variation d'indice ou de couche mince. Une dissociation de ces données peut être réalisée en utilisant un canal de référence mais la portée de cette distinction peut être limitée. Il peut néanmoins être utilisé pour des milieux turbides car sa lecture se fait en réflexion.

Des applications similaires à celles proposées pour le système à sensibilité de phase peuvent être aussi appliquées à cet instrument car il propose des limites de détection similaire. Il peut donc se retrouver dans le cadre de mesure analytique pour la découverte de fonctions d'une protéine

(biochimie, pharmaceutique) ainsi que la détection de pathogène dans des milieux liquides ou gazeux homogène (présentant peu de variation d'indice).

Des applications dans les milieux complexes, requérant l'analyse de plusieurs composés simultanément peuvent être aussi envisagé. Des analyses biomédicales, telles que la détection de marqueurs spécifiques à une infection, maladie ou cancer peuvent être alors considérées dans des milieux tels que le sérum, les urines ou le sang.

Enfin, des applications dans le secteur agroalimentaire peuvent être suggérées comme la surveillance du lait en pathogène – mais aussi pour un contrôle actif de la densité en ferment ou autres substances dans des liquides agroalimentaires (densité de ferment ou levure dans les alcools lors de procédé de vinification ou de production de bière). Cependant ce type de plateforme ne pourra être utilisé que pour des milieux présentant une certaine homogénéité en indice de réfraction.

CHAPITRE 6 ARTICLE 2 : PHASE SENSITIVE SENSOR ON PLASMONIC NANOGRATING STRUCTURES

Ce chapitre, qui retranscrit un article publié dans le journal *Optics Express* en 2011 ainsi que des résultats complémentaires dans le proche infrarouge, démontre le potentiel de l'utilisation de ce type de structures.

Il présente l'utilisation de la polarimétrie avec des échantillons basés sur la nanoplasmonique, qui peut être définie par tout phénomène impliquant le confinement d'un plasmon de surface à l'échelle nanométrique, grâce à l'utilisation de structures métalliques.

Ce choix de la nanoplasmonique a été motivé par sa possibilité à offrir une plateforme accédant à des dizaines de site pour la bio-détection, ce qui rend alors possible le dépistage de la leucémie sur plusieurs patients en même temps.

La décision de l'utilisation des structures en nanoligne d'or provient quant à elle de la polarimétrie, qui repose sur la différence de réponse entre deux polarisations orthogonales. L'utilisation d'une structure asymétrique propose des réponses très différentes entre deux polarisations perpendiculaires, permettant une lecture tant en phase qu'en polarisation. Enfin, Il sera aussi montré que l'utilisation de la polarimétrie améliore substantiellement les performances de cette technique.

6.1 Auteurs et affiliations

Les auteurs sont Mathieu Maisonneuve, Olivier D'allivy Kelly, André Pierre Blanchard Dionne, le Dr. Sergiy Patskovsky et le Pr Michel Meunier. La contribution de Mathieu Maisonneuve a été la construction du système optique ainsi que son amélioration, les différents tests de caractérisation réalisés avec les différentes nanostructures, l'étude théorique de ces structures ainsi que la collaboration à la réalisation du modèle utilisé et finalement à l'écriture de l'article. Olivier D'allivy Kelly a participé à l'article en collaborant à la réalisation du modèle théorique développé sur Matlab ainsi qu'à l'étude théorique. André Pierre Blanchard Dionne a participé à l'article en préparant les différents échantillons étudiés. Le Dr Sergiy Patskovsky ainsi que le Pr Michel Meunier ont participé à la rédaction à la rédaction de l'article. Tous sont affiliés au laboratoire plasmonique et procédés laser du département de Génie Physique de l'École Polytechnique de Montréal.

6.2 Abstract

In this paper, a concept of phase sensitive sensor based on plasmonic nanograting structures with normal incidence and transmission detection is presented. Performed theoretical modeling enables fabrication of nanostructures with optimal geometry for polarimetric measurements of the phase difference between s- and p- polarized light. High phase resolution of the optical setup (6×10^{-3} deg.) allows detection of the bulk refractive index with sensitivity equal to 3.8×10^{-6} RIU. Proposed technique presents a more efficient alternative to the conventional spectral interrogation method of nanoplasmonic-based sensing and could be used for multisensing or imaging applications.

6.3 Introduction

Plasmonics is rapidly becoming a dominant technology in the fields of novel optical devices employing new experimental capabilities of subwavelength metallic nanostructures. In combination with modern nanofabrication technologies which allows preparation of numerous regular patterns of particles, holes, or nanogratings, this technology provides opportunities to create efficient, fast and sensitive integrated multiplexed sensor systems for biological and medical research [31, 167]. Despite a number of undisputable advantages, nanoplasmonics-based sensors show sensitivity and resolution orders of magnitude lower compared to conventional SPR devices with prism or grating coupling methods where usually detection limit is about 1×10^{-6} Refractive Index Units (RIU) [27, 168]. The main problem is related to the fact that localized plasmon-based biosensors use only the resonant frequency of plasmon excitation, whereas conventional SPR takes additionally advantages of the finely tuned resonant conditions of angular or spectral coupling of a photon to the surface plasmon (SP) wave.

In this article, we propose to use a phase-sensitive detection approach to biosensing based on plasmonic nanograting structures. We think that existing phase measurement methodology which was shown as very efficient for SPR optical sensing [23, 169], could be used in combination with stabilized monochromatic laser sources to further improve the sensitivity, selectivity and resolution of plasmonics-based biosensing up to the detection limit of conventional SPR and to develop novel nanoscale plasmonics complexes and architectures.

6.4 Basic idea and approach

Coupling photons into surface plasmons (SP) can be achieved using a grating as a coupling medium to match the photon and SP wave vectors. A grating coupler matches the wave vectors by increasing the parallel wave vector component by an amount related to the grating period. The angle θ that satisfies the SP resonant excitation condition is given by [170]:

$$\sqrt{\varepsilon_d} \frac{2\pi}{\lambda_0} \sin(\theta) + p \frac{2\pi}{\Lambda} = \frac{2\pi}{\lambda_0} \sqrt{\varepsilon_M(\lambda) \cdot \varepsilon_d(\lambda)} \quad 6-1$$

where p is an integer relative to the diffraction order, Λ is the grating period, and ε_d and ε_m are the dielectric constant of the surrounding medium / substrate and of the metal, respectively, λ_0 is the monochromatic light source wavelength. This method, while less frequently used in the conventional SPR set-ups, is critical and very efficient where SP excitation on the planar surface by free-space radiation is required and, as is shown in this work, could provide additional parameters for experimental applications.

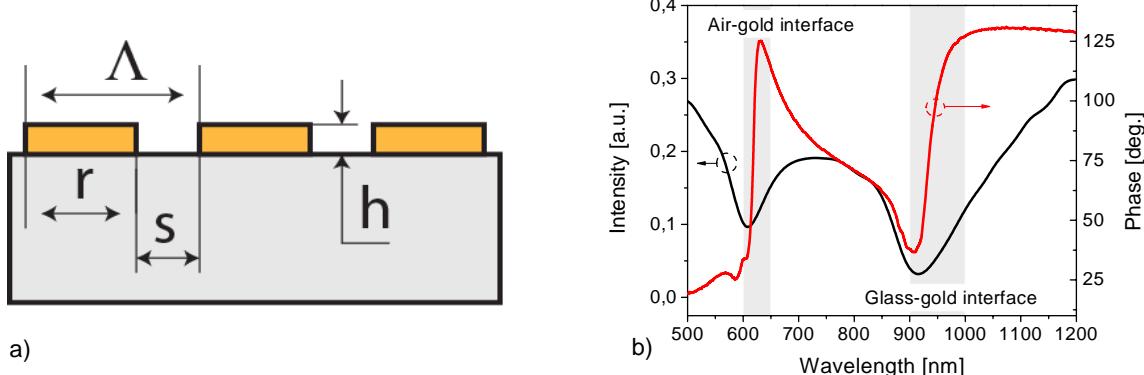


Figure 6-1: a) Schematic representation of the nanograting with period d , ridge size r , slit size s and thickness h ; b) Intensity and phase of the light transmitted through the nanoslit array with 600nm period, 450nm ridge size and 100 nm thickness.

While the proposed methodology could be applied to any types of gases or liquids biosensing, we concentrated our effort, as a proof of concept, on gas sensing ($n = 1$) by performing both simulations and experiments on rectangular-slits gratings. The proposed structures (Figure 6-1 a.) consist of a $h = 100$ nm thick gold film deposited on a transparent glass substrate (BK7) with a fixed period of $\Lambda = 600$ nm and a varying ridge size r as an optimization parameter.

As it was shown in the literature [171] the interaction of the incident light with subwavelength metallic structures results in an excitation of normal propagating plasmonic modes and coupled and uncoupled modes that are highly localized resonances. Moreover, these resonances may not propagate between slits, are independent of the grating period and are associated with reflection, extinction and transmission enhancement of the light. Using the rigorous couple wave analysis (RCWA) formalism [74], we performed numerical simulations to obtain the spectral characteristics for phase and intensity of light transmitted through such plasmonic nanostructures. Experimental spectral dependences (Figure 6-1 b.) for an incident light polarization perpendicular to the grating slits contain distinguishing features characterized by a sharp phase jump and a minimum intensity at about 600nm and 900nm attributed to the SP excitations at respectively the air/metal and metal/substrate interfaces. Since sensing occurs at the medium/gold interface, only the spectral range around 600nm is shown later in this work. Fig.2a presents theoretical spectral phase dependences for gratings having a fixed period of $\Lambda = 600\text{nm}$ and varying ridge sizes of $r = 300\text{nm}, 350\text{nm}, 400\text{nm}, 450\text{nm}$ and 500nm .

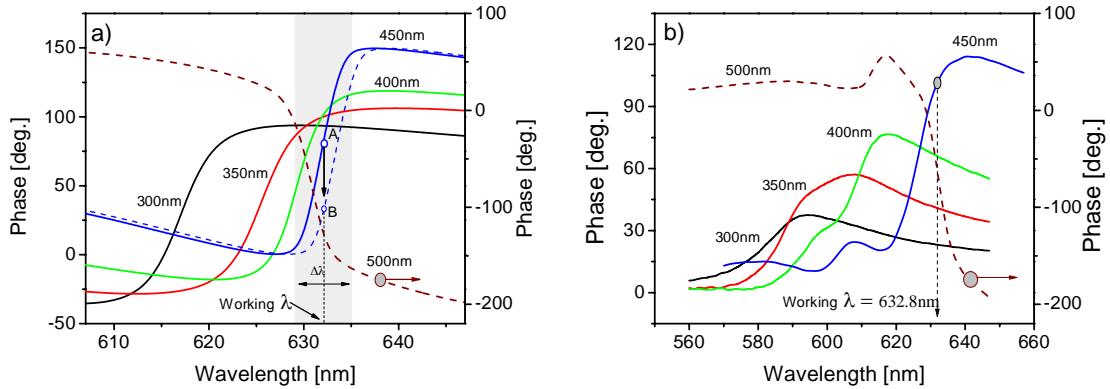


Figure 6-2: a) Theoretical spectral phase curves for nanograting structures with different ridge sizes; dashed blue line presents a shifted spectral phase curve for $r=450\text{nm}$ resulting from a change in refractive index equal to 3×10^{-3} RIU; b) Experimental spectral phase characteristics.

Maximising the sensitivity requires to obtain a sharp phase variation around a predetermined working wavelength. As follow from Fig.2a, the larger is r , the sharper is the phase change. For our system, the optimum condition was achieved for ridge size equal to 450nm at the working wavelength of 632.8nm (He-Ne laser). Here we propose to apply a phase sensing methodology to follow changes of medium refractive index. As an example, after slightly increasing the

medium RI by a value equal to 0.003 RIU for sample with $r=450\text{nm}$, the spectral phase curve is shifting, as shown by the dashed blue line on Fig.2a. This shift resulted in a corresponding phase change A->B at the fixed working wavelength.

Dynamic range of the sensor can be estimated from the absolute phase variation ($\Delta\lambda$ on Figure 6-2 a.). It is interesting to point out that the subsequent increase of r to 500nm has rather different impact on phase characteristic, showing opposite spectral trend. Such behaviour is very similar to the surface plasmon phase dependences on the thin metal film thickness in the Kretschmann SPR geometry.

For experimental tests, nanograting arrays with a fixed period of 600nm, ridge sizes ranging from 300nm to 500nm and overall dimension of $150\times150\mu\text{m}$ were produced by Focused Ion Beam (FIB) on a 100nm thick gold metal film (Platypus) deposited on the transparent substrate (glass BK7). Experimental spectral phase curves were measured on an ellipsometer (J.A. Wollam) and are presented on Figure 6-2 b. Overall tendencies confirm the theoretical predictions while some differences are observed in spectral phase curves positions and absolute phase variation, which are due to the imperfections of the fabricated samples by FIB method. It is anticipated that surface roughness [172], grating lines and period precision, slight convergence of the probe light could affect the surface waves propagation parameters especially for smaller slit sizes. Additional irregularities presented on the experimental curves are probably due to the complex nature of the light transmission through nanoplasmonic structures [88].

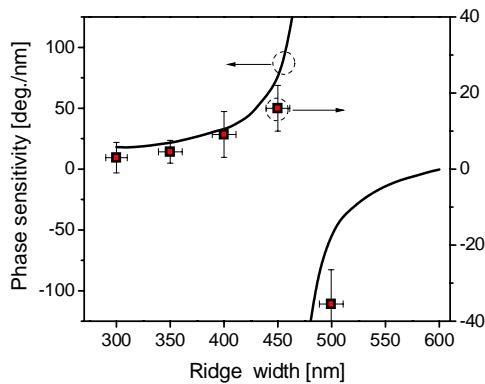


Figure 6-3: Theoretical (solid curves; scale on the left) and experimental data (points; scale on the right) for phase sensitivity dependence on the ridge sizes.

Sensitivity and dynamic range of the proposed phase-sensitive method depends on the sharpness and absolute variation of the spectral phase curves (Figure 6-2). Usually these sensor parameters are tuned by the plasmon coupling grating period. Here we show how important is the optimization of the ridge sizes and thickness for the nanogratings based sensor. Figure 6-3 shows the calculated and measured results for sensor phase sensitivity as a function of the ridge width. The obtained lower experimental sensitivity could be improved by performing E-Beam nanofabrication method on larger samples with smoother metal layers.

Optimal grating thickness that corresponds to the maximum spectral phase variation was evaluated theoretically for different ridge sizes (Figure 6-4 black line). Calculated working wavelengths at the position of the phase maximum are shown as red lines on Figure 6-4. It is clear that the minima of transmission and large phase changes follow the SP dispersion line (Equation 5-1). We can apply the concept that the optimal resonance condition of surface plasmon excitation is obtained when internal damping Γ_i is equal to the radiation damping Γ_{rad} [83] and that the direction of phase variation depends on the relation of these two parameters [72]. Radiation damping mechanism in our case contains two components. The first one is backscattering by the grating that increases with the grating thickness. The second is excitation of surface plasmon on the air/gold interface, for which enhanced transmission through nanoslits and coupling to the plasmon on the gold/substrate interface induces reemission to the far field. Γ_i is usually equal to the imaginary part of the propagating surface plasmon wavevector.

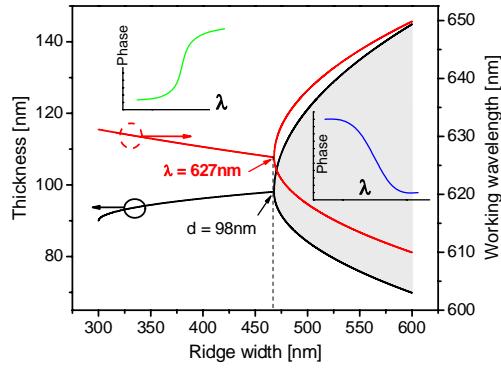


Figure 6-4: Theoretical results for optimal grating thickness and corresponding working wavelength position for different ridge sizes; Inserts: Typical phase curves for marked region.

But, in the case of asymmetrical gratings, the wave which travels parallel to a surface of a medium with a higher refractive index tends to lose energy into that medium and, similarly, the grating lines tend to collect light which initially travels into the grooves. Thus, this effect and the amounts of energy emerging from the grating lines and grooves will affect the internal damping parameter [173]. Using this concept we can explain the behavior of the curve for optimal grating thickness. First, the grating thickness of about 100nm allows compensating Γ_i [174]. Increasing of the ridge sizes results in the increase of Γ_i and requires thicker grating to maintain condition $\Gamma_i = \Gamma_{rad}$. The optimal grating thickness of 98nm is found for ridge width 470nm with a working wavelength of 627nm. This wavelength corresponds exactly to the condition of surface plasmon excitation at gold/air interface on the 600nm grating with normal incidence (Equation 8-1). A very interesting effect is observed after this point: splitting of the curve for optimal grating thickness and inversion of the phase curve (Figure 6-4, inserts). This effect could be explained by the resonance properties of enhanced light transmission through small subwavelength slits. For example, for nanoslits less than 100nm, different Fabry-Perot modes exist that depend on the slit size and depth [171, 175]. Leaking of evanescent surface plasmon also can contribute to the appearance of several optimal thicknesses [88, 176]. A deeper, more physical understanding of these phenomena would be desirable, but it takes substantial experimental work and is a subject of a future work.

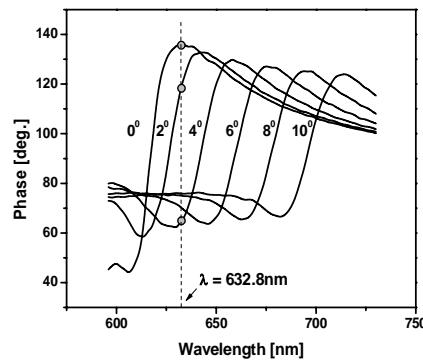


Figure 6-5: Experimental phase dependences for different incident angles.

Due to the nanofabrication technology limitations and the relatively low dynamic range of the phase-sensitive method, coincidence of probing laser light wavelength with the phase curve's maximum slope is rather difficult experimentally. It is critical to find another parameter to tune the starting point, which is generally the maximum phase slope point. To maximise the sensor

performance, we opted to tilt the structure. As it could be observed in Figure 6-5, angular deviation of the sample enables to tune this point by changing the wavelength position of the maximum phase slope. Therefore, by doing angular measurement at fixed wavelength, it is possible to retrieve the starting point of the experiment.

