



HAL
open science

Analyse locale des sensibilités des lectures angulaires, spectroscopiques et ellipsométriques de la Résonance des Plasmons de Surface en vue de la miniaturisation des biocapteurs optiques

Guillaume Legay

► **To cite this version:**

Guillaume Legay. Analyse locale des sensibilités des lectures angulaires, spectroscopiques et ellipsométriques de la Résonance des Plasmons de Surface en vue de la miniaturisation des biocapteurs optiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Bourgogne, 2006. Français. NNT: . tel-00115725

HAL Id: tel-00115725

<https://theses.hal.science/tel-00115725>

Submitted on 22 Nov 2006

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

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



Université
de
Bourgogne

Ecole Doctorale CARNOT

Thèse

présentée pour obtenir le grade de

Docteur en Physique

par **Guillaume LEGAY**

Analyse locale des sensibilités des lectures angulaires, spectroscopiques et ellipsométriques de la Résonance des Plasmons de Surface en vue de la miniaturisation des biocapteurs optiques

Soutenue publiquement le Vendredi 08 Septembre 2006, devant la commission d'examen
composée de :

Jean AUBARD	Professeur, Université Denis Diderot, Paris VII	<i>Rapporteur</i>
Michaël CANVA	Chargé de Recherche CNRS, Institut d'Optique, Paris	<i>Rapporteur</i>
Alain DEREUX	Professeur, Université de Bourgogne	<i>Directeur de thèse</i>
Eric FINOT	Professeur, Université de Bourgogne	<i>Co-Directeur de thèse</i>
Marcelo GOFFMAN	Ingénieur CEA, Saclay	<i>Rapporteur</i>
Pascal MAILLEY	Maître de Conférence, Université J. Fourier, Grenoble	<i>Examineur</i>
Rita MEUNIER-PREST	Chargé de Recherche CNRS, Université de Bourgogne	<i>Examineur</i>
Hervé RIGNEAULT	Directeur de Recherche CNRS, Institut Fresnel, Marseille	<i>Président du jury</i>

Laboratoire de Physique de l'Université de Bourgogne (LPUB), UMR CNRS 5027
Equipe Submicronique-Nanocapteur
www.u-bourgogne.fr/LPUB/

Faculté des Sciences Mirande, 9 avenue Alain Savary, BP47870, 21078 Dijon, France



Remerciements

Les mots sont malheureusement souvent imparfaits pour exprimer la gratitude que je ressens vis-à-vis de nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse. Je vais néanmoins tenter ce périlleux exercice.

Je souhaite en premier lieu remercier les Professeurs Jean Paul Champion, directeur du Laboratoire de Physique de l'Université de Bourgogne, et Alain Dereux, coordinateur de l'équipe Nanosciences-optique submicronique, structures qui m'ont accueillies et formées au cours de ces années de thèse.

Je remercie très sincèrement Messieurs Jean Aubard, Michaël Canva et Marcello Goffman d'avoir accepté la lourde et pénible tâche (encore plus en période estival) d'être rapporteurs de cette thèse. Leurs remarques pertinentes au cours de la soutenance m'ont permis, une nouvelle fois, d'apprécier le rôle prépondérant que joue l'interdisciplinarité dans la recherche actuelle. Je remercie M. Hervé Rigneault de l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail, et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mes remerciements vont également à M. Pascal Mailley, sans qui le mot « polymérique » serait resté à jamais dans mon vocabulaire, pour avoir participé à ce jury mais également pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir au cours de notre collaboration. C'est grâce à Rita Meunier-Prest que mes vagues souvenirs de chimie en début de thèse ont pu être exploités et complétés, je la remercie donc de sa grande patience et de sa présence parmi les membres du jury.

Ma collaboration avec Eric Finot a commencé au cours de l'été 2000, quand, par obligation de trouver un stage, j'ai poussé la porte du labo de ce tout jeune nommé Maître de Conférences. Lors de ce stage, son enthousiasme et son imagination créative m'ont présenté le monde de la recherche sous son aspect le plus passionnant. C'est tout naturellement que j'ai saisi l'opportunité de travailler quelques années de plus avec lui. L'histoire m'a montré que j'avais fait le bon choix, Eric a su, malgré un emploi du temps débordant, être présent quotidiennement pour répondre à toutes mes interrogations et m'en poser de nombreuses autres. Ton attention, ta gentillesse et ta clairvoyance sont reconnues par les nombreux stagiaires et thésards qui t'ont côtoyés. Je ne peux que le répéter. Je te remercie d'avoir toujours fait en sorte que ce travail soit meilleur.

Tout au long de ces années, j'ai également eu la chance de collaborer étroitement avec tous les membres de l'équipe Nanosciences. Je les remercie de l'ambiance dans laquelle tout s'est déroulé, que ce soit autour d'un café, d'un repas au RU, devant une expérience ou dans un bureau, vous avez tous contribué à la finalisation de ce mémoire ! Un grand merci à : Jean Claude « Prof » Weeber, qui m'a appris ce qu'est vraiment un plasmon, Laurent « le chimiste » Markey, qui nous a évité le pire, Yvon « l'évap » Lacroute, la bibliothèque process et machine, Gérard « nouveau chef » Colas des Francs, avec qui je vais pouvoir goûter aux joies du champ proche optique, Alexandre « l'américain » Bouhelier, qui va y contribuer également, Elly « bonne humeur » Lacroute, Cristina « Barca » Brun, Eric Lesniwska (merci encore pour les chaussures !), Eric Bourillot et Thierry David (qui m'ont souvent dépanné).

Je tiens à souligner la contribution importante des différents stagiaires que j'ai eu l'immense plaisir de co-encadrer et de brimer au cours de cette thèse : Florent, Allan, Thibaud, Nicolas (dans le froid du Québec), Amélie (bon courage, je n'ai mis ici que les qualités d'Eric ☺). Je les en remercie vivement.

On croise parfois dans un labo des personnes formidables, je crois que j'ai la chance d'en avoir rencontré quelques unes, merci à vous Johann, Alexandre, Christophe et Anne Laure (euh non pas toi ☺) d'avoir partagé ces moments avec moi.

Une équipe ne vit pas sans thésard, post doc ou stagiaire, alors à ceux que j'ai croisé, avant, au cours et après la thèse, j'adresse un grand merci : Romain, Cédric C., Arnaud, Cédric P., Jérémie, Aurélie, Maria, Dario (on en reparlera en 2010), Rachid, Aurélien, Hélène, Mickaël.....

J'ai également eu l'honneur de participer à l'Experimentarium (www.u-bourgogne.fr/experimentarium), espace de rencontres entre des jeunes chercheurs et le grand public. Ces rencontres m'ont apportés énormément grâce à tous les participants, et surtout merci à toi Lionel Maillot d'avoir rendu ces journées possibles.

Je dédie ce mémoire à mes parents qui m'ont constamment encouragé et soutenu dans mes études et dans mes choix. Ils ont su m'apporter le sens du travail et du sérieux et ont toujours fait de leur mieux pour m'aider à minimiser les problèmes du quotidien. Enfin, la relecture du mémoire et la correction des nombreuses coquilles sont l'œuvre de Marion, merci encore petite sœur !

Pour clore ces remerciements, je tenais à remercier du plus profond de mon cœur, Nadia ma femme, sans qui, pour moi, l'aventure scientifique se serait arrêtée il y a bien des années. Merci de ton sourire, de ta présence et de ta compréhension chaque jour. Pour la vie et quelques jours de plus.

*À ceux qui ne sont plus là,
À mes parents,
À Nadia.*

Table des matières

Introduction générale.....	11
Chapitre I : Etat de l'art	15
1.1 Introduction.....	15
1.2 Le greffage des molécules sondes en surface.....	17
1.2.1 Liaison préférentielle par l'intermédiaire d'un groupement additionnel	18
1.2.2 L'électropolymérisation	18
1.3 Les biopuces	19
1.4 Les transducteurs mécaniques.....	22
1.4.1 Les Microbalances à Quartz (Quartz Cristal Microbalance - QCM)	22
1.4.2 Les Ondes Acoustiques de Surface (SAW)	22
1.4.3 Les microleviers	23
1.5 Les transducteurs électrochimiques	25
1.6 Les transducteurs optiques.....	26
1.6.1 L'ellipsométrie spectroscopique	26
1.6.2 La Résonance des Plasmons de Surface (RPS).....	30
1.6.3 Le couplage de l'ellipsométrie spectroscopique et de la RPS	34
1.7 Conclusion	35
Chapitre II : Analyse des propriétés locales de couches métalliques, polymères et biologiques par Microscopie à Force Atomique.....	37
2.1 Introduction.....	37
2.2 Imagerie de couches minces.....	38
2.2.1 Couches minces métalliques	39
2.2.1.1 Choix du substrat.....	39
2.2.1.2 Dépôts de couches métalliques par évaporation thermique	39
2.2.2 Couches minces polymères	41
2.2.3 Couches minces biologiques.....	42
2.2.3.1 Immobilisation des monobrinns d'ADN et de la protéine sur la surface d'or.....	43
2.2.3.2 Caractérisation des couches d'or greffées.....	43
2.3 Mesure d'épaisseur de couches minces métalliques, polymères et biologiques.....	44
2.3.1 Gravure mécanique de couches minces métalliques et polymères	44
2.3.2 Nanorayure par la pointe AFM de monocouches biologiques	45
2.3.3 Détermination des profondeurs d'indentation et des modules d'élasticité de couches biologiques [122].....	46
2.3.3.1 Mesures de forces dans l'air.....	46
2.3.3.2 Mesures de forces en solution tampon.....	48
2.4 Mesure d'adhérence entre la pointe et la couche d'ADN dans l'air [122].....	50
2.5 Structuration de la surface par lithographie par faisceau d'électrons [122].....	52
2.5.1 Fabrication des pavés d'or	53
2.5.2 Mesures différentielles d'épaisseurs.....	55
2.5.2.1 Pavés d'or seuls.....	55
2.5.2.2 Pavés d'or dans l'air greffés par des monobrinns d'ADN.....	56
2.5.2.3 Pavés d'or en liquide greffés par des monobrinns d'ADN	58
2.6 Conclusion	59
Etude mono-capteurs optiques.....	61

Chapitre III : Analyse des propriétés locales de couches métalliques, polymères et biologiques par ellipsométrie spectroscopique 63

3.1 Introduction.....	63
3.2 Principes et appareils.....	64
3.2.1 Théoriquement.....	64
3.2.1.1 Réflexion sur un système multicouche	64
3.2.1.2 Simulation de la rugosité	67
3.2.2 Appareil utilisé et optimisation	68
3.2.2.1 Description de l'ellipsomètre à modulation de phase.....	68
3.2.2.2 Optimisation de l'acquisition.....	71
3.3 Caractérisation de métaux.....	74
3.3.1 Mesure de l'indice de l'or	74
3.3.2 Mesure de l'indice du chrome	76
3.3.3 Mesure d'épaisseur de multicouches métalliques.....	77
3.4 Détermination de la dépendance spectrale et thermique de l'indice de réfraction des polymères.....	80
3.4.1 Dépendance spectrale de l'indice du PMMA	81
3.4.2 Etude de la transition de phase vitreuse d'un polymère.....	82
3.5 Détermination de l'épaisseur et de l'indice de biopolymères : l'ADN.....	84
3.5.1 Etude <i>ex situ</i>	84
3.5.2 Etude <i>in situ</i>	88
3.6 Conclusion	90

Chapitre IV : Sensibilité théorique et expérimentale à l'adsorption de la RPS par lecture angulaire..... 91

4.1 Introduction.....	91
4.2 Définition de la sensibilité du capteur.....	91
4.3 Détermination théorique et expérimentale de l'influence des paramètres du système sur les sensibilités à l'adsorption.	93
4.3.1 Dispositif expérimental	93
4.3.2 Alignement et polarisation du système.....	94
4.3.3 Sensibilité à l'indice du milieu extérieur	95
4.3.4 Influence des différents constituants du dispositif	97
4.3.4.1 Influence de la longueur d'onde incidente.....	97
4.3.4.2 Influence de l'indice du prisme.....	99
4.3.4.3 Influence de l'épaisseur d'or.....	100
4.3.4.4 Influence de l'indice de la couche adsorbée.....	102
4.3.4.5 Conclusion.....	103
4.3.5 Détection de la fonctionnalisation de l'or par une couche biologique.	103
4.3.5.1 Etude dans l'air	103
4.3.5.2 Etude en liquide.....	104
4.3.5.3 Hybridation.....	106
4.4 Conclusion	107

Chapitre V : Lecture ellipsométrique de la RPS..... 109

5.1 Introduction.....	109
5.2 Influence paramétrique du système sur les sensibilités à l'adsorption.....	109
5.2.1 Choix de l'indice du prisme et influence de l'angle d'incidence	111
5.2.1.1 Indice et géométrie du prisme.....	111
5.2.1.2 Influence de l'angle d'incidence.....	113
5.2.2 Influence de l'épaisseur d'or et de la couche de chrome.....	114
5.2.3 Influence de l'indice et de l'épaisseur de la couche adsorbée	116
5.3 Mise en place du dispositif expérimental	118

5.4 Applications à l'étude de couches polymères et biologiques	121
5.4.1 Etude d'une couche mince polymère	121
5.4.2 Applications biologiques	125
5.4.2.1 Greffage non spécifique : cas de la T3 ARN Polymérase	127
5.4.2.2 Greffage spécifique : adsorption passive de monobriens thiolés d'ADN	128
5.4.2.3 Greffage spécifique : adsorption électroactive de chaînes thiolées	132
5.4.3 Interaction moléculaire anticorps / antigène	136
5.4.4 Application physico-chimique : transition de phase de la silice en ciment romain CSH	137
5.5 Conclusion	139
De l'étude monocapteur à multicapteurs	141
Chapitre VI : La miniaturisation des capteurs optiques	143
6.1 Introduction	143
6.2 Imagerie par RPS	143
6.2.1 Cartographie du champ proche optique [176]	144
6.2.2 Imagerie RPS en champ lointain	148
6.2.2.1 Dispositif	148
6.2.2.2 Déformation de l'image et orientation de la CCD	149
6.2.2.3 Observation avec une source cohérente	151
6.2.2.4 Résolution en source incohérente	152
6.3 L'imagerie ellipsométrique spectroscopique à balayage	154
6.3.1 Résolution latérale théorique	154
6.3.2 Application à l'étude d'une couche mince microstructurée	156
6.3.2.1 Détection par ellipsométrie spectroscopique	157
6.3.2.2 L'apport de la RPS	159
6.3.3 Analyse d'une puce biologique	162
6.3.3.1 Lecture de la puce par ellipsométrie spectroscopique dans l'air	162
6.3.3.2 Lecture de la puce par l'analyse ellipsométrique de la RPS en liquide	164
6.4 Conclusion	166
Chapitre VII : Conclusion et perspectives	167
Annexe A : Conditions d'excitation et relations de dispersion des plasmons de surface	171
Annexe B : Etapes de la réalisation de cellules microfluidique	177
Bibliographie	179

Introduction générale

Contexte et problématique de l'étude

La biologie moléculaire est à la recherche de nouvelles techniques pour sonder de manière rapide, fiable, sensible et économique des interactions entre molécules. Cette attente concerne le génome en médecine, la recherche en pharmacie, la détection des produits organiques volatiles pour la protection de l'environnement et l'analyse des organismes génétiquement modifiés (OGM) en agriculture.

Les puces à ADN, dont la détection est réalisée par fluorescence, ont démontré leur efficacité pour la détection de l'interaction spécifique ADN-ADN depuis plusieurs années. Pour ce qui concerne l'analyse de protéines, des techniques de détection d'interactions protéines/protéines sur puce ont récemment émergées ; la détection est dans ce cas souvent réalisée au travers de l'utilisation de marqueurs fluorescents (domaine des « protein chips »). Néanmoins, si on s'intéresse à l'analyse fine des interactions mises en jeu, c'est-à-dire visualiser en temps réel la cinétique de l'interaction, la modification de la protéine (marquage) est alors susceptible de changer la distribution de charges et, par-là même, de modifier l'affinité des sites de reconnaissance. Cependant, les progrès enregistrés ces 30 dernières années dans des domaines aussi divers que la biologie, la chimie de surface et la physique, ouvrent la voie à de nouvelles techniques de détection évitant le marquage des molécules à analyser.

La convergence finale de ces développements est la réalisation de laboratoires sur puce (« lab-on-a-chip »). Ces systèmes devront permettre à terme d'effectuer les batteries de tests médicaux, grands consommateurs de temps et d'échantillons d'analyse, sur un seul et même substrat.

La protéomique et la miniaturisation attendue confèrent donc un intérêt capital au développement de méthodes expérimentales n'utilisant pas de marqueur fluorescent et permettant de détecter de manière sensible, fiable et rapide les interactions biospécifiques.

Démarche suivie

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette thématique : il s'agit de développer et de comparer différentes techniques de détection de phénomènes de surface et de proposer des solutions permettant d'améliorer la sensibilité et la compacité de tels capteurs.

Les puces ADN, basées sur une détection par fluorescence, ont permis l'intégration de plusieurs milliers de zones d'interactions par échantillon. Même s'il est clair qu'une puce très haute densité accélère grandement la durée de manipulation, le temps nécessaire à l'analyse augmente proportionnellement. Les puces à protéine ne demandent pas une densité aussi importante : dans le cas d'une analyse clinique par exemple, une analyse rapide est demandée. Une dizaine voire une centaine de zones d'interactions par échantillon est donc suffisante.

La définition de la sensibilité d'un biocapteur est différente selon l'approche choisie : il est actuellement courant, dans la littérature, de définir comme sensibilité la concentration minimale de la molécule analysée détectable ou la masse adsorbée à la surface du capteur. Il est à noter que les techniques de détection s'affranchissant du marquage ne possèdent pas toutes la capacité à la miniaturisation. Il convient donc de déceler, parmi celles-ci, les techniques adéquates et de

proposer des solutions permettant une miniaturisation efficace. La miniaturisation de ces biocapteurs nécessite alors de définir une sensibilité relative à l'aire active du capteur. Dans ce cas, la sensibilité et la miniaturisation du capteur sont donc deux paramètres indissociables pour conclure sur l'intérêt d'une technique de détection.

Parmi les approches possibles, notre choix s'est porté sur une détection optique des interactions. Le principal atout des capteurs basés sur une détection optique est le caractère non destructif de l'analyse, autorisant des mesures *in situ* et en temps réel, et donc le suivi des cinétiques d'interaction, ouvrant ainsi la voie à l'étude de méthodes permettant d'accélérer les dépôts. L'imagerie et la structuration de la surface d'interaction autorisent également une miniaturisation du dispositif, et donc une augmentation du nombre de sites d'interaction.

Les techniques de lecture optique respectant les conditions énoncées précédemment sont principalement l'ellipsométrie et la résonance des plasmons de surface. Ces deux techniques sont à la fois sensibles à l'épaisseur, à l'indice optique et au taux de recouvrement des différentes couches de l'échantillon à analyser. Lors de l'adsorption de molécules biologiques, ou plus généralement d'une couche supplémentaire à l'échantillon, c'est la variation de ces paramètres qui sera responsable du changement de signal.

Nous nous sommes attachés dans ce mémoire à déterminer les sensibilités à l'adsorption de molécules biologiques de l'ellipsométrie et de la résonance des plasmons de surface, tout en explorant les pistes permettant une miniaturisation efficace de ces capteurs.

La détection d'un signal physique s'accompagne également de la compréhension et de la modélisation des phénomènes mis en jeu à la surface du capteur. En ce sens, une analyse en microscopie à sonde locale semble inévitable pour caractériser les propriétés physiques, morphologiques et topographiques des dépôts.

Plan de thèse

Le **chapitre 1** présentera l'état de l'art concernant les différentes approches de lectures employées dans le domaine des biocapteurs, plus particulièrement pour ceux basés sur l'ellipsométrie et la résonance des plasmons de surface. On s'attachera également à définir les techniques d'immobilisation de surface les plus utilisées, et à expliciter le rôle et le choix de molécules biologiques étudiées dans ce travail.

L'analyse des propriétés locales de couches métalliques, polymériques et biologiques par microscopie à force atomique sera exposée dans le **chapitre 2**. Cette étude exploitera les différents champs d'application du microscope à force atomique, à savoir la mesure de rugosité de surface, d'épaisseur et de forces. Une technique originale de mesure d'épaisseur par couplage de la microfabrication et de la microscopie à force atomique sera présentée. Les résultats obtenus sont d'un intérêt primordial pour mieux appréhender les variations de signaux des capteurs optiques.

Nous aborderons alors le premier axe d'étude des capteurs optique, à savoir leur emploi en tant que **monocapteur**. Cet axe fera l'objet de 3 chapitres.

Le **chapitre 3** sera ainsi consacré à l'étude de différentes couches minces par ellipsométrie spectroscopique ainsi qu'à l'évaluation de son potentiel en tant que biocapteur. L'ellipsométrie sera employée pour caractériser les couches métalliques utilisées dans le greffage des molécules biologiques. Des couches minces de polymères, structurables et possédant des propriétés

optiques proche des molécules biologiques, seront également étudiées comme modèles biologiques. Enfin, la sensibilité à l'adsorption de molécules biologiques dans l'air et en milieu aqueux pour l'adsorption de monobrins d'ADN sera également discutée.

L'exploitation du phénomène de résonance des plasmons de surface pour détecter le greffage de molécules sera étudiée dans le **chapitre 4**. Nous décrirons théoriquement leur sensibilité angulaire à l'adsorption, puis nous évaluerons expérimentalement cette sensibilité pour l'étude de monocouches biologiques caractérisées par AFM.

Le **chapitre 5** sera consacré à une approche originale basée sur une caractérisation ellipsométrique et spectroscopique de la résonance des plasmons de surface. Nous évaluerons l'intérêt de cette démarche pour l'augmentation de la sensibilité du capteur, notamment grâce à la détection de phase. Outre l'étude de couches polymériques ultra-minces, l'étude du greffage en temps réel de 3 types de molécules biologiques sera présentée. Elles nous permettront de discuter les modèles de cinétiques de greffage en fonction de la nature des complexes moléculaires et de leur interaction avec le substrat. Nous présenterons enfin quelques applications futures envisagées à travers cette technique.

L'aptitude à la miniaturisation des capteurs optiques, et donc leur potentialité en tant que multicapteurs, et les types de détection associés à celle-ci seront discutés dans la deuxième partie du mémoire qui sera l'objet du **chapitre 6**. Ainsi sera présenté l'apport de la structuration de couches minces de polymères pour **l'imagerie plasmonique**, ainsi que les possibilités de miniaturisation en évoquant les résolutions maximales obtenues en champ proche et lointain. Enfin, les potentialités de **l'ellipsométrie en microscopie à balayage** déterminées par l'emploi conjugué d'une platine motorisée et d'échantillons métallisés en or recouverts d'une couche nanométrique de PMMA microstructurée seront analysées. Les dimensions critiques latérales et l'espacement optimal de ces microstructures seront déterminés pour évaluer la résolution et la sensibilité du système d'imagerie. Cette étude sera reconduite lors d'une analyse couplant l'ellipsométrie spectroscopique et la résonance des plasmons de surface.

Chapitre I : Etat de l'art

1.1 Introduction

Un biocapteur est un système qui détecte un composé à analyser via des réactions biologiques. Il relie l'élément de reconnaissance biologique (qui réagit avec l'analyte) à un transducteur qui transforme cette bio-reconnaissance en un signal physique utile. Le dispositif de cette bio-reconnaissance se base sur un greffage sélectif d'un analyte cible sur un ligand récepteur (sonde). C'est la mise en parallèle de biocapteurs qui permet de définir une biopuce, dans la mesure où une bio-reconnaissance spécifique peut être associée à chacun de ces biocapteurs. L'intégration de l'ensemble de ces capteurs nécessite une miniaturisation de ceux-ci. La densité des zones indépendantes d'interactions est alors définie comme faible (25 structures / cm^2) ou haute (1000 structures / cm^2). De plus, l'augmentation de la densité de ces zones permet de limiter les volumes de réactifs nécessaires, d'augmenter le rendement de l'analyse par la multiplication des essais et la sensibilité de détection.

Les biopuces à ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ont joué un rôle moteur dans la miniaturisation des biocapteurs. Historiquement, 9 années séparent la découverte de l'ADN comme support des gènes (1944 [1]) et la caractérisation de sa structure (1953 [2]), alors que près de 50 ans se sont écoulés avant que les 35 000 gènes humains ne soient cartographiés [3]. Entre ces deux dates clés de la génétique, les méthodes de détection de séquences spécifiques ont complètement évolué. En effet, l'intégration systématique des puces à ADN, à partir des années 1990, a permis des avancées gigantesques en quelques années.

Leur principe repose sur la reconnaissance entre des oligonucléotides sondes, qui sont des fragments courts d'ADN, fixés sur une surface, avec des oligonucléotides cibles libres en solution. L'information génétique est portée par l'enchaînement précis des quatre bases élémentaires composant l'ADN, à savoir l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. Les multiples combinaisons possibles entre les bases ainsi que la longueur de la séquence sont caractéristiques d'un gène.

La mise en présence de séquences cibles et de sondes complémentaires conduit à l'hybridation de celles-ci selon les règles d'appariement définies par Crick [4]. L'hybridation moléculaire désigne donc l'association qui a lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T), et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G) (**Figure 1.1**). La stabilité des duplex dépend de nombreux facteurs en plus de la composition en bases : longueurs des duplex formés, taux de guanine, milieu (pH, salinité, température...).

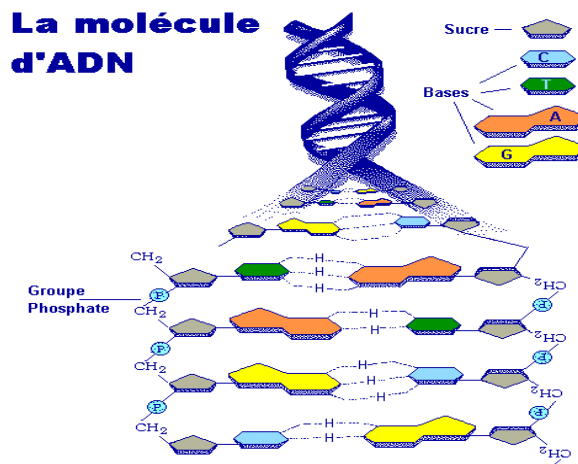


Figure 1.1 : Représentation schématique de la double hélice d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN). La liaison entre les brins complémentaires suit la règle d'appariement suivante: Guanine – Cytosine et Thymine – Adénine.

L'expression des gènes dans l'organisme se traduit par la production des ARN messagers lors de la transcription de l'ADN. Ce sont les ARN messagers qui sont à l'origine de la création des protéines dans l'organisme. Les protéines ont des fonctions très diverses : certaines pourront avoir une fonction structurale (elles participent à la cohésion structurale des cellules entre elles), enzymatique (elles catalysent les réactions chimiques de la matière vivante) ou encore une fonction de messenger (pour les protéines impliquées dans des processus de signalisation cellulaire). Les protéines sont donc une partie de l'expression des gènes et leur rôle est crucial dans le fonctionnement de tout organisme. La mise en évidence, ces dernières années, d'un grand nombre de gènes impliqués dans des pathologies humaines très diverses, souvent accompagnés par la production de protéines spécifiques, accentue le besoin croissant de posséder des méthodes de détection fiable de la présence dans l'organisme étudié de celles-ci. A l'heure actuelle, les méthodes utilisées pour analyser les protéines (électrophorèse sur gel, digestion enzymatique, spectrométrie de masse) restent limitées par leur faible débit et leur faible reproductibilité.

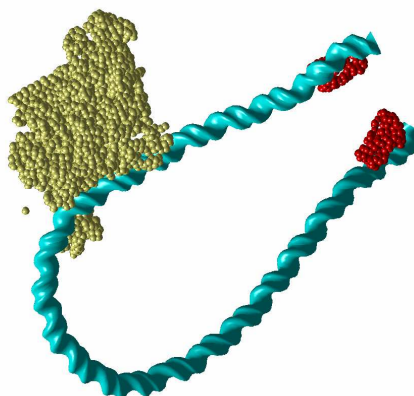


Figure 1.2: Schéma d'interaction entre un double brin d'ADN (filament en hélice) et une protéine (RNA polymérase).

Les puces à protéines reposent sur un principe similaire aux puces à ADN, c'est-à-dire une reconnaissance spécifique entre une entité fixée sur une surface et une entité libre. L'entité fixée à la surface est de nature variable, dépendant naturellement de la protéine analysée : il peut

s'agir de protéines, d'oligonucléotides (**Figure 1.2**), de peptides, d'anticorps ou d'enzymes. Comme nous l'avons déjà précisé, contrairement aux puces à ADN qui sont à haute densité, les puces à protéines peuvent être à faible densité.

Les techniques alternatives de lectures les plus courantes sont de type mécanique, chimique ou optique. Elles reposent sur plusieurs étapes communes (**Figure 1.3**) :

- le greffage de molécules sondes sur une surface ;
- la reconnaissance moléculaire entre les molécules cibles et sondes ;
- la lecture de cette reconnaissance via un transducteur.

Mon travail s'est principalement focalisé sur la caractérisation avant et après fonctionnalisation de la surface du transducteur, sur la structuration de la surface permettant la miniaturisation des zones d'interactions, ainsi que sur l'amélioration de la sensibilité des transducteurs étudiés.

Avant de s'intéresser aux principales méthodes de détection existantes, et d'évoquer leur limitation, il convient de décrire les différents mécanismes utilisés pour assurer le greffage des molécules à la surface des capteurs.

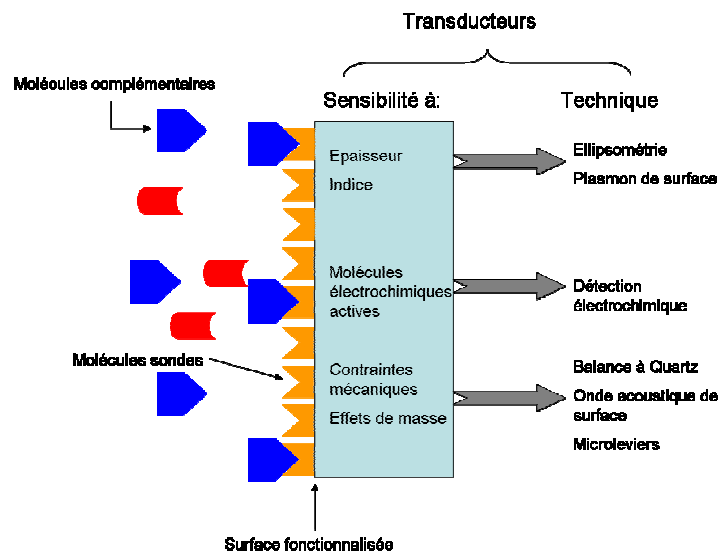


Figure 1.3 : Modes possibles de transduction sans marquage pour la détection d'une molécule complémentaire (cible) mis en solution en contact avec la surface fonctionnalisée par les molécules sondes.

1.2 Le greffage des molécules sondes en surface

Selon la nature chimique du transducteur et la nature de la molécule greffée, plusieurs techniques ont été développées. De même, en fonction des techniques utilisées, la reproductibilité, les dimensions du dépôt ainsi que ses propriétés intrinsèques, vont varier. Cette étape est donc primordiale pour la réalisation d'un biocapteur. Ces techniques se différencient par le type de liaison obtenue entre le substrat et la molécule sonde. Nous avons fait le choix de ne présenter ici que deux types de greffage qui ont été employés durant ce travail de thèse. Des systèmes de plus en plus élaborés et complexes sont également utilisés, mettant par exemple à

profit la grande affinité entre des entités chimiques telles que l'avidine et la biotine [[5], les maléimides et le thiol [6], l'ester de NHS et les amines [7], les thiocyanates et les amines [8] ou même les liaisons électrostatiques [9].

1.2.1 Liaison préférentielle par l'intermédiaire d'un groupement additionnel

La fixation des produits biologiques en surface peut être assurée par la modification des molécules sondes en leur greffant chimiquement des groupements ayant une forte affinité avec le substrat, comportement remarqué lors de l'étude des monocouches auto-assemblées (Self Assembled Monolayer, SAM). L'auto-assemblage, au sens général du terme, peut être défini comme la formation de structures hiérarchiques complexes à partir de « briques » simples. La conformation de la couche ainsi fixée dépend à la fois des interactions entre la surface et les molécules adsorbées (forces électrostatiques, liaisons hydrogène ou covalentes) ainsi que de la qualité et de la rugosité du substrat. La modification des produits biologiques par ces groupements permet alors leur fixation en surface. Communément deux groupements sont utilisés : les alkyl-trichlorosilanes [10] pour les surfaces à base de silicium ou de verre et les n-alkanthiols pour les surfaces en or. Les alkyl-trichlorosilanes sont particulièrement utilisés dans les biopuces de types « microarray » fluorescentes où le substrat employé est une lame en verre de microscope[8].

Nous avons utilisé les n-alkanethiols, ou par abus de langage thiols. Ce sont des molécules composées d'une chaîne carbonée de longueur variable possédant une terminaison soufrée. Le soufre a une très grande affinité avec les métaux, probablement par la possibilité de former de multiples liaisons avec les sites libres en surface [11-14]. Parmi les métaux exploitables pour le greffage de n-alkanethiols, l'or présente plusieurs avantages : il est naturellement conducteur, et peut ainsi intervenir dans un mode de transduction électrochimique, voire même optique lorsque son épaisseur est ramenée à quelques centaines d'Å. La réaction entre le substrat d'or et l'alkanethiol peut être considérée comme une réaction d'oxydation de la liaison S-H avec la surface d'or, suivie de la réduction de l'hydrogène :



La liaison entre le groupement thiolé et la surface d'or est très énergétique, approximativement 40 kcal.mol⁻¹. Les forces attractives de Van der Waals entre les chaînes alkyles voisines augmentent la stabilité et l'ordre de la couche auto-assemblée. De ce fait, les longues chaînes sont plus ordonnées que les petites. L'énergie de la liaison créée entre la surface et le groupement assure que les produits biologiques soient fortement fixés à la surface, les étapes de rinçage ne pourront donc pas désorber la monocouche. Le greffage des thiols à l'extrémité de molécules sondes est décrit par [15].

L'adsorption de thiols en surface peut être passive, c'est-à-dire en assurant simplement leur présence près de la surface d'or, ou électroactive, en appliquant un potentiel électrique à la surface, ce qui accélère théoriquement la cinétique de greffage. Les cinétiques de greffage et la nature du dépôt obtenues seront alors dépendantes de la méthode choisie.

1.2.2 L'électropolymérisation

L'accrochage des molécules biologiques sur des monomères, suivi de leur polymérisation en surface, permet également le greffage de molécules sondes. Les polymères conducteurs

souvent utilisés, tels que la polyvaniline, le polyphénol ou le polypyrrole [16] (**Figure 1.4**), ont la capacité de former des liaisons covalentes avec de nombreuses espèces chimiques, dont l'ADN [17,18].

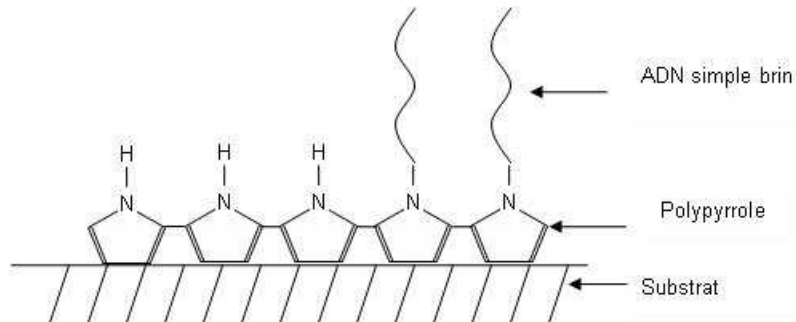


Figure 1.4 : Représentation schématique de monobrin d'ADN fixés sur une surface par l'intermédiaire du polypyrrole.

La copolymérisation et le dépôt du pyrrole sont assurés par le déplacement dans les trois dimensions d'un embout de pipette contenant la solution de pyrrole et une contre électrode de platine [19], (**Figure 1.5**). Lors du contact entre l'extrémité de la pipette et la surface, une impulsion électrique est appliquée permettant la réaction de copolymérisation. La structure, l'épaisseur et la densité de polymère ainsi déposé peuvent être contrôlées par l'intermédiaire de l'amplitude (environ 2V) et la durée (quelques ms, typiquement entre 40 et 500) de l'impulsion appliquée.

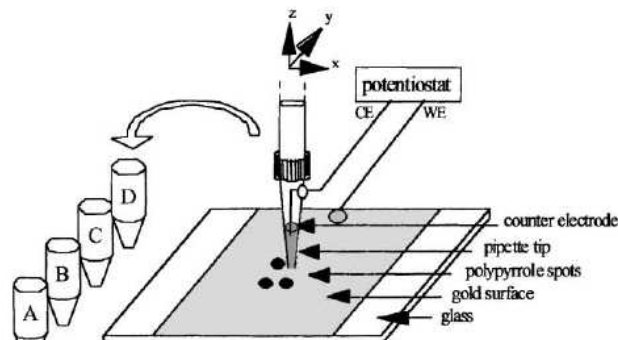


Figure 1.5 : Principe de la copolymérisation du pyrrole sous forme de plots grâce à une micropipette reliée à un potentiostat (issu de [19]).

La taille du dépôt va dépendre des propriétés géométriques de l'embout de pipette, un diamètre inférieur à 500 μm est annoncé. L'avantage de cette technique électrochimique est la possibilité de réaliser un multicapteur sélectif [20] en structurant l'échantillon et adressant électriquement et individuellement chaque structure.

Maintenant que les techniques de greffage utilisées au cours de ce travail ont été définies, et avant de s'intéresser aux transducteurs n'utilisant pas de marquage, il paraît nécessaire de présenter les caractéristiques et les évolutions des biopuces, basées sur un marquage fluorescent, qui possèdent encore actuellement une miniaturisation et une sensibilité inégalées.

1.3 Les biopuces

Des modes de transduction possibles, les mesures de fluorescence ou de radioactivité sont les plus souvent rencontrées dans les laboratoires de biochimie. Ces protocoles nécessitent

de greffer à la molécule cible soit une molécule fluorescente, soit un radiomarqueur (**Figure 1.6**). Ces deux types de détection sont les bases, depuis plusieurs années, des biopuces à ADN.

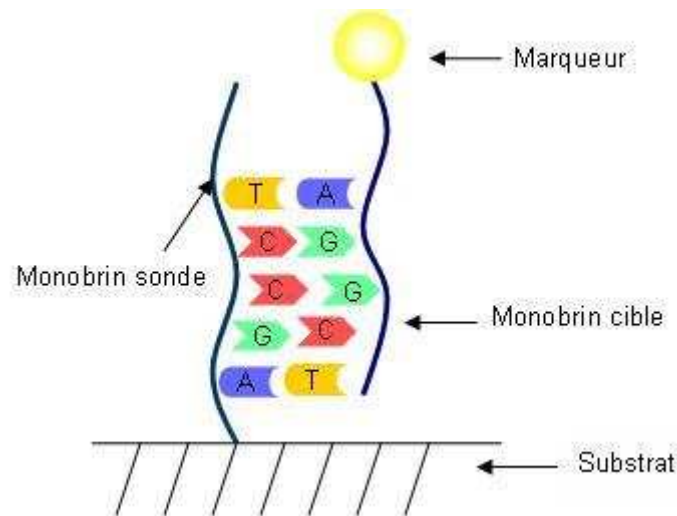


Figure 1.6 : Schéma de l'interaction entre un monobrin sonde et un monobrin cible portant un marqueur (fluorescent ou radioactif).

Le radiomarquage consiste à substituer à un atome de la molécule cible un atome radioactif, par exemple le radio-isotope du phosphore : le phosphore 32 (^{32}P). Les premières biopuces étaient basées sur le radiomarquage, conçues sur des membranes poreuses de nylon, appelées généralement « macroarray ». Basée sur la migration des espèces à travers un gel, cette technique est relativement lente. De plus, de par leur nature même, les membranes poreuses ne permettent pas une définition précise des zones d'interactions. Du fait d'une résolution latérale pour ce type de lecture de l'ordre de 300 μm , l'utilisation d'isotopes radioactifs comme marqueurs des séquences cibles se révèle peu intéressante pour les biopuces. Enfin, le principal inconvénient de la radioactivité repose sur les risques de contamination, d'autant plus graves que les atomes sont intégrés dans les molécules biologiques assimilables par ingestion dans l'organisme humain.

Le Projet du Génome Humain (HGP), créé aux USA en 1990 avec pour objectif de décrypter le génome humain, a redéfini les besoins des biopuces : le nombre important de gènes présents dans l'organisme nécessite en effet d'augmenter la capacité d'intégration des biopuces existantes. Les membranes poreuses et la détection par marqueur radioactif ne permettant pas d'atteindre cet objectif, ce sont les supports rigides et une lecture par fluorescence qui ont été choisis. En parallèle, l'évolution des techniques de greffage a permis l'utilisation de lame de verre comme support solide permettant un accrochage des molécules par silanisation. Plusieurs compagnies commercialisent des instruments prêts à l'emploi basés sur ce type de détection. Le fluorophore possède la propriété optique d'absorber l'énergie de la lumière d'excitation et de la restituer rapidement, c'est-à-dire en moins d'une nanoseconde, sous la forme de lumière fluorescente.

L'intégration d'un grand nombre de sites d'interaction a également été rendue possible grâce aux progrès réalisés en robotique, permettant un greffage plus précis. Les puces obtenues sont alors dénommées « microarray » [21-23] en rapport avec la taille des spots obtenus, de l'ordre d'une centaine de μm .

Le progrès dans le domaine des biopuces est constant, et actuellement la société Affymetrix commercialise une puce à oligonucléotides synthétisés *in situ* par photolithographie [22], réduisant d'un facteur 5 la taille des spots et augmentant donc de façon impressionnante le nombre de sites d'interaction sur un même substrat. La résolution latérale actuelle des appareils

commerciaux est d'environ $10 \mu\text{m}$ et leur sensibilité permet de détecter jusqu'à une molécule fluorescente par μm^2 . Cette méthode reste la plus performante pour la détection de l'hybridation de l'ADN concentrée à 1 pM ($10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$). Les caractéristiques des biopuces à détection par marqueurs les plus courantes sont reportées dans le **Tableau 1.1**.

Les inconvénients majeurs de ces techniques sont bien évidemment liés à la nécessité de marquer les molécules pour leur détection. La fonctionnalisation des molécules requiert des étapes supplémentaires de préparation dans les protocoles à mettre en œuvre. Par ailleurs, les marqueurs fluorescents présentent un certain nombre de limitations : la première d'entre elles provient du phénomène de « quenching » qui résulte de l'absorption d'une partie de l'énergie par les autres molécules situées à proximité dans le milieu.

Le photoblanchiment, caractérisé par la perte des propriétés fluorescentes des molécules sous l'effet d'une excitation par une forte intensité lumineuse, est lui aussi un frein compte tenu du fait que l'énergie absorbée par les molécules peut provoquer des réactions chimiques qui altèrent de façon irréversible les propriétés de fluorescence.

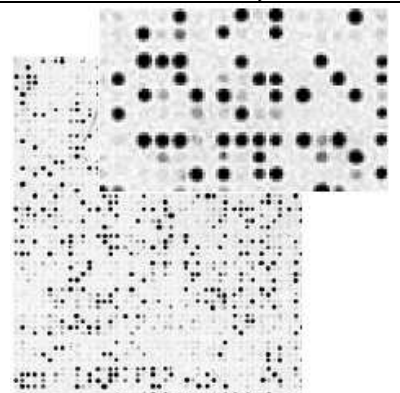
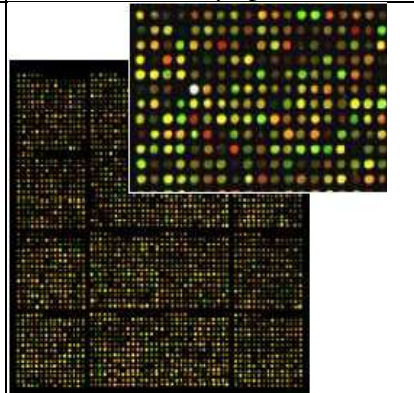
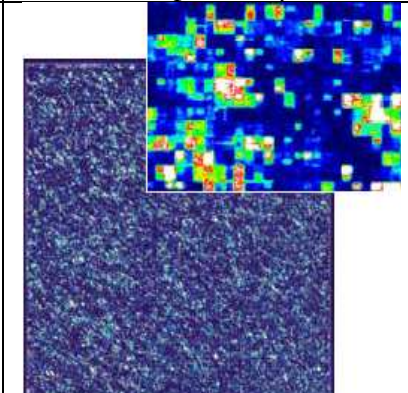
« Macroarray »	« Microarray spotted »	« GeneChips » Affymetrix
		
<ul style="list-style-type: none"> - support : membrane de nylon - taille des spots : $\approx 1 \text{ mm}$ - densité : $\approx 25 \text{ spots/cm}^2$ 	<ul style="list-style-type: none"> - support : lame de verre à revêtement chimique - taille des spots : $\approx 100 \mu\text{m}$ - densité : $\approx 1000\text{-}10000 \text{ spots/cm}^2$ 	<ul style="list-style-type: none"> - support : lame de verre à revêtement chimique - taille des spots : $\approx 20 \mu\text{m}$ - densité : $\approx 250000 \text{ spots/cm}^2$

Tableau 1.1 : Récapitulatif et descriptifs des différentes puces à marqueurs fluorescents.

Comme nous l'avons déjà précisé dans l'introduction générale, la problématique fondamentale est de conserver l'activité biologique de la protéine lorsqu'elle est immobilisée ou lorsqu'elle interagit avec l'entité déjà présente à la surface. Dans ce cas, l'ajout d'un marqueur fluorescent ou radioactif ne garantit pas la conservation de cette activité [24]. L'objectif est alors de dépister, parmi les capteurs n'utilisant pas de marquage, la technique qui soit à la fois sensible à l'adsorption d'une couche moléculaire mais qui puisse être de surcroît miniaturisée pour s'intégrer sous formes de puces. Les techniques alternatives de lectures les plus courantes sont de type mécanique, chimique ou optique. Avant d'étudier plus précisément les transducteurs optiques, qui font l'objet de ce travail de thèse, une étude non exhaustive des techniques alternatives au marquage est présentée dans le paragraphe suivant.

1.4 Les transducteurs mécaniques

La reconnaissance spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible va entraîner une modification de la surface du capteur : une augmentation de la masse fixée mais également une variation des contraintes de surfaces. Parmi les dispositifs mécaniques susceptibles de détecter ces variations, se distinguent les microbalances à quartz (Quartz Cristal Microbalance - QCM), les dispositifs à ondes de surface (Surface Acoustic Waves - SAW), et les microleviers.

1.4.1 Les Microbalances à Quartz (Quartz Cristal Microbalance - QCM)

Le premier paramètre qui vient à l'esprit est la prise de masse du système ligand-analyte lors de la fixation de l'analyte. De cette constatation est née l'idée d'employer une microbalance à quartz, issue d'une application datant d'une cinquantaine d'années et couramment employée pour quantifier les dépôts de couches nanométriques lors de leur évaporation sous vide. Une fine pastille de quelques millimètres d'épaisseur et de quelques centimètres de diamètre d'un matériau piézoélectrique est mise en vibration dans son premier mode de vibration transversale à une fréquence de résonance comprise entre 5 et 27 MHz. Du fait d'un facteur de qualité très important (généralement de l'ordre de 10^5), la fréquence est utilisée pour suivre l'immobilisation des ligands [25-28]. La relation de Sauerbrey permet de relier la variation de fréquence de résonance à la variation de masse à la surface du capteur :

$$\Delta F = -\frac{2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (1.1)$$

avec ΔF la variation de la fréquence de résonance (Hz), F_0 la fréquence de résonance fondamentale de la balance à quartz (Hz), Δm la prise de masse (g), A l'aire active de l'électrode (mm^2), ρ_q la densité du quartz ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) et μ_q le module de cisaillement du quartz ($\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Bien que difficile à mettre en place en milieu liquide du fait de la forte sensibilité de son facteur de qualité à la viscosité du fluide, la sensibilité attendue d'un tel dispositif est de l'ordre de quelques ng/cm^2 [29]. Son inconvénient majeur et péremptoire repose sur son inaptitude à être miniaturisée, d'autant plus que les volumes de solutions à utiliser atteignent plusieurs ml [25], ce qui est incompatible avec une étude en condition réelle en biologie.

1.4.2 Les Ondes Acoustiques de Surface (SAW)

Des ondes acoustiques de surface (Surface Acoustic Waves - SAW) progressives peuvent être générées et détectées par des dispositifs formés d'électrodes interdigitées lithographiées à la surface d'un matériau piézoélectrique. Très employées pour réaliser des filtres hautes fréquences, utiles en traitement du signal dans les télécommunications, l'application dans le cadre des biocapteurs est plus difficile en milieu liquide du fait de l'absorption considérable de l'onde par le liquide aux fréquences très élevées (30-500 MHz).

Quelques groupes ont cependant réussi à mettre en évidence l'adsorption de protéines sur la surface d'un tel capteur [30-32]. La **Figure 1.7** présente un schéma d'un dispositif SAW permettant une bio-détection. La détection de l'hybridation de l'ADN est annoncée, avec ce dispositif, à une sensibilité de $1.55 \text{ ng} / \text{ml} / \text{Hz}$ [33].

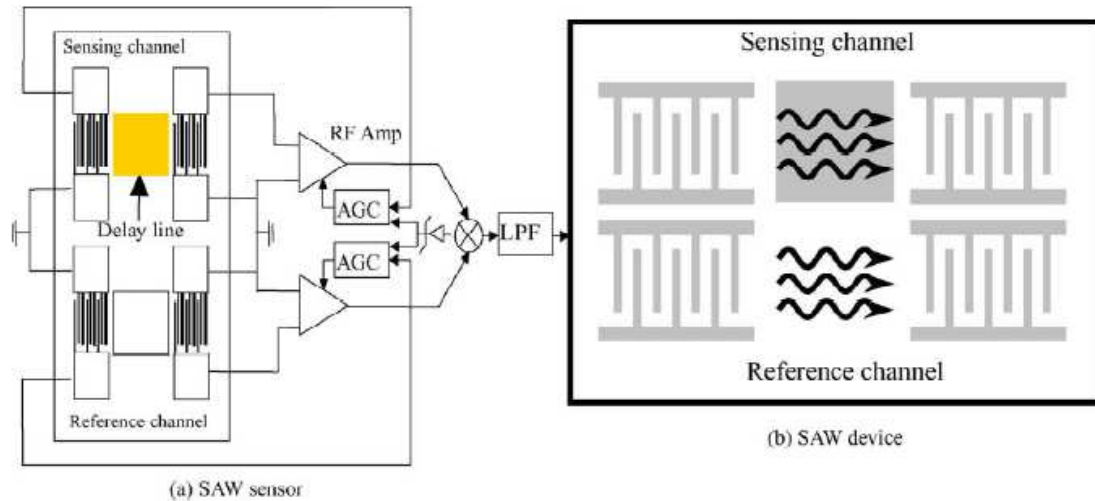


Figure 1.7 : Représentation schématique d'un capteur basé sur une détection par SAW (issu de [33]).

Les molécules sondes sont fixées sur la surface indiquée en jaune sur le schéma, qui a une dimension de l'ordre de 5 mm^2 , soit une sensibilité d'environ $0.6 \text{ ng} / \text{cm}^2$. Cette différence par rapport à une détection par QCM s'explique par le fait que les fréquences d'excitation utilisées dans le cadre des SAW sont beaucoup plus importantes que pour une étude par QCM (de l'ordre d'un facteur 10 dans le meilleur des cas). Cependant, les tailles des systèmes employés et de la zone d'analyse, de l'ordre du mm, ne permettent pas d'envisager, à l'heure actuelle, une haute potentialité en tant que multicapteurs.

1.4.3 Les microleviers

Depuis plusieurs années, les microleviers se sont avérés être des capteurs extrêmement sensibles, que ce soit pour des applications physiques, chimiques ou biologiques [34-36]. Ces capteurs utilisant comme transducteur des leviers de dimensions micrométriques sont basés sur la technologie développée pour la Microscopie à Force Atomique.

Par un système de pivot optique, la déflexion du levier va être visualisée au cours du temps suivant les réactions siégeant à sa surface (**Figure 1.8**). Deux modes de détection sont envisageables :

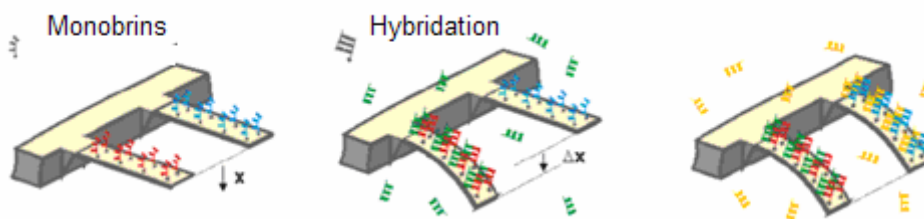


Figure 1.8 : Représentation schématique de microleviers sur lesquels siège l'hybridation d'ADN. Sur la première figure, chaque microlevier est fonctionnalisé avec un type de monobrin différent. Sur la deuxième figure, sous l'effet de l'injection de monobrins complémentaires, seul le premier microlevier réagit et se courbe du fait de l'hybridation. La troisième figure montre l'effet d'un deuxième type de monobrins cibles, où le deuxième microlevier va se courber. Issue de [37].

- le premier est basé une mesure statique : la fixation sur une des faces du levier de molécules biologiques va entraîner une déflexion, directement proportionnelle aux variations de contraintes de surface. Une représentation schématique du mécanisme est représentée dans la

Figure 1.8, issue d'une étude publiée par J. Fritz et al. [37]. La sensibilité aux variations de contraintes de surface est de l'ordre du mN.m^{-1} . De nombreuses équipes ont utilisé ce dispositif pour observer l'hybridation de l'ADN [37,38].

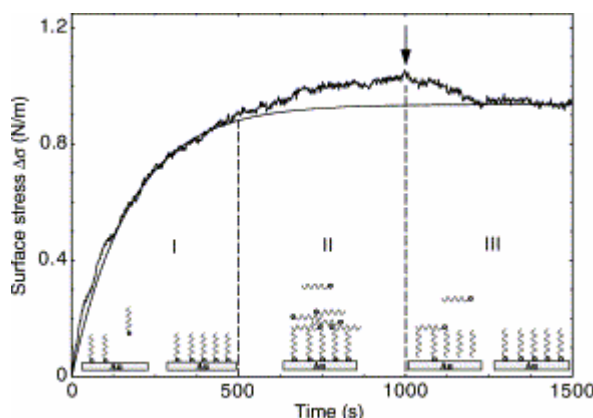


Figure 1.9 : Evolution de la contrainte de surface d'un microlevier sous l'effet du greffage de monobrin d'ADN thiolés de 25 bases [39].

La **Figure 1.9** montre la variation de contrainte de surface au cours du temps associée à la formation d'un film d'ADN de 25 bases modifié par un groupement thiol sur la face dorée d'un microlevier [39]. La variation de contrainte visualisée ici est de l'ordre du N/m , soit quasiment 10 fois supérieure à la constante de raideur d'un microlevier classique. Il s'en suit un rapport signal sur bruit très intéressant d'environ 1000. Il a également été montré, [38], qu'il était possible de distinguer des mésappariements de 0, 1 ou 2 bases pour des oligonucléotides cible et sonde de 25 bases.

- le second est lié à une analyse dynamique : le levier est excité à sa fréquence de résonance ; toute modification de la surface des dispositifs ou du milieu environnant se traduit par une variation de la fréquence de résonance [40]. Il est ainsi possible de traduire une variation de masse induite par le greffage de molécules sur la surface des microleviers.

La masse minimale détectée est évaluée à 10^{-13} g pour un microlevier de $200 \mu\text{m}$ de long et $20 \mu\text{m}$ de large, on peut estimer alors une sensibilité de l'ordre de $2.5 \text{ ng} / \text{cm}^2$.

Le **Tableau 1.2** regroupe les sensibilités par unité de surface, les aires actives et la variation de masse minimum détectable pour les trois types de transducteurs mécaniques.

Transducteurs	Sensibilité [ng/cm^2]	Aire réelle du capteur [cm^2]	Masse minimale détectable [ng]
QCM	De 1 à 10	1	1 à 10
SAW	0.6	0.05	$3 \cdot 10^{-2}$
Microleviers	2.5	$4 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}

Tableau 1.2 : Sensibilité surfacique, aire active, et masse minimale détectable des différents transducteurs présentés.

Les capteurs basés sur une détection par SAW ont donc la sensibilité la plus importante par cm^2 . Cependant, il apparaît clairement que la capacité de miniaturisation des microleviers [37]

est bien supérieure, permettant d'augmenter encore leur sensibilité et offrant une capacité d'intégration intéressante avec leur mise en parallèle [41], ce qui montre qu'ils sont, parmi les transducteurs mécaniques, la technique la plus performante et évolutive.

1.5 Les transducteurs électrochimiques

Les capteurs électrochimiques sont basés sur trois techniques de mesures distinctes : mesures potentiométriques, ampérométriques et impédancemétriques. Bien que ces techniques s'affranchissent d'un marquage fluorescent ou radioactif, notons que la reconnaissance moléculaire est réalisée grâce à l'intercalation d'un médiateur rédox [42-45].

Potentiométrie

Les mesures potentiométriques sont basées sur l'équation de Nernst [46] qui relie le potentiel d'équilibre de la réaction rédox aux activités des espèces de manière logarithmique. Ce potentiel peut être alors mesuré de deux manières :

- soit entre une électrode de référence et une électrode de mesure dont la surface est fonctionnalisée par un ligand [18]. On parle alors de la famille ISE (Ion Specific Electrode).

- soit par l'emploi de transistors à effet de champ (FET) qui sont sensibles aux charges sur la surface de l'électrode, appelée grille [47]. En modifiant cette grille à l'aide de couches catalytiques ou par la formation de complexes, ils sont alors nommés ENFET (pour enzymes) ou IMFET (pour immunologie) [48]. L'avantage de tels biocapteurs est leur simplicité d'utilisation mais ils souffrent d'une sensibilité faible face aux capteurs ampérométriques.

Ampérométrie

Les capteurs ampérométriques mesurent le courant issu de l'électrolyse d'une espèce électroactive en fixant le potentiel de l'électrode à une tension constante [49,50]. Le courant est directement relié à la concentration dans la solution de ces espèces ou à leur vitesse de production. La mesure indirecte constitue le facteur le plus limitant de la méthode ampérométrique comme biocapteurs. A l'inverse des systèmes potentiométriques, la méthode ampérométrique n'opère essentiellement qu'en dehors de l'équilibre réactionnel, ce qui requiert l'apport de nouveaux éléments actifs, le transport des espèces devient alors une restriction.

Impédancemétrie

L'impédancemétrie est surtout basée sur la mesure de conductivité ou de capacité entre des électrodes déposées en surface sur lesquelles sont immobilisés des ligands [51]. La conductivité peut être mesurée en solution à tension constante, elle dépend alors des concentrations en ions. L'impédance électrique sous tension alternative est aussi sensible à l'épaisseur diélectrique de la monocouche auto assemblée.

Ces capteurs ne sont pas en soit des « capteurs de masses », ils permettent cependant d'obtenir une signature précise de la nature de la couche d'oligonucléotides greffée et de mettre en évidence l'hybridation [52,53]. Le nombre de moles minimal détectable est alors de l'ordre de 6.10^{-10} M. Ces mesures permettent également de déterminer le taux de recouvrement d'une monocouche [54], la température de séparation de la double hélice en fonction de la composition des brins[45,55], ainsi que les erreurs d'appariements entre les bases [56].

1.6 Les transducteurs optiques

Les transducteurs optiques sont peut être les plus répandus dans l'univers de la biologie après les capteurs fluorescents. Leurs principaux atouts sont leurs caractères non destructifs, qui autorisent des mesures *in situ* et en temps réel ce qui permet de suivre les cinétiques de croissance. La formation du complexe ligand-analyte sur la surface entraîne des modifications des propriétés optiques de celle-ci comme l'absorption, la diffusion ou l'indice de réfraction. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement à deux techniques de détection optique : l'ellipsométrie spectroscopique et la résonance des plasmons de surface (RPS). Nous présenterons ici la base théorique des phénomènes associés à ces deux techniques ainsi que leur exploitation en tant que capteurs et leur aptitude à la miniaturisation.

1.6.1 L'ellipsométrie spectroscopique

L'ellipsométrie est une technique réputée pour l'analyse d'épaisseur et d'indice optique de matériaux déposés en couches multiples d'épaisseurs nanométriques. Découverte par P. Drude il y a plus de 100 ans [57], elle repose sur l'analyse de la polarisation d'une onde plane avant et après réflexion sur un substrat composé de couches multiples. L'ellipsométrie est basée sur la mesure du changement de polarisation d'un faisceau lumineux réfléchi selon un angle Φ_0 par une surface (**Figure 1.10**). Le rapport ρ des réflectivités mesurées r_p et r_s , correspondant respectivement aux polarisations parallèle (p) et perpendiculaire (s) au plan d'incidence permet de déterminer les angles « ellipsométriques » ψ et Δ par :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \frac{|r_p|}{|r_s|} \exp(i\Delta) = \tan \psi \exp(i\Delta) \quad (1.2)$$

ψ est donc dépendant du rapport des amplitudes réflectivités r_p et r_s , et Δ est le déphasage entre ces deux composantes induit par la réflexion sur le système multicouches. L'indice et l'épaisseur de chaque couche composant le système vont influencer sur ψ et Δ .

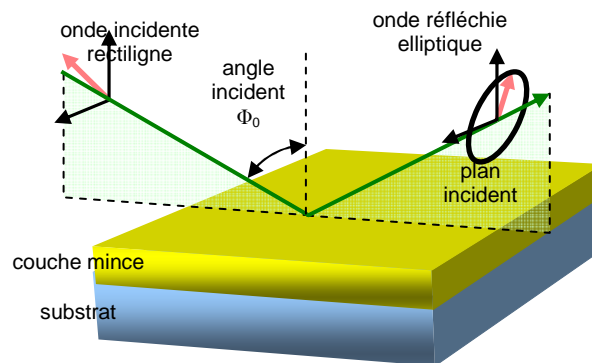


Figure 1.10: Variation de la polarisation d'une onde plane rectiligne réfléchie par une surface.

L'ellipsométrie est une méthode indirecte de mesure et, pour comprendre et vérifier les résultats expérimentaux, un modèle approprié doit être appliqué [58]. Cependant, le manque d'outils permettant une analyse numérique fine en a limité l'utilisation durant une grande partie du siècle dernier. Le développement exponentiel de la vitesse de calcul des ordinateurs durant les 30 dernières années, la diminution du temps de mesure, l'élargissement de la gamme spectrale

d'analyse et la semi-automatisation des mesures, ont permis un net regain d'intérêt pour cette technique [59].

La plupart des instruments de mesures commercialisés actuellement ont une résolution annoncée de 0.001° pour ψ et Δ , ce qui correspond à une précision théorique de 0.0003 nm dans l'air pour la mesure de la couche d'oxyde natif présente à la surface du silicium, avec un temps d'intégration inférieur à la seconde. Bien entendu, cette résolution est limitée par le rapport signal sur bruit. Néanmoins, une précision de 2% sur ψ et 1% sur Δ semble, dans une configuration de mesure idéale, être atteinte sur de nombreux appareils.

Longtemps confinée à l'industrie des semi-conducteurs, la potentialité de l'ellipsométrie pour la caractérisation de métaux et de diélectriques dans des conditions relativement simples à mettre en œuvre en fait un outil d'analyse optique de plus en plus répandu dans les laboratoires industriels et fondamentaux [60]. La liste des domaines auxquels l'ellipsométrie a été appliquée est vaste, on citera la caractérisation de la croissance de structures cristallines [61], de couches organiques [62] ou la détection de gaz [63,64]. Dans le cas de la détection de gaz, une limite de 10 ppm a été annoncée [63].

Bien que l'ellipsométrie en tant que capteur de phénomènes en temps réel ait été exploitée, on se reportera à [65] pour un éventail plus important des différentes applications, son utilisation en tant que biocapteur reste confidentielle [66] comparée aux autres techniques de détection. La détection du greffage de protéines et d'oligonucléotides a été étudiée par différents groupes [63,67-71]. La sensibilité attendue pour cette technique est inférieure à 1 ng/cm^2 [69].

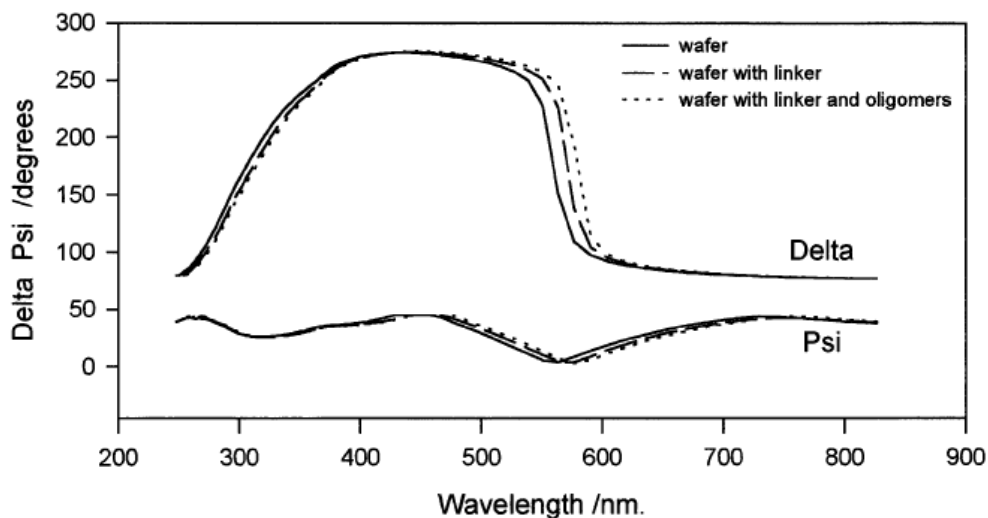


Figure 1.11 : Etude spectrale de ψ et Δ dans l'air pour un substrat seul (trait plein) et fonctionnalisé (pointillé) ; issue de [67].

La **Figure 1.11**, issue de [67], est la représentation spectrale des angles ψ et Δ avant et après greffage *ex situ* de monobrins d'ADN de 10 bases, sur une surface de silicium silanisée. Sur l'ensemble du spectre, et plus particulièrement entre 500 et 650 nm, l'adsorption de molécules à la surface de l'échantillon décale ψ et Δ . A longueur d'onde fixe, un décalage d'environ 50° entre la surface avant et après fonctionnalisation est attendu en Δ , ce qui confirme la grande sensibilité de la phase aux couches nanométriques. Le décalage en ψ est ici beaucoup moins marqué. Un indice optique de 1.46 et une épaisseur de 3 nm sont ainsi évalués pour le film d'ADN.

Les configurations employées pour l'étude *in situ* d'interactions biospécifiques imposent certaines limitations, notamment à cause du volume important (plusieurs ml) de solution à utiliser. Pour réaliser les études en milieu liquide, plusieurs types de cellule ont été imaginés [72,73]. Classiquement, une cellule du type représenté dans la **Figure 1.12** est employée. L'avantage de ce type de cellule est que le faisceau incident est orienté de façon à arriver perpendiculairement à la face externe de la cellule, évitant ainsi des réflexions parasites sur ces interfaces.

Nous montrerons, dans le **chapitre 3**, une approche permettant de réduire le volume de solution utilisée par rapport aux techniques présentées dans la littérature.

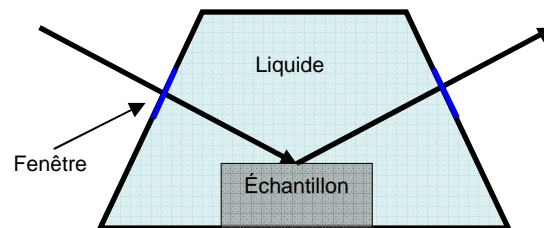


Figure 1.12 : Représentation schématique d'une cellule de mesure pour l'ellipsométrie en milieu liquide.

Le deuxième axe de recherche développé pour répondre au cahier des charges d'un biocapteur est la miniaturisation de la détection ellipsométrique, qui est liée à la capacité de résoudre spatialement plusieurs zones d'interactions sur un même substrat. Celle-ci est actuellement développée suivant deux voies :

- **l'imagerie à l'aide d'une caméra CCD de la zone éclairée par le spot, suivie de l'analyse de la réponse de chaque pixel.**

Bae et al. [71] ont ainsi étudié l'interaction de la protéine G de l'insuline avec son anticorps spécifique. L'imagerie permet ici d'obtenir la réponse du signal sur une zone de $(500 \times 500) \mu\text{m}^2$, et de discerner 4 zones d'interaction de $120 \mu\text{m}$ de diamètre espacées de $300 \mu\text{m}$ (**Figure 1.13 A**). Une résolution inférieure à $10 \mu\text{m}$ est alors attendue.

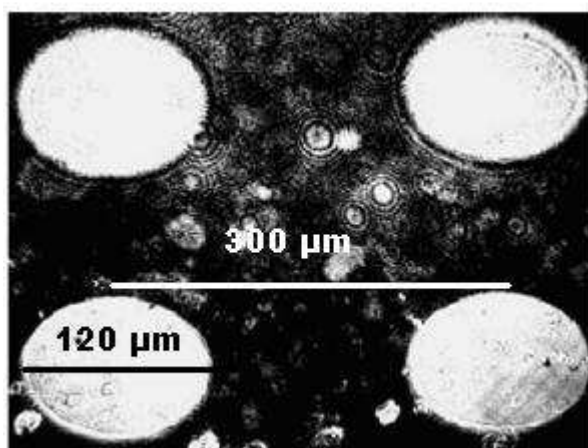


Figure 1.13 A : Image en intensité de 4 zones fonctionnalisées par la protéine G de l'insuline, espacées de $300 \mu\text{m}$ et de diamètre estimé à $120 \mu\text{m}$ [71].

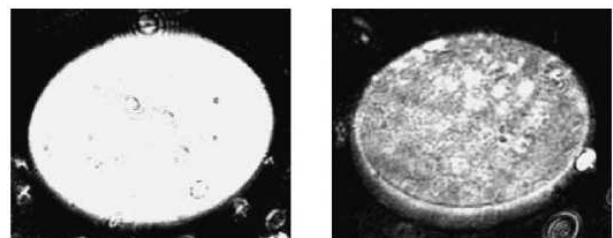


Figure 1.13 B : Comparaison de l'intensité d'une zone avant et après réaction biospécifique.

La **Figure 1.13 B** montre la différence d'intensité entre deux spots, le deuxième étant imagé après interaction entre la protéine G et l'anticorps. L'analyse menée ici est basée sur une comparaison des réflectivités et non pas des angles ellipsométriques. En effet, la somme d'informations colossale contenue dans une image pose des problèmes de traitement de signal. L'analyse spectrale de l'intensité et la détermination des angles ψ et Δ de chaque pixel en temps réel semblent pour le moment complexes à réaliser et demandent une refonte complète du système de détection.

- le déplacement du substrat permettant une analyse point par point, tout en gardant une détection classique du signal réfléchi.

La réponse du capteur est la résultante de l'interaction du faisceau lumineux avec le substrat intégrée sur l'aire de cette zone. Afin d'analyser une surface plus importante que la zone d'interaction, l'échantillon est déplacé et la réponse ellipsométrique est étudiée zone par zone. Cette approche est utilisée dans l'industrie des semi-conducteurs pour vérifier l'homogénéité d'un substrat de silicium sur une surface de plusieurs cm^2 . C'est également une approche possible pour imager un échantillon possédant une surface structurée : la **Figure 1.14**, issue de [67], montre la réponse obtenue, convertie en épaisseur, en déplaçant un spot de 1 mm^2 sur un échantillon recouvert par endroits d'un film d'ADN. Il est clair que la surface de la zone analysée ($5 \times 5 \text{ cm}^2$), et plus particulièrement la taille du spot employé, ne sont pas compatibles avec une application multicapteurs. Néanmoins, la diminution de la taille du faisceau lumineux laisse entrevoir la capacité d'imager des structures de tailles micrométriques.

Cette technique sera développée dans le **chapitre 3** du manuscrit. La résolution de cette technique est donc liée à la taille de spot, nous montrerons qu'il est possible d'atteindre expérimentalement une résolution inférieure à $50 \mu\text{m}$ en employant un spot d'environ $(100 \times 150) \mu\text{m}^2$, et donc d'analyser sans convolution des structures d'une largeur d'environ $100 \mu\text{m}$, tout en gardant le caractère spectral de l'étude.

