

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR COMBINANT LA PLASMONIQUE
ET L'ÉLECTROCHIMIE

VINCENT LATENDRESSE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)

AVRIL 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR COMBINANT LA PLASMONIQUE
ET L'ÉLECTROCHIMIE

présenté par : LATENDRESSE Vincent

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

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

M. PETER Yves-Alain, Dr.Sc., président

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

M. GERVAIS Thomas, Ph.D., membre

DÉDICACE

À mes parents,

Pour leur soutien et leurs sacrifices qui m'ont permis de me rendre où je suis.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à mon directeur de recherche Michel Meunier pour m'avoir donné l'opportunité de faire un projet dans son groupe de recherche et pour ces précieux conseils. Je désire également remercier son associé de recherche Sergiy Patskovsky pour son soutien et ses recommandations tout au long de ce projet.

Merci à tous les étudiants du laboratoire de plasmonique et de procédés par laser; tout particulièrement à Mathieu Maisonneuve et André Pierre Blanchard Dionne pour leur aide pour la théorie et le travail en laboratoire, à Anne-Marie Dallaire pour son aide avec les oligonucléotides, à Laurent Doré-Mathieu pour les mesures sur le système angulaire et à David Rioux pour son aide avec le laser.

Merci également à Caroline Fischer, Véronique Fischer et David Banville pour leur aide pendant la rédaction.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance au FRQ-NT pour le financement dont j'ai pu bénéficier.

RÉSUMÉ

Les biocapteurs sont des outils de détection extrêmement puissants, utiles pour une grande variété d'applications dans plusieurs domaines tels que la recherche biomédicale, le système de santé, l'industrie pharmaceutique et plusieurs autres. Les techniques plasmoniques et électrochimiques possèdent chacune leurs avantages et leurs inconvénients pour les applications de biodétection. Un biocapteur combinant les deux types de mesures a été fabriqué dans le cadre de ce projet. Un peigne d'électrodes interdigitées en or sert de surface pour la résonance des plasmons de surface (SPR) et pour les mesures d'impédance. Différentes mesures simultanées peuvent être prises en temps réel dans une cellule de mesure fermée avec un système d'impédance à 2 électrodes et un système SPR. La limite de détection SPR est dans le même ordre de grandeur que les systèmes en vente sur le marché.

Dans le cadre de ce projet, un laser ultrarapide (impulsions de 120 femtosecondes) a été utilisé pour le prototypage rapide du peigne d'électrodes interdigitées sur une lamelle de verre (BK7) recouverte de 50 nm d'or. Le procédé de fabrication a été optimisé afin qu'il soit possible de contrôler la largeur des électrodes et que la qualité de surface soit idéale pour la résonance des plasmons de surface. La période de l'échantillon utilisé est de 30 μm et la distance entre les électrodes est de 6 μm . Les dimensions obtenues sont compatibles avec des techniques de microfabrication, ce qui permettrait une fabrication à faibles coûts pour une entrée sur le marché.

Une fois les échantillons optimisés, deux montages optiques basés sur la configuration Kretschmann ont été réalisés dans le but de faire des mesures SPR spectrales. Le premier de ces systèmes se servant de la réflexion spéculaire sur l'échantillon et le deuxième se servant du premier ordre de diffraction en réflexion de l'échantillon qui agit comme un réseau. Des limites de détections de 7.9×10^{-7} RIU (*refractive index units*) et 7.2×10^{-6} RIU ont été obtenus pour ces deux systèmes respectivement pour des expériences avec de l'éthanol.

Un modèle électrique est présenté pour le peigne d'électrodes interdigitées du système de mesure d'impédance. La compatibilité du modèle est vérifiée, basée sur des changements dans la résistance de la solution. La limite de détection pour des solutions de NaCl est de 1.3×10^{-3} mg/100ml. La combinaison des deux systèmes a permis de montrer que le système SPR est plus

sensible à la détection d'éthanol et que le système d'impédance est plus sensible aux solutions d'eau salée.

Les systèmes de mesure ont permis la détection de séquences d'oligonucléotides provenant des gènes de bactéries de la tuberculose. Une détection spécifique des oligonucléotides complémentaires et non complémentaires est présentée.

ABSTRACT

Biosensors are powerful tools that are used for a wide range of applications in fields like biomedical research, healthcare, pharmaceuticals and many more. Plasmonic and electrochemical techniques have each their advantages and their weaknesses for biodetection applications. A biosensor combining both these measurement techniques was fabricated for this project. Gold interdigitated electrodes (IDEs) were used as a surface plasmon resonance (SPR) propagation surface and as electrodes for impedance measurements. Different types of measurements are enabled in real time within a closed measuring cell with a two-electrode impedance system. The limit of detection of the SPR system compares well with commercial systems.

For this project, an ultrafast laser (120 femtosecond pulses) was used for fast prototyping of the interdigitated electrodes on a glass slide on which a 50 nm thin film was previously deposited. The fabrication process was optimized in order to obtain the optimal electrode width and a good surface quality for the propagation of surface plasmons. The period of the sample that was used is 30 μm and the distance between the electrodes is of 6 μm . These dimensions are compatible with standard microfabrication techniques, which would enable fabrication at a low price for a market entry.