6.5 Instrumental methodology

An experimental set-up, illustrated in Figure 6-6, was developed to measure time variations of phase properties in air or liquid medium of our samples. In the proposed polarimetric set-up, spatially filtered light from a 5 mW stabilized He-Ne laser with 632.8 nm wavelength is passed through a Glan-Taylor polarizer to provide a 45° linearly polarized beam. The light is directed to a Photoelastic Modulator (PEM, HINDS I/FS50) after passing through a Soleil -Babinet compensator, which serves to optimize the initial phase retardation. The PEM is used to sinusoidally modulate the phase of the p-component at a frequency of 50 kHz. The beam is then directed through a diaphragm to the nanoplasmonic structure placed on the high precision rotation stage, thus allowing for incident angle fine tuning. All experiments in air or in gases were performed in a specially designed measurements chamber.

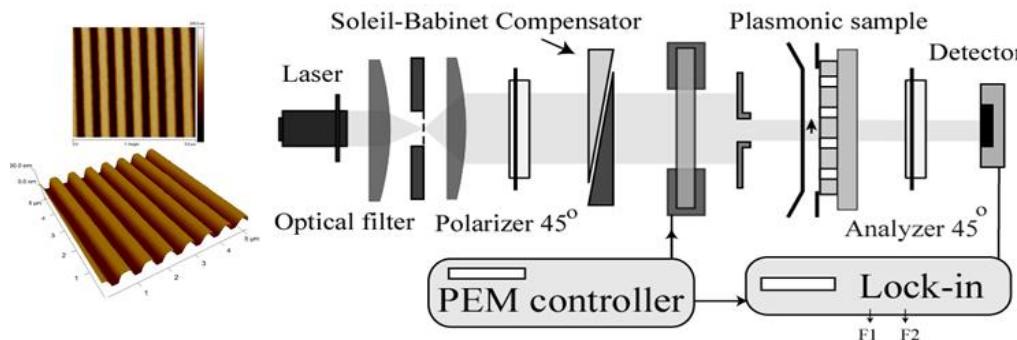


Figure 6-6: AFM sample images and optical set-up for phase measurements.

The final periodic signal of light transmitted through the tested nanoplasmonic sample and the 45° oriented analyzer is measured by the detector and then decomposed into harmonics using a lock-in amplifier. Since the time domain signal is periodic and continuous, the harmonics of a frequency spectrum could be modeled using a Fourier transform method. Thus, the first two harmonics are given by [126]:

$$F_1 = 2J_1(M)R_p R_s \sin(\alpha + (\phi_p - \phi_s)) \quad 6-2$$

$$F_2 = 2J_2(M)R_p R_s \cos(\alpha + (\phi_p - \phi_s)) \quad 6-3$$

Here, α is the initial phase retardance introduced by the Soleil-Babinet compensator. R_p , ϕ_p and R_s , ϕ_s are reflection and phase under p- and s- polarization, respectively. J_n indicates a Bessel function of order n and M , the modulation amplitude. Phase retardation $\phi = \phi_p - \phi_s$ can be derived from Equation 5-2 and 5-3 and are given by:

$$\phi = \tan^{-1} \left(\frac{F_1 J_2(M)}{F_2 J_1(M)} \right) \quad 6-4$$

6.6 Results and discussion

In order to estimate the efficiency of the polarimetric experimental set-up for the proposed nanoplasmonic phase-sensitive methodology, initial calibration tests were performed. In the absence of the sensing block, we measured responses of the first and second harmonic to the small phase retardation introduced by a Soleil-Babinet compensator. Optimal signal-to-noise ratio for the phase measurements (Equation 8-4) was obtained at 154° phase modulation depth (M), which provides equal harmonics intensities and therefore optimal conditions for the noise elimination (Figure 6-7 a.). Looking at the noise level, the high phase resolution of 6×10^{-3} ° confirms the efficiency of our polarimetric set-up for direct real time phase measurements at fixed incident angle.

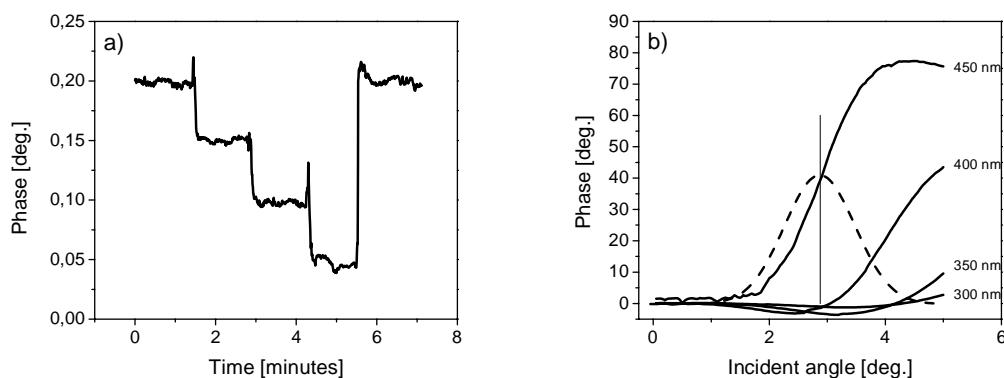


Figure 6-7: (a) Phase sensitivity experiment. b) Determination of optimal incident angle.

To test the proposed methodology, we adapted the PEM-based phase measurement system for nanoplasmonic sensing measurements, as shown in the Figure 6-6. Nanoplasmonic samples were placed on the rotation stage and the measured initial phase retardation was compensated by a Soleil -Babinet compensator. Experimental phase-angular dependencies serve as calibration procedure to find the optimal tilt position for highest phase sensitivity. For example, as seen in Figure 6-7 b., for a nanograting array with ridge = 450nm, the maximum phase derivative is obtained at 2.88° angle tilt which is later fixed for real time gas sensing.

We then used a well-established gas methodology for small refractive index variations Δn [169]. This method involves comparing the system response, while different inert gases with known refractive indices are brought in contact with the gold film. In the experiments, Ar and N₂ were used, for which the refractive indices differ by $\Delta n \approx 1.5 \times 10^{-5}$ RIU under the normal conditions [177, 178]. The gases were brought to the cell through a long spiral copper tube to equilibrate their temperatures with the room temperature. A flow meter is used to equalize the pressure to the flow cell in contact with the SPR-supporting nanoplasmonic gold film. Figure 6-8 demonstrates typical phase signals under the replacement of pure N₂ by Ar gas. Taking into account the level of residual noises that is equal to 0.06deg. (equal to three times of the mean standard deviation on each step), we can determine that the detection limit of our system is about 3.8×10^{-6} RIU, which is significantly better compared to conventional spectral-sensitive nanoplasmonic devices. Further improvement of the detection limit could be achieved by optimizing grating parameters, precision of nanofabrication and application of an active thermostabilisation system.

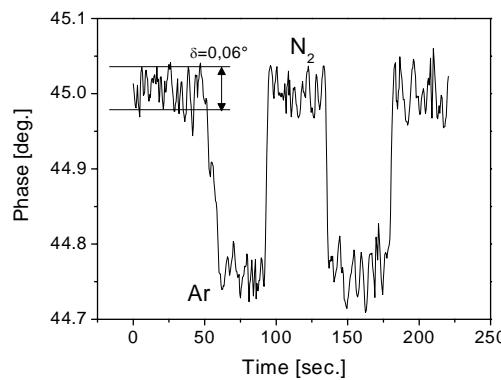


Figure 6-8 : Experimental results for phase under the replacement of pure N₂ by Ar.

6.7 Conclusion

We proposed a dephasing method of SP signal/noise enhancement to improve overall sensitivity of nanoplasmonic structures in bio- and chemical sensing. The proposed method enables to obtain low noise signals with an anticipated resolution of about 3.8×10^{-6} RIU. Such phase-sensitive approach makes possible the achievement of a relatively low detection limit and is expected to provide substantial advantages in the development of low-cost, portable gas- or biological sensor devices.

6.8 Acknowledgement

The authors acknowledge the financial contribution from the NSERC Strategic Network for Bioplasmonic Systems (Biopsys) and NanoQuébec.

6.9 Résultats complémentaires : analyse polarimétrique des nanostructures dans le proche infrarouge

Dans cette section, une analyse complémentaire des structures nanoplasmoniques dans le proche infrarouge a été réalisée. Cette étude a été accomplie dans le but de proposer une amélioration en matière de sensibilité et de limite de détection pour les plateformes nanoplasmoniques.

Une étude théorique de la sensibilité en fonction de la longueur d'onde d'excitation a été réalisée sur des réseaux avec différentes périodes ($\Lambda=500\text{ nm}$ à $\Lambda=1000\text{ nm}$) de période par pas de $\delta\Lambda=100\text{ nm}$) en utilisant l'équation 6-1. Les résultats de cette étude sont présentés sur la Figure 6-9a, où il peut être observé que la sensibilité de ces structures, i.e. la variation de la position de la résonance en fonction d'un changement en indice de réfraction, augmente avec de plus grandes longueurs d'onde d'excitation.

Les résultats obtenus sont très similaires à ceux que l'on peut observer dans le cas de la résonance plasmonique de surface sur les réseaux et s'explique de la même façon. Ceci est principalement dû à la nature du coupleur, i.e. le système permettant l'accord de phase entre l'onde incidente et le plasmon de surface. En effet, les systèmes fonctionnant à partir d'un couplage par prisme ont de meilleures sensibilités car le verre du prisme a une faible dispersion chromatique, ce qui induit un plus grand changement en longueur d'onde pour garder les conditions d'accord de phase.

Inversement, les systèmes utilisant les réseaux présentent de faibles sensibilités car ces derniers ont de très fortes dispersions chromatiques, et donc nécessitent un plus faible changement en longueur d'onde pour préserver l'accord de phase.

Mise à part la hausse de la sensibilité, il y a plusieurs avantages à aller dans le proche infrarouge. Le premier est la possibilité d'avoir une profondeur de sonde plus étendue dans le milieu à tester (Figure 6-9b) – ce qui ouvre la porte à des applications de détection de gros objets tels que les cellules ou les bactéries. Un autre avantage lié à une plus grande profondeur de sonde est la possibilité d'utiliser des fonctionnalisations de surfaces complexes qui peuvent aller jusqu'à une épaisseur de plusieurs dizaines à centaines de nanomètres (basés sur des résines absorbant spécifiquement un marqueur ou sur le dépôt de couches moléculaires pour inhiber les adsorptions non-spécifiques).

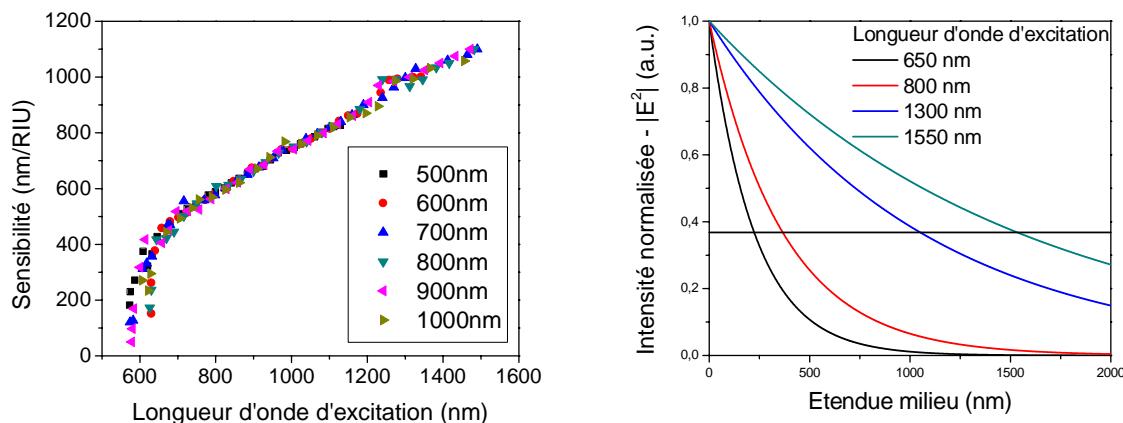


Figure 6-9 : a- Étude de la sensibilité des structures nanoplasmoniques (pas de réseaux de $\Lambda=500\text{ nm}$ à $\Lambda=1000\text{ nm}$ par pas de $\delta\Lambda=100\text{ nm}$) en fonction de la longueur d'onde de la résonance – chaque symbole correspond à un pas de réseau – le milieu d'étude étant l'eau; b- Étendue spatiale du plasmon de surface dans le milieu à tester – plus la longueur d'onde de résonance est grande plus la sonde est profonde.

Une autre propriété intéressante de l'utilisation de longueur d'onde dans le proche infrarouge est la possibilité d'utiliser les technologies optiques et optoélectroniques développées en télécommunication. Cette abondance de composants peut permettre la réduction des coûts des instruments développés. Le dernier avantage est la taille des structures étudiées. En effet, comme les plateformes nanoplasmoniques sont généralement utilisées en incidence normale, des

structures de l'ordre du micromètre seront utilisées. Ces tailles permettent l'emploi de méthodes de micro-fabrication plus conventionnelles et donc la réduction des coûts dans le processus de fabrication des échantillons.

6.9.1 Structure étudiée

La structure étudiée est un réseau de nanoligne d'or avec une période de $\Lambda=1000\text{ nm}$ et des largeurs de lignes de $r=800\text{ nm}$ (Figure 6-10a). Cet échantillon a été réalisé en utilisant une gravure par faisceau d'ion sur une couche d'or de 100nm d'épaisseur déposé sur un substrat de silicium.

Cette configuration, dont l'excitation d'un plasmon de surface se produit à $\lambda=1320\text{ nm}$ dans l'eau, permet l'utilisation des composants optoélectroniques de la bande O en télécommunication ainsi que des techniques plus conventionnelles de photolithographie optique et de micro-fabrication.

Des simulations utilisant le formalisme RCWA (« rigorous couple wave analysis » en anglais pour analyse rigoureuse des ondes couplées) ont été réalisées似ilairement à l'article précédent, afin d'étudier les réponses en intensité (Figure 6-10b), en polarisation (Figure 6-10c) et en phase (Figure 6-10d) de ce type de structures avec deux milieux d'indice de réfraction différents (n_{eau} et $n_{eau}+0.01$).

Dans ces simulations, nous avons pris pour convention la polarisation TM celle interagissant avec le réseau pour exciter un plasmon de surface (polarisation perpendiculaire au réseau de nanoligne), et la polarisation TE comme référence (polarisation parallèle au réseau de nanoligne).

Dans cette analyse, nous avons pu observer que la résonance du plasmon de surface est décrite par une baisse d'intensité sur la polarisation TM induisant un changement d'orientation du vecteur polarisation, ainsi que par un saut de phase pour cette même polarisation. La polarisation présente un pic beaucoup plus étroit que celui décrit par l'intensité et ouvre la possibilité à une lecture de ce paramètre afin de déterminer avec une meilleure résolution la position de la résonance. Aussi, une évaluation en phase statique peut être réalisée au vue des fronts abrupts que propose cette mesure.

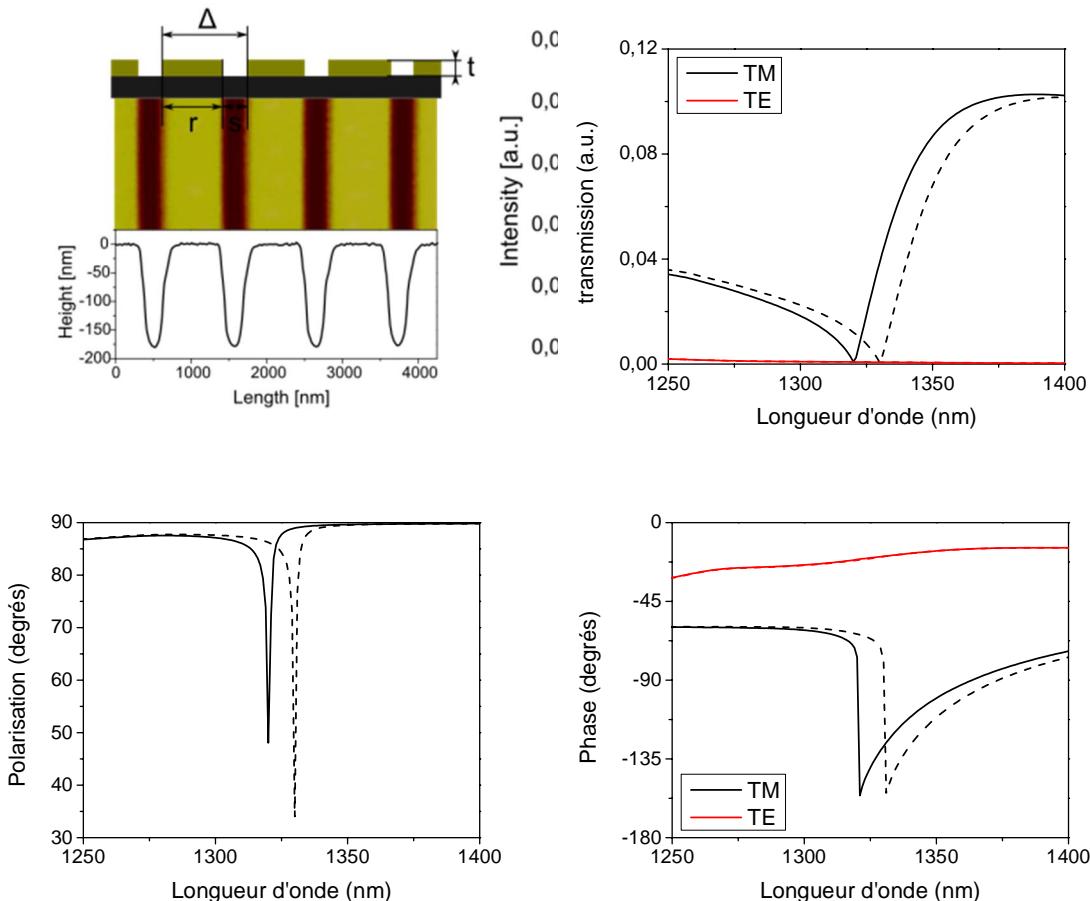


Figure 6-10 : a- Figure AFM avec profil montrant les caractéristiques géométriques de l'échantillon; b- Réponse en intensité de l'échantillon selon la polarisation TM (noir) et TE (rouge) pour l'eau (ligne continue) et un milieu d'indice supérieur de $\Delta n=0.01$ RIU (ligne pointillée); c- Réponse en polarisation pour l'eau (ligne continue) et pour le second milieu (ligne pointillée); d- Réponse en phase selon la polarisation TM (noir) et TE (rouge) pour l'eau (ligne continue) et pour le second milieu (ligne pointillée).

6.9.2 Résultats expérimentaux

Dans un second temps, des tests expérimentaux ont été accomplis avec l'échantillon construit. Pour cela, des mesures à l'ellipsomètre ont été effectuées afin d'avoir la polarisation à la sortie de l'échantillon ainsi que la différence de phase entre les polarisations TM et TE. Ces expérimentations ont été réalisées sous deux indices de réfraction différents, l'eau et l'éthanol pur. Ces résultats sont présentés en Figure 6-11a pour la polarisation et en Figure 6-11b pour la phase.