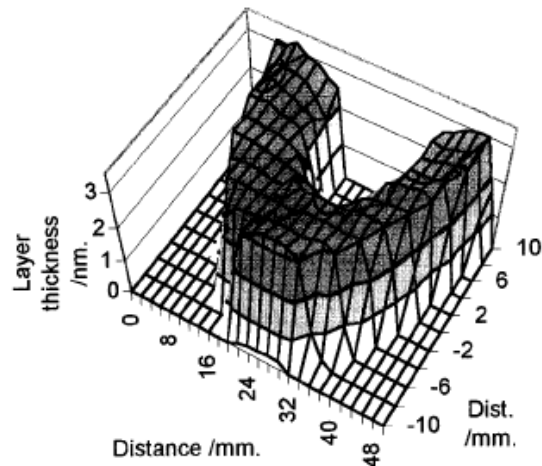


Figure 1.14 : *Imagerie ellipsométrique avec un spot de 1 mm^2 par déplacement d'une surface de 1 cm^2 recouverte par endroit d'un film d'ADN. La réponse est ici convertie en épaisseur [nm]. Issue de [67].*

1.6.2 La Résonance des Plasmons de Surface (RPS)

Parmi les techniques de détection d'interactions biologiques n'utilisant pas de marqueurs, la résonance des plasmons de surface (Surface Plasmon Resonance - SPR) a été particulièrement employée durant les 20 dernières années. Comme l'ellipsométrie, les biocapteurs basés sur cette technique sont sensibles à la fois à l'indice de réfraction et à l'épaisseur de la couche déposée à la surface du capteur.

Historiquement

La résonance des plasmons de surface peut être considérée comme une oscillation collective des électrons libres du métal à l'interface entre ce métal et un diélectrique. Le terme plasmon est l'analogie faite pour décrire le métal avec les plasmas, gaz ionisés. En 1957, Ritchie [74] fut le premier à prédire l'existence de ces ondes électromagnétiques susceptibles de se propager le long d'une surface métallique tout en restant très confinées. Otto [75] a montré en 1968 que ces ondes de surface pouvaient être excitées en utilisant la réflexion totale atténuée (**Figure 1.15 A**). Kretschmann et Raether obtiennent les mêmes résultats dans une configuration différente la même année [76] (**Figure 1.15 B**). Les premières études exploitant le phénomène de la RPS comme élément d'un capteur ont été menées par Nylander et Liedberg en 1983 [77]. Ils ont ainsi montré leur intérêt pour la détection de gaz et de biomolécules. Le développement industriel de cette technologie dans le domaine des biocapteurs a donné naissance à une entreprise spécialisée BIAcore International, créée en 1990.

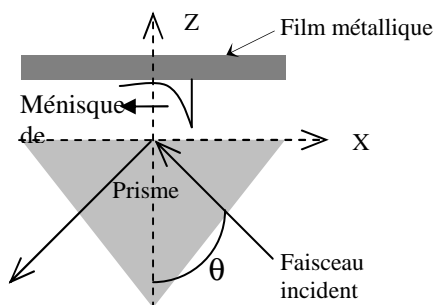


Figure 1.15 A : Configuration proposée par Otto : le diélectrique, l'air, se trouve entre le métal et le prisme.

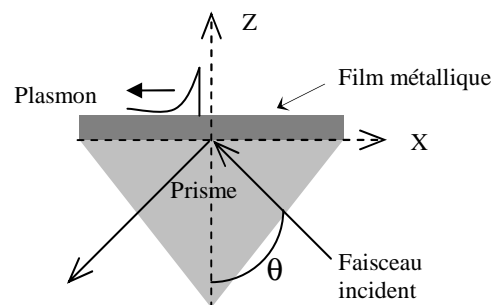


Figure 1.15 B : Configuration proposée par Kretschmann : le métal vient au contact du prisme et couple le plasmon au champ évanescent généré par la réflexion totale de la lumière à l'interface prisme-métal.

Conditions d'excitation : relation de dispersion

Les conditions d'excitation des plasmons de surface sont nombreuses : l'angle d'incidence, la longueur d'onde de travail, la polarisation de l'onde incidente, l'indice de réfraction du prisme et de la couche métallique, son épaisseur, l'indice du milieu extérieur. Le dépôt d'une couche supplémentaire à l'interface métal - milieu extérieur va également modifier ces conditions d'excitation.

Pour des métaux nobles tels que l'or ou l'argent déposés en couches de quelques nanomètres sur un diélectrique, le plasmon peut être excité par une onde électromagnétique dont la fréquence appartient au spectre visible. Le transfert d'énergie qui se produit entre le faisceau

incident et l'onde de surface induit une chute de la réflectivité, observable en champ lointain, si les conditions de résonance sont remplies. Ce phénomène conduit à la propagation d'une onde se propageant parallèlement à l'interface, évanescence suivant la direction normale à celle-ci et caractérisable en champ proche optique.

Ces conditions d'excitation peuvent être déterminées en recherchant les relations de dispersions liant les différents milieux composant le système étudié. La théorie des plasmons de surface dans différentes conditions a largement été développée par Ritchie [74] et Raether [78], dont nous reprenons dans l'**Annexe A** quelques résultats.

Il en résulte que la résonance des plasmons de surface pour un système donné (prisme-métal-milieu extérieur) n'est atteinte que pour une onde incidente ayant un angle d'incidence et une longueur d'onde particulière dépendant des caractéristiques du système. L'adsorption à la surface du métal d'une couche diélectrique va modifier légèrement la courbe de dispersion du plasmon de surface et donc ses conditions d'excitation. Un autre couple sera nécessaire pour de nouveau observer la résonance.

Deux modes de détection : angulaire et spectrale

① Si la pulsation ω de l'onde incidente est constante, donc λ constante, il est nécessaire que la pente de la droite de lumière de l'onde incidente dans le verre change pour retrouver les conditions de résonance. Ceci n'est réalisable qu'en modifiant l'angle d'incidence θ du faisceau incident. On parlera alors d'une **détection angulaire** de l'adsorption¹. La sensibilité de cette technique a été discutée dans la littérature [79,80]. Elle est évaluée à quelques pg/mm^2 [81].

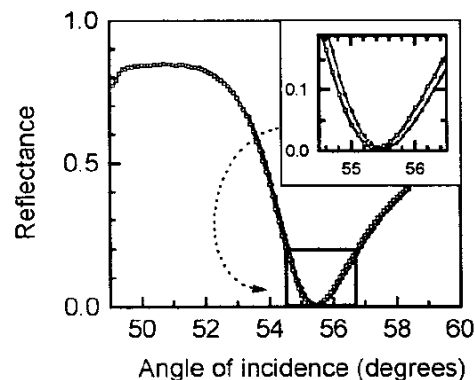


Figure 1.16 : Analyse angulaire in-situ de la résonance avant et après greffage de monobrin d'ADN de 25 bases, issue de [82]. La position initiale de la résonance est imposée par l'indice du prisme, l'épaisseur et la nature du métal, ainsi que l'indice du milieu extérieur.

La **Figure 1.16** représente l'étude angulaire de la réflectivité mesurée en champ lointain dans la configuration de Kretschmann avant et après greffage de monobrin d'ADN 25 bases, pour un système composé d'un prisme d'indice 1.76, d'une couche d'or de 43 nm immergée dans une solution d'indice 1.33. Le pic observé est caractéristique de la résonance plasmon. Sa position, ainsi que sa forme va dépendre des paramètres intrinsèques du système. L'agrandissement superposé à la **Figure 1.16** permet d'évaluer le décalage du pic obtenu après

¹ Une étude plus approfondie de la sensibilité théorique de la détection angulaire sera présentée dans le chapitre 4. Le formalisme employé à la fois pour la modélisation des courbes de réflectivité et de la réponse ellipsométrique sera développé dans le chapitre 3.

greffage. Dans le cas illustré, celui-ci est d'environ 0.10° . Ce décalage est totalement lié à l'épaisseur et à l'indice de la couche adsorbée.

Dans le cas le plus général, l'adsorption d'une couche à la surface conduit donc à un déplacement du pic vers des angles plus élevés et sera lié à l'épaisseur et l'indice optique de la couche adsorbée. Le suivi en temps réel de l'interaction est réalisé en fixant l'angle d'incidence à une valeur proche de la résonance plasmon et en visualisant l'évolution temporelle de la réflectivité. La RPS prend ici tout son intérêt, grâce à la variation de signal importante attendue près de la résonance plasmon.

De nombreuses applications ont été développées suivant ce principe [83], le nombre de publications par an étant par ailleurs en constante augmentation. Les champs d'application sont très variés :

- dans l'industrie alimentaire pour les contrôles qualité [84,85] ;
- dans l'industrie pharmaceutique, particulièrement pour l'étude de l'immunotoxicité des médicaments [86,87] ;
- dans l'étude de l'hybridation de l'ADN, d'anticorps, de protéines et la détermination des constantes d'affinités de différentes molécules [82,88-96].

Ceci n'est en aucun cas une liste complète des applications existantes, en effet plus d'un millier de publications a été recensé sur les 5 dernières années.

② Si l'angle d'incidence θ est fixe, donc la pente de la droite de lumière associée à l'onde incidente constante, la pulsation de l'onde incidente doit être modifiée pour égaler de nouveau la pulsation de plasmon. Un changement de la longueur d'onde de la source lumineuse est requis. La détection sera alors qualifiée de **spectrale**² [94,97-99].

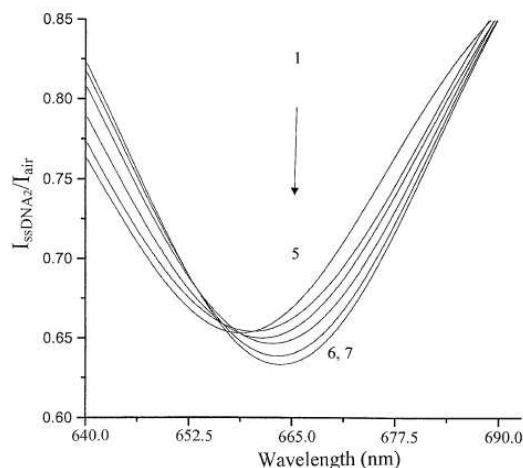


Figure 1.17: Etude spectrale de la réflectivité sous un angle d'incidence permettant l'excitation de la résonance plasmon. La courbe (1) est la réponse de la couche métallique seule. Les courbes de 2 à 7 sont les réponses après greffage de monobrins d'ADN 12 bases avec pour concentration, respectivement (2) 0.25; (3) 0.51; (4) 1.02; (5); 2.03; (6) 4.06 et (7) 6.66 pM. Issue de [100].

² Le chapitre 5 présentera de façon plus complète la sensibilité à l'adsorption d'une détection spectrale de la résonance des plasmons de surface.

L'analyse spectrale de la réflectivité en champ lointain permet, comme dans le cas d'une détection angulaire, de visualiser un pic d'absorption caractéristique de la résonance plasmon (**Figure 1.17**, [100]). Sur cette figure sont également reportés les spectres obtenus après greffage de monobrin d'ADN de 12 bases pour des concentrations comprises entre 0.25 pM à 6.66 pM. L'adsorption d'une couche supplémentaire, conduit à l'augmentation de la longueur d'onde de la résonance. Le pic de résonance se déplace alors vers les grandes longueurs d'ondes. De façon analogue à une détection angulaire, les cinétiques d'adsorption sont assurées par un suivi en temps réel à longueur d'onde fixe de la réflectivité, le pic de résonance assurant encore une fois une variation de signal importante.

Une comparaison des sensibilités respectives obtenues par une détection spectrale et angulaire a été menée par Homola et al. montrant que celles-ci sont comparables, même si, en fonction des conditions d'excitation, elles peuvent différer légèrement [81]. Cette remarque a également été émise par Chien et al. [101].

Miniaturisation

La miniaturisation de la détection RPS est généralement effectuée en couplant une technique de dépôts localisés et la capture par caméra CCD de l'image de la zone illuminée par le faisceau lumineux. Plusieurs techniques sont employées pour la réalisation de ces dépôts localisés, on citera par exemple les appareils de microspotting (fréquemment utilisés dans le cadre des biopuces fluorescentes) ou des dépôts par copolymérisation [20]. Les dimensions de ces dépôts peuvent atteindre une taille de l'ordre de 50 μm dans le cas du microspotting, et environ 300 μm pour dans le cas de la copolymérisation. La résolution spatiale va être restreinte par la résolution et le nombre de pixels de la caméra CCD. Enfin, la sensibilité lumineuse, que l'on peut associer également au nombre de niveaux de gris de cette caméra, va gouverner la précision de la mesure.

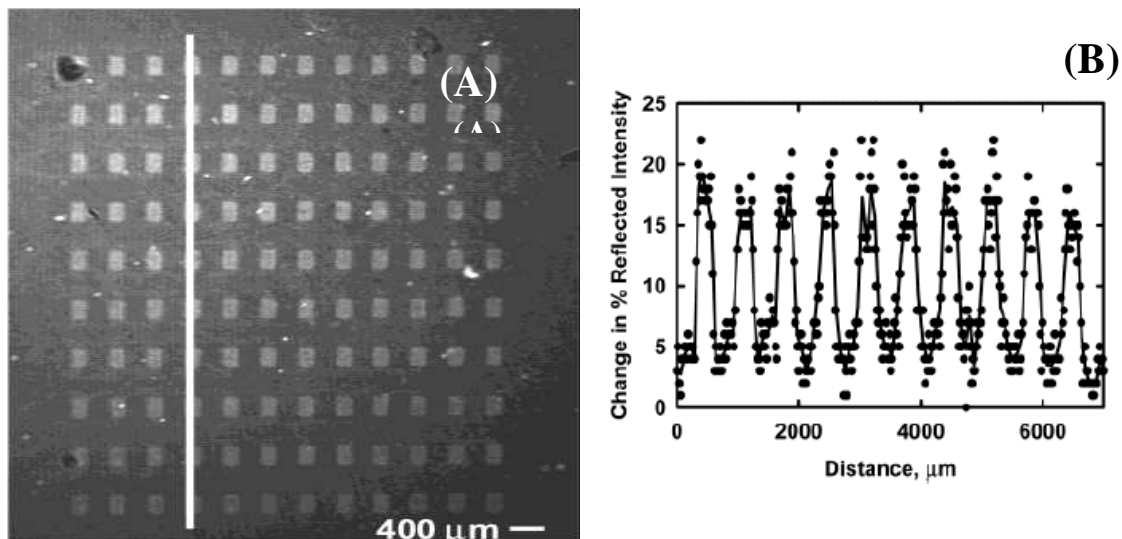


Figure 1.18 : (A) Imagerie d'une matrice de spots de 200 μm d'un complexe SAM / Streptavidine / Monobrin d'ADN fixé sur une surface d'or à un angle proche de la résonance plasmon de 200 μm . (B) Section associée à la ligne blanche. Issue de [54].

Un exemple d'imagerie RPS est présenté dans la **Figure 1.18 A**, issue de [54]. L'angle d'incidence permettant d'exciter la résonance plasmon étant différent entre la couche métallique et la zone fonctionnalisée, à angle fixe la réponse de ces deux zones est différente. Les zones

claires, d'une dimension latérale d'environ 200 μm , correspondent aux zones fonctionnalisées par une couche auto-assemblée SAM/Streptavidine/Monobrins d'ADN microspottée sur une surface d'or et d'épaisseur évaluée à 2.5 nm. La **Figure 1.18 B** représente la variation de la réflectivité suivant la section tracée sur la figure précédente. Notons que la résolution annoncée est de un pixel pour 16 μm . Deux remarques peuvent être émises à partir de cette étude : d'une part, la section représentée nous permet de déterminer un rapport signal sur bruit d'environ 4, qui semble relativement faible ; d'autre part une dispersion des mesures importante est relevée. Cependant, cet axe d'étude semble prometteur et a été et est encore actuellement développé dans de nombreuses équipes de recherches [84,102-104]. Nous présenterons au **chapitre 4** une étude visant à montrer l'intérêt de cette technique.

1.6.3 Le couplage de l'ellipsométrie spectroscopique et de la RPS

Outre une analyse de la réflectivité à travers l'angle ψ , l'ellipsométrie spectroscopique permet d'analyser le déphasage Δ . Une lecture spectrale des angles ellipsométriques dans une configuration autorisant l'excitation de la résonance des plasmons de surface permet à la fois d'accéder à la réflectivité mais également d'exploiter la grande sensibilité de la phase aux couches ultra-minces. Quelques études ont été menées sur ce couplage mais le champ d'application aux capteurs est pour l'instant très peu exploité, les premières publications étant parues au cours de cette thèse. Poksinski et Arwin ont mis récemment en évidence la grande sensibilité de cette technique pour la détection de la corrosion de cuivre ou l'adsorption de protéines de ferritine à la surface du métal [105-107]. Deux autres groupes ont publiés sur le couplage de l'ellipsométrie et de la résonance des plasmons de surface [108,109].

Un spectre de Δ est présenté **Figure 1.19** montrant le décalage obtenu après fixation de la protéine. Une variation de Δ de 90 $^\circ$, pour une couche d'épaisseur 9 nm, est observée à longueur d'onde fixe après immobilisation de la protéine, alors que la variation attendue en ellipsométrie spectroscopique est de 3 $^\circ$.

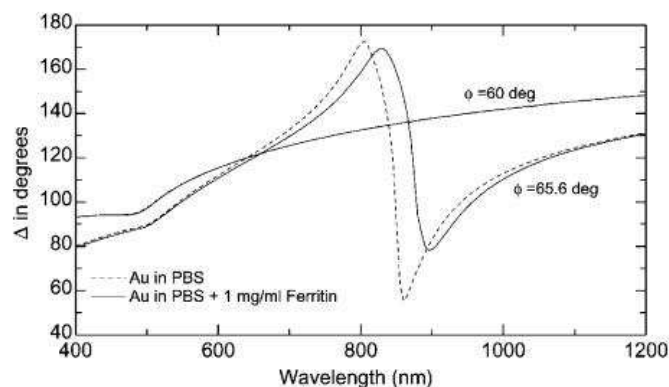


Figure 1.19 : Spectre de Δ in situ avant et après fixation de la ferritine sur la surface d'or. Issu de [107].

En 2005, Nanofilm [110] a breveté une détection similaire, limitée cependant à une étude mono-longueur d'onde de ψ et Δ . Une sensibilité inférieure à 1 ng/cm^2 est attendue. Cette société propose également un système d'imagerie par caméra CCD, annonçant une résolution spatiale de 10 μm . La limitation majeure du système est l'impossibilité de faire une acquisition spectrale, ce qui va limiter les possibilités d'optimisation de la réponse. D'autre part, comme nous l'avons précisé précédemment, le couplage de l'imagerie CCD et d'une lecture spectroscopique des angles ψ et Δ semble pour le moment difficilement applicable.

1.7 Conclusion

Les sensibilités attendues pour tous les capteurs présentés sont très proches. Certaines techniques semblent cependant plus difficiles à mettre en œuvre que d'autres en milieu aqueux. Néanmoins, parmi les capteurs sans marqueur présentés dans ce chapitre, l'ellipsométrie et la résonance des plasmons de surface nous ont semblé les techniques les plus adaptées à la réalisation d'un biocapteur. Elles respectent l'ensemble des conditions requises, à savoir :

- une sensibilité sub-monocouche ;
- une potentialité de miniaturisation élevée ;
- la possibilité d'étude in-situ et en temps réel ;

De plus, la nécessité d'utiliser un métal pour l'excitation des plasmons de surface offre un intérêt particulier à la technique : outre la possibilité d'employer des groupements thiolés pour assurer le greffage, la conductivité du métal est potentiellement intéressante pour des applications nécessitant la polarisation de l'échantillon. On pense ici par exemple à l'électrodéposition de molécules, assurant théoriquement un greffage plus rapide.

Le signal détecté par l'ellipsométrie et la RPS est dépendant de l'indice optique et de l'épaisseur des couches étudiées, ce qui présente l'inconvénient d'introduire deux inconnues lors des ajustements. Il nous a semblé judicieux de chercher une méthode complémentaire permettant de déterminer l'un de ces deux paramètres, et affiner ainsi la caractérisation. Le chapitre suivant sera ainsi en partie consacré à la mesure d'épaisseurs de couches biologiques par microscopie à force atomique.

Chapitre II : Analyse des propriétés locales de couches métalliques, polymères et biologiques par Microscopie à Force Atomique

2.1 Introduction

La caractérisation de l'épaisseur et de l'état de surface de couches ultraminces de métaux, polymères et de molécules adsorbées est d'un intérêt fondamental dans de nombreuses applications. Le premier objectif de cette étude est de développer une technique fiable de mesure d'épaisseur de couches ultraminces biologiques. En effet, l'analyse séparée des épaisseurs des couches biologiques et de leur taux de recouvrement, permettrait de décorrélérer les effets d'indice optique et d'épaisseur dans les variations des signaux issus des capteurs ellipsométriques ou basés sur la résonance des plasmons de surface.

Plusieurs études ont ainsi tenté de déterminer l'épaisseur de monobrins et de doubles brins d'ADN grâce à une mesure par sonde locale. Des expériences ont été menées pour observer l'hybridation de courtes séquences d'ADN, adsorbée à la surface d'une électrode de graphite (HOPG) par microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy – AFM) [111,112]. L'adsorption de l'ADN sur le graphite n'étant pas préférentielle, après rinçage, il résulte une très faible densité de brins à la surface. Il a cependant été révélé une différence de conformation entre un monobrin et un brin hybridé. L'application d'un potentiel à l'électrode permet une augmentation de la densité de monobrins adsorbés à la surface, jusqu'à obtenir un film quasi continu d'ADN. Une estimation de l'épaisseur de ces brins est réalisée en effectuant une section sur l'image AFM : une épaisseur moyenne est évaluée entre 1 et 3 nm entre le film et le graphite, ce qui représente une incertitude relativement conséquente au vu des dimensions attendues (inférieures à 10 nm).

En ce sens, des monobrins d'ADN thiolés, de longueurs différentes, greffés sur un substrat recouvert d'or, ont été utilisés comme molécules biologiques tests. La connaissance de la morphologie [113,114], ainsi que la rugosité de chacune des interfaces, est également primordiale pour l'interprétation du signal. Nous montrerons dans ce chapitre une nouvelle approche pour mesurer la distribution d'épaisseur de couches biologiques accrochées à un substrat d'or dans l'air et en solution.

La microscopie à force atomique est une technique privilégiée pour la mesure locale d'épaisseur de films minces diélectriques [15,115]. Outre les avantages inhérents à l'imagerie locale, l'AFM est également une machine de mesures de forces agissant entre la pointe de taille nanométrique et l'échantillon [116,117]. Les possibilités de l'AFM en termes de mesures de forces seront exploitées pour déterminer les forces d'adhérence ainsi que les profondeurs d'indentation de différents films biologiques. Il sera montré que les forces d'adhérences peuvent être reliées à l'indice optique effectif d'une couche. Les modules d'élasticité des couches ultraminces sont eux aussi accessibles.

La microscopie à force atomique est basée sur une mesure différentielle de hauteur et non sur une mesure absolue. Pour contourner cette difficulté, nous avons alors imaginé de structurer la surface inerte du substrat par lithographie électronique en pavés en or d'épaisseur nanométrique. La surface inerte sert alors de référence tandis que les molécules à analyser sont greffées sélectivement sur ces pavés d'or. Nous montrerons comment les distributions

d'épaisseur des pavés d'or avant et après greffage nous permettent d'analyser la morphologie du film biologique.

2.2 Imagerie de couches minces

L'imagerie en trois dimensions de la surface ainsi que de sa rugosité ont été réalisées à l'aide d'un AFM D3100 (Digital Instrument). Le principe général de fonctionnement d'un AFM est basé sur la mesure des forces de répulsions de cœur dur dues aux recouvrement des nuages électroniques des atomes de la pointe de l'instrument et la surface étudiée. La mesure par AFM repose sur la détermination de la déflexion d'un microlevier dont la pointe située à son extrémité libre est mise au contact d'une surface. La déflexion du microlevier est mesurée optiquement : un faisceau d'une diode laser est focalisé et réfléchi sur la face supérieure du levier métallisée puis atteint une photodiode quatre cadrans. Un circuit d'asservissement électronique maintient la déflexion constante, et donc également l'intensité de la force, par l'intermédiaire d'un tube piézoélectrique qui induit un déplacement vertical z du levier. Ce tube piézoélectrique, solidaire du levier, permet de même un déplacement latéral du levier, et ainsi de balayer la surface sur une aire maximale $(120 \times 120) \mu\text{m}^2$ (**Figure 2.1**). La résolution latérale, de l'ordre du dixième de nanomètre, est assurée par le faible rayon de courbure à l'extrémité de la pointe, estimé à une dizaine de nanomètres.

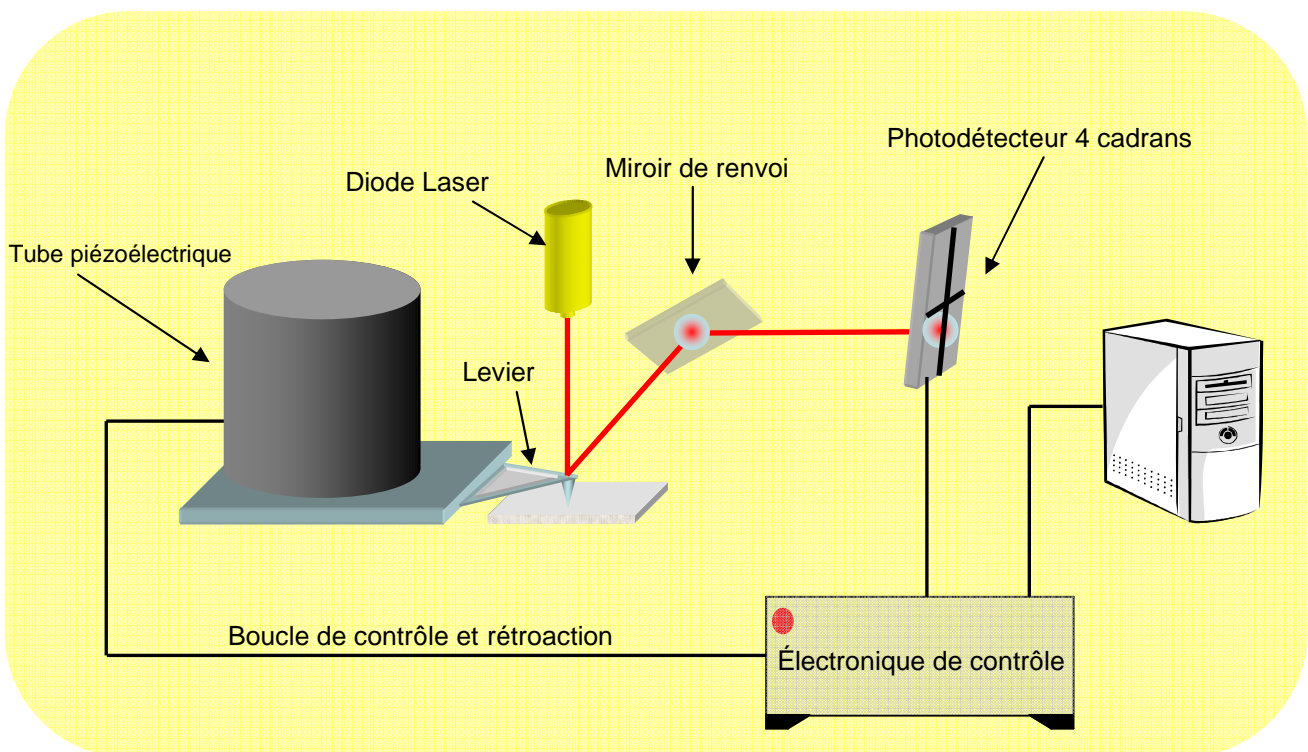


Figure 2.1: Schéma de principe du fonctionnement d'un AFM.

La force appliquée, un paramètre important pour ne pas endommager l'échantillon, est régulée par la constante de raideur du levier que l'on peut modifier par sa géométrie et ses propriétés élastiques. Des forces inférieures à 100 pN ont été appliquées pour cartographier les échantillons mous en mode contact, ceci a nécessité d'utiliser des leviers de constantes de raideurs de 0.032 N/m.

Nous avons tout d'abord caractérisé le support de la couche, un substrat de verre ou de silicium, ensuite l'or comme surface métallique, particulièrement intéressant pour le greffage de

molécules biologiques mais aussi pour être un support des plasmons de surface ou de courant électrique. Les conditions de préparation des couches sont ici répertoriées afin de minimiser la rugosité de surface. L'imagerie des couches ultraminces polymères, illustrées par le Poly(MéthylMéthAcrylate) (PMMA) un polymère électrosensible, et biologiques a été effectuée pour déterminer leur taux de recouvrement et leur rugosité.

2.2.1 Couches minces métalliques

2.2.1.1 Choix du substrat

Deux types de substrat ont été utilisés : le silicium cristallin, dont la rugosité est très faible (0.2 nm), et des lames de verres de microscopes. Le choix de l'un ou l'autre des substrats sera guidé par leurs propriétés propres (transparence, conductivité...). Le silicium est nettoyé à l'acétone et au trichloréthylène. Puis il est plongé dans un bain de HF à 5% vol. (T=25°C) pendant trois minutes afin d'éliminer l'oxyde thermique à la surface du silicium. Le silicium est ensuite rincé avec de l'eau déionisée puis séché sous flux d'azote. La lame de verre est découpée aux dimensions souhaitées à l'aide d'une pointe diamant. L'échantillon est ensuite immergé dans un bain de trichloréthylène chauffé à 80°C pendant 10 minutes pour éliminer les traces éventuelles de polluants organiques. Un rinçage abondant à l'eau déionisée est effectué avant d'étuver le substrat à 100°C pendant une heure pour désorber la fine couche d'eau adsorbée à la surface.

La rugosité RMS (Root Mean Square) des substrats est déterminée après acquisition de l'image suivant :

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum Z_i - Z_{moy}}{N}} \quad (2.1)$$

avec N le nombre de points de l'image, Z_i est la hauteur mesurée et Z_{moy} la valeur moyenne des hauteurs mesurée. Dans la suite de ce mémoire, sauf indication contraire, la rugosité des surfaces sera déterminée sur une aire de $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$. Pour le substrat de silicium, une rugosité de 0.2 nm est mesurée alors que pour la surface de verre elle est évaluée à 0.7 nm.

2.2.1.2 Dépôts de couches métalliques par évaporation thermique

Le dépôt de métal est réalisé par évaporation thermique, un procédé basé sur le changement d'état du métal à déposer. Les échantillons à recouvrir sont placés dans une enceinte où règne un vide poussé (de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-8} mbar) ; le métal brut (fils d'or ou poussière de chrome déposés placés dans un creuset) est chauffé jusqu'à sa température de fusion ce qui provoque sous ces conditions de vide leur sublimation : les atomes métalliques se refroidissent à la surface des échantillons placés en vis-à-vis, diffusent sur la surface et forment ainsi le dépôt en couche mince. Le schéma de principe du dispositif est représenté **Figure 2.2**.

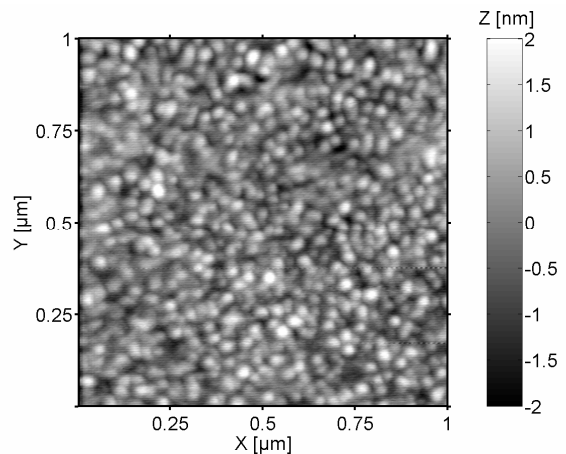
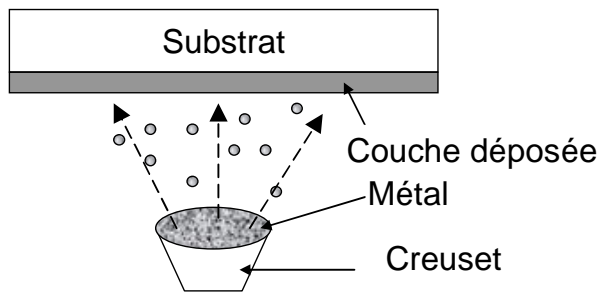


Figure 2.2: Schéma de principe d'une évaporation thermique.

Figure 2.3: Image typique AFM (1x1) µm² d'une surface d'or native.

L'épaisseur du dépôt est contrôlée *in situ* par une balance à quartz, la vitesse de dépôt est modulée par l'intermédiaire de la puissance fournie pour chauffer les creusets contenant le métal massif. Notons que l'incertitude sur l'épaisseur indiquée par le fabricant de la balance à quartz est de 5%.

L'or a la particularité de croître de façon colonnaire ou conique, ce qui explique une topographie de type granulaire en surface. La **Figure 2.3** représente une image AFM d'une surface d'or de 50 nm déposée sur silicium. La croissance de la couche, et donc ses paramètres intrinsèques (rugosité, porosité), dépend des conditions de dépôts. L'influence de ceux-ci a été étudiée en suivant un plan d'expérience pour déterminer les paramètres optimums donnant la rugosité de film d'or la plus faible. Nous avons choisi de travailler à pression constante, soit 5.10^{-7} mbars. La vitesse de dépôt, mesurée par une balance à quartz *in situ*, et l'épaisseur du dépôt ont été variées, la rugosité a été déterminée après dépôt. Les effets de la vitesse de dépôt et de l'épaisseur sur les rugosités mesurées sont lisibles à partir des **Figures 2.4** et **2.5**.

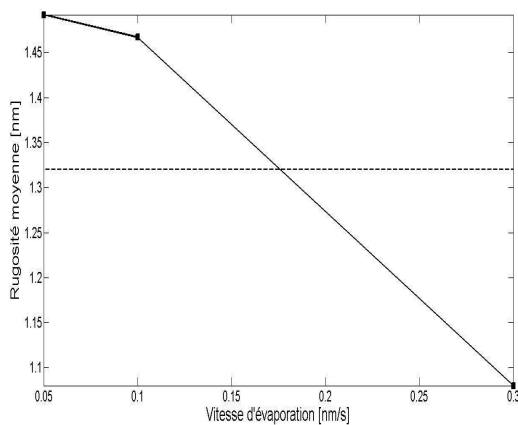


Figure 2.4 : Rugosité moyenne de l'or en fonction de la vitesse d'évaporation.

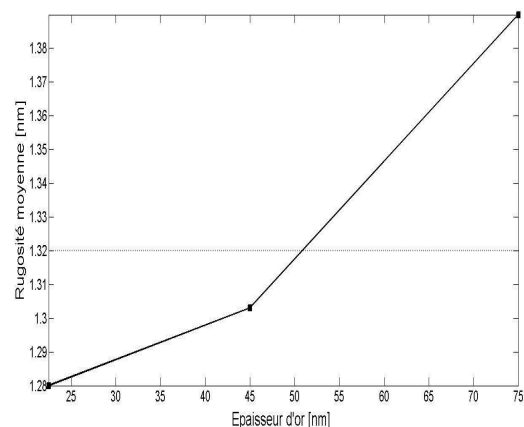


Figure 2.5 : Rugosité moyenne de l'or en fonction de l'épaisseur du dépôt.

La **Figure 2.4** montre une diminution de la rugosité moyenne avec l'augmentation de la vitesse d'évaporation. Les variations observées dans la **Figure 2.5** sont plus faibles, néanmoins la rugosité moyenne tend à augmenter avec l'épaisseur du dépôt. Cette étude préalable nous a permis de déterminer les conditions de dépôt satisfaisant des couches d'or faiblement rugueuses :

pour une épaisseur de 50 nm d'or, une vitesse de dépôt de 0.3 nm/s permet d'obtenir une rugosité de 1.2 nm.

2.2.2 Couches minces polymères

Un polymère classiquement utilisé dans les procédés de nanofabrication par lithographie par faisceau d'électrons (LFE) est le Poly(MéthylMéthAcrylate) (PMMA). Le PMMA est un polymère vinylique, fabriqué par polymérisation radicalaire à partir du monomère, le méthacrylate de méthyle. Cette résine positive voit sous irradiation sa structure moléculaire modifiée et sa solubilité profondément accrue. Ce polymère possède plusieurs avantages que nous avons exploités durant ce travail de thèse. D'une part, le PMMA fait partie des matériaux dits diélectriques (ou isolants électriques). Cette propriété pourra être utilisée pour isoler une zone particulière d'un échantillon. D'autre part, les différents réactifs biologiques employés n'interagissent pas avec le PMMA. Il sera donc un isolant électrique et biologique. Son épaisseur peut être contrôlée jusqu'à obtenir des couches ultra minces, inférieures à 10 nm. De plus, l'indice optique du PMMA est similaire aux couches biomimétiques, ce qui en fait un excellent fantôme.

Les couches minces de PMMA sont réalisées par « centrifugation » (**Figure 2.6**) : l'échantillon à recouvrir est placé dans une tournette, puis on vient déposer à sa surface une goutte de 100 μ L de PMMA liquide. La rotation de l'échantillon engendre une force centrifuge qui répartit le PMMA en une couche mince uniforme. L'échantillon est ensuite étuvé à 175 $^{\circ}$ C pendant 3 heures pour évaporer le solvant piégé par le PMMA. Cette température de recuit est réduite à 90 $^{\circ}$ C pendant 1 heure pour des épaisseurs de PMMA inférieures à 100 nm.

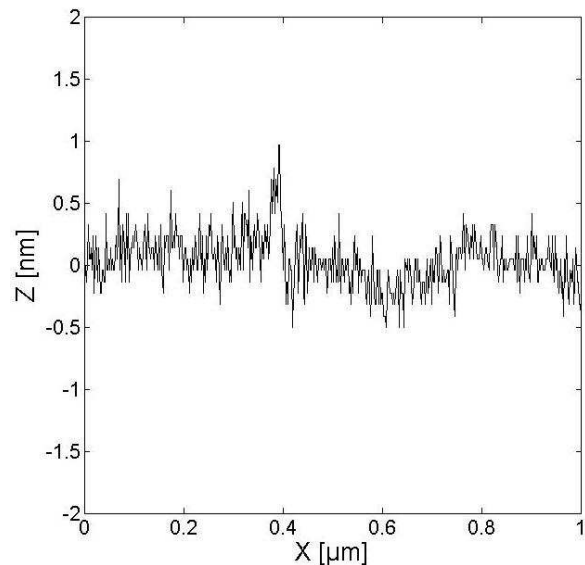
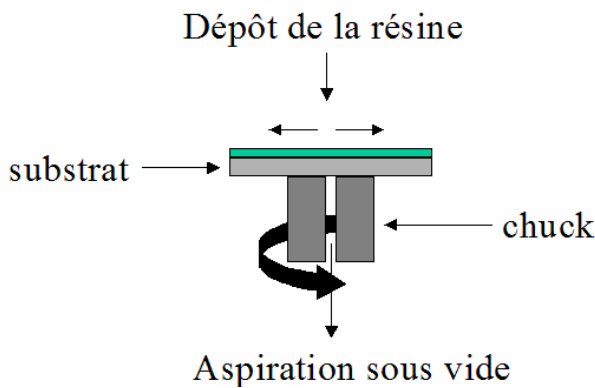


Figure 2.6: Schéma de principe du dépôt de PMMA par centrifugation.

Figure 2.7 : Section d'une couche de 300 nm de PMMA déposée sur un substrat de silicium

Pour contrôler l'épaisseur de couche, deux paramètres entrent en considération : la viscosité du PMMA, qui peut être contrôlée en modifiant sa concentration dans son solvant, le chlorobenzène, et la mise en rotation de l'échantillon (rampe d'accélération, vitesse maximale atteinte, décélération, etc.). Une formule empirique [118] permet de lier l'épaisseur du film de PMMA à la vitesse de rotation de la centrifugeuse et à la concentration par :

$$d = A.c^{1.33}.\omega^{-0.5} \quad (2.2)$$

où d est l'épaisseur de la couche [μm], c le pourcentage de polymère dans le solvant, ω la vitesse de rotation [Tours/min] et A une constante d'ajustement, empiriquement fixée à 4.3. Cette approximation est valable pour $c < 5\%$.

L'analyse de la topographie (**Figure 2.7**) d'un dépôt de PMMA de 300 nm sur un substrat de silicium montre une rugosité inférieure à 0.2 nm. Cette rugosité est typiquement la rugosité du substrat de silicium. Une analyse similaire conduite sur un substrat de verre montre une rugosité de 0.8 nm soit la rugosité de la surface de verre. Les dépôts d'épaisseurs plus faibles présentent la même rugosité. On en déduit que ce procédé de dépôt permet d'obtenir des couches ultra-minces et très plates, avec une rugosité identique à celle de son substrat.

2.2.3 Couches minces biologiques

Nous avons employé comme molécules modèles pour cette étude deux types de molécules biologiques interagissant de façon différente avec l'or :

- des monobrinns d'ADN, composés d'un nombre de bases compris entre 15 et 35, et possédant à leur extrémité 3' un groupement thiol. L'interaction entre le groupement thiol et l'or sera donc forte.

- une protéine, la T3 RNA polymérase, faiblement adhérente à l'or. Dans ce cas, le greffage de la protéine est assuré des groupements amines $-\text{NH}_2$ libres peuvent former des liaisons avec l'or. Des liaisons hydrogènes et des forces de Van der Waals peuvent aussi contribuer à fixer la protéine sur la surface. De plus, certains acides aminés, notamment la cystéine, sont connus pour former des liaisons avec l'or [119].

Nous ferons l'hypothèse que, à concentration identique, seul le nombre de bases a un impact sur l'épaisseur et le taux de recouvrement des monobrinns à la surface des pavés d'or. La nature des bases ne sera donc pas considérée comme un paramètre influant. La synthèse et la thiolation des monobrinns [15] sont des étapes longues, c'est pourquoi tous les monobrinns étudiés ont été achetés chez MGW Biotech. La distance entre chaque base est dans la littérature de 0.34 nm. Un groupement thiolé ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-$) est greffé à l'extrémité 3' des monobrinns utilisés, estimé quant à lui à 1 nm. En considérant une chaîne linéaire, la longueur théorique de chaque brin peut ainsi être évaluée. Les chaînes choisies sont répertoriées dans le **Tableau 2.1**.

Nombre de bases	Longueur théorique [nm]	Séquence
15	5.8	5' – AGT ACA GTC ATC GCG - 3'
25	9.2	5' – TTA TTA ACC CTC ACT AAA GCG CGC A- 3'
35	12.5	5' - TTT TTT TTT TTT ATT AAC CCT CAC TAA AGC GCG CA - 3'

Tableau 2.1: Nombre de bases, longueur théorique et séquences des monobrinns d'ADN utilisés.

2.2.3.1 Immobilisation des monobrins d'ADN et de la protéine sur la surface d'or

Une méthode simple pour greffer les monobrins d'ADN sur la surface d'or consiste à déposer sur la zone à analyser une goutte de 10 μL de solution d'ADN thiolés à 10^{-4} M dans du tampon phosphate à 50 mM de NaCl. Les monobrins thiolés mis en solution vont donc s'adsorber à la surface d'or pour former une monocouche d'oligonucléotides. Le processus gouvernant l'adsorption de la protéine à la surface de l'or ne met pas en jeu le même type de phénomène, ce qui aura fondamentalement une influence sur la cinétique du greffage. Néanmoins, il sera prouvé ultérieurement que le même procédé peut être appliqué pour former une monocouche protéique sur le substrat.

L'utilisation d'une solution tampon contrôlée en pH est rendue nécessaire pour conserver la stabilité de l'ADN. L'incubation est réalisée pendant 18H. Pour éviter l'évaporation de la goutte, qui conduirait à la pollution de la surface par des cristaux de NaCl, l'échantillon est stocké dans une boîte étanche contrôlée en taux d'humidité. L'échantillon est ensuite rincé abondamment avec la solution tampon et séché sous un léger flux d'azote.

2.2.3.2 Caractérisation des couches d'or greffées

Les différentes étapes de l'immobilisation ont été imagées par AFM. Les **Figures 2.8** montrent l'évolution de la topographie d'une surface d'or (**Figure 2.3**) en fonction des longueurs des chaînes d'oligonucléotides greffées. Il apparaît en premier lieu que la structure granulaire de l'or tend à s'estomper plus la longueur des chaînes est importante. L'adsorption des monobrins de 15 bases (**Figure 2.8A**) masque les joints de grains en élargissant de 5 nm la taille des grains d'or apparent. Le dépôt dissimule totalement la structure granulaire de l'or pour les monobrins de 35 bases (**Figure 2.8B**).

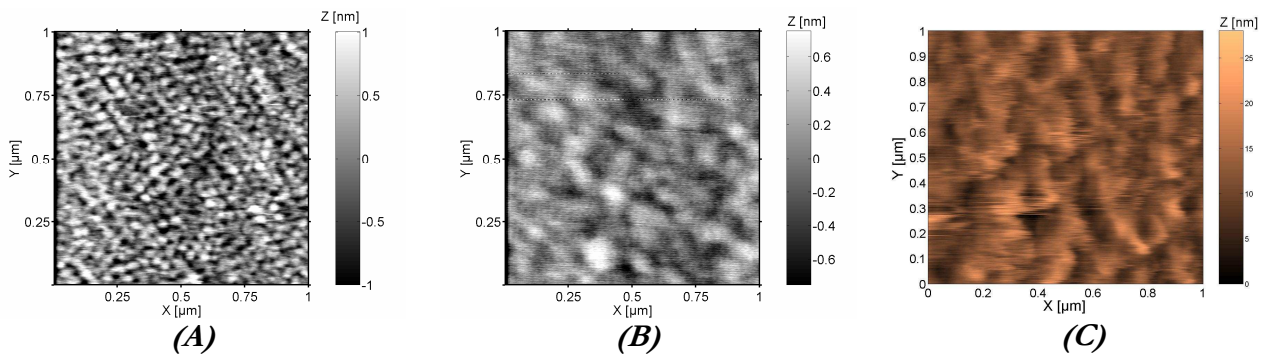


Figure 2.8: Image AFM d'un film d'ADN 15 bases(A), 35 bases (B), d'une couche protéique de T3 Polymérase (C), immobilisés sur une surface d'or.

La couche protéique a une structure différente. L'observation globale sur une surface de 1 μm^2 met en évidence une couche d'apparence irrégulière (**Figure 2.8C**). Les grains d'or sont invisibles et la rugosité du film est beaucoup plus importante, (RMS = 3.1 nm).

L'imagerie AFM donne une première information qualitative sur la nature du dépôt. Le principe de la mesure différentielle de hauteur ne permet cependant pas de mesurer l'épaisseur de dépôt. Plusieurs approches ont alors été envisagées.

2.3 Mesure d'épaisseur de couches minces métalliques, polymères et biologiques.

Deux approches traditionnelles ont été suivies pour déterminer l'épaisseur des couches étudiées. La première repose sur une gravure mécanique de la couche, effectuée manuellement par une aiguille de seringue ou par la pointe elle-même, suivie d'une mesure différentielle de hauteur. La seconde exploite les capacités de l'AFM comme machine de force en estimant la profondeur d'indentation de la pointe dans le film biologique.

2.3.1 Gravure mécanique de couches minces métalliques et polymères

Dans le cas de métaux faiblement adhérents à la surface du substrat, une simple rayure, effectuée à l'aide d'une aiguille de seringue, permet de mesurer l'épaisseur de métal déposé. Le rayon de courbure à l'extrémité de l'aiguille utilisée est estimé à environ $50\ \mu\text{m}$. Une vérification préalable a montré que l'aiguille ne rayait ni le verre ni le silicium. L'épaisseur mesurée est donc la différence de hauteur entre le fond et le haut de la tranchée obtenue. Le rattrapage du plan de l'échantillon est assuré par un ajustement linéaire sur les deux axes du plan. La hauteur de marche est mesurée sur l'ensemble des lignes de l'image, la mesure finale étant la moyenne des 512 lignes composant l'image. Ainsi pour l'échantillon présenté dans la **Figure 2.9**, l'analyse de la hauteur moyenne de la marche mesurée dans une fenêtre de balayage de $(20 \times 20)\ \mu\text{m}^2$ permet d'assurer que l'épaisseur d'or déposée est de $48.8 \pm 0.5\ \text{nm}$. Cette mesure de l'épaisseur du dépôt d'or a été reproduite en 10 endroits sur la largeur de l'échantillon.

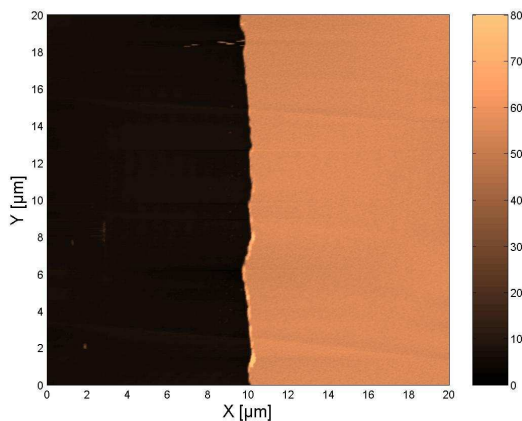


Figure 2.9: Image AFM d'une rayure réalisée un film d'or déposé sur un substrat de silicium.

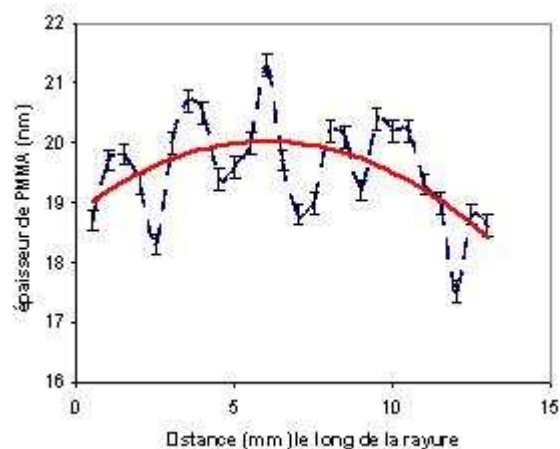


Figure 2.10 : Epaisseur de PMMA mesuré en fonction de position sur l'échantillon.

Dans le cas d'un métal déposé par évaporation thermique, une mesure locale d'épaisseur est donc représentative de l'ensemble de l'échantillon à $\pm 0.5\ \text{nm}$ près.

Cette approche sera également valable pour tout matériau faiblement adhérent, ce qui inclut la majorité des polymères. L'exemple présenté dans la **Figure 2.9** montre l'évolution de l'épaisseur du film de PMMA, dilué à 0.8% et centrifugé à 8000 tours/min, en fonction de la position de l'image sur l'échantillon. La dispersion des mesures observées est de l'ordre de 5%, ce qui, après ajustement des mesures en rouge, montre un écart de 1 nm entre l'épaisseur maximale et minimale. Le profil de la couche déposé par centrifugation est donc légèrement parabolique.

2.3.2 Nanorayure par la pointe AFM de monocouches biologiques

L'application d'une force supérieure au nN à l'aide d'une pointe de l'AFM endommage l'échantillon. Cette méthode est particulièrement intéressante pour déterminer l'épaisseur d'un film de la protéine T3 polymérase faiblement lié à la surface de l'or (**Figure 2.8C**). En appliquant une force de 15 nN suffisante pour briser les liaisons amine/or et après plusieurs balayages successifs sur une surface de $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$ (**Figure 2.11**), la structure granulaire de l'or se découvre progressivement sous la couche protéique encore partiellement présente.

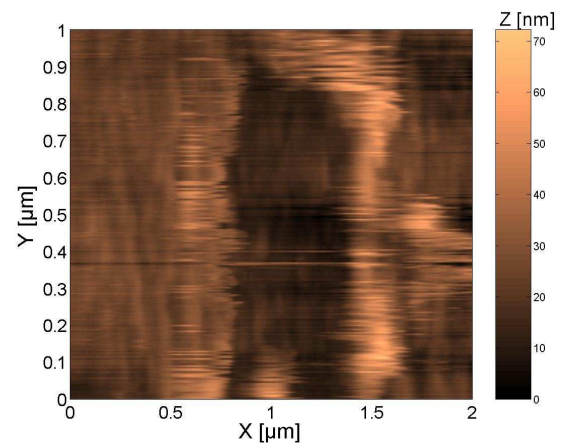
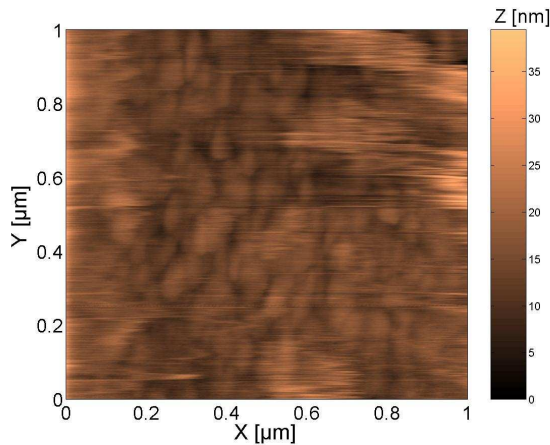


Figure 2.11A: Image AFM de $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$ avec une force de 15 nN de la couche protéique : apparition de la structure granulaire de l'or.

Figure 2.12: Image AFM avec une force de 100 pN de la zone entourant celle où la protéine a été arrachée.

En réajustant la force appliquée à une valeur de 100 pN et en élargissant la zone d'imagerie à $(2 \times 1) \mu\text{m}^2$, le carré de balayage $1 \mu\text{m}^2$ formé précédemment devient visible (**Figure 2.12**). Les bourrelets apparus autour de la zone de $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$ sont la preuve du déplacement de la couche protéique par la pointe. Le profil de la section (**Figure 2.13**) indique une épaisseur comprise entre 8 et 15 nm, un écart équivalent à deux fois la rugosité mesurée sur la **Figure 2.8C**. L'évaluation de l'épaisseur est néanmoins compatible avec les dimensions théoriques de la protéine, $22 \times 7.3 \times 8.1 \text{ nm}$ disponibles dans la littérature [120].

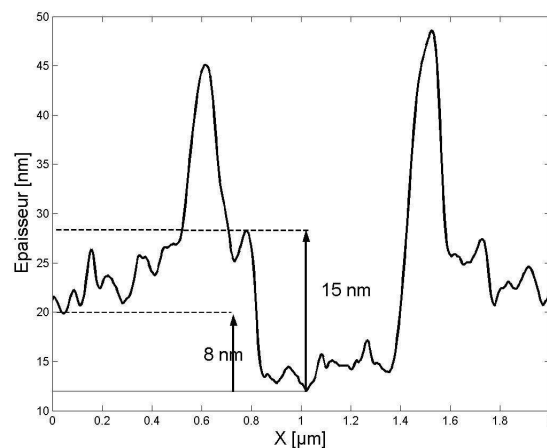


Figure 2.13: Estimation de l'épaisseur du film protéique par section de l'image AFM.

Cet exemple sur une molécule de taille relativement importante, dans des conditions idéales pour l'arrachement, i.e. de faibles liaisons avec le substrat, montre que la détermination

d'épaisseur par cette technique reste délicate. Une étude similaire présentée dans la littérature [121] a été conduite pour déterminer l'épaisseur de monobrins d'ADN thiolés de 25 bases sur une surface d'or. L'évaluation de l'épaisseur du film obtenu est d'environ $3 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$. Si cette technique ne permet pas de garantir la précision de l'épaisseur, elle a le mérite d'estimer en revanche la nature de la liaison (forte ou faible) des entités biologiques en surface. L'étude de molécules de tailles inférieures ou plus fortement liées à la surface sera naturellement encore plus problématique.

2.3.3 Détermination des profondeurs d'indentation et des modules d'élasticité de couches biologiques [122]

Les propriétés élasto-plastiques des matériaux peuvent être obtenues en analysant les interactions de forces agissant entre la pointe de l'AFM au contact de la surface du substrat, c'est-à-dire à partir de la déflexion du levier, Z_c , en fonction de l'élongation du tube piézoélectrique, Z_p , qui permet à la pointe d'indenter ou de se rétracter de la surface. L'analyse des courbes de forces obtenues dans l'air ou en solution permettent d'obtenir deux types d'informations :

- la profondeur d'indentation de la surface greffée qui permet de déduire l'épaisseur et les propriétés mécaniques de la couche greffée ;
- l'adhérence liée aux propriétés physiques de la couche : l'indice optique et la densité de la couche.

2.3.3.1 Mesures de forces dans l'air

Les propriétés de surface ne sont accessibles que si les modules élastiques de l'échantillon sont bien inférieurs à ceux de la pointe en nitrure de silicium. Nous faisons l'hypothèse raisonnable pour un échantillon biologique qui considère uniquement la déformation élastique du film et pas de la pointe. Le modèle le plus couramment utilisé est celui de Hertz bien que l'adhérence entre la pointe AFM et la surface ne soit pas considérée, dans l'hypothèse d'une sphère élastique en vis-à-vis d'une surface plane. Des compléments prenant en compte les énergies de surface de la pointe et de la surface tels que les modèles DMT (Derjaguin-Müller-Toparov) [123], JKR (Johnson-Kendall-Roberts) [124] ont été développés. Le modèle de Sneddon [125] nous a semblé le plus cohérent car il est applicable à la majorité des cas.

Les mesures ont été réalisées sur une période de 2 heures pour chaque substrat et chaque environnement. Un minimum de 100 courbes de forces a été enregistré sur différentes zones du substrat durant ce laps de temps, en utilisant un levier contact de constante de raideur $k=0.032 \text{ N/m}$. La force mesurée F est donnée par la loi de Hooke :

$$F = k \cdot Z_c \quad (2.3)$$

La distance entre la surface et la pointe, δD , est obtenue par :

$$\delta D = Z_c - Z_p. \quad (2.4)$$

La courbe d'approche, présentée dans la **Figure 2.14**, est utilisée pour mesurer à la fois la profondeur de pénétration, donc l'épaisseur du film d'ADN, et les propriétés mécaniques de la couche. La déflexion de la pointe est représentée en fonction de l'élongation du tube

piézoélectrique. En encart, la force agissant sur la pointe (nN) est calculée pour chaque séparation δD pointe/surface.

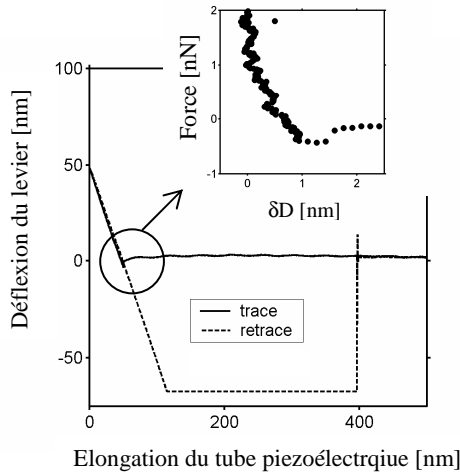


Figure 2.14: Courbe de force AFM dans l'air entre la pointe et un film ADN 35 bases.

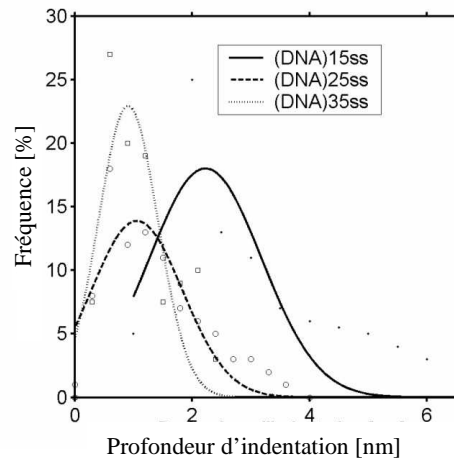


Figure 2.15 : Distribution de la profondeur de pénétration de la pointe dans les différents films d'ADN dans l'air.

La profondeur de pénétration correspond à la distance séparant le contact film/pointe et la position de la pointe coïncidant à la force appliquée maximale. La **Figure 2.15** montre les distributions de la profondeur d'indentation obtenues à partir d'une centaine de courbes de forces sur les différents types d'ADN. Pour quantifier ces dispersions ainsi que l'épaisseur moyenne des films d'ADN, les distributions obtenues ont été ajustées par des gaussiennes de la forme :

$$P(x) = C \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.5)$$

où $P(x)$ est le nombre d'événements à la pénétration x , μ est la valeur moyenne, σ est l'écart type et C la constante de normalisation. L'ajustement n'est pas optimal : plusieurs points expérimentaux sont en dehors de ces courbes. Néanmoins, la valeur maximale des gaussiennes est suffisamment proche des résultats expérimentaux pour que l'on puisse ainsi estimer l'épaisseur du film. Notons que pour le monobrin de 15 bases, on observe une large dispersion des mesures. Les distributions des monobrins 25 bases et 35 bases montrent une dispersion plus faible. Les épaisseurs mesurées par indentation sont regroupées dans le **Tableau 2.2**.

	Épaisseur du film dans l'air (nm)
ADN ₁₅	4.5
ADN ₂₅	2
ADN ₃₅	1.5

Tableau 2.2 : Épaisseur des films d'ADN de 15, 25 et 35 bases déterminées grâce aux distributions d'indentations dans l'air

Le module d'Young effectif E' de la couche d'ADN a été évalué à partir de la raideur de la surface dF/db comme suit :

$$E' = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi}{A}} \frac{dF}{dh} \quad (2.6)$$

où $A=4\pi Rb$ est l'aire de contact entre la pointe et la surface [126] et R le rayon de la pointe à son extrémité.

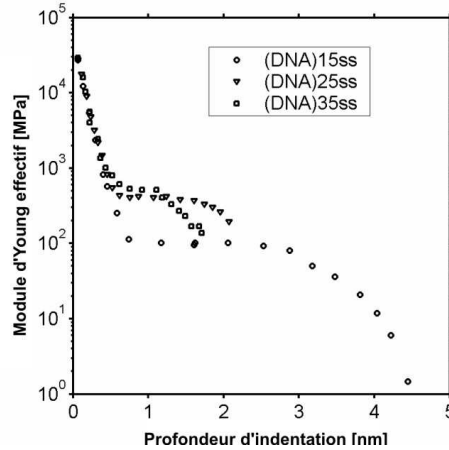


Figure 2.16: Evolution du module d'Young effectif dans l'air de différents films d'ADN en fonction de la profondeur de pénétration.

L'analyse de la **Figure 2.16** montre tout d'abord que E' n'est pas constant sur toute l'épaisseur du film d'ADN. A l'interface Au/ADN, le gradient des modules élastiques est plutôt abrupt sur 0.7 nm quelle que soit la nature de la couche. Entre 1 et 2 nm au dessus de la surface d'or, E' apparaît constant, ce qui indique que la couche n'est influencée ni par le substrat ni par l'environnement. Le film de 15 brins d'ADN a un module de 100 MPa bien inférieur aux autres films. A l'interface ADN/air, il devient logique qu'un gradient de module soit beaucoup plus doux pour les 15 bases (sur 3 nm). L'extrême surface du film d'ADN 15 bases a un module très faible de l'ordre de 10 MPa qui ne peut s'expliquer que par un film peu dense avec une forte fraction d'air.

2.3.3.2 Mesures de forces en solution tampon

Les forces d'interaction entre la pointe et les différents films d'ADN déposés sur l'or ont également été analysées en milieu liquide. La **Figure 2.17** montre le profil de force en fonction de la séparation pointe/substrat. Notons qu'aucune force n'agit sur la pointe à une distance supérieure à 15, 17 et 25 nm pour les brins de 15, 25 et 35 bases respectivement. A grande distance jusqu'aux séparations marquées d'une flèche, des forces électrostatiques de nature répulsive à décroissance exponentielle sont observées.

Ce caractère exponentiel est dû à l'écrantage des charges de surface effectives par la solution ionique. On peut approximer ces forces électrostatiques (appelées également forces de double couche) par [127] :

$$F_{\text{elec}} = 4\pi Q_s R \Phi_p \exp(-D/\lambda_D) \quad (2.7)$$

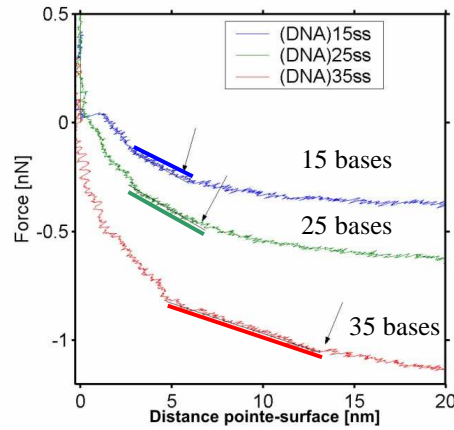


Figure 2.17 : Profils de force en fonction de la distance pointe AFM/substrat pour les trois longueurs de brins en liquide.

avec R le rayon de l'extrémité de la pointe, Q_s la charge de surface, Φ_p le potentiel électrique de la pointe, D la distance pointe surface et λ_D la longueur de Debye. La longueur de Debye est la longueur caractéristique de l'effet d'écran dans la solution ionique. Dans le cas d'une solution saline, elle est exprimée par :

$$\lambda_D = \sqrt{\left(\frac{\epsilon k_B T}{2e^2 N_A I}\right)} \quad (2.8)$$

avec e la charge élémentaire [C], N_A le nombre d'Avogadro, I la force ionique de la solution tampon [mol.L^{-1}], ϵ la fonction diélectrique du milieu, k_B la constante de Boltzmann et T la température [K]. Dans le cas d'une solution contenant des ions $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ avec une concentration milli-molaire, λ_D estimée à 10 nm.

Dans notre cas la force ionique des solutions tampons est identique, la longueur de Debye également, ce qui explique le parallélisme des trois courbes. Les forces à longue portée sont donc parallèles, seule la charge de surface Q_s , qui est différente en fonction de la longueur des brins, influe sur leur amplitude.

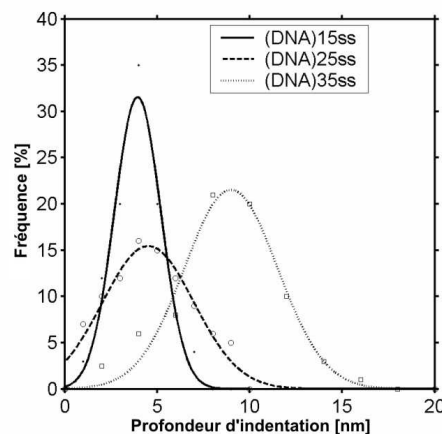


Figure 2.18: Distribution des indentations des trois films d'ADN en liquide.

A courte portée, c'est-à-dire proche du contact entre la pointe et le substrat, les changements sont beaucoup plus marqués. Ce second régime est attribué à la déformation élastique du film biologique, la variation de force est alors plus linéaire qu'exponentielle. La transition entre les deux régimes peut être un bon moyen de mesurer l'épaisseur d'ADN.

	Epaisseur du film en liquide [nm]
ADN ₁₅	4.5
ADN ₂₅	4.8
ADN ₃₅	10

Tableau 2.3 : Epaisseur des films d'ADN 15, 25 et 35 bases déterminées à partir des distributions d'indentation en milieu liquide.

La distribution des profondeurs d'indentation issue de l'analyse des forces est présentée dans la **Figure 2.18** et leurs valeurs les plus probables sont considérées correspondantes à l'épaisseur du film (**Tableau 2.3**). La transition entre les deux régimes d'interactions diffère en fonction de la longueur des brins d'ADN à lieu à $D=5, 6$ et 13 nm pour les brins de 15, 25 et 35 bases respectivement (**Figure 2.17**). La force de répulsion au contact avec l'échantillon est estimée à 1 nN, ce qui est comparable avec les mesures effectuées dans l'air. La force de répulsion au contact de l'or est plus importante pour de longs brins. Enfin, les profils de forces sont légèrement différents, principalement pour le monobrin de 35 bases, où l'on peut discerner différentes interactions : l'une à courte portée, de 0.5 à 5 nm, et une autre entre 5 et 12 nm. On attribue le premier régime à la compression du film, classiquement étudié par des modèles d'interactions élastiques comme le modèle de Hertz par exemple, mais également à des changements structurels du film d'ADN. Le second régime correspond quant à lui aux forces stériques liées à la compression du film [128].

2.4 Mesure d'adhérence entre la pointe et la couche d'ADN dans l'air [122]

Les forces d'adhérence mesurées lors du retrait de la pointe complètent les données physiques sur la couche greffée. Cette force est principalement due aux forces attractives de Van der Waals existantes entre la pointe et l'échantillon. L'énergie de Van der Waals est la somme des énergies d'interaction électrostatique, d'induction et de dispersion. La modélisation de tels phénomènes a été développée par Hamaker et montre l'effet de la géométrie du système sur cette interaction. Les atomes sont supposés conserver leurs individualités et donc s'attirer du fait des forces de dispersion. Notre système est assimilable à l'interaction d'une sphère, de rayon R de densité atomique ρ_1 , séparée d'une distance D d'une surface plane de densité atomique ρ_2 . Cette énergie est alors exprimée par :

$$W(D)_{VDW} = -\frac{\pi^2 C \rho_1 \rho_2 R}{6D} \quad (2.9)$$

où C est la constante caractéristique des propriétés de polarisabilité des atomes. L'expression (2.9) peut être exprimée sous la forme :

$$W(D)_{VDW} = -\frac{HR}{6D} \quad (2.10)$$

où H , appelée constante d'Hamaker, a la dimension d'une énergie.

La force de Van der Waals résultante est la dérivée par rapport à D de cette énergie potentielle :

$$F_{VDW}(D) = -\frac{\partial W(D)}{\partial D} = -\frac{HR}{12D^2} \quad (2.11)$$

Les variations des forces d'adhérence, donc de Van der Waals, sont directement reliées aux variations de la constante d'Hamaker d'après (équation 2.11). Pour calculer H_{132} entre la pointe (indice 1) et le substrat d'or (indice 2) séparés par le film d'ADN (indice 3), on approxime H_{132} par [129]:

$$H_{132} = \sqrt{H_{131}H_{232}} \quad (2.12)$$

Entre deux diélectriques, H_{131} est obtenu par :

$$H_{131} = \frac{3}{4}k_B T \left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon_3}{\epsilon_1 + \epsilon_3} \right)^2 + \frac{3h\gamma}{16\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_3^2)^2}{(n_1^2 + n_3^2)^{3/2}} \quad (2.13)$$

avec T la température (K), h la constante de Planck, k_B la constante de Boltzmann, γ la fréquence d'absorption dans l'UV, n_1 et n_3 les indices optiques respectifs de la silice et de l'ADN. Le premier terme d'entropie est considéré comme négligeable vis-à-vis du second terme de dispersion si l'on suppose une constante diélectrique ϵ_3 raisonnable entre 4 et 20. Pour un métal, l'équation précédente n'étant pas valide ($\epsilon \rightarrow \infty$), H_{232} est approximé à $4 \cdot 10^{-19}$ J [129].

Un film adsorbé sur une surface réduit alors les forces de Van der Waals. Les distributions gaussiennes des forces d'adhérence au contact de la pointe en nitrure de silicium avec l'or seul ou fonctionnalisé par les brins d'ADN de différentes longueurs sont représentées en **Figure 2.19**.

L'or seul, comme attendu, développe les forces les plus importantes : à mesure que le nombre de bases, donc la longueur des brins, augmente, la valeur moyenne des forces diminue alors que la variance augmente.

Dans l'hypothèse d'un contact similaire entre la pointe de forme parabolique et les trois types de surfaces greffées, les différences entre les forces d'adhérence ne peuvent provenir que des écarts entre les indices optiques de l'ADN n_3 :

$$\frac{F_{Au/ADN/Si} - F_{Au/Air/Si}}{F_{Au/Air/Si}} = \frac{H_{Au/ADN/Si} - H_{Au/Air/Si}}{H_{Au/Air/Si}} \quad (2.14)$$

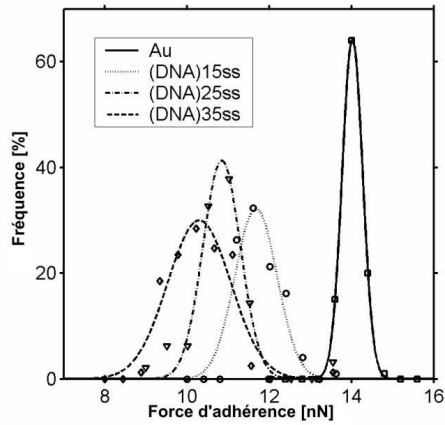


Figure 2.19 : Distribution des forces d'adhérence pour la surface d'or seule et les trois surfaces fonctionnalisées par des brins d'ADN de trois longueurs différentes.

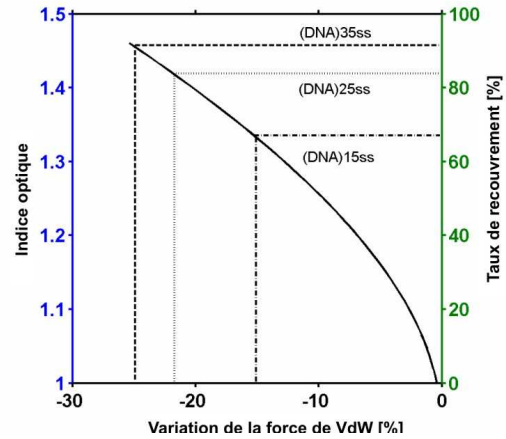


Figure 2.20 : Variation de la force de Van der Waals en fonction de l'indice optique effectif n_3 de la couche adsorbée sur l'or.