Two optical setups based on the Kretschmann configuration were realised in order to take spectral SPR measurements once the sample was fabricated. The first of these systems used the specular reflection on the sample and the second used the first order of diffraction from the interdigitated electrodes which acts as a grating. The limit of detection of those systems, measured with a change between water and ethanol solution are 7.9×10^{-7} RIU (refractive index units) and 7.2×10^{-6} RIU respectively.

An equivalent circuit model is presented for the electrical impedance system. Based on changes between solutions with different salt concentrations, the model was verified. The limit of detection for a NaCl solution is 1.3×10^{-3} mg/100ml. The combination of these two types of measurements showed that the SPR system as a better sensitivity to variations in ethanol concentration and the impedance system to variations in salt concentrations.

Oligonucleotides sequences from the normal and mutated genes of mycobacterium tuberculosis were detected with this system. The experiments showed specific attachment of the complementary oligonucleotides compared to the non-complementary ones.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 THÉORIE & REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1.1 Biocapteurs.....	4
1.2 Biocapteurs plasmoniques.....	6
1.2.1 Couplage photon-plasmon.....	9
1.2.2 Méthode d’interrogation.....	13
1.2.3 Influence des dimensions de la surface de propagation	14
1.3 Biocapteurs électrochimiques	18
CHAPITRE 2 PROPOSITION DE RECHERCHE.....	25
CHAPITRE 3 FABRICATION ET OPTIMISATION DES MICROÉLECTRODES INTERDIGITÉES	31
3.1 Fabrication des microélectrodes.....	32
3.2 Optimisation de la fabrication.....	33
3.3 Caractérisation des échantillons	35
3.3.1 Spectre des échantillons dans l’air	38

3.3.2	Spectre des échantillons dans l'eau	43
3.4	Présentation de l'échantillon optimisé	45
CHAPITRE 4 CARACTÉRISATION DES SYSTÈMES DE MESURES		47
4.1	Systèmes SPR.....	47
4.1.1	Description du montage SPR	47
4.1.2	Détermination de la limite de détection du système SPR	49
4.1.3	Présentation d'un système SPR utilisant le premier ordre de diffraction de l'échantillon.....	51
4.2	Description et caractérisation du système à mesure d'impédance	53
4.3	Combinaison des deux types de mesures	57
4.3.1	Influence de l'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes sur le pic SPR.....	57
CHAPITRE 5 BIOCAPTEUR PLASMONIQUE ET ÉLECTROCHIMIQUE COMBINÉ....		59
5.1	Résultats expérimentaux des deux types de mesures prises simultanément	59
5.2	Expériences avec des oligonucléotides	61
CONCLUSION		69
RÉFÉRENCES.....		72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1: Espacement normalisé pour le premier ordre de diffraction de 4 échantillons. Comparaison entre la théorie et les résultats expérimentaux dans la configuration parallèle.....	37
Tableau 3.2: Position des pics de résonances plasmoniques des courbes présentées à la figure 3.7.	39
Tableau 3.3: Déplacement du pic SPR des courbes présentées à la figure 3.8.	42
Tableau 3.4: Paramètres de comparaison pour les courbes de la figure 3.9.	43
Tableau 3.5: Comparaison des échantillons en fonction de la résonance SPR, de la profondeur de la résonance et de la largeur à mi-hauteur.	44
Tableau 4.1: Valeurs obtenue pour RSOL pour 4 concentrations d'eau salée.	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1:	Schéma de principe d'un biocapteur.....	4
Figure 1.2:	Principe de base d'un biocapteur optique (gauche) et électrochimique (droite).	5
Figure 1.3:	Relation de dispersion des plasmons de surface. La courbe en noir représente la relation de dispersion de la lumière et la courbe en rouge celle des plasmons de surface.....	10
Figure 1.4:	Condition pour le couplage photon-plasmon.	10
Figure 1.5:	a) Méthode de couplage photon-plasmon par prisme dans la configuration Kretschmann. b) Relation de dispersion associée à la méthode de couplage.	11
Figure 1.6:	a) Couplage par réseau de diffraction. b) Relation de dispersion associée à la méthode de couplage.....	12
Figure 1.7:	Spectre de réflexion de la lumière sur une couche mince d'or de 50 nm en utilisant le couplage par prisme. Dans ce cas, le milieu diélectrique est de l'eau et l'angle d'incidence est de 73 degrés.....	13
Figure 1.8:	Système de mesure angulaire avec couplage par prisme.	14
Figure 1.9:	a) Système de mesure pour la longueur de propagation. b) Longueur de propagation des plasmons de surface en fonction de la largeur des électrodes en argent [7].	16
Figure 1.10:	Relation de dispersion des PS pour une bande métallique en fonction de sa largeur [12].....	17
Figure 1.11:	Longueur de propagation des PS sur un substrat d'argent de 70 nm d'épaisseur, en fonction de la largeur de la bande métallique. Les données expérimentales sont les mêmes que dans la figure 1.9 et les résultats de simulation sont tirés de l'Article de Rashid Zia [12].....	18
Figure 1.12:	Principe d'utilisation d'un système électrochimique à 3 (gauche) et à 2 (droite) électrodes. On distingue 3 électrodes dans cette figure. L'électrode de travail (W), l'électrode de référence (R) et l'électrode auxiliaire (C).	19