Nous pouvons noter que les mesures obtenues expérimentalement présentent la même tendance que celles obtenues avec la simulation. En effet, la sensibilité expérimentale, égale à $S_{exp}=850 \text{ nm/RIU}$, est très proche de celle obtenue théoriquement, dont la valeur est $S_{théo}=920 \text{ nm/RIU}$. Cette différence de 7.6% provient principalement du décalage (« stitching » utilisé en microfabrication) observé sur les échantillons fabriqués par FIB (Figure 3-3 dans le chapitre 3). Ce décalage vient de l'incapacité du FIB de revenir exactement à la même position en changeant de ligne.

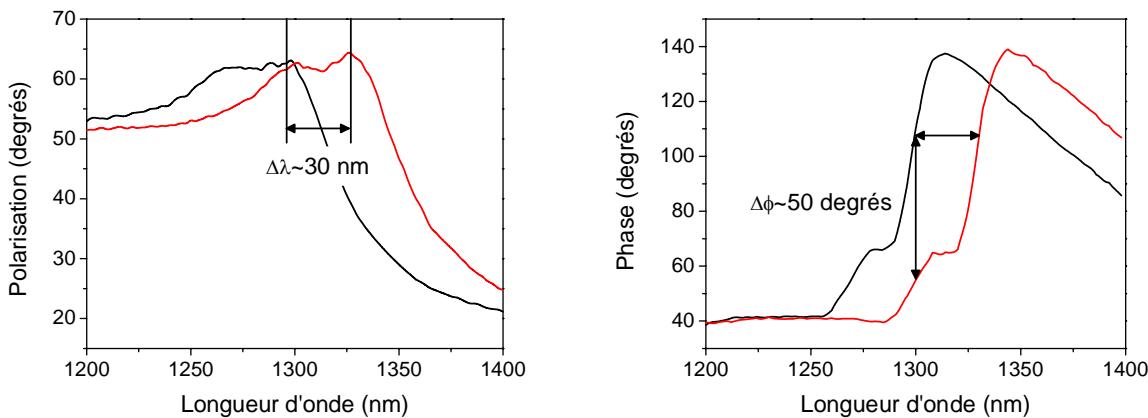


Figure 6-11: a- Résultats expérimentaux en polarisation de la structure étudiée avec l'eau (courbe noire) et l'éthanol (rouge) comme milieu à analyser; b- résultats expérimentaux en phase pour les mêmes conditions.

Cependant, les paramètres des courbes telles que la largeur et la définition du pic en polarisation ainsi que la pente maximale du front de phase sont bien en deçà de ce qui a pu être observé théoriquement. En effet, la largeur du pic est de $\delta\lambda=1.48 \text{ nm}$ théoriquement alors qu'il est environ égal à $\delta\lambda=100 \text{ nm}$ expérimentalement. De même, le front de phase présente des pentes maximales égales à $S_{phase}=20.76^\circ/\text{nm}$ théoriquement alors que les valeurs expérimentales sont 20 fois plus basses.

6.9.3 Estimation des performances et applications possibles pour les plateformes nanoplasmoniques

Grâce à ces valeurs ainsi qu'aux performances des systèmes optiques, nous pouvons prédire théoriquement les limites de détection qui seront obtenues avec ce type d'échantillon. Dans le cas

d'un suivi du minimum avec la courbe de polarisation, en prenant en compte la résolution de l'appareil proposé en chapitre 5, soit $\delta\lambda=0.076\text{ nm}$ et une sensibilité de $S=850\text{ nm/RIU}$, il est possible d'obtenir une limite de détection $LoD=8.94*10^{-5}\text{ RIU}$, ce qui est proche des systèmes SPR conventionnels. Dans le cas d'une analyse en phase, en prenant en compte le bruit en phase du système proposé dans l'article, soit $\delta\phi=0.06^\circ$ et une pente de $5.14^\circ/\text{nm}$ avec la sensibilité égale à $S_{exp}=850\text{ nm/RIU}$, la limite de détection « théorique » est de $LoD=1.37*10^{-5}\text{ RIU}$.

Les performances estimées se révèlent être inférieures à celles obtenues par ce même type de structure dans le visible ou par des techniques utilisant la résonance plasmonique de surface planaire. Cependant, une amélioration des paramètres des courbes peut être parachevée en perfectionnant les méthodes de fabrication, en particulier sur la qualité de l'échantillon – l'utilisation de l'E-beam permettrait de conserver une faible rugosité de surface et donc une meilleure qualité de l'excitation du plasmon de surface; et les paramètres de la structure (dont la période, épaisseur et largeur des lignes d'or), ce qui permettrait d'obtenir des limites de détection plus proches ou meilleures aux méthodes précédentes.

La gamme dynamique est elle aussi caractérisée en indice de réfraction et peut être calculée comme suit. En prenant en compte que la réponse est linéaire sur $\Delta\lambda=5.8\text{ nm}$ sur la courbe de phase et sachant que la sensibilité pour la structure étudiée est de $S_{exp}=535\text{ nm/RIU}$ dans l'air, alors l'étendue dynamique est environ égale à un changement d'indice de $\Delta n=1*10^{-2}\text{ RIU}$.

En matière d'applications, les systèmes nanoplasmoniques,似ilairement aux systèmes plasmoniques, ne peuvent pas distinguer les changements d'indice à un dépôt de couche mince. Cependant, l'utilisation d'un canal de référence peut limiter cette dépendance tout en ayant certaines restrictions. L'avantage d'une telle plateforme est la possibilité d'avoir des centaines de mesures simultanées sur une même plateforme. Des applications requérant ce niveau de multiplexage sont à favoriser.

Pour cela, des puces à ADN fonctionnant avec la nanoplasmonique peuvent être envisagées ainsi que la détection de multiples marqueurs pour l'analyse biomédicale dans le sérum, les urines ou le sang. L'étude fonctionnelle en biochimie peut être aussi une application avec un test sur des centaines de récepteurs différents d'une seule molécule ou inversement, un test d'un récepteur sur des centaines de molécules.

Finalement, des applications de détections de pathogènes, polluants ou poisons multiples peuvent être aussi envisagées tant dans des milieux liquides ou gazeux. De manière similaire aux plateformes plasmoniques, des tests de présence de bactéries, germes ou poison dans l'eau courante peuvent être réalisés ainsi que la détection de gaz toxique dans l'air. Des systèmes utilisant une lecture de phase seront à privilégier dans le cas d'application nécessitant une grande sensibilité et résolution.

CHAPITRE 7 ÉTUDE DE CAS : LA DETECTION DE LA LEUCEMIE VIA UNE ANALYSE DU SÉRUM HUMAIN

Ce chapitre porte sur l'étude de cas de l'application médicale choisie – détection de la leucémie par l'évaluation des immunoglobulines présentes dans le plasma sanguin. Cette dernière est liée à la collaboration de ce projet de doctorat avec le réseau stratégique du CRSNG Biopsys dont le but est de proposer une plateforme bio-plasmonique pour la détection de la leucémie et du cancer du poumon.

Dans un premier temps, ce chapitre décrit l'analyse comparative parachevée afin de déterminer la meilleure plateforme pour le dépistage de la leucémie. Pour réaliser cette comparaison, les spécifications nécessaires pour sa détection seront définies. Ces dernières sont la limite de détection, l'étendue de la gamme dynamique et la capacité à obtenir une mesure multiplexée. Ensuite, un récapitulatif des caractéristiques des instruments étudiés pour ces trois paramètres sera fait. Une comparaison sera ensuite réalisée afin de déterminer la plateforme proposant le meilleur compromis.

Enfin, ce chapitre présentera un article soumis au journal *Biosensors and Bioelectronics* dont le sujet porte sur la détection de la leucémie par l'instrument choisi. Il y sera présenté la chimie de surface utilisée pour capturer les chaînes légères ainsi que le protocole d'expérimentation. Par la suite, des tests de validations utilisant des solutions pures d'immunoglobuline avec spécifiquement des chaînes lambda ou kappa ont été accomplis pour déterminer la spécificité de la surface ainsi que la zone de réponse linéaire du capteur. Finalement, des tests ont été réalisés avec des échantillons de sérum humains afin de valider la méthode proposée.

7.1 Analyse comparative des transductions

7.1.1 Définitions des spécifications nécessaires pour la détection de la leucémie

Afin de déterminer une base de comparaison des différents instruments, on doit définir les spécifications nécessaires en matière de limite de détection, gamme dynamique et capacité de multiplexage.

Une étude de la littérature pour connaître les concentrations mises en jeu pour la détection de la leucémie a été réalisée afin de déterminer la limite de détection nécessaire à l'application. Selon

les données trouvées dans les références [68, 70, 179, 180], les concentrations de chaînes légères libres varient entre $C_{massique}=0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ et $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, soit entre $C=4 \text{nM}$ et 40nM . Par contre, les taux de chaînes légères attachées aux immunoglobulines sont de l'ordre de $C_{massique}=0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ à $10 \text{ mg}/\text{ml}$ selon les données obtenues des échantillons testés, ce qui donne en concentration molaire une gamme de $C=100 \text{nM}$ à $10 \mu\text{M}$ pour les immunoglobulines M et de 600nM à $60 \mu\text{M}$ pour les immunoglobulines G. Ces deux types d'immunoglobuline ont été pris en exemple car ce sont ces espèces qui ont été étudiées lors de l'application biomédicale.

L'étendue dynamique a quant à elle été étudiée en utilisant une analyse théorique basée sur un modèle de couches minces appliqué à la réflexion totale interne et à la résonance plasmonique de surface. Pour cela, les chaînes légères sont définies par un film mince d'une épaisseur $e=10 \text{ nm}$ avec un indice de réfraction de $n=1.38$ (indice de réfraction souvent pris comme référence dans la littérature pour des molécules de large taille [162]). Le milieu ambiant est défini avec les valeurs en indice de réfraction de l'eau. Les conditions en angle et longueur d'onde sont les mêmes que celles citées dans les études des instruments. Le résultat définissant la gamme dynamique pour la SPR est une variation en changement d'indice de réfraction maximale et égale à $\Delta RI_{max} = 4*10^{-3} \text{ RIU}$. Pour la réflexion totale interne, le changement de phase à l'angle critique a été pris comme paramètre et est égal à $\Delta\phi_{max} = 0.8^\circ$. Il doit être cependant noté que le calcul réalisé dans ce modèle prend pour acquis une couche mince parfaite d'une épaisseur $e=10 \text{ nm}$, sachant que les couches biologiques sont plutôt des couches partielles. Ces valeurs présentées sont donc certainement surestimées.

Le multiplexage est nécessaire pour la détection de la leucémie car cette dernière implique une analyse comparative de plusieurs bio-marqueurs et de préférence avec les mêmes conditions expérimentales. L'étude en concentration des chaînes légères kappa et lambda est réalisée de façon à obtenir un ratio déterminant la condition (saine ou malade) du patient. De plus, dans la perspective d'amélioration de la technique de détection, d'autres bio-marqueurs peuvent être aussi surveillés, comme le type de chaîne lourde (5 sortes : A, D, E, G et M)

7.1.2 Récapitulatif, comparaison et détermination des spécifications des instruments présentés dans cette thèse

7.1.2.1 Récapitulatif des spécifications des instruments présentés dans cette thèse

Dans cette section, un récapitulatif des spécifications des instruments présentés est réalisé et exposé sous la forme du tableau suivant. Les paramètres de limite de détection (en matière d'indice et de concentration de solution détectable), de gamme dynamique (en indice et en couche mince équivalente – remarque 1) ainsi qu'en multiplexage seront dévoilés.

Tableau 7-1: Récapitulatif des spécifications des instruments développés durant le projet de doctorat

Systèmes	TIR	SPR phase	SPR polarisation	Nano-plasmonique
LoD	RIU	10^{-5} RIU	6.2×10^{-7} RIU	5×10^{-7} RIU
	[X] (nM)	21.35nM	n.d.	5.6nM
Gamme	RIU	1.5×10^{-3} RIU	10^{-3} RIU	$2-5 \times 10^{-3}$ RIU
	Couche (nm)	infini	Éq. à 5nm	Éq. à 10nm
Multiplexage	Oui ²	Oui ²	Oui	Oui ²

Remarque 1 : La couche équivalente (pour la plasmonique seulement) provient d'un calcul théorique qui représente l'épaisseur du film biologique équivalent au changement d'indice maximal. L'indice de cette couche a été fixé à $n=1.38$ – généralement acquis comme indice de couche biologique dans la littérature. La longueur d'onde initiale est égale à $\lambda=633\text{ nm}$.

Remarque 2 : La deuxième remarque réfère aux systèmes utilisant une modulation de phase. Leur multiplexage peut représenter un cout élevé dû à l'électronique utilisé. Cependant, des techniques de modulation de phase lente, telle que celle utilisant les cristaux liquides, peuvent être utilisées et combinées à des systèmes d'imagerie permettant alors un multiplexage à faible coût. Il est à noter que l'utilisation de cette technologie peut engendrer une baisse des performances en ce qui trait à la limite de détection.

7.1.2.2 Comparaison et détermination de la plateforme pour le dépistage de la leucémie

Lorsque nous comparons les systèmes présentés plus haut, nous pouvons observer que le système de mesure de polarisation propose la meilleure limite de détection, ainsi que la meilleure capacité à multiplexer les mesures. Elle présente une limite de détection en indice de $LoD=5*10^{-7}$ RIU et de $C=5\text{ nM}$ en concentration, valeurs similaires à celles mises en jeu pour la détection de la leucémie. De plus, le système proposé permet d'avoir un capteur proposant deux sites de détection (contrainte de cellule de mesure), mais peut être facilement amélioré à une dizaine de senseurs en utilisant une plateforme microfluidique.

D'un point de vue de l'étendue dynamique, les systèmes de mesure de phase (et polarisation) sur échantillon nanoplasmonique ainsi que celui pour la réflexion totale interne présentent de meilleures alternatives. Cependant, l'étendue du SPR en polarisation peut être améliorée en prenant une fenêtre spectrale plus grande et donc le rend tout aussi intéressant que les deux autres plateformes. De plus, la gamme dynamique originale est très proche par celle proposée par le modèle mathématique, ce qui permet de choisir la SPR en polarisation.

7.2 Article 3 : Leukemic marker detection using a spectro-polarimetric surface plasmon resonance platform

7.2.1 Auteurs et affiliations

Les auteurs sont Mathieu Maisonneuve, Chiara Valsecchi, le Pr Chen Wang, le Pr Alexandre Brolo et le Pr Michel Meunier. La contribution de Mathieu Maisonneuve a été la construction du système optique ainsi que son amélioration, les différents tests de caractérisations et validations réalisés, la participation au développement de la chimie de surface, la réalisation des tests biologiques ainsi que l'écriture de l'article. Chiara Valsecchi a contribué à l'article en proposant la chimie de surface énoncé dans l'article ainsi qu'en aidant à la réalisation des premières expérimentations de détection. Le Pr Chen Wang a collaboré en fournissant les échantillons sur lesquels les tests ont été réalisés. Le Pr Alexandre Brolo et le Pr Michel Meunier ont participé à la rédaction de l'article. Mathieu Maisonneuve et Pr. Michel Meunier sont affiliés au laboratoire plasmonique et procédés laser du département de Génie Physique de l'École Polytechnique de Montréal, le Pr Chen Wang est affilié au département de Médecine et de Pathobiologie de

l'université de Toronto basé à l'hôpital du Mont Sinai et Chiara valsecchi et le Pr Alexandre Brolo sont affiliés au département de Chimie de l'Université de Victoria.

7.2.2 Abstract

In this paper, we present a proof of concept screening for monoclonal immunoglobulin as a leukemia tumor marker using a surface plasmon resonance (SPR) bio-sensing platform. This screening method is based on measurements of immunoglobulin levels in human serum and the determination of the relative concentrations of kappa and lambda light chains. The kappa/lambda ratio is used to determine the presence of monoclonal immunoglobulin. Tests have been performed using standard solutions of immunoglobulins and serum samples from patients with known leukemic diagnoses. This platform has a resolution of 5×10^{-7} refractive index unit (RIU) per channel, which is up to 10 times better than other SPR imaging systems for multi-sensing applications. The results obtained with this technique are in agreement with those acquired using conventional methods for immunoglobulin detection, indicating that our polarimetric SPR platform should be suitable for a cheap and efficient tool for early leukemia biomarker screening and monitoring applications.

7.2.3 Introduction

Leukemic proliferation of B-cell tumors, including plasma cell neoplasms, Waldenström's disease, chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphomas, is often associated with monoclonal immunoglobulin. In Canada, about 5800 people are diagnosed and 2600 will die yearly of leukemic malignancies [181]. According to the American cancer society [55], there is no standard screening technique for early detection of leukemia which is generally diagnosed by morphological and phenotypic examinations when clinical symptoms appear. In addition, techniques currently used for leukemia diagnosis, such as blood cell morphology, flow cytometry or bone marrow biopsy, are not suitable for screening as they are expensive, need a long analysis time and require highly qualified professionals.

In the last two decades, important studies have been performed on serum components, such as immunoglobulin [68] and their light chain [69, 182, 183], in a range of plasma cell and B-cell neoplastic disorders in order to discover new biomarkers for leukemia diagnosis. In the specific case of CLL, a large proportion of articles in the literature suggests that a comparative analysis of

the amounts of kappa and lambda light chains should provide a strong indication of the presence of the disease [70, 179, 183].

Immunoglobulin classes and the different light chains, such as IgG κ , IgG λ , IgM κ and IgM λ can be identified by specific antibodies. A skewed $\kappa - \lambda$ ratio may be found in patients with asymptomatic monoclonal immunoglobulin. By using serum protein electrophoresis method, a $\kappa - \lambda$ ratio interval between 0.6 and 4.2 may predict significant monoclonal components in patients with clinical disease [184]. More recently, free light chains in serum are used as a sensitive biomarker in screening, monitoring and risk stratifying of patients with myeloma, CLL and B-cell lymphomas. Abnormal free light chain ratio has been shown as a prognostic factor for reduced survival of patients with CLL. The patients with an abnormal light chain ratio are more likely to have genetic changes associated with aggressive disease progression and require early treatment [185].

The aim of this study is to propose and validate a cost effective method for real-time determination of relative concentrations of different types of immunoglobulins in human serum for leukemia screening. Concentrations of these markers were monitored using surface-plasmon resonance (SPR) bio-sensing. SPR has become one of the dominant technologies for bio-detection, as it enables real-time and label-free detection of biological species without requiring a large amount of samples (low volume of analyte [148]). A SPR-based method also provides good sensitivity and low limit of detection [81].