Parallèlement le taux de recouvrement Γ du film d'ADN peut être déduit du modèle en se basant sur l'hypothèse d'un indice suivant :

$$n_{eff} = n_{milieu} + \Gamma(n_{ADN} - n_{milieu}) \quad (2.15)$$

La **Figure 2.20** est la représentation des variations de l'indice optique du film d'ADN, ainsi que de son taux de recouvrement, en fonction de la variation de la force de Van der Waals mesurée. Les mesures correspondant aux 3 longueurs de brins d'ADN sont représentées en traits pointillés et leurs valeurs sont reportées dans le **Tableau 2.4**. Les hauts indices mesurés pour l'ADN de 35 bases signifient que le film est le plus dense alors que le taux de recouvrement Γ est le plus faible pour les 15 bases.

Nombre de bases	Indice effectif	Fraction Volumique [%]
15	1.34	72
25	1.43	91
35	1.47	100

Tableau 2.4 : Indice effectif et fraction volumique des différentes couches de monobrins d'ADN déterminées par les mesures d'adhérence.

2.5 Structuration de la surface par lithographie par faisceau d'électrons [122]

Une autre approche pour déterminer l'épaisseur de film biologique est basée sur la structuration de la surface grâce aux facilités de micro-fabrication disponibles au laboratoire. L'objectif est de réaliser une mesure différentielle d'épaisseur en structurant la surface en pavés d'or, de dimensions latérales et d'épaisseurs contrôlées sur un substrat de silicium, sur lesquels sera greffée la couche biologique. Le greffage des molécules étudiées, assuré par une interaction thiol-or, est localisé spécifiquement sur les plots métalliques. Une mesure de l'épaisseur de la structure avant et après greffage permettra de déterminer par différence l'épaisseur du film biologique. L'intérêt principal de cette structuration est de réaliser une mesure locale permettant de déterminer une distribution d'épaisseur.

2.5.1 Fabrication des pavés d'or

Le motif à réaliser en lithographie par faisceau d'électrons (LFE) est choisi de sorte à respecter les critères imposés par l'AFM. En effet, le balayage horizontal de l'AFM est limité à une aire de $(120 \times 120) \mu\text{m}^2$. Pour effectuer une mesure statistique de hauteur sur le plus de pavés possibles, nous avons choisi de réaliser une matrice de 16 plots d'or de $5 \mu\text{m}$ de large, de 50 nm d'épaisseur et espacés de $10 \mu\text{m}$. Le substrat choisi est le silicium pour sa faible rugosité de surface et sa conductivité, propriété nécessaire pour la LFE.

Le processus de fabrication par LFE est bien maîtrisé au laboratoire : cette technique offre l'avantage par rapport à d'autres (par exemple la photolithographie UV) de procéder par écriture directe sur les échantillons, ce qui laisse une grande souplesse pour une modification rapide des motifs. La **Figure 2.21** résume les différentes étapes du processus de fabrication de la matrice des 16 pavés.

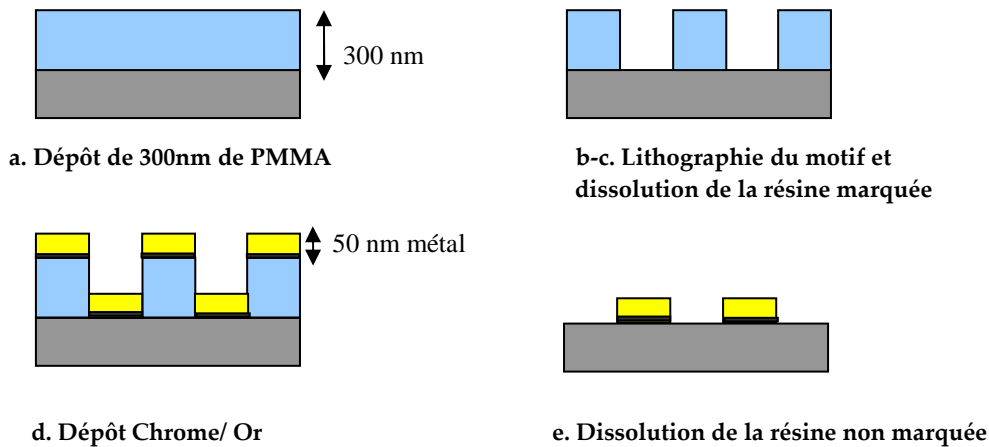


Figure 2.21 : Etapes successives de la fabrication de la matrice de pavés : une couche mince de polymère électro-sensible est déposée à la surface d'un échantillon (a) ; le faisceau d'électrons en contact avec l'échantillon vient briser les chaînes de ce polymère (b) ; une combinaison de solvants permet par la suite de dissoudre les régions de polymère marquées faisant apparaître les motifs voulus (c) ; il est ensuite possible d'évaporer un métal à la surface de l'échantillon (d) ; le motif final est obtenu après dissolution des couches restantes de polymère (e).

a/ La résine employée est le PMMA, déposée suivant le protocole décrit précédemment, pour obtenir une épaisseur de 300 nm .

b/ La lithographie a été réalisée au LPUB à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) JEOL 840 A, disposant d'un grossissement maximal de $300\,000$ et d'une résolution de 70 nm dans des conditions de fonctionnement optimales. La procédure typique de lithographie repose sur une phase d'exposition destinée à définir la géométrie du motif désiré. Le masque électro-sensible est marqué par un faisceau d'électrons qui, au contact de l'échantillon, vient casser les chaînes du polymère. Cette étape est prépondérante dans le sens où elle détermine la résolution et la durée de la procédure d'élaboration. Pour la fabrication, le MEB est relié à un ordinateur qui permet de piloter la position du faisceau d'électrons par l'interface du logiciel ELPHY Quantum de RAITH GmbH. Il est ainsi possible d'exposer point par point de l'échantillon sans affecter la résine aux endroits non désirés.

Le détecteur est principalement composé d'une cage de Faraday (collecteur), d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur. Il est muni d'un lecteur à faible énergie, détectant les signaux d'amplitude inférieure à 50 eV. Les électrons primaires et rétro-diffusés ayant des énergies supérieures sont donc éliminés de la mesure. Le scintillateur transforme les électrons secondaires en signal lumineux. Plus l'interaction sera importante, plus le pixel sera brillant. Le MEB peut alors travailler selon deux modes : le mode imagerie pour le positionnement et le mode insolation pour la lithographie. Par analogie avec l'optique, la longueur d'onde des électrons étant très courte (quelques dixièmes de nm pour des tensions d'accélération de quelques kV), la résolution n'est pas limitée par la diffraction.

L'obtention de résolutions élevées avec un masqueur électronique est assurée par le contrôle précis des paramètres du faisceau. La tension d'accélération des électrons permet de contrôler la taille de la sonde. Pour la réalisation des petites structures, cette tension est de 20 kV, ce qui permet d'obtenir au minimum des structures d'un diamètre de 70 nm. Il est cependant possible de travailler à de plus faibles énergies, entraînant une perte de résolution, pour réaliser de plus grosses structures afin de diminuer la durée totale d'exposition pour les gros motifs.

Le faisceau d'électrons est condensé à l'aide tout d'abord d'une première lentille condenseur, contrôlée par le réglage grossier du courant de sonde. Ce courant est utilisé à la fois pour former et limiter la quantité de courant dans le faisceau. Une seconde lentille affine et densifie le faisceau d'électrons, le rendant ainsi plus cohérent. Cette lentille est contrôlée par le bouton de réglage fin du courant. Un diaphragme objectif de diamètre interchangeable élimine les électrons aux grands angles.

L'astigmatisme est corrigé en focalisant au maximum le faisceau sur l'échantillon. En arrêtant le balayage du faisceau, un spot de contamination est obtenu à partir des contaminants absorbés sur la surface de l'échantillon. Ce spot est en général un composé de carbone provenant de résidus d'huile de pompe à vide. L'obtention d'un spot de révolution circulaire et de diamètre minimal (70 nm) est la garantie d'une résolution maximale pour les conditions de tension d'accélération choisies.

La dose D , densité surfacique de charges délivrée par le faisceau électronique est donnée par l'équation:

$$D = \frac{i.t}{A} \quad (2.16)$$

avec D la dose ($C.cm^{-2}$), i le courant électronique (A), t le temps d'exposition (s), A la surface exposée en cm^2 .

Pour la réalisation de ces motifs, une tension d'accélération de 20 kV, un pas de 80 nm et un temps d'insolation de 80 μs sur une aire de 305 μm ont été utilisés.

c/ Le PMMA marqué est ensuite dissout en plaçant l'échantillon dans un développeur (33 % de MIBK (méthyl isobutyl cétone) et 67 % d'isopropanol) durant 45 secondes. Ce solvant est sélectif en terme de masse moléculaire et ne dissout que les chaînes de polymères qui ont été brisées par le faisceau d'électrons. La dissolution est stoppée par trempage dans un bain d'isopropanol pendant 30 secondes, puis l'échantillon est séché sous un flux d'azote.

d/ Le dépôt du métal est effectué par évaporation thermique suivant les paramètres précisés précédemment. Il est apparu que l'or est faiblement adhérent au silicium. L'utilisation

d'une sous couche d'accroche de chrome de 5 nm nous a permis d'améliorer l'adhérence du dépôt.

e/ La dernière étape de fabrication consiste à « décoller » le métal de la surface encore recouverte de résine. Ainsi, seules les régions où la résine a été préalablement enlevée demeurent recouvertes de métal. Ce processus, communément appelé "lift-off" consiste à dissoudre le PMMA non insolé dans un bain de solvant, le trichloréthylène, chauffé à 80°C.

2.5.2 Mesures différentielles d'épaisseurs

2.5.2.1 Pavés d'or seuls

La **Figure 2.22** est une image AFM (512x512 pixels) de la matrice 4x4 des pavés d'or. Les pavés d'or recouvrent alors 25% de la surface imagée. La distribution d'épaisseur est obtenue en effectuant la différence entre la ligne de base qui est notre substrat de silicium et la hauteur mesurée de chaque pavé. L'analyse de la distribution est réalisée dans une aire de 4x4 μm^2 au centre de chaque pavé afin d'éviter la convolution entre la pointe et les bords. Cette procédure a été automatisée afin d'éviter les erreurs manuelles lors du choix des centres des pavés.

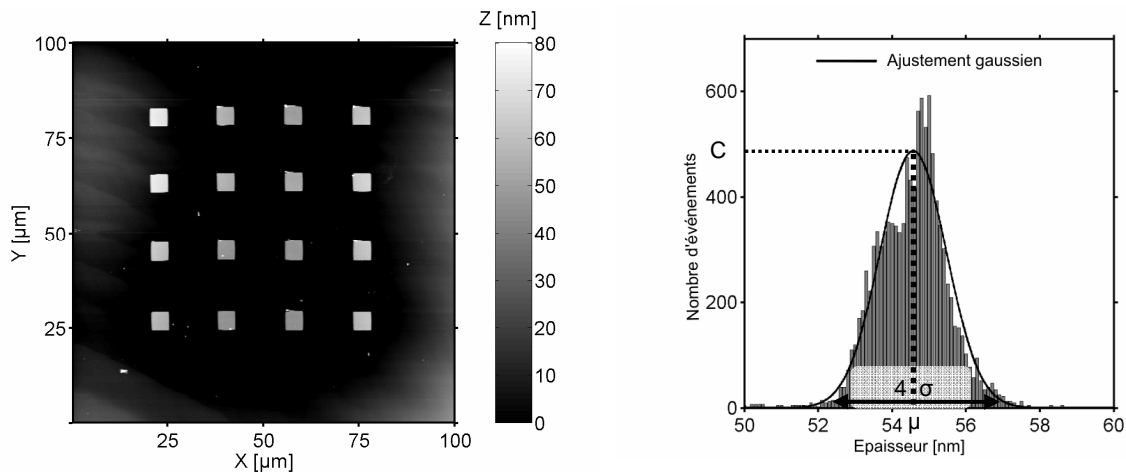


Figure 2.22: Image AFM d'une matrice de 16 pavés en or déposée sur du silicium **Figure 2.23:** Distribution des épaisseurs des plots d'or.

La distribution de l'épaisseur des pavés d'or non greffés est représentée dans la **Figure 2.23**. Quel que soit le nombre de pavés n étudiés, la valeur moyenne de hauteur reste comprise entre 54.6 et 54.9 nm.

L'écart type σ , soit la rugosité, augmente cependant avec le nombre n de pavés analysés comme le montre la **Figure 2.24**. Les points représentent les valeurs de l'écart type mesurées avec la matrice de plots alors que la ligne continue rappelle la dépendance de la rugosité d'un film d'or étendu en fonction de l'aire analysée. 4 pavés sont donc nécessaires pour être représentatifs d'un film continu. Par la suite, 10 pavés ont été choisis pour chaque matrice afin d'éliminer une éventuelle contamination des pavés lors du processus de greffage. La distribution de hauteur est indépendante de la force appliquée pour des forces inférieures à 10 nN et une fréquence de balayage comprise entre 0.1 et 10 Hz.

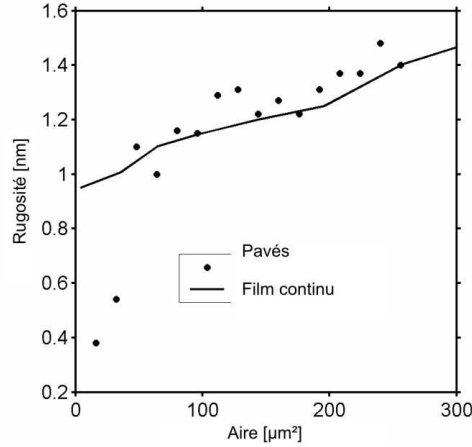


Figure 2.24: Rugosité de la surface d'or en fonction de l'aire de la surface analysée.

2.5.2.2 Pavés d'or dans l'air greffés par des monobrins d'ADN

La vitesse de balayage et la force appliquée F_{app} deviennent ensuite des paramètres critiques pour imager à nouveau les plots d'or, une fois que le film d'ADN est adsorbé. Nous avons déjà vu qu'une force $F_{app} > 1$ nN va endommager le film d'ADN dans la zone imagée en créant des dépôts alors visibles en bords de l'image.

Pour $100 \text{ pN} < F_{app} < 1 \text{ nN}$, l'épaisseur des pavés d'or mesurée ne change pas par rapport à celle des pavés non greffés. Les brins d'ADN sont donc pressés par la pointe, ce processus étant élastique puisque l'épaisseur des pavés augmente quand F_{app} diminue. Une force appliquée de 100 pN est apparue être la force optimum, bien qu'elle soit difficile à maintenir constante lors de longues acquisitions du fait d'une certaine dérive, ce qui a nécessité un ajustement régulier au cours du balayage.

Concernant la vitesse de balayage v , l'épaisseur moyenne μ varie de 0.5 nm pour v comprise entre 20 μm/s et 400 μm/s . La vitesse choisie est de 200 μm/s : une fréquence trop faible augmente drastiquement le temps d'acquisition et ainsi la dérive de la force appliquée, tandis qu'une fréquence trop élevée ne permet pas au tube piézoélectrique de suivre correctement la topographie de la surface. La **Figure 2.25** rassemble les distributions de hauteurs des brins de 15, 25 et 35 bases dans l'air ainsi que leur ajustement gaussien. Les écarts types obtenus lors de ces ajustements sont représentatifs à la fois de la rugosité de l'or et de la dispersion des films d'ADN. Des dispersions σ_{Au} et σ_{Au+ADN} , nous déduisons la dispersion de l'épaisseur du film σ_{ADN} suivant la relation:

$$\sigma_{ADN}^2 + 2\sigma_{Au}\sigma_{ADN} = \sigma_{Au+ADN}^2 - \sigma_{Au}^2 \quad (2.17)$$

Si une distribution est gaussienne, 95% de la population est dans l'intervalle $[\mu - 2\sigma; \mu + 2\sigma]$, c'est pourquoi l'incertitude de l'épaisseur des films d'ADN est donnée par $\pm 2\sigma$. Les pavés recouverts de brins d'ADN 15 bases subissent la plus grande variation en épaisseur (3.4 nm) alors que les deux autres films ont une épaisseur d'environ 2 nm.

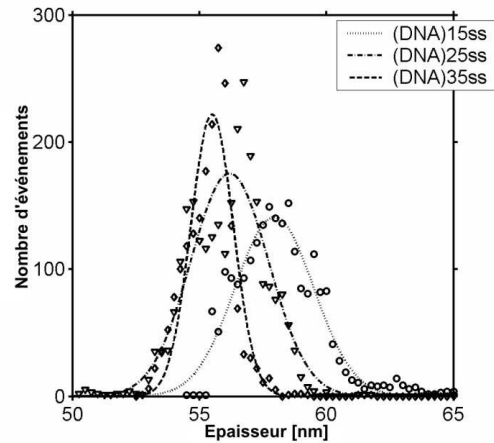


Figure 2.25 : Distribution des hauteurs des pavés d'or greffés par des brins d'ADN de 15, 25 et 35 bases dans l'air.

En supposant que les brins sont rigides et que la variation d'épaisseur mesurée par rapport à leur longueur théorique est due à une inclinaison de la couche d'ADN (**Figure 2.26**), l'orientation effective des brins par rapport à la surface est calculée par :

$$\alpha = \arcsin\left(\frac{\mu_{ADN}}{L_{THEO}}\right) \quad (2.18)$$

où μ_{ADN} est l'épaisseur moyenne mesurée et L_{THEO} la longueur théorique. Le **Tableau 2.5** centralise, pour chaque brin, la valeur moyenne de la distribution, l'écart type, l'épaisseur du film ainsi que l'orientation α des brins par rapport à la surface.

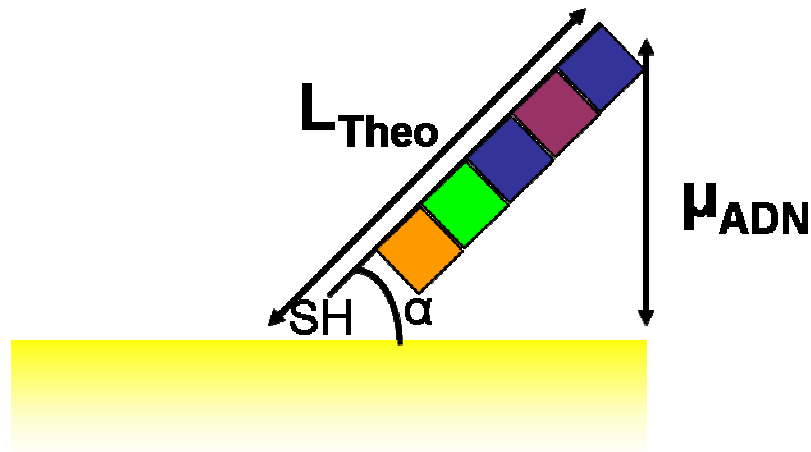


Figure 2.26 : Schématisation de l'orientation des monobrins d'ADN et définition de l'angle α .

Les brins d'ADN de 25 et 35 bases sont donc couchés en surface, contrairement aux brins de 15 bases, dont l'orientation moyenne est de 35° . $\sigma_{ADN(35b)}$ est légèrement plus faible que σ_{Au} : on peut supposer, comme le montrait la **Figure 2.8C**, que l'ADN₃₅ recouvre totalement la surface d'or.

AIR	μ [nm]	σ_{Au+ADN} [nm]	σ_{ADN} [nm]	Epaisseur du film $\mu_{ADN} \pm 2\sigma_{ADN}$ [nm]	α [°]
Au	54.5		1.5		
Au + ADN ₁₅	57.9	2.03	0.65	3.4±1.3	35±20
Au + ADN ₂₅	56.7	1.87	0.47	2.2±0.9	15±10
Au + ADN ₃₅	56	1.32	0.10	1.5±0.2	6±2

Tableau 2.5 : Epaisseur et angle d'orientation des films d'ADN de 15, 25 et 35 bases dans l'air.

Il apparaît que plus les bases sont nombreuses, plus σ_{DNA} est faible. La valeur de σ est un indicateur permettant d'évaluer la mobilité des brins greffés à la surface. Au regard des valeurs de σ mesurées, les brins les plus courts semblent beaucoup plus mobiles.

2.5.2.3 Pavés d'or en liquide greffés par des monobrins d'ADN

Les épaisseurs des films d'ADN en milieu aqueux ont été mesurées grâce à une cellule adaptable au microscope. Le levier est alors solidaire de la cellule qui est transparente. Une goutte de solution tampon englobe totalement le levier et est maintenue entre la cellule et la surface par capillarité. Un délai de stabilisation du liquide et du levier d'une dizaine de minutes est alors nécessaire avant l'imagerie.

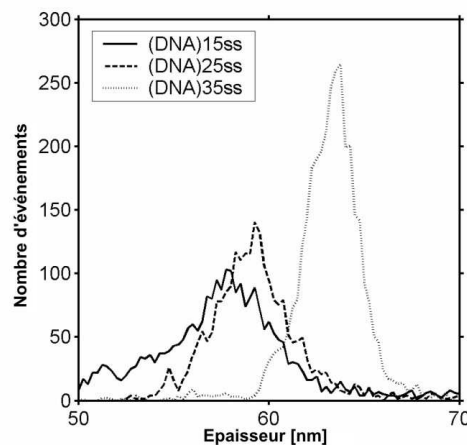


Figure 2.27 : Distribution des hauteurs des pavés d'or greffés par des brins d'ADN 15, 25 et 35 bases en liquide.

Les distributions d'épaisseur sont représentées dans la **Figure 2.27**. L'interprétation est plus complexe que dans l'air : les forces électrostatiques répulsives agissant à longue portée entre la pointe et le film biologique peuvent en effet fausser la mesure.

LIQUIDE	μ [nm]	σ_{Au+ADN} [nm]	σ_{ADN} [nm]	Épaisseur du film $\mu_{ADN} \pm 2\sigma_{ADN}$ [nm]	Longueur théorique [nm]	α (°)
Au	54.5		1.5			
Au + ADN ₁₅	58.0	3.0	1.5	3.4±3.0	5.8	35 ±30
Au + ADN ₂₅	60.0	2.5	1.3	5.8±2.6	9.2	39 ±20
Au + ADN ₃₅	64.0	2.0	0.5	10.5±1.0	12.5	57 ±5

Tableau 2.6 : Épaisseur et orientation des films d'ADN de 15, 25 et 35 bases en milieu liquide.

Notons tout d'abord que la hiérarchie des épaisseurs en liquide est inversée par rapport aux mesures dans l'air (**Tableau 2.6**). Les brins de 35 bases qui étaient complétement couchés sur la surface d'or dans l'air sont ici les plus redressés, avec une longueur mesurée à 10.5 nm. Les brins de 15 bases, quant à eux, ont une épaisseur constante par rapport à la mesure dans l'air. Plus le nombre de bases est grand, plus σ_{ADN} est faible. En liquide, $2\sigma_{ADN15}$ est quasiment égal à μ_{ADN15} alors que $2\sigma_{ADN35}$ ne représente que 10% de μ_{ADN35} : les brins semblent donc se redresser en s'hydratant.

L'orientation effective des brins α semble augmenter avec le nombre de bases alors que σ diminue. La valeur limite de cette orientation, et ceci quel que soit le nombre de bases, tend vers environ 60°.

De la comparaison entre les orientations des brins dans l'air et en milieu liquide, nous concluons que la mobilité des brins est majoritairement gouvernée par les interactions électrostatiques entre les brins et le substrat. La densité de charge effective pour l'ADN est considérable: on considère classiquement environ une charge négative par base, soit approximativement $2e^-/\text{nm}^3$, alors que l'or est chargé positivement. Le fait que les brins les plus longs soient couchés sur la surface dans l'air et non pas en liquide indique que l'attraction électrostatique est considérablement réduite en solution. Les brins sont repoussés en liquide, ce qui nous laisse supposer une inversion de charge du substrat d'or due à l'adsorption d'ions à sa surface: une concentration élevée en sel dans la solution tampon va conduire à une répulsion plus importante.

2.6 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre différentes techniques de mesures d'épaisseurs par microscopie à force atomique. En fonction de la nature de la couche analysée, ces techniques ne présentent pas le même intérêt et ne permettent pas d'obtenir les mêmes informations.

Dans le cas des métaux faiblement adhérents au substrat, il a été mis en évidence que la mesure d'épaisseur réalisée entre le fond et le bord d'une rayure donne une estimation de l'épaisseur à ± 1 nm, incertitude tenant compte à la fois de la rugosité de la couche et du léger gradient d'épaisseur obtenu lors de l'évaporation. Cette technique est également robuste dans le cas de polymères.

Concernant les monocouches biologiques, plusieurs observations ont été faites en fonction des techniques de mesures employées. Des différentes mesures de force effectuées dans l'air et en liquide, une estimation de l'épaisseur a été déduite en mesurant l'indentation de la

pointe dans le film. Par ailleurs, les mesures des forces d'adhérence ont été reliées à l'indice optique de la couche, lui-même dépendant du taux de recouvrement.

Si la nanostructuration de la couche par la pointe AFM ne permet pas d'obtenir une précision importante sur la mesure d'épaisseur, nous avons montré que la structuration de l'échantillon sous la forme de matrice de pavés d'or caractérisés avant et après greffage donnait accès à la fois à l'épaisseur moyenne de la couche mais également à sa dispersion.

La comparaison de ces deux approches montre que les profondeurs d'indentation sous-estiment de 1 nm les épaisseurs de films par rapport à la mesure différentielle conduite sur les pavés. Il est probable que la pointe n'atteigne pas le substrat d'or, ce qui induirait une erreur systématique dans notre analyse.

La problématique de la détection optique de l'accrochage moléculaire revient dans la plupart des cas à déterminer l'épaisseur et l'indice de la couche greffée. La technique originale de mesure différentielle proposée dans ce chapitre permet d'encadrer l'épaisseur de la couche et donc de décorréler l'effet de ces deux paramètres sur la réponse optique.

Etude mono-capteurs optiques

Chapitre III : Analyse des propriétés locales de couches métalliques, polymères et biologiques par ellipsométrie spectroscopique

3.1 Introduction

L'ellipsométrie spectroscopique est une technique reconnue pour sa grande précision pour déterminer l'épaisseur et les indices optiques de couches ultraminces de matériaux diélectriques. Les données du matériau sont obtenues par ajustement des variations spectrales des mesures des réflectivités complexes obtenues en polarisation (*p*) et (*s*) (**Figure 3.1**). On définit alors les angles ellipsométriques ψ et Δ comme suit :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \frac{|r_p|}{|r_s|} \exp(i\Delta) = \tan \psi \exp(i\Delta) \quad (3.1)$$

$\tan \psi$ représente la réflectivité classique analysée d'un point de vue énergétique. Le déphasage entre les deux polarisations Δ est attendu être extrêmement sensible à l'indice et à l'épaisseur de couches nanométriques. L'étude spectrale des variations de phase et de réflectivité permet également d'obtenir un nombre important de mesures, ce qui autorise naturellement un ajustement beaucoup plus précis du spectre expérimental par un modèle théorique comparé à une mesure mono-longueur d'onde.

Avant d'évaluer la potentialité de cette technique comme biocapteur ainsi que son aptitude à la miniaturisation, nous avons d'abord déterminé séparément les indices optiques par ellipsométrie des différents métaux employés au cours de ce travail de thèse, à savoir la couche métallique d'or servant au greffage des molécules biologiques et la sous couche de chrome. Ces valeurs pour l'échantillon en couche mince sont alors comparées aux mesures bibliographiques données pour des matériaux massifs.

Les performances de l'ellipsométrie comme capteur optique sont alors évaluées avec comme modèles biologiques, des monocouches de monobrins d'ADN, qui ont été caractérisées au chapitre précédent. Initialement conduite dans l'air, cette étude a été complétée par une analyse *in situ* réalisée grâce à une cellule de mesure conçue au laboratoire.

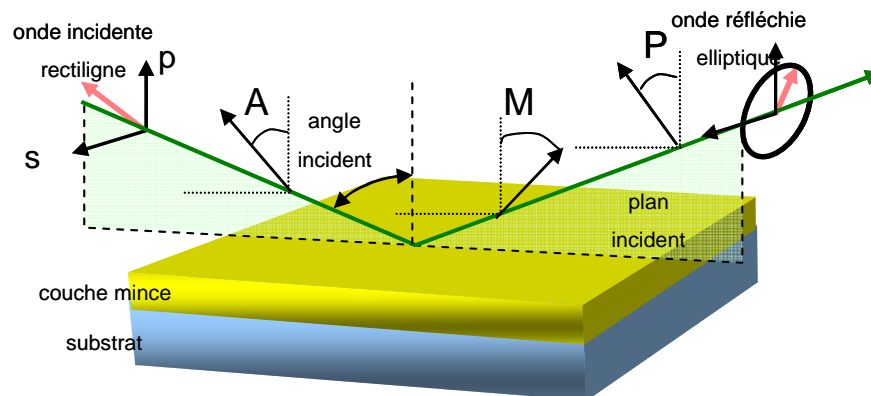


Figure 3.1 : Représentation schématique des éléments rencontrés par l'onde incidente et l'onde réfléchie.

3.2 Principes et appareils

Il est possible d'étudier l'interaction d'une onde électromagnétique avec un ensemble de plusieurs couches grâce à la représentation matricielle d'Abélès [130] qui explicite le champ électromagnétique après réflexion sur un nombre fini d'interfaces successives supposées infinies dans le plan perpendiculaire au plan d'incidence et planes. Cette représentation permet de décrire un système composé de N couches dont les deux extrêmes sont d'épaisseurs semi-infinies. Ce modèle permet en outre de prendre en compte la rugosité des surfaces analysées en définissant une couche intermédiaire d'épaisseur égale à la rugosité et d'indice optique équivalent à un indice effectif lié au milieu adjacent à la couche analysée.

3.2.1 Théoriquement

3.2.1.1 Réflexion sur un système multicouche

Chaque phase j d'épaisseur h_j est caractérisée par trois paramètres : sa constante diélectrique ou sa permittivité ϵ_j , sa conductivité σ_j et sa perméabilité magnétique μ_j . Ces paramètres dépendent de la longueur d'onde dans le vide λ du faisceau incident. Dans notre système, la première couche est le milieu extérieur et la dernière, le substrat. Pour chacune des couches, on définit une fonction diélectrique complexe $\hat{\epsilon}_j$:

$$\hat{\epsilon}_j(\omega) = \epsilon_j + i \frac{4\pi\sigma_j}{\omega} \quad (3.2)$$

où ω est la fréquence angulaire $\omega = \frac{2\pi c}{\lambda}$, avec c la célérité de la lumière.

L'indice optique complexe \mathcal{N}_j est relié à ces quantités par : $\mathcal{N}_j^2 = \hat{\epsilon}_j = (n_j + ik_j)^2$ [131]. La partie réelle de \mathcal{N}_j est l'indice de réfraction n_j , sa partie imaginaire est le coefficient d'extinction k_j . Un système stratifié est par conséquent défini par un ensemble (n_j, k_j, h_j) correspondant aux couches qui le composent.

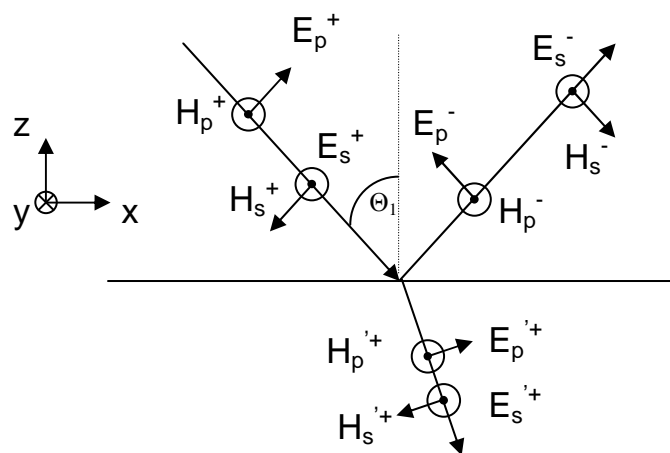


Figure 3.2 : Schéma représentant l'interaction d'une onde électromagnétique incidente polarisée (p) sur un système stratifié. A chaque interface, une partie du faisceau incident est transmise dans la couche inférieure (+), une autre réfléchie (-).

Considérons un système composé d'une interface séparant deux milieux sur laquelle se réfléchit une onde électromagnétique plane faisant un angle d'incidence θ_1 par rapport à la normale à la surface (**Figure 3.2**).

A cette interface, une partie de l'onde est réfléchi, l'autre est transmise. Le champ électrique \vec{E} à la position \vec{r} de l'espace et au temps t s'écrit :

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \sum_{\alpha} \vec{E}^{\alpha} e^{i(\vec{k}_{\alpha} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (3.3)$$

où α désigne le sens de propagation de l'onde (+ sens incident, - sens réfléchi), \vec{k}_{α} le vecteur d'onde et ω la pulsation de l'onde. Le vecteur \vec{E}^{α} décrit la polarisation de l'onde.

Pour la polarisation parallèle au plan d'incidence (TM ou p) :

$$\vec{E}_p^{\alpha} = E_{p,x}^{\alpha} \vec{x} + E_{p,z}^{\alpha} \vec{z} \quad (3.4)$$

où $E_{p,x}^{\alpha}$ et $E_{p,z}^{\alpha}$ sont les amplitudes des composantes selon \vec{x} et \vec{z} du champ électromagnétique. Le champ magnétique est alors dirigé selon \vec{y} .

Pour la polarisation transverse au plan d'incidence (TE ou s) :

$$\vec{E}_s^{\alpha} = E_{s,y}^{\alpha} \vec{y} \quad (3.5)$$

où $E_{s,y}^{\alpha}$ est l'amplitude du champ électromagnétique selon \vec{y} . Le champ magnétique est alors contenu dans le plan (x, z).

Les coefficients de réflexion du système sont définis par le rapport des amplitudes de composantes tangentielles du champ électromagnétique incident (+) et réfléchi sur le système (-) :

$$r_p = \frac{E_{p,x}^-}{E_{p,x}^+} \quad (3.6)$$

$$r_s = \frac{E_{s,y}^-}{E_{s,y}^+}$$

Expérimentalement, seule l'intensité réfléchi est détectée, elle est fonction du carré de ce coefficient. Il est nécessaire d'exprimer le champ réfléchi par le système entier en fonction des paramètres des N couches pour pouvoir calculer r_p et r_s .

Toutes les couches, sauf la première et la dernière, sont représentées par des matrices de passage M_j , $1 < j < N$, qui relie les amplitudes des composantes tangentielles du champ électromagnétique à l'interface entre les phases j et $j+1$. Les amplitudes U_j et V_j des composantes tangentielles du champ résultant à la première interface sont relié à celles de U_{N-1} et V_{N-1} du champ résultant à la dernière interface par la relation :

$$\begin{bmatrix} U_1 \\ V_1 \end{bmatrix} = M \begin{bmatrix} U_{N-1} \\ V_{N-1} \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

Les éléments de la matrice résultante M , définie par le produit des matrices M_j , sont notés $(m_{11}, m_{12}, m_{21}, m_{22})$:

$$M = \prod_{j=2}^{N-1} M_j = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

Dans le cas d'une onde polarisée p (TM) :

Les composantes tangentielles sont E_x et H_y , soit $U_i = H_{yi}$ et $V_i = E_{xi}$. La continuité de ces composantes du champ conduit à la définition des matrices de passage M_j :

$$M_j = \begin{pmatrix} \cos \beta_j & -\frac{i}{q_j} \sin \beta_j \\ -iq_j \sin \beta_j & \cos \beta_j \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

avec q_j l'admittance optique $q_j = \frac{\cos \theta_j}{\sqrt{\hat{\epsilon}_j}}$ et β_j le déphasage induit par chaque

interface $\beta_j = \frac{2\pi}{\lambda} n_j h_j \cos \theta_j$.

Dans le cas d'une onde polarisée s (TE) :

Les composantes tangentielles continues sont E_y et H_x . La matrice de passage M_j s'écrit alors :

$$M_j = \begin{pmatrix} \cos \beta_j & -\frac{i}{p_j} \sin \beta_j \\ -ip_j \sin \beta_j & \cos \beta_j \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

avec $p_j = \sqrt{\hat{\epsilon}_j} \cos \theta_j$.

L'expression générale du coefficient de réflexion complexe en fonction des termes de la matrice résultante M est alors obtenue par :

$$r_p = \frac{(m_{11} + m_{12} q_N) q_1 - (m_{21} + m_{22} q_N)}{(m_{11} + m_{12} q_N) q_1 + (m_{21} + m_{22} q_N)} \quad (3.11)$$

$$r_s = \frac{(m_{11} + m_{12} p_N) p_1 - (m_{21} + m_{22} p_N)}{(m_{11} + m_{12} p_N) p_1 + (m_{21} + m_{22} p_N)} \quad (3.12)$$

Il est alors aisé de déterminer ψ et Δ en introduisant les expressions (3.11) et (3.12) dans l'équation (3.1).

3.2.1.2 Simulation de la rugosité

Nous avons montré au chapitre 2 que l'existence d'une distribution d'épaisseur était attribuée à la rugosité des films. Cette rugosité, ou même discontinuité dans le cas de couche biologique, peut se concevoir dans le formalisme d'Abélès comme une couche supplémentaire constituée de deux milieux de fraction volumique f [132]. L'épaisseur de la couche correspond à la rugosité estimée alors que l'indice de réfraction complexe effectif est exprimé en fonction des fractions volumiques des deux milieux et de leur indice de réfraction respectif. Deux théories sont alors utilisées pour décrire cette fonction selon la disposition des deux constituants.

La première s'appuie sur la relation de Claussius-Mossotti [133], qui définit la constante diélectrique d'un ensemble de sphères, suffisamment éloignées entre elles, immergées dans un milieu hôte. Il s'agit du modèle de Maxwell-Garnett (MG) [134] exprimant la constante diélectrique ε , du milieu effectif constitué de particules sphériques de constante ε_p , en fraction volumique f dans un milieu hôte de constante ε_h , selon la formule :

$$\varepsilon = \varepsilon_h \cdot \frac{\varepsilon_i(1+2f) + 2\varepsilon_h(1-f)}{\varepsilon_i(1-f) + \varepsilon_h(2+f)} \quad (3.13)$$

Ce modèle est validé dans le cas d'inhomogénéité de formes granulaires, de fraction volumique très faible ($< 10\%$) et de taille inférieure à $\lambda/10$. La condition sur la fraction volumique peut être problématique dans le cas de film biologique : si l'on considère la couche biologique comme discontinue, la fraction volumique occupée par cette couche peut varier de 0 à 1.

Le second modèle, dit de Bruggeman [135], élimine les contraintes sur les proportions relatives et donc sur la fraction volumique : il traite les constituants du mélange de façon équivalente. Le mélange des différents constituants va être considéré comme le milieu hôte évoqué dans la théorie de MG. Le nombre de phases coexistantes n'est plus donc plus limité à 2. Soient $\varepsilon_i (i=1,2,..)$ les constantes diélectriques des différents matériaux, respectivement en fraction f_i , la constante diélectrique ε effective du mélange s'exprime par :

$$\sum_i f_i \frac{\varepsilon_i - \varepsilon}{\varepsilon_i + 2\varepsilon} = 0 \quad (3.14)$$

Cette équation peut se développer sous la forme d'un polynôme de degré égal aux nombres de composants du mélange. Par exemple, pour 2 composants on peut écrire :

$$-2\varepsilon^2 + [3f_1(\varepsilon_1 - \varepsilon_2) + 2\varepsilon_2 - \varepsilon_1]\varepsilon + \varepsilon_1\varepsilon_2 = 0 \quad (3.15)$$

qui peut être approximée linéairement dans le cas de deux matériaux diélectrique d'indice optique réel n_1 et n_2 par :

$$n_{eff} = n_2 + f_1(n_1 - n_2) \quad (3.16)$$

Une nouvelle fois, ce modèle ne peut être appliqué que pour des inclusions de taille inférieure à $\lambda/10$. Si l'on se réfère au **chapitre 2**, le film d'or déposé présente une taille de grain inférieure à 50 nm et l'imagerie des films biologiques et polymères n'a pas mis en évidence la

présence d'inclusions de tailles supérieures à cette limite. Cette approche permettra donc, en première approximation, de prendre en compte la rugosité des surfaces analysées, ainsi que de déterminer le taux de recouvrement des films biologiques.

La **Figure 3.3** représente la valeur de l'indice effectif n_{eff} d'une couche d'ADN (indice $n = 1.47$) de fraction volumique f dans un milieu ambiant d'indice $n_{air} = 1$ pour l'air et $n_{eau} = 1.33$ pour l'eau pour les trois modèles explicités. En encart est représenté l'écart de n_{eff} , calculé pour les deux autres modèles, par rapport au modèle de Bruggeman.

Cette figure met en évidence les faibles écarts existants entre les différents modèles, inférieurs à 1% dans l'air et à 0.2 % en liquide, ce qui justifie l'approximation faite en (3.16). Dans le cadre le plus général, c'est-à-dire pour la rugosité des métaux, des films polymères et biologiques, c'est le modèle de Bruggeman qui a été choisi pour la suite de cette étude.

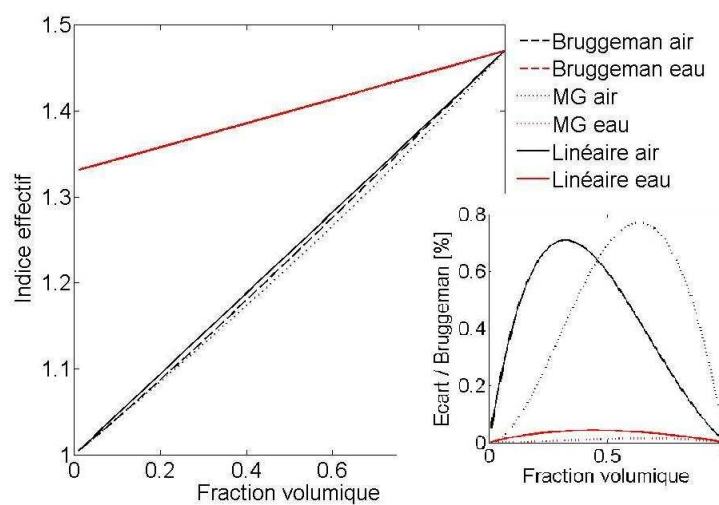


Figure 3.3 : Evaluation de l'indice effectif en fonction de la fraction volumique (ADN/Air ou ADN/eau) pour les modèles de Maxwell-Garnett, Bruggeman et linéaire. En encart est représenté l'écart par rapport au modèle de Bruggeman.

3.2.2 Appareil utilisé et optimisation

L'appareil utilisé ici est un ellipsomètre à modulation de phase (Uvisel, Horiba Jobin Yvon) [136,137], acquis par l'équipe Nanosciences en Mars 2004. Outre les éléments classiques d'un ellipsomètre, à savoir le polariseur, l'analyseur et le monochromateur, la présence d'un modulateur photoélastique après le polariseur permet la réduction du temps de mesure.

3.2.2.1 Description de l'ellipsomètre à modulation de phase

Le schéma de principe d'un ellipsomètre à modulation de phase est présenté dans la **Figure 3.4**.

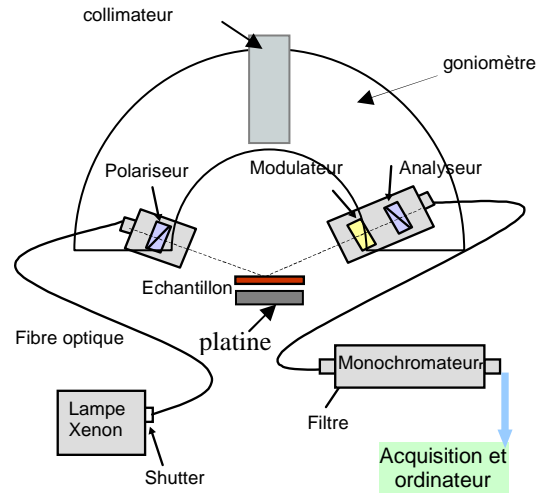


Figure 3.4 : Schéma de principe de l'ellipsomètre à modulation de phase.

La lumière blanche, issue d'une lampe à arc Xénon (75 W) émettant dans un spectre compris entre 300 et 800 nm, est transmise via une fibre optique vers un polariseur linéaire. Après réflexion sur l'échantillon, la polarisation de l'onde change : les deux composantes (p) et (s) du faisceau ne sont pas réfléchies de la même manière sur l'échantillon. Le faisceau traverse ensuite le modulateur photoélastique constitué d'un barreau de silice contraint par un transducteur piézoélectrique à une fréquence de 50 kHz. Cette contrainte crée une anisotropie optique dans le barreau. La lumière polarisée traversant le modulateur est alors affectée par la biréfringence modulée, d'où un retard de phase entre les deux composantes du champ. Le faisceau passe au travers d'un analyseur, puis est collecté par un monochromateur permettant de sélectionner ainsi la longueur d'onde de travail, l'intensité est alors détectée par un photomultiplicateur.

Le dispositif optique est positionné sur un goniomètre permettant de varier l'angle d'incidence de 55° à 80° par pas de 5° . L'échantillon est déposé sur platine réglable en hauteur et en angle ; la planéité est contrôlable par un système d'auto collimation fixé perpendiculairement à la platine. L'ellipsomètre est piloté par le logiciel DeltaPsi2 (Horiba Jobin Yvon), qui permet, outre les réglages et l'acquisition des signaux, le traitement numérique des données.

Extraction de ψ et Δ

Le signal mesuré est digitalisé par un convertisseur analogique digital, sa transformée de Fourier discrète permet d'obtenir la composante continue et les harmoniques de la fréquence de modulation. L'intensité mesurée $I(t)$ s'écrit alors :

$$I(t) = I_0 + I_s \sin(\delta(t)) + I_c \cos(\delta(t)) \quad (3.17)$$

où $\delta(t)$ est le déphasage introduit par le modulateur, et I_s et I_c sont des fonctions des angles ψ et Δ .

L'introduction d'un développement à partir des fonctions de Bessel permet, dans certaines conditions présentées plus en détails dans la littérature [132], d'extraire I_s et I_c . Par ailleurs le formalisme de Jones, appliqué au dispositif décrit **Figure 3.1**, permet d'écrire :

$$\begin{aligned}
I_0 &= 1 - \cos 2\psi \cos 2A + \cos 2(P - M) \cos 2M (\cos 2A - \cos 2\psi) \\
&\quad + \cos 2(P - M) \sin 2A \sin 2M \sin 2\psi \cos \Delta \\
I_s &= \sin 2(P - M) \sin 2A \sin 2\psi \sin \Delta
\end{aligned} \tag{3.18}$$

$$I_c = \sin 2(P - M) \left[\sin 2M (\cos 2\psi - \cos 2A) + \sin 2A \cos 2M \sin 2\psi \cos \Delta \right]$$

Le choix des angles du modulateur M, du polariseur P et de l'analyseur A va permettre de simplifier ces relations et de déterminer ψ et Δ . Classiquement, deux configurations sont utilisées :

$$\underline{\mathbf{P-M = 45^\circ, A = 45^\circ, M = 0 \pm 90^\circ}}$$

On a alors :

$$I_s = \sin 2\psi \sin \Delta \tag{3.19}$$

$$I_c = \sin 2\psi \cos \Delta$$

Cette configuration permet une détermination précise de Δ (indétermination entre ψ et $90 - \psi$ avec un point critique à 45°).

$$\underline{\mathbf{P-M = 45^\circ, A = 45^\circ, M = 45^\circ}}$$

Nous obtenons alors :

$$I_s = \sin 2\psi \sin \Delta \tag{3.20}$$

$$I_c = \cos 2\psi$$

Cette configuration permet une détermination précise de ψ (indétermination de Δ entre $[90 ; 270]$).

Les indéterminations sont donc levées en réalisant une mesure dans chaque configuration. L'incertitude sur la détermination des angles ellipsométriques est annoncée à 2% sur ψ et 1% sur Δ [138].

Une fois le modèle multicouche élaboré, les données expérimentales doivent être ajustées pour pouvoir extraire les données recherchées. La stratégie développée est basée sur la minimisation d'une fonction d'erreur non linéaire χ :

$$\chi^2 = \min \sum_{i=1}^n \left[\frac{(\psi_{\text{exp}} - \psi_{\text{calc}})_i^2}{\Gamma_{\psi,i}} + \frac{(\Delta_{\text{exp}} - \Delta_{\text{calc}})_i^2}{\Gamma_{\Delta,i}} \right] \tag{3.21}$$

avec n le nombre de points de mesure, $\Gamma_{\psi,i}$ et $\Gamma_{\Delta,i}$ les incertitudes sur la mesure, ψ_{exp} et Δ_{exp} les valeurs expérimentales, ψ_{calc} et Δ_{calc} les valeurs calculées par le modèle.

Un algorithme d'ajustement est ensuite employé pour minimiser χ^2 . La méthode de Levenberg-Marquardt est couramment utilisée [139]. La solution obtenue doit avoir un sens physique : un résultat mathématiquement correct peut ne pas être réaliste. Il paraît donc nécessaire de limiter le nombre de paramètres d'ajustement en étudiant les systèmes multicouches par étapes successives et en bloquant les paramètres déterminés lors de l'étape précédente, la convergence étant d'autant plus aisée que les paramètres initiaux sont proches de la solution finale.

Il est assez difficile de définir un critère sur la valeur de χ^2 correspondant à un ajustement correct, celui dépendant en outre de la complexité du spectre, c'est-à-dire du nombre d'inflexions et de l'amplitude des variations. Néanmoins, il s'avère qu'une valeur de χ^2 inférieure à 1 est, dans la majorité des cas, synonyme d'un ajustement mathématiquement correct.

3.2.2.2 Optimisation de l'acquisition

Plusieurs paramètres sont modifiables avant d'effectuer l'acquisition. Le premier est l'angle d'incidence, qui, comme nous l'avons précisé, peut être varié dans notre cas de 55 à 80° par pas de 5°. Le signal détecté va dépendre également de deux facteurs essentiels en traitement du signal : le temps d'intégration, qui va principalement influencer sur le bruit de la mesure et donc la qualité de l'ajustement, et le nombre de points d'acquisition, qui va gouverner en grande partie la durée globale de l'acquisition mais également la précision de l'ajustement. Enfin, la taille de spot aura de même une influence sur la stabilité du signal.

Angle d'incidence

L'angle d'incidence est généralement choisi au voisinage de l'angle de Brewster où la lumière réfléchie est entièrement polarisée et la lumière réfractée partiellement polarisée ce qui assure que la sensibilité est maximale [132]. La valeur de l'angle de Brewster dépend directement des indices de réfraction des deux milieux. Elle est de 56 degrés à l'interface air-verre et de 53 degrés pour l'interface air-eau. Dans le cas d'un métal, l'angle de Brewster n'existe pas. Néanmoins un angle d'incidence d'environ 75°, dans le cas d'une couche mince de chrome ou d'or, permet d'obtenir les conditions de mesures optimums [131].

Temps d'intégration et pas d'acquisition

Le temps d'intégration pour chaque point mesuré et le pas utilisé par le monochromateur nous ont semblé être les paramètres les plus importants. En effet, réduire le temps d'intégration et/ou le nombre de points d'acquisition permet de diminuer de façon remarquable le temps d'acquisition d'un spectre. Cependant, ces variations peuvent induire des erreurs lors de l'ajustement des courbes.

Pour mettre en évidence l'influence de ces paramètres sur la réponse ellipsométrique, un échantillon de silicium a été analysé. Rappelons qu'industriellement l'ellipsométrie est régulièrement utilisée pour déterminer l'épaisseur de la couche d'oxyde natif présente à la surface du silicium (**Figure 3.5**).

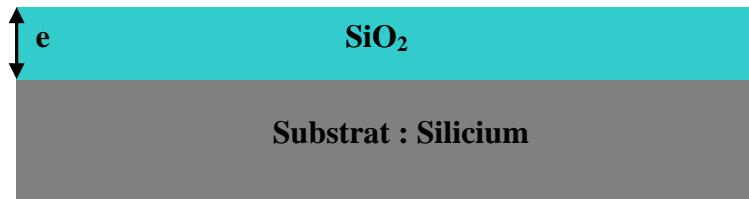


Figure 3.5 : Représentation schématique d'un échantillon de silicium. L'épaisseur e de la couche d'oxyde, SiO_2 , sera ajustée avec comme fonction diélectrique celle donnée par [140].

Les fonctions diélectriques du silicium et de l'oxyde natif sont disponibles dans la littérature [140]. Un spectre étant représenté en trait plein sur la **Figure 3.6**, sur une gamme spectrale comprise entre 400 et 800 nm avec un angle d'incidence fixé à 75° , en variant le temps d'intégration du signal de 100 ms à 1 s et le pas du monochromateur de 5 à 40 nm, correspondant à un temps d'acquisition compris entre 5 min et 40 s respectivement.

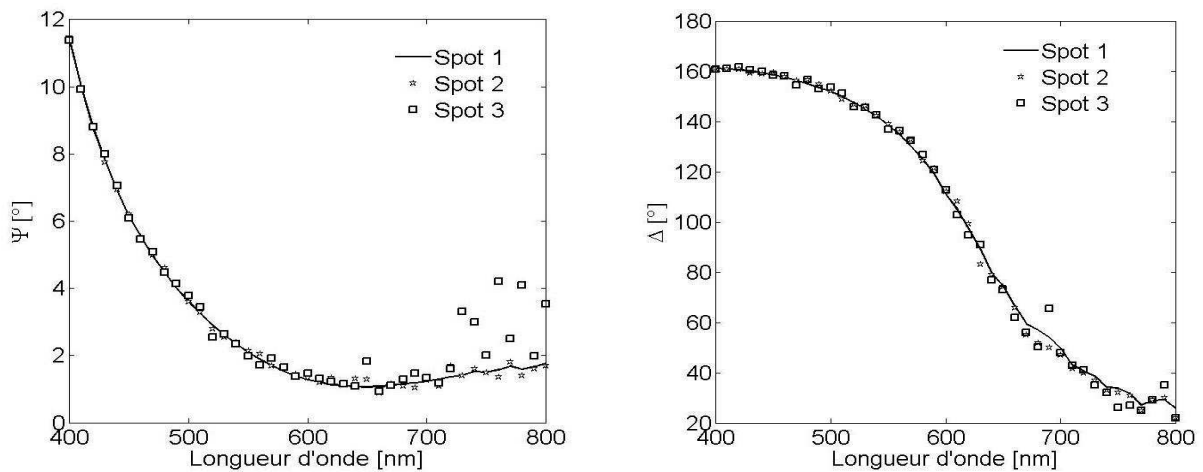


Figure 3.6 : Spectres ellipsométriques de l'échantillon de silicium avec un temps d'intégration de 200 ms et un pas de 10 nm, pour les trois tailles de spots différentes.

L'objectif est de déterminer les limites de ces paramètres permettant d'obtenir un ajustement optimal de l'épaisseur de la couche d'oxyde natif, en prenant comme indice de la couche l'indice de la silice donné par [140].

En premier lieu, notons que les épaisseurs déterminées pour chaque mesure sont complètement cohérentes entre elles, à l'Angström près : une valeur de 1.96 nm est ainsi déterminée. Cependant si l'on s'intéresse au coefficient de convergence χ^2 , des variations plus nettes sont observables (de 0.055 à 0.168).

Pour évaluer l'influence de ces paramètres sur la précision de l'ajustement, une représentation de la moyenne de χ^2 pour chaque temps d'intégration est réalisée dans la **Figure 3.7**. De même, la **Figure 3.8** illustre la valeur moyenne de χ^2 pour chaque pas du monochromateur. Enfin la valeur moyenne de χ^2 de l'ensemble des mesures est reportée en pointillés sur les deux graphiques.

Il apparaît alors que le temps d'intégration a une influence relativement faible sur la précision de la mesure, et donc que la différence entre un temps d'intégration long, 1000 ms, et un temps d'intégration court, par exemple 100 ms, est négligeable. En ce sens 200 ms semble un bon compromis entre vitesse de mesure et précision.

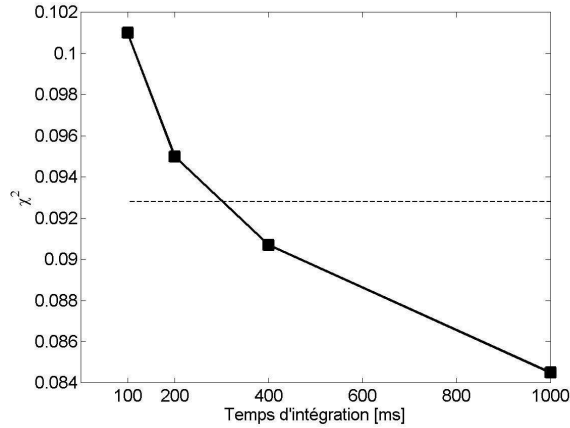


Figure 3.7 : Effet du temps d'intégration sur χ^2 , la valeur moyenne de χ^2 est tracée en pointillés.

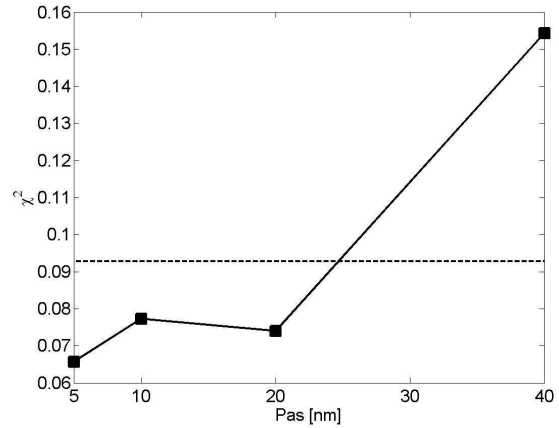


Figure 3.8 : Effet du pas du monochromateur sur χ^2 , la valeur moyenne de χ^2 est tracée en pointillés.

Le pas (ou le nombre de points de mesure), semble le paramètre le plus influant. La variation de χ^2 est quasiment nulle pour un pas de discrétisation inférieur à 20 nm, soit un minimum de 16 points. Pour une discrétisation de 40 nm, soit 9 points, la valeur moyenne de χ^2 augmente drastiquement. Un minimum de 16 points est donc nécessaire pour obtenir une précision maximale pour l'étude de l'oxyde de silicium. Notons également que le spectre étudié ne présente pas d'inflexion complexe, à la différence des métaux, qui est source d'erreurs supplémentaires nécessitant d'augmenter le nombre de points d'analyse.

En moyenne, dans la configuration adoptée, c'est-à-dire un temps d'intégration de 200 ms et un nombre de points d'acquisition égale 16, l'acquisition complète d'un spectre s'effectue en moins d'une minute. Ce temps d'acquisition, qui reste faible par rapport aux ellipsomètres n'utilisant pas la modulation de phase, ne permet cependant pas de suivre en temps réel une interaction biologique sur toute la gamme spectrale.

La taille de spot

La mesure effectuée en ellipsométrie est le résultat de l'interaction du faisceau lumineux et de la surface illuminée. L'ellipsomètre est pourvu d'un collimateur qui permet de diminuer la largeur du faisceau selon trois positions. Le diamètre du gros spot (Spot 1) sur l'échantillon est estimé à 3 mm, le spot de taille moyenne (Spot 2) permet de réduire ce diamètre à 500 μm , tandis que le plus petit spot (Spot 3) est évalué à environ 100 μm . Il est à noter l'influence prépondérante de l'angle d'incidence sur la longueur du faisceau : en considérant la forme elliptique du spot sur la surface, la longueur du spot L_{spot} s'exprime par :

$$L_{spot} = \frac{l_{spot}}{\cos \theta} \quad (3.22)$$

avec l_{spot} le diamètre du spot et θ l'angle d'incidence du faisceau. Ainsi pour le spot de 100 μm de large, le demi-axe va varier de 175 μm pour un angle d'incidence de 55° à 350 μm pour 75°.

Réduire la zone d'interaction a pour inconvénient de diminuer l'intensité lumineuse détectée. Il est alors nécessaire d'intensifier la lumière incidente en augmentant la haute tension qui alimente la lampe Xénon, au risque de diminuer le rapport signal sur bruit en bord de spectre.

Pour exemple, les spectres des trois spots sur l'échantillon de silicium sont représentés sur **Figure 3.6**.

Le spot le plus large a un bruit de 0.1° en ψ et de 0.3° en Δ quelle que soit la longueur d'onde. Pour le spot moyen, un bruit plus important, dû à une tension appliquée à la lampe de plus de 600 V, apparaît en bord de spectre à partir de 710 nm. Le plus petit spot présente un bruit pour un temps d'intégration de 200 ms qui s'amplifie très nettement au-delà de 620 nm. Nous verrons plus tard que la bande spectrale 580-680 nm sera utilisée pour l'excitation de la résonance des plasmons de surface. Il est donc nécessaire d'augmenter le temps d'acquisition au-delà de 500 ms pour amplifier le flux photonique du petit spot pour obtenir un bruit équivalent au spot le plus large. L'utilisation d'un spot de 100 μm de large pour de l'imagerie à balayage est donc possible mais aux dépens de la rapidité de lecture.

3.3 Caractérisation de métaux

Il s'agissait en premier lieu de déterminer précisément l'épaisseur et les constantes diélectriques des dépôts métalliques qui serviront ultérieurement à l'accroche des molécules biologiques. Pour éviter l'éventuelle contamination des surfaces métalliques par pollution ou oxydation à l'air, les mesures ellipsométriques ont été effectuées immédiatement après évaporation. Le silicium, pour sa très faible rugosité de surface, et le verre, que l'on utilisera dans les chapitres suivants, ont été choisis comme substrats pour ces expériences.

3.3.1 Mesure de l'indice de l'or

Le métal étudié en premier lieu est l'or, déposé thermiquement suivant les paramètres énoncés au **chapitre 2**, sous forme d'une couche mince de 45 nm, d'épaisseur mesurée *in situ* par balance à quartz. Les spectres de ψ et Δ sont acquis pour un angle d'incidence de 75° , et représentés sur la **Figure 3.9**.

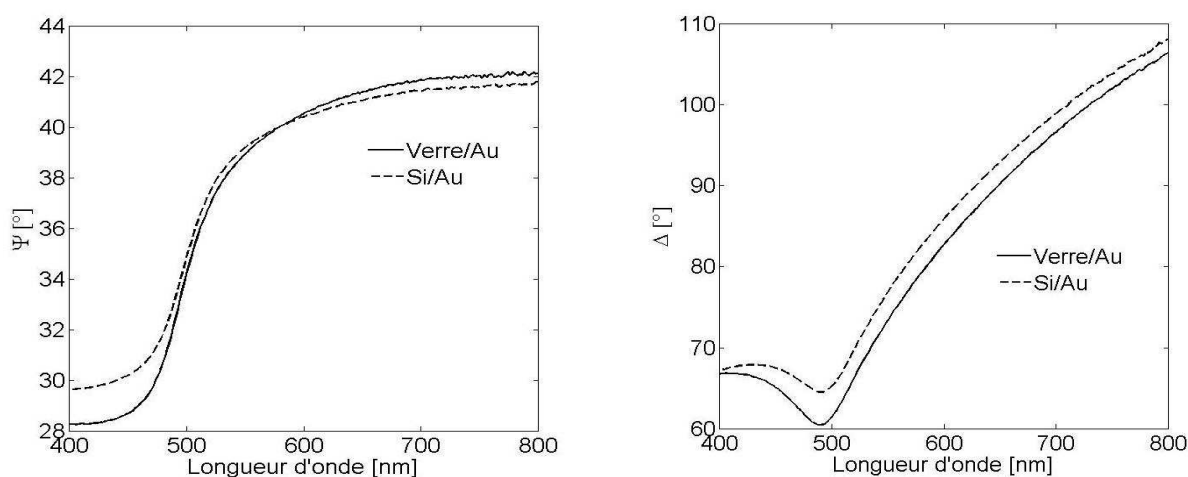


Figure 3.9 : Spectres ellipsométriques obtenus à 75° d'une couche mince de 45 nm d'or déposée sur un substrat de verre (trait plein) et de silicium (trait pointillé).

Deux traitements de données sont possibles à partir de la mesure de ψ et Δ :

(i) A partir des constantes diélectriques données dans la littérature [140,141], représentées dans la **Figure 3.10**, et par la modélisation du système par le formalisme d'Abélès, l'épaisseur de

la couche d'or est déterminée, en tenant en compte ou non de la rugosité, et peut ensuite être comparée à celle mesurée par AFM.

(ii) A partir de l'épaisseur déterminée par AFM, la constante diélectrique de la couche est calculée longueur d'onde par longueur d'onde. Celle-ci est ensuite confrontée aux valeurs données dans la littérature [140,141].

(i) Détermination d'épaisseur à partir des tables d'indice disponibles dans la littérature

Dans un premier temps, l'ajustement de l'épaisseur de métal est réalisé en suivant les modèles multicouches présentés dans le **Tableau 3.1**. Le modèle 1 considère la couche d'or comme parfaitement plane sur le substrat. Le modèle intègre une couche de rugosité entre l'or et le milieu extérieur l'air. Celle-ci est d'épaisseur 1 nm, valeur moyenne de la rugosité déterminée par AFM dans le chapitre 2. La fonction diélectrique de l'or de référence est issue de [140], celle-ci est n'est pas ajustée.

Modèle 1	Epaisseur	Modèle 2	Epaisseur
		50% Or /50 % air	1 nm
Or	e	Or	e'
Substrat	Silicium ou verre	Substrat	Silicium ou verre

Tableau 3.1 : Modèles utilisés lors de l'ajustement des spectres ellipsométriques des échantillons recouvert d'une couche mince d'or.

Les mesures des épaisseurs e et e' ainsi obtenues ainsi que les χ^2 correspondants sont reportés dans le **Tableau 3.2**.

	e [nm]	χ^2	e' [nm]	χ^2	AFM [nm]
Verre / Or	36.5 ± 5.8	1.7612	41.3 ± 6.4	0.977	44.6 ± 1
Silicium / Or	43.5 ± 7.7	1.7994	40.4 ± 4.7	0.872	44.8 ± 1

Tableau 3.2 : Epaisseurs et χ^2 obtenus pour des couches d'or déposées sur du verre ou du silicium en fonction du modèle utilisé. La mesure AFM effectuée sur ces mêmes échantillons montre une sous estimation de l'épaisseur de l'ajustement ellipsométrique.

L'épaisseur de la couche a été mesurée par AFM de la même manière que pour le **chapitre 2**. L'épaisseur AFM de 44.6 ± 1 nm diffère d'environ 10% de la mesure ellipsométrique, qui, au vue des incertitudes déterminées, est moins précise. Même si l'ajout de la couche intermédiaire de rugosité permet une diminution de χ^2 , les deux modèles sous estiment l'épaisseur réellement déposée. De même, l'épaisseur de métal obtenue déterminée par cet ajustement sur le substrat de verre et de silicium est différente, ce qui n'est pas observé par AFM.

Après vérification de la calibration de l'ellipsomètre et de l'AFM, il est apparu que seule la fonction diélectrique de l'or utilisée lors de la simulation pouvait différer. D'une part, les valeurs des constantes diélectriques données communément sont issues de mesures réalisées sur matériaux massifs. Les épaisseurs des couches étudiées ici étant très faibles, une légère variation de ces fonctions diélectriques en fonction de l'épaisseur de métal déposé est probable. D'autre part, les conditions d'évaporation (pression, température, vitesse d'évaporation et nature du substrat) vont jouer un rôle prépondérant dans la croissance de la couche et donc dans sa structuration, et donc sur sa fonction diélectrique [142]. Il est fort plausible que, d'un évaporateur à l'autre, la croissance d'un même matériau puisse différer légèrement. Pour nous affranchir de

cette éventualité, les échantillons ont toujours été évaporés dans le même bâti, dans des conditions identiques.

(ii) Détermination de l'indice optique de l'or à partir de l'épaisseur déterminée par AFM

Connaissant précisément par AFM l'épaisseur de la couche, il est possible de déterminer les variations spectrales des indices optiques grâce à la mesure ellipsométrique. En assurant une épaisseur de 44.5 ± 1 nm pour la couche d'or précédemment étudiée, le spectre de l'indice optique complexe est extrapolé et est représenté dans la **Figure 3.10** avec les barres d'erreurs associées. Ces dernières tiennent compte de la rugosité de la couche d'or de 1 nm mesurée par AFM. Des valeurs d'indices de la littérature sont également reportées dans la **Figure 3.10**.

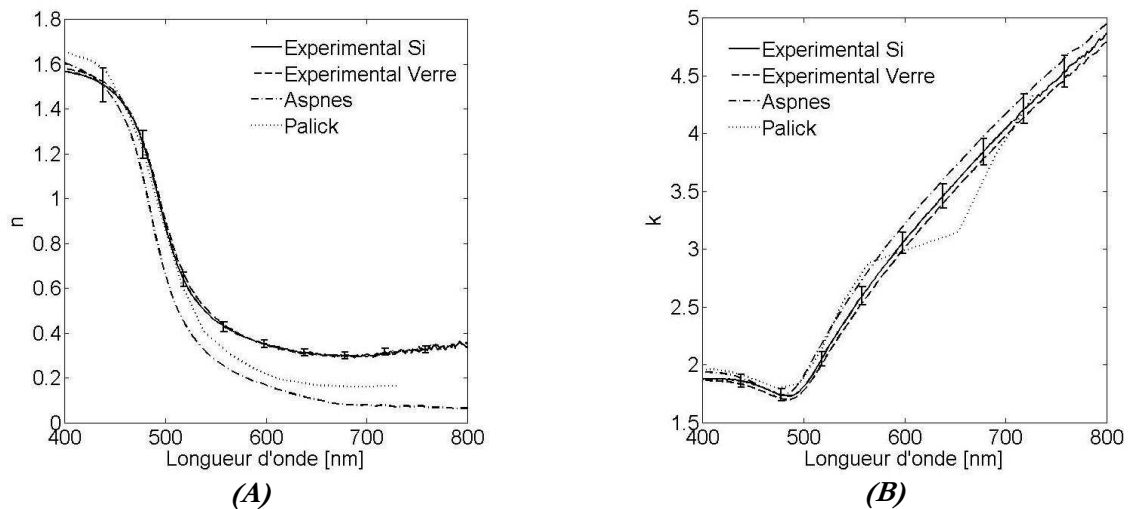


Figure 3.10 : Comparaison des indices de réfraction de l'or de la littérature et mesurés en ellipsométrie sur une couche d'or de 45 nm. ; n (A) et k (B).

Il est à noter que le substrat utilisé ne semble pas influencer la fonction diélectrique de l'or. En d'autres termes, la couche semble croître de façon identique, et donc possède les mêmes propriétés optiques, sur le verre et sur le silicium.

L'analyse conduite montre que l'or évaporé dans notre cas présente un indice réel n supérieur aux deux références, alors que la partie imaginaire k est très proche de celle donnée par Aspnes. La comparaison avec les valeurs données par Palick est plus délicate, celles-ci étant très peu nombreuses sur la gamme spectrale étudiée. Dans la suite de ce travail, nous prendrons pour référence nos mesures de l'indice optique de l'or.

Notons cependant que cette technique ne permet pas de prendre en compte la rugosité de la couche évaporée, représentée par les barres d'erreurs sur la **Figure 3.10**, ce qui la rend difficilement applicable pour des couches très rugueuses. Néanmoins, l'erreur commise est ici inférieure à l'écart existant avec les fonctions diélectriques de la littérature.

3.3.2 Mesure de l'indice du chrome

L'or étant faiblement adhérent au verre et au silicium, une sous couche de chrome doit être évaporée pour améliorer la stabilité de l'ensemble lors des mesures sous flux liquide. Une étude similaire a donc été menée sur une couche nanométrique de chrome.

La forte adhérence du chrome sur le verre et le silicium ne permet pas de réaliser une tranchée dans le métal comme pour l'or. Pour contourner le problème, une trace de feutre est réalisée sur le substrat avant évaporation. Lors de l'évaporation, le chrome va se déposer sur l'ensemble du substrat. Le chrome qui est au contact du feutre est ensuite éliminé grâce à un papier Kodak imbibé d'acétone. Il est alors possible de mesurer une marche entre le substrat et le métal.

Les valeurs de n et de k pour une couche de chrome de 15 nm sont reportées dans la **Figure 3.11**, ainsi que celles données par Palick.

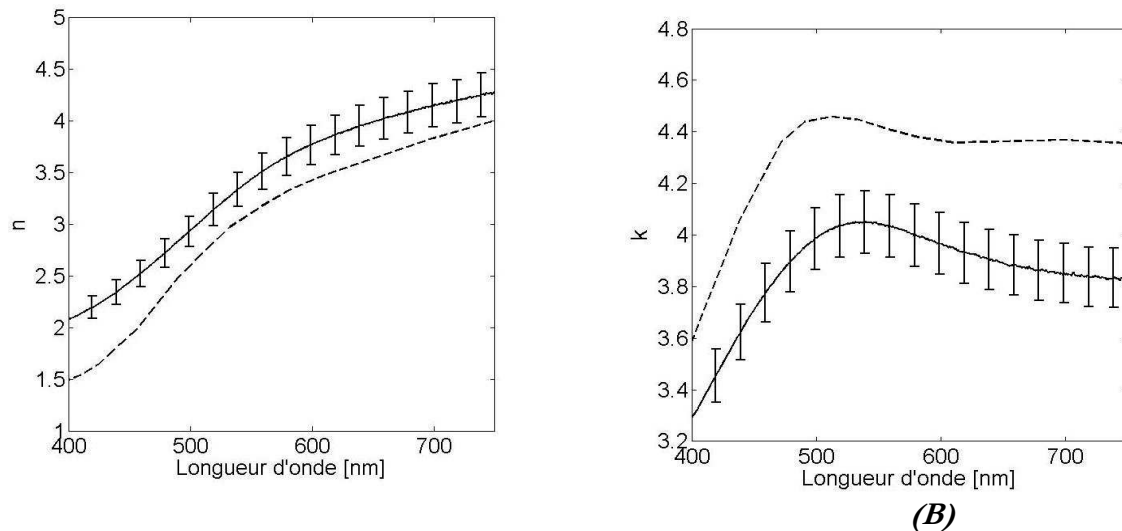


Figure 3.11 : Comparaison de l'indice de réfraction du chrome donné par Palick et mesuré par ellipsométrie sur une couche de chrome de 15 nm. ; n (A) et k (B).