The reported SPR biosensor was able to selectively detect light chain immunoglobulin from both test solutions and samples of human sera obtained from leukemia patients. To assure specific adsorption of the analytes, an existing technique of antibody immobilization has been transferred to gold surface [11, 186].

Finally, this SPR-based biosensing platform should provide a cheap and efficient tool for early leukemia screening. This technology should also be useful for monitoring the progression of leukemia patients during therapy.

7.2.4 Principle and instrumentation

7.2.4.1 Principle

The principle of leukemic marker detection is summarized in Figure 7-1. Mature B-cell leukemia, lymphoma, myeloma and other plasma cell disorders are clonal proliferation of immunoglobulin-producing cells. Monoclonal overexpression results in a dominant type of immunoglobulin that are composed of a specific heavy chain for IgG or IgM (rare occasions IgA, IgD or IgE) and restricted to either κ or λ light chain, as illustrated in Figure 7-1. Therefore, the presence of monoclonal immunoglobulin can be detected by a skewed concentration ratio (relative to their usual distribution in the blood of healthy individuals) between the kappa and lambda light chains [187].

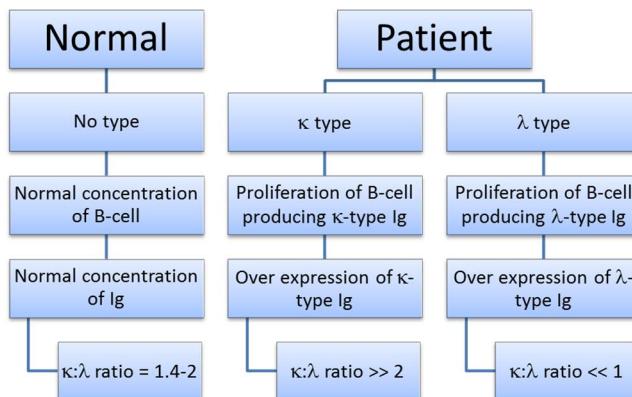


Figure 7-1: Chart illustration of a normal (healthy) person and leukemic patients presenting over expression of either κ or λ light chains.

This measurement of the $\kappa - \lambda$ light chain ratio in human serum may then be used for leukemia screening, as well as a monitoring tool for the disease response during treatment. The $\kappa - \lambda$ light chain ratio for non-leukemic patients has been determined to fall in a range from 1.4 to 2, whereas ratio for the leukemic patients is greater than 2 for κ overexpressed light chain and much lower than 1 for λ [69].

7.2.4.2 Instrumentation

A biosensor suitable for leukemia screening needs to fulfill several requirements. First, a wide dynamic range is necessary since the light chain concentrations in serum vary extensively from a

patient to another. It ranges from 0.1 to 1 mg/mL, according to data acquired with conventional techniques (turbidimetry assays and serum protein electrophoresis) on samples used in this paper. Taking into account molecular size, surface chemistry, volume and surface concentration, the system is required to operate with a resolution of about 10^{-6} refractive index unit (RIU), and a dynamic range greater than 10^{-3} RIU. In order to get reliable and comparable data, biomarkers analysis must be performed with the exact same experimental condition. To answer this need, the system has to include a multi-sensing scheme to simultaneously measure the $\kappa - \lambda$ light chain ratio in a sample of human blood. Polarimetric method using spectral polarization reading has been chosen as it provides good resolution and wide dynamic range. Figure 7-2a shows a schematic of the apparatus. It is based on the measurement of p-polarized reflected light, affected by the SPR coupling [83], referenced to s-polarized light, which is not affected by SPR, as seen in the experimental curve on Figure 7-2 inset. The ratio of these polarizations gives the tangent value of the polarization vector [71]. The spectral position of the resonance, defined by the minimum of the measured reflectivity curve (see Figure 7-2 inset), is tracked with a polynomial interpolation and roots calculation.

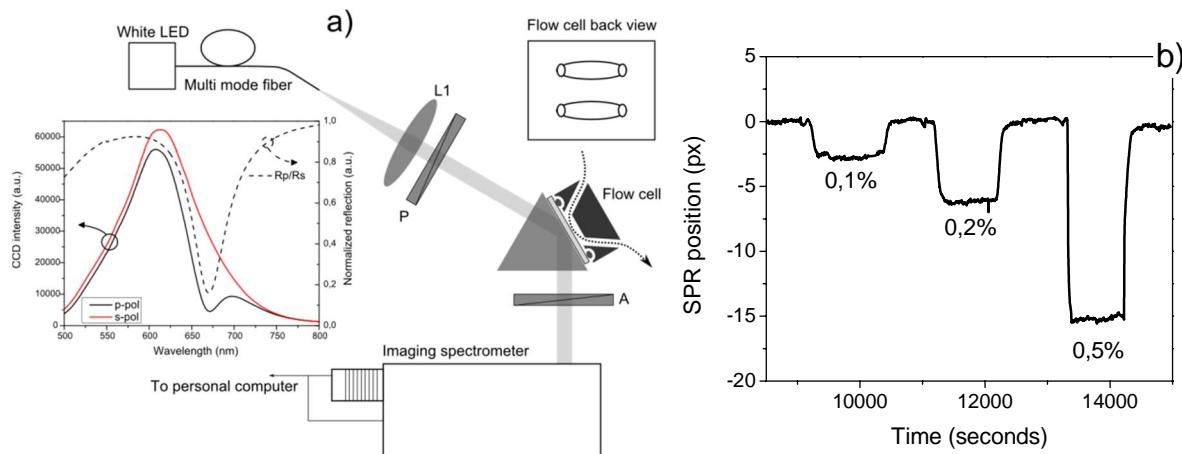


Figure 7-2: a- Optical setup used in the experiments; inset: spectral curve acquired on p-polarization (black continuous), s-polarization (red continuous) and the ratio between the p and the s polarizations (black dashed); b- Characterization test using sequentially a 0.1, 0.2 and 0.5% Vol. ethanol solution

The details of the optical setup for the SPR system used in these experiments are presented in Figure 7-2a. A white-light beam incoming from a LED (Thorlabs warm white 450-750nm - MWWHL3) was focused in a multimode fiber (Thorlabs MM core 105 μ m – M15L01). Light, at

the output of the fiber, was then brought to an achromatic lens (L1) and the beam was collimated before passing through a plate polarizer. This parallel beam was directed to the sensing block, which consists of a microscope plate covered with a 50nm gold layer in contact with the tested solution on one side (two channels – the flow cell back view is also presented in Figure 7-2a) and with oil immerse BK7 prism on the other side for coupling condition. Reflected light passed through an analyzer before going to the spectro-imaging system. A CCD camera (Andor Newton 971) acquired the light dispersed from the monochromator and the generated image was then processed to get useful spectral information from the two channels.

Finally, characterization tests have been realized on the system to determine its performance. The resolution was determined by using different solutions of ethanol in water with concentrations of 0.1, 0.2 and 0.5% Vol. as shown on Figure 7-2b. Using the refractive index changes of the ethanol solutions [188] and the measured signal-to-noise ratio, the setup resolution was calculated to be 5×10^{-7} RIU, which is better than the needed resolution for leukemia screening. In terms of dynamic range, the spectral window offered by the instrument is about 44 nm which is equivalent to a change of 1.5×10^{-3} RIU and thus respecting the needed specifications.

7.2.5 Materials and methods

7.2.5.1 Materials and samples

All the tests have been performed in 10mM Phosphate Buffer Saline (pH 7.4 PBS 10x, Sigma Aldrich P5493 diluted 10 times in 18MΩ.cm deionized water). Lyophilized recombinant Protein G (Sigma-Aldrich P4689) from E. coli (MW~20kDa) was used in all the experiments as well as Bovine Serum Albumin (BSA) from Sigma-Aldrich (A7906). Goat polyclonal anti-human kappa (Sigma-Aldrich K3502) and goat polyclonal anti-human lambda (Sigma-Aldrich L1645) were used respectively to bind to kappa and lambda light chains.

Patient serum samples were collected at the Mount-Sinaï Hospital, Toronto. The 4 serum samples in this study included a normal control and 3 samples from patients presenting an over-expression of a monoclonal type of immunoglobulin (G-kappa, M-lambda and G-lambda respectively). Total concentrations of immunoglobulin, shown in Table 7-2, have been obtained from independent turbidimetric assays. Monoclonal concentrations were determined by serum protein electrophoresis [189].

The 4 tested serum samples were then diluted to get similar effective concentrations where resulting concentrations are shown in Table 7-2. Total concentration of immunoglobulin in blood serum was defined by the addition of polyclonal (normal part of Ig) and monoclonal (overexpressed Ig related to B-cell disorder) concentrations. An estimation of the range of kappa and lambda concentrations in human sera was extracted and their ratios are presented in Table 1. This estimation was related to the fact that the $\kappa - \lambda$ ratio in the polyclonal part ranged from 1.4 to 2 and led to errors shown in Table 7-2.

Tableau 7-2 : Monoclonal and polyclonal immunoglobulins in serum samples of normal control and patients

Patients	Monoclonal concentration	Polyclonal concentration	Estimated ratio	Estimated error
Control	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.7	0.03
G-kappa	120 $\mu\text{g}/\text{ml}$	70 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6.238	0.42
M-lambda	120 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.164	0.013
G-lambda	120 $\mu\text{g}/\text{ml}$	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.641	0.004

7.2.5.2 Surface chemistry

Our method for leukemia screening is based on SPR. The selectivity of an SPR experiment is provided by the proper surface chemistry. The immobilization of species on the gold surface that specifically captures the biological molecules of interest from the solution side is then an important aspect of the sensor development. Antibodies specific to human kappa or lambda light chains were immobilized to the gold surface by direct attachment to a protein G layer. Protein G specifically binds to the crystallizable fragment (Fc) of an antibody, which allows the fragment antigen-binding site (Fab) to be available for binding [190]. This surface modification method presents some advantages over other techniques, such as the NHS/EDC chemistry. In that case, antibodies are randomly attached on the surface, which could possibly block their active binding sites. Moreover, the antibodies used in our experiments were from goat, and protein G is more

suitable than other similar proteins (like protein A) because it has a better affinity for this species [191, 192]. Also, according to Johnson et al. [186], protein G has other advantages, one of which is its pH-dependent orientation which will maximize the binding capacity of antibodies at pH 7.2 because it makes the active region (Fab) available to the tested solution. Another advantage of the protein G is its good affinity to gold surfaces [11, 186], due to a chemisorption binding mechanism which occurs at room temperature involving Au - N interactions [186].

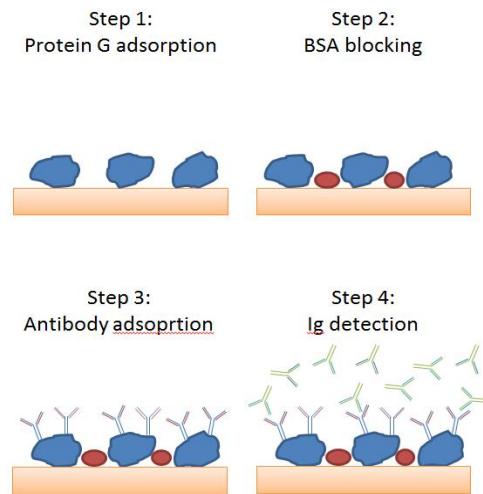


Figure 7-3: Schematic illustration of the experimental protocol

7.2.5.3 Experimental protocol

First, microscope glass slides were cleaned by using successively acetone and isopropanol (IPA) bath and were dried with N₂. Glass slides were then immersed in a PIRANHA (H₂SO₄:H₂O₂) solution for 15 minutes to remove all remaining organic compounds, followed by rinsing with water and drying with N₂. Afterwards, a chromium adhesion layer (2nm) and a gold layer (50nm) were evaporated onto the glass substrate using an electron beam (e-beam) evaporator. The layer thicknesses were verified by using a quartz micro balance and an ellipsometer. Deposition of a photoresist was done before dicing the microscope glass slide into square samples of 1.25x1.25 cm² to protect against the deposition of dust and organic particles on the gold surface. The photoresist was then removed by successive baths of acetone, IPA and water for 10 minutes in a sonicator. Samples were then washed by using oxygen plasma for 5 minutes (50 sccm O₂) to remove remaining photoresist, dust and organic particles.

SPR chips were then placed onto a fluidic cell (made in Plexiglas) with two channels and liquid were brought using a peristaltic pump with a flow rate per channel of $5\mu\text{L}/\text{min}$. The surface functionalization was then performed to make the gold surface specific to human kappa or lambda light chain, as schematically illustrated in Figure 7-3. Initially, the gold surface was exposed to PBS with a flow rate of $5\mu\text{L}/\text{min}$ for 20 minutes. Then a solution of protein G in PBS ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) was introduced in the fluidic cell for 20 minutes at the same flow rate (step 1 in Figure 7-3). As it was mentioned previously, there is no need to use an adhesion layer since protein G spontaneously chemisorbs to the gold surface through their amine groups. Following a 10 minutes rinsing step, a solution of BSA ($1\text{mg}/\text{mL}$) was then flown into the fluidic cell to fill empty sites on the surface and avoid non-specific adsorption (step 2 in Figure 7-3). Kinetics of these two steps could be observed in Figure 7-4a.

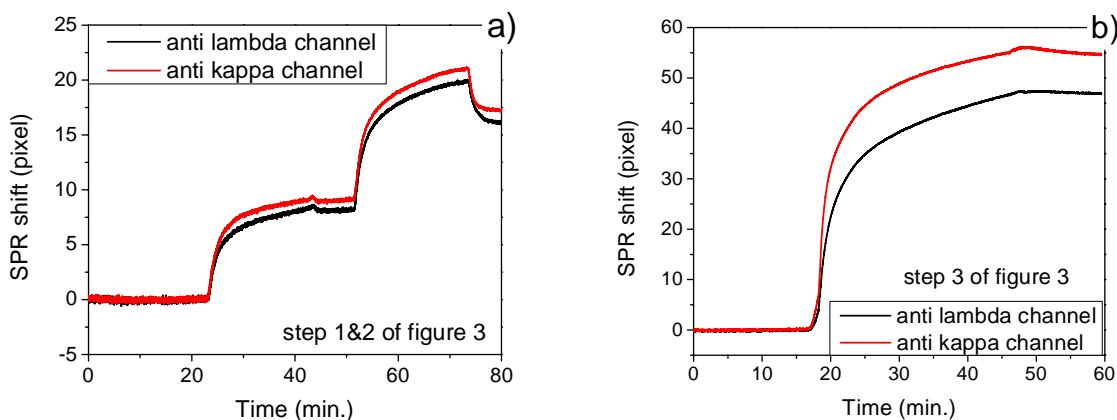


Figure 7-4: Surface functionalization steps. a- Adsorption of protein G and BSA respectively steps 1 and 2 of Figure 7-3, b- Antibodies adsorption on protein G (step 3 on figure 7-3).

Then, as shown on Figure 7-4b, a new baseline was performed for 20 minutes before passing a solution of anti-human kappa and lambda respectively on two separated channels for 5 minutes. The pump was then stopped, leaving the surface in contact with the antibody solution for 35 minutes. PBS was flown again to rinse the antibody solution from the surface (step3 Figure 7-3).

Finally, a solution of human serum or pure immunoglobulin in PBS was injected in the two flowing channels to measure the relative concentration between kappa and lambda light chain (step 4 in Figure 3). In order to prevent incorrect data processing, the sensorgrams were scaled

respectively to the amount of surface receptors for both channels (SPR shift for anti- κ and anti- λ adsorption on protein G in Figure 4b).

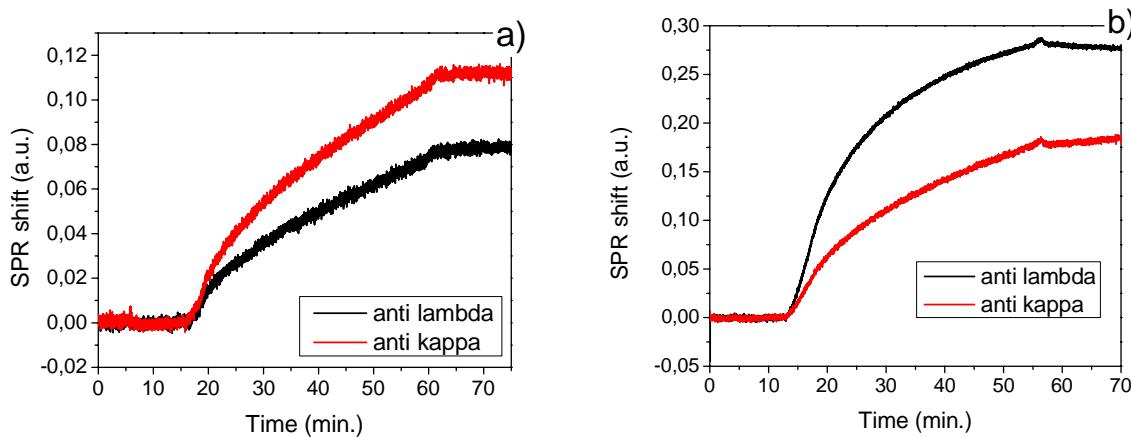


Figure 7-5: a- SPR kinetics data of control sample (normal case) of human serum in contact to both anti-kappa- and anti-lambda-modified surfaces; b- Same experiments with the G- λ human serum sample (leukemia patient, see Table 7-2).

The sensograms shown in Figure 7-5 are examples of typical results obtained with human serum samples. The black lines in Figure 7-5 represent adsorption on surfaces that are specific to lambda light chain and the red lines represent the adsorption on surfaces specific to kappa light chain. The $\kappa - \lambda$ ratio obtained in Figure 7-5a by SPR dynamic experiments with the control sample was equal to 1.45 (compared to a ratio of 1.7, quoted in Table 7-2, obtained with conventional analytical methods for the determination of immunoglobulin). Figure 7-5b shows results obtained with the G- λ sample (information about these samples is given in Table 7-2), where the $\kappa - \lambda$ ratio evaluated by SPR was close to 0.65 (compared to 0.641 in Table 7-2).

7.2.6 Results

7.2.6.1 Surface validation

Surface validation tests were primarily done to verify the anti-kappa and anti-lambda surface binding capacity and specificity. Binding capacity was quantified by looking at the SPR response with pure κ and λ light chain immunoglobulin solutions in PBS, with concentrations ranging from 100 ng/ml to 100 μ g/ml. Results of this test revealed that a linear SPR response was achieved for concentrations varying from 1 μ g/ml to 10 μ g/ml. This narrow range of

concentration can be explained by the surface chemistry, which limits the amount of bound light chains immunoglobulin (surface saturation). The surface specificity was then tested. 2.4 µg/ml solutions (in the linear range of the SPR response) of pure kappa or lambda light chain immunoglobulins (in PBS) were alternatively injected on both anti-kappa and anti-lambda channels of the SPR system to simultaneously measure specific and non-specific responses. For each solution, the tests were performed 3 times to get reliable data. The results are presented in Figure 7-6a. In order to make the data set from the two channels comparable, the specific adsorptions were set to 1 and, as shown in Figure 7-6a, the functionalized surfaces provide rather good specificity, with a specific signal up to 3 times greater than the non-specific signal. The non-specific adsorption could be explained by two different mechanisms: the physisorption of immunoglobulin on empty sites of the gold surface and/or the direct adsorption of immunoglobulin on free protein G sites (without anti-lambda or anti-kappa antibodies). In any case, non-specific adsorption is a common limitation in biosensors. Although our surface chemistry did not eliminate this problem, we were able to keep it to a relative low level.