L'écart observé entre les valeurs obtenues par ellipsométrie et celles données par Palick semble ici plus important que pour l'or : une sous-estimation de n et une surestimation de k sont constatées. Du fait des épaisseurs relatives des couches d'or et de chrome utilisées par la suite (respectivement 45 et 5 nm), l'erreur sur l'indice du chrome est moins préjudiciable que celle commise sur l'or.

L'étude menée sur les couches minces d'or et de chrome de respectivement 45 et 5 nm nous permet de mettre en avant la variation de leur fonction diélectrique par rapport aux modèles disponibles dans la littérature. Ces variations peuvent en premier lieu être dues aux conditions d'évaporation des couches. Parallèlement, l'influence de l'épaisseur de la couche sur la fonction diélectrique peut être évoquée. Elle n'a pas fait l'objet d'une étude ici car les épaisseurs des couches d'or et de chrome seront fixées par la suite. Il a cependant été montré par ellipsométrie sur un film d'argent que pour des films ultra-minces la fonction diélectrique diffère de celle de l'argent massif [143], notamment pour des épaisseurs inférieures à l'épaisseur de percolation de l'ordre d'une dizaine de nanomètres.

3.3.3 Mesure d'épaisseur de multicouches métalliques

Pour comprendre la réponse d'un système composé de plusieurs couches métalliques, une couche de 3 nm de chrome a été déposée sur un substrat de verre, suivie de l'évaporation de 37 nm d'or. La modélisation d'un tel système doit prendre en compte l'interaction des deux couches métalliques. Plusieurs modèles ont été évalués (**Tableau 3.3**). Le premier considère deux couches planes indépendantes, le deuxième intègre une couche de rugosité intermédiaire entre la couche

d'or et le milieu extérieur alors que le troisième intègre en plus une couche de diffusion intermédiaire entre la couche de chrome et la couche d'or, représentée dans la **Figure 3.12**.

	Modèle 1		Modèle 2		Modèle 3	
	Épaisseur [nm]	χ^2	Épaisseur [nm]	χ^2	Épaisseur	χ^2
Rugosité		1.21	1	0.345	1 nm	0.345
Or	38.2 ± 2.1		37.4 ± 1.2		37.4 ± 1.2	
Diffusion					0	
Chrome	3.5 ± 1.3		2.8 ± 0.6		2.8 ± 0.6	
Verre						

Tableau 3.3 : Modèles utilisés lors de l'ajustement des spectres ellipsométriques des substrats de verre recouvert d'une multicouche chrome/or.

Cette analyse montre dans un premier temps que la prise en compte de la rugosité de l'interface or/air est nécessaire pour optimiser l'ajustement et définir parfaitement les épaisseurs des différentes couches : une diminution de χ^2 et des incertitudes sur les épaisseurs est observée. Le modèle 3 quant à lui ne met pas en évidence la présence d'une couche de diffusion entre le chrome et l'or pourtant évoquée dans la littérature [144]. Cette diffusion de chrome peut avoir un impact lors de la fonctionnalisation en diminuant le nombre de sites accessibles sur la surface d'or, et donc rendre la surface greffée inhomogène. L'hypothèse d'une diffusion du chrome dans l'or gouvernée thermiquement a alors été émise.

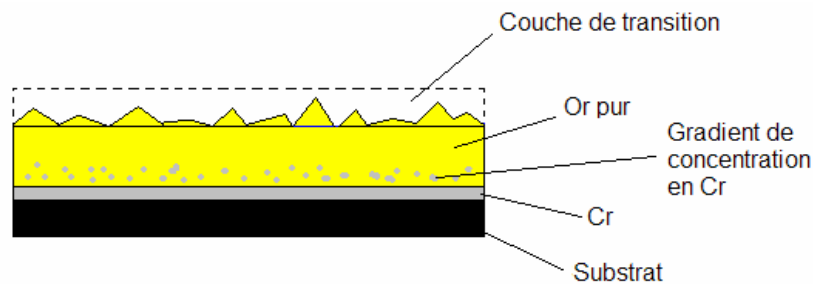


Figure 3.12 : Représentation schématique du modèle 3 utilisé pour ajuster un système multicouche composé d'une sous-couche de chrome et d'une couche d'or.

L'évaluation de la diffusion de la couche de chrome a donc été réalisée pour différentes températures de recuit, effectué dans une étuve contrôlée à 1°C près. On cherche ainsi à déterminer les conditions de stabilité de la structure multicouches. Une série de multicouches déposées au cours de la même évaporation a été analysée après des recuits de 150, 200 et 300 °C pendant 12 heures.

Les angles ψ et Δ des couches étant les éléments physiques les plus pertinents pour comprendre l'influence des recuits, on s'intéressera dans la suite à comparer leurs évolutions en fonction du recuit réalisé.

► Influence du recuit sur les angles ψ et Δ – substrat Verre

Pour les multicouches évaporées sur un substrat de verre, il apparaît que le recuit occasionne une diminution de l'angle ψ (**Figure 3.13A**) associée à une augmentation générale de Δ (**Figure 3.13B**). Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de ce comportement :

- Disparition des contraintes superficielles.

- Réarrangement des atomes d'or (augmentation de la rugosité).
- Diffusion du chrome.

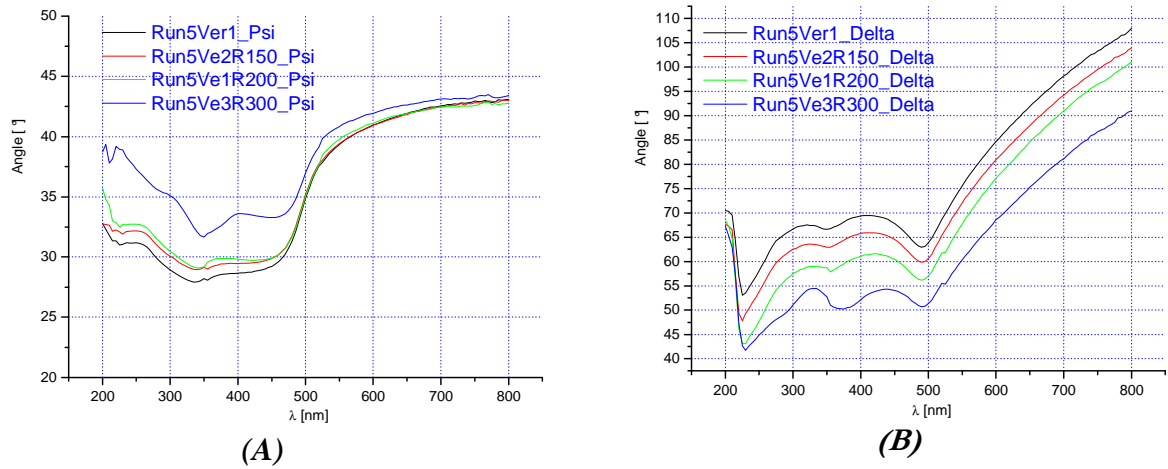


Figure 3.13 : Tendence générale de l'influence des recuits sur les indices ψ (A) et Δ (B) pour un système multicouches Verre/Cr/Au.

► Influence du recuit sur les angles ψ et Δ – substrat Silicium

Le comportement mis en évidence sur le substrat de verre semble moins pertinent pour les couches d'or déposées sur un substrat de silicium : il est possible que la faible rugosité du silicium favorise les changements d'état de la couche d'or (diffusion, réarrangement...); ceci expliquerait notamment l'écart moins important en Δ observé entre le recuit à 200°C et 300°C (Figure 3.14B).

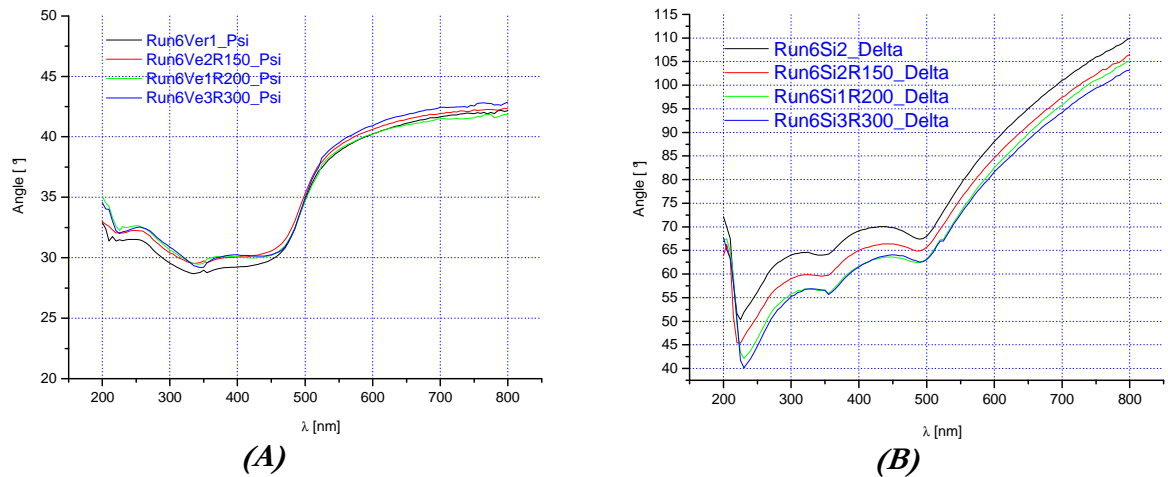


Figure 3.14 : Tendence générale de l'influence des recuits sur les indices ψ (A) et Δ (B) pour un système multicouches Si/Cr/Au

► Ajustements des spectres obtenus

Le modèle 3, décrit par la Figure 3.12, a été employé pour ajuster les spectres obtenus. Les histogrammes représentés dans les Figures 3.15A et B regroupent les ajustements effectués, y sont également reportés les compositions calculées des couches mixtes : les chiffres associés

aux différents éléments représentent le pourcentage de l'élément dans la couche. L'épaisseur totale des couches a été mesurée par AFM et est représentée en pointillé rouge. Les tendances que révèlent ces modèles sont les suivantes :

- Disparition progressive de la couche initiale de chrome avec l'augmentation de la température de recuit.
- Enrichissement en chrome d'une zone 'tampon' avec naissance d'un gradient de concentration au sein de la couche d'or.
- Homogénéisation de la couche pour le recuit à 300°C (disparition du gradient de concentration).
- Augmentation de l'épaisseur l'interface Or-Vide pour le recuit à 300°C (qui va dans le sens de l'explosion de la rugosité détectée en AFM).

A température ambiante, et dans les conditions d'évaporation choisies, la couche de diffusion peut donc être considérée comme nulle : le système multicouches sera donc stable.

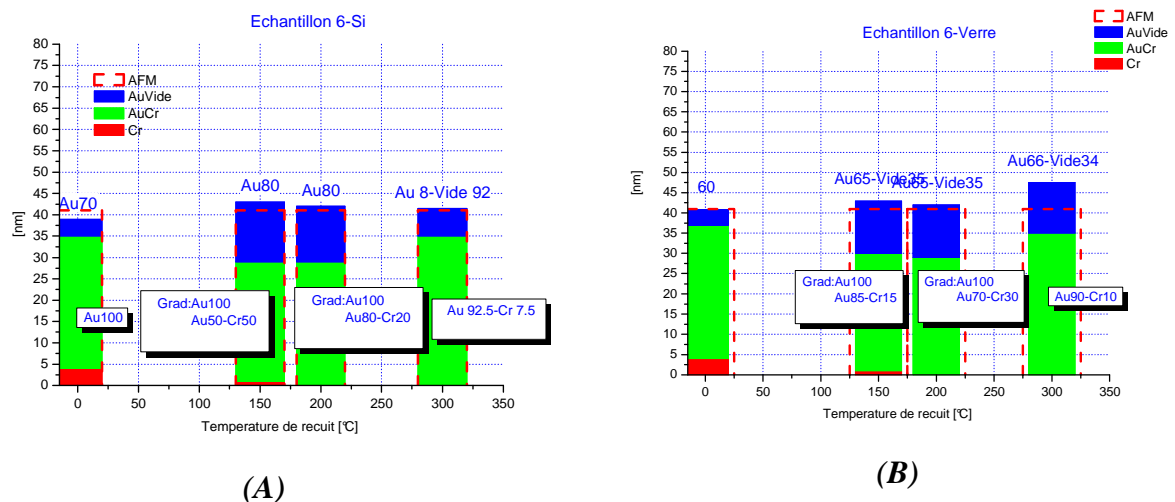


Figure 3.15 : Evolution de la composition des échantillons Cr/Au déposés sur silicium (A) et verre (B) pour différentes température de recuit.

Ce paragraphe a permis de souligner la complémentarité des deux techniques de mesures que sont l'ellipsométrie et l'AFM pour déterminer l'indice optique d'un métal. L'AFM permet d'assurer une épaisseur à ± 1 nm pour des couches faiblement rugueuse, ce qui permet à la mesure ellipsométrique d'assurer l'indice de ces mêmes couches avec une précision de 5%. De plus, l'étude de la diffusion du chrome dans l'or sous une contrainte thermique a permis de justifier l'emploi de deux couches distinctes de chrome et d'or pour l'ajustement du système multicouches utilisé par la suite.

3.4 Détermination de la dépendance spectrale et thermique de l'indice de réfraction des polymères

Pour illustrer les capacités de l'ellipsométrie spectroscopique à déterminer l'indice et l'épaisseur d'une couche diélectrique, d'indice de réfraction comparable aux produits biologiques, différentes épaisseurs de PMMA ont été déposées sur silicium. Les couches minces de PMMA

présentent une très faible rugosité, déterminée au **chapitre 2** comme équivalente à la rugosité du substrat, permettant une évaluation beaucoup plus sûre du couple indice – épaisseur.

Le chlorobenzène, solvant du PMMA, est utilisé pour diluer ce dernier. Le PMMA dilué est ensuite étalé sur l'échantillon par centrifugation, puis recuit dans une étuve à 90 °C afin d'évaporer le solvant restant. Comme précisé dans le chapitre précédent, en modifiant la viscosité du polymère et donc en diminuant sa concentration dans le solvant, il est possible d'obtenir des films d'épaisseurs de plus en plus faibles tout en gardant ces propriétés électrosensibles. De même, la variation des vitesses de rotation va permettre également de moduler l'épaisseur de la couche.

3.4.1 Dépendance spectrale de l'indice du PMMA

L'indice du PMMA n'est pas constant sur la gamme spectrale du visible, et comme la majorité des diélectriques il est possible de le modéliser grâce à un modèle de Cauchy non absorbant [145] :

$$n(\lambda) = A + \frac{B \cdot 10^4}{\lambda^2} + \frac{C \cdot 10^9}{\lambda^4} \quad (3.23)$$

Le couplage de la mesure ellipsométrique et la mesure de l'épaisseur de la couche par AFM nous permet d'ajuster plus précisément les spectres expérimentaux. Ainsi la **Figure 3.16** est la représentation de l'indice du PMMA pour des couches de 300 nm d'épaisseur (en bleu) et 30 nm (en rose). Celle-ci met en évidence la dépendance spectrale de l'indice du PMMA mais également une dépendance vis-à-vis de la nature de la couche. La variation de l'indice semble en effet plus importante pour une couche mince que pour une couche de 300 nm d'épaisseur.

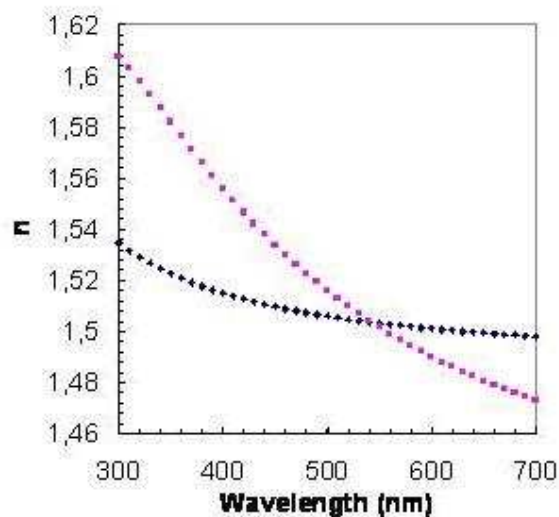


Figure 3.16 : Dépendance spectrale de l'indice de réfraction du PMMA pour deux couches d'épaisseurs 300 nm (bleu) et 30 nm (rose).

Pour déterminer l'influence de la concentration et de la vitesse de rotation sur l'indice du PMMA, une série de 9 échantillons a été étudiée pour des vitesses allant de 1000 à 8000 Tr/min et des concentrations de 4 à 1%. Les effets de la dilution et de la vitesse de rotation sur l'indice du PMMA, à 450 nm et 633 nm, sont présentés respectivement dans les **Figures 3.17 et 3.18**.

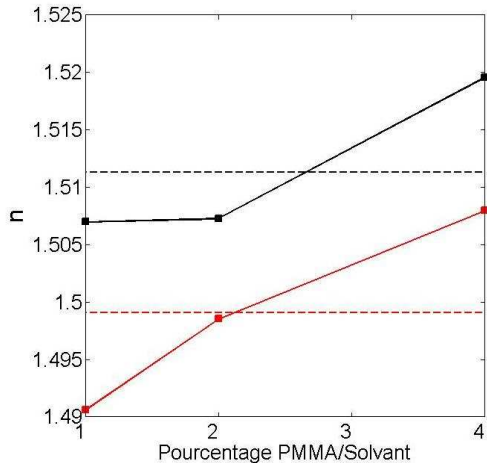


Figure 3.17 : Effet de la concentration sur l'indice du PMMA à 450 nm (noir) et à 633 nm (rouge). Les valeurs moyennes sont représentées en pointillé.

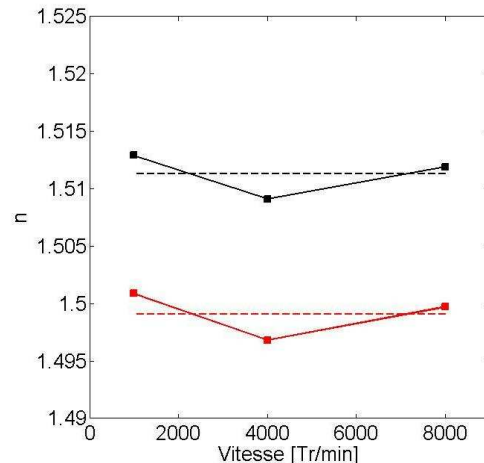


Figure 3.18 : Effet de la vitesse de rotation de la centrifugeuse sur l'indice du PMMA à 450 nm (noir) et à 633 nm (rouge). Les valeurs moyennes sont représentées en pointillé.

Au regard des **Figures 3.17 et 3.18**, la concentration de PMMA a un effet beaucoup plus marqué que la vitesse de rotation. De même, l'écart entre la valeur de l'indice à deux longueurs d'ondes augmente à mesure que la concentration de PMMA diminue, alors qu'il reste constant dans le cas de la vitesse de rotation. Cette remarque renforce l'observation préliminaire montrant la variation d'indice considérable pour une épaisseur de couche faible. Ceci s'interprète par la dépendance de l'indice avec la conformation des entités élémentaires du polymère. Typiquement, on observe expérimentalement une dépendance de l'indice avec l'épaisseur plus forte pour des épaisseurs inférieures à 10 fois le rayon de giration de la molécule, soit pour le PMMA pour des épaisseurs inférieures à 100 nm.

Une étude similaire sur l'influence de la masse molaire du PMMA a également été menée entre le PMMA brut (de masse molaire \overline{Mn} 950 000 g.mol⁻¹), le PMMA Arkema précipité (\overline{Mn} = 80 000 g.mol⁻¹) et le PMMA V045 (\overline{Mn} = 46 000 g.mol⁻¹). A épaisseur identique, l'indice mesuré est équivalent, ce qui, en d'autres termes, montre que la masse molaire n'a pas d'influence sur l'indice de réfraction.

Ce paragraphe a donc permis de mettre en avant la dépendance de l'indice de réfraction du PMMA vis-à-vis la longueur d'onde mais également de l'épaisseur de la couche déposée.

3.4.2 Etude de la transition de phase vitreuse d'un polymère

Outre sa dépendance spectrale, l'indice optique d'un diélectrique varie également avec la température. En se basant sur la relation de Lorentz-Lorenz [131], cette variation peut s'écrire sous la forme [146] :

$$\frac{dn}{dT} = \frac{(n^2 - 1)(n^2 + 2)}{6n} (-3\alpha) \quad (3.24)$$

avec n l'indice de réfraction du diélectrique, T la température et α le coefficient d'expansion thermique du diélectrique.

Dans le cas du verre, α est proche de $0.5 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, ce qui équivaut à une variation d'indice de l'ordre de 10^{-6} pour une élévation de température de 10°C , qui est en deçà du seuil de détection de l'ellipsomètre.

Si la sensibilité en température des métaux et des verres est faible dans une gamme inférieure à 100°C , certains polymères sont beaucoup plus réactifs. Ainsi dans cette gamme de température, certains peuvent effectuer une transition de phase qui s'accompagne généralement d'une diminution de l'indice de réfraction et/ou d'une augmentation de l'épaisseur de la couche. L'objectif de cette étude est de montrer la faisabilité par ellipsométrie de la détermination de la température de changement de phase d'un polymère.

La thermalisation de l'échantillon est obtenue par un module chauffant Peltier, la température de surface est mesurée à l'aide d'un thermocouple, qui assure une précision de 0.1°C . L'acquisition des spectres est réalisée sous un angle d'incidence de 75° , sur une gamme spectrale limitée entre 350 et 700 nm. Une mesure est effectuée tous les 10°C , après avoir attendu l'équilibre thermique pendant 10 minutes.

Dans un premier temps, une montée en température est réalisée sur la plaque de verre sans polymère pour s'assurer de la stabilité du système. La **Figure 3.19** ne montre aucune différence significative entre les différents spectres, ce qui confirme la variation d'indice du verre inférieure à la sensibilité de l'ellipsomètre.

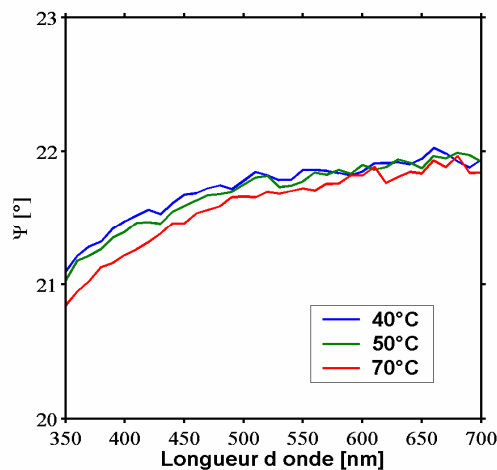


Figure 3.19 : Variation spectrale de ψ pour un substrat de verre en fonction de sa température.

La température de transition vitreuse T_g du PMMA, qui est comprise entre 95 et 106°C [147-149], n'est pas atteignable par le module chauffant employé. Nous nous sommes intéressés ici à la température de fusion de la polycaprolactone, attendue aux environs de 50°C dans la littérature [150]. La polycaprolactone est déposée suivant le même principe que le PMMA, c'est-à-dire par centrifugation, à une vitesse de $8000 \text{ Tr}/\text{min}$. La viscosité très importante du polymère ne nous a pas permis de réaliser une mesure AFM de l'épaisseur ainsi obtenue. La forte adhérence entre le polymère et la pointe empêche en effet d'imager correctement la marche créée par rayure.

L'étude effectuée sur l'échantillon de polycaprolactone présente un comportement différent de celui de la silice nue avec deux régimes distincts autour de 50°C . La **Figure 3.20**, sur lesquelles sont portés les différents spectres acquis tous les 10°C , montre clairement ces deux régimes : un premier régime pour des températures comprises entre la température ambiante et

40°C, le deuxième régime étant atteint pour des températures supérieures à 50°C. On note également que la divergence en ψ de ces deux régimes est maximale pour une longueur d'onde proche de 450 nm et est alors évaluée à 0.5°.

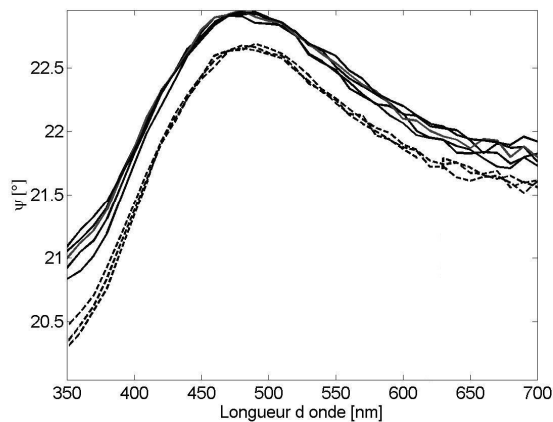


Figure 3.20 : Variation spectrale de ψ pour une couche de polycaprolactone déposée sur un substrat de verre. Les courbes en traits pleins sont obtenues pour des températures supérieures à 50 °C, celles en pointillés pour des températures inférieures à 50 °C.

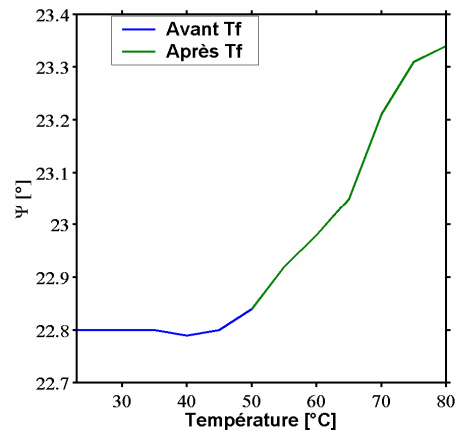


Figure 3.21 : Variation de ψ à une longueur d'onde de 450 nm. La partie verte de la courbe met en évidence la transition vitreuse de la polycaprolactone.

Pour affiner la détermination de la température de ce changement de régime, la variation de ψ à une longueur d'onde fixe de 450 nm, soit à la sensibilité maximale, a été enregistrée lors d'une montée en température (**Figure 3.21**). Un changement de pente très net est ainsi observé pour une température de 48°C, en accord avec la littérature.

Notons enfin que T_g est fortement dépendante de l'épaisseur de la couche polymère quand celle-ci est inférieure à 100 nm, ce qui correspond approximativement à 10 fois le rayon de gyration du polymère. Une étude similaire réalisée sur des films minces de PMMA montre une variation de T_g d'environ 10 °C pour des films d'épaisseurs inférieures à cette limite [149].

3.5 Détermination de l'épaisseur et de l'indice de biopolymères : l'ADN

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, les couches biomimétiques se caractérisent par une épaisseur inférieure à 10 nm et surtout par un taux de recouvrement entre 50 et 90 %, ce qui se traduit par un indice effectif de la couche en utilisant le modèle de Bruggeman.

Nous avons alors cherché à caractériser optiquement par ellipsométrie spectroscopique ces couches constituées de monobrin d'ADN immobilisés sur une surface d'or, dans un premier temps dans l'air puis en solution ionique.

3.5.1 Etude ex situ

Le dépôt des monobrin a été réalisé par l'incubation d'une solution d'ADN thiolés à 10^{-4} M dans du tampon phosphate à 50 mM NaCl pendant 18 heures sur une couche d'or de 45 nm d'épaisseur, déposée sur un substrat de verre. Le volume de goutte a été choisi suffisamment

important pour que le spot lumineux soit totalement en interaction avec l'ADN greffé. Les mesures ont ensuite été réalisées avec un angle d'incidence de 60°.

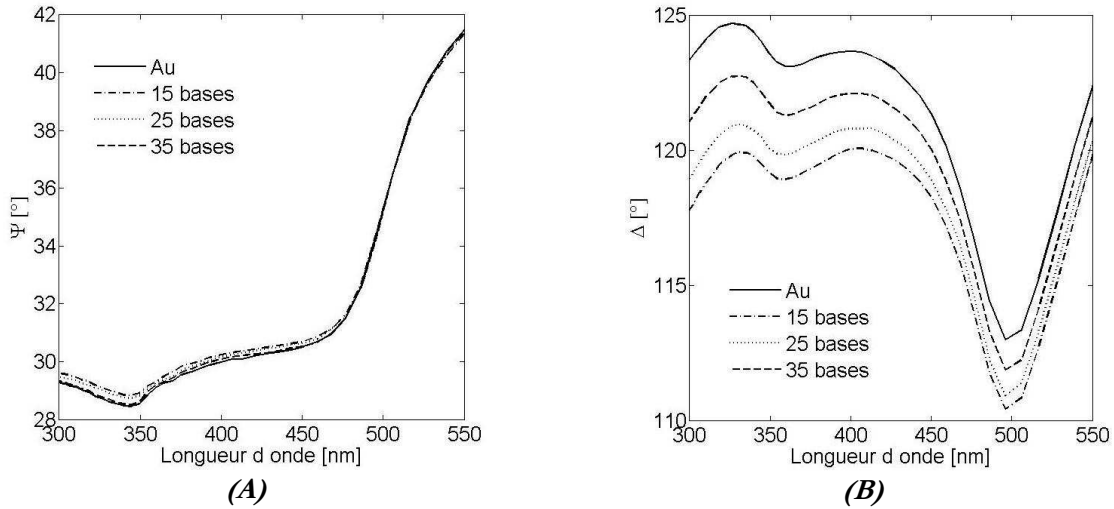


Figure 3.22 : Spectres ellipsométriques réalisés dans l'air de monobrin d'ADN de 15, 25 et 35 bases déposés sur une surface d'or ; le spectre en Ψ (A) permet de discerner la nature des brins. Les décalages important observés en Δ (B) confirment cette observation.

Les spectres ainsi obtenus sont représentés dans les **Figures 3.22**. L'ellipsométrie spectroscopique permet de clairement différencier la nature des monobrin (15, 25 et 35 bases) par rapport au substrat nu que ce soit en Ψ ou, avec un ordre inversé, en Δ . Les décalages angulaires, relativement faibles en Ψ mais plus visibles en Δ , sont reportés pour une longueur d'onde de 345 nm dans le **Tableau 3.4**.

	Décalage de Ψ [°] à 345 nm	Décalage de Δ [°] à 345 nm
15 bases	0.37	4.55
25 bases	0.27	3.55
35 bases	0.04	1.89

Tableau 3.4 : Décalage de ψ et Δ à une longueur d'onde de 345 nm des échantillons recouverts d'ADN par rapport à un échantillon vierge.

Plusieurs modèles d'ajustement de complexité graduelle ont été utilisés pour déterminer l'indice et l'épaisseur de la couche d'ADN greffée (**Figure 3.23**). La valeur de la partie réelle n de l'indice de l'ADN est donnée à 1.47, [151], pour une longueur d'onde supérieure à 500 nm. n sera cependant considéré comme suivant un modèle de Cauchy absorbant, rendant compte de sa dépendance spectrale théorique :

$$n_{ADN}(\lambda) = A + \frac{B \cdot 10^4}{\lambda^2} + \frac{C \cdot 10^9}{\lambda^4} \quad (3.25)$$

La partie imaginaire de l'indice, k , a également été introduite dans certains modèles. Celle-ci a été choisie constante sur tout le spectre : elle n'est pas ici liée à l'absorption de l'ADN dans le

visible, qui est donnée pour nulle dans la littérature, mais doit théoriquement rendre compte de la dispersion d'énergie due à la rugosité de la couche biologique.

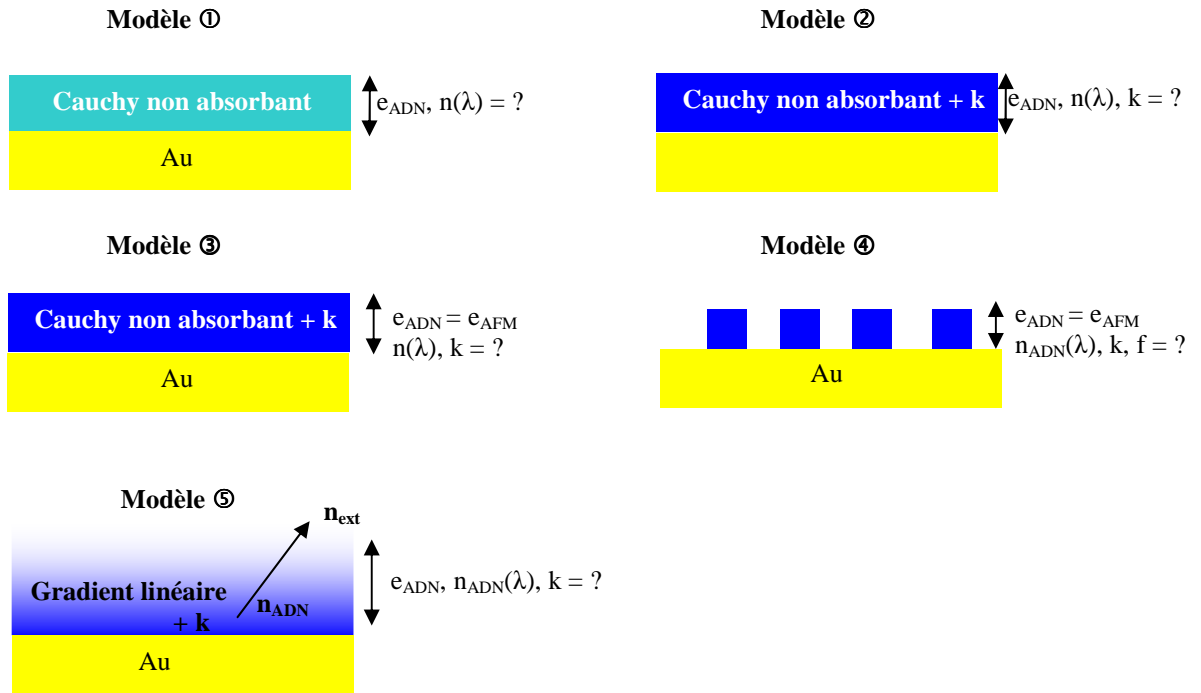


Figure 3.23 : Représentation schématique des différents modèles d'ajustements des spectres ellipsométriques utilisés pour déterminer l'épaisseur et l'indice des couches d'ADN dans l'air.

L'approche la plus simple, illustrée par le modèle ① dans la **Figure 3.23**, est de considérer la couche biologique comme une couche continue d'indice optique réel, variant suivant la loi de Cauchy. L'ajustement consiste alors à rechercher « en aveugle », à la fois l'indice de la couche $n(\lambda)$ et son épaisseur e_{ADN} . En dépit d'une valeur de χ^2 excellente (**Tableau 3.5**), les valeurs obtenues sont peu réalistes et dénuées de sens physique : les indices, donnés à 550 nm, sont surestimés et les épaisseurs sont par ailleurs sous-estimées par rapport aux valeurs obtenues par AFM. La détermination conjointe de l'indice et de l'épaisseur d'une couche inhomogène en aveugle est donc particulièrement délicate.

Nombre de bases	Epaisseur AFM (nm)	Modèle①			Modèle ②			
		e (nm)	n	χ^2	e (nm)	n	k	χ^2
15	3.4	2.18	1.756	0.0952	1.98	1.731	0.124	0.0718
		± 0.19	± 0.027		± 0.18	± 0.024	± 0.051	
25	2.1	1.56	1.771	0.0174	1.21	1.754	0.062	0.0141
		± 0.13	± 0.023		± 0.11	± 0.018	± 0.023	
35	1.5	0.83	1.831	0.0047	0.67	1.815	0.034	0.0042
		± 0.11	± 0.021		± 0.08	± 0.17	± 0.012	

Tableau 3.5 : Epaisseurs et indices optiques à $\lambda = 550 \text{ nm}$ des films d'ADN ajustés conjointement par les modèles ① et ②.

La deuxième démarche, représentée par le modèle ②, est d'introduire la partie imaginaire de l'indice de la couche biologique k dans le modèle précédent. Si l'ajustement, **Tableau 3.5**, est légèrement amélioré, les épaisseurs mesurées diffèrent de façon non négligeable de celles déterminées par AFM.

En tenant compte de l'échec de 2 modèles précédents, nous avons choisi de réduire le nombre de paramètres d'ajustement en fixant l'épaisseur des couches biologiques aux valeurs mesurées par AFM (**Tableau 3.6**).

Nb. bases	e AFM (nm)	Modèle ③			Modèle ④				Modèle ⑤			
		n	k	χ^2	n	k	f	χ^2	e	n	k	χ^2
15	3.4	1.324	0.017	0.0720	1.467	0.023	68.9	0.0678	2.94	1.498	0.022	0.1154
		± 0.018	± 0.0056		± 0.014	± 0.002	± 3.7		± 0.38	± 0.023	± 0.011	
25	2.1	1.401	0.0053	0.0109	1.482	0.0087	83.7	0.0093	4.28	1.524	0.018	0.3458
		± 0.013	± 0.0021		± 0.004	± 0.0013	± 2.8		± 0.65	± 0.034	± 0.034	
35	1.5	1.461	0.0041	0.0125	1.461	0.0021	97.7	0.00587	4.83	1.538	0.029	0.4437
		± 0.011	± 0.0018		± 0.0058	± 0.008	± 2.2		± 0.86	± 0.072	± 0.043	

Tableau 3.6 : Epaisseurs et indices optiques à $\lambda=550$ nm des films d'ADN ajustés par les modèles ③, ④ et ⑤.

Le modèle ③ permet donc d'ajuster à la fois $n(\lambda)$ et k , en considérant la couche biologique comme continue. A $\lambda = 550$ nm, il apparait très clairement que l'indice de réfraction réel n des couches est différent selon la nature du monobrin déposé : celui-ci croit de 1.324 pour les monobrin de 15 bases à 1.461 pour ceux de 35 bases. Cette évolution est à lier à la structuration des couches qui, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, dépend de la nature des monobrin : plus les brins sont longs plus leur structuration se rapproche d'un film continu. L'indice de réfraction est alors un indice effectif, tenant à la fois compte de la couche biologique mais également du milieu extérieur. Cette structuration influe également sur la partie imaginaire k : celle-ci chute d'un facteur 3 entre les monobrin de 15 bases et ceux de 35 bases. Cette évolution est associée à la diminution de la dispersion des épaisseurs des couches biologiques pour les brins les plus longs AFM (**Tableau 2.5**) et donc à la diminution de la rugosité de la couche.

Afin d'évaluer précisément l'indice réel de l'ADN, cette variation d'indice en fonction de la nature des bases peut être interpréter en modélisant la couche suivant deux modèles distincts : l'un considérant une structuration latérale du film, l'autre perpendiculaire.

Le modèle ④ est basé sur la détermination conjointe de $n_{ADN}(\lambda)$ et k de l'ADN, en supposant la couche équivalente à une couche fractionnée de type Bruggeman (éq. 3.15). L'indice réel $n_{ADN}(\lambda = 550 \text{ nm})$ encadre la valeur donnée dans la littérature pour chaque type de monobrin. La dépendance spectrale est présentée, dans le cas du monobrin de 35 bases, dans la **Figure 3.24**.

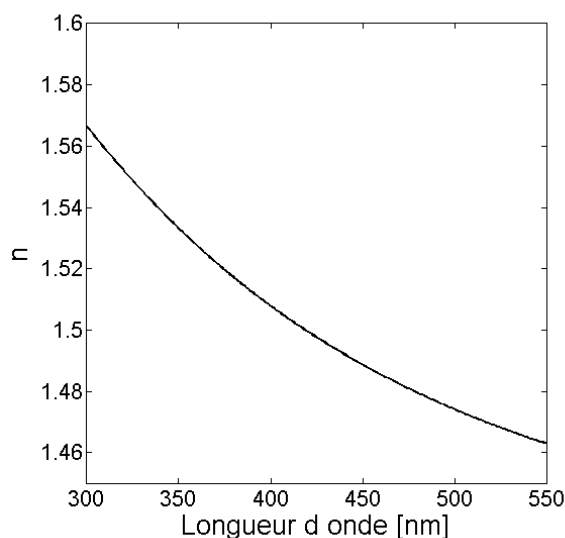


Figure 3.24 : Représentation de la dépendance spectrale de n_{ADN} , déterminée par le modèle ④, dans le cas du film de monobrins d'ADN de 35 bases ($A = ; B = ; C =$).

k varie en fonction de la nature du film : il est d'autant plus important que la fraction volumique d'air est grande et donc que la couche est rugueuse. Remarquons enfin que la fraction volumique déterminée est en accord avec celle déterminée grâce à la mesure des forces d'adhérences dans le chapitre 2 (**Figure 2.20** et **Tableau 2.4**). Connaissant l'épaisseur de la couche étudiée par une technique annexe, dans notre cas l'AFM, le modèle ④ permet une évaluation de l'indice de la couche adsorbée, ainsi que sa fraction volumique.

La dernière approche, représentée par le modèle ⑤, est basée sur une évolution suivant un gradient linéaire de l'indice de la couche $n_{ADN}(\lambda)$ à l'indice du milieu extérieur $n_{ext}(\lambda)$, rendant compte d'une structuration verticale de la couche. L'augmentation de χ^2 , et les valeurs incohérentes des épaisseurs et des indices optiques, ne permettent pas, dans ce cas, de valider ce modèle.

3.5.2 Etude *in situ*

Le suivi *in situ* par ellipsométrie de l'adsorption d'entités biologique sur une surface a d'ores et déjà été démontré par de nombreux groupes [152-154]. L'équipe de Martensson a détecté l'adsorption de la ferritine [155]. Le volume de solution de plusieurs millilitres nécessaire pour remplir ce type de cellule ne satisfait pas les quantités de produits biologiques. Nous avons alors conçu au laboratoire une cellule de mesure permettant une analyse *in situ* et d'un volume interne n'excédant pas une cinquantaine de microlitres (**Figure 3.25**).

La jupe et le corps de la cellule en Téflon assurent la stabilité chimique pour la plupart des espèces chimiques. Le liquide est comprimé entre l'échantillon, maintenu grâce à une aspiration, et un hublot. Celui-ci est en verre, transparent dans l'UV et dans le visible pour assurer l'étude spectroscopique, et est d'une épaisseur de 400 μm suffisante pour garantir une rigidité convenable sans pour autant être trop épais. L'épaisseur totale du hublot et du liquide devant être inférieure à 1 mm pour collecter l'ensemble des faisceaux issus des multiples réflexions, l'espace séparant le hublot et l'échantillon a été fixé à 200 μm .

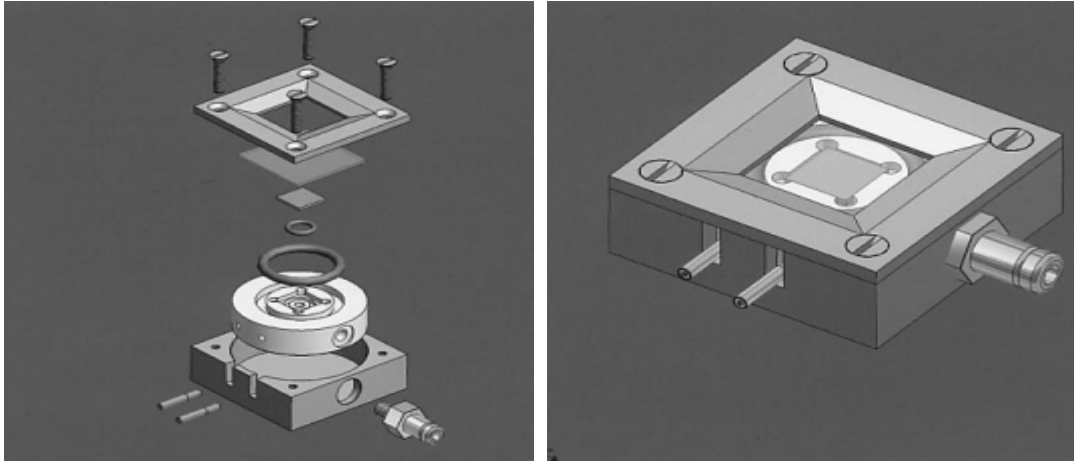


Figure 3.25 : Schéma de la cellule de mesure permettant une analyse ellipsométrique in-situ.

L'étanchéité et le parallélisme entre le hublot et le substrat, vérifié grâce aux réflexions normales à chaque interface de la cellule, sont assurés en serrant la partie supérieure de la cellule sur un joint torique.

Le liquide est injecté dans la cellule à l'aide d'une seringue stérile de 1 mL dont le débit est contrôlé par un pousse seringue. Des tuyaux en silicone de 500 μm de diamètre interne et d'une longueur d'environ 5 cm sont utilisés pour acheminer le liquide. Le volume mort lié au tuyau est alors évalué à environ 10 μL .

Les mesures ellipsométriques sur les différents films d'ADN en milieu liquide sont regroupées dans la **Figure 3.26**.

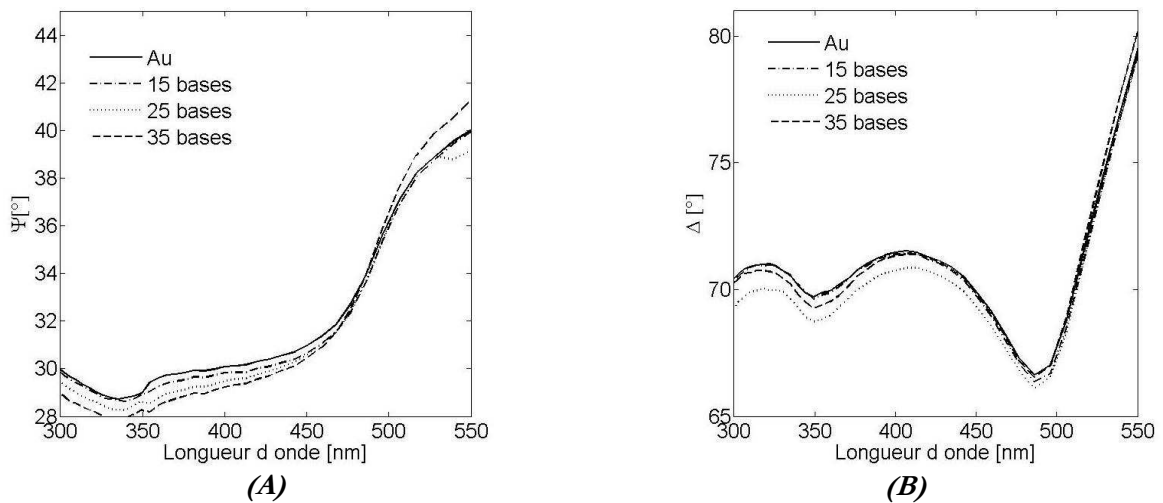


Figure 3.26 : Spectres ellipsométriques réalisés dans en liquide de monobrins d'ADN de 15, 25 et 35 bases déposés sur une surface d'or ; le spectre en Ψ (A) permet de discerner la nature des brins. La répartition des courbes en Δ (B) ne semble pas suivre un ordre précis.

En liquide, les mesures sont plus délicates quand dans l'air, les variations de signal apparaissent beaucoup plus faibles en Δ . L'écart entre les indices du film biologique et de l'environnement s'amointrit. De plus l'ajout d'une nouvelle interface dans le système, interface verre-liquide, entraînant des réflexions parasites, et la difficulté d'évaluer précisément l'épaisseur de la couche liquide, font que la mesure ellipsométrique en milieu liquide avec un faible volume de solution est peu précise. Notons cependant que la hiérarchie est inversée par rapport à l'air.

En ψ , les signaux se classent suivant l'ordre croissant du nombre de bases des monobrinns d'ADN. Cette remarque tend à confirmer l'analyse faite au **chapitre 2**, les brins les plus longs se redressent en milieu liquide. Cependant, l'analyse en Δ , montre un ordre disparate des signaux, avec des décalages très faibles.

Il semble donc, au vu des résultats obtenus, que la détection d'un greffage par ellipsométrie est réalisable *ex situ*. Les résultats obtenus concordent avec l'analyse AFM précédemment menée. L'exploitation de cette technique *in situ* est en revanche plus délicate. Pour répondre au cahier des charges d'un biocapteur, et donc réduire au maximum le volume de solution utilisée, la conception présentée impose une interface supplémentaire entraînant une complexification de l'analyse et une plus grande incertitude sur la reproductibilité. Les résultats analysés ici, bien que réalistes en ψ , s'avèrent difficilement exploitables.

3.6 Conclusion

Lors de ce chapitre nous avons montré l'intérêt de la mesure ellipsométrique couplée avec une analyse AFM pour la détermination de l'indice complexe de métaux, différant légèrement des tables existantes élaborées à partir de matériaux massifs.

L'étude de la transition vitreuse d'un polymère a permis de confirmer l'extrême sensibilité de l'ellipsométrie aux variations de l'indice et de l'épaisseur de couches nanométriques au cours du temps ou dans un environnement contrôlé. Cette grande sensibilité *ex situ* a également permis d'analyser des films d'ADN greffés sur un substrat recouvert d'or. L'analyse *in situ* dans un volume de solution de quelques μl de ces mêmes films d'ADN a confirmé la variation du couple indice effectif / épaisseur lors de l'hydratation de la couche.

L'ellipsométrie spectroscopique apparaît donc comme une technique extrêmement précise pour la détermination d'indice et d'épaisseur de couches nanométriques, métallique ou biologique, à l'air ambiant. Son emploi pour la caractérisation des molécules sondes greffées sur des zones d'environ $(50 \times 50) \mu\text{m}^2$ est donc envisageable comme étape préliminaire à une analyse *in situ*.

La solution envisagée pour s'affranchir de cette interface supplémentaire présente lors de l'analyse en milieu liquide est d'effectuer une analyse par face arrière de l'échantillon, le liquide devenant alors le milieu extérieur. Cette étude n'est cependant pas possible dans une configuration ellipsométrique standard : l'atténuation due à la traversée de la couche d'or ne permettant pas une détection sensible de la couche greffée. Comme il a été présenté dans l'introduction générale, la superposition d'un prisme sur l'échantillon va permettre d'exalter la transmission de l'onde incidente à travers la couche d'or et, par l'onde évanescente créée à la surface du métal, venir sonder la couche greffée.

Chapitre IV : Sensibilité théorique et expérimentale à l'adsorption de la RPS par lecture angulaire

4.1 Introduction

Parmi les méthodes de détections optiques, nous nous sommes également intéressés aux capteurs basés sur la Résonance des Plasmons de Surface (RPS). Comme il a été présenté en introduction, la nature évanescente de l'onde générée à l'interface entre le métal et l'environnement est à l'origine de l'extrême sensibilité du capteur à l'adsorption sur la surface métallique.

Ce chapitre a pour objectif de calculer et mesurer cette sensibilité. Après une description des phénomènes physiques mis en jeu et des conditions d'excitation de la résonance des plasmons de surface, nous détaillerons l'influence des paramètres composant un monocapteur sur les sensibilités à l'adsorption. Les monobrans d'ADN, caractérisés au **chapitre 2**, serviront d'échantillon de référence.

4.2 Définition de la sensibilité du capteur

L'excitation de la résonance des plasmons de surface se traduit en champ lointain par une chute de réflectivité. De plus, l'ajout d'une couche supplémentaire sur la surface d'or impose un décalage de la résonance, angulaire ou spectral selon la méthode de détection utilisée.

La configuration de Kretschmann – Raether, détaillée dans le **chapitre 1**, peut être modélisée par le modèle multicouche présenté dans le chapitre précédent (Paragraphe 3.2.1.1). La détermination du coefficient de réflexion en polarisation (p) va permettre de modéliser l'intensité détectée à la sortie du prisme. Le calcul de r_p est assuré définissant comme premier milieu le prisme, et comme angle d'incidence l'angle d'incidence du faisceau lumineux à l'intérieur du prisme.

Avant de définir la sensibilité du capteur, intéressons nous aux informations accessibles par une détection angulaire de la résonance. Une simulation d'un système composé d'un prisme d'indice 1.5, recouvert d'une couche d'or de 50 nm, avec pour milieu extérieur l'air, illuminé par un faisceau à 633 nm, est représentée dans la **Figure 4.1**. L'ajout d'une couche de 5 nm d'un diélectrique d'indice 1.47 sur ce même système conduit au signal tracé en pointillés. L'adsorption d'une couche va toujours conduire à un décalage du pic vers les grands angles.

Dès lors, la cinétique de l'adsorption moléculaire peut être suivie en fixant un angle d'incidence proche de la résonance plasmon. Le décalage du pic au cours du temps diminuera ou augmentera la réflectivité suivant que l'angle est plus ou moins ouvert par rapport à l'angle de la résonance plasmon. La variation de réflectivité observée va dépendre à la fois du décalage angulaire résultant de l'adsorption mais également de la forme du pic : plus le pic sera fin et profond plus la variation de réflectivité, à angle fixe, sera importante. La profondeur du pic peut être évaluée en calculant la différence entre les intensités I_1 , mesurée sur le plateau présent avant le pic de résonance, et I_2 , intensité minimale correspondante à la résonance. Le calcul de la dérivée de la réflectivité par rapport à l'angle d'incidence va permettre de définir une première sensibilité, que l'on nommera sensibilité angulaire S_a , définie par :

$$S_a = \frac{dR}{d\theta} \quad (4.1)$$

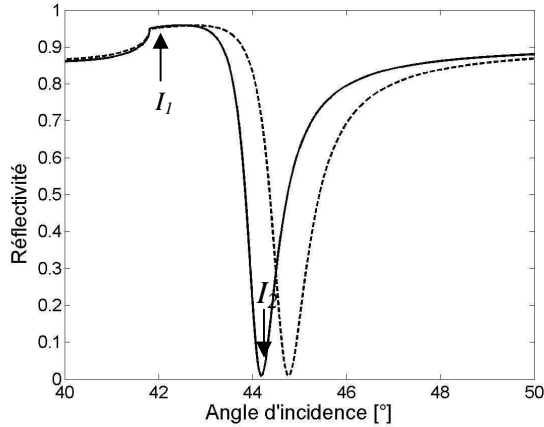


Figure 4.1 : Réflectivité théorique dans la configuration de Kretschmann d'un film d'or d'épaisseur 50 nm (trait plein) et modifié par l'ajout d'une couche de diélectrique de 5 nm et d'indice 1.47, en trait pointillés.

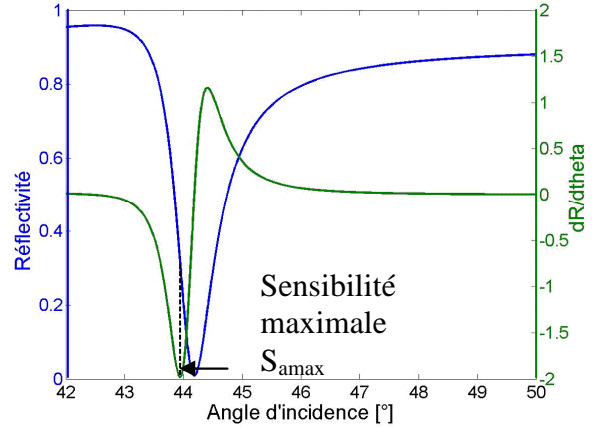


Figure 4.2 : Réflectivité et dérivé de la réflectivité théorique pour un prisme d'indice 1.5 recouvert de 50 nm d'or dans l'air. La position de la sensibilité maximale est indiquée en pointillés.

Pour les paramètres énoncés précédemment, il est possible de déterminer S_a en fonction de l'angle d'incidence, représenté en vert sur la **Figure 4.2**. S_a présente un *extremum*, correspondant donc à l'angle d'incidence optimale pour la détection en temps réel, i.e. permettant d'obtenir les variations de réflectivités les plus importantes. La sensibilité maximale $S_{a\max}$, évaluée en valeur absolue à environ 2 deg^{-1} , correspond à un angle d'incidence situé à 0.2° en dessous de l'angle plasmon θ_p . Il est important de noter que la sensibilité angulaire du capteur varie fortement avec l'angle d'incidence, ce qui nécessite une mesure précise de celui-ci pour une analyse quantitative du signal réfléchi.

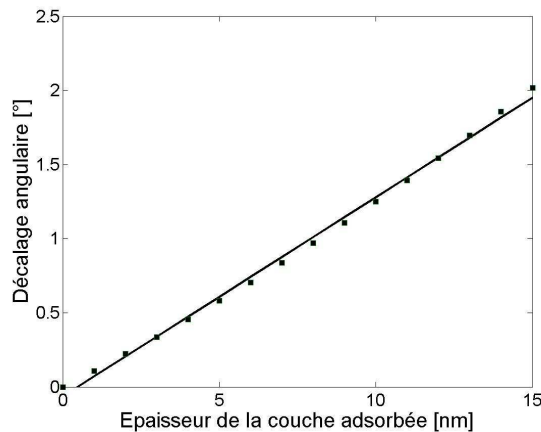


Figure 4.3 : Evaluation du décalage angulaire de la résonance plasmon en fonction de l'épaisseur de la couche adsorbée. L'ajustement linéaire est représenté en trait plein.

Par ailleurs, il est possible de calculer le décalage angulaire de la résonance plasmon θ_a par rapport à sa position initiale associé à l'adsorption d'une couche d'indice optique fixe, mais d'épaisseur croissante e (par pas de 1 nm). Ce décalage, annoté par des points sur la **Figure 4.3**,

présente un comportement linéaire. La détermination de la dérivée du décalage angulaire par rapport à l'épaisseur adsorbée implique la définition d'une deuxième sensibilité, correspondant à la sensibilité à l'épaisseur à indice fixe notée S_e [°/nm] :

$$S_e = \frac{d\theta_d}{de} \quad (4.2)$$

Dans l'exemple illustré par la **Figure 4.3**, S_e est évaluée à 0.16 °/nm. Dans le cas général, valable dans l'ensemble de ce mémoire, S_e est considérée comme constante pour une couche adsorbée d'épaisseur inférieure à 20 nm.

S_a et S_e n'ont pas forcément le même comportement : maximiser l'une n'implique pas obligatoirement de maximiser l'autre. Pour rendre compte de l'efficacité réelle du capteur, il est nécessaire de définir la sensibilité du capteur S_c par :

$$S_c = S_a \cdot S_e = \frac{dR}{d\theta} \cdot \frac{d\theta}{de} = \frac{dR}{de} \quad (4.3)$$

Afin de maximiser S_c , le paragraphe suivant sera consacré à l'optimisation des paramètres du système sur les sensibilités S_a et S_e .

4.3 Détermination théorique et expérimentale de l'influence des paramètres du système sur les sensibilités à l'adsorption.

Les paramètres influant sur la réponse du capteur, et donc sur S_c , sont nombreux. Pour une détection angulaire de la réflectivité, S_c va dépendre à la fois de :

- la polarisation de l'onde incidente ;
- la longueur d'onde de travail ;
- l'indice de réfraction du prisme ;
- la constante diélectrique des métaux utilisés (liée à la longueur d'onde de travail et déterminée par ellipsométrie) ;
- l'épaisseur des couches métalliques ;
- l'indice de la couche adsorbée ;
- l'indice du milieu extérieur.

Avant de d'explicitier l'influence de ces paramètres sur la réponse du capteur, il convient de décrire le montage expérimental ainsi que les caractéristiques des éléments le composant.

4.3.1 Dispositif expérimental

Un dispositif expérimental basé sur la configuration de Kretschmann – Raether a été réalisé. L'excitation des plasmons de surface est obtenue par un système prisme - métal, assurant ainsi la présence d'une interface diélectrique - métal et permettant d'atteindre les valeurs de k_x

nécessaire à l'excitation de la résonance plasmon décrite par les relations de dispersion. On se propose ici d'étudier par réflectométrie un système permettant l'excitation angulaire de la résonance des plasmons de surface (**Figure 4.4**).

L'illumination du système est assurée par un laser collimaté et polarisé (p) à l'aide d'un polariseur, d'une puissance maximale de 5 mW, avec une surface de spot de l'ordre de 1 mm^2 . Plusieurs lasers de mêmes caractéristiques mais de longueurs d'ondes d'émission différentes ont été utilisés.

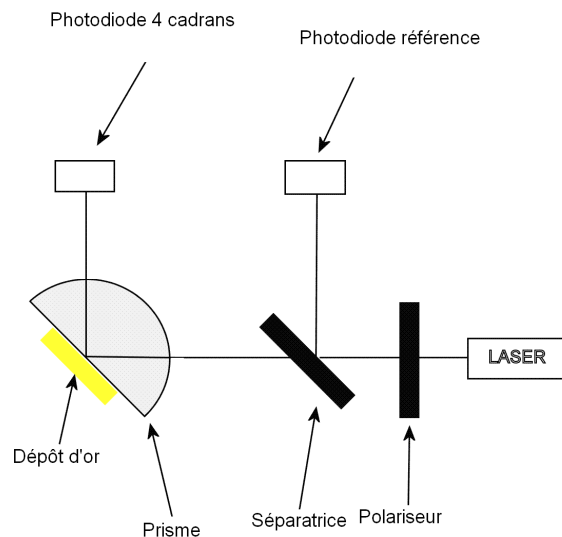


Figure 4.4 : Représentation schématique du dispositif expérimental permettant l'excitation des plasmons de surface.

Le faisceau incident du laser est divisé à l'aide d'une lame séparatrice en deux, l'un destiné à une photodiode de référence et l'autre à l'illumination du prisme. Outre le fait de pouvoir mesurer la réflectivité, la photodiode de référence permet de s'affranchir des variations d'intensité du laser, ainsi que le bruit de fond parasite.

Plusieurs formes de prismes peuvent être utilisées. Nous avons, dans cette partie, choisi de travailler avec un prisme hémicylindrique : il permet de localiser facilement le faisceau laser au centre du prisme quel que soit l'angle d'incidence, le faisceau n'étant pas dévié s'il passe par un rayon du prisme. Le prisme est fixé sur une platine de déplacements micrométriques latéraux (x , y) montée sur un goniomètre $\theta/2\theta$ possédant une précision angulaire de $1/100^\circ$.

L'intensité du signal réfléchi est collectée grâce à une photodiode 4 cadrans qui permet une meilleure détermination de la position du faisceau réfléchi.

4.3.2 Alignement et polarisation du système

Le polariseur et la lame séparatrice ont été alignés optiquement par auto-collimation. Le centre du prisme est ensuite aligné avec les autres éléments quel que soit l'angle de rotation en positionnant le faisceau laser perpendiculairement à l'axe de révolution du goniomètre. La platine (x , y) permet de confondre l'axe du prisme avec l'axe de rotation de la platine goniométrique.

L'alignement est vérifié tous les 90° par auto-collimation sur la face plane du prisme, et en obtenant un faisceau rasant pour les autres positions.

Il est nécessaire d'assurer la plage de linéarité de la photodiode sur laquelle est détecté le signal en sortie de prisme. La photodiode présente un comportement linéaire sur une plage comprise entre 0 et 2.5 V. L'intensité du faisceau incident a donc été ajustée afin que l'intensité de la lumière réfléchie se trouve dans la zone linéaire du détecteur.

L'excitation de la résonance plasmon n'est possible théoriquement qu'avec une polarisation (p) de l'onde incident. La profondeur du pic d'absorption a alors été étudiée en fonction de la polarisation de la lumière incidente. La **Figure 4.5** montre que dès lors qu'une légère composante TM existe dans la polarisation, un mode plasmon est partiellement excité, cependant la profondeur du pic n'est pas aussi prononcée qu'avec une polarisation TM parfaite.

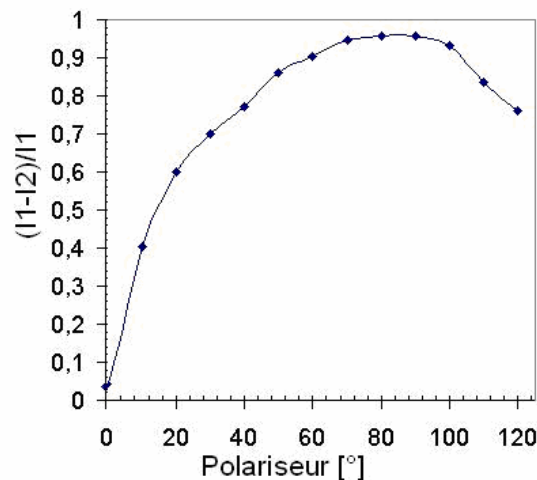


Figure 4.5 : Influence de la polarisation sur la profondeur relative du pic plasmon.

Une plage de 20° autour de l'angle de la polarisation (p) reste acceptable pour garantir une résonance prononcée et reproductible. La précision sur la polarisation de l'onde incidente n'est donc pas un critère rédhibitoire.

4.3.3 Sensibilité à l'indice du milieu extérieur

Avant de considérer les effets de l'adsorption moléculaire, nous nous sommes intéressés à la sensibilité du capteur à la variation de l'indice optique du milieu environnant. En effet, lorsque l'on fait varier l'indice optique du milieu extérieur, le pic d'adsorption est décalé (**Figure 4.6**). L'angle d'incidence, marqué d'une flèche sur la figure, est choisi de façon à avoir la sensibilité la plus importante. L'indice optique du milieu extérieur a été varié progressivement de $n=1.333$ (l'eau) jusqu'à $n=1.3614$ (éthyle glycol pur). L'indice de la solution est alors fonction de la concentration en alcool. L'injection successive de plusieurs concentrations d'alcool amène des sauts brusques de l'intensité réfléchie (**Figure 4.7**).

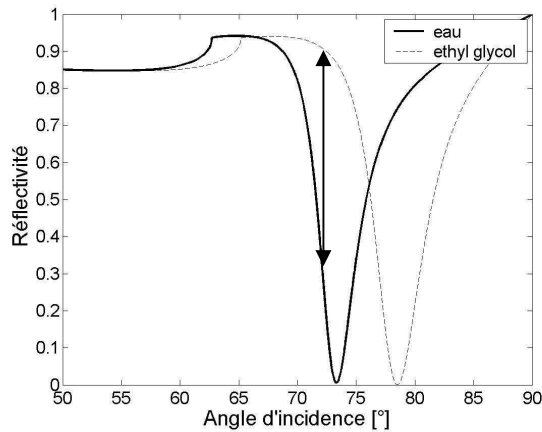


Figure 4.6 : Réflectivité théorique pour deux milieux liquides d'indices différents. La flèche indique la position de la sensibilité maximale dans l'eau et donc l'angle utilisé pour l'étude.

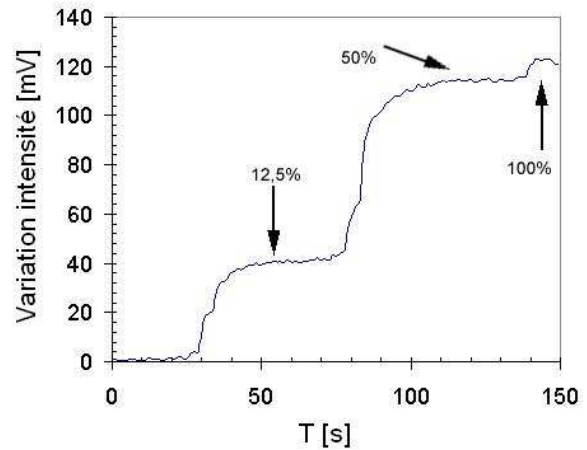


Figure 4.7 : Variation de l'intensité lumineuse détectée par la photodiode quatre cadrans en fonction des solutions utilisées lors de l'acquisition à angle fixe.

La **Figure 4.8** illustre cette variation en fonction de la dilution. La saturation du signal observée pour une dilution supérieure à 50 % est à relier à la forme du pic : la réflectivité ne varie pas linéairement à mesure que l'indice de la solution augmente mais « suit » la forme du pic. Cette variation tend à diminuer en se rapprochant du plateau.

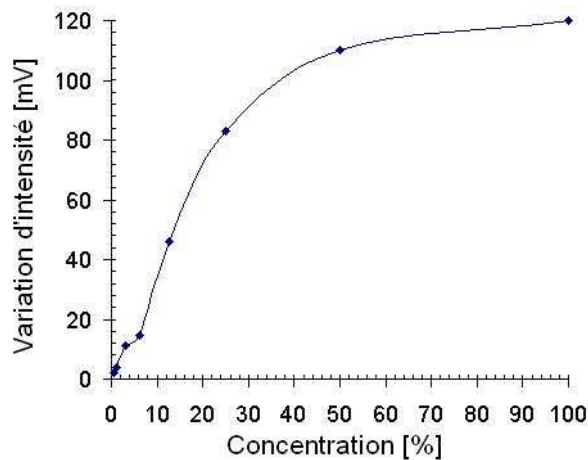


Figure 4.8 : Variation de l'intensité lumineuse détectée par la photodiode en fonction de la concentration d'éthyle alcool présente dans le milieu extérieur.

Néanmoins, en se restreignant aux dilutions les plus faibles, ie inférieures à 50 %, et en supposant que l'indice varie linéairement avec la concentration d'éthyle glycol, il est possible de déterminer la limite de détection de la variation d'indice du milieu extérieur. Le niveau de bruit sur de la photodiode est de 2 mV et la différence d'indice entre l'eau et l'éthyle glycol est 0.0314. La concentration limite détectable correspond alors à une dilution de 0.5% soit à une sensibilité à l'indice optique de l'ordre de 2.10^{-4} .

4.3.4 Influence des différents constituants du dispositif

Outre l'indice du milieu extérieur et la polarisation de l'onde incidente, d'autres paramètres vont influencer sur la sensibilité du capteur. Afin d'évaluer l'effet des paramètres les plus pertinents, un plan de paramètres a été établi. La définition des plages de variation de ceux-ci a été réalisée en respectant plusieurs critères :

- **la longueur d'onde** : il a été montré que la longueur d'onde permettant d'exciter la résonance des plasmons de surface à l'interface diélectrique-métal appartient au spectre du visible ou du proche infrarouge. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés particulièrement aux longueurs d'onde accessibles et employées au laboratoire.

- **l'indice du prisme** : couramment un prisme en BK7 (d'indice optique de 1.5) est utilisé. Notons que plus l'indice du prisme est élevé, plus l'angle associé à la résonance plasmon diminue. Sachant qu'une étude en milieu liquide avec un prisme d'indice 1.5 nécessite un angle d'incidence approchant 80° , c'est-à-dire une incidence presque rasante et donc plus problématique, l'augmentation de l'indice du prisme est une solution expérimentale.

- **l'épaisseur d'or** : comme il a été précisé précédemment, l'épaisseur du dépôt par évaporation d'or est assurée à 5% près. Connaissant l'épaisseur idéale d'or pour l'excitation des plasmons de surface, 47 nm dans la littérature [78], une variation de quelques nanomètres autour de cette valeur a été envisagée.

- **l'indice de la couche adsorbée** : la plupart des molécules biologiques possède un indice optique proche du verre. Par exemple l'indice de l'ADN sous sa forme cristallisé est de 1.47. Néanmoins, nous avons déjà montré que les couches greffées ne peuvent pas être assimilées à des couches denses mais plutôt discontinues. La notion d'indice effectif nous permet d'envisager un indice optique minimal équivalent à l'indice du milieu extérieur et maximal à celui de la molécule biologique elle-même.

Pour étudier le poids sur cette sensibilité maximale en réflectivité des différents paramètres une étude théorique est menée selon le plan d'expérience présenté dans le **Tableau 4.1** :

Longueur d'onde [nm]	Indice du prisme	Epaisseur d'or [nm]	Indice de la couche adsorbée
543	1.5	40	1.35
633	1.65	45	1.4
780	1.8	50	1.45

Tableau 4.1 : Paramètres utilisés et variés lors du calcul des sensibilités S_e , S_e et S_c des paragraphes suivants.

Ces simulations ont été conduites pour deux milieux extérieurs, l'air, et l'eau, avec respectivement pour indice de réfraction 1 et 1.33.

4.3.4.1 Influence de la longueur d'onde incidente

Avant de s'intéresser plus précisément à la sensibilité du capteur à la longueur d'onde d'excitation, remarquons l'influence de celle-ci sur la réflectivité et la forme du pic de résonance pour un système composé d'une couche d'or de 50 nm déposée sur un prisme d'indice 1.5. Les

Figures 4.9 et **4.10** illustrent la réponse de ce système avec pour milieu extérieur respectivement l'air et l'eau.

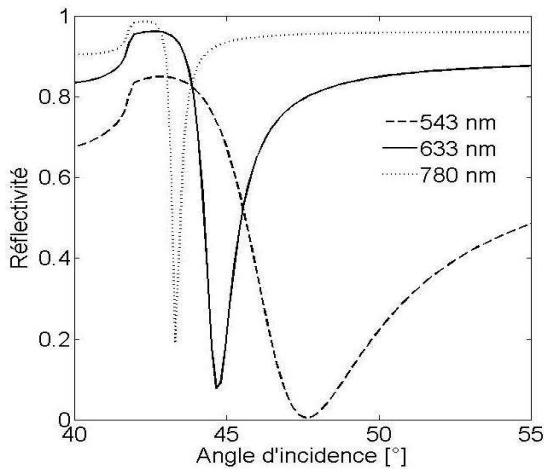


Figure 4.9 : Réflectivité théorique pour un même système illuminé par trois longueurs d'ondes différentes dans l'air.

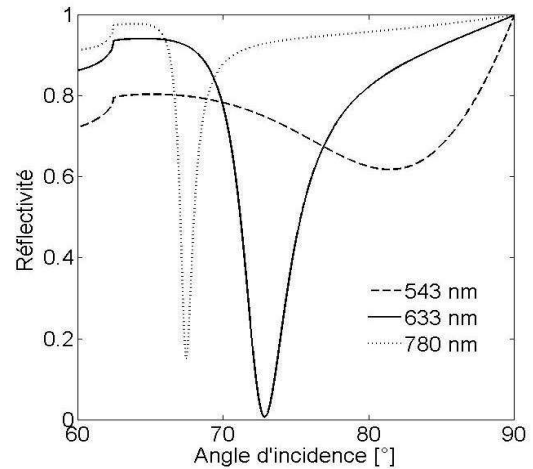


Figure 4.10 : Réflectivité théorique pour un même système illuminé par trois longueurs d'ondes différentes en liquide.

Outre le décalage vers les grands angles à mesure que la longueur d'onde diminue, notons qu'à 543 nm, le pic d'absorption est dix fois plus large qu'à 633 nm dans l'air. Cette tendance est confirmée en liquide où l'élargissement, accompagné d'une atténuation de la résonance, est encore plus marqué (**Figure 4.10**). Cet élargissement rend impossible les mesures en liquide, avec une longueur d'onde inférieure à 600 nm pour un prisme d'indice 1.5. L'étude en liquide sera donc limitée à une excitation à 633 nm ou 780 nm.

La **Figure 4.11** donne l'effet sur la sensibilité à l'épaisseur moyenne S_e de la longueur d'onde d'excitation. Les 3 valeurs obtenues dans l'air sont représentées en noir, celles calculées en liquide sont illustrées en rouge. S_e décroît nettement avec l'augmentation de la longueur d'onde quelque soit l'indice du milieu extérieur. La courbe pointillée représente la valeur moyenne des valeurs de S_e . L'adsorption, et donc le décalage angulaire de la résonance, semble *a priori* plus facilement détectable pour des longueurs d'onde proches de l'UV.

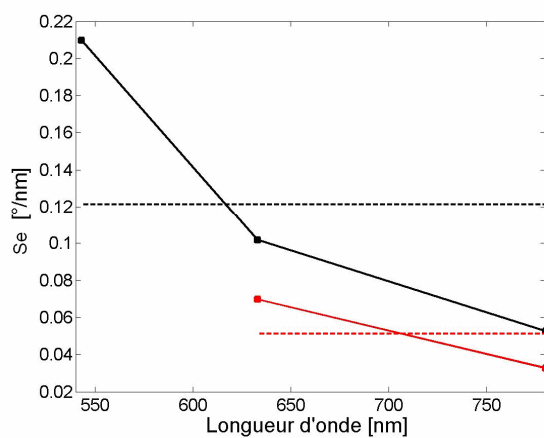


Figure 4.11 : Sensibilité moyenne théorique à l'épaisseur S_e en fonction de la longueur d'onde dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

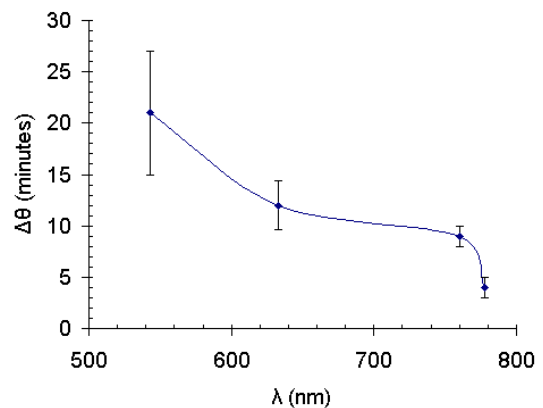


Figure 4.12 : Déplacement angulaire expérimental du pic plasmon en fonction de la longueur d'onde, pour une monocouche de 25 bases d'ADN (dans l'air).

Nous avons vérifié expérimentalement cette décroissance avec un dépôt d'ADN de 25 bases analysé dans l'air en changeant de source lumineuse. La diminution de ce décalage pour de grandes longueurs d'ondes est très nette : un décalage de 21' est mesuré à 543 nm, alors qu'il n'est que de 10' à 780 nm (**Figure 4.12**).

Les courbes d'effets nous permettent d'évaluer la sensibilité S_a en fonction des différentes longueurs d'onde, et montrent un comportement opposé à S_c (**Figure 4.13**) : S_c tend à augmenter pour des longueurs d'ondes se rapprochant de l'IR. Le calcul de S_c , représenté dans la **Figure 4.14** permet de confirmer cette tendance.

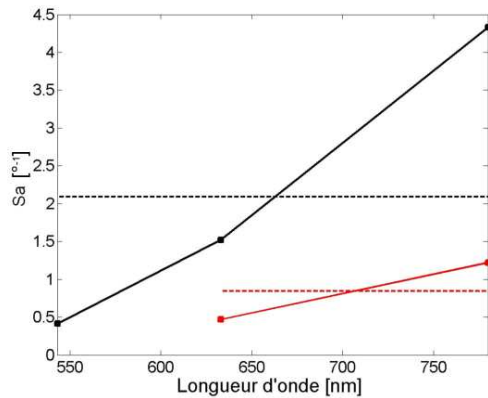


Figure 4.13 : Sensibilité angulaire moyenne S_a en fonction de la longueur d'onde dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

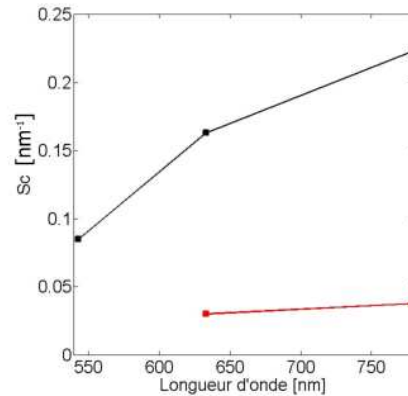


Figure 4.14 : Sensibilité moyenne S_c du capteur en fonction de la longueur d'onde dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

Dans l'air S_c est trois fois plus importante à 780 nm qu'à 543 nm. Néanmoins cette tendance s'amenuise très largement en liquide, où S_c est quasiment constante. Une longueur d'onde d'excitation de 780 nm conduit donc à la sensibilité S_c la plus importante.

Expérimentalement, travailler avec une longueur d'onde dans l'infrarouge impose de nombreuses contraintes, notamment pour les alignements des constituants du dispositif. D'autre part, et nous l'exploiterons dans le chapitre suivant, cette longueur d'onde est en bordure de la gamme spectrale de l'ellipsomètre utilisé ce qui pourra entraîner un bruit plus important sur la mesure. En définitive, même si la sensibilité S_c est bien plus importante à 780 nm, pour ces raisons nous avons choisi de travailler à 633 nm.

4.3.4.2 Influence de l'indice du prisme

Les sensibilités moyennes S_a et S_c pour un indice de prisme variant de 1.50 à 1.80 présentent un comportement opposé : une augmentation de l'indice du prisme va conduire à une diminution du décalage angulaire (**Figure 4.15**) et parallèlement à une augmentation de la sensibilité en réflectivité (**Figure 4.16**).

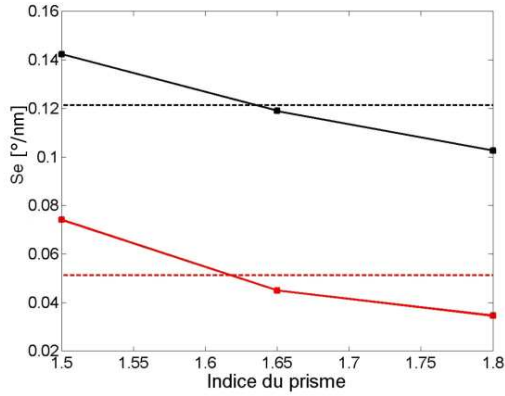


Figure 4.15 : Sensibilité moyenne à l'épaisseur S_e en fonction de l'indice du prisme dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

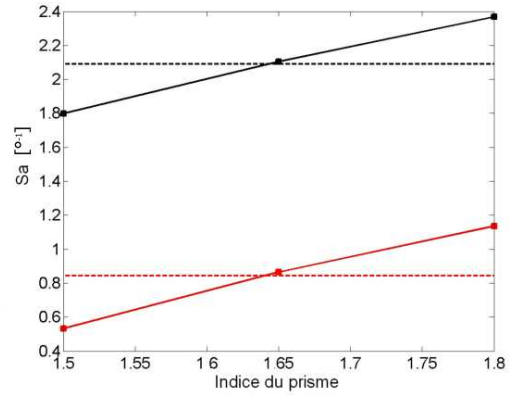


Figure 4.16 : Sensibilité angulaire moyenne S_a en fonction de l'indice du prisme dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

Dans le cas d'une étude angulaire, un faible indice du prisme présentera l'avantage d'obtenir de grands décalages angulaires, alors qu'un indice de prisme élevé permettra d'obtenir une plus grande sensibilité en réflectivité et donc à angle fixe.

L'effet de l'indice du prisme sur la sensibilité S_c du capteur est négligeable (**Figure 4.17**), que ce soit pour une mesure dans l'air ou en liquide.

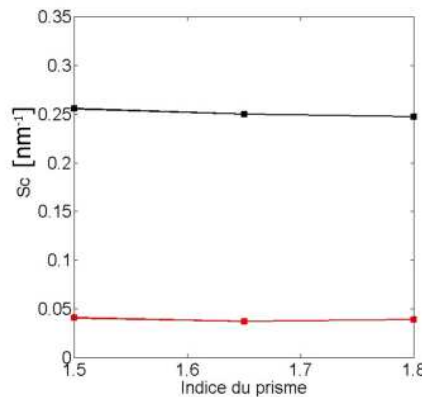


Figure 4.17 : Sensibilité moyenne S_c du capteur en fonction de l'indice du prisme dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

Le choix de l'indice du prisme ne sera donc pas un facteur influent sur la sensibilité globale du capteur. Par contre, un indice de prisme élevé réduira l'angle d'incidence nécessaire à l'excitation des plasmons de surface, paramètre qui peut être limitant en liquide.

4.3.4.3 Influence de l'épaisseur d'or

Parmi les paramètres influents sur la résonance, l'épaisseur de métal est le seul élément, outre bien sûr la couche biologique elle-même, susceptible de varier d'une expérience à l'autre. Dans un dispositif expérimental donné, les éléments que sont le prisme et la source sont généralement fixés ou adaptés au besoin de l'expérience. Faisant partie intégrante de la réaction biologique, le dépôt d'or n'est exploitable qu'une seule fois. De plus, l'évaporation thermique conduit à une incertitude sur l'épaisseur de métal déposé d'environ 5%, ce qui correspond à une erreur d'environ de 2 à 3 nm suivant les épaisseurs déposées.

Un plasmon de surface peut être excité dans le visible sur une plage relativement large d'épaisseur de métal. Ainsi, comme le montre la **Figure 4.18**, il est possible de détecter une résonance pour une épaisseur comprise entre 20 et 75 nm d'or. Cette figure permet également de visualiser la modification de la forme du pic pour différentes épaisseurs d'or : la profondeur du pic varie en fonction de l'épaisseur de métal. Des épaisseurs comprises entre 40 et 55 nm permettent d'accéder aux résonances les plus prononcées. Nous cherchons alors à déterminer l'épaisseur la plus faible, afin de minimiser la consommation de métal et donc le coût de chaque échantillon, permettant d'obtenir des valeurs de S_a et S_e maximales.

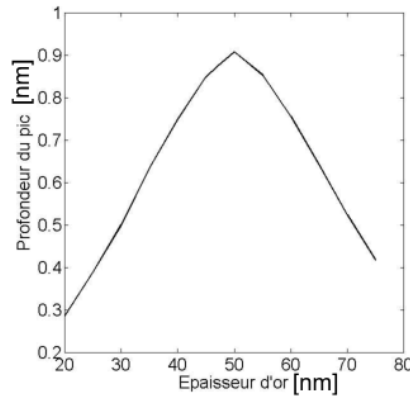


Figure 4.18 : Profondeur du pic de la résonance plasmon en fonction de l'épaisseur d'or.

Au regard de la **Figure 4.19**, l'épaisseur d'or n'apparaît pas comme un paramètre influent vis-à-vis du décalage angulaire après adsorption. La sensibilité à l'épaisseur S_e apparaît en effet comme constante dans l'air et en liquide. Une analyse de l'angle de résonance avant et après réaction ne sera donc pas influencée par l'épaisseur de métal : pour un même type de dépôt le décalage angulaire sera constant quelle que soit l'épaisseur d'or.

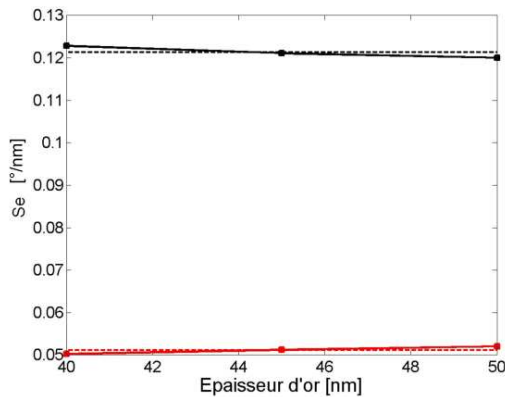


Figure 4.19: Sensibilité moyenne à l'épaisseur S_e en fonction de l'épaisseur d'or dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

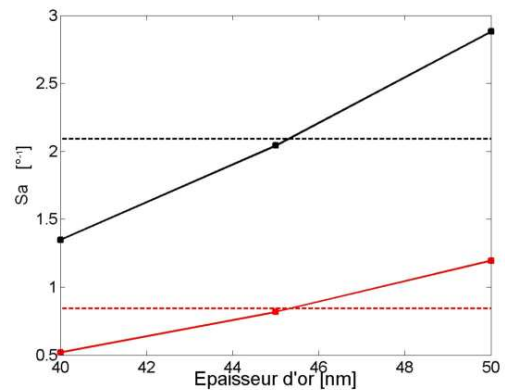


Figure 4.20 : Sensibilité angulaire moyenne S_a en fonction de l'épaisseur d'or dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

En revanche, la sensibilité angulaire S_a dépend de cette épaisseur (**Figure 4.20**). En moyenne, une sensibilité deux fois plus importante pour une épaisseur de 50 nm par rapport à une épaisseur de 40 nm est attendue. L'étude de S_e montre bien entendu la même variation que S_a (**Figure 4.21**).

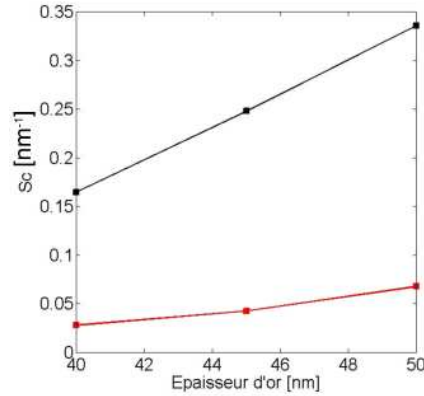


Figure 4.21 : Sensibilité moyenne S_c du capteur en fonction de l'épaisseur d'or dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

Il apparaît qu'une épaisseur d'or de 50 nm permet d'obtenir les sensibilités maximales. Notons cependant qu'au vu de la précision du dépôt d'or, soit ± 2 nm, nous avons choisi d'évaporer 45 nm d'or compromis entre une sensibilité S_c correcte et un coût raisonnable.

4.3.4.4 Influence de l'indice de la couche adsorbée

Même si l'indice et l'épaisseur de la couche adsorbée ne sont pas des paramètres contrôlables lors de l'expérience, connaître leurs effets sur le décalage angulaire et la forme du pic est d'un intérêt fondamental pour la compréhension du signal détecté. La **Figure 4.22** montre une dépendance du décalage angulaire vis-à-vis de l'indice de la couche adsorbée dans l'air. Ce phénomène est accentué en liquide. Nous avons également vu (**Figure 4.3**) que le décalage angulaire était linéairement proportionnel à l'épaisseur.

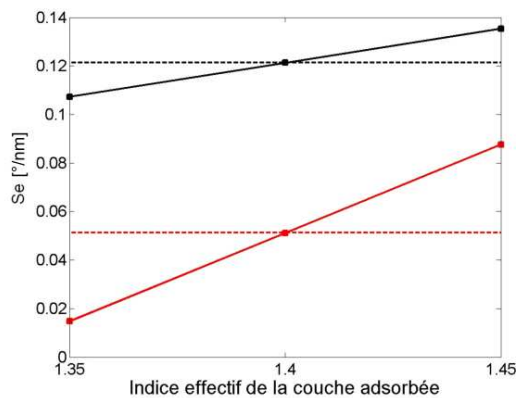


Figure 4.22 : Sensibilité moyenne à l'épaisseur S_e en fonction de l'indice effectif de la couche adsorbée dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

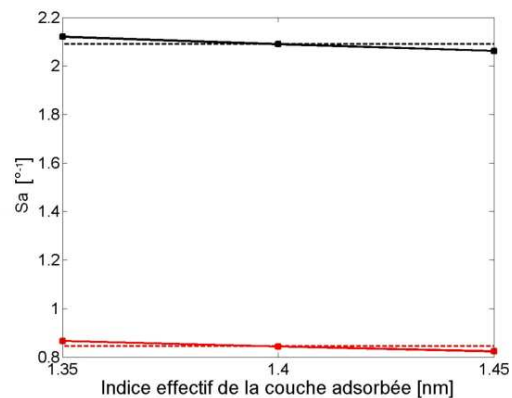


Figure 4.23 : Sensibilité angulaire moyenne S_a en fonction de l'indice effectif de la couche adsorbée dans l'air (noir) et en liquide (rouge).

La **Figure 4.23** représente S_a en fonction de l'indice de la couche analysée : une variation quasiment nulle est observée. Si l'on considère l'adsorption de molécule sur la surface comme la densification d'une couche d'épaisseur fixe, ce qui revient à avoir un indice effectif variant au cours du temps, la forme du pic, sur la gamme d'indice et d'épaisseur utilisée, peut être considérée comme constante au cours du greffage et non perturbatrice de l'analyse en temps réel à angle fixe.

4.3.4.5 Conclusion

Ce paragraphe a permis de définir plus précisément les paramètres influents sur la sensibilité du capteur. Ainsi, pour obtenir une réponse idéale, une longueur d'onde de 780 nm, une épaisseur d'or de 50 nm ainsi qu'une couche d'indice élevé sont idéaux. Nous avons cependant souligné que ces paramètres imposent des inconvénients expérimentaux, d'autant plus que leurs influences diminuent lors du passage de l'air au liquide. Notre choix s'est donc porté sur une longueur d'onde d'excitation de 633 nm et une épaisseur d'or de 45 nm.

4.3.5 Détection de la fonctionnalisation de l'or par une couche biologique.

Les dépôts d'or ont été réalisés selon la même procédure que dans le paragraphe 2.2.1.2 directement à la surface métallisée du prisme. Nous avons choisi de ne pas utiliser de couche d'accrochage de chrome afin de limiter le nombre de paramètres aux cours des ajustements théoriques. La faible adhérence de l'or sur le verre permet également un nettoyage aisé de la surface. De plus, le dispositif utilisé ne permettant pas au moment de ces expériences de travailler en milieu liquide sans consommer une quantité trop importante de matériel biologique, les greffages des différents oligonucléotides ont été réalisés par incubation directe sur la surface d'or préalablement évaporée. Par souci de cohérence avec les mesures AFM les concentrations des solutions d'ADN utilisées ont été de 10^{-4} M, la durée d'incubation est également restée inchangée.

L'objectif de cette partie est de vérifier les sensibilités théoriques calculées. Nous avons tenté d'ajuster les courbes de réflectivité angulaires à l'aide du modèle théorique d'Abélès afin de déterminer l'indice optique du film adsorbé à la surface. La pertinence des résultats sera donnée sur différents types de monobrins par la confrontation avec les résultats donnés au chapitre AFM.

4.3.5.1 Etude dans l'air

Dans l'air, au regard des résultats expérimentaux (**Figures 4.24A, 4.24B**), le déplacement angulaire varie avec le type de monobrins adsorbés à la surface. La méthode est suffisamment sensible pour faire la différence entre les monobrins de 15 et 25 bases. Cependant la différenciation des monobrins 25 et 35 bases reste difficile. Les mesures AFM justifient cette faible différence entre le 25 et 35 bases, les épaisseurs sont en effet très proches.

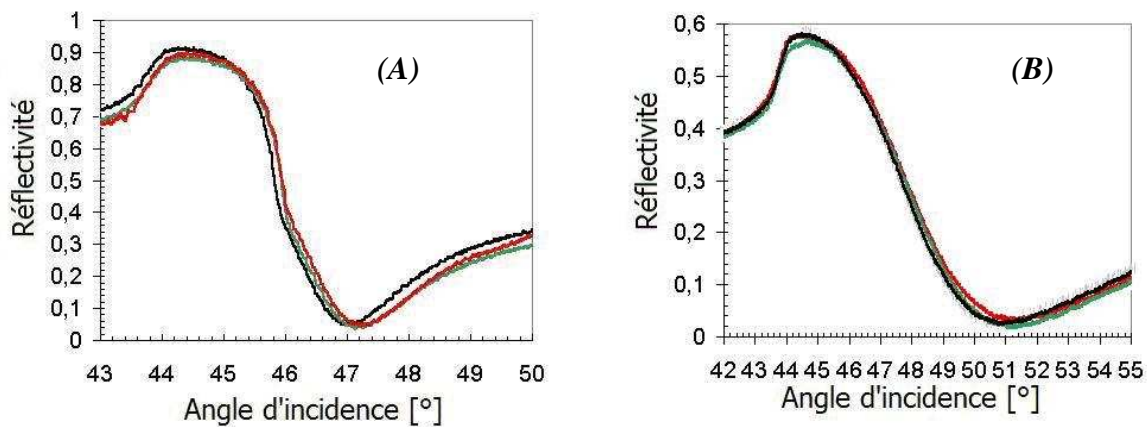


Figure 4.24 : Etude angulaire de la réflectométrie pour une surface d'or nue (courbe noire), puis greffée par des brins d'ADN 15 bases (courbe rouge) et 25 bases (courbe verte), à 633 nm (A) et à 543 nm (B).

La dépendance spectrale de l'indice de l'ADN peut ici être négligée : les longueurs d'onde utilisées, $\lambda=633$ et 543 nm, sont comprises dans la gamme spectrale où l'indice de l'ADN est invariant suivant la longueur d'onde. L'ajustement de ces mesures angulaire peut être effectué en aveugle pour déterminer à la fois l'indice et l'épaisseur de la couche adsorbée. Cette démarche, comme il a été montré en ellipsométrie, peut conduire à une erreur importante sur la détermination de ces paramètres. Pour s'affranchir de cette indétermination, et en s'appuyant sur la variation linéaire du décalage angulaire vis-à-vis de l'indice effectif de la couche adsorbée, il est possible d'extrapoler l'indice effectif de la couche à l'aide des simulations développées dans la partie théorique et des mesures AFM des épaisseurs de films (**Figure 4.25**). Les résultats sont répertoriés dans le **Tableau 4.2**.

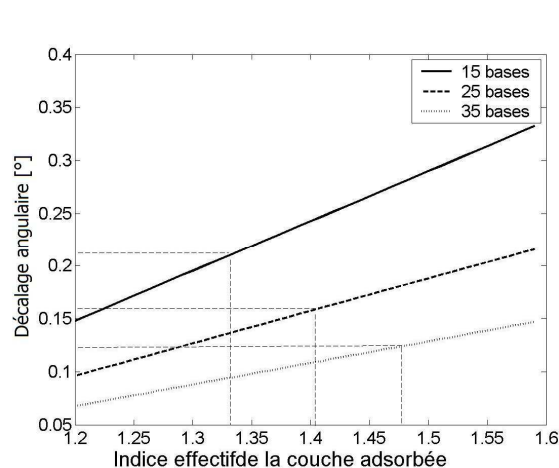


Figure 4.25 : Représentation du décalage angulaire théorique de la résonance pour des épaisseurs fixées en fonction de l'indice effectif de la couche.

	15 bases	25 bases	35 bases
e_{AFM} [nm]	3.4	2.2	1.5
$\Delta\theta$ (°) à 633 nm	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.02
$\Delta\theta$ (°) à 543 nm	0.35 ± 0.04	0.26 ± 0.04	
n_{eff}	1.33 ± 0.03	1.40 ± 0.03	1.47 ± 0.03
(AFM)	(1.34)	(1.43)	(1.47)
((Ellipso))	((1.32))	((1.40))	((1.46))

Tableau 4.2 : Décalages induits par différentes épaisseurs d'ADN. Détermination de l'indice effectif de la monocouche d'ADN à partir des valeurs expérimentales.

Les indices effectifs ainsi déterminés montrent un accord certain avec les mesures précédentes réalisées par AFM, même si ces valeurs semblent légèrement minimisées pour les monobrinns de 15 et 25 bases. Néanmoins, on peut conclure que la détection angulaire par résonance des plasmons de surface est suffisamment sensible pour différencier la nature ainsi que l'indice effectif du dépôt à la surface du capteur dans l'air. On peut donc estimer par cette méthode des variations de l'indice optique de l'ADN de l'ordre de 10^{-2} .

4.3.5.2 Etude en liquide.

Une cellule pour immerger la surface d'or en liquide a été adaptée. Comme montré dans la partie précédente, le pic d'absorption en liquide est nettement décalé vers les grands angles. On considère que l'indice de la solution tampon utilisée est égal à celui de l'eau, soit 1.333 à la longueur d'onde employée. En liquide, la différenciation entre les films d'ADN s'avère plus difficile du fait de la largeur importante du pic d'adsorption. L'incertitude sur la position du pic est donc plus grande. La **Figure 4.26** montre un décalage angulaire de 0.40° observé dans la solution tampon pour un ADN de 25 bases, qui peut être comparé au décalage de 0.26° dans l'air.

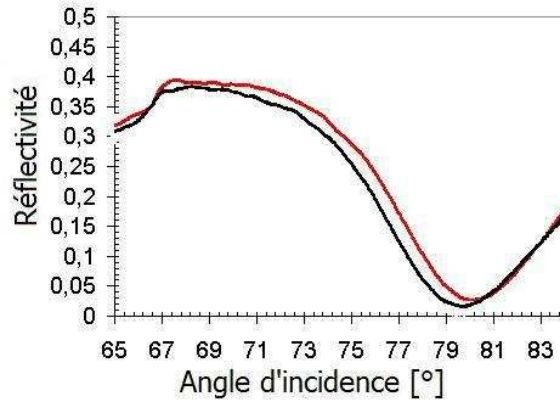


Figure 4.26 : Etude angulaire de la réflectométrie en liquide d'une surface d'or (noir), puis fonctionnalisée par un film d'ADN 25 bases (rouge)

Le fait d'hydrater la surface modifie la structure de la couche d'ADN, l'indice effectif de l'ensemble est également changé. Les mesures AFM ont déjà confirmé ce phénomène : en milieu liquide, les brins d'ADN ont tendance à se redresser. De manière analogue à l'ajustement effectué dans l'air, le décalage angulaire de la résonance pour chaque type de monobrin est évalué et est ensuite rattaché à l'indice effectif correspondant (**Figure 4.27**). Les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau 4.3** suivant :

	15 bases	25 bases	35 bases
e_{AFM} [nm]	3.4	5.8	10.5
$\Delta\theta$ (°) à 633 nm	0.40 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.45 ± 0.02
n_{eff}	1.41 ± 0.03	1.37 ± 0.03	1.36 ± 0.03

Tableau 4.3 : Décalages induits par différentes épaisseurs d'ADN. Détermination de l'indice effectif de la monocouche d'ADN à partir des valeurs expérimentales

Une première remarque est de souligner que le décalage angulaire obtenu pour l'ADN de 15 bases est équivalent à celui de l'ADN de 25 bases. Cette égalité met en évidence l'importance de la mesure AFM, qui permet déterminer la nature du monobrin greffé. Par ailleurs, ces mesures soulignent la diminution de l'indice effectif, et donc du taux de recouvrement de la couche, à mesure que le nombre de bases augmente. Ce résultat est à mettre en relation avec les mesures effectuées dans l'air où les monobrin de 35 bases recouvraient la totalité de la surface. En liquide, outre la répulsion existante entre le monobrin et le substrat, les répulsions électrostatiques, croissantes avec la longueur de la molécule, existantes entre les squelettes chargés de chaque monobrin sont responsables de la discontinuité du film, c'est-à-dire de l'espacement existant entre chaque monobrin greffé sur la surface.

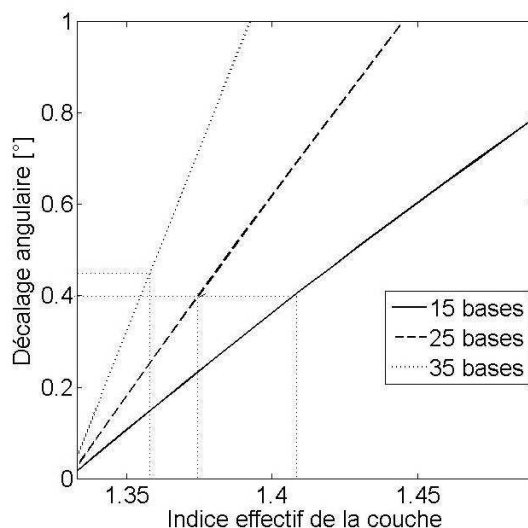


Figure 4.27 : Représentation du décalage angulaire théorique de la résonance pour des épaisseurs fixées en fonction de l'indice effectif de la couche.

4.3.5.3 Hybridation

L'aptitude de la technique à détecter l'hybridation a été évaluée sur un dépôt d'ADN monobrin et d'ADN hybridé (double hélice complète) de 25 bases. Le décalage observé dépend en partie de la différence de fonction diélectrique entre les deux natures d'ADN (monobrin et hybridée). En effet, la fonction diélectrique peut être reliée directement à la densité du milieu qui doit doubler, à concentration identique, avec la double hélice d'ADN.

De même, la rigidité de la double hélice peut induire des différences d'épaisseur. Le décalage observé sera donc le fait d'une variation de l'épaisseur et de la fonction diélectrique. Sur la **Figure 4.28**, le décalage angulaire induit par les brins hybridés, 0.13° , est plus faible que celui produit par les monobrins, 0.37° . Dans cette configuration, un décalage des courbes est donc perceptible.

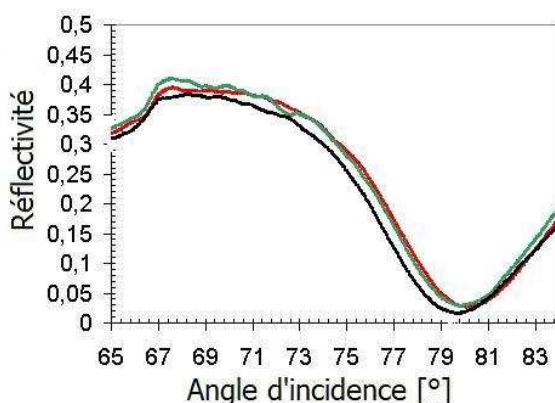


Figure 4.28 : Effet de l'hybridation des brins d'ADN 25 bases. Les courbes verte et rouge représentent respectivement les monobrins et les doubles brins.

4.4 Conclusion

La forte variation de réflectivité aux angles proche de la résonance plasmon a été étudiée. Ce chapitre a permis de déterminer l'influence théorique des différents paramètres du système sur les sensibilités angulaire et à l'épaisseur. Nous avons pu ainsi fixer l'épaisseur de métal, la longueur d'onde d'excitation et l'indice du prisme assurant théoriquement les meilleures sensibilités. Nous avons vérifié expérimentalement dans ce chapitre la haute sensibilité de détection angulaire de la résonance des plasmons de surface appliquée à la caractérisation de molécules biologiques. Dans le cadre d'une étude monocapteur dans l'air et en liquide, un greffage *ex situ* de monobrin d'ADN thiolés a été réalisé et caractérisé sans le but de déterminer la fraction volumique, nous avons pu confirmer l'importance d'une technique de mesure complémentaire permettant de décorréler l'effet de l'indice et de l'épaisseur de la couche greffée sur le décalage du pic de réflectivité caractéristique de la résonance.

Le système développé est suffisamment sensible dans l'air pour permettre de déterminer l'indice effectif de l'ADN déposé à la surface. En liquide, comme attendu au vu des mesures AFM, le décalage angulaire est plus important que dans l'air. Néanmoins une augmentation des incertitudes sur la position angulaire de la résonance due à l'élargissement du pic est remarquée. Enfin l'hybridation du monobrin complémentaire provoque une variation du signal. La faisabilité de la détection de matériel biologique par résonance des plasmons de surface a été démontrée pour un dispositif monocapteur.

Chapitre V : Lecture ellipsométrique de la RPS

5.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est de démontrer les potentialités de la lecture ellipsométrique et spectroscopique couplée à la résonance des plasmons de surface pour détecter le greffage de couches biologiques ultrafines ou la réactivité physico-chimique de surface.

Le principe repose, tout comme une étude RPS classique, sur l'illumination d'un prisme sur lequel est déposée une couche métallique, en l'occurrence de l'or, sous un angle permettant l'excitation de ces ondes de surfaces. A la différence d'une lecture angulaire, la résonance des plasmons de surface, est analysée d'un point de vue **spectroscopique**. D'autre part, nous compléterons la détection énergétique correspondant à la norme de la réflectivité, par la mesure de la phase de la réflectivité via la mesure de l'angle **ellipsométrique** Δ .

Ce dispositif a pour avantage de contourner les limitations de l'ellipsométrie spectroscopique en milieu aqueux en évitant au faisceau optique de traverser le milieu liquide et par conséquent de réduire le volume de solution et être compatible aux demandes en biologie.

Après avoir évalué théoriquement les sensibilités de ψ et de Δ à l'épaisseur et à l'indice de réfraction afin de déterminer les paramètres optimums de détection, une couche polymère a été utilisée pour une vérification expérimentale de ces paramètres. Les couches biologiques, de dimensions différentes et présentant différentes interactions avec le substrat, ont alors été caractérisées.

5.2 Influence paramétrique du système sur les sensibilités à l'adsorption.

La **Figure 5.1** montre pour exemple l'effet attendu de l'adsorption d'une couche de 6 nm, d'indice 1.45 sur les variations angulaires ψ et Δ en configuration ellipsométrie-plasmon.

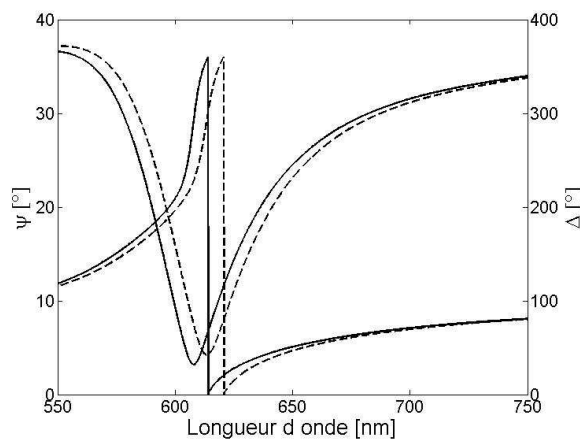


Figure 5.1 : Spectres de ψ et Δ pour une épaisseur de chrome de 5 nm et 40 nm d'or ; trait plein : couche nue ; trait pointillé : adsorption d'un film d'épaisseur 6 nm et d'indice 1.45.

Les variations de Δ confirment, comme pour l'ellipsométrie classique l'extrême sensibilité de la phase aux couches nanométriques, phénomène amplifié par la résonance des plasmons de surfaces. Les réponses, tant en ψ qu'en Δ , se décalent vers le rouge (traits pointillés) lors de l'ajout d'une couche intermédiaire entre la surface d'or et le milieu extérieur.

Nous avons alors cherché, par analogie avec l'étude angulaire de la réflectivité de la résonance plasmon, à déterminer la sensibilité S_c du capteur pour ψ et Δ . Comme précédemment, cette sensibilité est déduite du produit de la sensibilité à l'épaisseur adsorbée S_e et des sensibilités spectroscopiques S_λ :

$$S_c^{\psi,\Delta} = S_\lambda^{\psi,\Delta} \cdot S_e = \frac{\partial \psi, \Delta}{\partial \lambda} \cdot \frac{\partial \lambda}{\partial e} = \frac{\partial \psi, \Delta}{\partial e} \quad (5.1)$$

$S_e = \frac{d(\Delta\lambda)}{de}$ (5.2) se détermine à partir de la **Figure 5.2**, qui illustre la relation linéaire, pour des épaisseurs inférieures à 20 nm, entre le décalage spectral $\Delta\lambda$ du pic de résonance en ψ et l'épaisseur d'une couche d'indice optique constant. S_e est alors sans dimension. S_e varie aussi de manière linéaire avec l'indice de la couche pour une épaisseur de film fixée.

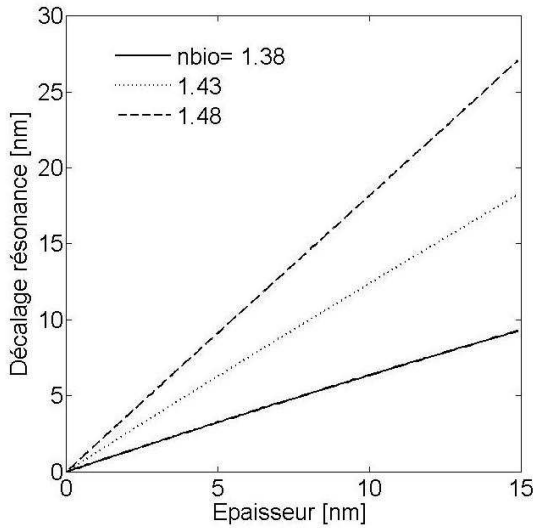


Figure 5.2 : Evaluation du décalage spectral de la résonance plasmon en fonction de l'épaisseur déposée sur la surface d'or. L'indice optique de la couche n_{bio} est fixé.

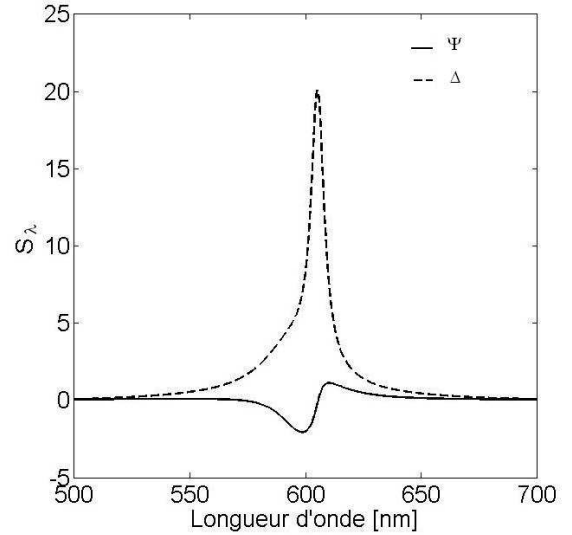


Figure 5.3 : Représentation de la sensibilité spectroscopique (éq. 5.3) pour un système bicouche de 5 nm de chrome et 40 nm d'or dont le spectre est présenté **Figure 5.1**.

S_λ , différente en ψ et Δ , détermine l'efficacité du capteur à une longueur d'onde donnée, et est définie par :

$$S_\lambda^\psi = \frac{d\psi}{d\lambda} [^\circ / nm] \quad (5.3)$$

$$S_\lambda^\Delta = \frac{d\Delta}{d\lambda} [^\circ / nm]$$

La **Figure 5.3** représente la dérivée spectrale du signal de la **Figure 5.1**. S_λ^Δ est clairement la sensibilité la plus importante, et ceci quelle que soit la longueur d'onde, ce qui justifie à elle seule l'intérêt de la détection de phase. La valeur de S_λ^Δ la plus grande est 20 fois supérieure à S_λ^ψ

maximale et correspond à la longueur d'onde où la sensibilité S_{λ}^{ψ} est nulle, c'est-à-dire au creux du pic de résonance.

5.2.1 Choix de l'indice du prisme et influence de l'angle d'incidence

Cette partie a pour objectif principal d'analyser quels sont les paramètres les plus influents sur la sensibilité du capteur, en particulier l'angle d'incidence, les épaisseurs des couches métalliques et l'indice de la couche adsorbée.

Angle d'incidence $\theta_{\text{ellipso}} [^{\circ}]$	Épaisseur d'or [nm]	Indice de la couche adsorbée	Épaisseur de la couche adsorbée
70	40	1.35	2
75	45	1.4	6
80	50	1.45	10

Tableau 5.1 : Paramètres utilisés et variés lors du calcul des sensibilités S_s , S_e et S_c des paragraphes suivants.

5.2.1.1 Indice et géométrie du prisme

Contrairement au dispositif classique employé pour étudier la résonance des plasmons de surface où la longueur d'onde de travail est fixe et l'étude est réalisée en modifiant l'angle d'incidence, l'angle d'incidence θ_{ellipso} est ici fixé. Notre dispositif nous impose d'avoir des angles d'incidences variés par pas de 5 degrés. C'est donc le balayage spectral qui va permettre d'obtenir les conditions adéquates pour exciter la résonance.

Lors de l'étude angulaire de la résonance des plasmons de surface, le prisme employé était hémicylindrique permettant un centrage et un alignement plus aisés des éléments. Ici l'angle d'incidence étant fixe, le positionnement de la cellule assuré par les déplacements micrométriques motorisés, l'emploi d'un prisme hémicylindrique ne permet pas de conserver une valeur d'angle d'incidence fixe lorsque la cellule de mesure est déplacée. Notre choix s'est porté sur un prisme à angle droit. La contrainte sur la nature et la géométrie du prisme est fixée par l'angle de la résonance plasmon θ_p : celui-ci est lié à la longueur d'onde excitatrice qui est fixée par l'ellipsomètre entre 300 et 800 nm.

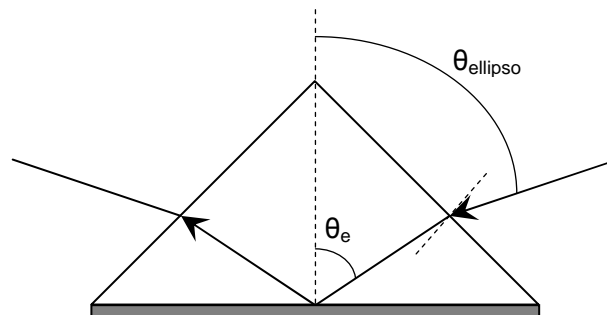


Figure 5.4 : Correspondance entre l'angle d'incidence de l'ellipsomètre θ_{ellipso} et l'angle d'incidence sur l'échantillon θ_e .

La plage de réglage angulaire est limitée sur une gamme de 55 à 80°. Pour le type de prisme employé, la correspondance entre l'angle d'incidence donné par l'ellipsomètre θ_{ellipso} et θ_e (**Figure 5.4**), l'angle d'incidence sur l'échantillon, est donnée par les lois de Descartes:

$$\theta_e = 45 + \arcsin\left(\frac{\sin(\theta_{\text{ellipso}} - 45)}{n_{\text{prisme}}}\right) \quad (5.4)$$

(5.4) implique que pour θ_{ellipso} variant de 55 à 80° θ_e est compris entre 51 et 67° et n_{prisme} de 1.5 à 1.8. La **Figure 5.5**, illustrant la longueur d'onde d'excitation de la résonance plasmon en fonction de l'angle θ_e (**A**), et dans le cas particulier d'un prisme à angle droit θ_{ellipso} (**B**), pour 3 prismes de différent indice, permet d'évaluer la plage angulaire compatible une étude en **liquide**. L'excitation du plasmon de surface est possible sur une gamme angulaire assez large. Plus l'angle sera élevé, plus la longueur d'onde d'excitation sera faible, et ce pour les 3 prismes.

Le prisme d'indice 1.5 est clairement incompatible avec notre dispositif expérimental : les angles θ_{ellipso} associés à la résonance sont supérieurs à 80°. Le prisme d'indice 1.65 permet d'exciter la résonance pour des angles θ_e compris 58 et 80°, ce qui correspond à θ_{ellipso} appartenant à la gamme 70-80°.

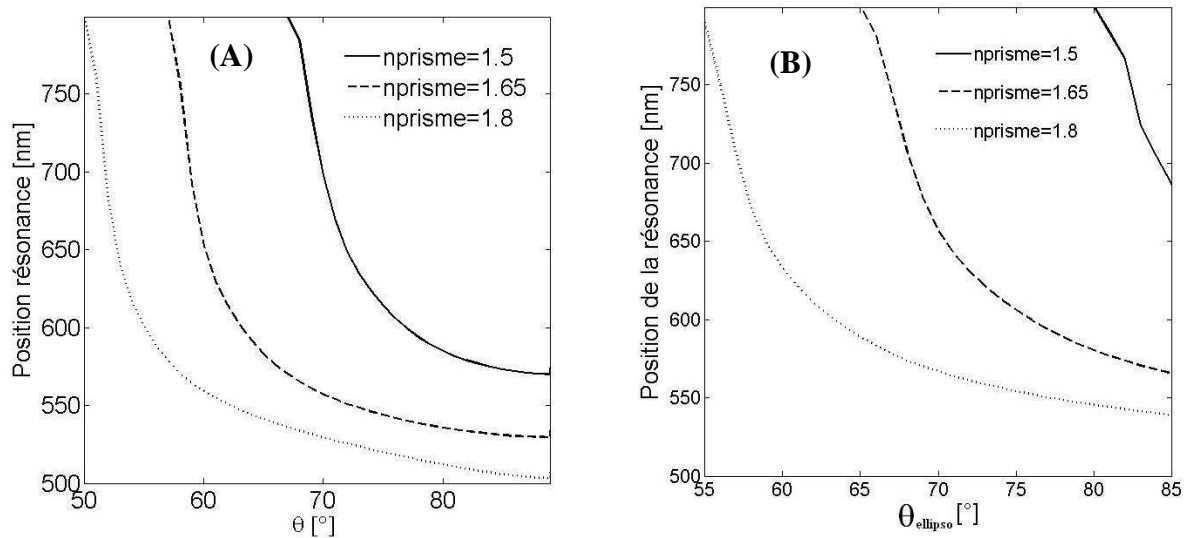


Figure 5.5 : Position spectrale de la résonance plasmon en fonction de l'angle d'incidence θ_e (**A**) et θ_{ellipso} (**B**) pour des prismes à angle droit d'indice de réfraction compris entre 1.5 et 1.8 sur une couche d'or de 45 nm.

Concernant le prisme d'indice 1.8, la résonance est confinée dans une gamme spectrale relativement étroite, de 500 à 550 nm, pour des angles d'incidences θ_e compris entre 60 et 80°, alors qu'une variation exponentielle de la position de la résonance, de 550 à 800 nm, est observée pour des angles inférieurs à 60°. Rappelons que plus la longueur excitatrice est faible, moins la sensibilité du capteur est importante (**chapitre 4**), ce qui fait que la plage angulaire de θ_{ellipso} utilisable est bornée entre 60 et 80°.

Les prismes d'indice 1.65 à 1.8 permettent donc d'atteindre les conditions de résonances avec des angles d'incidence les plus faibles. Pour des raisons géométriques, il est, en outre, intéressant de travailler avec un angle d'incidence le plus faible possible, dans la mesure où cet angle va conditionner la taille du spot, et donc l'aptitude à la miniaturisation.

Néanmoins, dans la mesure où un prisme SF2, d'indice théorique 1.65 à 633 nm, ait été employé expérimentalement, nous fixerons à $n_p=1.65$ dans les simulations, imposant également des angles θ_{ellipso} compris entre 70 et 80°.

5.2.1.2 Influence de l'angle d'incidence

Les **Figures 5.6 A et B** montrent un effet de 50% de l'angle d'incidence sur S_λ^ψ et S_λ^Δ , celles-ci sont maximales pour $\theta_{\text{ellipso}} = 70^\circ$, et décroissantes à mesure que l'angle θ_{ellipso} augmente.

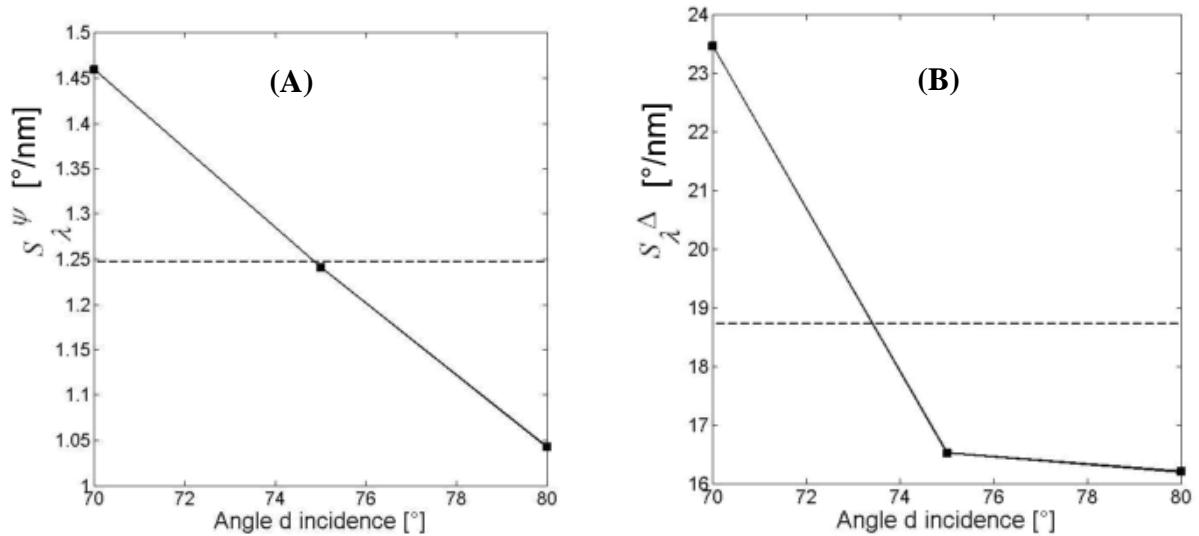


Figure 5.6 : Sensibilités spectroscopiques moyennes en fonction de l'angle d'incidence θ_{ellipso} pour ψ (A) et Δ (B).

La valeur maximale pour S_λ^ψ est d'environ 1.5°/nm, alors que pour S_λ^Δ cette sensibilité est multipliée par un facteur 15. L'effet de 60% de l'angle d'incidence est le plus fort pour S_c , comme nous pouvons le constater en **Figure 5.7**. On retrouve aussi que S_c est plus importante pour les petits angles $\theta_{\text{ellipso}} = 70^\circ$.

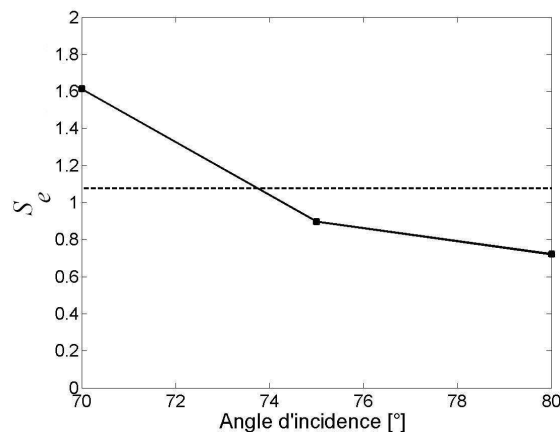


Figure 5.7 : Sensibilité à l'épaisseur moyenne en fonction de l'angle d'incidence θ_{ellipso} .

Les sensibilités globales du capteur $S_c^{\psi,\Delta}$, reportées dans la **Figure 5.8**, en trait plein pour S_c^ψ et en trait pointillé pour S_c^Δ , sont par conséquent nettement améliorées pour des angles

d'incidence petits. S_c^Δ est 3 fois plus importante à 70° qu'à 80° . Même si l'écart est moins marqué pour S_c^ψ , l'évolution demeure identique.

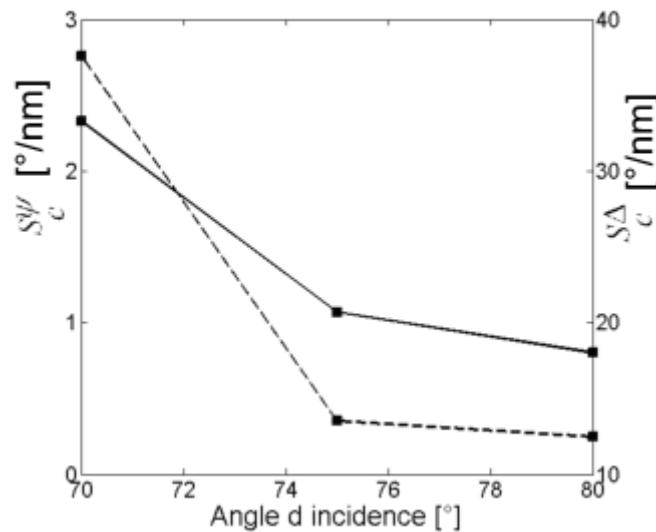


Figure 5.8 : Sensibilité moyenne du capteur en fonction de l'angle d'incidence $\theta_{ellipso}$, en ψ (trait plein) et Δ (trait pointillé)

Cependant, il convient de pondérer cette remarque par l'observation faite dans la **Figure 5.5** où il est notable que la diminution de l'angle d'incidence entraîne un décalage vers les grandes longueurs d'onde de la résonance plasmon. Le **chapitre 3** nous a montré que le bruit de la mesure tend à augmenter drastiquement plus la longueur d'onde d'excitation est proche de l'infrarouge (**Figure 3.6**). L'adsorption et l'augmentation de l'indice du milieu extérieur conduisent également à la même observation. Ce critère nous restreint donc sur le choix de l'angle d'incidence à un angle de 75° , compromis entre une sensibilité du capteur correcte et l'assurance d'un rapport signal sur bruit raisonnable.

5.2.2 Influence de l'épaisseur d'or et de la couche de chrome

Un plasmon peut être excité à l'aide de film d'or d'épaisseur variant entre 30 et 70 nm. Nous avons recherché, d'une part, quelle était l'épaisseur donnant la meilleure sensibilité à l'adsorption et, d'autre part, si la reproductibilité des résultats dépendait du décalage sur l'épaisseur lors des évaporations successives sachant que l'erreur commise est de l'ordre de 5%. Expérimentalement, la surface d'or sera au contact de liquide qui, sous flux, pourra l'endommager. Une sous couche de chrome est donc nécessaire pour assurer une stabilité de la couche métallique. Les **Figures 5.9 A** et **B** permettent d'évaluer l'influence de cette sous couche de chrome de 5 nm (en trait pointillé) sur les sensibilités S_λ^ψ et S_λ^Δ à 75° . S_λ^ψ est maximale à 48 et 43 nm, respectivement sans et avec la sous couche de chrome. La présence du chrome entraîne une diminution de S_λ^ψ d'environ 30%. Une variation de 2 nm autour de l'épaisseur idéale influence faiblement S_λ^ψ . S_λ^Δ maximale n'est pas influencée par la présence de la sous couche de chrome. En revanche, la tolérance sur l'épaisseur d'or est moindre : une variation de l'épaisseur de 1 nm conduit à une chute de S_λ^Δ de l'ordre de 30%.

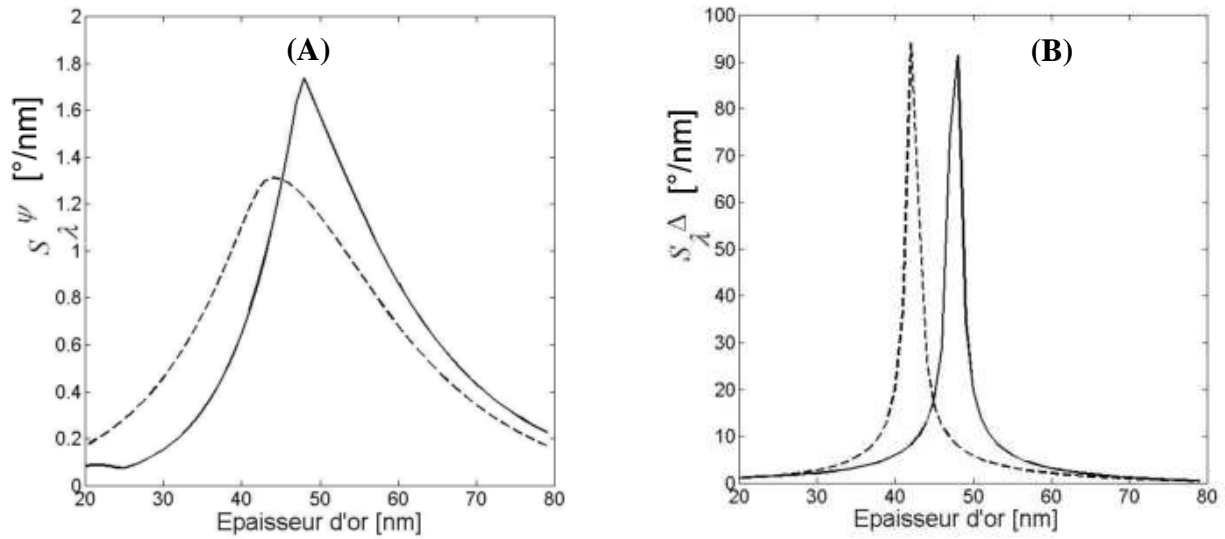


Figure 5.9 : Evolution de S_{λ}^{ψ} (A) et S_{λ}^{Δ} (B) en fonction de l'épaisseur d'or avec (trait plein) ou sans sous couche de chrome (trait pointillé).

L'évolution de S_{λ}^{ψ} et S_{λ}^{Δ} en fonction de l'épaisseur d'or, dans le cas de la présence de la sous couche de chrome, est représentée dans les **Figures 5.10 A** et **B**, et ce pour les différents angles d'incidence. A mesure que l'angle d'incidence augmente, l'épaisseur d'or nécessaire pour obtenir S_{λ}^{ψ} maximale diminue. S_{λ}^{ψ} maximale, de l'ordre de 2°/nm, est obtenue pour un angle de 70° et pour épaisseur de métal de 50 nm. A 75°, une couche de 43 nm permet d'obtenir une valeur de S_{λ}^{ψ} de 1.3°/nm, inférieure de 40% par rapport à 70°. Les variations de S_{λ}^{Δ} observées dans la **Figure 5.10B** sont en revanche très faibles.

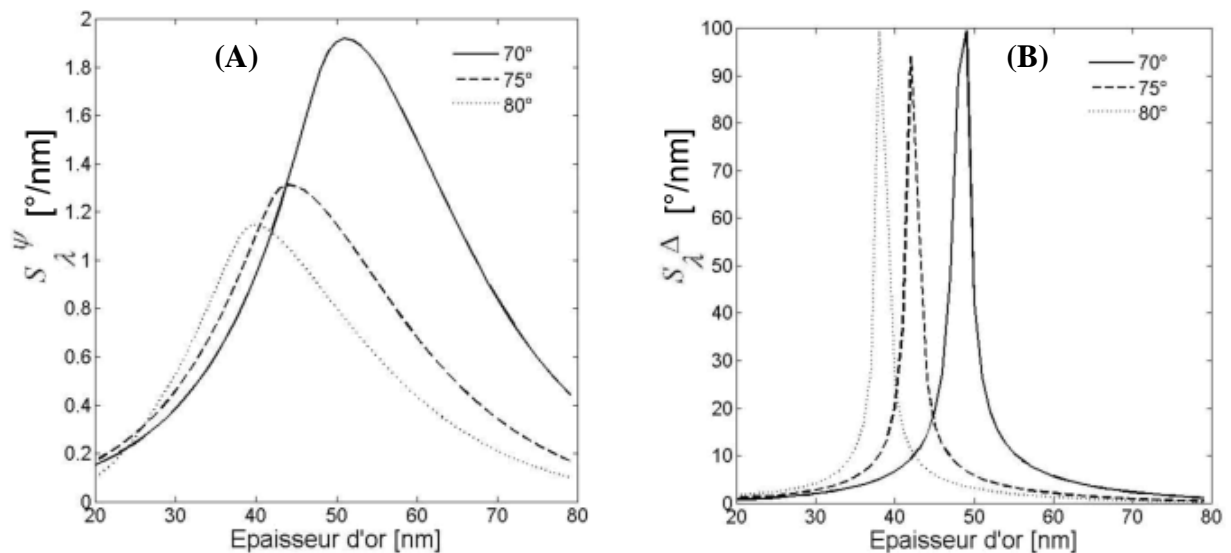


Figure 5.10 : Evolution de S_{λ}^{ψ} (A) et S_{λ}^{Δ} (B) en fonction de l'épaisseur d'or pour les 3 angles θ_{ellipso} étudiés.

Il ressort en revanche de la **Figure 5.11** que l'épaisseur d'or a , en moyenne, a une influence très faible sur le décalage du pic de résonance, et donc sur S_c . Cette remarque est particulièrement importante dans la mesure où l'épaisseur de métal ne sera pas considérée comme un paramètre perturbant et responsable de la variabilité du décalage du pic de résonance.

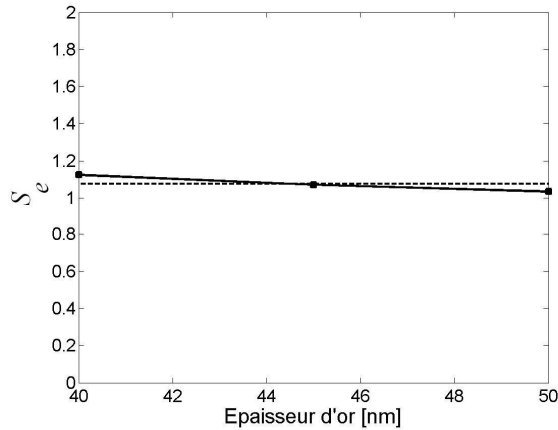


Figure 5.11 : Sensibilité à l'épaisseur moyenne en fonction de l'épaisseur d'or.

Au regard des valeurs de S_e , indépendantes de l'épaisseur de métal (**Figure 5.11**) et très proches de 1, et en tenant compte des incertitudes sur l'épaisseur d'or déposée lors de l'évaporation, une épaisseur de 43 nm semble être optimum afin d'obtenir une sensibilité maximale sur ψ et Δ , pour une incidence à 75° .

5.2.3 Influence de l'indice et de l'épaisseur de la couche adsorbée

L'indice et l'épaisseur de la couche adsorbée ne sont pas des paramètres ajustables au cours de l'étude. Il est cependant intéressant de connaître, comme dans le chapitre précédent, leur influence sur le décalage du pic et également sur les sensibilités spectroscopiques.

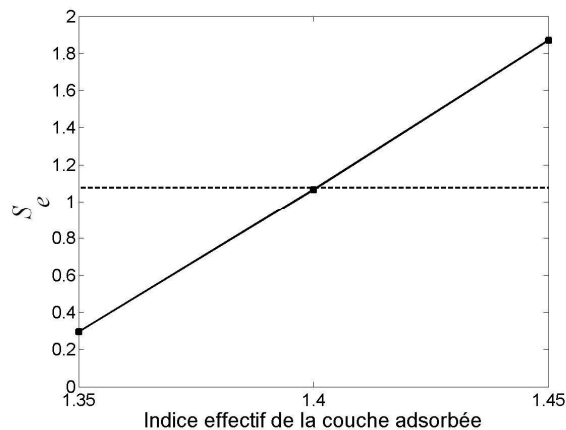


Figure 5.12 : Sensibilité à l'épaisseur moyenne en fonction de l'indice effectif de la couche adsorbée.

Plus la différence entre les indices de la couche adsorbée et du milieu extérieur sera importante, plus le décalage en longueur d'onde sera marqué (**Figure 5.12**). L'évolution de S_e en fonction de l'indice effectif de la couche adsorbée est linéaire par rapport à l'indice effectif de la couche adsorbée. L'augmentation de l'indice de la couche adsorbée, dans la gamme d'épaisseur étudiée ici, perturbe légèrement S_λ^ψ : la variation peut être considérée comme négligeable sur la gamme d'indice et d'épaisseur étudiée (**Figure 5.13 A**). Bien que plus importante pour S_λ^Δ , cette variation reste peu significative au regard de l'influence de l'angle d'incidence et de l'épaisseur d'or (**Figure 5.13 B**).

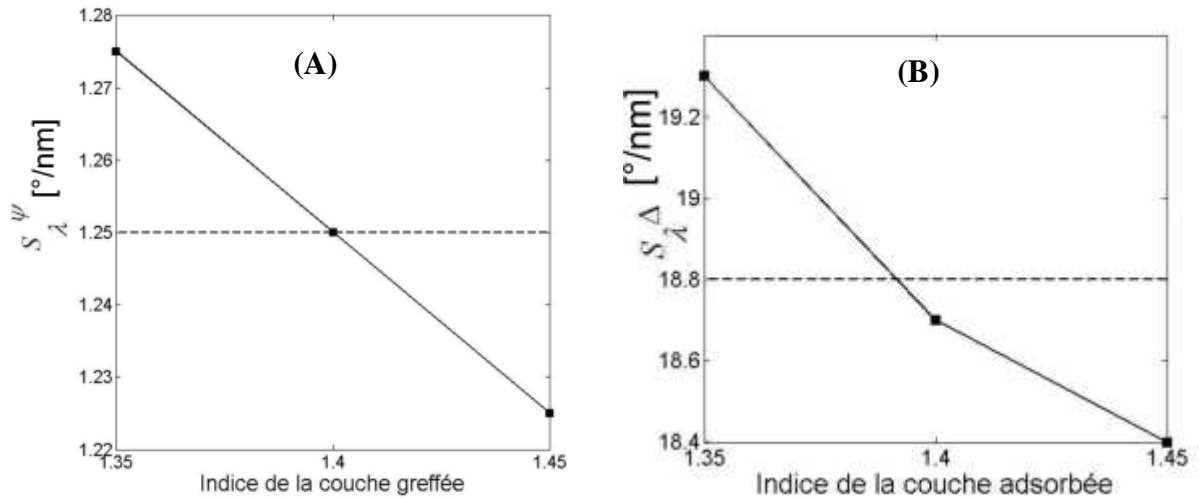


Figure 5.13 : Sensibilités spectroscopiques moyennes en fonction de l'indice effectif de la couche adsorbée, pour ψ (A) et Δ (B).

Intéressons-nous maintenant à la variation des angles ψ et Δ à longueur d'onde fixe, au cours de l'adsorption d'une couche supplémentaire. Le processus d'adsorption d'une couche en surface est modélisable sous la forme d'une couche d'épaisseur fixe et d'indice croissant. La **Figure 5.14** illustre les variations des angles ellipsométriques à la longueur d'onde où la valeur de S_{λ}^{ψ} est maximale, dans le cas d'une étude en ψ , ou de S_{λ}^{Δ} , pour le suivi de Δ , lors de l'adsorption d'une couche de 2, 5 et 10 nm.

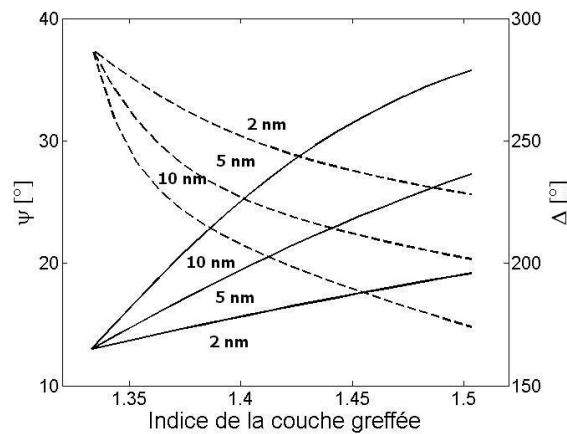


Figure 5.14 : Evolution de ψ et Δ à longueur d'onde fixe lors de l'adsorption d'une couche d'épaisseur fixe et d'indice effectif croissant.

Si les réponses de ψ et Δ pour une épaisseur de 2 nm sont quasiment linéaires, cette linéarité n'est plus observée à mesure que l'épaisseur de la couche augmente. Ainsi, pour une couche de 5 nm d'épais, la variation de ψ avec l'indice peut encore être considérée linéaire sur toute la plage d'indice, alors que pour Δ le caractère linéaire de la réponse est acceptable jusqu'à un indice effectif d'environ 1.4. Pour une couche de 10 nm, cette approximation n'est clairement plus possible pour Δ , limitation qui, à notre connaissance, n'a pas été précisée dans la littérature.

Une étude en Δ à longueur d'onde fixe est donc réalisable lorsque la non linéarité de la réponse est négligeable, c'est-à-dire dans le cas de couches de faibles épaisseurs, inférieures à 5 nm, ou d'indices effectifs, et donc de densité de couches, faibles. En conséquence, nous avons

choisi de suivre, dans la suite de ce chapitre, les cinétiques de greffage à travers l'observation de l'angle ψ . En revanche, il apparaît clairement que le suivi de Δ lors de l'adsorption de couches répondant aux critères de linéarité présentera une sensibilité inégalable. Cette option peut être choisie dans le cas d'étude de couches déjà caractérisée, dont l'adsorption permet de rester dans la gamme linéaire de réponse.

5.3 Mise en place du dispositif expérimental

Comme il a été montré dans le **chapitre 4**, l'excitation d'un plasmon de surface d'un métal est liée à plusieurs paramètres, notamment la présence d'un prisme permettant d'atteindre les valeurs de k_x nécessaires au couplage des modes de surface. Il a donc fallu adapter la configuration de l'ellipsomètre disponible.

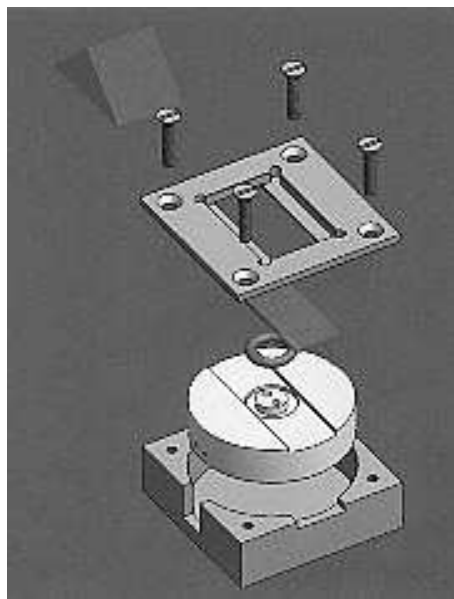


Figure 5.15 : Schéma de la cellule de mesure permettant une analyse ellipsométrique de la résonance plasmon.

Cellule de mesure

Une cellule de mesure permettant de coupler les études de la résonance des plasmons de surface avec l'ellipsométrie a été conçue au laboratoire (**Figure 5.15**). L'analyse de la lumière en face arrière de l'échantillon permet de réduire le volume de liquide à 10 μL . Les entrées et sorties de liquide sont assurées par des tubes en silicone. L'ensemble de la jupe est réalisé en Teflon de façon à assurer un environnement inerte vis-à-vis des produits biologiques. La géométrie du capot supérieur est choisie de façon à pouvoir guider et maintenir l'échantillon sur le joint torique. Les vis de serrage permettent d'assurer l'étanchéité de l'ensemble de la cellule. L'injection est réalisée par une seringue de 1 mL, montée sur un pousse seringue autorisant une étude sous flux constant (300 $\mu\text{L}/\text{min}$) ou statique. L'avantage de travailler à flux constant est de pouvoir assurer le renouvellement continu de la solution et éviter ainsi la déplétion de celle-ci des molécules étudiées. L'inconvénient majeur de cette technique est lié à l'injection de microbulles d'air qui, dans la configuration géométrique de la cellule utilisée, vont avoir tendance à s'adsorber à la surface d'or et perturber progressivement la réponse du capteur. La majorité des études a été conduite en système statique, c'est-à-dire qu'après injection, la solution dans la cellule n'est pas renouvelée.

Le prisme

La dépendance spectrale de l'indice du prisme a été mesurée par ellipsométrie (**Figure 5.16**). L'indice réel n_{prisme} évolue de 1.74 à 1.63 entre 300 et 800 nm. Sur la plage de 550 à 750 nm, gamme spectrale utile pour la résonance plasmon en liquide, l'indice réel varie de 1.647 à 1.638. Cette dépendance sera alors prise en compte lors des ajustements.

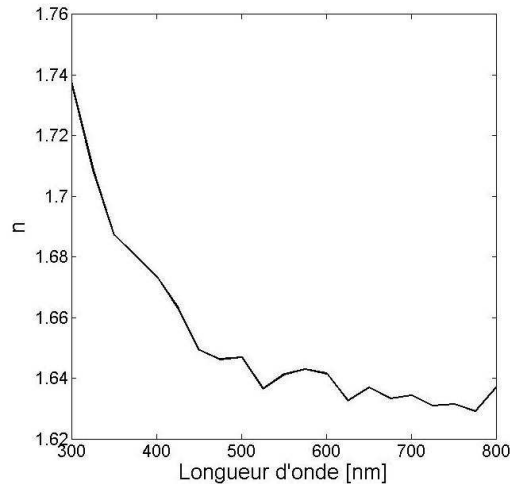


Figure 5.16 : Spectre de l'indice du prisme en SF₂ déterminé par ellipsométrie spectroscopique.