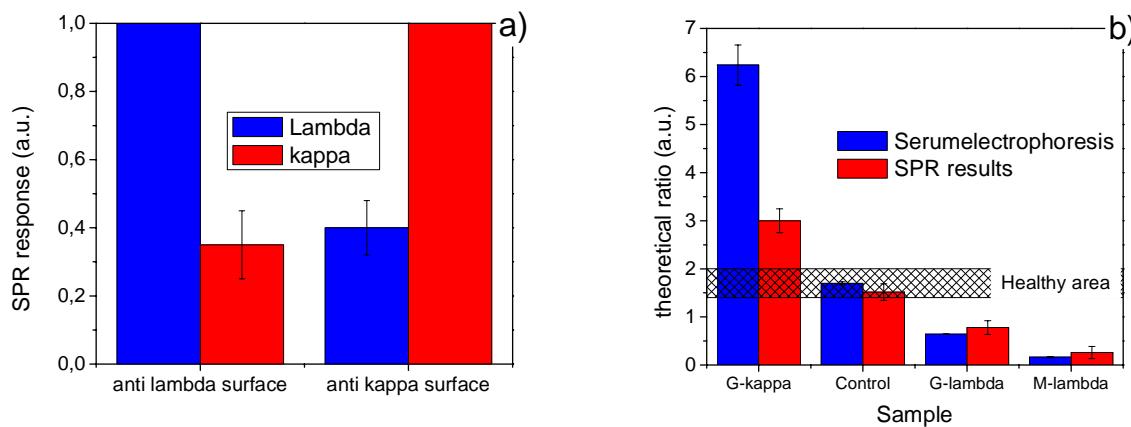


Figure 7-6: a- Surface validation results with tested standard κ and λ light chain immunoglobulin on respectively anti- κ and anti- λ surfaces; b- $\kappa - \lambda$ ratios – in blue: ratios obtained by standard analytical method for the determination of immunoglobulin (used in hospital); - in red: $\kappa - \lambda$ ratios obtained with the proposed SPR method.

7.2.6.2 Screening test with complex media

Finally, tests using real human sera have been performed to validate the reliability of the proposed screening method. Samples used for the experiments are the ones described in the

materials and samples section (Table 7-2), but diluted 100 times to reach the linear range of the SPR instrument. Examples of dynamic data are shown in Figure 7-5, where the tested samples are the control (ratio estimated at 1.7) in Figure 7-5a and the G- λ sample (ratio ~ 0.65) in Figure 7-5b. Tests on each human sera sample have been done three times to validate the obtained data and to make statistical significant measurements of the ratios.

The results obtained are presented in Table 7-3 and illustrated in Figure 7-6b. It could be noted that the ratios measured by SPR follow a similar trend than the ones obtained with a standard analytical technique for immunoglobulin determination. Moreover, error bars for the measured ratios show that there was a low dispersion of the data, which indicates that the proposed technique is quite reliable for the ratio measurements. An under-estimated ratio for the M-lambda and G-kappa patients could be observed in Figure 7-6b. This is explained by either the fact that these samples had the highest concentration of immunoglobulin leading to surface saturation and, as it was noticed in the surface validation part, by non-specific adsorption limiting the linear range of the sensor. Nevertheless, even if a perfect quantitative match was not yet achieved, these results showed that SPR was able to identify leukemic patients.

Tableau 7-3 : Comparison between estimated and measured ratio

Patients	Electrophoresis measurement	error	SPR measurement	error
Control	1.7	0.03	1.517	0.172
G-kappa	6.238	0.42	3.03	0.247
M-lambda	0.164	0.013	0.26	0.127
G-lambda	0.641	0.004	0.778	0.144

7.2.7 Discussions

As it could be observed on both figure 6 and table 2, the SPR system offered good accuracy while still suffered from non-specific binding (up to 40% of the signal in Figure 6a). This issue led to either an overestimation of the measured ratio (for those less than 1) or to an

underestimation (for those greater than 2). However, since the threshold for diagnostic is defined by a ratio, these errors have not altered the results significantly. In that sense, the SPR platform in its current form could already be used as a front line screening method.

The sources of this non-specificity arises mainly from the adsorption of different kinds of protein in the serum on the gold surface, and as well from non-specific binding of Ig onto the surface by either binding directly on gold or on protein G which did not catch anti-kappa/lambda antibodies.

Investigations are underway to improve those measurements by working on both surface chemistry and measurements strategy, which would consist in simultaneous measurement of the raw ratio and non-specific adsorption in order to correct in real time the measured ratio.

7.2.8 Conclusion

In this paper, we have presented a proof-of-concept monoclonal immunoglobulin screening method using the relative concentration ratios between kappa and lambda light chains. The proposed optical setup coupled with proper surface chemistry has shown that measured ratios correspond to the ones measured with a conventional technique used in diagnostic laboratories. Although further improvement in the surface chemistry could provide a better measurement of ratios (mainly the ones with very high over expression), the results presented here clearly demonstrated the potential of polarimetric SPR as a relative low cost tool for fast disease diagnostic.

7.2.9 Acknowledgements

The authors acknowledge the financial contribution from the NSERC Strategic Network for Bioplasmonic Systems (Biopsys) and NanoQuébec. They also acknowledge the fruitful discussion with Dr. Sergiy Patskovsky and the team members of Pr. Meunier group (André-Pierre Blanchard-Dionne, Anne-Marie Dallaire and Laurent Doré-Mathieu).

7.3 Commentaires et remarques sur l'étude de cas

Comme nous avons pu le voir dans la section précédente, les résultats obtenus lors de la complétion de l'étude de cas a montré la possibilité d'utiliser de telles plateformes optiques pour la détection d'objets biologiques dans les milieux complexes; mais aussi la possibilité d'utiliser

de telles plateformes dans un contexte médical. Les commentaires et remarques qui suivent sont ceux envoyés aux correcteurs du papier ainsi que de la thèse.

En effet, ces commentaires et remarques sont là pour améliorer la compréhension et de montrer l'utilité d'une telle plateforme. Lors de l'étude de cas, nous avons comparé nos résultats obtenus par SPR avec ceux obtenus par des méthodes cliniques utilisant l'électrophorèse. Cette dernière est utilisée depuis plusieurs années dans un contexte clinique et présente plusieurs avantages (précision, spectre total des espèces présentes dans le sérum) mais aussi des inconvénients (longue, complexe à opérer, un seul patient à la fois). Notre proposition de la plateforme optique est de pallier à un manque de technique de dépistage et de suivi des patients qui permettrait de réduire les coûts opérationnel, d'avoir une réponse plus rapide comparée à l'électrophorèse et de pouvoir regarder la condition de plusieurs patients simultanément. Elle présente toutefois plusieurs inconvénients, comme une moins bonne précision ainsi qu'une chimie de surface à améliorer et développer. Nous ne proposons pas une technique pour remplacer l'électrophorèse, mais plutôt une technique qui permettrait d'utiliser seulement l'électrophorèse pour le diagnostic clinique, là où la précision et la fiabilité des résultats sont critiques.

Il a pu aussi être observé que la chimie de surface pouvait être améliorée. En effet, avec une spécificité de 3:1, cette dernière est à peine nécessaire pour obtenir des résultats qui sont cependant correct et donnent les bonnes conclusions. Plusieurs pistes peuvent être proposées : la première consisterait en un nettoyage différent des surfaces d'or ainsi qu'une préfonctionnalisation de ces dernières afin de faciliter l'accroche de protéines G sur la surface. En effet, comme il a été possible de l'observer dans l'article l'accroche de cette protéine est du même ordre que celle de la BSA alors que cette dernière devrait être très faible. Une meilleure stratégie pour prévenir les accroches non spécifiques doit être aussi pensée, en utilisant, par exemple, de plus petites molécules que celle de la BSA. Enfin, afin de bloquer les protéines G qui n'aurait pas accroché un anticorps spécifique aux chaînes courtes λ ou κ , il pourrait être appliqué une solution de fragment constant (avec des concentrations très élevées) afin de bloquer toute accroche non spécifique de la part des protéines G.

Enfin, il a pu être observé quelques différences de lecture entre les deux canaux. Ces derniers ont par la suite été mis à l'échelle en tenant compte de la concentration d'anticorps spécifiques aux chaînes courtes κ et λ (principalement en prenant la déviation totale spectrale ou en pixel induite

par l'accroche de ces anticorps). La raison de ces différences est principalement liée à la chimie de surface où il est difficile d'avoir exactement les mêmes concentrations de molécules sur la surface d'or. Plusieurs tests ont été effectués afin de montrer que ces différences ne provenaient pas de l'instrumentation (senseurs, imageurs, vitesse des fluides). Pour cela, des analyses de changement d'indice ainsi que de déposition de couche mince sur les deux canaux de façon similaire et simultanée ont été réalisées et ces deux derniers ont toujours présenté des réponses très similaires (différence inférieure à 10 %) comme il est présenté dans la Figure 7-7.

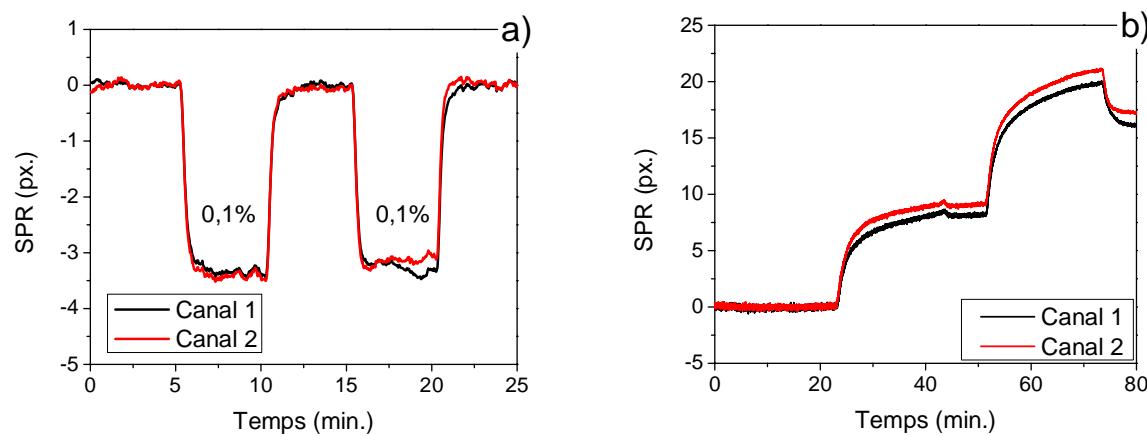


Figure 7-7 : a – Comparaison des réponses entre le canal 1 et le canal 2 pour un même changement d'indice de réfraction (eau à solution de $C=0.1\% \text{ Vol.}$ d'éthanol) ; b – Comparaison entre les deux canaux pour une adsorption de couche mince (étapes 1 et 2 décrites dans l'article portant sur la détection de la leucémie).

CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

Forces et défis des plateformes étudiées

Le sujet de ce doctorat est de proposer une série de biocapteurs optiques comme alternative pour l'analyse de fluides complexes. Les résultats présentés dans les chapitres précédents démontrent la possibilité et la viabilité d'utiliser ces plateformes optiques dans les applications proposées. Ceci a été confirmé par l'étude de cas présentée : la détection de la leucémie, où les résultats obtenus sont très proches de ceux obtenus par des méthodes conventionnelles utilisées dans les hôpitaux et dans les études cliniques.

8.1 Méthodologie du doctorat

Plusieurs étapes de travail et de réflexion ont été nécessaires afin d'arriver à un instrument capable de détecter la leucémie. En effet, cette thèse s'est articulée sous une série de 3 objectifs précis relevant les défis reliés à cette détection.

Étape #1 : La détermination d'une ou de transductions optiques présentant les sensibilités nécessaires à la détection de la leucémie, ainsi qu'une asymétrie dans leur réponse entre deux polarisations orthogonales (permettant l'utilisation de la polarimétrie). Cette étape a été accomplie en réalisant une recherche dans la littérature des transductions optiques pour la biodétection ainsi qu'une analyse comparative de ces dernières.

Les transductions qui ont émergé de cette étude sont la réflexion totale interne, la résonance plasmonique de surface ainsi que la nanoplasmonique. Toutes trois avaient déjà été utilisées dans le cadre d'une détection de biomarqueurs et présentaient de très bonnes sensibilités.

Étape #2 : L'étude des performances des transductions choisies dans une prospection polarimétrique. Cette étape, retranscrite dans les chapitres 4, 5 et 6, a consisté à réaliser plusieurs systèmes optiques utilisant les transductions choisies. Chaque système optique appliqué avait pour but d'exploiter au maximum les capacités de ces phénomènes.

Pour cela, un système de mesure combiné de la phase et de la polarisation a été proposé pour la réflexion totale interne. Il permettait de séparer l'information de la position de l'angle critique – relié à l'indice du milieu – de celle de la phase – indiquant la déposition

d'une couche mince sur le prisme. Ce type de système peut très utile dans les fluides complexes inhomogène (pouvant présenter de fortes variations d'indices dans le milieu testé) et des voies d'amélioration ont été proposées pour améliorer les spécifications de cette plateforme.

C'est dans cette même optique que des systèmes d'analyse de phase et de polarisation ont été appliqués aux phénomènes plasmoniques – le but étant d'obtenir la meilleure limite de détection en matière d'indice de réfraction. Lors de ces tests, il a pu être noté que ces systèmes pouvaient proposer des limites de détection aussi basses que $LoD=5*10^{-7}$ RIU, très proche de ce qui se fait de meilleur dans la littérature [125]. De plus, les systèmes nanoplasmoniques ont montré la possibilité de les utiliser dans un cadre d'analyse nécessitant un fort multiplexage grâce à leurs configurations géométriques, c'est-à-dire une mesure en transmission. Cependant, cette configuration leur interdit l'analyse de milieux turbides (optiquement opaque).

Finalement, une discussion sur les applications possibles de chaque instrument développé est proposée à la fin de chaque section instrumentale. Cette dernière fait un bilan des performances proposées par chacune des plateformes et détermine des applications tirant profit de ces spécifications.

Étape #3 : Études de cas. Cette dernière, décrite dans le chapitre 7, est l'illustration de ce travail de doctorat à un cas réel d'étude de fluide complexe – le sérum humain – dans un cadre d'une application biomédicale.

Dans un premier temps, une confrontation des performances mesurées des systèmes est réalisée. Cette comparaison s'est faite sur une base de trois paramètres : la limite de détection, la gamme dynamique et la capacité à multiplexer. Ces trois aspects sont importants pour l'application de la détection de biomarqueurs pour l'identification de la leucémie. Ces performances ont été aussi confrontées à une modélisation théorique de la détection de la leucémie – provenant principalement d'une analyse de la littérature pour la sensibilité et le multiplexage et d'un modèle mathématique pour la gamme dynamique.

Dans un second temps, l'utilisation de la plateforme choisie, dans ce cas le spectro-imageur polarimétrique combiné à la SPR, est réalisée pour la détection de la leucémie. Pour cela, des expérimentations utilisant des solutions purifiées et monoclonales

d'immunoglobuline ont été réalisées pour vérifier la méthodologie et déterminer les spécifications de la chimie de surface employée. En effet, ces tests ont permis de mesurer la spécificité de la fonctionnalisation de surface (ratio entre l'adsorption spécifique et non spécifique, environ égale à 3 dans notre cas) ainsi que la gamme en concentration nous donnant une réponse linéaire du signal (dans l'étude présentée, elle est de $C=1 \mu\text{g}/\text{ml}$ à $10\mu\text{g}/\text{ml}$).

Finalement, des expériences avec des échantillons de sérum humain, un contrôle et trois spécimens avec des surexpressions d'un type particulier d'immunoglobuline ont été faites. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux acquis par des méthodes conventionnelles, utilisées dans les milieux cliniques (dans ce cas, électrophorèse du sérum), et montrent des ratios avec des tendances similaires pour tous les échantillons (la moyenne des différences entre les résultats obtenus et ceux mesurés en milieu clinique est supérieure à 80 %).

La conclusion de ces trois étapes est la réalisation de plusieurs plateformes couvrant un large spectre d'application où les fluides à analyser sont considérés comme complexes, ainsi qu'une illustration par un cas réel : un test de détection de la leucémie en conditions réelles (analyse du sérum humain). Cette dernière étape permet de faire la promotion de l'utilité des biocapteurs optiques pour des applications médicales, telles que le diagnostic de la leucémie. Cependant, comme toute méthode, cette dernière a des points forts et des points faibles.

Dans la suite de ce chapitre, une critique constructive liée aux plateformes développées sera proposée. Pour cela, l'auteur décrira son opinion sur ce qu'il pense être les points forts des plateformes ainsi que les défis à relever tant d'un point de vue instrumental que pour les applications.

Finalement, une attention particulière sera portée sur l'étude de cas en présentant les défis à intégrer ces technologies dans le milieu médical, mais aussi des pistes pour une possible commercialisation de ce type de plateforme. Ce jugement sera accompagné par une revue de littérature pour illustrer les différents points discutés.

8.2 Forces et défis de ce projet de doctorat

8.2.1 Bilan des systèmes développés

La principale force de ce projet de doctorat est le développement des différents systèmes qui permet de couvrir un très grand spectre d'applications liées à l'analyse de fluides complexes. En effet, ces plateformes apportent des solutions à un ou plusieurs défis liés à l'utilisation de tels liquides.

Les forces de ces systèmes sont principalement instrumentales. Ils présentent des spécifications qui sont très proches de ce qui se fait de meilleur dans la littérature, voire même dans quelques cas les surpassent [125], comme pour la mesure de polarisation avec un suivi de la position de la résonance. Cependant, la mesure de ces résolutions peut toujours être le sujet de débat, car elles reposent sur des valeurs de changement d'indice prises avec des systèmes dont la précision est moindre que ceux présentés dans cette thèse. Par contre, selon l'opinion de l'auteur, ces valeurs restent néanmoins valables car elles reposent sur des données vérifiées dans la littérature (différentes tables reconnues dans ce domaine [79, 177, 178, 188]). En effet, dans le cas d'incrément plus petit que ceux proposés par ces tables, les valeurs sont extrapolées en tenant compte de la tendance de la courbe des valeurs (par exemple l'indice de réfraction n en fonction de la concentration).