La résonance plasmon a été mise en évidence expérimentalement sur un film d'or nu avec un ellipsomètre à angle variable en collaboration avec la société Jobin Yvon. Les spectres ont été acquis tous les 0.5° sur une plage de 73.5 à 77° (**Figures 5.17 A et B**).

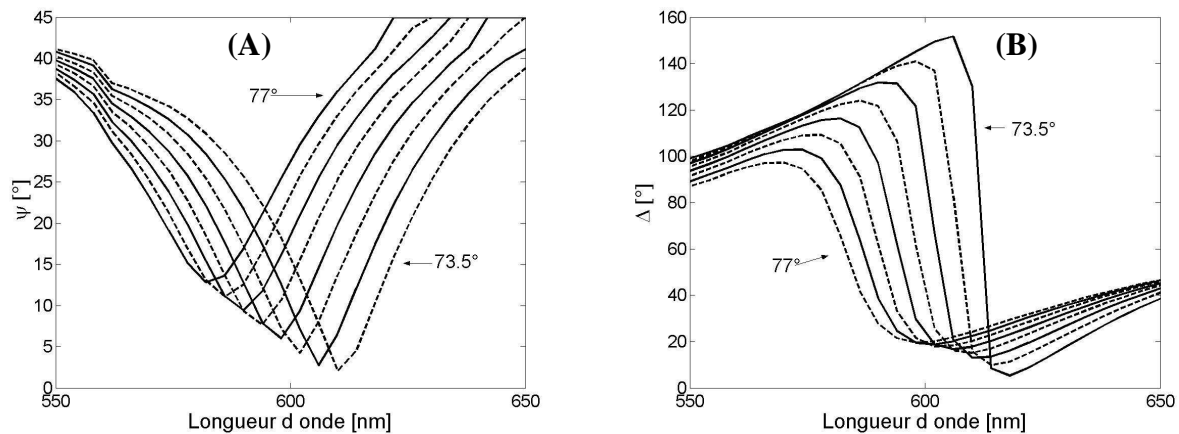


Figure 5.17 : Analyse expérimentale spectroscopique de la résonance des plasmons de surface à angle variable en ψ (A) et Δ (B).

ψ étant le rapport des réflectivités des polarisations (p) et (s), le pic ainsi formé est caractéristique de la résonance plasmon, une chute importante de ψ est observée à la longueur d'onde 602 nm. Proche de cette longueur d'onde, une diminution brutale de la phase Δ est également notée sur environ 180°.

Le pic de résonance en ψ et le décalage de phase en Δ les plus marqués correspondent à une longueur d'onde d'excitation de 610 nm et un angle d'incidence de 73.5°. Le pic glisse linéairement d'environ 10 nm en longueur d'onde pour 1° de variation d'angle d'incidence.

Divergence du faisceau

La divergence du faisceau de l'ellipsomètre employé a été déterminée expérimentalement à 0.5° . L'influence de cette divergence a été évaluée numériquement en considérant une distribution gaussienne du faisceau autour de l'angle d'incidence (**Figure 5.18**). La réponse pour chaque angle compris dans la gaussienne est ensuite calculée, ψ du faisceau divergent est obtenu en effectuant la moyenne pondérée des signaux précédents. La **Figure 5.19** regroupe le spectre de ψ d'un faisceau, divergent de 0.5° , et celui d'un faisceau collimaté.

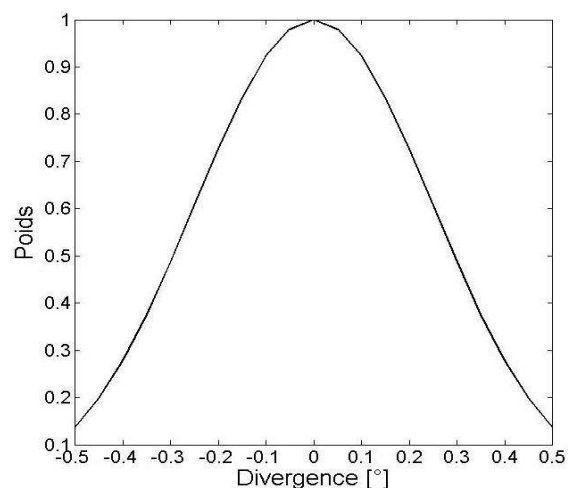


Figure 5.18 : Distribution gaussienne de la divergence du faisceau.

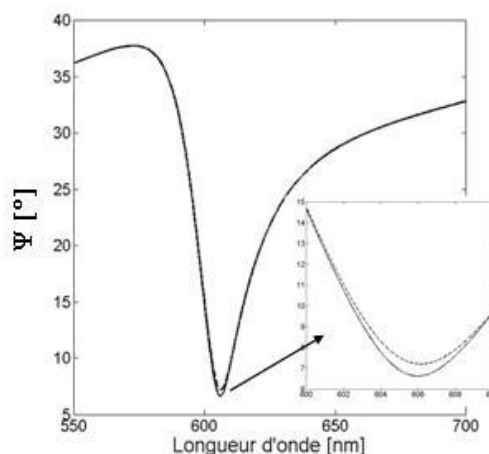


Figure 5.19 : Spectres de ψ du faisceau parfaitement collimaté (trait plein) et divergent (trait pointillé). L'encart permet de confirmer la faible influence de la divergence sur le spectre.

Cette étude montre que la divergence éventuelle du faisceau n'influe ni sur la largeur du pic, et donc sur S_λ^ψ , ni sur sa position.

Modélisation du système

Dans la suite de ce chapitre, le modèle présenté dans la **Figure 5.20** sera employé lors des ajustements. Par comparaison avec le formalisme employé pour l'ellipsométrie spectroscopique, le calcul de ψ et Δ est identique, en prenant soin de choisir comme **milieu incident le prisme** avec un faisceau ayant une incidence θ_e définie selon la nature du prisme et l'angle d'incidence θ_{ellipso} . Pour $\theta_{\text{ellipso}} = 75^\circ$ et $n_{\text{prisme}} = 1.65$, θ_e est égale à 63.62° .

Le modèle multicouche est alors organisé suivant le sens de propagation de la lumière. La **Figure 5.20** illustre la nature des couches et leur position lors de la traversée du faisceau lumineux. L'épaisseur de la lame de verre de 1 mm est très grande devant la longueur d'onde, elle peut être négligée dans le formalisme d'Abélès. L'adhérence de la lame de verre sur le prisme est assurée par un gel d'indice. L'épaisseur de la couche intermédiaire obtenue est estimée entre 50 et 100 μm , épaisseur permettant également de négliger cette couche dans les simulations. Les épaisseurs de métaux seront ajustées avant greffage et fixées par la suite.

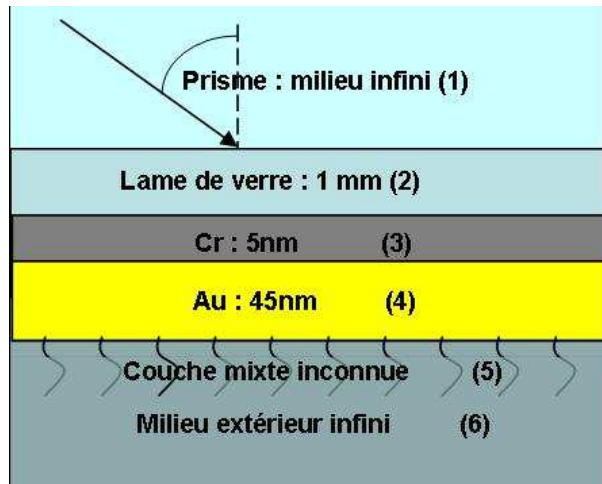


Figure 5.20 : Représentation schématique des différentes couches réelles traversées par le faisceau lumineux.

5.4 Applications à l'étude de couches polymères et biologiques.

Cette partie est consacrée à l'évaluation de la sensibilité expérimentale de la détection spectroscopique et ellipsométrique de la résonance des plasmons de surface. Nous aborderons, dans un premier temps, le cas de couches ultra-minces de polymère. L'adsorption non spécifique, dans le cas de la T3 polymérase, et spécifique, pour des monobrins d'ADN thiolés, caractérisés précédemment, seront ensuite étudiés. La polarisation de la couche métallique nous permettra d'évaluer les avantages de l'électrodéposition en terme de cinétique de greffage. Enfin, nous montrerons la sensibilité de cette technique pour deux champs d'applications différents, physico-chimique et clinique.

5.4.1 Etude d'une couche mince polymère

Afin d'évaluer la sensibilité expérimentale de ce dispositif à l'adsorption de couches nanométriques, deux films de PMMA dilués 15 fois et 6 fois respectivement, d'épaisseurs caractérisées par AFM de 6 nm et 31 nm respectivement, ont été déposés sur le substrat plasmon. Les spectres de l'échantillon témoin et des échantillons recouverts de PMMA sont ensuite acquis, sur une gamme de 550 à 750 nm. Les **Figures 5.21 A et B** sont les représentations des spectres de ψ et Δ pour le substrat seul et recouvert du film de PMMA.

La résolution spectroscopique du monochromateur de l'ellipsomètre permet d'assurer une précision de 0.1 nm sur la longueur d'onde. Un décalage de 19.7 nm de la longueur d'onde de résonance de ψ est observé avec l'ajout de la couche 6 nm de PMMA., soit, et ce pour une couche d'indice équivalent, une précision sur l'épaisseur supérieure à un Å. Remarquons également que pour une épaisseur de 31 nm de PMMA, le pic a tendance à s'élargir et sa profondeur à diminuer, ce qui implique une diminution de S_{λ}^{ψ} .

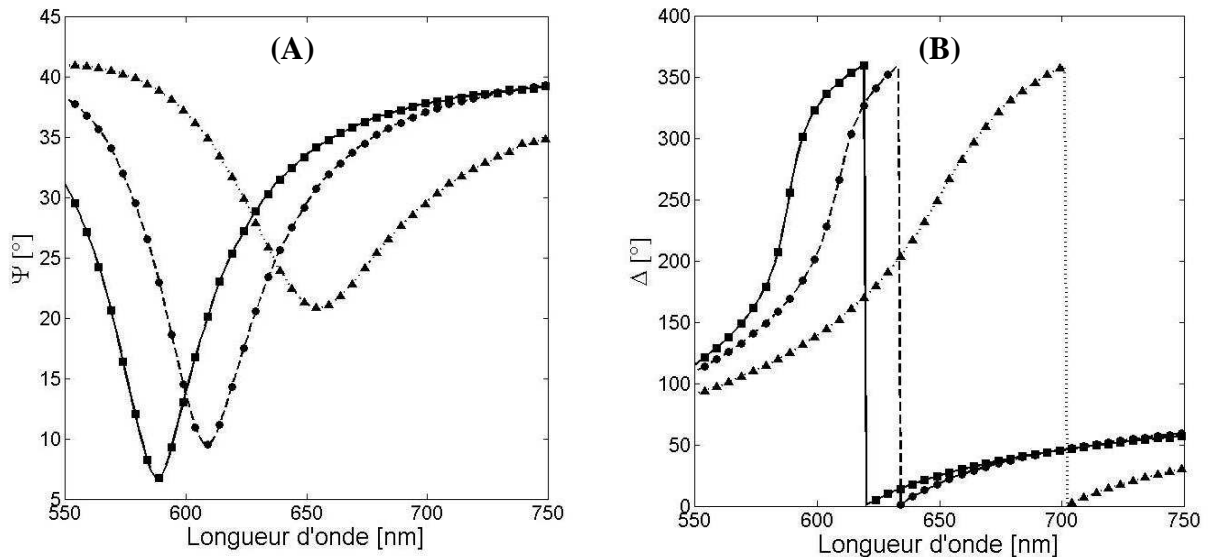


Figure 5.21 : Lecture spectroscopique de la résonance plasmon pour les échantillons témoin, PMMA de 6 nm et PMMA de 31 nm. Les points expérimentaux sont marqués par respectivement des carrés (témoin), ronds (6 nm PMMA) et triangles (31 nm) alors que les ajustements correspondants sont tracés en trait plein, grand pointillé et petit pointillé.

Ajustements des spectres

Il est nécessaire ici d'ajuster pour chaque échantillon l'épaisseur de chrome et d'or : bien qu'appartenant à la même série d'évaporation, un léger gradient d'épaisseur est observé compte tenu de la répartition des échantillons dans l'évaporateur.

D'autre part, nous avons mis en évidence, dans le **chapitre 3**, la dépendance spectrale de l'indice du PMMA, fortement influencée par l'épaisseur de la couche en dessous de 100 nm. Néanmoins, il s'avère que cette dépendance est beaucoup plus importante pour les faibles longueurs d'ondes. Sur la gamme spectrale de 550 à 750 nm, l'indice du PMMA reste constant.

L'épaisseur de PMMA est déterminée en se basant sur le modèle présenté **Figure 5.20**, elle est reportée dans le **Tableau 5.2** pour chaque échantillon.

	Epaisseur chrome [nm]	Epaisseur or [nm]	Epaisseur PMMA [nm]	χ^2
Témoin	3.2	43.3		0.215
PMMA 6 nm	3.4	44.7	6.8	0.483
PMMA 31 nm	4.1	44.3	32.4	0.326

Tableau 5.2 : Epaisseur des couches métalliques et polymères et leur χ^2 associé, déterminé par l'ajustement des spectres présentés **Figure 5.21**.

On note ici une très bonne concordance des épaisseurs mesurées par AFM et par ellipsométrie couplée à la RPS, ce qui nous permet de valider la méthode d'ajustement. La reproductibilité du système est également vérifiée : pour chaque échantillon analysé, nécessitant le démontage de la cellule et le repositionnement du prisme, les épaisseurs de métaux mesurées sont très proches.

Sensibilité

Le calcul de S_{λ}^{ψ} et S_{λ}^{Δ} expérimentales pour chaque échantillon (**Figures 5.22 A et B**) permet d'évaluer l'effet de l'épaisseur de la couche de polymère sur ces sensibilités. Si la couche de 6 nm de PMMA n'a qu'une influence très faible sur ces sensibilités (de l'ordre de 15% pour cet 25% pour S_{λ}^{Δ}), l'effet de la couche de 31 nm est très marqué. Des diminutions de 65% de S_{λ}^{ψ} et 75 % de S_{λ}^{Δ} sont mesurées. Cette observation renforce l'analyse théorique, conduite dans le paragraphe précédent, montrant la non linéarité de la réponse pour des grandes épaisseurs. En revanche, un facteur d'environ 14 est mesuré entre S_{λ}^{ψ} et S_{λ}^{Δ} , proche pour chaque échantillon.

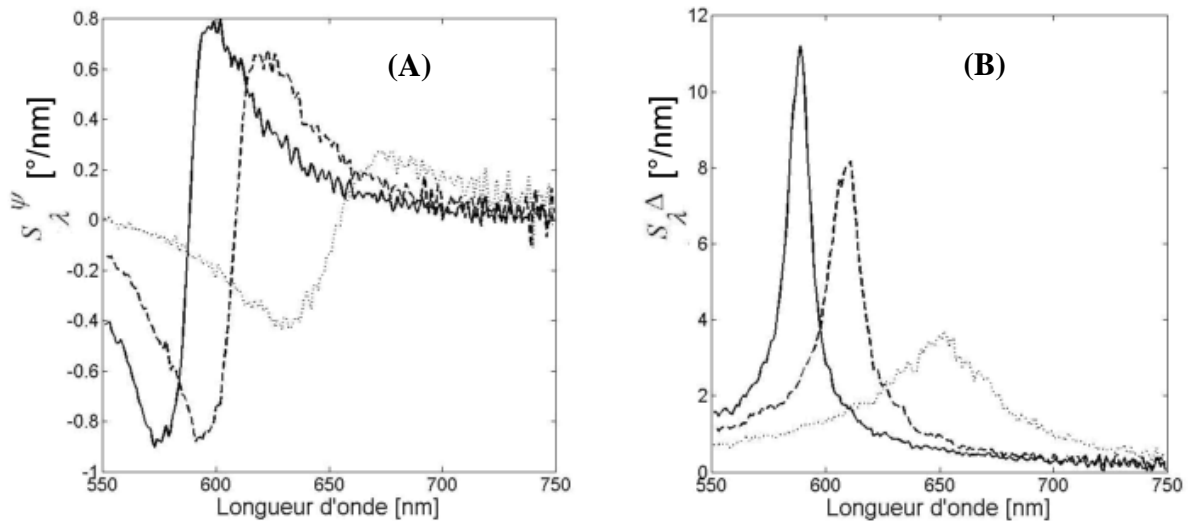


Figure 5.22 : Sensibilités S_{λ}^{ψ} (A) et S_{λ}^{Δ} (B) calculées à partir des spectres expérimentaux, présentés en Figures 5.21, de l'échantillon d'or (trait plein), recouvert de 6nm (trait grand pointillé) et 31 nm de PMMA (petit pointillé).

En soustrayant les spectres obtenus sur les échantillons recouverts de PMMA à l'échantillon témoin (**Figures 5.23 A et B**), on peut aisément visualiser la longueur d'onde où l'écart est le plus important. Ainsi, un écart de 18.2° en ψ est observé à 584 nm entre l'échantillon témoin et l'échantillon recouvert de 6 nm de PMMA. Cet écart se porte à 32.3° dans le cas de l'échantillon de PMMA de 31 nm d'épais. L'analyse de Δ est plus délicate : les variations de Δ et les décalages importants de la résonance font que l'écart entre les spectres possède un profil singulier. Néanmoins, en se restreignant à une gamme spectrale proche de la résonance plasmon du substrat nu, soit entre 550 et 630 nm, une différence maximale pour 6 nm de PMMA, respectivement 31 nm de PMMA, de 122° , respectivement 195° , est observée.

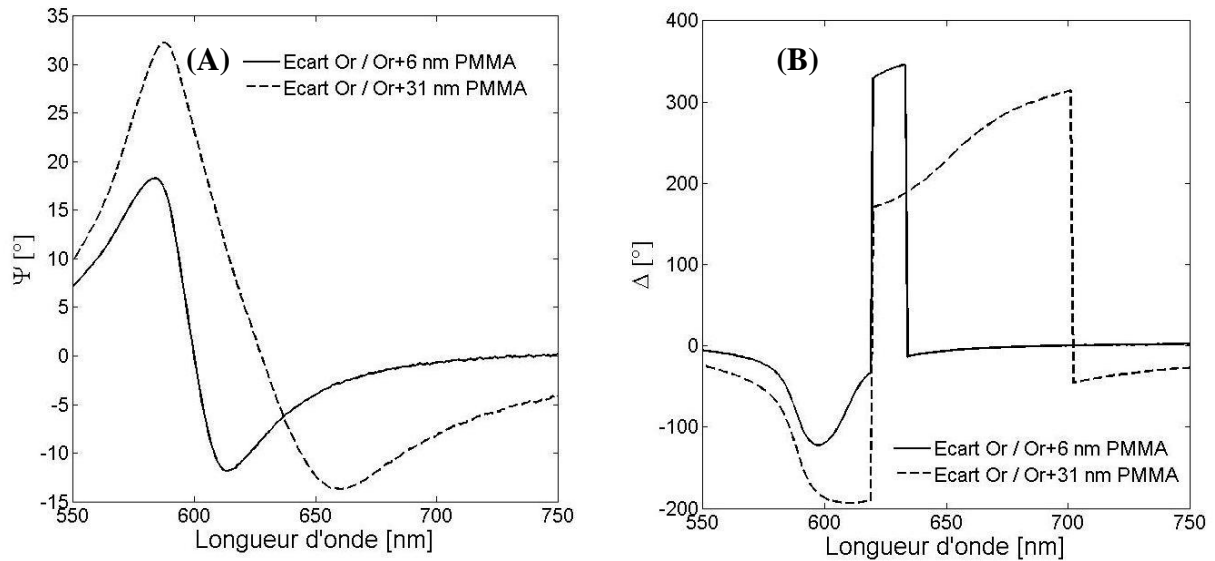


Figure 5.23 : Ecart entre les spectres de l'échantillon d'or seul et recouvert de 6 nm de PMMA (trait plein) et de 31 nm de PMMA (trait pointillé), en ψ (A) et Δ (B).

Rapport signal sur bruit

La stabilité du système, à longueur d'onde fixe, au cours du temps a été vérifiée par l'enregistrement des variations de ψ et de Δ sur une période de 20 000 secondes dans les conditions citées auparavant pour un échantillon mis au contact d'une solution (**Figure 5.24**). Le bruit mesuré sur ψ est d'une valeur de 0.2° , alors que sur Δ il est estimé à 0.5° . Ce bruit est plus important que pour une mesure spectrale ce qui s'explique par le fait de travailler à longueur d'onde fixe et sur de longues plages temporelles d'acquisition. Par ailleurs, observons la complète stabilité temporelle du système, ce qui indique d'une part qu'il n'y a pas d'interaction entre la solution tampon et l'or, et d'autre part que l'acquisition ne dérive pas au cours du temps.

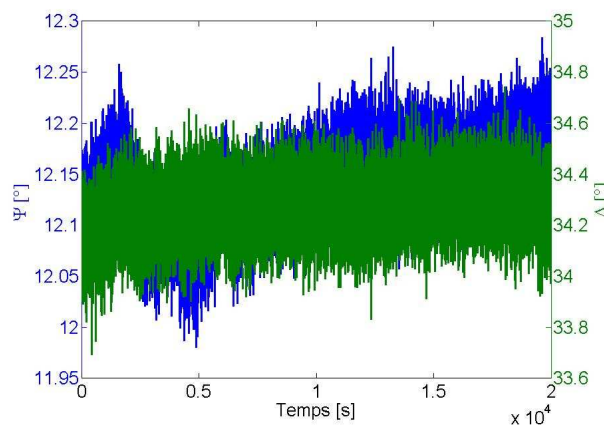


Figure 5.24 : Variation temporelle de ψ et Δ à longueur d'onde fixe.

Le **Tableau 5.3** suivant regroupe les valeurs des écarts déterminés sur la **Figure 5.23**, ainsi que le SNR pour chaque échantillon.

	Variation ψ	SNR	Variation Δ	SNR
PMMA 6 nm	18.2	91	122	244
PMMA 31nm	32.3	161	195	390

Tableau 5.3 : Ecart maximal observé en ψ et en Δ entre l'échantillon d'or seul et recouvert de PMMA. Le rapport signal sur bruit est également reporté.

La première remarque est que le rapport signal sur bruit, en ψ et en Δ , est bien supérieur à la limite de détection des capteurs, généralement admise à 2 pour la fluorescence. Notons également l'apport de la détection de la phase : à épaisseur égale le SNR est quasiment trois fois plus important en Δ qu'en ψ . En approximant linéairement la variation de signal avec l'épaisseur, et pour une couche d'indice identique, une épaisseur minimale de 0.2 Å est détectable en phase, alors qu'en ψ elle est évaluée à 0.9 Å.

Cette première étude expérimentale a montré la haute potentialité du couplage de l'ellipsométrie spectroscopique et de la résonance des plasmons de surface pour la détection et la caractérisation de couches continues ultraminces de polymères.

5.4.2 Applications biologiques

Après avoir déterminé les sensibilités expérimentales sur un film continu de PMMA, nous sommes intéressés aux couches biologiques. Contrairement aux couches polymères, les couches biologiques ne peuvent pas être considérées comme continues. L'intérêt d'étudier ces couches *in situ* est également de pouvoir suivre leur cinétique d'adsorption.

Nous décrivons dans un premier temps notre démarche expérimentale, puis nous discuterons les résultats obtenus avec des molécules de formes différentes depuis des édifices de taille moléculaire importante, comme les protéines, en passant par les molécules d'ADN sous forme de brins et enfin des petites molécules tels que les thiols. Ceci nous permettra de comparer par ailleurs les types de greffages, qu'ils soient spécifiques ou non, ou même électro-actifs.

Démarche expérimentale

Un protocole expérimental identique pour l'ensemble des molécules biologiques a été suivi. Il comporte 5 étapes :

⇒ Un premier spectre rapide avec un pas de 10 nm est tout d'abord acquis pour évaluer la valeur de la longueur d'onde caractéristique de la résonance plasmon, sur une gamme spectrale allant de 550 à 750 nm. Le spectre est alors évalué à l'aide de 21 points en moins d'une minute.

⇒ Une acquisition avec un pas de 0.1 nm permet ensuite de caractériser plus finement les paramètres du support plasmon et de déterminer la position de la résonance et la longueur d'onde $\lambda_{S_{max}}$ correspondant à S_{λ}^{ψ} maximale.

⇒ La cinétique d'absorption juste après l'introduction des molécules cibles en solution est alors étudiée en enregistrant l'évolution temporelle du signal ellipsométrique à la longueur d'onde $\lambda_{S_{max}}$, fixée avec comme résolution temporelle 1 seconde. L'ajustement de la cinétique de greffage suivant la nature des molécules greffées en surface permet d'obtenir les constantes de greffage.

⇒ A la fin du processus d'adsorption, lorsque la variation de signal devient inférieure à 10 %, la surface est alors rincée pour éliminer les molécules faiblement adsorbées à l'or. La durée d'adsorption des molécules peut atteindre 12 heures. Une taille importante de spot lumineux est préférable de manière à augmenter le flux lumineux au niveau du photodétecteur et ainsi maintenir une tension de 300 V qui reste acceptable pour la lampe Xe tout au long de cette longue période.

⇒ Un dernier spectre est enfin acquis pour quantifier le décalage du pic qui déterminera l'épaisseur et l'indice effectif de la couche greffée.

Analyse des cinétiques

De nombreux modèles, permettant d'analyser l'adsorption de molécules sur une surface, existent, tous basés sur des hypothèses quant à la nature du dépôt, c'est-à-dire monocouche ou multicouche, à l'énergie de la liaison entre le substrat et la molécule adsorbée, aux interactions entre molécules et à la diffusion des espèces. Plusieurs modèles sont donc exploitables pour étudier l'adsorption de monocouches. L'adsorption de molécules thiolées à la surface d'un métal est très souvent décrite par un modèle introduit par Langmuir [156], valable pour l'adsorption d'une monocouche, quand tous les sites d'adsorption sont équivalents, et que l'adsorption sur un site est indépendante des autres sites, c'est-à-dire que les molécules n'interagissent pas entre elles. Il est décrit par :

$$S(t) = C \left(1 - \exp \left(- \left(\frac{t}{k_D} \right)^\gamma \right) \right) \quad (5.5)$$

où S est la réponse du capteur, C est une constante qui reflète la réponse de la couche saturée, t le temps [s], k_D [s] est la constante de temps correspondant au temps mis pour obtenir 63 % de C , γ est un exposant qui rend compte de l'effet de la déplétion de la solution et des dimensions de la molécule.

L'adsorption de molécules uniquement gouvernée par la diffusion peut être décrite par la même équation, avec $\gamma = 1/2$ [157,158]. D'après [159], un coefficient γ de $1/4$ est synonyme de l'adsorption d'ensembles moléculaires volumineux et complexes, l'encombrement stérique des molécules limite alors l'accès aux sites d'adsorption et diminue la vitesse de réaction. Un modèle de diffusion non limité du second ordre a également été utilisé [14,82,158], défini par :

$$S(t) = C \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{t}{k_s}} \right) \quad (5.6)$$

Concernant l'adsorption de molécules thiolées, de nombreuses publications s'opposent sur les modèles à employer ainsi que sur les mécanismes d'adsorption présents [160-164]. Nous nous appuyerons donc sur chacun de ces modèles pour l'ajustement des courbes expérimentales obtenues et déterminerons ainsi le modèle le plus adapté.

5.4.2.1 Greffage non spécifique : cas de la T3 ARN Polymérase

Il a été montré dans le **chapitre 2** que la protéine T3 polymérase interagissait avec l'or de façon à former une monocouche à la surface du métal. Pour déterminer la cinétique d'absorption et la densité de greffage de la protéine, une solution de T3 ARN polymérase, concentrée à 5.10^{-6} M dans du tampon a été mise au contact de la surface d'or. La cinétique d'adsorption de la protéine sur la surface et le spectre de ψ , avant et après greffage, sont présentés dans les **Figures 5.25 A et B**.

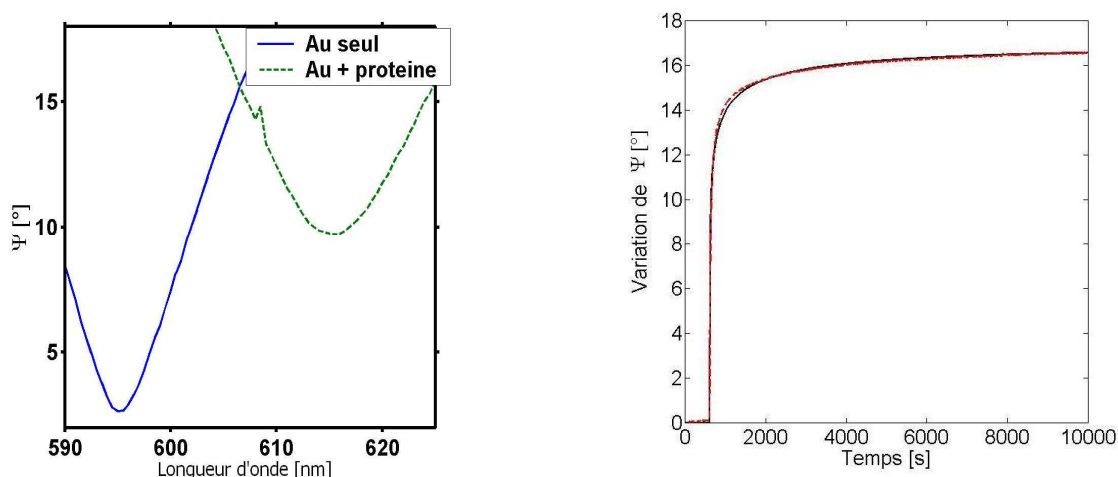


Figure 5.25 : (A) Spectre de ψ avant greffage (trait plein) et après adsorption de la protéine T3 (trait pointillé). (B) Cinétique de l'interaction T3 RNA polymérase – or (expérimental en rouge – ajustement en trait pointillé).

Analyse des spectres

La résonance plasmon pour la surface d'or au contact de la solution tampon excitée à 595.4 nm est décalée vers le rouge de 20.3 nm après exposition à la solution contenant la protéine puis rinçage. Nous verrons dans le paragraphe suivant que plusieurs méthodes d'ajustement peuvent être utilisées pour déterminer l'épaisseur et l'indice de couches biologiques discontinues. L'hypothèse d'une couche continue et d'indice optique invariant selon la longueur d'onde d'excitation est émise. La continuité de la couche a été montrée par AFM, nous permettant d'approximer la rugosité de la couche comme incluse dans une couche d'indice effectif moindre. L'incertitude sur l'épaisseur exacte de la protéine et la connaissance relative de son indice font que seul un ajustement de l'épaisseur en fixant l'indice de la couche, souvent considéré égale à 1.5 pour les protéines, est ici employé (**Tableau 5.4**)

Indice effectif	Epaisseur [nm]	Fraction volumique [%]	χ^2
1.49	8.7	94	1.276
1.48	9.2	88	1.114
1.45	11.5	70	0.786
1.42	15.45	53	0.986

Tableau 5.4 : Epaisseurs de la couche protéique déterminées par un ajustement avec un indice de réfraction constant.

Le meilleur χ^2 est obtenu pour un indice effectif de 1.45, soit une fraction volumique de 70 %, et une épaisseur de 11.5 nm, correspondant à une valeur moyenne des épaisseurs extrêmes déterminées par AFM en fin d'expérience. Le résultat obtenu est donc cohérent avec l'épaisseur déterminée par AFM. Il est cependant délicat d'annoncer précisément une épaisseur de la couche protéique.

Analyse de la cinétique d'adsorption

La variation de ψ (en rouge sur la **Figure 5.25 B**) a été enregistrée au cours du temps en se plaçant à une longueur d'onde de 593 nm. Dans la première partie du spectre, t compris entre 0 et 600 secondes, l'or est au contact de solution tampon : le signal ψ ne varie pas. L'injection de la solution contenant la protéine a été effectuée après 600 secondes. Une augmentation brutale de ψ est observée au cours des premières secondes suivant l'injection, synonyme d'une adsorption à la surface de l'or. Un plateau est atteint après 5 000 secondes, la variation de ψ atteint alors une valeur de 16.5° . Ce plateau caractéristique correspond à une saturation des sites accessibles à la protéine. Le rinçage de la cellule par la solution tampon initiale ne montrant aucune variation de ψ vérifie l'hypothèse d'une liaison forte entre la protéine et l'or.

Les valeurs de k_D , calculées pour γ compris entre $\frac{1}{4}$ et 1, sont reportées dans le **Tableau 5.5**.

γ	C [°]	k_D [s]	R^2
1	16.4	76.3	0.46
$\frac{1}{2}$	16.84	98.1	0.78
$\frac{1}{4}$	17.27	41.5	0.98

Tableau 5.5 : Constantes de vitesse associées aux différents modèles de Langmuir pour l'ajustement de l'adsorption de la T3 sur la surface d'or.

Dans le cas de la protéine T3 polymérase, nous vérifions expérimentalement que $\gamma = \frac{1}{4}$ permet un ajustement plus précis de la cinétique d'adsorption. Cette valeur faible de γ est synonyme de l'adsorption en surface de molécules d'encombrement stérique important, ce qui est compatible avec les propriétés géométriques de la protéine. La courbe résultante est superposée en rouge dans la **Figure 5.25B**.

5.4.2.2 Greffage spécifique : adsorption passive de monobrins thiolés d'ADN

Par comparaison avec une adsorption non spécifique, l'adsorption de monobrins d'ADN thiolés, possédant une affinité forte avec la couche d'or, a ensuite été étudiée. L'objectif est ici de déterminer la méthode de mesure optique de l'épaisseur et l'indice du film d'ADN. Les trois longueurs de brins dont les épaisseurs de film ont été caractérisées en AFM servent alors d'échantillons modèles.

Analyse des spectres

La **Figure 5.26** illustre un exemple des spectres obtenus avant (carrés noirs) et après l'incubation (carrés blancs) de monobrins d'ADN 25 bases thiolés à une concentration d'ADN en

solution de 10^{-6} M. Que ce soit en ψ ou Δ , un glissement spectral net du pic de résonance est observé et répertorié pour chaque nature de monobrins (**Tableau 5.6**).

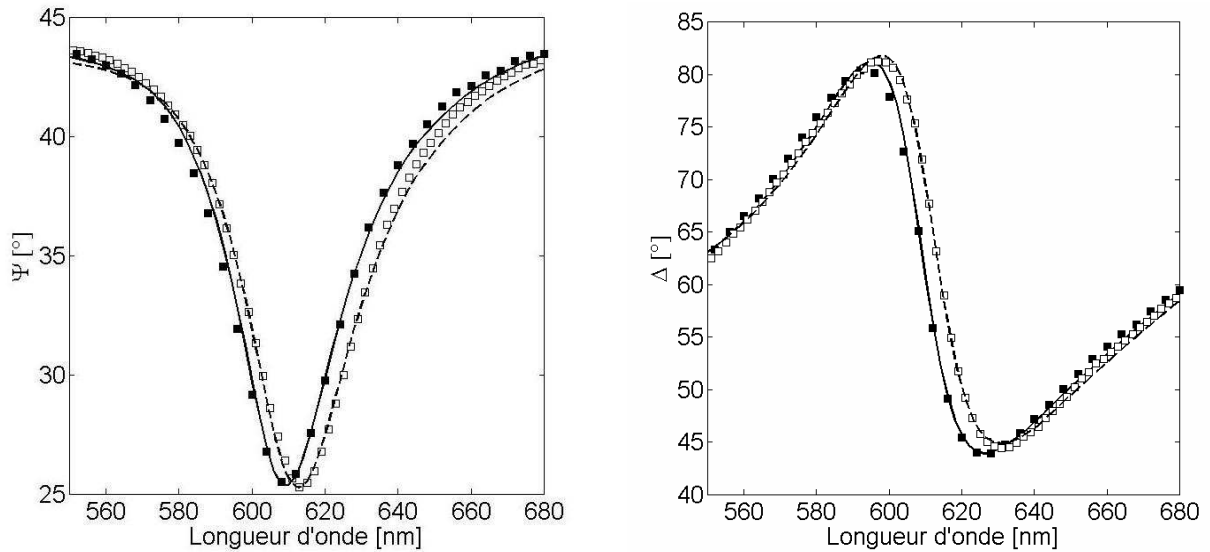


Figure 5.26 : Spectres avant (carrés noirs) et après greffage (carrés blancs) de monobrins d'ADN de 25 bases. Les ajustements sont reportés respectivement en trait plein et pointillé.

Le premier ajustement, en trait plein sur la **Figure 5.26**, est réalisé sur le spectre avant greffage. Il nous permet de fixer les épaisseurs des métaux et définit ainsi la référence invariante du système. Celles-ci ne seront donc pas ajustées après greffage. La dépendance spectrale de l'indice de l'ADN, comme nous l'avons montré dans le **chapitre 3**, n'est vraie que pour $\lambda < 500$ nm. Plusieurs modèles d'ajustement, présentés dans la **Figure 3.23** du chapitre 3, ont été employés, en considérant cette fois ci l'indice de l'ADN invariant suivant la longueur d'onde, les spectres étant acquis sur une gamme spectrale supérieure à 550 nm. Les ajustements par les modèles ① et ② sont regroupés dans le **Tableau 5.6A** suivant :

Nombre de bases	Décalage du pic (nm)	Épaisseur AFM (nm)	Modèle ①			Modèle ②			
			e (nm)	n	χ^2	e (nm)	n	k	χ^2
15	3.1	3.4	9.32	1.3802	0.40971	9.04	1.3941	0.0044	0.0718
			± 0.70	± 0.027		± 0.214	± 0.011	± 0.005	
25	4.5	5.8	3.72	1.4352	0.01763	3.28	1.4217	0.17 ± 0.023	0.10987
			± 0.47	± 0.0512		± 0.19	± 0.0058		
35	5.8	10.5				3.46	1.3415	0.1825 ± 0.012	0.2862
						± 0.28	± 0.17		

Tableau 5.6A : Décalage des pics de résonances plasmons, et ajustements de l'épaisseur e et des indices de réfractions complexe n et k , en fonction de la nature des oligonucléotides greffés en surface.

Le modèle ①, basé sur la détermination conjointe de l'épaisseur et de l'indice réel n de la couche biologique, n'est clairement pas valide. L'épaisseur est largement surestimée (**Tableau 5.6A**) par rapport à l'épaisseur AFM dans le cas du film de monobrins de 15 bases, alors qu'elle est sous-estimée pour les monobrins de 25 et 35 bases. La prise en compte de la diffusion, liée à la rugosité du film, au travers de k , permet dans le modèle ② d'améliorer sensiblement

l'ajustement mais les épaisseurs déterminées sont, une nouvelle fois, en désaccord avec la mesure AFM.

Le fait de fixer l'épaisseur mesurée par AFM au film d'ADN (modèle ③, **Tableau 5.6B**) d'obtenir la valeur de l'indice effectif de la couche. La partie réelle n de l'indice effectif de réfraction tend à diminuer à mesure que le nombre de bases augmente. La partie imaginaire k reste quasiment constante en fonction de la nature du monobrin : les pertes dues à la diffusion sont similaires quel que soit la nature du film déposé, ce qui implique une structuration de la couche semblable.

Les deux derniers modèles utilisés rendent compte de l'agencement physique de la couche, l'un par une structuration de la couche via un modèle de Bruggeman (modèle ④, **Tableau 5.6B**) évaluant la fraction volumique entre l'indice de l'ADN et le milieu extérieur, l'autre basé sur une variation de l'indice effectif de la couche suivant un gradient linéaire (modèle ⑤, **Tableau 5.6B**) entre l'indice de l'ADN et celui du milieu extérieur, suivant une direction perpendiculaire à l'interface.

Le modèle ④ permet d'obtenir des valeurs d'indices réels de l'ADN proches de la valeur de l'ADN cristallisé. La variation de la fraction volumique mesurée, décroissante plus le nombre de bases est important, peut s'expliquer par les répulsions électrostatiques entre les brins d'ADN qui sont d'autant plus importantes que le nombre de bases est grand. Les valeurs de k , proche de 0.02, ne semblent pas dépendre de la nature de la couche.

Nb. bases	e AFM (nm)	Modèle ③			Modèle ④				Modèle ⑤			
		n	k	χ^2	n	k	f	χ^2	e	n	k	χ^2
15	3.4	1.412	0.017	0.07201	1.481	0.023	62.15	0.07021	3.94	1.4602	0.012	0.07217
		\pm 0.002	\pm 0.002		\pm 0.002	\pm 2.8	\pm 0.58		\pm 0.002	\pm 0.002		
25	5.8	1.399	0.0053	0.10419	1.482	0.017	49.11	0.10328	5.07	1.47872	0.024	0.10447
		\pm 0.005	\pm 0.005		\pm 0.004	\pm 0.003	\pm 3.22		\pm 0.35	\pm 0.0054	\pm 0.003	
35	10.5	1.372	0.016	0.12609	1.461	0.021	36.41	0.11987	9.85	1.4604	0.031	0.15673
		\pm 0.002	\pm 0.002		\pm 0.006	\pm 0.004	\pm 3.26		\pm 0.52	\pm 0.007	\pm 0.003	

Tableau 5.6B : Epaisseurs e , indices optiques n et k , et fraction volumique f des films d'ADN ajustés par les modèles ③, ④ et ⑤.

Le modèle ⑤ permet de déterminer des épaisseurs proches de celles mesurées par AFM, néanmoins légèrement inférieures. En ce sens, on peut considérer que ce modèle est le plus fiable si l'épaisseur exacte de la couche est inconnue. Le choix d'un gradient linéaire est justifié pour des fractions volumiques variant faiblement autour de 50 %, ce qui a été démontré grâce au modèle ④. Notons la cohérence des indices des films d'ADN déterminés par le modèle ④ et ⑤. Il est nécessaire d'introduire un indice complexe, représentant la perte d'énergie due à la morphologie du dépôt.

Analyse des cinétiques d'adsorption

L'étude des cinétiques de greffage a également été réalisée : la **Figure 5.27** représente l'évolution de la variation de ψ au cours du temps pour les trois types de monobrins utilisés. Les variations observées s'étalent sur une période de 20 000 secondes.

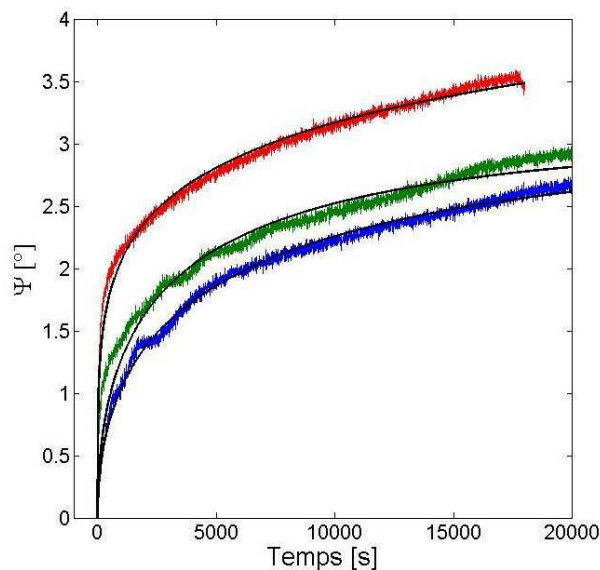


Figure 5.27 : Cinétique d'adsorption des monobrin de 15 (en bleu), 25 (en vert) et 35 bases (rouge). Les ajustements correspondants sont portés en noir.

Pour chaque cinétique, les valeurs de k_D et k_s , et le coefficient de corrélation associé à l'ajustement correspondant, sont centralisés dans le **Tableau 5.7**.

Si les modèles de Langmuir simple, $\gamma = 1$, et de diffusion non limitée du second ordre ne permettent pas d'obtenir un ajustement correct, on observe une compétition entre les deux autres modèles. Ainsi, la cinétique d'adsorption des monobrin de 15 bases est modélisable avec $\gamma = 1/2$, alors que l'ajustement de la cinétique des monobrin de 35 bases est plus proche de $\gamma = 1/4$. La cinétique associée aux monobrin de 25 bases se comporte de façon intermédiaire, c'est-à-dire que ni l'un ni l'autre des modèles n'ajuste parfaitement la cinétique. Cette évolution de γ est à relier avec l'encombrement stérique des molécules, qui augmente avec le nombre de bases.

	$\gamma=1$		$\gamma=1/2$		$\gamma=1/4$		Diffusion non limitée	
	k_D [s]	R^2	k_D [s]	R^2	k_D [s]	R^2	k_s [s]	R^2
15 bases	3 201	0.88	6 061	0.99	84 746	0.91	2 232	0.955
25 bases	2 314	0.72	3 571	0.96	45 249	0.95	1 506	0.8685
35 bases	1 209	0.50	1 589	0.88	31 949	0.9839	7 462	0.7547

Tableau 5.7 : Constantes de vitesses en fonction du modèle de cinétique utilisé et de la nature du monobrin.

Le milieu extérieur joue également un rôle dans la conformation des monobrin greffés en surface. Des répulsions électrostatiques existent entre le substrat et le squelette chargé des brins d'ADN. La concentration des ions Na^+ et Cl^- de la solution tampon a été variée depuis 50 mM jusqu'à 150 mM, concentration à laquelle toutes les mesures *in situ* ont été effectuées. Pour une analyse spectrale statique d'une couche d'ADN 15 bases, c'est-à-dire réalisée après une attente de 30 minutes entre chaque injection de la solution tampon à différentes concentrations salines et l'acquisition du spectre, un décalage de la position de la résonance de Ψ est observé. Les spectres associés sont représentés en **Figure 5.28**. Le glissement spectral de 1.2 nm entre la

position du pic pour une couche d'ADN 15 bases dans un milieu contenant 50 mM de NaCl (en vert) et 150 mM de NaCl (en rouge) montre que la concentration en sel influe très nettement sur la conformation en surface des monobrans et qu'une mesure n'est donc valable que dans des conditions de force ionique bien déterminées.

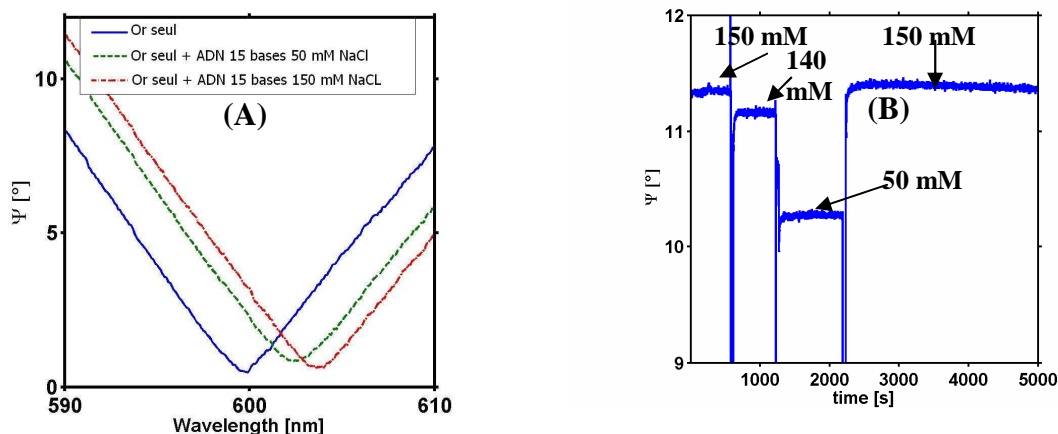


Figure 5.28 : Variation de la position de la résonance en fonction de la concentration en sel pour une couche de monobrans de 25 bases (A) ; cinétiques associées (B).

La **Figure 5.28** permet de vérifier la réversibilité très rapide de ce phénomène. A longueur d'onde fixe, Ψ revient à sa valeur initiale après injection de la solution tampon de concentration initiale : les variations de Ψ ne sont donc pas dues à une adsorption supplémentaire sur la couche d'or. Enfin notons qu'aucune variation significative de Ψ n'a été observée pour les mêmes variations de salinité sur une couche d'or seule.

Le décalage du pic plasmon peut s'expliquer par une variation de l'épaisseur et de l'indice effectif de la couche greffée. L'abaissement de la force ionique de la solution entraîne une diminution des répulsions électrostatiques substrat/ADN et donc une diminution d'épaisseur, or le nombre de brins étant constant en surface, ceci se traduit par une augmentation de l'indice effectif [165].

Une solution plus faiblement concentrée en sel est donc responsable d'un affaissement de la structure moléculaire. La concentration en sel va gouverner l'accessibilité des sites de reconnaissance lors de l'hybridation.

5.4.2.3 Greffage spécifique : adsorption électroactive de chaînes thiolées.

Nous avons cherché une technique permettant d'accélérer le greffage des molécules en surface et assurant un greffage sélectif. L'emploi d'un substrat métallisé, et donc conducteur, qui est également le support d'un plasmon de surface, a été mis à profit en appliquant un potentiel électrique. En effet, il a été montré [166,167] que l'application d'un potentiel électrique à la couche métallique servant à l'accroche des molécules étudiées accélère grandement la cinétique d'adsorption. Dans notre cas, les terminaisons soufrées des groupements thiols sont polarisées négativement en solution : les molécules vont donc être attirées par une interface chargée positivement. Cette technique, appelée électrodéposition, permet une adsorption complète en moins de 15 minutes. L'application d'un potentiel négatif permet au contraire de désorber les thiols. La valeur du potentiel appliqué dépend du type de thiols adsorbés ainsi que des propriétés de la surface. La plage maximale de stabilité des monocouches auto-assemblées est comprise entre 200 et 500 mV [166] (**Figure 5.29**). Un potentiel de 500 mV est donc appliqué sur le

substrat jusqu'à l'obtention, dans la réponse en ψ , d'un plateau caractéristique d'une adsorption complète de la couche.

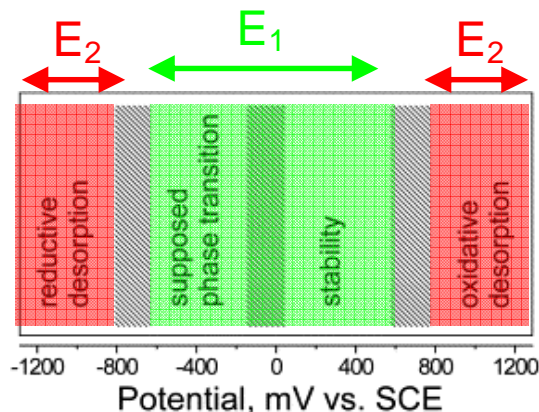


Figure 5.29 : Plage de stabilité des monocouches auto-assemblées.

Expérimentalement, deux aires en or, d'une épaisseur compatible avec l'excitation du plasmon et électriquement isolées, servent d'électrodes de référence et de travail (Figure 5.30). La rampe de potentiel électrique est appliquée à l'échantillon grâce à une potentiostat EG&G 283, qui autorise également la mesure du courant. En déplaçant le faisceau d'une zone à l'autre, il est possible de sonder l'adsorption de thiols électroactive sur l'électrode de travail et vérifier sur l'électrode de référence polarisée soit négativement, l'or reste alors nu, soit à la masse, permettant une adsorption passive. Le signal différentiel détecté est donc lié au greffage électroactif des molécules.

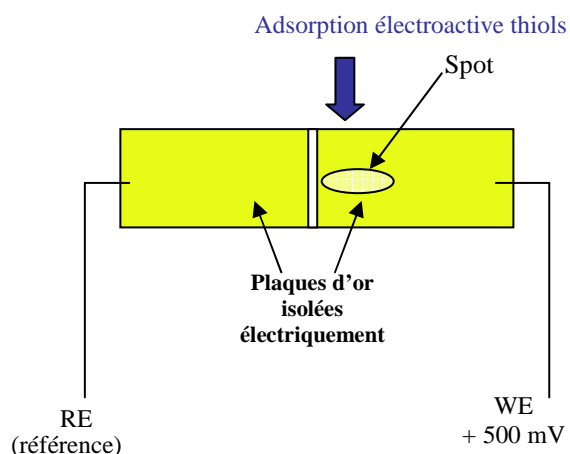


Figure 5.30 : Schéma de principe du dépôt électroactif de monocouches auto-assemblées.

Trois chaînes n-alkanethiolates, avec un nombre de carbones compris entre 3 et 18 (Tableau 5.8), ont été utilisées pour cette étude, effectuée en collaboration avec R. Meunier-Prest et S. Raveau du Laboratoire de Synthèse et d'Electrosynthèse Organométalliques (LSEO) de l'Université de Bourgogne. Les valeurs d'indices optiques des couches auto-assemblées sont disponibles dans la littérature ; ces indices sont compris entre 1.4 et 1.5 [12]. D'autre part, les épaisseurs des monocouches auto assemblées de thiols, adsorbées passivement, ont également été évaluées par ellipsométrie [168]. Ces valeurs sont reportées dans le Tableau 5.8.

Nombre de carbone	Formule	Nom	Épaisseur théorique [nm] [168]
3 (C ₃)	HSCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	acide 3-mercaptopropionique	0.9
11 (C ₁₁)	HS(CH ₂) ₁₀ CO ₂ H	acide 11-mercaptoundecanoïque	1.7
18 (C ₁₈)	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ SH	Octadecanethiol	2.5

Tableau 5.8 : Nomenclature et épaisseurs théoriques de 3 chaînes n-alkanethiolates utilisées.

Très peu solubles dans l'eau, du fait du caractère hydrophobe des chaînes carbonées, les thiols ont été dissous dans une solution composée à 50 % de tampon et 50 % d'éthanol pur. Un exemple de spectre obtenu avant et après greffage, dans le cas de C₁₈ à 5.10⁻⁴ M, est présenté dans la **Figure 5.31**.

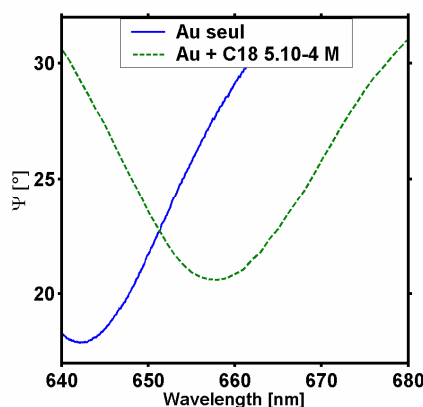


Figure 5.31 : Variation de la position de la résonance plasmon, visualisée en ψ , pour le greffage électroactif de C₁₈ concentré à 5.10⁻⁴ M dans une solution 50% Tampon / 50 % éthanol pur.

Comparaison des épaisseurs obtenues entre un dépôt passif et électroactif

En premier lieu, nous pouvons comparer les décalages des pics de résonance en fonction de la nature des thiols (**Tableau 5.9**).

Concentration [M]	C ₃		C ₁₁		C ₁₈	
	λ [nm]	e [nm]	λ [nm]	e [nm]	λ [nm]	e [nm]
5.10 ⁻⁵			5	3.8		
10 ⁻⁴	2.8	2.1	6.6	5.0	17.6	13.4
3.10 ⁻⁴	2.8	2.1	4	3.1	19	14.4
5.10 ⁻⁴	3	2.3			15.6	11.9

Tableau 5.9 : Décalage de la résonance et épaisseur de la couche greffée en fonction de la concentration et de la nature de la chaîne.

Les décalages observés sont naturellement dépendants de la composition de la couche : un nombre croissant de carbones s'accompagne d'un décalage plus important. La concentration ne semble pas avoir de relation avec le décalage. On observe cependant que la dispersion des glissements en longueur d'onde augmente avec la longueur des chaînes.

Les spectres obtenus avant et après greffage permettent de déterminer l'épaisseur et la fraction volumique de la couche adsorbée. Le **Tableau 5.9** présente pour chaque thiol et pour

chaque concentration, l'épaisseur e de la couche complète ajustée pour un indice n_{Thiol} , que nous fixons à 1.5, et une fraction volumique de 1.

On observe ici une différence flagrante entre les deux modes de greffage : les dépôts passifs sont bien moins épais (**Tableau 5.8**), ce qui laisse envisager la formation de multicouches de thiols en greffage électroactif. Celle-ci a été observée et caractérisée en 1993 par Kim et al. [161,169], après plusieurs dizaines d'heures de greffage passif et semble accentuée par l'oxydation de l'or [170]. On suppose également que la polarisation de l'échantillon accélère l'oxydation de la surface.

Par ailleurs, la formation de multicouches semble favorisée pour des chaînes longues. Ainsi, si l'on se réfère aux épaisseurs théoriques, 3 couches sont ainsi déposées lors de l'adsorption du C_3 pour près de 5 couches pour le C_{18} .

Cinétiques d'adsorption

Un exemple de cinétique pour les 3 types thiols, à une concentration de 10^{-4} M, est représenté dans la **Figure 5.32**. Contrairement à l'adsorption des monobrins d'ADN, un ajustement par une isotherme de Langmuir n'a pas de sens physique du fait de la formation de multicouches.

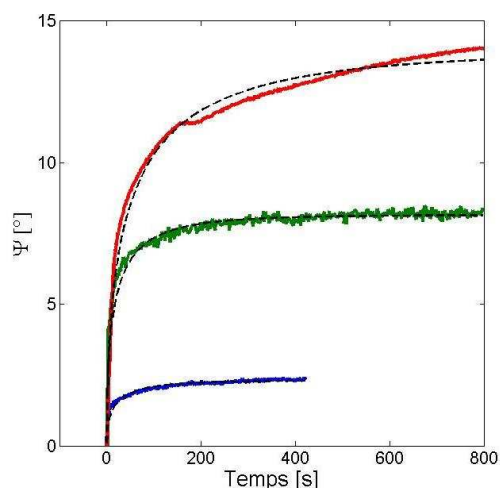


Figure 5.32 : Cinétiques d'adsorption de thiols, C_3 (bleu), C_{11} (vert), C_{18} (rouge), à 10^{-4} M, obtenues par électrodéposition. Les ajustements sont représentés en trait pointillé.

Néanmoins, un ajustement par un modèle de Langmuir du second ordre de diffusion non limité (en trait pointillé sur la **Figure 5.32**) permet de décrire précisément les cinétiques, nous autorisant à comparer les constantes de temps obtenues pour chaque type de thiols et concentrations (**Tableau 5.10**).

Concentration [M]	C3 k_D [s]	C11 k_D [s]	C18 k_D [s]
$5 \cdot 10^{-5}$		37.1	
10^{-4}	18.9	44.2	99.8
$3 \cdot 10^{-4}$	22.9	87.5	177.7
$5 \cdot 10^{-4}$	3.9		278.7

Tableau 5.10 : Constante de temps dans le cas d'un modèle de Langmuir du second ordre de diffusion non limité en fonction de la concentration et de la nature de chaînes.

Intéressons nous en premier lieu à l'évolution de ces constantes en fonction de la longueur des chaînes. Il apparaît clairement que celles-ci augmentent à mesure que la longueur de la chaîne augmente, en accord avec [158]. Cette augmentation s'explique par l'effet d'encombrement stérique : plus le volume occupé par les molécules est important moins les sites de l'or sont accessibles.

La variation de k_D avec la concentration est nettement moins marquée. Ces résultats rejoignent les observations effectuées par Peterlinz et al. montrant que, pour un greffage de chaînes thiolées sans électrodéposition, les constantes cinétiques restent constantes pour des concentrations supérieures à 10 mM

Enfin, si l'on compare les valeurs obtenues pour un dépôt électroactif et passif [158], sans tenir compte du caractère multicouches dû à l'électrodéposition, et à concentration égale, une augmentation de l'ordre de 30% des constantes cinétiques est notable, ce qui assure une vitesse de greffage plus importante lorsque l'échantillon est polarisé.

5.4.3 Interaction moléculaire anticorps / antigène

A titre d'exemple d'application, nous présentons ici la méthode pour doser un anticorps basée sur l'interaction entre un peptide sonde, greffé en surface, et un anticorps. Il a été montré récemment à l'Université de Florence que les anticorps anti-myéline sont des marqueurs de la sclérose en plaque [171]. Un glycopeptide CSF 114 (**Figure 5.33**) a été synthétisé pour titrer les anticorps anti-MOG dans le sérum des patients atteints de la sclérose en plaque [172].

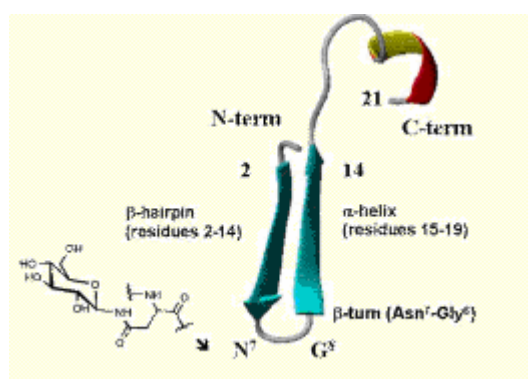


Figure 5.33 : Structure du CSF 114 (Glc).

En collaboration avec le Pr. Papini de l'Université de Florence (Italie), nous avons pu détecter l'interaction CSF 114 – anticorps. Une couche de thiols C_{18} à une concentration $2 \cdot 10^{-4} M$ avec une terminaison $-COOH$ a déjà été adsorbée de façon électrochimique sur l'or afin, d'une

part, de fixer le peptide sans interaction avec l'or et, d'autre part, de passiver la surface pour éviter les interactions non spécifiques entre les anticorps et l'or. Une liaison covalente a été formée entre les groupes $-NH_2$ libres du peptide et les terminaisons $-COOH$ des thiols C_{18} activées au préalable par l'EDAC.

Les peptides CSF 114 étant donc immobilisés sur la surface, il est possible ensuite d'étudier l'interaction avec les anticorps : une solution d'anticorps à 100 nM, isolés de sérum de patients atteints de sclérose en plaque, est injectée.

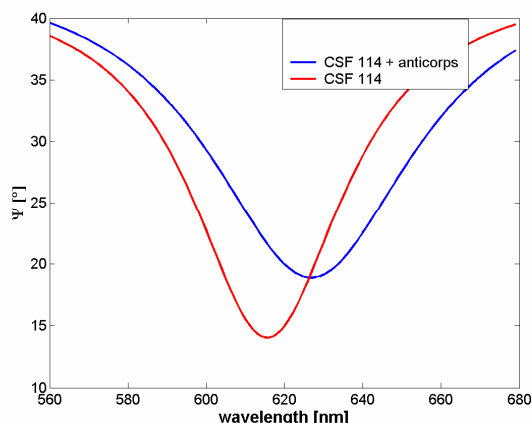


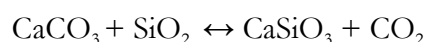
Figure 5.34 : Décalage du pic en ψ relatif à l'interaction CSF 114 – anticorps de patients atteints de sclérose en plaque. Malgré la faible concentration utilisée (100 nM), un décalage de 11 nm est mis en évidence.

Ainsi, une interaction entre le peptide CSF 114 et les anticorps anti-MOG est observée, un décalage de 11 nm de la résonance est mesuré (**Figure 5.34**). La faible concentration utilisée nous permet d'envisager l'utilisation du couplage ellipsométrie spectroscopique - RPS pour le titrage de ces anticorps. On s'attend à pouvoir détecter une concentration d'anticorps inférieure à 1 nM, concentration minimale qui est compatible avec un test clinique.

5.4.4 Application physico-chimique : transition de phase de la silice en ciment romain CSH

Il aurait été intéressant de comparer l'apport de la détection spectroscopique de la résonance des plasmons de surface pour la détermination de la transition vitreuse de la polycaprolactone. Cependant, dans la configuration actuelle, la thermalisation de la cellule ne peut être envisagée sans bouleverser totalement son design. Cette technique a alors été appliquée à l'étude de la transition de phase de la silice en ciment. Cette application a été effectuée en collaboration avec S. Pourchet du Laboratoire de Recherche sur la Réactivité des Solides (LRRS).

Le ciment romain, composé de silicates de calcium hydratés (CSH), peut être réalisé en mettant en contact une fine couche de silice avec de la chaux saturée, avec pour réaction globale :



Un film mince de SiO_2 , d'épaisseur 8 nm, est déposé sur la couche métallique par pulvérisation cathodique, en utilisant une cible de silicium et un mélange de gaz Ar/O_2 , à une vitesse de 5 nm /min.

L'indice de réfraction de la couche ainsi déposée est ensuite déterminé par ellipsométrie spectroscopique en assurant une épaisseur de 8 ± 1 nm par une mesure AFM. Les valeurs obtenues sont identiques aux valeurs données dans la littérature pour la silice massive [140]. Sur la gamme spectrale utile pour la résonance des plasmons de surface (550-650) nm, l'indice de réfraction de la couche mince de silice obtenu sera considéré comme constant à 1.458 ± 0.005 . Une mesure d'épaisseur par AFM de la couche de CSH transformée nous permet de constater que celle-ci demeure constante.

Analyse des spectres

Les **Figures 5.35** illustrent la lecture spectroscopique et ellipsométrique de la résonance plasmon avant (dans l'eau) et après la transformation de la couche de silice en CSH (dans la chaux). Un décalage de la résonance de 5 nm est ainsi détecté, dû à la fois à cette transformation mais également à la variation de l'indice du milieu extérieur, préalablement déterminé à 2 nm.

A indice fixe, une augmentation de 17 % est nécessaire pour pouvoir ajuster les courbes, ce qui s'oppose à la mesure AFM. En supposant l'épaisseur fixe, un indice de réfraction de 1.515 est déterminé.

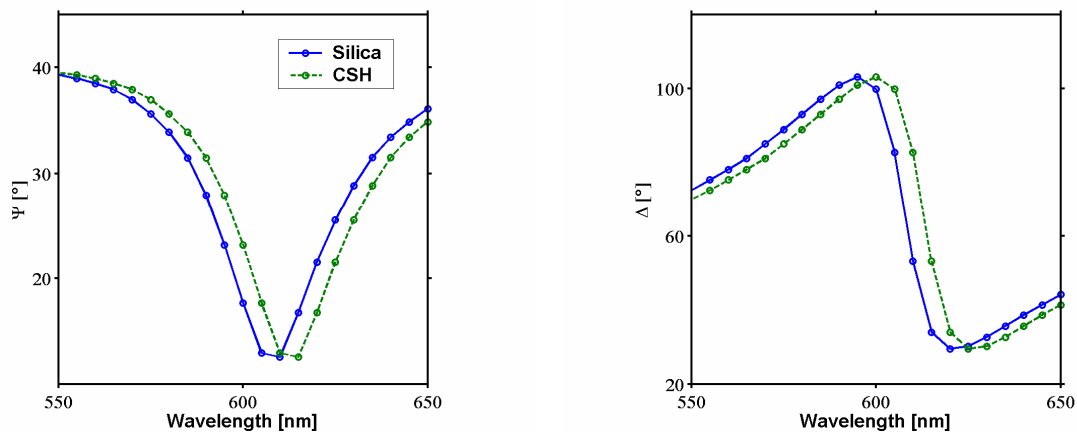


Figure 5.35 : Variation de la position spectrale de la résonance plasmon après transformation de la silice (en bleu) en CSH (en vert pointillé) en ψ (A) et Δ (B).

Cinétique de réaction

La transition de phase de la couche de 8 nm de silice a été suivie à longueur d'onde fixe pendant 17H (**Figure 5.36**). La solution a été régulièrement enrichie en chaux pour prévenir de l'appauvrissement de la solution en calcite CaCO_3 . La brusque variation de Ψ observée lors de l'injection de la solution est consécutive au changement de l'indice de réfraction du milieu extérieur. La lente évolution de la cinétique est expliquée par la variation graduelle de l'indice de réfraction de la couche.

Outre la détermination de la durée de transformation d'une couche mince de silice en CSH, cette étude ouvre la voie à d'autres analyses *in situ*. On pense ici à l'étude de l'interaction CSH – PCP AT 32, un polymère fluidifiant, pour évaluer son influence sur la cohésion de la couche.

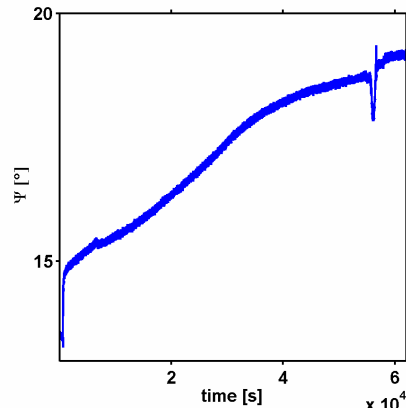


Figure 5.36: Cinétique de la transition de phase de la silice en CSH.

5.5 Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre une approche novatrice exploitant la détection par ellipsométrie spectroscopique de la résonance des plasmons de surface dans le cadre d'une étude monocapteur. Cette étude a nécessité la réalisation d'une cellule de mesure adaptable à l'ellipsomètre utilisé. Outre une détection spectrale de la forte variation de réflectivité aux longueurs d'ondes encadrant la résonance des plasmons de surface, nous avons montré que cette résonance influence également la phase de l'onde réfléchie, et ce, de façon encore plus prononcée. La sensibilité spectroscopique ainsi obtenue est **15** fois supérieure à une étude de réflectivité classique.

L'étude de couches ultra-minces de PMMA nous a permis de définir un rapport signal sur bruit de l'ordre de 400. 3 différents types d'adsorption de molécules biologiques ont pu être suivis *in situ* et en temps réel. Les épaisseurs et la fraction volumique des monobrinns d'ADN, qui ont servi de modèles d'analyse au cours de cette thèse, ont été déterminées. Un modèle de gradient d'indice linéaire a permis d'ajuster les épaisseurs et les indices des films conjointement, ce qui s'est avéré impossible dans le cas d'une couche continue. Nous avons également pu vérifier que les dimensions des édifices moléculaires influent sur les cinétiques d'adsorption, alors que l'électrodéposition permettait une adsorption plus rapide.

Enfin, à titre d'exemple, deux champs d'applications du capteur ont été présentés : l'interaction anticorps/antigène a ainsi été visualisée dans le cadre d'une étude clinique de la sclérose en plaque ; la cinétique de la transformation d'une couche nanométrique de silice en CSH a également été suivie.

De l'étude monocapteur à multicapteurs.

Chapitre VI : La miniaturisation des capteurs optiques

6.1 Introduction

Ce dernier chapitre est consacré à tester l'aptitude à la miniaturisation des capteurs optiques étudiés jusqu'à présent. L'approche monocapteur nous a permis de définir les sensibilités à l'adsorption de la RPS, de l'ellipsométrie spectroscopique, ainsi que du couplage de ces deux techniques. La localisation spatiale de sites d'interactions de faibles dimensions est possible grâce à un greffage localisé, que ce soit, par exemple, par l'intermédiaire de canaux microfluidiques ou par des dépôts par électropolymérisation de pyrrole. Nous proposons, dans un premier temps, de simuler ce greffage localisé par la microstructuration d'un film mince de PMMA par LFE. Cette approche offre l'avantage d'utiliser une couche biomimétique de faible épaisseur, qui peut à la fois servir de modèle pour la biologie mais également permettre de compartimenter spatialement, et ce avec une résolution inférieure à 100 nm, la surface en vue d'un greffage sélectif. L'objectif de cette section est d'examiner les dimensions et les séparations minimales acceptables des structures à fabriquer à la surface pour permettre une détection en champ lointain, et ce, pour les trois techniques employées jusqu'à présent.

Ceci suppose par ailleurs un système de détection de haute résolution qui puisse analyser simultanément ou dans un intervalle de temps très proche plusieurs sites d'interactions. Deux approches sont envisageables, selon la technique de détection employée :

- l'une est basée sur l'imagerie de la surface en champ lointain à l'aide d'une caméra CCD, applicable dans le cas d'une étude RPS ;

- l'autre repose sur une analyse point par point de l'interaction d'un faisceau collimaté sur une surface, approche idéale dans le cadre d'une étude par ellipsométrie spectroscopique couplée ou non avec la RPS.

Après une étude préliminaire en champ proche optique nous permettant de définir précisément les dimensions critiques des structures autorisant l'excitation et la propagation d'ondes de surface, nous déterminerons la résolution en champ lointain obtenue par imagerie RPS.

La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude par ellipsométrie spectroscopique couplée ou non à la RPS d'échantillons microstructurés. Une méthode de greffage qui puisse localement, sur des zones d'interactions les plus restreintes possibles, fonctionnaliser la surface avec des espèces biologiques différentes est également nécessaire. Nous montrerons les possibilités offertes pour la détection de dépôts biologiques localisés par électropolymérisation directe de pyrrole, étude menée en collaboration avec le CREAB du CEA de Grenoble [173-175].

6.2 Imagerie par RPS

Forts de la certitude d'une sensibilité suffisante à la détection de molécules biologiques, les possibilités d'intégration et donc de miniaturisation ont été examinées grâce à l'étude en champ proche optique et en champ lointain d'une couche ultra-mince de PMMA structurée par LFE.

6.2.1 Cartographie du champ proche optique [176]

L'objectif de cette étude, réalisée en collaboration avec le Pr. J.C. Weeber, est de caractériser localement la perturbation du champ proche optique associé à une surface organique d'épaisseur nanométrique déposé sur le film d'or supportant les plasmons de surface. De par sa résolution latérale submicronique, le microscope optique de champ proche (PSTM, Photon Scanning Tunelling Microscope) se présentait comme la technique la plus performante pour cette étude. L'excitation des plasmons de surface est obtenue encore une fois dans la configuration de Kretschmann-Raether. La **Figure 6.1** présente le dispositif expérimental.

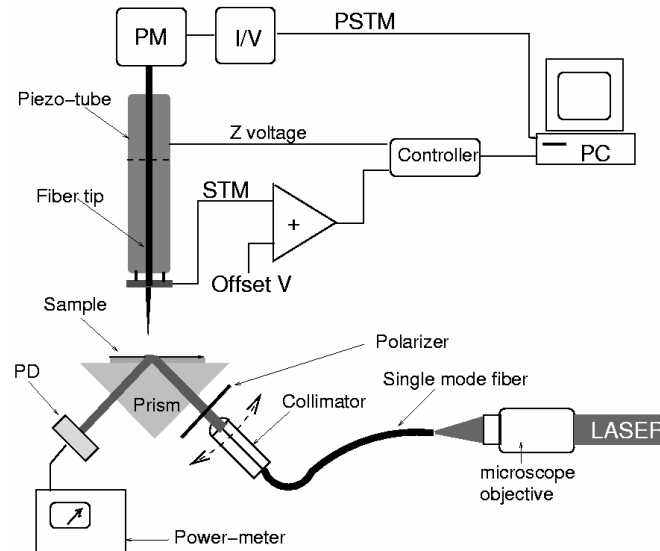


Figure 6.1 : Schéma de principe de fonctionnement du microscope optique PSTM.

L'onde évanescente créée par l'excitation est détectée à l'aide d'une fibre optique effilée et métallisée, dont l'extrémité de 50 nm de rayon de courbure est approchée pas à pas de la face supérieure de l'échantillon à l'aide d'un tube piézoélectrique. Le courant tunnel de la jonction entre l'extrémité de la fibre optique et la surface est mesuré afin de déterminer le contact entre les deux éléments.

Le déplacement latéral de la fibre optique permet de cartographier la distribution de l'intensité du champ proche optique et ceci pour différents plans parallèles à la surface de l'échantillon.

Nous avons choisi d'utiliser comme revêtement organique un film de PMMA ultra fin, déposé suivant le protocole présenté précédemment. La résine électrosensible est structurée par lithographie par faisceau d'électrons. Des rainures aux flancs très raides avec des largeurs et des séparations variant de 1 à 10 μm sont tracées dans le film de PMMA. Une image AFM de rainures de 2 μm espacées de 4 μm est présentée (**Figure 6.2**).

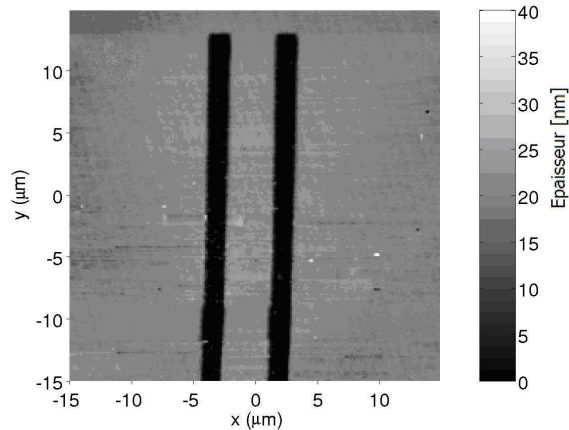


Figure 6.2 : Image AFM de rainures de $2\ \mu\text{m}$ de large espacées de $4\ \mu\text{m}$ dans le film de PMMA sur l'or.

L'étude théorique en champ lointain, présentée au paragraphe 4.2.2, montre que l'adsorption d'un film continu induit le décalage du pic d'absorption. Cette absorption mesurée en absorption se traduit en transmission à travers la couche d'or recouverte du film, par une amplification de l'intensité du champ proche optique. Bien qu'évanescente, l'intensité de cette onde dans le champ proche peut être quantifiée grâce au PSTM.

La courbe de transmission d'un film d'or d'épaisseur $50\ \text{nm}$, est présentée en **Figure 6.3**. Un angle d'incidence θ_{or} de 42.25° permet d'obtenir le signal le plus important. La profondeur du champ proche optique d'environ $700\ \text{nm}$ est mesurée à partir des courbes de transmission. A mesure que la sonde pénètre cette zone, le signal croît de manière exponentielle jusqu'à environ $170\ \text{nm}$, une valeur qui correspond quasiment au quart de la longueur d'onde utilisée ($\lambda=800\ \text{nm}$).

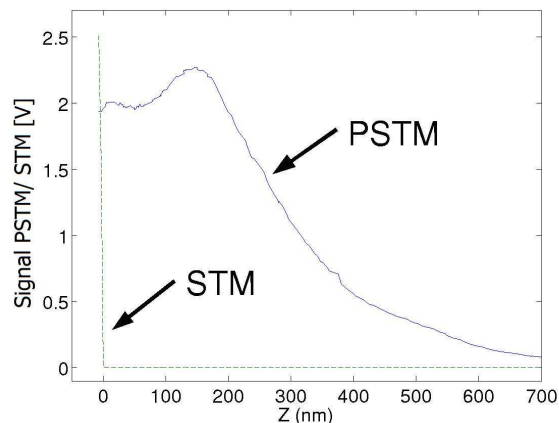


Figure 6.3 : Courbe de transmission ($\theta_{or} = 42.25^\circ$) obtenue en PSTM à travers $50\ \text{nm}$ d'or. Le signal optique est recueilli par la fibre à mesure qu'elle traverse le champ proche. Le signal STM, mesuré simultanément, sert à déterminer le contact pointe/surface.

La baisse de signal observée pourrait être attribuée au contact de la pointe avec la surface, le signal STM du courant tunnel STM affirme pourtant le contraire. La portée de cette baisse ne peut pas non plus être interprétée par un modèle classique d'Abélès. Une explication plausible mais qui exigerait un appui théorique serait qu'en dessous d'une certaine distance petite vis-à-vis de la longueur d'onde, un couplage entre la couche d'or et le revêtement métallique de la pointe serait suffisamment fort pour perturber la résonance plasmon.

Une étude identique a été menée sur un film d'or d'épaisseur 50 nm recouvert par 10 nm de PMMA. La réponse maximale détectée est pour un angle θ_{PMMA} de 43.18° (**Figure 6.4**), qui est à comparer avec l'angle θ_{or} mesuré pour un film d'or seul. Ainsi, à l'angle θ_{or} , le signal est quasiment inexistant, ce qui met en évidence la faible excitation du plasmon.

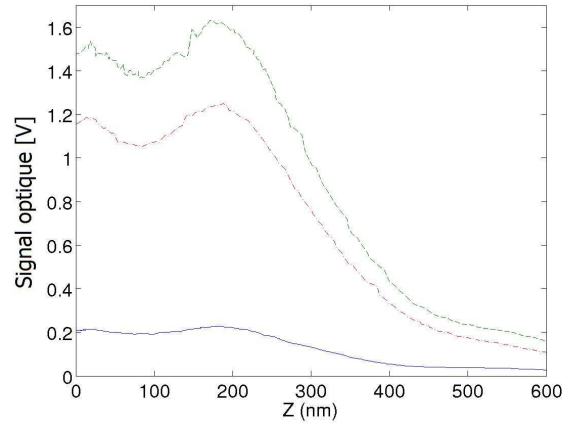


Figure 6.4 : Courbe d'approche PSTM enregistrée sur un film d'or (50 nm) recouvert d'un film de PMMA. Le maximum d'amplification est trouvé pour un angle $\theta = 43.18^\circ$ (courbe hachurée) en parfait accord avec le pic d'absorption en réflectivité. Les intensités chutent énormément quand l'angle est modifié (courbe pleine, $\theta = 42.2^\circ$; courbe pointillée, $\theta = 43.28^\circ$).

L'analyse PSTM en mode imagerie a d'abord été conduite sur des rainures de $2 \mu\text{m}$ de large et $100 \mu\text{m}$ de long et $15 \mu\text{m}$ d'espacement, gravées dans le PMMA (**Figure 6.5**). Hormis la distance pointe-surface et l'angle d'excitation, l'orientation des rainures vis-à-vis du plan d'incidence s'est avérée être un paramètre primordial.

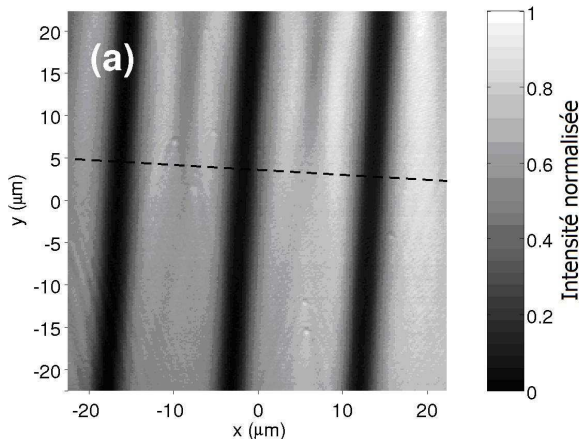


Figure 6.5 : Image PSTM de rainures de $2 \mu\text{m}$ de large lithographiées dans le film de PMMA de 10 nm d'épais obtenu à la résonance plasmon de l'or recouvert par le polymère ($\theta = 43.18^\circ$) avec le plan d'incidence parallèle à l'orientation des rainures.

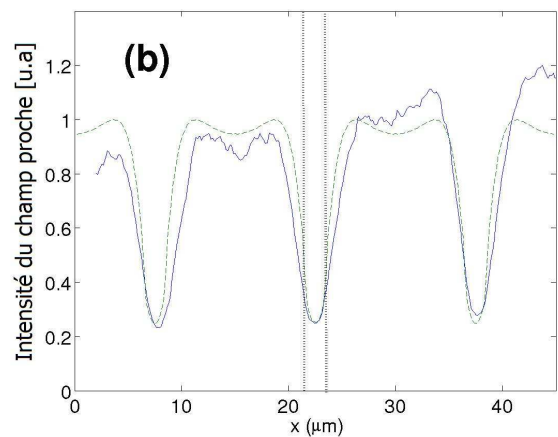


Figure 6.6 : Profil expérimental (ligne pleine) de la distribution du champ proche optique sur l'or et le PMMA. La largeur physique de la rainure mesurée par AFM est rappelée par les traits verticaux. Le profil théorique (ligne pointillée) est présenté pour comparaison

D'autres calculs bien antérieurs à cette étude, menés par J.C. Weeber et A. Dereux, ont permis de développer des codes de calcul (fonction de Green, méthode différentielle) simulant la distribution du champ électrique au dessus de la surface. Cette approche numérique appliquée aux couches ultraminces s'est avérée être en excellent accord avec les résultats expérimentaux. Si

l'on se réfère à sa largeur à mi-hauteur, la réponse optique sur les rainures est deux fois plus étendue que la largeur physique des stries. Des oscillations sont également perceptibles sur les zones d'or (**Figure 6.6**).

Les images PSTM acquises en variant l'angle d'incidence apportent des informations complémentaires. Ainsi pour un angle d'incidence $\theta = 42.2^\circ$, correspondant à l'angle d'excitation du plasmon sur l'or seul, une inversion partielle de contraste est notable (**Figure 6.7**). Néanmoins, contrairement aux attentes initiales, le contraste de l'image PSTM ne s'inverse pas totalement. Les bords des rainures sont fortement marqués, ce qui est probablement dû aux modes de bords et aux interférences qui en résultent. Les relations de dispersion connues pour les films étendus sont en fait perturbées par la structuration en rainures de faibles largeurs.

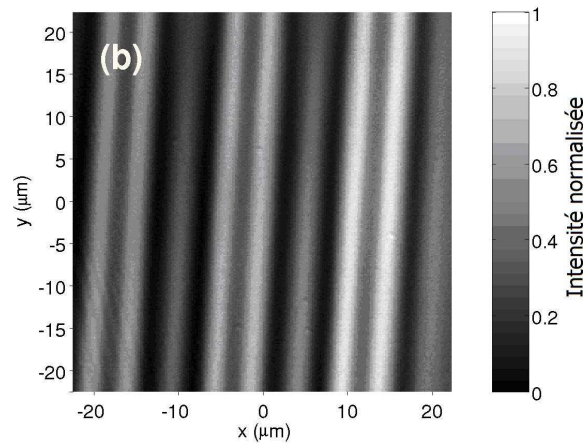


Figure 6.7 : Image PSTM d'une rainure de 2 μm de large lithographiée dans le film de PMMA de 10 nm d'épais enregistrée un angle $42,2^\circ$, correspondant à l'angle plasmon de l'or.

La largeur des rainures a ensuite été progressivement réduite jusqu'à 250 nm, les lignes restent bien contrastées, même en dessous de $\lambda/3$ (**Figure 6.8**).

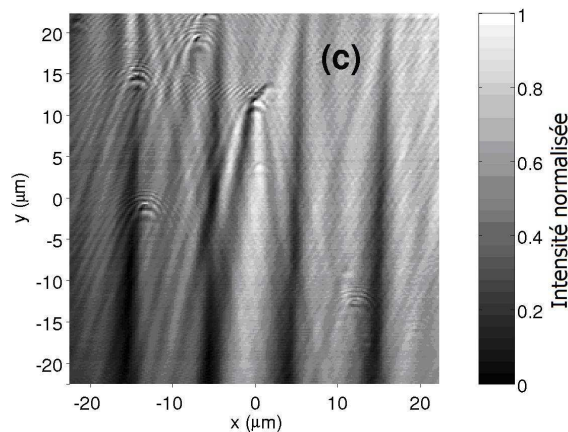


Figure 6.8 : Image PSTM de rainures de 250 nm de large dans le film de PMMA de 10 nm d'épais.

Dans toutes les images précédentes, le plan d'incidence était parallèle à l'axe Y des rainures, l'orientation normale à cette direction donne des résultats d'une sensibilité nettement amoindrie. Des structures aussi larges que 10 μm ne peuvent être résolues, seuls les bords supérieurs parallèles au vecteur d'onde sont fortement marqués. Des oscillations derrière la

structure sont perceptibles, elles proviennent des interférences entre l'onde plasmon qui s'est propagée à travers la structure et l'onde réfléchi par le côté supérieur.

Lorsqu'elle se propage à l'interface entre un diélectrique et un métal réel, l'onde voit son amplitude décroître exponentiellement, de l'ordre d'un facteur e^2 pour une distance de propagation de $40 \mu\text{m}$.

La **Figure 6.9** montre la réponse PSTM de deux rainures de $2 \mu\text{m}$ de large séparées de $4 \mu\text{m}$, éclairée en incidence parallèle. L'onde se propage du haut vers le bas de l'image. Les deux bandes sont clairement résolues selon l'axe X sans diaphonie entre les rainures, par contre les bords supérieurs selon l'axe Y sont nettement moins abrupts, le profil de la distribution du champ électromagnétique nous montre en effet qu'une distance d'environ $25 \mu\text{m}$ est nécessaire avant d'atteindre un état stable selon Y.

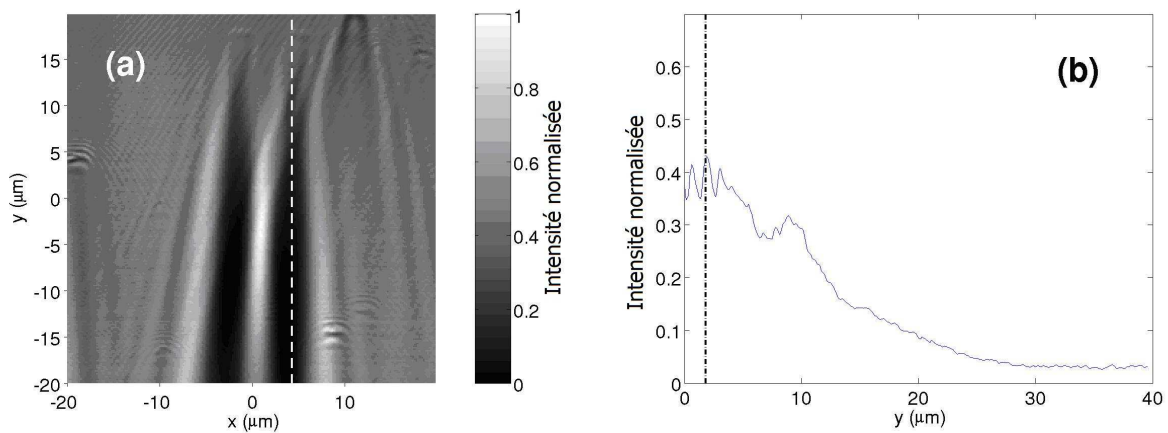


Figure 6.9 : (a) Image PSTM de deux rainures dans le PMMA de 10 nm de profondeur, de $2 \mu\text{m}$ de large séparé de $4 \mu\text{m}$ illuminé en incidence parallèle. (b) Profil de l'image (a) suivant la ligne pointillé blanche, la ligne verticale noire indique le bord supérieur de la rainure.

Les résolutions latérales pour l'imagerie basée sur la résonance plasmon dépendent fortement de l'orientation de l'illumination : une résolution submicronique est attendue parallèlement au plan d'incidence alors qu'elle n'est que d'une dizaine de nanomètres pour une illumination normale.

6.2.2 Imagerie RPS en champ lointain

La microscopie en champ proche reste une technique délicate à mettre en œuvre pour la réalisation d'un biocapteur. Une étude en champ lointain, plus adaptée aux applications biologiques, a été entreprise. L'objectif est ici de déterminer les résolutions spatiales en imagerie à l'aide d'échantillons microstructurés.

6.2.2.1 Dispositif

La technique d'imagerie utilisée classiquement pour l'étude de multicapteurs par la méthode RPS utilise une caméra CCD pour mesurer l'intensité en chaque point.

Le dispositif, proposé en **Figure 6.10**, permet d'imager des zones d'interactions allant de 6 mm^2 à $500 \mu\text{m}^2$. L'analyse monocapteur nous a montré qu'une source d'excitation émettant dans le rouge permet d'obtenir d'assurer une sensibilité du capteur S_c suffisante dans l'air et en

liquide. En revanche, nous avons cherché à varier la cohérence de la source pour évaluer les effets de la diffraction éventuelle en bord des structures. Deux sources différentes ont ainsi été utilisées :

- une source laser cohérente et polarisée émettant dans le rouge à 633 nm ;
- une lumière blanche incohérente filtrée dans le rouge.

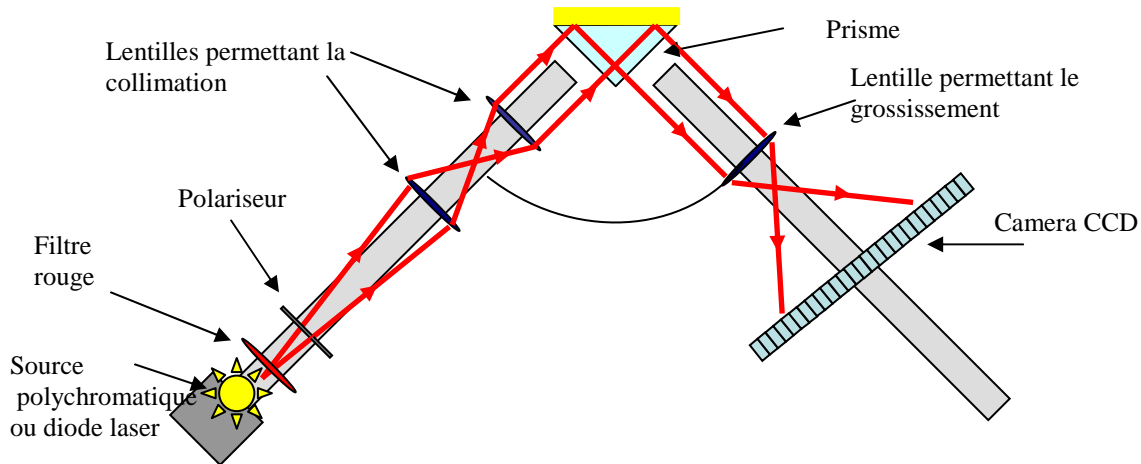


Figure 6.10 : Représentation schématique du dispositif réalisé pour l'imagerie plasmon.

Le faisceau, dans le cas de la source incohérente, est ensuite polarisé (*p*) ou (*s*) grâce à un polariseur. Il est ensuite collimaté classiquement par deux lentilles et un diaphragme. Le prisme utilisé dans l'air est un prisme droit d'indice optique donné de $n_{prisme} = 1.5$, alors que pour l'étude en liquide un prisme d'indice 1.65 a été employé. L'image réfléchie est ensuite agrandie grâce à une lentille biconvexe de distance focale $f = 62.9$ mm, et est recueillie sur la caméra CCD.

La sensibilité en intensité de la caméra est liée au nombre de niveaux de gris détectables (256 à 1024 suivant les modèles). La sensibilité lumineuse sera d'autant plus importante que le nombre de niveaux de gris détectables sera élevé. Le choix de la CCD est également guidé par sa sensibilité aux différents bruits (bruits de photons, bruit thermique et bruit électronique). La sensibilité, la taille du capteur, la fréquence de rafraîchissement et le bruit extérieur aux mesures seront donc conditionnés par la qualité de la caméra.

La caméra choisie a une taille de capteur de 640x480 pixels, chaque pixel mesurant $7 \mu\text{m}$, permettant une acquisition à une vitesse de 30 images/s sur un port FireWire classique (Thorlabs DC110). La dimension du capteur ainsi que la taille de chaque pixel de la matrice CCD ont été privilégiées par rapport aux niveaux de gris, choisi ici à 256 : au vu de la taille de pixel et en fonction du grossissement obtenu avec la lentille, un objet de $10 \mu\text{m}$ sera théoriquement résolu.

6.2.2.2 Déformation de l'image et orientation de la CCD

Intéressons nous à la marche des rayons lumineux après interaction avec la face métallisée du prisme et donc la formation de l'image. L'objet (AB) sur la surface dorée est réfléchi avec un angle θ_p (**Figure 6.11**). La dimension de l'image (P_1P_2) formée sur la face externe du prisme est donnée par :

$$P_1P_2 = AB \cdot \frac{\cos \theta_p}{\sin(A + \theta_p)} = AB \cdot \gamma \quad (6.1)$$

avec A l'angle du prisme et γ la déformation.

Pour quantifier la déformation γ , étudions deux cas particuliers :

- dans le cas d'un prisme d'indice 1.5, avec l'air pour milieu extérieur, θ_p est évalué à environ 44.5° soit $\gamma=0.71$;
- dans le cas d'un prisme d'indice 1.65, avec pour milieu extérieur de l'eau, θ_p est égal à 62.63° soit $\gamma=0.51$.

L'image P_1P_2 à la sortie du prisme est donc déformée, ce qui réduit sa résolution suivant un axe. Après la sortie du faisceau lumineux du prisme, d'après les lois de Descartes, l'angle réfléchi devient :

$$\theta_{p'} = \text{arc sin} \left(n_{\text{prisme}} \cdot \sin(A + \theta_p) \right) \quad (6.2)$$

Notons également que lorsque la caméra CCD est placée perpendiculairement à l'axe optique, l'image formée n'est pas nette. La représentation géométrique du système après le passage de la face externe du prisme (**Figure 6.12**) permet d'évaluer l'angle θ_{CCD} nécessaire à la formation d'une image nette sur la caméra.

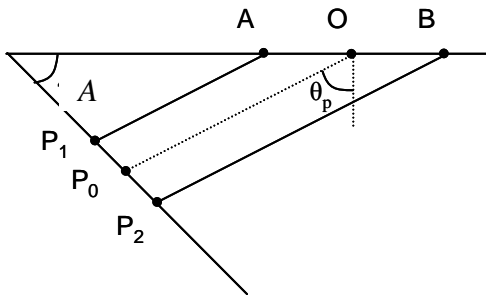


Figure 6.11 : Formation de l'image P_1P_2 sur la face externe du prisme après réflexion sur la zone étudiée.

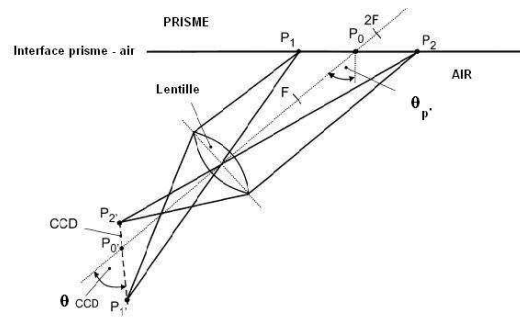


Figure 6.12 : Tracé des rayons permettant la formation d'une image nette sur la CCD, Figure traduite et issue [177].

L'angle θ_{CCD} s'écrit alors [177] :

$$\theta_{\text{CCD}} = \frac{\pi}{2} - \arctan \left(\frac{f' \sin \theta_{p'}}{(f' - l_0) \cos \theta_{p'}} \right) \quad (6.3)$$

avec f' la distance focale de la lentille, l_0 la distance entre le point central P_0 de l'image sur la face externe du prisme et le centre de la CCD. Généralement θ_{CCD} est proche de 60° .

De manière analogue à l'analyse conduite en champ proche optique, nous avons choisi, pour mettre en évidence la résolution d'une détection en champ lointain, de réaliser sur une lame

de verre, recouverte de 5 nm de chrome et 45 nm d'or, une série de cuvettes en PMMA lithographiées de 12 nm de profondeur. Le fond des cuvettes est donc en or.

La **Figure 6.13** illustre la réflectivité théorique des systèmes chrome/or (trait plein) et chrome/or/PMMA (trait pointillé) dans l'air. Pour chaque résonance, indiquée par des flèches, une différence de réflectivité est observable entre les deux systèmes. A l'angle d'excitation de la résonance du système chrome/or, un contraste d'environ 0.8 est calculé. Celui-ci chute à 0.2 à la résonance du système chrome/or/PMMA, soit un contraste 75 % plus faible.

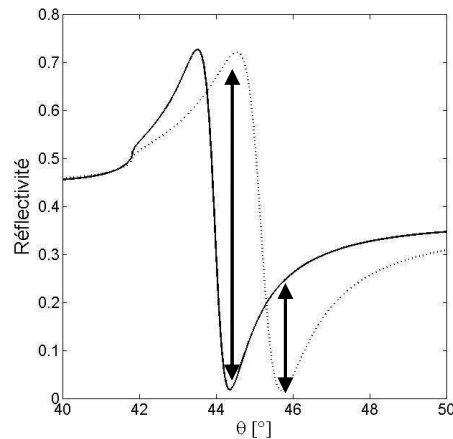


Figure 6.13 : Réflectivité théorique des systèmes chrome/or (trait plein) et chrome/or/12 nm PMMA (trait pointillé). Les flèches indiquent la position de la résonance et l'écart de réflectivité associé.

6.2.2.3 Observation avec une source cohérente

L'observation expérimentale de ce contraste a été menée sur des cuvettes carrées de 100 μm de côtés espacées de 100 μm . Les images **6.14 A et B** représentent la réflectivité locale de l'échantillon pour deux angles plasmons : l'un correspond à l'excitation de la résonance plasmon sur la surface chrome/or seule ($\theta_{p1}=44.35^\circ$) et l'autre sur la bicouche or/PMMA ($\theta_{p2}=45.72^\circ$).

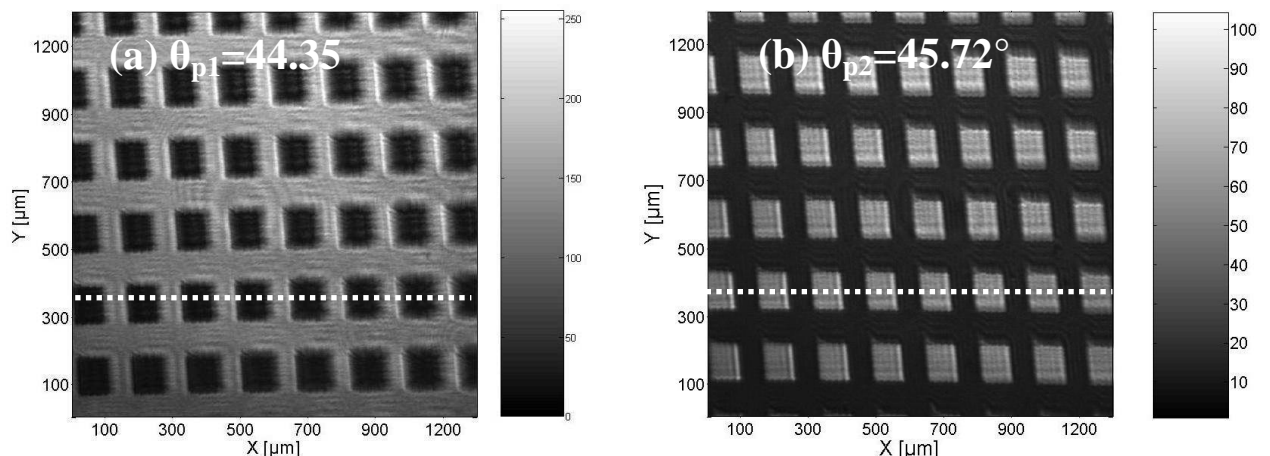


Figure 6.14 : Images des cuvettes de PMMA sur l'or sous incidence correspondant à l'excitation du plasmon de surface sur l'interface or-air (a). En réflexion, l'or est sombre, mettant en évidence la résonance plasmon, alors que le PMMA est clair. Lorsque l'angle correspond à l'excitation du plasmon surface sur l'interface (or-PMMA)-air (b), le PMMA devient sombre, et l'or clair.

La **Figure 6.14A**, obtenue avec pour incidence θ_{p1} , présente deux réponses distinctes : claire sur le PMMA, correspondant à une intensité détectée importante, et sombre sur l'or, correspondant à une réflectivité minimale. L'angle d'incidence est ensuite modifié pour atteindre la valeur θ_{p2} associé à la résonance pour un système chrome/or/12 nm de PMMA. La structure précédente est de nouveau imagée mais, comme prédit par la théorie et observé en champ proche optique, une inversion très nette du contraste est visible (**Figure 6.14B**). Cette inversion est confirmée par la section partielle (**Figure 6.15**), qui représente le niveau de gris mesuré sur une portion d'une même ligne marquée en trait pointillé blanc sur les **Figures 6.14A et B**.

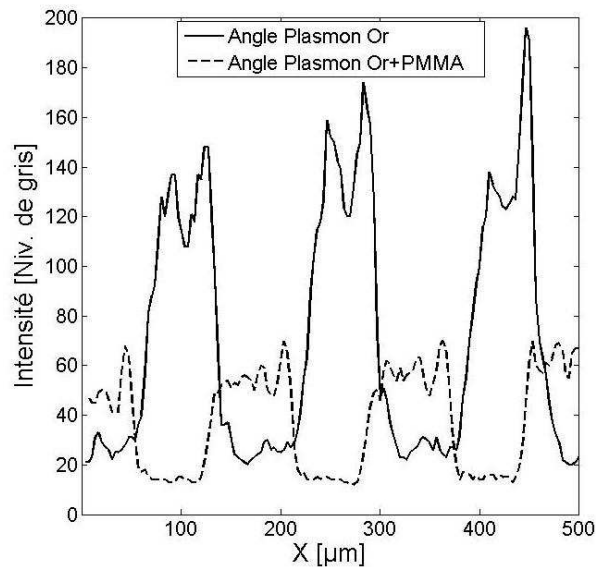


Figure 6.15 : Profil des images 6.14A et B sur une même ligne : mise en évidence de l'inversion de contraste pour les deux angles d'incidence.

Une différence d'environ 90 niveaux de gris est mesurée entre les deux systèmes à l'angle plasmon θ_{p1} . Pour θ_{p2} , l'écart est d'environ 25 niveaux de gris, soit une diminution du contraste de 72 %, en accord avec la diminution déterminée théoriquement.

Cette figure montre également la présence d'ondulations aux bords de chaque structure. Une approche développée par Berger et al. [178] consiste à attribuer ces oscillations à la diffraction existante au niveau du saut d'indice que rencontre l'onde plasmon lors de sa propagation sur la surface structurée. La diffraction est à relier au caractère cohérent de l'onde lumineuse incidente. Pour s'affranchir de la diffraction, une source lumineuse incohérente, couplée avec un filtre rouge, a ensuite été utilisée.

6.2.2.4 Résolution en source incohérente

Un échantillon, composé de rosaces lithographiées dans 12 nm de PMMA avec des bandes de largeurs 40, 30, 20 et 10 μm de gauche à droite respectivement, est imagé en liquide avec le prisme d'indice 1.65. Le facteur de déformation appliqué est ici de 0.5, ce qui implique une résolution deux fois plus importante dans la direction de propagation de l'onde de surface. Les **Figures 6.16, A** en polarisation (*p*), **B** en polarisation (*s*), acquises en lumière incohérente, montrent dans un premier temps la suppression de la diffraction sur le bord des structures.

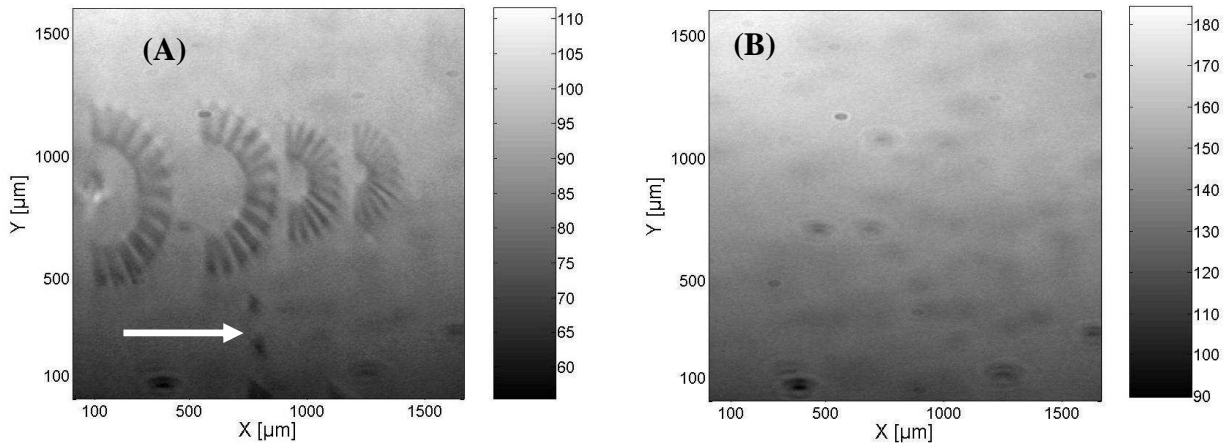


Figure 6.16 : Imagerie en champ lointain à l'angle de résonance plasmon de l'or de structures en forme de rosaces de longueur $200\ \mu\text{m}$ et de largeur $40, 30, 20$ et $10\ \mu\text{m}$ de gauche à droite respectivement, en polarisation (p) (A), en polarisation (s) (B). La flèche blanche indique le sens de propagation de l'onde de surface.

Remarquons que la variation de réflectivité est beaucoup moins marquée que dans l'air, au regard de l'échelle des niveaux de gris. Une résolution inférieure à $10\ \mu\text{m}$ est observée dans la direction Y.

Parmi les facteurs limitant la qualité de l'image et la résolution latérale, citons les inhomogénéités de la source émettrice, ainsi que celles dues en partie aux réflexions parasites dans le prisme et les lentilles. Pour supprimer ce bruit, deux images sont acquises en polarisation (p) et (s). L'image réalisée en polarisation (p) contient l'information RPS ainsi que celle non souhaitée générée par ces fluctuations alors que l'image capturée en polarisation (s) ne contient que le signal relatif aux fluctuations. Les deux images sont alors divisées, (Figure 6.17), pour supprimer ce bruit [179].

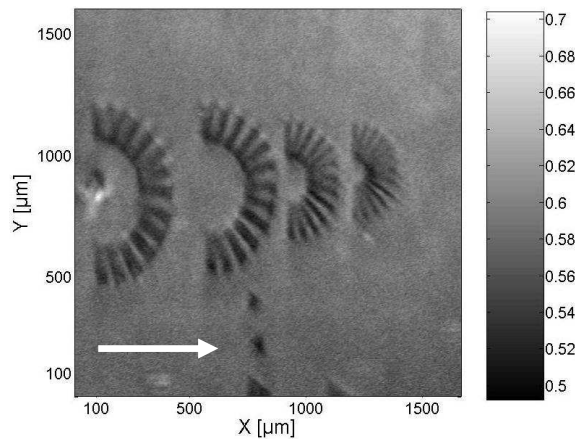


Figure 6.17 : Rapport des images obtenues en polarisation (p) et (s).

Notons que le fond lumineux est ici homogénéisé par rapport à l'Image 6.16A et que les motifs sont beaucoup plus visibles. Par l'intermédiaire des rosaces, nous avons cherché à déterminer l'influence de l'orientation de la structure sur la propagation de l'onde évanescente et donc sur la résolution. Au regard de l'Image 6.17, le contraste est aussi marqué pour une orientation dans le sens de propagation, marqué par une flèche, ou à 90° . La résolution est en revanche influencée par l'orientation des motifs du fait de la déformation γ observée suivant X et corrigée pendant le traitement de l'image.

La résolution obtenue en champ lointain, de l'ordre de 10 μm permet d'envisager une intégration de l'ordre 1000 capteurs/ cm^2 , et l'acquisition simultanée des variations de réflectivités issues de ceux-ci lors d'interactions. Il est cependant délicat de déduire l'indice et l'épaisseur de la couche adsorbée sans l'acquisition de la variation angulaire de la réflectivité. Une étude angulaire de la réflectivité locale n'est possible qu'en ajustant constamment γ et θ_{CCD} , réalisable au travers de la motorisation de l'ensemble des éléments du banc.

6.3 L'imagerie ellipsométrique spectroscopique à balayage

Comme présentée dans le premier chapitre de ce mémoire, la miniaturisation de la détection ellipsométrique est possible suivant deux axes d'études :

- par imagerie directe à l'aide d'une caméra CCD ;
- par imagerie à balayage de la zone d'interaction.

Nous venons de montrer que l'imagerie CCD a l'avantage d'avoir une résolution spatiale inférieure à 10 μm , en revanche il semble que l'analyse pixel par pixel soit très coûteuse en temps de mesure. La mise en place de cette approche directe nécessitant un traitement informatique lourd du signal ellipsométrique, nous avons alors opté pour la solution la plus adaptée à notre cas: l'imagerie à balayage. Celle-ci offre l'avantage de pouvoir garder une configuration standard de l'ellipsomètre. Le temps de mesure sera proportionnel au nombre des zones d'interaction entre le faisceau et l'échantillon. Enfin, la résolution spatiale sera liée aux dimensions du faisceau lumineux en interaction avec l'échantillon.

Nous chercherons ici à optimiser le temps de mesure et à améliorer la résolution latérale de cette approche, c'est-à-dire à déterminer la variation minimale de contraste qui permette de discerner soit deux objets séparés d'une distance d ou un objet de largeur d' avec un contraste acceptable. Cette démarche s'applique à la fois à l'imagerie basée sur l'ellipsométrie spectroscopique mais également à la détection couplée avec la RPS.

6.3.1 Résolution latérale théorique

Le faisceau lumineux peut être modélisé par un faisceau gaussien représenté par $G(x, y)$ la fonction gaussienne normalisée définie par :

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi v_1 v_2} \exp\left(-\left(\frac{x^2}{2v_1^2} + \frac{y^2}{2v_2^2}\right)\right) \quad (6.4)$$

où v_1 et v_2 sont associées aux dimensions latérales du spot en μm , avec v_2 dépendante de l'angle d'incidence θ_{ellipso} du faisceau lumineux donné par :

$$v_2 = \frac{v_1}{\cos \theta_{\text{ellipso}}} \quad (6.5)$$

La surface est représentée numériquement par deux dimensions structurées par un ensemble de fonctions portes, valant 1 lorsque la zone étudiée est remplie de PMMA et 0 dans le

cas contraire. Le signal réfléchi $S(x, y)$ par la surface $\Pi_i(x, y)$ en mouvement sous le faisceau $G(x, y)$ est obtenu le produit de convolution suivant :

$$S(x, y) = \sum_i \Pi_i(x, y) * G(x, y) \quad (6.6)$$

On définit alors le contraste de l'image comme :

$$\Delta S = S(x, y)_{\max} - S(x, y)_{\min} \quad (6.7)$$

La réponse ellipsométrique $S(x, y)$ va dépendre à la fois des dimensions du faisceau gaussien, des dimensions de chaque fonction porte, ainsi que de l'espacement entre les portes

La **Figure 6.18.A** présente la variation attendue de $S(x, y)$ lors du passage du faisceau gaussien elliptique, caractérisé par $v_1 = 100\mu m$ et $v_2 = 200\mu m$ par le centre d'un plot isolé de côté variant de $50\mu m$ à $500\mu m$.

Le produit de convolution entraîne un élargissement de la réponse : pour un plot de $500\mu m$ par exemple, la largeur de la réponse est attendue à $750\mu m$. De plus, en fonction de la largeur de la porte le contraste de l'image $S(x, y)$ évolue. Une chute de 80% de la réponse est observée entre une porte de $500\mu m$ et $50\mu m$ de large. Par ailleurs, les portes les plus étroites vont nous renseigner sur le diamètre réel du faisceau. L'estimation expérimentale de v_1 est obtenue en mesurant la largeur à mi-hauteur de la réponse.

Le pouvoir de séparation a été testé à l'aide de deux plots de largeur $200\mu m$ dont l'espacement bord à bord a été varié de 50 et $700\mu m$. Pour une distance inter plots supérieure à $200\mu m$, un contraste de l'image $S=0.9$ indique que les deux plots sont mesurés indépendamment l'un de l'autre. En dessous de $200\mu m$, une baisse du contraste est observée avec notamment une valeur de S_{\min} entre plots qui augmente à mesure que l'espacement diminue.

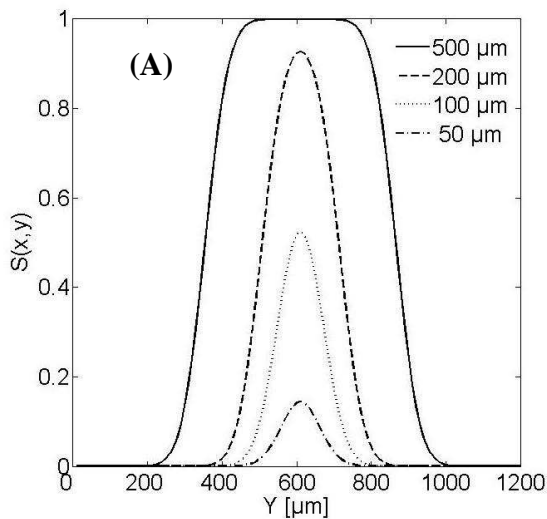


Figure 6.18A : Réponse théorique du déplacement latéral d'un faisceau gaussien normalisé ($v_1=100\mu m$; $v_2=200\mu m$) avec une fonction porte de côté compris entre 50 et $500\mu m$.

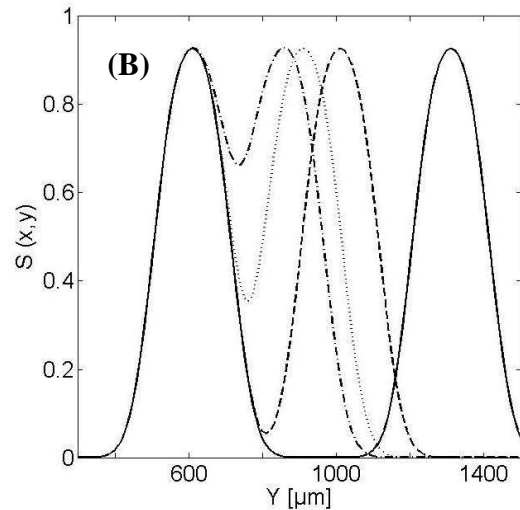


Figure 6.18B : Réponse théorique de deux fonctions portes de côté $200\mu m$ dont les bords sont séparés de $500, 200, 100$ et $50\mu m$.

Dans le cas de la **Figure 6.18B**, deux portes de largeur 200 μm espacées de 50 μm sont discernables. La **Figure 6.19** suivante résume les dépendances ΔS avec la largeur et l'espacement des plots.

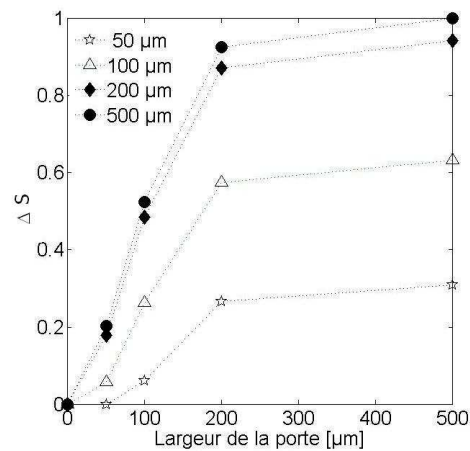


Figure 6.19 : *Contraste attendu en fonction de la largeur de la porte pour des espacements de 50 (étoiles), 100 (triangles), 200 (losanges) et 500 (rond) μm .*

Dans l'objectif d'une miniaturisation, il importe à la fois :

- d'augmenter l'intégration des plots c'est-à-dire la densité de plots par surface, et donc de diminuer l'espacement entre plots ;
- d'avoir une aire suffisante du plot pour détecter un événement biologique.

L'arrangement optimum pour avoir des plots isolés sans convolution ($\Delta S \geq 0.9$) est de mesurer la réponse de plots de 200 μm de large et séparés de 200 μm soit une densité de 900 plots par cm^2 . Par contre, ceci n'interdit pas d'être sensible à des dimensions plus petites, des plots de 50 μm espacés de 100 μm donnent une variation encore mesurable de 10%. La densité d'intégration est alors de 20 000 plots par cm^2 mais avec une convolution entre plots.

6.3.2 Application à l'étude d'une couche mince microstructurée

Nous avons vérifié expérimentalement les limites de détection atteignables en imagerie par ellipsométrie spectroscopique. Pour cela, une couche ultramince de 10 nm de PMMA a été déposée par centrifugation sur un substrat de verre recouvert de 5 nm de chrome et 45 nm d'or. Des zones de (10×10) à (500×500) μm^2 espacé de 50 à 500 μm ont donc été insolées par LFE puis révélées, créant ainsi un enchaînement de cuvettes. Ces structures sont alors équivalentes aux fonctions portes employées dans l'analyse théorique.

Les déplacements micrométriques motorisés (SMC100CC, Newport), assurent le positionnement de la platine porte-échantillon à 100 nm près et autorisent un déplacement maximum de 5.5 cm suivant les deux axes, à une vitesse comprise entre 1 et 5000 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$.

La résolution obtenue sera liée aux dimensions de la structure et aux nombres de points par :

$$\text{Résolution} = \frac{\text{Dimension}}{20} \quad (6.8)$$

Nous estimons ici que 20 points de mesures sont suffisants pour décrire latéralement un motif. La vitesse de balayage sera déduite par le rapport de la résolution et du temps d'acquisition par point :

$$vitesse = \frac{Résolution}{T_{acquisition}} \quad (6.9)$$

Dans le cas d'une cuvette de 200 μm de côté, et un temps d'acquisition de 1 s par point, une vitesse de balayage de 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ est optimale.

6.3.2.1 Détection par ellipsométrie spectroscopique

La mesure ellipsométrique a été conduite dans l'air à une longueur d'onde de 450 nm, longueur d'onde correspondant à l'écart le plus important entre les spectres sur l'or nu et sur les systèmes or nu/PMMA. La taille de spot la plus faible possible, soit 100 μm de diamètre théorique, a été employée. ψ et Δ pour chaque forme de cuvettes ont été mesurées suivant l'axe perpendiculaire au plan d'incidence, permettant ainsi d'obtenir la plus grande résolution. Les **Figures 6.20A** (où seuls les variations de ψ pour les cuvettes de 50 et 100 μm sont reportés) et **B** illustrent ces mesures.

Dimensions critiques :

Les valeurs de ψ et Δ des cuvettes de 500, 200 et 100 μm de large atteignent le même maximum. L'acquisition d'un spectre au centre de ces structures n'est donc pas influencée par les structures limitrophes.

Taille du faisceau :

En revanche ψ et Δ associées à la cuvette de 50 μm n'atteignent pas cette valeur maximale. Cette mesure autorise cependant la détermination de la taille du faisceau : à mi hauteur, v_1 est évaluée à 60 μm . L'angle d'incidence du faisceau étant de 65° , v_2 vaut alors 140 μm . Enfin, dans le cas des cuvettes de 10 μm , aucune variation de ψ et Δ n'est détectée.

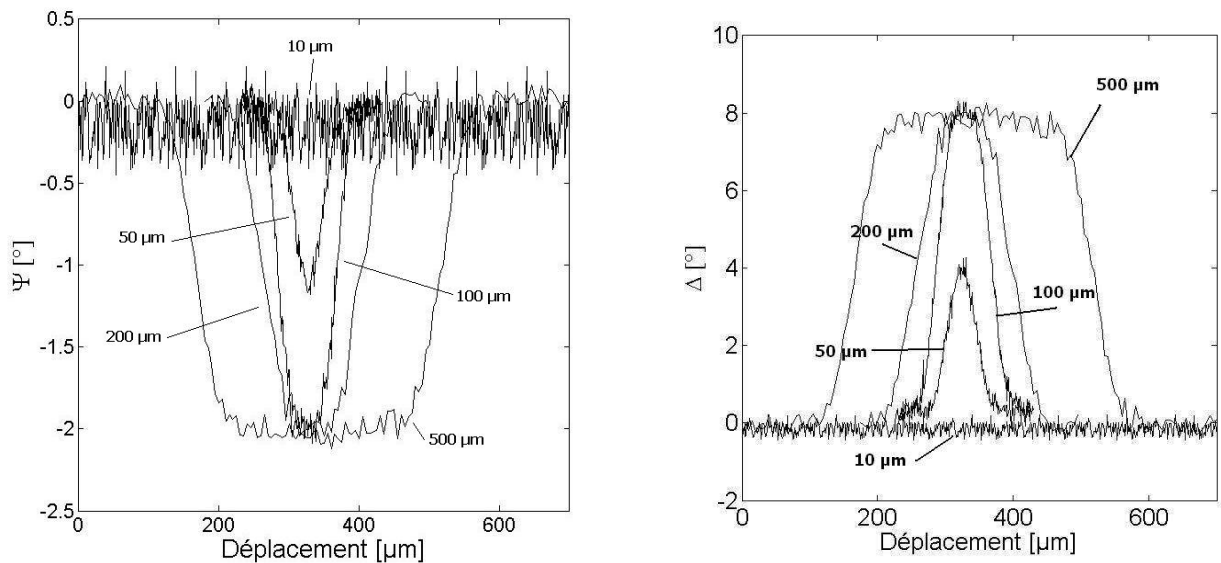


Figure 6.20 : Représentation de la variation de ψ (A) et de Δ (B) pour une longueur d'onde incidente de 450 nm en imagerie à balayage, à 1 $\mu\text{m}/\text{s}$, sur un substrat composé de cuvettes de 10, 50, 100, 200 et 500 μm .

Espacement des structures :

Un exemple d'enchaînement de cuvettes de $100\ \mu\text{m}$ espacées respectivement de $100\ \mu\text{m}$ et $300\ \mu\text{m}$ est imagé et représenté dans les **Figures 6.21A** et **B**. Il apparaît que pour un espacement de $100\ \mu\text{m}$, l'effet de la cuvette voisine est nul. Au regard de cette analyse un espacement inférieur à $100\ \mu\text{m}$, estimé à $75\ \mu\text{m}$, est envisageable pour des cuvettes de largeur $100\ \mu\text{m}$. Dans ce cas, les valeurs de ψ et de Δ seront équivalentes à celles mesurées sur une couche continue, les zones d'interactions étant complètement isolées optiquement les unes des autres. Il s'ensuit une capacité d'intégration de 3000 zones d'interaction par cm^2 .

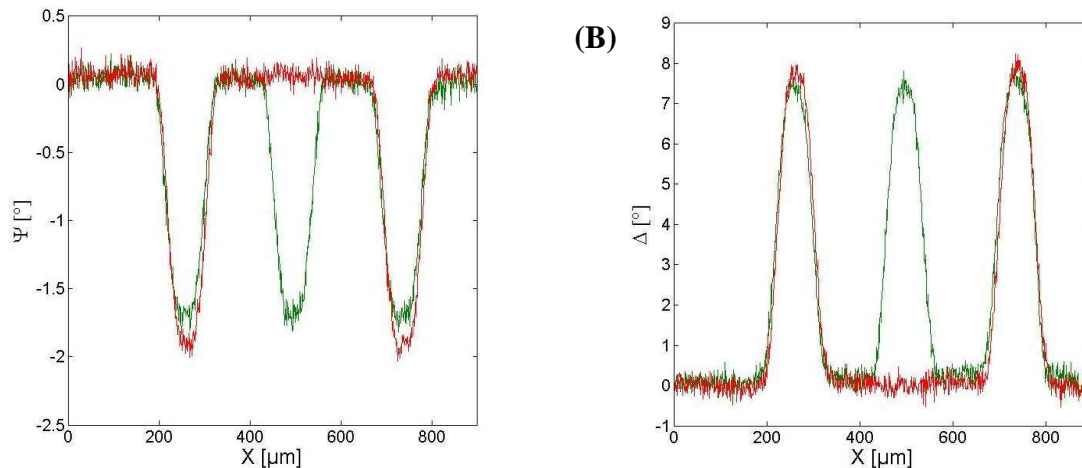


Figure 6.21 : Représentation de la variation de ψ (A) et de Δ (B) pour une longueur d'onde incidente de $450\ \text{nm}$ en imagerie à balayage, à $1\ \mu\text{m/s}$, sur un substrat composé de cuvettes de $100\ \mu\text{m}$ de large espacées de 100 et $300\ \mu\text{m}$.

Microscopie à balayage ellipsométrique:

L'imagerie complète d'une cuvette est réalisable en balayant successivement les deux axes. Les **Figures 6.22A** et **6.22B** présentent les répartitions des angles ψ et Δ suivant les deux directions de balayage, obtenues pour une cuvette de $200\ \mu\text{m}$ de large et $10\ \text{nm}$ d'épais. La convolution du faisceau lumineux avec la cuvette, plus marquée selon la direction X et due au caractère elliptique du spot, implique une déformation de la cuvette. Une zone d'environ $(100 \times 100)\ \mu\text{m}^2$ au centre de la cuvette présente cependant une réponse constante, isolée optiquement des structures limitrophes.

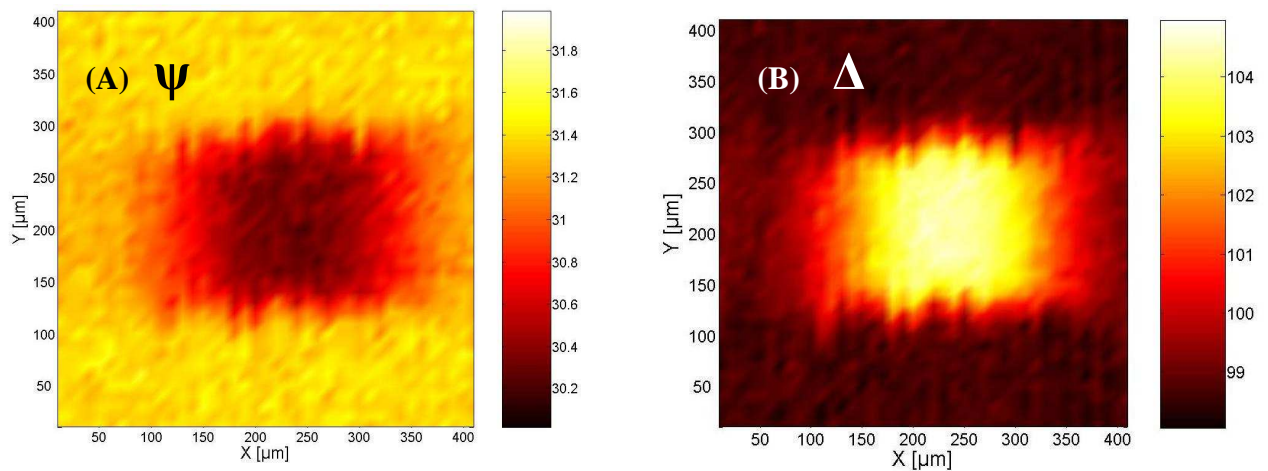


Figure 6.22 : Imagerie à balayage à deux dimensions d'une cuvette de $(200 \times 200)\ \mu\text{m}^2$ creusée dans $10\ \text{nm}$ de PMMA.

Grâce à la structuration d'un film mince de PMMA par LFE et la motorisation de la platine porte-échantillon, nous avons pu déterminer les dimensions critiques de zones analysables *ex situ* dans une configuration classique par ellipsométrie spectroscopique, qui sont compatibles avec le cahier des charges d'une biopuce.

6.3.2.2 L'apport de la RPS

Nous cherchons ici à confirmer l'apport de la RPS en comparaison avec une détection ellipsométrique classique. Les échantillons précédents ont été analysés en liquide par imagerie à balayage. La sensibilité maximale en ψ et Δ est obtenue pour deux longueurs d'ondes d'excitation distinctes. Le protocole de mesure est donc le suivant :

- acquisition d'un spectre sur l'or nu ;
- acquisition d'un spectre sur l'or recouvert de PMMA ;
- différence entre les deux spectres en ψ et Δ permettant de trouver les deux longueurs d'ondes de travail correspondant à la plus grande différence entre les spectres.

Ces trois étapes sont illustrées dans les **Figures 6.23A** et **B**. Le spectre acquis à l'intérieur d'une cuvette, donc sur l'or nu, est représenté en trait pointillé, alors que celui obtenu sur le PMMA est en trait plein. La différence de ces deux spectres, en trait pointillé court, permet de déterminer les longueurs d'onde les plus favorables : 615 nm pour ψ et 635 pour Δ . Les valeurs des variations des angles ellipsométriques, obtenues expérimentalement lors du balayage pour une longueur d'onde donnée, sont indiquées par des cercles.

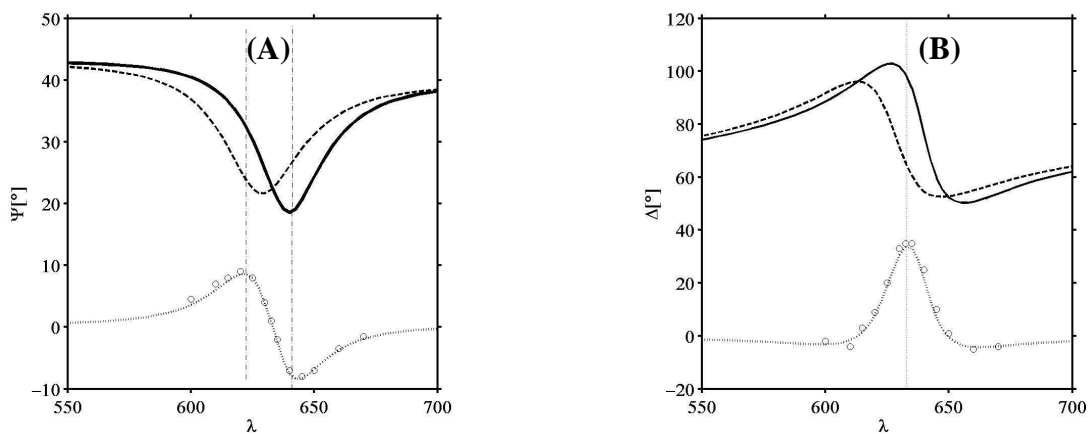


Figure 6.23 : Lecture spectroscopique de la résonance plasmon hors (trait plein) et à l'intérieur (trait pointillé) de la cuvette creusée dans 10 nm de PMMA pour les angles ψ (A) et Δ (B). La différence des signaux est également reportée.

L'acquisition menée sur des cuvettes de 100 μm espacées de 200 μm , creusée dans une couche de 5 nm de PMMA, permet d'évaluer le gain de sensibilité par rapport à une détection

ellipsométrique classique. Les longueurs d'ondes de travail ont été optimisées pour obtenir tour à tour S_{λ}^{ψ} (**Figure 6.24A**) et S_{λ}^{Δ} (**Figure 6.24.B**) maximales.

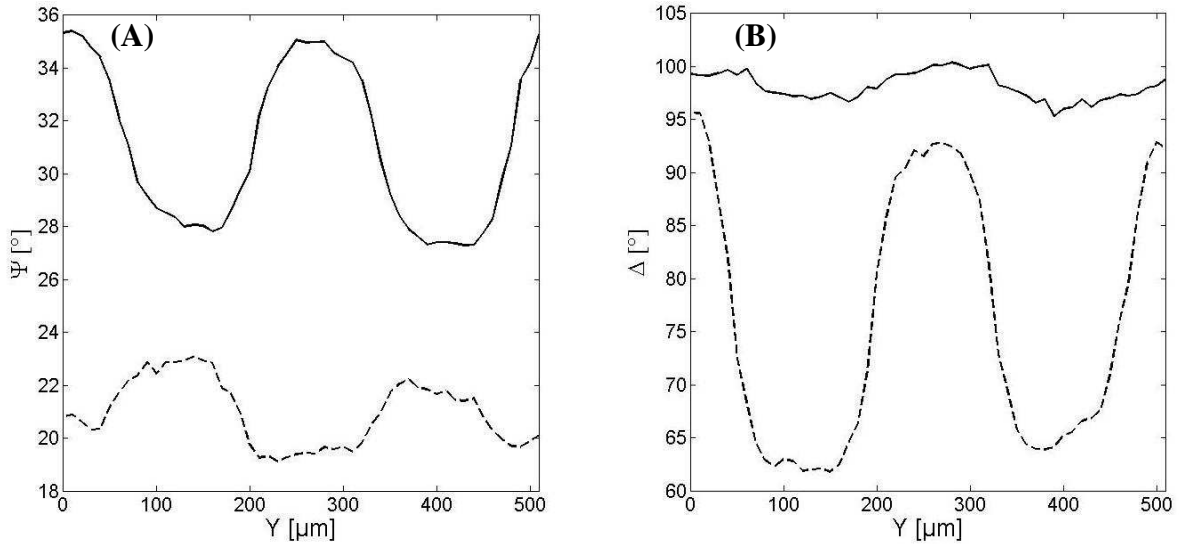


Figure 6.24 : Représentation de la variation de ψ (A) et de Δ (B) en imagerie à balayage RPS, à $10 \mu\text{m/s}$, sur un substrat composé de cuvettes de $100 \mu\text{m}$ de large espacées de $200 \mu\text{m}$ pour une longueur d'onde de travail de 615 nm (trait plein) et 635 nm (trait pointillé).

Si la résolution suivant l'axe Y est identique à l'ellipsométrie à balayage, il convient de noter que la présence de la lame de verre après le prisme va conduire à une augmentation de ν_2 . Les lois de Descartes, dans le cas d'une incidence $\theta_e = 63.62$ dans le prisme d'indice 1.65, nous permettent d'écrire:

$$n_{\text{prisme}} \sin \theta_e = n_{\text{lame}} \sin \theta'_e$$

$$\theta'_e = a \sin \left(\frac{n_{\text{prisme}} \sin \theta_e}{n_{\text{lame}}} \right) = 80.21^\circ$$

D'après (6.5), ν_2 vaut alors $353 \mu\text{m}$. On estime alors qu'une structure de $350 \mu\text{m}$ de côté peut être optiquement isolée. La réduction de ν_2 est possible en supprimant la lame de verre, et donc en utilisant un prisme par analyse, ou en augmentant l'indice de réfraction de la lame.

Imagerie

L'imagerie complète d'une cuvette de $300 \mu\text{m}$ de côté, creusée dans 10 nm de PMMA, est réalisée suivant les deux axes de balayage, à une vitesse de $20 \mu\text{m/s}$. La longueur d'onde donnant S_{λ}^{ψ} maximale est de 595 nm , et est de 615 nm pour S_{λ}^{Δ} , comme le montre les **Figures 6.25A** et **B**.

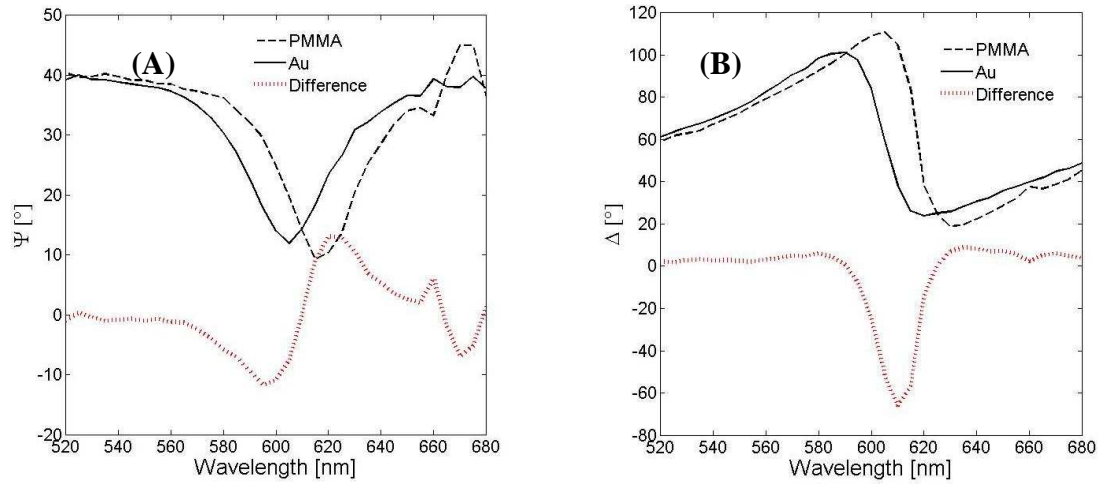


Figure 6.25 : Lecture spectroscopique de la résonance plasmon hors (trait plein) et à l'intérieur (trait pointillé) de la cuvette de 350 μm de côté creusée dans 10 nm de PMMA pour les angles ψ (A) et Δ (B). La différence des signaux est également reportée.

Les **Figures 6.26A et B** illustrent la répartition spatiale des angles ellipsométriques sur une surface de balayage de $(1 \times 1) \text{ mm}^2$.

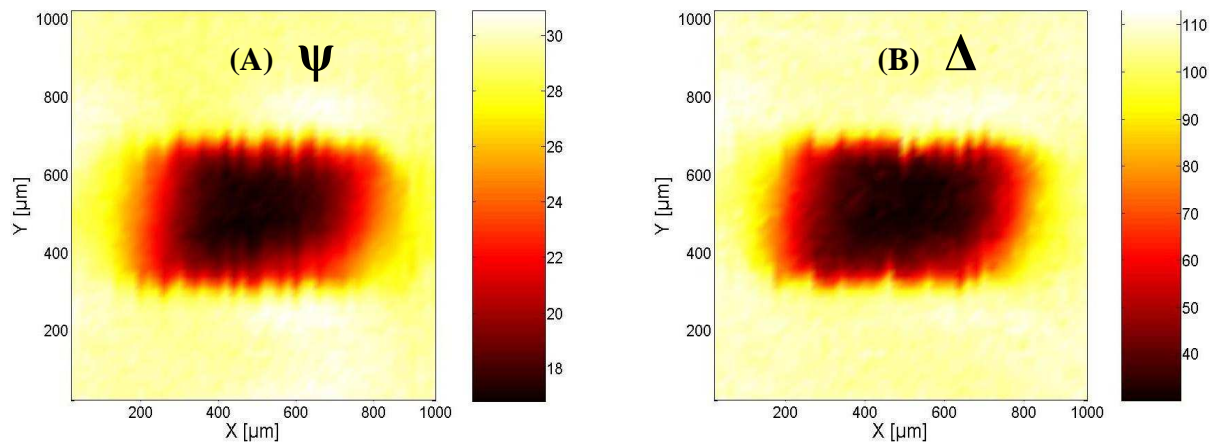


Figure 6.26 : Imagerie à balayage en par lecture ellipsométrique de la RPS d'un spot de 350 μm de diamètre en ψ (A), à $\lambda = 595 \text{ nm}$, et Δ (B), à $\lambda = 615 \text{ nm}$.

Il apparaît nettement que la résolution suivant l'axe X de balayage est plus faible : l'effet de la convolution entre le faisceau et la cuvette est plus important. Cette étude, menée sur des couches minces biomimétiques, montre clairement que l'imagerie à balayage est possible sur des structures espacées de 50 μm , de dimensions minimales de 10 μm . Dans le cas de structures de dimensions supérieures ou égales à 300 μm , espacées de 300 μm , le dispositif actuelle permet également d'enregistrer localement un spectre, sans que celui-ci soit perturbé par les structures limitrophes, et donc de conduire les mêmes ajustements que pour une analyse monocapteur. La densité d'intégration est évaluée alors à 256 zones d'interactions par cm^2 .

6.3.3 Analyse d'une puce biologique

En collaboration avec le CREAB du CEA de Grenoble, des substrats verre recouvert de 5 nm de chrome et 45 nm d'or ont été fonctionnalisés par copolymérisation de pyrrole. Des spots circulaires de 350 μm de diamètre, espacés de 350 μm , soit 700 μm centre à centre, ont ainsi été déposés en variant la concentration C_p d'oligonucléotides, de 0.2 à 5 μM , et le temps de copolymérisation, de 100 ms à 1s.

L'objectif est ici de mesurer localement les indices et les épaisseurs des spots suivant différentes conditions de dépôt. La platine motorisée nous permet d'acquérir sur chaque spot les variations spectrales des angles ψ et Δ , par ellipsométrie spectroscopique dans l'air, couplée avec la RPS dans le cas d'une étude en liquide. Les spectres locaux sont ensuite ajustés pour déterminer les épaisseurs et les indices des zones fonctionnalisées.

6.3.3.1 Lecture de la puce par ellipsométrie spectroscopique dans l'air

Deux spectres, acquis en ellipsométrie spectroscopique sur le substrat vierge (trait plein) et au centre d'une zone fonctionnalisée (trait pointillé), sont présentés dans les **Figures 6.27 A** et **B** suivantes.

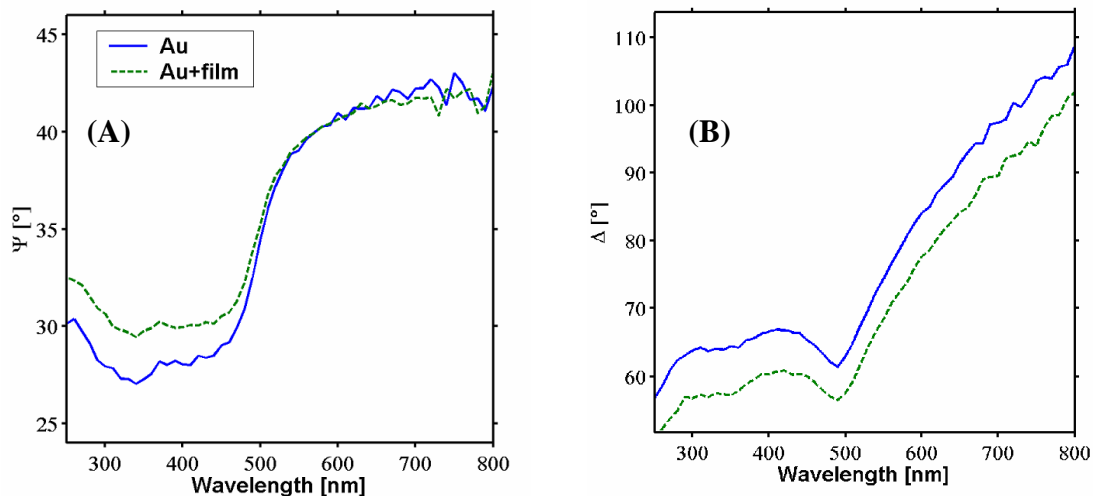


Figure 6.27 : Spectres ellipsométriques acquis sur le substrat nu (trait plein) et sur un spot (trait pointillé) en ψ (A) et Δ (B).

Cette première acquisition nous permet de définir la longueur d'onde de travail, où la sensibilité de lecture sera maximum : dans notre cas, l'écart entre les spectres est maximal à une longueur d'onde de 450 nm.

Les **Figures 6.28 A** et **B** présentent un enchaînement de spots, de temps de copolymérisation identique 500 ms, avec, respectivement, des concentrations de 0, 0.2, 1 et 5 μM d'oligonucléotides.