La plateforme proposée pour la réflexion totale interne, malgré une faible limite de détection comparée à d'autres instruments développés utilisant la TIR [29, 30, 113], est originale de par le fait qu'elle propose une séparation de l'information de l'adsorption de couches minces à celle d'un changement d'indice. De plus, sa gamme dynamique est très grande sur ces deux paramètres. Ce point est très important dans le cadre d'analyse de fluide extrêmement complexe sujette à de très fortes variations d'indice. Le défi à relever pour cette plateforme serait une amélioration de sa limite de détection dont quelques pistes ont été proposées dans le chapitre 4.

Dans le cas de la SPR à sensibilité de phase, cette dernière présente une très bonne limite de détection – mais offre une gamme dynamique limitée. De plus, il existe toujours des systèmes ayant de meilleures limites de détection. Ces derniers utilisent généralement des instrumentation beaucoup plus complexes et dont souvent la capacité à multiplexer serait difficile à mettre en œuvre. Pour cela, on retrouve les systèmes d'analyse de phase, basés sur une analyse

interférométrique [22, 142, 144, 193, 194] ou polarimétrique [23, 143, 169] de la SPR, et qui fournissent des limites de détection aussi basse que $LoD=10^{-8} RIU$.

Dans le cas de l’interférométrie, le multiplexage pourrait être réalisé si les détecteurs étaient remplacés par des systèmes d’imagerie tels que des caméras CCD ou CMOS ou encore des lignes de photodiodes. Cependant, une baisse de la qualité du signal serait certainement observée, car ces mesures de phase se font de manière synchrone avec une modulation de l’une des branches de l’interféromètre.

Pour la mesure polarimétrique, comme ces dernières utilisent des modulations rapides (de l’ordre de la dizaine de kHz) de l’état de polarisation [126, 143, 169], il est très peu concevable d’imaginer un système d’imagerie comme détecteur, dû à leur lenteur dans la mesure. Des solutions utilisant des modulations plus lentes de la polarisation (système de déphasage par cristaux liquides) ont été proposées [195], mais ces dernières proposent des limites de détection autour des $LoD=10^{-7} RIU$. Ce type de système pourrait être appliqué à l’imagerie de phase, mais elle présenterait de plus basses résolutions, car elles perdent l’avantage d’utiliser la détection synchrone.

La plateforme utilisant une mesure en polarisation apporte plusieurs points intéressants. Elle présente une étendue dynamique très grande, ainsi qu’une excellente capacité à multiplexer des mesures. Le système présenté propose une capacité de multiplexage intéressante qui peut aller jusqu’à plusieurs dizaines de sites de détections en même temps. En effet, sa linéarité s’étale sur des changements d’indices supérieurs à $\Delta n=0.01 RIU$, soit 10 fois plus grands que ceux proposés par la phase. Cependant, malgré ces grandes dynamiques, la SPR en polarisation ne peut séparer l’information de la couche mince à celle de l’indice de la solution, ce qui la cantonne à des fluides complexes ne présentant pas de fortes variations d’indices.

D’autres techniques peuvent apporter ces grandes dynamiques, dont la nanoplasmonique qui présente des dynamiques similaires à celle de la résonance plasmonique de surface, car basée sur un phénomène similaire. De plus ce type de plateforme propose une meilleure alternative pour l’aspect multiplexage et intégration. En effet, ce type de détection se retrouve sur des puces à ADN [196] qui peuvent aller à plusieurs milliers de mesures simultanées. La nanoplasmonique amène ce grand nombre de tests en parallèle grâce à sa géométrie de mesure en incidence

normale [37, 145, 146], ce qui permet une meilleure intégration des systèmes microfluidique, ainsi que son intégration dans des laboratoires sur puce [34, 131].

Pour conclure ce bilan, le plus grand défi pour ces plateformes développées est leur application. En effet, les mesures de performances ont été réalisées dans des conditions de laboratoire qui peuvent être loin de celles qui se trouvent dans des applications réelles. Cette transition de ces plateformes d'un laboratoire vers les conditions réelles pourrait être un projet extrêmement intéressant, et des partenariats avec des industriels seraient le meilleur moyen de le concrétiser.

Cependant, cette commercialisation peut représenter plusieurs défis surtout dans un contexte de miniaturisation ou de production de masse. En effet, les systèmes relativement simples tels que le SPR spectral ou la nanoplasmonique devrait être facilement miniaturisé, ceux utilisant des modulations de phase ou de polarisation seront beaucoup plus difficiles à développer. Des études sur des composants optiques intégrés, proposant ce type de technologie de modulation de phase, devront être réalisées afin de voir s'il est possible d'obtenir des résolutions similaires à celles présentées dans cette thèse de doctorat.

8.2.2 Forces et défis de l'application proposée dans l'étude de cas

Cette étude de cas, via l'utilisation de la résonance plasmonique de surface, propose une plateforme qui présente beaucoup d'avantages à offrir au secteur médical. En effet, elle repose sur une détection ne requérant pas de modifier l'objet à détecter (« label-free »). Elle ne nécessite pas l'utilisation de fluorophore ou d'élément diffusant pour l'analyse, ces derniers pouvant altérer la mesure. La seule partie qui doit être modifiée est la surface réceptrice. Cette dernière est fonctionnalisée de manière à pouvoir capturer les biomarqueurs qui veulent être analysés.

Un autre point positif, et le plus important selon l'auteur, est que cette technique a été utilisée avec succès dans cette thèse pour la détection de marqueurs de la leucémie, comme nous pouvons l'observer dans le chapitre 7 – montrant de ce fait sa possible intégration et utilisation dans le milieu médical ou pour toute analyse clinique.

Cependant, dans l'étude de cas, la plateforme proposée a plusieurs défis à relever, principalement liés au fait qu'elle s'applique au milieu médical. Selon l'opinion de l'auteur, il existe deux principaux défis pour que ce type de plateforme soit un jour utilisé dans le domaine médical.

Le premier défi est qu'elle doit montrer qu'elle peut être une alternative sérieuse aux instrumentations couramment utilisées dans les hôpitaux et les laboratoires médicaux. C'est un processus normal lorsqu'il y a des transitions dans diverses technologies. Pour cela, les technologies concurrentes doivent être identifiées et leurs performances comparées à celle proposée par les plateformes développées dans cette thèse de doctorat.

Dans le cas particulier de la leucémie, les instrumentations suivantes les plus couramment utilisées sont : l'électrophorèse des protéines dans le sérum ou l'urine [197, 198], l'électrophorèse assistée par immunofixation [69, 189, 198, 199] ou la néphéломétrie assistée par des billes de latex recouverte d'anticorps spécifiques aux chaînes légères lambda ou kappa [69, 180, 200-202]. Ces techniques ont servi de multiples fois pour la détermination de la condition d'un patient dans un milieu hospitalier, mais ont aussi soutenu un très grand nombre de recherches cliniques [68-70, 179, 182, 183, 203-205].

Une solution pour pallier ce défi serait de convaincre les personnes initiant des études cliniques d'utiliser l'instrumentation proposée. Ceci permettrait de montrer sur une plus grande échelle, la viabilité de cette plateforme.

Le second défi est la méconnaissance des variables en sortie du système proposé, qui ne sont pas familières du personnel médical. En effet, il utilise généralement des concentrations massiques [68-70, 179, 182, 183, 203-205], alors que les techniques d'optique de surface utilisent des changements d'indice effectif ou d'épaisseurs [32, 142, 169, 206].

Pour pallier à cela, il faudra créer des tables de comparaison/calibration directement intégrées dans les logiciels d'acquisition afin de traduire la donnée de la couche mince en une donnée médicale. Même si ce travail n'est pas un challenge en soi, une attention particulière devra être portée sur la conception de ces tables de calibration afin de limiter les sources d'erreur sur les mesures et interprétation des résultats médicaux.

8.2.3 Vers une possible commercialisation de l'application de la détection de la leucémie

En résumé, grâce à de bonnes performances instrumentales ainsi que dans la démonstration de son application médicale, la plateforme présentée dans le chapitre 7 propose une alternative

sérieuse pour la détection et l'analyse de la leucémie, autant dans un contexte médical que clinique.

Dans le cadre d'une éventuelle commercialisation de cette plateforme, le plus grand défi sera de convaincre le milieu médical de l'utilité et de la validité de cette technique. Pour cela, il devra être montré que les caractéristiques de cette technique sont supérieures à celle couramment utilisée dans ce milieu (électrophorèse, néphélémétrie...). Des recherches cliniques, sur des échantillons de plusieurs centaines de patients, devront être aussi réalisées avec cet instrument afin de mesurer sa spécificité, sa sensibilité et ses valeurs prédictives positives et négatives, comme présentées sur le tableau 8-1.

Ces études cliniques doivent être faites en partenariat avec des centres d'analyse ayant une importante présence dans la littérature (clinique Mayo [183, 189, 203], Université de Birmingham [68, 179]), afin de faire une campagne de promotion de la plateforme dans les laboratoires d'analyse. De plus, des partenariats stratégiques doivent être considérés avec les industriels vendant les instruments d'analyse à ces cliniques et centres d'études (*Siemens, Roche, Beckman-Coulter*) ainsi qu'avec les compagnies fournissant les kits de détection, comme la compagnie *The Binding Site Group* qui fournit le kit « *Freelite* », ainsi que l'instrument d'analyse « *SPA_{plus}* », utilisé à de nombreuses reprises dans des études sérologiques pour la détection de la leucémie [68, 179, 183, 203].

Tableau 8-1 : Définition de la sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative.

		Patient		
résultat	Patient malade	Patient sain		
positif	Vrai positif VP	Faux positif FP	Valeur prédictive positive $VP / (VP + FP)$	
négatif	Faux négatif FN	Vrai négatif VN	Valeur prédictive négative $VN / (VN + FN)$	
	Sensibilité $VP / (VP + FN)$	Spécificité $VN / (VN + FP)$		

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les tâches effectuées pour ce projet de doctorat portaient sur l'analyse polarimétrique de transductions optiques de surface pour une application biomédicale. Ces dernières avaient pour but de faire un banc d'essai de différents systèmes proposés, utilisant différents phénomènes optiques de surface, afin de sélectionner le système plus performant pour la détection de la leucémie. La complétion de ce projet passait par la réalisation des objectifs suivants :

- Détermination des transductions optiques présentant les performances en matière de sensibilité et proposant des solutions de multiplexage,
- Étude en polarimétrie de ces transductions via la réalisation de biocapteurs,
- Étude de cas : application de la plateforme choisie pour la détection de la leucémie.

Chacun des points de ce projet a été traité avec succès et a mené à la validation de la méthode proposée pour la détection de la leucémie. Ce type de biocapteur optique dans la détection spécifique de la leucémie n'a jamais été rapporté dans la littérature, à la connaissance de l'auteur.

Une revue de littérature sur plusieurs types de biocapteurs optiques de surface a été réalisée. Une analyse comparative des différentes techniques a permis de sélectionner les transductions présentant les meilleures performances en matière de sensibilité, proposant des solutions au multiplexage (plus ou moins complexe) et présentant des réponses optiques asymétriques pour deux polarisations orthogonales (lecture polarimétrique). De cette étude, il en découle le choix suivant : la réflexion totale interne, la résonance plasmonique de surface ainsi que la nanoplasmonique et de ce fait répond à l'objectif #1.

Par la suite, une étude des réponses polarimétriques de ces transductions a été conduite. Pour cela, la construction de plusieurs biocapteurs utilisant une lecture de polarisation et/ou de phase a été réalisée. Pour le cas de la réflexion totale interne, un système mesurant la combinaison de l'information de polarisation et de phase a été construit afin de profiter de la capacité de la TIR à pouvoir séparer l'information du milieu testé et de la couche mince déposée. Ce dernier nous donne une courbe dont la position angulaire du maximum est directement liée à l'angle critique et donc l'indice de réfraction de la solution. La hauteur de la courbe est égale au cosinus de la phase, dont son changement est lié à l'adsorption d'une couche mince. Pour la résonance

plasmonique de surface, ainsi que la nanoplasmonique, des systèmes plus conventionnels de lecture de polarisation ou de phase ont été employés. Dans ces deux cas, la variation de leurs paramètres est synonyme de changement d'indice de la solution ou d'adsorption de couche mince. Cependant, ils présentent l'avantage d'être plus sensibles pour ces deux variations. Pour chacune des plateformes proposées, une évaluation des performances a été réalisée et des applications ont été déterminées. La construction de ces systèmes ainsi que la proposition d'applications pour chaque plateforme en tenant compte de leurs performances répondent donc à l'objectif #2.

Une comparaison de ces plateformes a été par la suite réalisée afin de déterminer celles qui offraient les meilleures performances en matière de limite de détection, mais aussi d'étendue dynamique et de multiplexage. De cette étude comparative, il a été conclu que le système utilisant l'analyse en polarisation de résonance plasmonique de surface proposait le meilleur compromis. Finalement, l'application de la plateforme sélectionnée à la détection de la leucémie a été expérimentée. Pour cela, des tests utilisant le modèle de détection, élaboré en collaboration avec le Pr Brolo de l'université de Victoria ainsi que le Pr Wang de l'hôpital du Mont-Sinaï, à Toronto, ont été achevés. Ce modèle repose sur la détection des chaînes légères kappa et lambda dans le sérum sanguin par le biais d'anticorps spécifiques à ces chaînes légères. Il a d'abord été validé en utilisant des solutions purifiées. Ces tests ont permis de déterminer la spécificité de la surface par rapport à l'adsorption non spécifique (signal spécifique est 3 fois plus grand) ainsi que la zone de réponse linéaire en fonction de la concentration ($C_{massique}=1 \mu\text{g}/\text{ml}$ à $10\mu\text{g}/\text{ml}$). Par la suite, les tests en conditions réelles ont été performés, et leurs résultats montrent que la technique proposée donne des résultats similaires ($> 80\%$) à ceux obtenus avec les méthodes utilisées dans les hôpitaux. Ce dernier point répond à l'objectif #3, mais illustre aussi l'objectif général de la thèse – la biodétection dans un milieu complexe.

Bien que cette thèse de doctorat réponde à tous ses objectifs, plusieurs recommandations peuvent être faites sur les transductions analysées ainsi que sur le système proposé pour l'étude de cas.

Pour les transductions, même si seulement l'une d'entre elles a été sélectionnée pour étude de cas, il en reste néanmoins que les autres peuvent fournir des plateformes pour d'autres types d'applications. Comme il l'a été proposé dans le chapitre 4, la réflexion totale interne peut amener des solutions pour des applications requérant sa possibilité de séparer l'information de la

solution de la couche mince se déposant sur le prisme. Ce type de plateforme pourrait être utilisé pour l'analyse de milieux turbides qui présente de très forts changements d'indice de réfraction en solution. Cette technologie pourrait bien se retrouver dans le contrôle des eaux usées ou des chaînes de production alimentaire (produit laitier). Enfin, une attention particulière doit être portée sur la chimie de surface (chimie des silanes) qui est plus complexe à opérer (la plupart du temps en phase gazeuse) et pouvant être toxique comparer à celle utilisée pour les métaux nobles (chimie des thiols – relativement simple à utiliser).

Comme, il a été constaté dans le chapitre 5, la mesure de phase sur les systèmes utilisant la résonance plasmonique de surface en configuration Kretschmann amène une très grande sensibilité. Cette dernière pourrait être exploitée sur l'analyse de solutions faiblement concentrées – dans le cadre de la recherche académique ou pharmaceutique. Cependant, une amélioration de l'instrumentation peut être réalisée, sachant qu'il est facile de trouver dans la littérature des systèmes similaires montrant une limite de détection jusqu'à 10 fois inférieures à celle proposée dans cette thèse de doctorat.

Enfin, les plateformes nanoplasmoniques, qui proposent la possibilité de faire du multiplexage à large échelle, pourraient être une alternative aux technologies utilisées actuellement pour les puces à ADN – ou pour des applications biomédicales qui ne nécessitent pas une très grande sensibilité, mais un fort multiplexage. Cependant, ces applications sont limitées à l'analyse de fluide transparent ou faiblement turbide, car elles sont basées sur une lecture en transmission. Des études et tests en réflexion pourraient être réalisés afin d'augmenter le spectre d'applications possibles de cette plateforme.

D'un point de vue du système proposé, un travail plus approfondi sur la chimie de surface doit être réalisé afin d'avoir des spécificités meilleures. Cette propension à avoir un niveau d'adsorption non spécifique élevé peut nuire à la mesure des concentrations relatives des biomarqueurs et mener à la génération de faux positifs ou négatifs. De plus, elle pourrait être la cause de la courte zone linéaire ($C_{massique}=1 \mu\text{g/ml à } 10 \mu\text{g/ml}$), menant à une saturation rapide du signal pour les échantillons présentant des concentrations plus élevées. De ce fait, une étude des différentes chimies de surface utilisant les protéines A, G ou L devrait être réalisée, ainsi qu'une analyse sur différent type d'anticorps. Ces études doivent aboutir à la maximisation de la couverture de surface et sa fonctionnarisation.

Un travail sur l'intégration de la micro fluidique doit être poursuivi. Cette intégration permettra la réalisation de plusieurs dizaines de mesures simultanément. Ceci permettrait donc d'effectuer ce test sur plusieurs patients en même temps ou d'analyser plus profondément un patient en regardant d'autres types de marqueurs. Des détecteurs plus grands pourraient être aussi employés afin de croître le nombre de canaux potentiels qui serait offert par l'instrument.

La remarque finale sur le système proposé serait de réaliser une étude clinique sur plusieurs centaines de patients afin de mesurer la spécificité (capacité à donner un résultat négatif) et la sensibilité (capacité à donner un résultat positif) de la plateforme. Cette même étude pourrait servir en même temps de campagne de promotion de la plateforme dans un cadre éventuel de sa commercialisation.