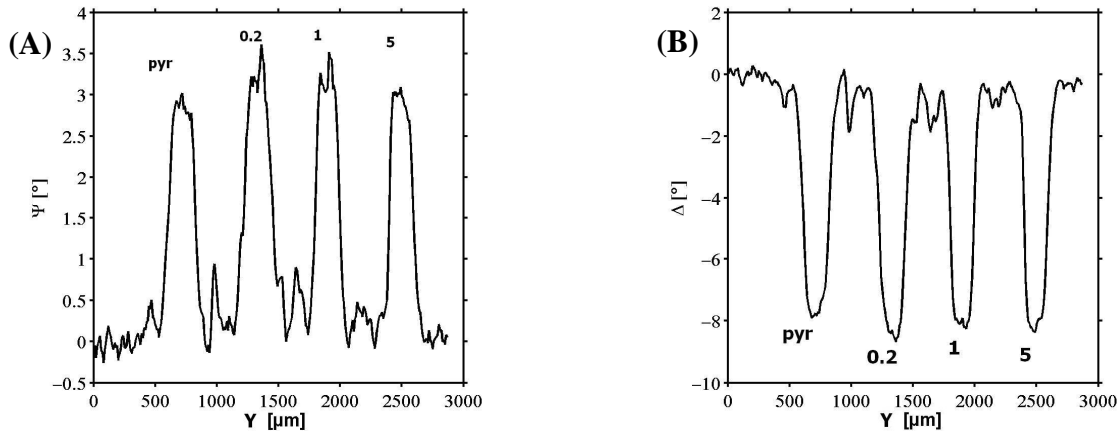


Figure 6.28 : Représentation de la variation de ψ (A) et de Δ (B) pour une longueur d'onde incidente de 450 nm en imagerie à balayage sur une série de spots copolymérisés pendant 500 ms de concentration en oligonucléotides de 0, 0.2, 1 et 5 μM .

Les spots sont ici clairement définis, la largeur des pics est estimée à 400 μm . Des variations d'environ 3° en ψ et 8° en Δ sont observées entre l'or nu et les zones fonctionnalisées. La concentration de molécules sondes ne semble pas influencer la réponse que ce soit en ψ ou en Δ . A l'inverse, au regard des **Figures 6.29A** et **B**, où les spots sont de concentrations identiques mais de temps de copolymérisation croissant, plus le temps de copolymérisation est important, plus les variations de ψ et Δ sont marquées.

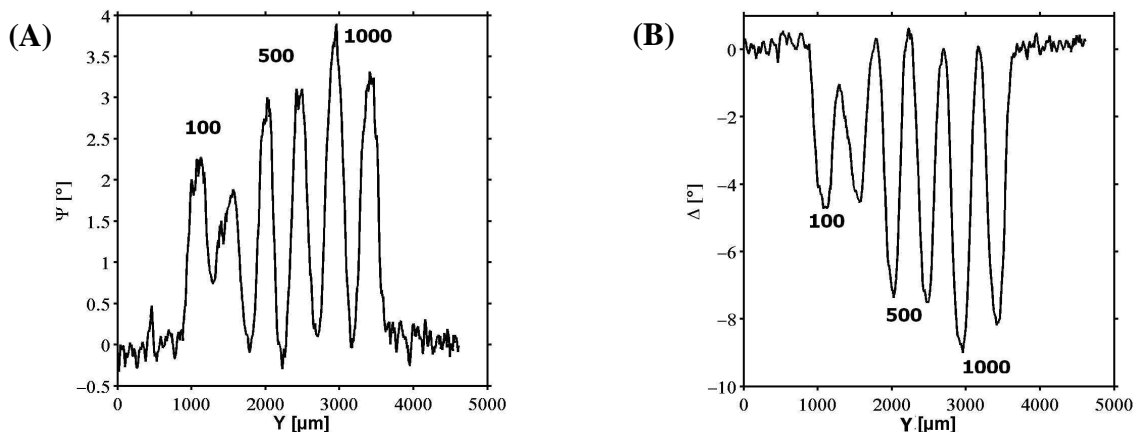


Figure 6.29 : Représentation de la variation de ψ (A) et de Δ (B) pour une longueur d'onde incidente de 450 nm en imagerie à balayage sur une série de spots de concentration identique mais de temps de copolymérisation croissant de 100, 500 et 1000 ms.

Les **Figures 6.30 A** et **B**, illustrent l'influence de ces paramètres sur l'épaisseur de la couche déposée, déterminée à partir des ajustements réalisés sur chaque spot. L'indice de la couche a été trouvé constant sur l'ensemble des spots, à 1.45. Les variations de ψ et Δ ne sont dues qu'aux variations de l'épaisseur.

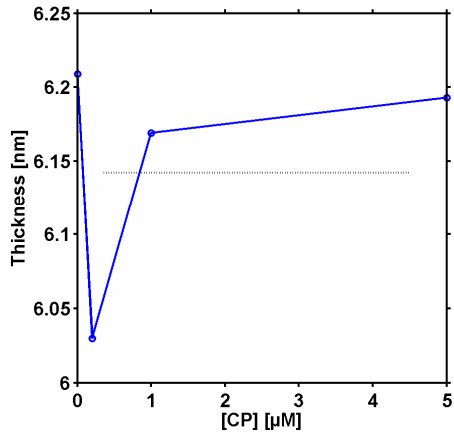


Figure 6.30A : Effet de la concentration en oligonucléotides C_p sur l'épaisseur du dépôt.

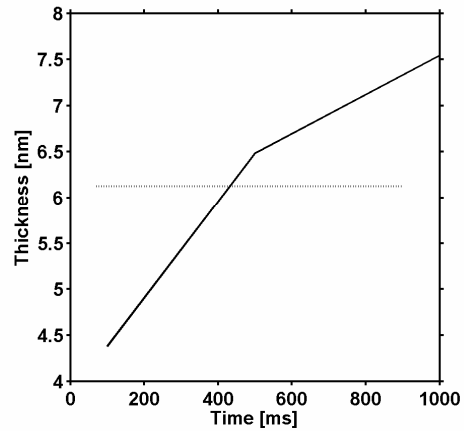


Figure 6.30B : Effet du temps de copolymérisation sur l'épaisseur du dépôt.

Ces figures confirment que la concentration en oligonucléotides n'influence pas l'épaisseur de la couche, alors que celle-ci double, passant de 4 nm à près de 8 nm, entre un temps de polymérisation de 200 ms et 1 s.

6.3.3.2 Lecture de la puce par l'analyse ellipsométrique de la RPS en liquide

L'étude de ces mêmes échantillons a ensuite été menée *in situ*, grâce à l'analyse ellipsométrique de la RPS. Les spectres sont acquis au centre de chaque spot. Les spectres présentés dans les **Figures 6.31A** et **B**, à temps de copolymérisation constant et concentration croissante, permettent de quantifier le glissement spectral la résonance dû à la couche copolymérisée. Comme attendu après l'analyse de la couche biomimétique de PMMA, le phénomène de résonance, amplifie les variations des angles ellipsométriques à longueur d'onde fixe : une augmentation de ψ de plus de 15° est observée, accompagnée d'une variation de Δ de près de 100° .

Il s'avère que, même en milieu liquide, la concentration en oligonucléotides n'a pas d'influence sur la réponse, les spectres obtenus sur les zones fonctionnalisées se superposant.

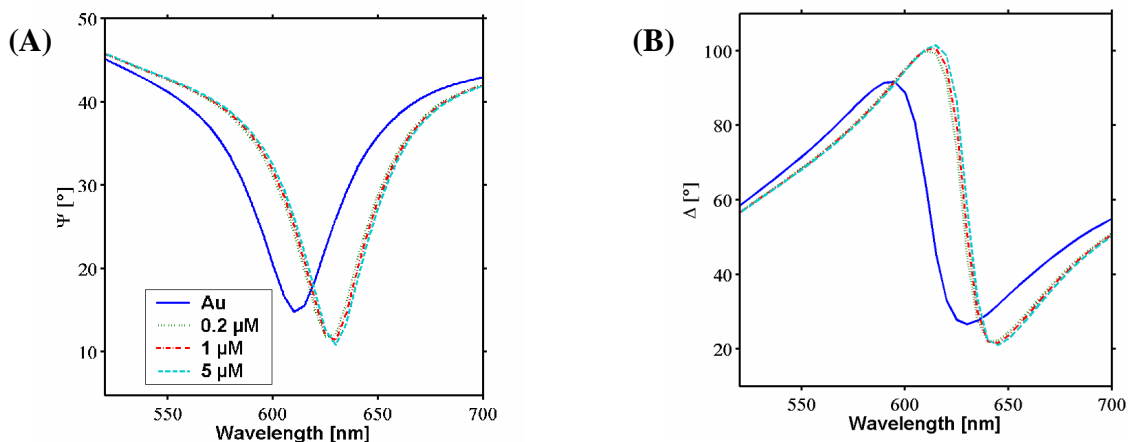


Figure 6.31 : Spectres RPS par lecture ellipsométrique en fonction de la concentration en oligonucléotides en ψ (A) et Δ (B).

A l'inverse, les **Figures 6.32A** et **B** confirment que plus le temps de polymérisation est grand, plus le décalage est important, synonyme de l'adsorption d'une couche plus épaisse et/ ou plus dense.

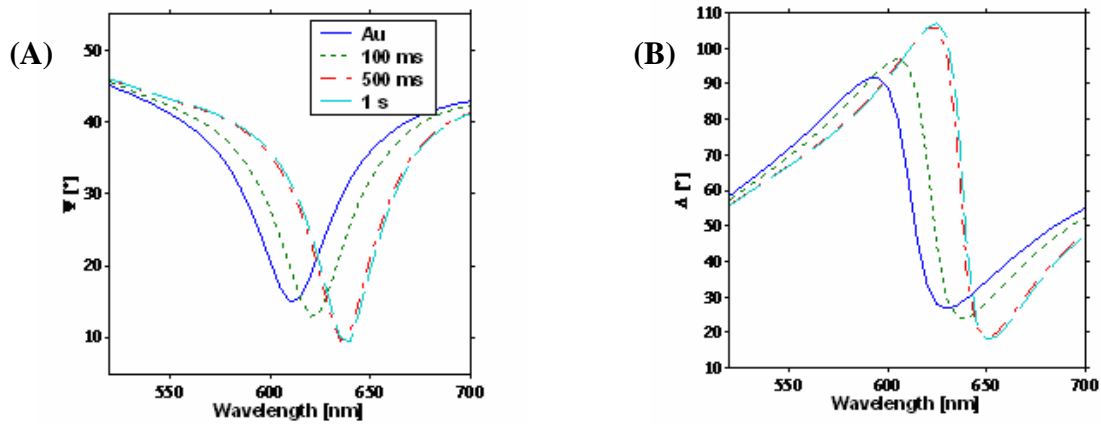


Figure 6.32 : Spectres RPS par lecture ellipsométrique en fonction du temps de copolymérisation en ψ (A) et Δ (B).

L'ajustement des spectres, présenté dans le **Tableau 6.1** permet de quantifier les variations d'indices et d'épaisseur en fonction de la concentration de sondes et le temps de polymérisation, nous y reportons également les valeurs obtenues par ellipsométrie spectroscopique dans l'air.

Un gonflement de la couche est noté lors de la mise en solution, l'épaisseur moyenne passant de 6 nm à près de 10 nm. L'indice de la couche, constant dans l'air à 1.45, est ici légèrement diminué avec pour valeur moyenne 1.38. Déjà observé sur les spectres, il apparaît très nettement qu'une épaisseur de couche importante est reliée à un temps de polymérisation grand.

	AIR		LIQUIDE	
	Epaisseur [nm]	Indice optique	Epaisseur [nm]	Indice optique
Concentration (à 500 ms)				
Pyrol seul	6.1	1.45	11.7	1.37
0.2 μ M	6.5	1.45	10.1	1.38
1 μ M	6.7	1.45	9	1.39
5 μ M	6.7	1.45	9.7	1.39
Temps de polymérisation				
100 ms	4.4	1.45	8	1.37
500 ms	6.5	1.45	11.6	1.37
1s	7.5	1.45	14.6	1.39

Tableau 6.1 : Ajustement de l'épaisseur et de l'indice optique des spots en fonction de la concentration et du temps de copolymérisation.

L'imagerie complète d'un spot est présentée dans l'**Image 6.33** sur une aire de (600x600) μm^2 . Si en ψ le spot semble rond et présente une variation de 7° , sans convolution au centre, l'analyse de Δ montre une légère déformation du spot suivant l'axe X. Néanmoins les variations

observées, près de 70° , confirment l'intérêt d'une étude de la phase. Cette image, et les ajustements précédents, démontrent parfaitement la capacité de l'imagerie ellipsométrique à balayage à imager des zones d'interactions avec une résolution de l'ordre de $50\ \mu\text{m}$, tout en conservant les capacités d'analyse de la RPS ellipsométrique.

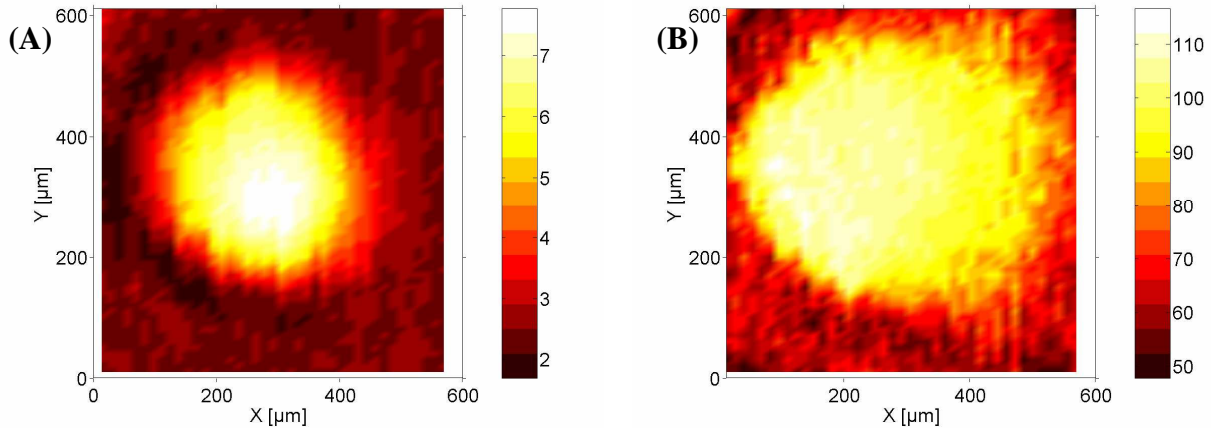


Figure 6.33 : Imagerie à balayage en par lecture ellipsométrique de la RPS d'un spot de $350\ \mu\text{m}$ de diamètre en ψ (A) et Δ (B).

6.4 Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer les voies exploitables pour transposer les études monocapteur optique présentées précédemment à une étude multicapteurs. Nous avons montré, tout d'abord en champ proche optique, les dimensions minimales des structures autorisant l'excitation des plasmons de surface. Dans le cadre d'une étude RPS, nous avons montré qu'il était possible d'imager la zone d'interaction champ lointain grâce à une caméra CCD. L'utilisation d'une couche microstructurée a permis de définir une capacité d'intégration de l'ordre de $1\ 000$ capteurs par cm^2 , avec une résolution spatiale inférieure à $10\ \mu\text{m}$. L'information obtenue, à angle fixe, est alors une variation différentielle de réflectivité.

L'imagerie à balayage, qui dans son principe est proche d'une étude à sonde locale, a été employée en ellipsométrie spectroscopique, couplée ou non avec la RPS. Les dimensions critiques des structures étudiées se sont avérées très proches de l'imagerie en champ lointain RPS. Par ailleurs, ce dispositif autorise l'acquisition locale de spectre, et donc l'ajustement des propriétés du substrat étudié. Cette technique d'imagerie n'est donc plus limitée à une étude différentielle.

Chapitre VII : Conclusion et perspectives

Ce mémoire rapporte mon travail de thèse réalisé de 2002 à 2006 dans l'équipe Nanosciences du Laboratoire de Physique de l'Université de Bourgogne sous la direction des professeurs Alain Dereux et Eric Finot. L'objectif principal de ce projet de thèse consistait à déterminer quels étaient, parmi les biocapteurs optiques n'utilisant pas de marquage, ceux qui présentaient à la fois une grande sensibilité à l'adsorption et une aptitude à la miniaturisation.

Une étude bibliographique préliminaire nous a permis de comparer l'ensemble des modes de transductions sans marquage classiquement utilisés. Si le mode de transduction optique ne permet pas d'atteindre les sensibilités obtenues par des techniques mécaniques, il est, semble-t-il, le mode de transduction autorisant les plus grandes facilités de miniaturisation, s'approchant le plus de l'extrême compacité des puces à fluorescence. La spécificité majeure de ce type de détection est sa sensibilité à la fois à l'épaisseur de la couche moléculaire adsorbée mais également à son indice optique, lié naturellement à la densité de la couche. Les biocapteurs optiques les plus fréquemment utilisés sont basés sur la détection angulaire mono-longueur d'onde de la résonance des plasmons de surface. Cette mesure reste majoritairement qualitative et ne permet pas de décorrélérer l'effet de l'indice et de l'épaisseur de la couche adsorbée.

Nous avons cherché à déterminer de façon précise l'épaisseur de la couche adsorbée ainsi que son indice, aux variations souvent approximées, ou même négligées dans la littérature. La voie que nous proposons dans ce mémoire est de mesurer, par Microscopie à Force Atomique, les variations d'épaisseurs de structures, réalisées par LFE et d'épaisseurs nanométriques, suite à l'adsorption des molécules étudiées. L'étude statistique de la dispersion des épaisseurs des biocouches, possible à la fois dans l'air et en liquide, nous a ainsi renseigné sur l'épaisseur moyenne et l'orientation de monobrin d'ADN dans ces deux milieux. Leur taux de recouvrement a été évalué par l'analyse des forces d'interaction.

La connaissance de l'indice optique de l'ensemble des couches constituant le capteur optique est primordiale pour l'interprétation des mesures. L'ellipsométrie spectroscopique a été employée, dans l'air, pour caractériser l'indice et l'épaisseur de couches métalliques, qui ont servi de substrat pour l'accroche des molécules biologiques, et polymériques, aux propriétés proches de ces mêmes molécules. La potentialité de cette technique en tant que biocapteur a été évaluée au travers l'exemple des monobrin d'ADN déjà analysés par AFM. Si *ex situ*, les résultats obtenus semblent cohérents avec la mesure AFM, dans le cadre d'une approximation de l'indice de la couche par un modèle de Bruggeman et de l'indice de l'ADN par un modèle de Cauchy, nous assurant ainsi que la technique est suffisamment précise pour un contrôle de dépôt, la tentative de mesure *in situ*, respectant toutes les conditions énoncées par le cahier des charges des biocapteurs, n'a pas été concluante. Afin de réduire le nombre d'interfaces rencontrées par le faisceau lumineux, nous avons proposé d'étudier l'échantillon par face arrière. Dans cette configuration, seule l'excitation d'une onde évanescente sur la surface métallique peut nous renseigner sur d'éventuelles interactions biospécifiques.

Nous avons alors étudié théoriquement et expérimentalement la sensibilité à l'adsorption de l'excitation angulaire de la résonance des plasmons de surface, comme monocapteur, obtenue dans la configuration de Kretschmann-Raether. Parfaitement utilisable en milieu liquide, malgré une chute importante de sensibilité, cette technique nous a permis de déterminer l'indice et le taux de recouvrement des oligonucléotides modèles, dans l'air et en liquide, en nous basant sur les mesures d'épaisseurs obtenues par AFM.

La réalisation d'une cellule originale de mesure spécifique à l'ellipsomètre, permettant la lecture ellipsométrique de la RPS, a mis en évidence l'apport conséquent de la détection de la phase. Une sensibilité 15 à 20 fois supérieure à une étude en réflectivité classique est ainsi attendue lors de l'adsorption de molécules biologiques. En ce sens, le couplage plasmon / ellipsométrie est la meilleure méthode de lecture pour les capteurs chimiques et biologiques. L'ajustement en liquide des monobrin d'ADN modèles a permis de leur associer un modèle de gradient linéaire d'indice optique, et déterminer des épaisseurs en accord avec les mesures AFM. Le suivi en temps réel de l'accrochage de molécules biologiques a démontré le rôle primordial de l'encombrement stérique des molécules lors des cinétiques de greffage, alors qu'un gain d'au moins 30 % sur les vitesses de greffage a été obtenu grâce à l'électrodéposition. L'emploi de lecture ellipsométrique de la RPS à une problématique clinique, le dosage d'anticorps marqueurs de la sclérose en plaque, et à une étude physico-chimique, la cinétique de transformation de la silice en ciment CSH, a montré le vaste domaine d'application de ce capteur en tant que monocapteur.

Nous avons montré que le passage d'une plateforme monocapteur à une plateforme multicapteurs optiques était possible suivant 2 axes de recherche. Le premier axe, adapté à une étude en champ lointain de la RPS, est basé sur une imagerie en temps réel de la surface analysée à **angle fixe** proche de la résonance. Nous avons préalablement vérifié, en champ proche optique, les dimensions minimales permettant l'excitation de l'onde évanescente. Présentant une résolution spatiale inférieure à 10 μm , cette technique, couplée à un greffage localisé, autorise une étude différentielle en réflectivité de plusieurs centaines de zones d'interaction par cm^2 . L'étude multicapteurs par ellipsométrie spectroscopique, couplée ou non avec la RPS, passe par l'imagerie à balayage, à la manière d'une étude par sonde locale. La résolution spatiale obtenue est cependant inférieure à celle par imagerie par CCD, du fait de la dimension du faisceau et de sa convolution avec le système en surface. L'intérêt est néanmoins nettement plus grand, dans la mesure où il est à la fois possible de décrire spatialement une zone d'interaction à **une longueur d'onde fixe**, mais également d'acquérir **un spectre localement**, sans déplacement du système de détection, permettant alors un ajustement et donc la détermination des propriétés locales de la zone analysée. Le gain important de sensibilité grâce à la lecture ellipsométrique de la RPS, l'imagerie ainsi que la détermination locale des paramètres de la couche font que cette technique est, à notre sens, celle présentant le plus d'intérêt.

Nous pouvons maintenant clore ce mémoire en envisageant différentes perspectives et futurs développements basés sur ce travail de thèse, notamment sur la lecture ellipsométrique de la RPS.

Parmi ces perspectives, il serait dans un premier temps intéressant d'améliorer la collimation et donc de réduire le diamètre du faisceau incident tout en conservant une intensité lumineuse suffisante. Une solution envisagée est d'augmenter la puissance de la lampe à arc Xenon, en prenant garde de ne pas avoir une énergie au niveau de la couche d'or susceptible de dégrader la couche biologique.

Nous aimerions également modifier la cellule de mesure afin de thermaliser totalement le milieu liquide, dans le but, par exemple, de déterminer les plages de stabilité en températures des complexes moléculaires. De même, un couplage systématique de l'électrochimie avec la lecture ellipsométrique de la RPS permettrait, outre l'électrodéposition, de conjuguer la sensibilité de la mesure et la détection de la signature chimique de la molécule adsorbée.

Dans le but de réduire le volume de solution consommée pour l'étude de l'interaction molécules cibles/molécules sondes, nous souhaiterions mettre en contact les zones

micrométriques greffées localement avec des canaux de faibles dimensions latérales. Il s'agit donc de création de cellules de microfluidique. Le choix de ce type de dispositif permet, d'une part, de travailler *in situ* et avec de petits volumes de solution, c'est-à-dire de pouvoir réaliser toutes les étapes de greffage et de détection dans un même environnement et, d'autre part, de pouvoir effectuer des greffages simultanés dans des canaux différents. Ces systèmes, que nous présentons dans l'**Annexe B**, ont été développés récemment au laboratoire par L. Markey, un prototype de dispositif intégrant la cellule microfluidique est actuellement en élaboration.

Annexe A : Conditions d'excitation et relations de dispersion des plasmons de surface

Considérons une onde plane monochromatique TM ou (p)³, donc polarisée dans le plan (x,z), qui se propage le long de l'interface diélectrique/métal (**Figure A.1**).

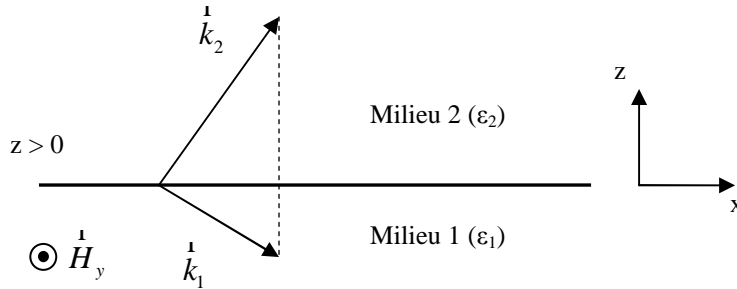


Figure A.1 : Conditions de raccord à l'interface entre deux milieux d'indice différent.

Les milieux considérés sont linéaires, homogènes et isotropes. Le système est invariant par translation selon l'axe y , on peut exprimer les champs dans les milieux 1 et 2 par :

$$\left. \begin{array}{l} z < 0 \\ \left. \begin{array}{l} \mathbf{r} \\ B_1 = \begin{bmatrix} 0 \\ B_{y1} \\ 0 \end{bmatrix} \exp[i(k_{x1}x + k_{z1}z - \omega t)] \\ \\ \mathbf{r} \\ E_1 = \begin{bmatrix} E_{x1} \\ 0 \\ E_{z1} \end{bmatrix} \exp[i(k_{x1}x + k_{z1}z - \omega t)] \end{array} \right\} \end{array} \right\} \quad (A.1)$$

$$\left. \begin{array}{l} z > 0 \\ \left. \begin{array}{l} \mathbf{r} \\ B_2 = \begin{bmatrix} 0 \\ B_{y2} \\ 0 \end{bmatrix} \exp[i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \\ \\ \mathbf{r} \\ E_2 = \begin{bmatrix} E_{x2} \\ 0 \\ E_{z2} \end{bmatrix} \exp[i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \end{array} \right\} \end{array} \right\}$$

Les équations de Maxwell, appliquées aux milieux non magnétiques, permettent d'écrire :

$$\mathop{\text{rot}}^{\mathbf{r}}(\mathop{\text{rot}}^{\mathbf{r}} H_i) = \epsilon_0 \epsilon_i \frac{\partial E_i}{\partial t} \quad (A.2)$$

$$\mathop{\text{rot}}^{\mathbf{r}}(\mathop{\text{rot}}^{\mathbf{r}} E_i) = -\mu_0 \frac{\partial H_i}{\partial t} \quad (A.3)$$

³ Remarquons qu'en polarisation TE ou (s), c'est-à-dire polarisé perpendiculairement au plan d'incidence, les composantes de \mathbf{E} et \mathbf{B} sont inversées. Dans ce cas, le champ électrique n'a pas de composante normale à l'interface. La même analyse ne conduirait pas à l'excitation d'une onde évanescente de surface.

$$\text{div}(\vec{H}_i) = 0 \quad (\text{A.4})$$

$$\text{div}(\varepsilon_i \vec{E}_i) = 0 \quad (\text{A.5})$$

Les conditions de continuités aux interfaces imposent :

$$E_{x1} = E_{x2} \quad (\text{A.6})$$

$$\varepsilon_1 E_{z1} = \varepsilon_2 E_{z2} \quad (\text{A.7})$$

$$H_{y1} = H_{y2} \quad (\text{A.8})$$

On en déduit :

$$k_{x1} = k_{x2} = k_x \quad (\text{A.9})$$

De plus, l'équation (A.3) s'exprime également par :

$$\frac{\partial H_{yi}}{\partial z} = -i\varepsilon_0 \varepsilon_i \omega E_{xi} \quad (\text{A.10})$$

Soit :

$$k_{z1} H_{y1} = \omega \varepsilon_0 \varepsilon_1 E_{x1} \quad (\text{A.11})$$

$$k_{z2} H_{y2} = -\omega \varepsilon_0 \varepsilon_2 E_{x2} \quad (\text{A.12})$$

D'après (A.6), on peut en déduire que :

$$\frac{k_{z1}}{\varepsilon_1} H_{y1} + \frac{k_{z2}}{\varepsilon_2} H_{y2} = 0 \quad (\text{A.13})$$

Le système d'équations formé par (A.8) et (A.13) admet une solution non triviale si et seulement si le déterminant calculé est nul. Cette condition implique que :

$$\frac{k_{z1}}{\varepsilon_1} + \frac{k_{z2}}{\varepsilon_2} = 0 \quad (\text{A.14})$$

La dérivée temporelle de (A.2), le rotationnel de (A.3) en combinaison avec (A.9) permettent d'en déduire la relation liant k_{zi} , k_{xi} et ω :

$$k_x^2 + k_{zi}^2 = \varepsilon_i \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 \quad (\text{A.15})$$

soit également :

$$k_{zi} = \sqrt{\left(\varepsilon_i \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 - k_x^2 \right)} \quad (\text{A.16})$$

Les équations (A.14) et (A.16) impliquent alors que :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (\text{A.17})$$

Si l'on suppose que le milieu (1) est un métal idéal dont la fonction diélectrique est analogue à celle d'un gaz d'électrons libres, ϵ_1 peut être approximée par le modèle de Drude :

$$\epsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (\text{A.18})$$

avec ω_p la pulsation de plasma du métal. La relation de dispersion à l'interface métal-diélectrique devient alors :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_2 \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}\right)}{\epsilon_2 + 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}}} \quad (\text{A.19})$$

Même si elle néglige la partie imaginaire de la fonction diélectrique du métal, la relation de dispersion (A.19) est généralement utilisée pour représenter les relations de dispersions des métaux.

Le caractère évanescent de l'onde de surface est démontré en supposant que ω et ϵ_2 sont réels et que ϵ_1 est complexe, ce qui est le cas pour les métaux, alors l'équation (A.17) devient :

$$\epsilon_2 (\epsilon_1' + i\epsilon_1'') \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 = (\epsilon_2 + \epsilon_1' + i\epsilon_1'') (k_x' + ik_x'')^2 \quad (\text{A.20})$$

L'identification des parties réelles et imaginaires conduit à :

$$\begin{aligned} k_x'^2 - k_x''^2 &= \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left(\frac{\epsilon_1' \epsilon_2^2 + (\epsilon_1''^2 + \epsilon_1'^2) \epsilon_2}{(\epsilon_1' + \epsilon_2)^2 + \epsilon_1''^2} \right) \\ k_x' k_x'' &= \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left(\frac{\epsilon_2^2 \epsilon_1''}{2 [(\epsilon_1' + \epsilon_2)^2 + \epsilon_1''^2]} \right) \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

Dans le cas où le milieu est peu absorbant ($\epsilon_1'' = |\epsilon_1'|$), ce qui est le cas de l'or, le système (A.21) se réduit à :

$$k_x' = \frac{\omega}{c} \sqrt{\left(\frac{\epsilon_1' \epsilon_2'}{\epsilon_1' + \epsilon_2'} \right)} \quad (\text{A.22})$$

$$k_x'' = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_1' \epsilon_2'}{\epsilon_1' + \epsilon_2'} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{\epsilon_1''}{2\epsilon_1'^2}$$

Si $\epsilon_1' < 0$ et $|\epsilon_1'| > \epsilon_2'$, alors k_x' est effectivement réel. Ces conditions imposent que $k_x' > \omega/c$: dans ce cas k_{zi} est un imaginaire pur. L'onde est bien une onde de surface qui se propage selon l'axe des x et dont l'amplitude décroît quand $|z| \rightarrow \infty$. Une étude similaire pour une polarisation (s) montre qu'il est impossible d'obtenir une onde évanescente dans ce cas.

Le fait que $k_x' > \omega/c$ assure un champ évanescent mais ne permet pas que ces ondes soient excitées par la lumière. Deux méthodes sont couramment utilisées pour atteindre la résonance :

- un réseau de diffraction de pas a, illuminé sous une incidence θ_0 , permet d'atteindre des valeurs de $k_x = (\omega/c) \sin \theta_0 \pm 2\pi m/a$, où m est entier. Pour des valeurs particulières de m, la condition $k_x = k_{\text{plasmon}}$ est réalisée.

- d'un prisme d'indice supérieur à 1, permet de retrouver cette égalité. Les droites de lumière lient k_x à ω pour chaque milieu diélectrique, elles sont représentées sur la **Figure A.2**. La droite de lumière $k = (\omega/c)$, en pointillés noirs sur la figure, définit la frontière entre les ondes radiatives (à gauche) et les ondes évanescentes (à droite) dans l'air. De même la droite de lumière $k = (\omega/c) \sqrt{\epsilon_{\text{Diél}}}$, en rouge, définit la frontière entre ces deux types d'onde dans le diélectrique si $\sqrt{\epsilon_{\text{Diél}}}$ désigne l'indice optique du diélectrique. La courbe de dispersion du plasmon de surface à l'interface métal - air, en trait plein noir, étant située sous la droite de lumière de l'air, le plasmon ne pourra être excité que par une onde évanescente dans l'air.

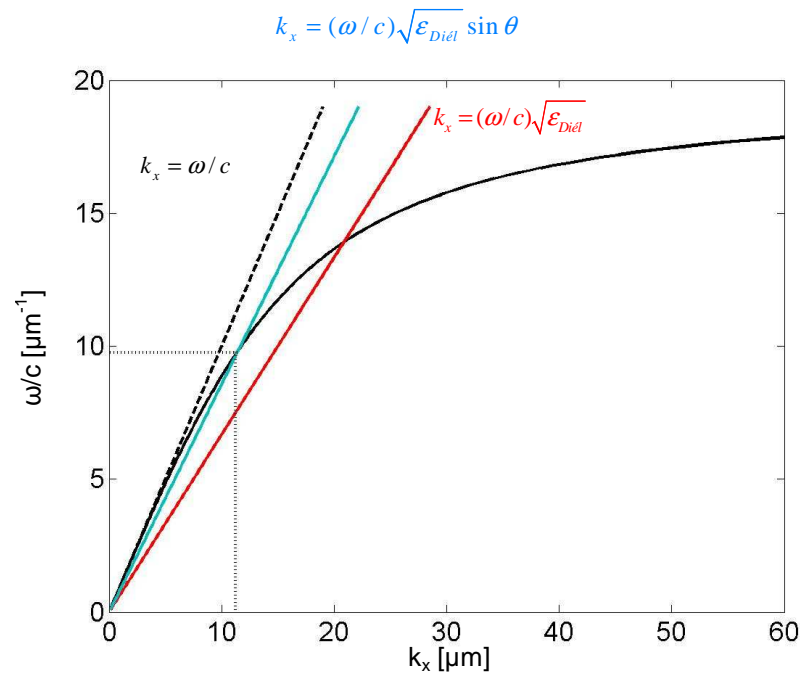


Figure A.2 : Relations de dispersion de l'air (en pointillés noir), du diélectrique (en rouge), de l'onde incidente (en bleu) et du métal (en noir). La résonance est marquée en pointillés fins.

La courbe de dispersion du plasmon intersekte la droite de lumière du diélectrique. Ainsi des ondes radiatives dans le diélectrique sont susceptibles d'exciter le mode de plasmon de l'interface métal - air. Pour une incidence θ , on peut définir une nouvelle droite de lumière correspondant à l'onde émise, décrite par $k = (\omega/c)\sqrt{\epsilon_{\text{Diél}}}\sin\theta$. Si cette droite est comprise entre la droite de lumière de l'air et celle du diélectrique, il existera un couple (k_x, ω) permettant l'excitation du plasmon de surface : celle-ci est obtenue pour la valeur de k_x où la courbe de dispersion du plasmon intersekte la droite de lumière de l'onde incidente, on parlera alors de résonance (représenté en pointillés fins sur la figure). Dans cette configuration l'énergie lumineuse sera transmise, ce qui conduira à une nette diminution de l'intensité réfléchie. Une étude en champ lointain de l'intensité réfléchie conduira à l'observation d'un pic d'absorption. Une étude en champ proche optique de la surface métallique mettra en évidence l'apparition d'une onde évanescente à la surface du métal, se propageant parallèlement à l'interface.

Annexe B : Etapes de la réalisation de cellules microfluidique

Les dispositifs microfluidiques sont conçus par moulage dans un polymère, le poly(diméthylsiloxane) (PDMS). La réalisation d'une cellule microfluidique repose sur plusieurs étapes largement présentées dans la littérature [180-182].

(a) fabrication d'un masque par LFE

Un masque de chrome déposé sur un substrat transparent est réalisé par LFE. Ce masque est la représentation 2D du motif souhaité, c'est-à-dire l'agencement des micro - canaux et ainsi que les zones d'arrivées de solutions. Les étapes de lithographie et d'évaporation de métaux suivent le même protocole que précédemment.

(b) réalisation de l'empreinte par lithographie UV

Une résine photosensible SU8 est déposée ensuite sur un substrat de silicium par centrifugation. Une épaisseur de résine d'environ 20 μm est ainsi obtenue. Celle-ci est recuite sur une plaque chauffante à 65°C pendant une minute puis à 95°C pendant deux minutes. L'insolation de cette résine à travers le masque est effectuée par lithographie UV (Karl Süss – MJB 21). L'échantillon est ensuite recuit pendant 15 minutes à 95°C afin d'accélérer la réticulation de la résine. La résine est dite négative, les parties non protégées par le masque vont être éliminées en trempant l'échantillon pendant 30 s dans le développeur. La réaction est stoppée dans un bain d'isopropanol. L'ensemble est de nouveau étuvé à 150°C pendant deux minutes. Une fois ces étapes réalisées, une empreinte du motif en SU8, d'épaisseur d'environ 20 μm , et de géométrie définie lors de la création du masque, est disponible.

(c) moulage de la cellule

Le PDMS est homogénéisé pendant 10 minutes par une agitation avec un barreau magnétique puis dégazé sous une cloche à vide pendant 30 minutes. La solution obtenue est versée dans un tube, contenant l'empreinte réalisée précédemment. Un recuit d'une heure est nécessaire pour durcir le PDMS. Après refroidissement de l'ensemble, la cellule est démoulée. Pour assurer une bonne adhérence de la cellule sur le substrat, le PDMS est oxydée par un plasma d'oxygène. Cette étape permet de rendre la cellule hydrophile et de faciliter ainsi l'écoulement des liquides dans les canaux. Les **Images A.1**, réalisées par MEB, montre une coupe d'un canal ainsi réalisé. La profondeur des canaux est d'environ 20 μm , la largeur choisie est de 50 μm .

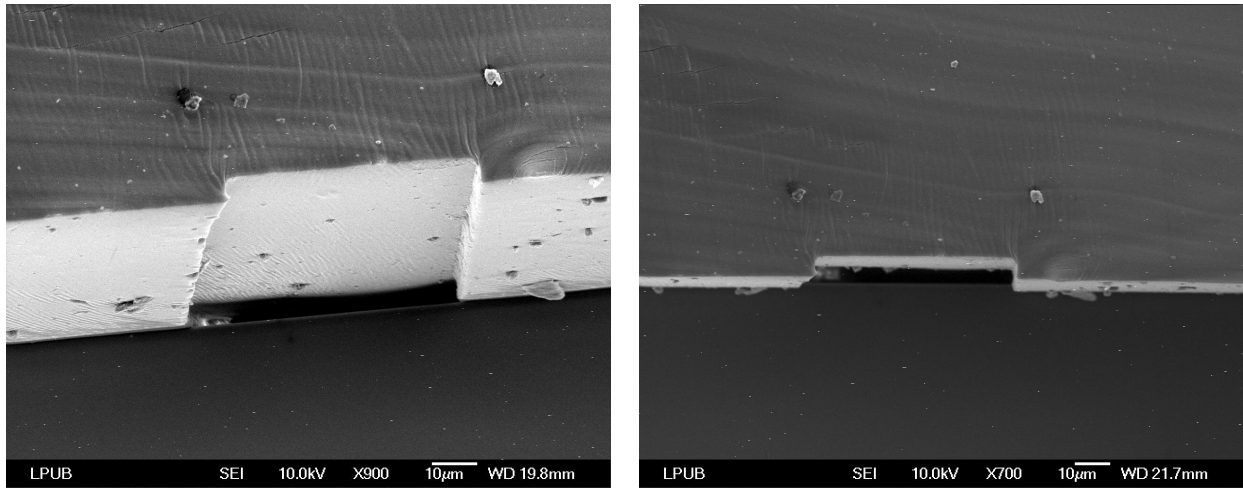


Figure A.1 : Images MEB de la coupe d'un canal microfluidique réalisé au laboratoire sous deux orientations différentes : une largeur de 50 μm et une profondeur de 10 μm sont ici visualisées.

Le dispositif final est présenté dans la **Figure A.2**. L'entrée et l'évacuation des fluides sont assurées par des tuyaux en silicone, préalablement fixés dans le PDMS.

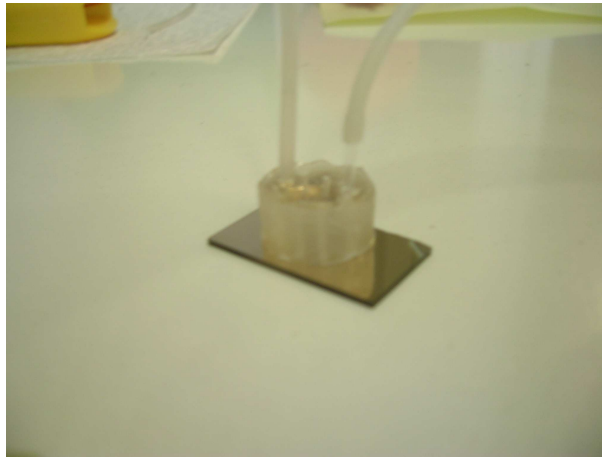


Figure A.2 : Photos d'une cellule de microfluidique réalisée au laboratoire.

Bibliographie

1. Avery OT, McLeod CMM, M.: **Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III.** *J. Exp. Med* 1944, **79**:137-158.
2. Watson JD, Crick FHC: **A structure for desoxyribose nucleic acid.** *Nature* 1953, **171**:737-738.
3. Consortium TGIS: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**:860-921.
4. Crick FHC: **The origin of the genetic code.** *J Mol Biol* 1968, **38**:367-379.
5. Busse S, Scheumann V, Mengesn B, Mittler S: **Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods.** *Biosensors&Bioelectronics* 2002, **17**:704-710.
6. Houseman BT, Gawalt ES, Mrksch M: **Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips.** *Langmuir special issue entitled The biomolecular interface* 2002.
7. Millot MC, Martin F, Mangin C, Lévy Y, Sébille B: **Use of polymethacryloyl chloride to immobilize proteins onto gold surfaces. Detection by surface plasmon resonance.** *Materials Science & Engeneering C* 1999, **7**:3-10.
8. Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM: **Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports.** *Nucleic Acids Research* 1994, **22**.
9. Hammond PT: **Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly.** *Current Opinion in colloid & Interface Science* 2000, **4**:430-442.
10. Brzoska JB, Ben Azouz I, Rondelez F: **Silanization of Solid Substrates: A Step Toward Reproducibility.** *Langmuir* 1994, **10**:4367.
11. Poirier GE, Pylant ED: **The self-assembency mechanism of alkanethiols on Au (111).** *Science* 1996, **272**:1145-1148.
12. Ulman A: *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly.* Edited by Janovitch HB. Boston; 1991.
13. Ulman A, Kang JF, Shnidman Y, Liao S, Jordan R, Choi GY, Zaccaro J, Myerson AS, Rafailovich M, Sokolov J, et al.: **Self-assembled monolayers of rigid thiols.** *Reviews in Molecular Biotechnology* 2000, **74**:175-188.
14. Schreiber F: **Structure and growth of self-assembling monolayers.** *Progress in Surface Science* 2000, **65**:151-256.
15. Medalia O, Englander J, Guckenberger R, Sperling J: **AFM imaging in solution of protein-DNA complexes formed on DNA anchored to a gold surface.** *Ultramicroscopy* 2002, **90**:103-112.
16. Diaz AF, Kanazawa KK, Gardini GP: **Electrochemical polymerization of pyrrole.** *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, **14**:635-636.
17. Livache T, Bazin H, Caillat P, Roget A: **Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips.** *Biosensors&Bioelectronics* 1998, **13**:629-634.

18. Garnier F, Korri-Youssoufi H, Srivastava P, Mandrand B, Delair T: **Toward intelligent polymers: DNA sensors based on oligonucleotide-functionalized polypyrroles.** *Synthetic Metals* 1999, **100**:89-94.
19. Livache T, Guedon P., Brakha C., Roget A., Levy Y., Bidan G.: **Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with surface plasmon resonance hybridization detection.** *Synthetic Metals* 2001, **121**:1443-1444.
20. Bassil N, Maillard E, Canva M, Levy Y, Millot MC, Pissard S, R. N, Goossens M: **One hundred spot parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutation.** *Sensors and Actuators B* 2003, **94**:313-323.
21. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D: **Light-directed, spatially addressable parallel chemical analysis.** *Science* 1991, **251**:767-773.
22. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP: **Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:5022-5026.
23. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995, **270**:467-470.
24. Peter JC, Briand JP, Hoebeker J: **How biotinylation can interfere with recognition: a surface plasmon resonance study of peptide-antibody interactions.** *J. Immunol. Methods* 2003, **274**:149-158.
25. Okahata Y, Kawase M, Niikura K, Ohtake F, Furusawa H, Ebara Y: **Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance.** *Analytical Chemistry* 1998, **70**:1288-1296.
26. Manelli I, Minunni M, Tombelli S, Wang R, Spiriti MM, Mascini M: **Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors.** *Bioelectrochemistry* 2004, **66**:129-138.
27. Hang TC, Guiseppi-Elie A: **Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **19**:1537-1548.
28. Rickert J, Brecht A, Göpel W: **Quartz crystal microbalances for quantitative biosensing and characterizing protein multilayers.** *Biosensors&Bioelectronics* 1997, **12**:567-575.
29. Bidan G, Billon M, Galasso K, Livache T, Mathis G, Roget A, Torres-Rodriguez LM, Vieil E: **Electropolymerization as a Versatile Route for Immobilizing Biological Species onto Surfaces. Application to DNA Biochips.** *Applied Biochem.* 2000, **89**:183-193.
30. Barié N, Rapp M: **Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors.** *Biosensors&Bioelectronics* 2001, **16**:979-987.
31. Welsch W, Klein C, Schickfus M, Hunklinger S: **Development of a Surface Acoustic Wave Immunosensor.** *Analytical Chemistry* 1996, **68**:200-204.
32. Gizeli E, Bender F, Rasmusson A, Saha K, Josse F, Cernosek R: **Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties.** *Biosensors&Bioelectronics* 2003, **18**:1399-1406.
33. Hur J, Han J, Seon J, Pak YE, Roh Y: **Development of an SH-SAW sensor for the detection of DNA hybridization.** *Sensors and Actuators A* 2005, **120**:462-467.

34. Mertens J, Finot E, Thundat T, Fabre A, Nadal MH, Eyraud V, Bourillot E: **Effects of temperature and pressure on microcantilever resonance response.** *Ultramicroscopy* 2003, **97**:119-126.
35. Fabre A, Finot E, Demoment J, Contreras S: **Monitoring the chemical change of Pd induced by hydrogen absorption using microcantilevers.** *Ultramicroscopy* 2003, **97**:425-432.
36. Thundat T, Watcher EA, Sharp SL, Warmack RJ: **Detection of mercury vapor using resonating microcantilevers.** *Appl. Phys. Lett.* 1995, **66**:1695-1697.
37. Fritz J, Baller MK, Lang HP, Rothuizen H, Vettiger P, Meyer E, Guntherodt HJ, Gerber C, Gimzewski JK: **Translating biomolecular recognition into nanomechanics.** *Science* 2000, **288**:316-318.
38. Hansen KM, Ji H-F, Wu G, Datar R, Cote R, Majumdar A, Thundat T: **Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches.** *Analytical Chemistry* 2001, **73**:1567-1571.
39. Marie R, Jensenius H, Thaysen J, Christensen CB, Boisen A: **Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNA-oligos on gold investigated by microcantilever sensors.** *Ultramicroscopy* 2002, **91**:29-36.
40. Su M, Li S, Dravida VP: **Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes.** *Appl. Phys. Lett.* 2003, **82**:3562-3564.
41. Huber F, Hegner M, Gerber C, Guntherodt HJ, Langa HP: **Label free analysis of transcription factors using microcantilever arrays.** *Biosensors&Bioelectronics* 2005, **In Press**.
42. Liu S, Li J, Dong S: **Interaction of brilliant cresyl blue and methylene green with DNA studied by spectrophotometric and voltammetric methods.** *Electroanalysis* 1996, **8**:803-807.
43. Erdem A, Kerman K, Meric B, Ozsoz M: **Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator.** *Electroanalysis* 2001, **13**:219-223.
44. Carter MT, Rodriguez M, Bard AJ: **Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine.** *J. Am. Chem. Soc.* 1989, **11**:8901-8911.
45. Kelley SO, Boon EM, Jackson NM, Hill MG, Barton JK: **Mismatch Detection Based on Charge Transduction Through DNA.** *Nucleic Acids Research* 1999, **27**:4830-4837.
46. Pearson JE, Gill A, Vadgama P: **Analytical aspect of biosensors.** *Ann. Clin. Biochem.* 2000, **37**:119-145.
47. Fritz J, Cooper EB, Gaudet S, Sorger PK, Manalis SR: **Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, **99**:14142-14146.
48. Luo XL, Xu JJ, Zhao W, Chen HY: **A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **19**:1295-1300.
49. Wang J, Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Dontha N.: **Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips.** *Biosensors&Bioelectronics* 1997, **12**:587.
50. Pandey PC, Upadhyay S, Upadhyay B: **Peroxide Biosensors and Mediated Electrochemical Regeneration of Redox Enzymes.** *Analytical Biochemistry* 1997, **252**:136-142.
51. Brett CMA, Oliveira Brett AM, Serrano SHP: **An EIS study of DNA-modified electrodes.** *Electrochim. Acta* 1999, **44**:4233-4239.

52. Finot E, Bourillot E, Meunier-Prest R, Lacroute Y, Legay G, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N, Siri O, Braunstein P, Dereux A: **Performance of interdigitated nanoelectrodes for electrochemical DNA biosensor.** *Ultramicroscopy* 2003, **97**:441-449.
53. Legay G: **Elaboration d'un nanocapteur électrochimique à ADN.** *Stage de DEA, Université de Bourgogne* 2002.
54. Shumaker-Parry JS, Zareie MH, Aebersold R, Campbell CT: **Microspotting Streptavidin and Double-Stranded DNA Arrays on Gold for High-Throughput Studies of Protein-DNA Interactions by Surface Plasmon Resonance Microscopy.** *Analytical Chemistry* 2004, **76**:918-929.
55. Meunier-Prest R, Raveau S, Finot E, Legay G, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N: **Direct measurement of the melting temperature of supported DNA by electrochemical method.** *Nucleic Acids Research* 2003, **31**.
56. Boon EM, Kisko JL, Barton JK: **Detection of DNA Base Mismatches Using DNA Intercalators.** *Methods in Enzymology* 2002, **353**:506-522.
57. Drude P: *Ann. Physik und Chemie* 1889, **532** and **865**.
58. Jellison GE: **Spectroscopic ellipsometry data analysis : measured versus calculated quantities.** *Thin solid films* 1998, **313-314**:33-39.
59. Vedam K: **Spectroscopic ellipsometry : a historical overview.** *Thin solid films* 1998, **313-314**:1-9.
60. Aspnes D: **Expanding horizons: new developments in ellispometry and polarimetry.** *Thin solid films* 2004, **455-456**:3-13.
61. Wakagi M, Hong B, Nguyen HV, Collins RW, Drawl W, Messier R: **Characterization of Substrate Temperature and Damage in Diamond Growth Plasmas by Multichannel Spectroellipsometry.** *J. Vac. Sci. Technol. A* 1995, **13**:1917-1923.
62. Arwin H: **Spectroscopic ellipsometry for characterization and monitoring of organic layers.** *Phys. Stat. Sol. (A)* 2001, **188**:1331-1338.
63. Zangoie S, Bjorklund R, Arwin H: **Vapor sensitivity of thin porous silicon layers.** *Sensors and Actuators B* 1997, **43**:168-174.
64. Guo S, Rochotzki R, Lundström I, Arwin A: **Ellipsometric sensitivity to halothane vapors of hexamethyldisiloxane plasma polymer films.** *Sensors and Actuators B: Chem* 1997, **44**:243-427.
65. Arwin H: **Is ellispometry suitable for sensor applications?** *Sensors and Actuators A* 2001, **92**:43-51.
66. Arwin H: **Spectroscopic ellipsometry and biology : recent developments and challanges.** *Thin solid films* 1998, **313-314**:764-774.
67. Gray DE, Case-Green SC, Fell TS, Dobson PJ, Southern EM: **Ellipsometric and interferometric characterization of DNA probes immobilised on a combinatorial array.** *Langmuir* 1997, **13**:2833-2842.
68. Karlsson LM, Schubert M, Ashkenov N, Arwin H: **Protein adsorption in porous silicon gradients monitored by spatially-resolved spectroscopic ellipsometry.** *Thin solid films* 2004, **455-456**:726-730.
69. Tengvall P, Lundström I, Liedberg B: **Protein adsorption studies on model organic surfaces: an ellipsometric and infrared spectroscopic approach.** *Biomaterials* 1998, **19**:407-422.

70. Ostroff RM, Hopkins D, Haerberli AB, Baouchi W, Polisky B: **Thin film biosensor for rapid visual detection of nucleic acid targets.** *Clinical Chemistry* 1999, **45**:1659-1664.
71. Bae YM, Oh B-K, Lee W, Lee WH, Cho ijW: **Detection of insulin–antibody binding on a solid surface using imaging ellipsometry.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **20**:895-902.
72. Rekveld S: *Ellipsometric studies of protein adsorption onto hard surfaces in a flow cell.* Febodruk Enschede, Netherland; 1997.
73. Ortega-Vinuesa JL, Tengvall P, Wälivaara B, Lundström I: *J. Biomater* 1998, **19**:251.
74. Ritchie RH: **Plasma losses by fast electrons in thin films.** *Phys. Rev.* 1957, **1**:874-881.
75. Otto A: **Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by method of frustrated total refraction.** *Z. Phys.* 1968, **216**:398.
76. Kretschmann E, Raether H: **Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light.** *Z. Naturforsch.* 1968, **23A**:2135-2136.
77. Liedberg B, Nylander, C., Lundström, I.: **Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing.** *Sensors and Actuators* 1983, **4**:299-304.
78. Raether H: *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings:* G. Höhler & E. Niekisch; 1988.
79. de Bruijn HE, Altenburg BSF, Kooyman RPH, Greve J: **Choice of metal and wavelength for surface plasmon resonance sensors : some considerations.** *Appl. Optics* 1992, **31**:440-442.
80. Yeatman EM: **Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing.** *Biosensors&Bioelectronics* 1996, **11**:635-649.
81. Homola J, Yee SS, Gauglitz G: **Surface plasmon resonance sensors: review.** *Sensors and Actuators B* 1999, **54**:3-15.
82. Georgiadis G, Peterlinz KP, Peterson AW: **Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy.** *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**:3166-3173.
83. Karlsson R: **SPR for molecular interaction analysis : a review of emerging application areas.** *J. Mol. Recognit.* 2004, **17**:151-161.
84. Spadavecchia J. MMG, Quaranta F., Siciliano P., Rella R.: **Surface plasmon resonance imaging of DNA based biosensors for potential applications in food analysis.** *Biosensors&Bioelectronics* 2005, **21**:894-900.
85. Leonard P, Hearty S, Brennan J, Dunne L, Quinn J, Chakraborty T, O'Kennedy R: **Advances in biosensors for detection of pathogen in food and water.** *Enzyme and Microbial Technology* 2003, **32**:3-13.
86. Xuan H, Hage DS: **Immobilization of α 1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug–protein binding.** *Analytical Biochemistry* 2005, **In Press**.
87. Kim SK, et al.: **Evaluation of absorption of heparin-DOCA conjugates on the intestinal wall using a surface plasmon resonance.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, **39**:861-870.

88. Ciolkowski ML, Fang MM, Lund ME: **A surface plasmon resonance method for detecting multiple modes of DNA-ligand interactions.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, **22**:1037-1045.
89. Kim S, Ock K, Kim J, Koh K, Kang S: **Optical properties and molecular orientation of self-assembled monolayer using surface plasmon resonance spectroscopy.** *Dyes and Pigments* 2001, **48**:1-6.
90. Lotierzo M, Henry OYF, Piletsky S, Tothill I, Cullen D, Kania M, Hock B, Turner APF: **Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **20**:145-152.
91. Peterson AW, Heaton, R. J., Georgiadis, R. M.: **Kinetic Control of Hybridization in Surface Immobilized DNA Monolayer Films.** *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**:7837-7838.
92. Peterson AW, Heaton RJ, Georgiadis RM: **The effect of surface probe density on DNA hybridization.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**:5163-5168.
93. Peterson AW, Wolf LK, Georgiadis RM: **Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces.** *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**:14601-14607.
94. Pfeifer P, Aldinger U, Schwotzer G, Diekmann S, Steinrücke P: **Real time sensing of specific molecular binding using surface plasmon spectroscopy.** *Sensors and Actuators B* 1999, **54**:166-175.
95. Salamon ZA, Macleod HA, Tollin G: **Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1997, **1331**:117-129.
96. Tsoi PY, Yang M: **Surface plasmon resonance study of the molecular recognition between polymerase and DNA containing various mismatches and conformational changes of DNA-protein complexes.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **19**:1209-1218.
97. Homola J, Dostalek J, Chen S, Rasooly A, Jiang S, Yee SS: **Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk.** *International Journal of Food Microbiology* 2002, **75**:61-69.
98. Yuk JS, Kim HS, Jung JW, Jung SH, Lee SJ, Kim WJ, Han JA, Kim YM, Ha KS: **Analysis of protein interactions on protein arrays by a novel spectral surface plasmon resonance imaging.** *Biosensors&Bioelectronics* 2005, **in press**.
99. Stemmler I, Brecht A, Gauglitz G: **Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications.** *Sensors and Actuators B: Chem* 1999, **54**:98-105.
100. Chan WH, Choi MF, Zhao X: **A low-cost surface plasmon resonance instrument based on detection of resonance excitation wavelength.** *Microchemical Journal* 2003, **74**:113-119.
101. Chien FC, Chen SJ: **A sensitivity comparison of optical biosensors based on four different surface plasmon resonance modes.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **20**:633-642.
102. Maillart E: **Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel.** Université Paris XI: 2004.
103. Bassil N: **Système de biopuce optique en temps réel : Application au diagnostic génétique.** *Thèse Université Paris XI* 2005.

104. Piliarik M, Vaisocherová H, Homola J: **A new surface plasmon resonance sensor for high-throughput screening applications.** *Biosensors&Bioelectronics* 2005, **20**:2104-2110.
105. Poksinski M, Arwin H: **Copper corrosion monitoring with total internal reflection ellipsometry.** *J. Electrochem. Soc* 2003, **150**:536-539.
106. Poksinski M, Arwin H: **In situ monitoring of metal surfaces exposed to milk using total internal reflection ellipsometry.** *Sensors and Actuators B* 2003, **94**:247-252.
107. Poksinski M, Arwin H: **Protein monolayers monitored by internal reflection ellipsometry.** *Thin solid films* 2004, **455-456**:716-721.
108. Westphal P, Bornmann A: **Biomolecular detection by surface plasmon enhanced ellipsometry.** *Sensors and Actuators B* 2002, **84**:278-282.
109. Nabok AV, Tsargorodskaya A, Hassan AK, Starodub NF: **Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins.** *Applied Surface Science* 2005, **246**:381-386.
110. http://www.nanofilm.de/fset_hm/fset_wel.html.
111. Chiorcea Paquim AM, Diculescu VC, Oretskaya TS, Oliveira Brett AM: **AFM and electroanalytical studies of synthetic oligonucleotide hybridization.** *Biosensors&Bioelectronics* 2004, **20**:933-944.
112. Brett AMO, Paquim AC: **DNA imaged on a HOPG electrode surface by AFM with controlled potential.** *Bioelectrochemistry* 2004, **66**:17-124.
113. Huang E, Satjapipat M, Han S, Zhou F: **Surface Structure and Coverage of an Oligonucleotide Probe Tethered onto a Gold Substrate and Its Hybridization Efficiency for a Polynucleotide Target.** *Langmuir* 2001, **17**:1215-1224.
114. Rouillat MH, Dugas V, Martin JR, Phaner-Goutorbe M: **Characterization of DNA chips on the molecular scale before and after hybridization with an atomic force microscope.** *Applied Surface Science* 2005, **252**:1765-1771.
115. Doudevski I, Hayes WA, Woodward JT, Schwartz DK: **Atomic force microscope imaging of molecular aggregation during self-assembled monolayer growth.** *Colloids and Surfaces A* 2000, **174**:233-243.
116. Butta HJ, Cappellab B., Kappla M.: **Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications.** *Surface Science Reports* 2005, **In press**.
117. Finot E, Lesniewska E, Goudonnet JP, Mutin JC, Domenech M, Ait Kadi A: **Correlating surface forces with surface reactivity of gypsum crystals by atomic force microscopy. Comparison with rheological properties of plaster.** *Solid State Ionics* 2001, **141-142**:39-46.
118. Walsh CB, Franses EI: **Thicknes and quality of spin-coated polymer films by two-angle ellipsometry.** *Thin solid films* 1999, **347**:167-177.
119. Sasaki YC, et al.: **Two-dimensional arrangement of a functional protein by cystein-gold interaction : enzyme activity and characterization of a protein monolayer on a gold substrate.** *Biophys. J.* 1997, **72**:1842-1848.
120. <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=116341119270995&pdbId=1CEZ>.
121. Holmberg M, Kühle A, Garneas J, Boisen A: **Hybridisation of short DNA molecules investigated with in situ atomic force microscopy.** *Ultramicroscopy* 2003, **97**:257-261.

122. Legay G, Finot E, Meunier-Prest R, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N, Dereux A: **DNA nanofilm thickness measurement on microarray in air and in liquid using an atomic force microscope.** *Biosensors & Bioelectronics* 2005, **21**:627-636.
123. Derjaguin BV, Muller VM, Toropov YP: *J. Colloid. Interface Sci* 1975, **53**:314-320.
124. Johnson KL, Kendall K, Roberts AD: *Proc. R. Soc. London* 1971, **324**:301-309.
125. Sneddon IN: *International Journal of Engineering Science* 1965, **3**:47-57.
126. Stark RW, Drobek T, Weth M, Frickef J, Heckel WM: **Determination of elastic properties of single aerogel powder particles with the AFM.** *Ultramicroscopy* 1998, **75**:161-169.
127. Butt HJ: **Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope.** *Biophys. J.* 1991, **60**:1438-1444.
128. Meagher L, Griesser HJ: **Interactions between adsorbed lactoferrin layers measured directly with the atomic force microscope.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2002, **23**:125-140.
129. Israelachvili J: *Intermolecular and Surface Forces*. Edited by Press A. London; 1992.
130. Abeles F: **Recherches sur la propagation des ondes sinusoïdales dans les milieux stratifiés. Application aux couches minces.** *Ann. Phys., Paris, 12ème série* 1950, **5**:596-640.
131. Born M, Wolf E: *Principles of optics* edn 7th expanded edition: Cambridge University Press; 1999.
132. Azzam RMA, Bashara NM: *Ellipsometry and Polarized Light*. Edited by Holland N. Amsterdam; 1977.
133. Mossotti OF: *Mem. Sci. Moden* 1850, **14**:49.
134. Maxwell Garnett JC: *Phil. Trans* 1904, **203**:385.
135. Bruggeman DAG: *Annal. Phys.* 1935, **24**:636.
136. Drevillon B, Perrin J, Marbot R, Violet A, Dalby JL: *Rev. Sci. Instr.* 1982, **53**:969.
137. Jaspersen SN, Schnatterly SE: *Rev. Sci. Instr.* 1969, **40**:761.
138. Stchakovsky M: **Conception et réalisation d'un ellipsomètre spectroscopique à modulation de phase. Application à l'étude d'interfaces de matériaux en couches minces.** *Thèse Université Paris-Sud Orsay* 1991.
139. Bevington: *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. New York: McGraw-Hill; 1969.
140. Aspnes D: *Spectroscopic ellipsometry of solids-new developments*. North Holland: ed B. Seraphin; 1976.
141. Palick ED: *Handbook of optical constants of solids*: Orlando FL : Academic; 1985.
142. Snopok BA, Kostyukevich KV, Lysenko SI, Lytvyn PM, Lytvyn OS, Mamykin SV, Zynyo SA, Shepelyavyj PE, Kostyukevich SA, Shirshov YM, et al.: **Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters.** *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics* 2001, **4**:56-69.
143. Oates TWH, Ryves L, Bilek MMM, McKenzie DR: **Accurate determination of optical and electronic properties of ultra-thin silver films for biosensor applications.** *sENSors and Actuators B* 2005, **109**:146-152.

144. George MA, Glauninger WS, Thundat T, Lindsay SM: **Electrical, spectroscopic, and morphological investigation of chromium diffusion through gold films.** *Thin solid films* 1990, **189**:59-72.
145. Al-Attar HA, A.Dh T: **Optical constants of polyaniline/poly(methylmethacrylate) blend.** *Optics communications* 2004, **229**:263-270.
146. Tan CZ: **Review and analysis of refractive index temperature dependence in amorphous SiO₂.** *Journal of Non-Crystalline Solids* 1997, **238**:30-36.
147. http://www.chimietech.com/francais/microelectronique/mcc_nano_pmma_f.htm.
148. http://www.microchem.com/products/pmma_faq.htm.
149. Kahle O, Wielsch U, Metzner H, Bauer J, Uhlig C, Zawatzki C: **Glass transition temperature and thermal expansion behaviour of polymer films investigated by variable temperature spectroscopic ellipsometry.** *Thin solid films* 1998, **313-314**:803-807.
150. Singh L, Ludovice PJ, Henderson CL: **Influence of molecular weight and film thickness on the glass transition temperature and coefficient of thermal expansion of supported ultrathin polymer films.** *Thin solid films* 2004, **449**:231-241.
151. Elhadj S, Singh G, Saraf RF: **Optical properties of an immobilized DNA monolayer from 255 to 700 nm.** *Langmuir* 2004, **20**:5539-5543.
152. Chiang KL, Krull UJ, Nikolelos DP: **Ellipsometric determination of the structure of surface-stabilized bilayer lipid membranes on silver metal.** *Analytica Chimica Acta* 1997, **357**:73-77.
153. Riquelme BD, Valverde JR, Rasia RJ: **Kinetic study of antibody adhesion on a silicon wafer by laser reflectometry.** *Biosensors&Bioelectronics* 2003, **18**:635-647.
154. Bae YM, Oh B-K, Lee W, Lee WH, Choi JW: **Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer.** *Biosensors&Bioelectronics* 2005, **21**:103-110.
155. Martensson J, Arwin H: **Interpretation of spectroscopic ellipsometry data on protein layers on gold including substrate layer interactions.** *Langmuir* 1995, **11**:963-968.
156. Langmuir I: **The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum.** *J. Am. Chem. Soc.* 1918, **40**:1361-1403.
157. Dannenberg O, Buck M, Grunze M: **Self-Assembly of n-Alkanethiols: a kinetic study by second harmonic generation.** *J. Phys. Chem. B* 1999, **103**:2202-2213.
158. Peterlinz KA, Georgiadis R: **In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy.** *Langmuir* 1996, **12**:4731-4740.
159. Rahn JR, Hallock JR: **Antibody binding to antigen-coated substrates studied with surface plasmon oscillations.** *Langmuir* 1995, **11**:650-654.
160. Biebuyck H.A. BCD, Whitesides G.M.: **Comparison of Organic Monolayers on Polycrystalline Gold Spontaneously Assembled from Solutions Containing Dialkyl Disulfides or Alkanethiols.** *Langmuir* 1994, **10**:1825-1831.
161. Fruböse C, Doblehofer K: **In situ quartz-microbalance study of the self-assembly and stability of aliphatic thiols on polarized gold electrodes.** *Chem. Soc., Faraday Trans.* 1995, **91**:1949-1953.

162. Shimazu K, Yi Sato Y, Uosaki K.: **In situ and dynamic monitoring of the self-assembling and redox processes of a ferrocenylundecanethiol monolayer by electrochemical quartz crystal microbalance.** *Langmuir* 1992, **8**:1385-1387.
163. Pan W, Durning CJ, Turro NJ: **Kinetics of Alkanethiol Adsorption on Gold.** *Langmuir* 1996, **12**:4469-4473.
164. Karpovich DS, Blanchard GJ: **Direct Measurement of the Adsorption Kinetics of Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers on a Microcrystalline Gold Surface.** *Langmuir* 1994, **10**:3315-3322.
165. Jensenius H: **Microcantilever-based studies of bio/chemical systems.** Lyngby, Denmark: Technical University of Denmark: 2002.
166. Mirsky VM: **New electroanalytical applications of self-assembled monolayers.** *Trends in analytical chemistry* 2002, **21**:439-450.
167. Ma F, Lennox RB: **Potential-assisted deposition of alkanethiols on Au: controlled preparation of single and mixed component SAMs.** *Langmuir* 2000, **16**:6188-6190.
168. Bain CD, Troughton EB, Tao YT, Evall J, Whitesides GM, R.G. N: **Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold.** *J. Am. Chem. Soc.* 1989, **111**:321-335.
169. Kim YT, McCarley RL, Bard AJ: **Observation of n-octadecanethiol multilayer formation from solution onto gold.** *Langmuir* 1993, **9**:1941-1944.
170. Yan C, Götzhäuser A, Grunze M: **Formation of Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers on Oxidized Gold Surfaces.** *Langmuir* 1999, **15**:2414-2419.
171. Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojavljevic N, Dujmovic I, Stojkovic MM: **Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients.** *Journal of the Neurological Sciences* 2003, **211**:67-73.
172. Mazzucco S, Mata S, Vergelli M, Fioresi R, Nardi E, Mazzanti B, Chelli M, Lolli F, Ginanneschi M, Pinto F, et al.: **A synthetic glycopeptide of human myelin oligodendrocyte glycoprotein to detect antibody responses in multiple sclerosis and other neurological diseases.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1999, **9**:167-172.
173. Livache T, Bazin, Maillart E, Lasalle N, Mailley P, Corso B, Guedon P, Roget A, Levy Y: **Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, **32**:687-696.
174. Grosjean L, Cherif B, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PA, Villiers MB, Livache T: **A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process.** *Analytical Biochemistry* 2005, **347**:193-200.
175. Maillart E, Brengel-Pesce K, Capela D, Roget A, Livache T, Canva M, Levy Y, Soussi T: **Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction.** *Oncogene* 2004, **23**:5543-5550.
176. Weeber JC, Finot E, Legay G, Cathelat A, Lacroute Y, Dereux A: **Surface plasmon near-field imaging of very thin microstructured polymer layers.** *Langmuir* 2004, **20**:10179-10185.
177. Steiner G, Sablinskas V, Hübner A, Kuhne C, Salzer R: **Surface plasmon resonance imaging of microstructured monolayers.** *Journal of Molecular Structure* 1999, **509**:265-273.

178. Berger CEH, Kooyman RPH, Greve J: **Surface plasmon propagation near an index step.** *Optics communications* 1999, **167**:183-189.
179. Berger CEH, Kooyman RPH, Greve J: **Resolution in surface plasmon spectroscopy.** *Rev. Sci. Instr.* 1994, **65**:2829-2836.
180. Ng JMK, Gitlin I, Stroock AD, Whitesides GM: **Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems.** *Electrophoresis* 2002, **23**:3461-3473.
181. Xia Y, Whitesides GM: **Soft Lithography.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**:550-575.
182. Juncker D, Schmid H, Bernard A, Caelen I, Michel B, de Rooij N, Delamarche E: **Soft and rigid two-level microfluidic networks for patterning surfaces.** *J. Micromech. Microeng.* 2001, **11**:532-541.

Résumé :

Les puces à ADN, dont la détection est réalisée par fluorescence, ont démontré leur efficacité pour l'identification du génome depuis plusieurs années. Cependant, si on s'intéresse à l'analyse fine des interactions mises en jeu, c'est à dire visualiser en temps réel la cinétique de l'interaction, le marquage est susceptible de changer la distribution de charges et par la même de modifier l'affinité des sites de reconnaissance. Parmi les approches s'affranchissant du marquage fluorescent, notre choix s'est porté sur une détection optique, par ellipsométrie spectroscopique et / ou par la lecture de la résonance des plasmons de surface (RPS), des interactions, présentant le compromis le plus intéressant entre sensibilité et capacité de miniaturisation.

Ces techniques optiques reposant sur la mesure couplée de l'épaisseur et des indices optiques de la couche adsorbée. Dans une première étape, la détermination statistique par Microscopie à Force Atomique de microstructures lithographiées et fonctionnées par des monocouches biomimétiques a permis d'estimer les variations d'épaisseurs nanométriques induites par l'adsorption des molécules étudiées. Si l'ellipsométrie spectroscopique présente une très grande sensibilité ex situ à l'indice optique, l'étude angulaire de réflectivité RPS s'avère être la technique optique la plus sensible en milieu liquide. Nous avons montré, par ailleurs que la lecture spectroscopique du déphasage de la réflectivité RPS est 100 x plus sensible que l'étude angulaire et permet de déterminer séparément les épaisseurs, le modèle d'indices optiques (gradient, fraction volumique) de la couche biologique.

Le passage d'une analyse monocapteur à une lecture multicapteurs a été étudié par deux modes de microscopies RPS :

- l'imagerie en champ lointain par CCD permet outre la rapidité d'acquisition, d'intégrer 1 000 capteurs / cm²
- la microscopie spectroscopique ellipsométrique à balayage, compte de tenu de la convolution du faisceau incident avec la surface microstructurée est limitée à 256 capteurs / cm² mais présente l'avantage d'acquérir localement un spectre qui servira à une analyse paramétrique (indices optiques, fraction volumique, épaisseur).

Mots clés : *Biocapteurs, Ellipsométrie spectroscopique, Résonance des Plasmons de Surface, AFM, Microscopie optique.*