En conclusion, l'ensemble des objectifs de ce doctorat a été complété avec succès. Ils offrent une preuve concluante de l'application des biocapteurs optiques dans un large spectre d'application nécessitant l'analyse de fluide complexe et ont été mis en application avec l'étude de cas — la détection de la leucémie. Cette thèse a permis d'analyser différents systèmes utilisant des transductions optiques en mettant l'emphase sur leurs avantages et leurs inconvénients. Cette analyse pourrait servir de point de départ pour l'élaboration de systèmes pour des applications spécifiques liées à l'analyse de fluide complexe. Finalement, ce doctorat ouvre la voie, aux biocapteurs optiques, à des applications de détection de maladies ou de cancers et potentiellement à son utilisation dans un milieu clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. M. Nelson and E. G. Griffin, "ADSORPTION OF INVERTASE," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 38, pp. 1109-1115, 1916/05/01 1916.
- [2] W. S. Hughes, "THE POTENTIAL DIFFERENCE BETWEEN GLASS AND ELECTROLYTES IN CONTACT WITH THE GLASS," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 44, pp. 2860-2867, 1922/12/01 1922.
- [3] L. C. J. Clark, "Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions," *American Society for Artificial Internal Organs*, vol. 2, p. 8, 1956.
- [4] L. C. Clark and C. Lyons, "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [5] T. Vo-Dinh and B. Cullum, "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics.," *Fresenius J Anal Chem*, vol. 366, 2000.
- [6] B.-Y. Chang and S.-M. Park, "Electrochemical Impedance Spectroscopy," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 3, pp. 207-229, 2010.
- [7] J. S. Daniels and N. Pourmand, "Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges," *Electroanalysis*, vol. 19, pp. 1239-1257, Jun 2007.
- [8] C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault, "Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, pp. 663-670, 1999.
- [9] K. Länge, *et al.*, "Surface acoustic wave biosensors: a review," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, pp. 1509-1519, 2008/07/01 2008.
- [10] S. Lee, *et al.*, "Comparative Study of Binding Constants from Love Wave Surface Acoustic Wave and Surface Plasmon Resonance Biosensors Using Kinetic Analysis," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 13, pp. 7319-7324, 2013.
- [11] K. Saha, *et al.*, "Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 835-42, 2003.
- [12] C. L. Baird and D. G. Myszka, "Current and emerging commercial optical biosensors," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 14, pp. 261-268, 2001.
- [13] M. A. Cooper, "Optical biosensors in drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, pp. 515-528, Jul 2002.
- [14] Y. Fang, "Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery," *Assay and Drug Development Technologies*, vol. 4, pp. 583-595, Oct 2006.
- [15] X. Fan, *et al.*, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 620, pp. 8-26, 2008.
- [16] J. Homola, *et al.*, "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 54, pp. 3-15, 1999.

- [17] D. G. Myszka and R. L. Rich, "Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 3, pp. 310-317, 2000.
- [18] R. L. Rich and D. G. Myszka, "Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 21, pp. 355-400, 2008.
- [19] R. Chen, *et al.*, "Fast detection of hydrogen sulfide gas in the ppmv range with silver nanoparticle films at ambient conditions," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 186, pp. 431-438, 2013.
- [20] H. Wu, *et al.*, "Rapid detection of melamine based on immunoassay using portable surface plasmon resonance biosensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 178, pp. 541-546, 2013.
- [21] A. a. Yanik, *et al.*, "An Optofluidic Nanoplasmonic Biosensor for Direct Detection of Live Viruses from Biological Media," *Nano letters*, pp. 4962-4969, 2010.
- [22] H. P. Ho and C. L. Wong, "Imaging differential phase surface plasmon resonance biosensors," Montreal, QC, Canada, 2007, pp. 675-676.
- [23] W. C. Law, *et al.*, "Wide dynamic range phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on measuring the modulation harmonics," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 23, pp. 627-632, Dec 15 2007.
- [24] S. Patskovsky, *et al.*, "Phase-sensitive spatially-modulated surface plasmon resonance polarimetry for detection of biomolecular interactions," *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 133, pp. 628-31, 2008.
- [25] M. B. Pu, *et al.*, "Directional coupler and nonlinear Mach-Zehnder interferometer based on metal-insulator-metal plasmonic waveguide," *Optics Express*, vol. 18, pp. 21030-21037 ST - Directional coupler and nonlinea, 2010.
- [26] T. Yang and H. P. Ho, "A phase-sensitive surface plasmon resonance sensor based on the enhanced light transmission through arrays of nanoholes in gold films," Hong Kong, China, 2008.
- [27] M. Vala, *et al.*, "High-performance compact SPR sensor for multi-analyte sensing," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 148, pp. 544-549, 2010.
- [28] A.-P. Blanchard-Dionne, *et al.*, "Intensity based surface plasmon resonance sensor using a nanohole rectangular array," *Optics Express*, vol. 19, pp. 331-336, 2011.
- [29] S. Patskovsky, *et al.*, "Phase-sensitive silicon-based total internal reflection sensor," *Optics Express*, vol. 15, p. 6 pp., 2007.
- [30] S. Patskovsky, *et al.*, "Silicon based total internal reflection bio and chemical sensing with spectral phase detection," *Opt. Express*, vol. 17, pp. 20847-20852, 2009.
- [31] L. Guyot, *et al.*, "Integrated silicon-based nanoplasmonic sensor," *Opt. Express*, vol. 19, pp. 9962-9967, 2011.
- [32] M. Holgado, *et al.*, "Simultaneous Reflectivity, Ellipsometry and Spectrometry Measurements in Submicron Structures for Liquid Sensing," [Holgado, M.; Casquel, R.; Molpeceres, C.; Morales, M.; Ocana, J. L.] Univ Politecn Madrid, Ctr Laser, Madrid 28031, Spain. Holgado, M, Univ Politecn Madrid, Ctr Laser, Madrid 28031, Spain.

- m.holgado@upm.es AN - ISI:000260963500016, pp. 564-569 ST - Simultaneous Reflectivity, Ellipsome.
- [33] F. Mazzotta, *et al.*, "Nanoplasmonic biosensing with on-chip electrical detection," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 26, pp. 1131-6, 2010.
 - [34] D. Sinton, *et al.*, "Microfluidic and nanofluidic integration of plasmonic substrates for biosensing," USA, 2009, p. 732206 (13 pp.).
 - [35] A. A. Yanik, *et al.*, "Integrated nanoplasmonic-nanofluidic biosensors with targeted delivery of analytes," *Applied Physics Letters*, vol. 96, pp. 021101-021101, 2010.
 - [36] "Focus Chip vision-optics for microchips," *Lab on a Chip*, vol. 3, pp. 42N-52N, 2003.
 - [37] K.-L. Lee, *et al.*, "Sensitive biosensor array using surface plasmon resonance on metallic nanoslits," *Journal of biomedical optics*, vol. 12, pp. 044023-044023, 2007.
 - [38] R. Martinez Vazquez, *et al.*, "Optical sensing in microfluidic lab-on-a-chip by femtosecond-laser-written waveguides," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, pp. 1209-1216, 2009/02/01 2009.
 - [39] J.-Y. Yoon and B. Kim, "Lab-on-a-Chip Pathogen Sensors for Food Safety," *Sensors*, vol. 12, pp. 10713-10741, 2012.
 - [40] K. Zagorovsky and W. C. W. Chan, "A Plasmonic DNAzyme Strategy for Point-of-Care Genetic Detection of Infectious Pathogens," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, pp. 3168-3171, 2013.
 - [41] R. Slavík, *et al.*, "A miniature fiber optic surface plasmon resonance sensor for fast detection of staphylococcal enterotoxin B," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, pp. 591-595, 2002.
 - [42] B.-K. Oh, *et al.*, "The fabrication of protein chip based on surface plasmon resonance for detection of pathogens," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1847-1850, 2005.
 - [43] N. Karoonuthaisiri, *et al.*, "Development of a M13 bacteriophage-based SPR detection using *Salmonella* as a case study," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 190, pp. 214-220, 2014.
 - [44] T. N. Athmaram, *et al.*, "Characterization of pandemic influenza A (H1N1) virus hemagglutinin specific polyclonal antibodies for biosensor applications," *Journal of Medical Virology*, pp. n/a-n/a, 2013.
 - [45] M.-I. Aguilar and D. Small, "Surface plasmon resonance for the analysis of β -amyloid interactions and fibril formation in alzheimer's disease research," *Neurotoxicity Research*, vol. 7, pp. 17-27, 2005/01/01 2005.
 - [46] A. J. Haes, *et al.*, "A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease," *Nano Letters*, vol. 4, pp. 1029-1034, 2004/06/01 2004.
 - [47] K. Hegnerová, *et al.*, "Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 139, pp. 69-73, 2009.

- [48] N. Bianchi, *et al.*, "Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction," *Clinical and Diagnostic Virology*, vol. 8, pp. 199-208, 1997.
- [49] A. Rachkov, *et al.*, "Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis," *Talanta*, vol. 85, pp. 2094-2099, 2011.
- [50] J. Ferguson, *et al.*, "Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol," *Analytica Chimica Acta*, vol. 529, pp. 109-113, 2005.
- [51] J. Homola, *et al.*, "Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 75, pp. 61-69, 2002.
- [52] S. Rebe Raz, *et al.*, "Label-Free and Multiplex Detection of Antibiotic Residues in Milk Using Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor," *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 7743-7749, 2009/09/15 2009.
- [53] A. Sternesjo, *et al.*, "Determination of Sulfamethazine Residues in Milk by a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor Assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 226, pp. 175-181, 1995.
- [54] G. Spoto, *et al.*, "Design, realization, and testing of a SPR biosensing system for wine quality monitoring," 2007, pp. 659210-659210-8.
- [55] (2013). *Leukemia - Chronic Lymphocytic*. Available: <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chroniclymphocyticcll/>
- [56] S. V. Berdyugina, *et al.*, "Polarized Reflected Light from the Exoplanet HD189733b: First Multicolor Observations and Confirmation of Detection," *The Astrophysical Journal Letters*, vol. 728, p. L6, 2011.
- [57] S. V. Berdyugina, *et al.*, "First Detection of Polarized Scattered Light from an Exoplanetary Atmosphere," *The Astrophysical Journal Letters*, vol. 673, p. L83, 2008.
- [58] M. Nikku and B. Adam, "Analytic Models for Albedos, Phase Curves, and Polarization of Reflected Light from Exoplanets," *The Astrophysical Journal*, vol. 747, p. 25, 2012.
- [59] J. W. Sloane, "Nondetection of Polarized, Scattered Light from the HD 189733b Hot Jupiter," *The Astrophysical Journal*, vol. 696, p. 1116, 2009.
- [60] T. Songxin and R. M. Narayanan, "A multiwavelength airborne polarimetric lidar for vegetation remote sensing: instrumentation and preliminary test results," in *Geoscience and Remote Sensing Symposium, 2002. IGARSS '02. 2002 IEEE International*, 2002, pp. 2675-2677 vol.5.
- [61] S. Tan, *et al.*, "Polarimetric reflectance and depolarization ratio from several tree species using a multiwavelength polarimetric lidar," 2005, pp. 58880M-58880M-9.
- [62] J. S. Tyo, *et al.*, "Review of passive imaging polarimetry for remote sensing applications," *Applied Optics*, vol. 45, pp. 5453-5469, 2006/08/01 2006.

- [63] Y. H. Huang, *et al.*, "Detecting Phase Shifts in Surface Plasmon Resonance: A Review," *Advances in Optical Technologies*, vol. 2012, pp. 1-12, 2012.
- [64] a. V. Kabashin, *et al.*, "Phase-polarisation contrast for surface plasmon resonance biosensors," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 13, pp. 1263-9, 1998.
- [65] a. V. Kabashin, *et al.*, "Surface plasmon resonance bio- and chemical sensors with phase-polarisation contrast," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 54, pp. 51-56, 1999.
- [66] X. F. Ren, *et al.*, "Polarization properties of subwavelength hole arrays consisting of rectangular holes," *Applied Physics B*, vol. 91, pp. 601-604, 2008.
- [67] N. Sedoglavich, *et al.*, "Phase-polarisation contrast for surface plasmon resonance based on low cost grating substrates," *Current Applied Physics*, vol. 8, pp. 351-354, 2008.
- [68] A. Bradwell, *et al.*, "Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'κ/Ig'λ ratios in multiple myeloma patients," *Leukemia*, vol. 27, pp. 202-7, 2013.
- [69] J. a. Katzmann, *et al.*, "Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains," *Clinical chemistry*, vol. 48, pp. 1437-44, 2002.
- [70] M. J. Maurer, *et al.*, "Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. 118, pp. 2821-6, 2011.
- [71] E. Hecht, "Polarization," in *Optics*, 4th ed San Francisco, CA, USA: Addison-Wesley, 2002, pp. 325-384.
- [72] F. Abeles, "Surface electromagnetic waves ellipsometry," *Surface Science*, vol. 56, pp. 237-251, 1976.
- [73] D. M. Wood and N. W. Ashcroft, "Effective medium theory of optical properties of small particle composites," *Philosophical Magazine*, vol. 35, pp. 269-280, 1977/02/01 1977.
- [74] M. G. Moharam and T. K. Gaylord, "Rigorous coupled-wave analysis of planar-grating diffraction," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 71, pp. 811-811, 1981.
- [75] R. W. Wood, "On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum," *Proceedings of the Physical Society of London*, vol. 18, p. 269, 1902.
- [76] L. Rayleigh, "III. Note on the remarkable case of diffraction spectra described by Prof. Wood," *Philosophical Magazine Series 6*, vol. 14, pp. 60-65, 1907/07/01 1907.
- [77] U. Fano, "The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves)," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 31, pp. 213-222, 1941/03/01 1941.
- [78] N. D. M. Neil. W Ashcroft, *Solid State Physic*, 1st edition ed., 1976.
- [79] *refractive index database*. Available: www.refractiveindex.info
- [80] P. B. Johnson and R. W. Christy, "Optical Constants of the Noble Metals," *Physical Review B*, vol. 6, pp. 4370-4379, 1972.
- [81] J. Homola, *Surface Plasmon Resonance Based Sensors* vol. 4. New York, NY, USA: Springer, 2006.

- [82] H. Raether, "Surface plasmons on smooth surfaces," in *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. vol. 111, ed: Springer Berlin Heidelberg, 1988, pp. 4-39.
- [83] H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Berlin, 1988.
- [84] E. Kretschmann and H. Raether, "Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light," *Z. Naturforsch. A*, vol. 23, p. 2135, 1968.
- [85] A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Zeitschrift für Physik*, vol. 216, pp. 398-410, 1968/08/01 1968.
- [86] E. Hecht, "Diffraction," in *Optics*, 4th ed: Addison Wesley 2002, pp. 392-435.
- [87] T. W. Ebbesen, *et al.*, "Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays," *Nature*, vol. 391, pp. 667-9, 1998.
- [88] L. Martín-Moreno, *et al.*, "Theory of Extraordinary Optical Transmission through Subwavelength Hole Arrays," *Physical Review Letters*, vol. 86, pp. 1114-1117, 2001.
- [89] F. Huang and H. Liang, "Adsorption Behaviors of DNA/Cation Complexes on Amino and Silica Chip Surfaces: A Dual Polarization Interferometry Study," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 5, pp. 5025-5033, 2013/06/12 2013.
- [90] F. Huang, *et al.*, "Using dual-polarization interferometry to study surface-initiated DNA hybridization chain reactions in real time," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 51, pp. 317-323, 2014.
- [91] B. Lillis, *et al.*, "Dual polarisation interferometry characterisation of DNA immobilisation and hybridisation detection on a silanised support," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1459-1467, 2006.
- [92] H. Berney and K. Oliver, "Dual polarization interferometry size and density characterisation of DNA immobilisation and hybridisation," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 618-626, 2005.
- [93] M. J. Swann, *et al.*, "Dual-polarization interferometry: an analytical technique to measure changes in protein structure in real time, to determine the stoichiometry of binding events, and to differentiate between specific and nonspecific interactions," *Analytical Biochemistry*, vol. 329, pp. 190-198, 2004.
- [94] H. C. Graham, *et al.*, "The metrics of surface adsorbed small molecules on the Young's fringe dual-slab waveguide interferometer," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 37, p. 74, 2004.
- [95] J. F. Neville, *et al.*, "Real time, high resolution studies of protein adsorption and structure at the solid–liquid interface using dual polarization interferometry," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 16, p. S2493, 2004.
- [96] A. W. Sonesson, *et al.*, "A comparison between dual polarization interferometry (DPI) and surface plasmon resonance (SPR) for protein adsorption studies," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 54, pp. 236-240, 2007.

- [97] A. Boudjemline, *et al.*, "Use of Dual Polarization Interferometry as a Diagnostic Tool for Protein Crystallization," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 7881-7887, 2011/10/15 2011.
- [98] S. Ricard-Blum, *et al.*, "Dual polarization interferometry characterization of carbohydrate–protein interactions," *Analytical Biochemistry*, vol. 352, pp. 252-259, 2006.
- [99] S. Lin, *et al.*, "Homopolyvalent antibody–antigen interaction kinetic studies with use of a dual-polarization interferometric biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 715-721, 2006.
- [100] H. Y. Song, *et al.*, "Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization as Measured by Dual Polarization Interferometry and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," *Langmuir*, vol. 28, pp. 997-1004, 2012/01/10 2011.
- [101] R. Cush, *et al.*, "The resonant mirror: A novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 8, pp. 347-353, 1993.
- [102] D. A. Dmitriev, *et al.*, "Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor," *Journal of immunological methods*, vol. 280, pp. 183-1202, 2003.
- [103] D. A. Dmitriev, *et al.*, "Analysis of the binding of bispecific monoclonal antibodies with immobilized antigens (human IgG and horseradish peroxidase) using a resonant mirror biosensor," *Journal of immunological methods*, vol. 261, pp. 103-118, 2002.
- [104] T. Dougan, *et al.*, "Characterization of autoantibodies from patients with Goodpasture's disease using a resonant mirror biosensor," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 128, pp. 555-561, 2002.
- [105] A. J. T. George, *et al.*, "Measurement of kinetic binding constants of a panel of anti-saporin antibodies using a resonant mirror biosensor," *Journal of immunological methods*, vol. 183, pp. 51-63, 1995.
- [106] D. R. Hall and D. J. Winzor, "Use of a Resonant Mirror Biosensor to Characterize the Interaction of Carboxypeptidase A with an Elicited Monoclonal Antibody," *Analytical Biochemistry*, vol. 244, pp. 152-160, 1997.
- [107] M. J. Pazos, *et al.*, "Kinetic Analysis of the Interaction between Yessotoxin and Analogues and Immobilized Phosphodiesterases Using a Resonant Mirror Optical Biosensor," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 18, pp. 1155-1160, 2005/07/01 2005.
- [108] M.-J. Pazos, *et al.*, "Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin–phosphodiesterase interactions," *Analytical Biochemistry*, vol. 335, pp. 112-118, 2004.
- [109] V. Cortez-Retamozo, *et al.*, "Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels," *International Journal of Cancer*, vol. 98, pp. 456-462, 2002.
- [110] S. T. Thanyani, *et al.*, "A novel application of affinity biosensor technology to detect antibodies to mycolic acid in tuberculosis patients," *Journal of immunological methods*, vol. 332, pp. 61-72, 2008.
- [111] H. Arwin, *et al.*, "Total Internal Reflection Ellipsometry: Principles and Applications," *Applied Optics*, vol. 43, pp. 3028-3036, 2004/05/20 2004.

- [112] Y. Y. Chen, *et al.*, "Biosensor with total internal reflection imaging ellipsometry," *International Journal of Nanotechnology*, vol. 4, pp. 171-178, 2007.
- [113] S. Patskovsky, *et al.*, "Mechanical modulation method for ultra-sensitive phase measurements in photonics biosensing," *Optics Express*, vol. 16, pp. 21305-21314, 2008.
- [114] M.-H. Chiu, *et al.*, "Refractive-index measurement based on the effects of total internal reflection and the uses of heterodyne interferometry," *Applied Optics*, vol. 36, pp. 2936-2939, 1997/05/01 1997.
- [115] A. Nabok and A. Tsargorodskaya, "The method of total internal reflection ellipsometry for thin film characterisation and sensing," *Thin Solid Films*, vol. 516, pp. 8993-9001, 2008.
- [116] A. V. Nabok, *et al.*, "Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins," *Applied Surface Science*, vol. 246, pp. 381-386, 2005.
- [117] A. V. Nabok, *et al.*, "Registration of T-2 mycotoxin with total internal reflection ellipsometry and QCM impedance methods," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 885-890, 2007.
- [118] G. De Crescenzo, *et al.*, "Kinetic Characterization by Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors: Principle and Emerging Trends," *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 1, pp. 204-215, 2008.
- [119] F. S. Damos, *et al.*, "Determination of Thickness, Dielectric Constant of Thiol Films, and Kinetics of Adsorption Using Surface Plasmon Resonance," *Langmuir*, vol. 21, pp. 602-609, 2005/01/01 2004.
- [120] R. Karlsson and A. Fält, "Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors," *Journal of immunological methods*, vol. 200, pp. 121-133, 1997.
- [121] R. L. Rich, *et al.*, "Extracting kinetic rate constants from surface plasmon resonance array systems," *Analytical Biochemistry*, vol. 373, pp. 112-120, 2008.
- [122] H. Yu, *et al.*, "Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1726, pp. 168-176, 2005.
- [123] Y. Li, *et al.*, "Detection of Protein Biomarkers Using RNA Aptamer Microarrays and Enzymatically Amplified Surface Plasmon Resonance Imaging," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 1082-1088, 2007/02/01 2007.
- [124] D. R. Shankaran, *et al.*, "Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 121, pp. 158-177, 2007.
- [125] M. Piliarik and J. í. Homola, "Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?," *Optics Express*, vol. 17, pp. 16505-16517, 2009/09/14 2009.
- [126] W.-C. Law, *et al.*, "Wide dynamic range phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on measuring the modulation harmonics," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 23, pp. 627-32, 2007.

- [127] H. P. Ho, *et al.*, "Real-time optical biosensor based on differential phase measurement of surface plasmon resonance," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2177-2180, 2005.
- [128] Y. Wu, *et al.*, "Surface Plasmon Resonance Biosensor Incorporated in a Michelson Interferometer With<newline/>Enhanced Sensitivity," *Sensors Journal, IEEE*, vol. 7, pp. 70-73, 2007.
- [129] K.-H. Lee, *et al.*, "Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 466-472, 2007.
- [130] Y. Xinglong, *et al.*, "Immunosensor based on optical heterodyne phase detection," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 76, pp. 199-202, 2001.
- [131] A. De Leebeeck, *et al.*, "On-Chip Surface-Based Detection with Nanohole Arrays," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 4094-4100, 2007/06/01 2007.
- [132] A. Lesuffleur, *et al.*, "Plasmonic nanohole arrays for real-time multiplex biosensing," USA, 2008, p. 703504 (10 pp.).
- [133] A. Lesuffleur, *et al.*, "Plasmonic nanohole arrays for label-free kinetic biosensing in a lipid membrane environment," Piscataway, NJ, USA, 2009, pp. 1481-4.
- [134] D. Sinton, *et al.*, "Nanohole arrays in metal films as optofluidic elements: progress and potential," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 4, pp. 107-116, 2008/01/01 2008.
- [135] F. Eftekhari, *et al.*, "Nanoholes As Nanochannels: Flow-through Plasmonic Sensing," *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 4308-4311, 2009/06/01 2009.
- [136] C. Escobedo, *et al.*, "Flow-Through vs Flow-Over: Analysis of Transport and Binding in Nanohole Array Plasmonic Biosensors," *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 10015-10020, 2010/12/15 2010.
- [137] J. C. Sharpe, *et al.*, "Gold Nanohole Array Substrates as Immunobiosensors," *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 2244-2249, 2008/03/01 2008.
- [138] A. Brecht and G. Gauglitz, "Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 38, pp. 1-7, 1997.
- [139] L. M. Lechuga, "Optical biosensors," in *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, L. Gorton, Ed., ed: Elsevier, 2005.
- [140] P. Leonard, *et al.*, "Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, pp. 3-13, 2003.
- [141] H. N. Daghestani and B. W. Day, "Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors," *Sensors*, vol. 10, pp. 9630-9646, 2010.
- [142] A. V. Kabashin and P. I. Nikitin, "Interferometer based on a surface-plasmon resonance for sensor applications," *Quantum Electronics*, vol. 27, pp. 653-4, 1997.
- [143] A. V. Kabashin, *et al.*, "Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing," *Optics Express*, vol. 17, pp. 21191-21204, 2009/11/09 2009.

- [144] H. P. Ho, *et al.*, "Highly sensitive photonic biosensors based on interferometric detection of surface plasmon waves," Hangzhou, China, 2006, p. 2.
- [145] A. G. Brolo, "Plasmonics for future biosensors," *Nature Photonics*, vol. 6, pp. 709-713, Nov 2012.
- [146] A. G. Brolo, *et al.*, "Surface Plasmon Sensor Based on the Enhanced Light Transmission through Arrays of Nanoholes in Gold Films," *Langmuir*, vol. 20, pp. 4813-4815, 2004/06/01 2004.
- [147] R. Gordon, *et al.*, "Strong Polarization in the Optical Transmission through Elliptical Nanohole Arrays," *Physical Review Letters*, vol. 92, pp. 1-4, 2004.
- [148] C. Valsecchi and A. G. Brolo, "Periodic Metallic Nanostructures as Plasmonic Chemical Sensors," *Langmuir*, vol. 29, pp. 5638-5649, 2013/05/14 2013.
- [149] P. N. Prasad, *Introduction to biophotonics*: Wiley Intersciences, 2003.
- [150] K. Schmitt, *et al.*, "Interferometric biosensor based on planar optical waveguide sensor chips for label-free detection of surface bound bioreactions," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 2591-2597, 2007.
- [151] M. D. Marazuela and M. C. Moreno-Bondi, "Fiber-optic biosensors - An overview," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 372, pp. 664-682, 2002.
- [152] G. Jing, *et al.*, "Dual-mode surface-plasmon-resonance sensors using angular interrogation," *Optics Letters*, vol. 33, pp. 512-14, 2008.
- [153] K. A. Peterlinz and R. Georgiadis, "Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance spectroscopy," *Optics Communications*, vol. 130, pp. 260-266, 1996.
- [154] K. J. Kasunic, "Comparison of Kretschmann?Raether Angular Regimes for Measuring Changes in Bulk Refractive Index," *Appl. Opt.*, vol. 39, pp. 61-64, 2000.
- [155] J. Badoz, *et al.*, "Wave propagation through a medium with static and dynamic birefringence: theory of the photoelastic modulator," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 7, pp. 672-682, 1990.
- [156] E. Hecht, "The propagation of light," in *Optics*, 4th ed: Addison Wesley, 2002, pp. 86-148.
- [157] E. Hecht, "Lasers and Laserlight," in *Optics*, 4th ed: Addison Wesley, 2002, pp. 581-606.
- [158] O. Svensson and T. Arnebrant, "Adsorption of serum albumin on silica - The influence of surface cleaning procedures," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 344, pp. 44-47.
- [159] J. J. Cras, *et al.*, "Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, pp. 683-688, 1999.
- [160] R. L. DeRosa, *et al.*, "Functionalized glass substrate for microarray analysis," *Thin Solid Films*, vol. 515, pp. 4024-4031, Feb 26 2007.
- [161] J. Homola, *et al.*, "Multiple surface plasmon spectroscopy for study of biomolecular systems," *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 113, pp. 774-81, 2006.

- [162] J. Vörös, "The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers," *Biophysical Journal*, vol. 87, pp. 553-561, 2004.
- [163] M. Daimon and A. Masumura, "Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region," *Applied Optics*, vol. 46, pp. 3811-3820, 2007/06/20 2007.
- [164] "Schott N-BK7 data sheet," Schott, Ed., ed, 2007.
- [165] M. Maisonneuve, *et al.*, "Polarimetric total internal reflection biosensing," *Optics Express*, vol. 19, pp. 7410-7416, 2011/04/11 2011.
- [166] OMS/WHO. (2013). *Légionellose - Aide-mémoire N°285*. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/fr/>
- [167] F. J. Garcia-Vidal, *et al.*, "Light passing through subwavelength apertures," *Reviews of Modern Physics*, vol. 82, pp. 729-787, 2010.
- [168] K. a. Willets and R. P. Van Duyne, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing," *Annual review of physical chemistry*, vol. 58, pp. 267-97, 2007.
- [169] S. Patkovsky, *et al.*, "Self-noise-filtering phase-sensitive surface plasmon resonance biosensing," *Optics Express*, vol. 18, pp. 491-496, 2010.
- [170] P. S. Vukusic, *et al.*, "Surface plasmon resonance on gratings as a novel means for gas sensing," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 8, pp. 155-160, 1992.
- [171] M. R. Gadsdon, *et al.*, "Optical resonances on sub-wavelength silver lamellar gratings," *Optics express*, vol. 16, pp. 22003-28, 2008.
- [172] D. L. Mills, "Attenuation of surface polaritons by surface roughness," *Physical Review B*, vol. 12, pp. 4036-4046, 1975.
- [173] K. Knop, "Rigorous diffraction theory for transmission phase gratings with deep rectangular grooves," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 68, pp. 1206-1206, 1978.
- [174] I. Pockrand, "Resonance anomalies in the light intensity reflected at silver gratings with dielectric coatings," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 9, pp. 2423-2432, 1976.
- [175] G. D. Aguanno, *et al.*, "Transmission resonances in plasmonic metallic gratings," *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 28, pp. 253-264, 2011.
- [176] F. García de Abajo, "Colloquium: Light scattering by particle and hole arrays," *Reviews of Modern Physics*, vol. 79, pp. 1267-1290, 2007.
- [177] E. R. Peckt and B. N. Khanna, "Dispersion of Nitrogen," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 56, 1966.
- [178] A. Michels and A. Botzen, "Refractive index and Lorentz-Lorenz function of argon up to 2300 atmospheres at 25°C," *Physica*, vol. 15, pp. 769-773, 1949.
- [179] G. Pratt, *et al.*, "Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukaemia," *British journal of haematology*, vol. 144, pp. 217-22, 2009.

- [180] A. L. Renckens, *et al.*, "Nephelometry of the kappa/lambda light-chain ratio in serum of normal and diseased children," *Clinical chemistry*, vol. 32, pp. 2147-9, Dec 1986.
- [181] C. C. S. s. A. C. o. C. Statistics, "Canadian Cancer statistics 2013," Canadian cancer society, Toronto, ON2013.
- [182] J. P. Campbell, *et al.*, "Development of a highly-sensitive multi-plex assay using monoclonal antibodies for the simultaneous measurement of kappa and lambda immunoglobulin free light chains in serum and urine," *Journal of immunological methods*, vol. 391, pp. 1-13, 2013.
- [183] S. V. Rajkumar, *et al.*, "Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance," *Blood*, vol. 106, pp. 812-7, 2005.
- [184] E. Bergón, *et al.*, "The predictive power of serum κ/λ ratios for discrimination between monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma," in *Clinical Chemical Laboratory Medicine* vol. 43, ed, 2005, p. 32.
- [185] K. M. Charafeddine, *et al.*, "Extended Use of Serum Free Light Chain as a Biomarker in Lymphoproliferative Disorders: A Comprehensive Review," *American journal of clinical pathology*, vol. 137, pp. 890-897, June 1, 2012 2012.
- [186] B. N. Johnson and R. Mutharasan, "pH effect on protein G orientation on gold surfaces and characterization of adsorption thermodynamics," *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 28, pp. 6928-34, 2012.
- [187] P. Jain and K. R. Rai, *Leukemia*: Demos Medical Publishing, 2011.
- [188] "Concentrative properties of aqueous solutions: density, refractive index, freezing point, depression and viscosity," in *Handbook of Chemistry and Physics*, D. R. Lide, Ed., ed Boca raton, FL: CRC press, 2005, pp. 8.58-8.84.
- [189] A. Dispenzieri, *et al.*, "International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders," *Leukemia*, vol. 23, pp. 215-24, Feb 2009.
- [190] C. R. Goward, *et al.*, "Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G," *The Biochemical journal*, vol. 267, pp. 171-7, 1990.
- [191] (2013). *Binding properties of protein A&G for immunoglobulins*. Available: www.millipore.com/techpublications/tech2/binding_properties
- [192] (2013). *Pierce™ Ig Binding Proteins*. Available: <http://www.piercenet.com/files/TR0034-Ab-binding-proteins.pdf>
- [193] S. P. Ng, *et al.*, "Common-path spectral interferometry with temporal carrier for highly sensitive surface plasmon resonance sensing," *Optics Express*, vol. 21, pp. 20268-20273, 2013/08/26 2013.
- [194] Y. Zhang, *et al.*, "Surface plasmon resonance sensor based on spectral interferometry: numerical analysis," *Applied Optics*, vol. 52, pp. 3253-3259, 2013/05/10 2013.

- [195] I. R. Hooper and J. R. Sambles, "Differential ellipsometric surface plasmon resonance sensors with liquid crystal polarization modulators," *Applied Physics Letters*, vol. 85, pp. 3017-3019, 2004.
- [196] M. J. Heller, "DNA MICROARRAY TECHNOLOGY: Devices, Systems, and Applications," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 4, pp. 129-153, 2002.
- [197] T. X. O'Connell, *et al.*, "Understanding and interpreting serum protein electrophoresis," *American family physician*, vol. 71, pp. 105-12, Jan 1 2005.
- [198] D. F. Keren, *et al.*, "Strategy to diagnose monoclonal gammopathies in serum: high-resolution electrophoresis, immunofixation, and kappa/lambda quantification," *Clinical chemistry*, vol. 34, pp. 2196-201, Nov 1988.
- [199] R. Lakshminarayanan, *et al.*, "Detection by immunofixation of M proteins in hypogammaglobulinemic patients with normal serum protein electrophoresis results," *American journal of clinical pathology*, vol. 127, pp. 746-51, May 2007.
- [200] J. Goudswaard and G. Virella, "Immunochemical determination of human lysozyme by laser nephelometry," *Clinical chemistry*, vol. 23, pp. 967-70, Jun 1977.
- [201] P. Montagne, *et al.*, "Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay of lysozyme in milk and other human body fluids," *Clinical chemistry*, vol. 44, pp. 1610-5, Aug 1998.
- [202] M. Attaelmannan and S. S. Levinson, "Understanding and identifying monoclonal gammopathies," *Clinical chemistry*, vol. 46, pp. 1230-8, Aug 2000.
- [203] M. J. Maurer, *et al.*, "Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 29, pp. 1620-6, 2011.
- [204] H.-T. Tsai, *et al.*, "Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective study," *Blood*, vol. 114, pp. 4928-32, 2009.
- [205] G. Pratt, "The evolving use of serum free light chain assays in haematology," *British journal of haematology*, vol. 141, pp. 413-22, 2008.
- [206] P. I. Nikitin, *et al.*, "Surface plasmon resonance interferometry for biological and chemical sensing," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 54, pp. 43-50, 1999.

ANNEXE 1

Liste des contributions de l'auteur

Articles scientifiques avec comité de lecture :

- Maisonneuve Mathieu, Chiara Valsecchi, Chen Wang, Alexandre Brolo, Michel Meunier, "Leukemic marker detection using a spectro-polarimetric surface plasmon resonance platform", *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier (submitted)
- Bahrami Farshid, Maisonneuve Mathieu, Meunier Michel, Aitchison J Stewart, Mojahedi Mo, "An improved refractive index sensor based on genetic optimization of plasmon waveguide resonance", *Optics Express*, 21, 18, 20863-20872, 2013, Optical Society of America.
- Tawil Nancy, Hatef Ali, Sacher Edward, Maisonneuve Mathieu, Gervais Thomas, Mandeville Rosemonde, Meunier Michel, "Surface Plasmon Resonance Determination of the Binding Mechanisms of L-Cysteine and Mercaptoundecanoic Acid on Gold", *The Journal of Physical Chemistry C*, 117, 13, 6712-6718, 2013, American Chemical Society.
- Maisonneuve Mathieu, D'Avilly Kelly Olivier, Blanchard-Dionne André Pierre, Patskovsky Sergiy, Meunier Michel, "Phase sensitive sensor on plasmonic nanograting structures", *Optics Express*, 19, 27, 26318-26324, 2011, Optical Society of America.
- Maisonneuve Mathieu, Song In-Hyouk, Patskovsky Sergiy, Meunier Michel, "Polarimetric total internal reflection biosensing", *Optics Express*, 19, 8, 7410-7416, 2011, Optical Society of America.
- Patskovsky Sergiy, Maisonneuve Mathieu, Meunier Michel, Kabashin V Andrei, "Mechanical modulation method for ultrasensitive phase measurements in photonics biosensing", *Optics Express*, 16, 26, 21305-21314, 2008, Optical Society of America.
- Patskovsky Sergiy, Vallieres Martin, Maisonneuve Mathieu, Song In-Hyouk, Meunier Michel, Kabashin V Andrei, "Designing efficient zero calibration point for phase-sensitive surface plasmon resonance biosensing", *Optics express*, 17, 4, 2255-2263, 2009, Optical Society of America.

Conférences avec comité de lecture :

- M. Maisonneuve et al., Phase polarization contrast surface plasmon resonance imaging system for high throughput biosensing applications, SPP6, Ottawa, ON, Canada, peer reviewed.
- M. Maisonneuve et al., Spectral surface plasmon resonance microscopy with enhanced spatial sensitivity, Photonics north 2012, Montreal, QC, Canada, peer reviewed.
- M. Maisonneuve et al., Phase sensitive optical biosensors, Optics and Photonics, San Diego, CA, United States, 2010, peer reviewed.
- M. Maisonneuve et al., Biosensing with total internal reflection polarimetry, Photonics north 2009, Quebec, QC, Canada, peer reviewed.
- M. Maisonneuve et al., Highly sensitive surface plasmon resonance biosensing using phase properties of light, Photonics north 2008, Montreal, QC, Canada, peer reviewed, invited talk.