Figure 1.13: Modèle électrique des peignes interdigités a) schéma des électrodes b) schéma électrique	20
Figure 1.14: Courbes d'impédance pour un système de peignes interdigités. a) Impédance de phase en fonction de la fréquence b) Courbe Nyquist dans le plan complexe.	22
Figure 1.15: Courbes d'impédance pour le modèle présenté a) pour des résistances de solution différentes b) pour des capacités de double couche différentes.	23
Figure 1.16: Profondeur de pénétration du champ électrique dans le milieu de test [21].	24
Figure 2.1: Schéma de l'échantillon à fabriquer. Vue de côté et vue de dessus.	27
Figure 2.2: Schéma représentant la diffraction de la lumière par les peignes d'électrodes interdigitées en configuration Kretschmann.	28
Figure 3.1: Étapes de la fabrication des échantillons par laser. a) Structure du substrat initiale. b) Fabrication laser. c) échantillon fabriqué.	32
Figure 3.2: a) Image d'un échantillon avec une période de 40 μm , prise avec un microscope optique en transmission, b) profil d'intensité de l'image.	33
Figure 3.3: Comparaison de la courbe SPR spectrale de deux échantillons (période = 40 μm , fente = 6 μm) préparés dans les mêmes conditions, à l'exception du vide dans la chambre de fabrication. R_p/R_s signifie réflexion de la polarisation p divisée par la réflexion de la polarisation s.	34
Figure 3.4: Positionnement perpendiculaire et parallèle de l'échantillon par rapport à la polarisation de la lumière incidente.	35
Figure 3.5: Images prises avec un microscope optique en transmission pour 3 échantillons de période différente. a) 15 μm , b) 20 μm et c) 30 μm	36
Figure 3.6: a) Angle de diffractions théorique de l'ordre 1 pour un échantillon positionné de façon orthogonale et parallèle à la polarisation s avec une longueur d'onde de 633 nm. b) mesures expérimentales pour un échantillon positionné orthogonalement par rapport à la polarisation s avec une source blanche.	37

Figure 3.7: Courbes de résonance spectrales pour des réseaux de 30, 20, 15 et 11 μm dans l'air avec un angle de 44 degrés. a), b) Simulations pour des réseaux placés perpendiculairement et parallèlement respectivement [47] c), d) résultats expérimentaux correspondants.	40
Figure 3.8: Simulations de la résonance plasmonique pour différents ordres de diffractions avec un changement d'indice de réfraction de $\Delta\text{RIU} = 0.001$	41
Figure 3.9: Courbes de résonance SPR théorique pour le premier ordre de diffraction pour 4 périodes de réseaux différentes (30, 20, 15 et 11 μs) en comparaison avec l'ordre zéro d'un échantillon avec une période de 30 μm	42
Figure 3.10: Courbes SPR expérimentales dans l'eau pour 4 périodes de réseaux différentes en comparaison avec la courbe d'une couche mince d'or (50 nm).	44
Figure 3.11: a) Image globale de l'échantillon utilisé pour les tests. La période de l'échantillon est de 30 μm . b) Image de l'échantillon prise avec un microscope optique en transmission.	45
Figure 3.12: Mesures spectrales et angulaires de l'échantillon présenté à la figure 3.11.	46
Figure 4.1 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la SPR spectrale avec le spectre obtenu. La courbe en rouge correspond à la polarisation p et la courbe en noir à la polarisation s.	48
Figure 4.2: a) Résultat pour un test de limite de détection avec un montage SPR angulaire sur une couche mince d'or pour un changement d'indice de réfraction de 4.8×10^{-5} RIU. b) Résultat pour un test de limite de détection avec le montage SPR spectral de la figure 4.1 pour un changement d'indice de réfraction de 4.8×10^{-5} RIU. Trois types de quadratures différentes ont été utilisés pour modéliser le pic SPR.	50
Figure 4.3: a) Montage expérimental utilisé pour faire des mesures directement avec le premier ordre de diffraction de l'échantillon. b) Résultat pour un test de limite de détection avec le montage SPR spectral de la figure a), pour un changement d'indice de réfraction de 2.38×10^{-4} RIU.	52

Figure 4.4: Optimisation de l'intensité des ordres de diffraction en fonction de la profondeur de la fente.	53
Figure 4.5: Montage expérimental utilisé pour les mesures d'impédance.	54
Figure 4.6: Mesures en temps réel avec le potentiostat pour des solutions d'eau avec différentes concentrations de NaCl. La fréquence est de 10 Hz.	55
Figure 4.7: a) Courbes Nyquist pour des solutions d'eau avec différentes concentrations de NaCl b) Courbes d'impédance et de phases correspondantes aux courbes en a). La légende s'applique aux 2 graphiques.	56
Figure 4.8: Déplacement du pic SPR en fonction de la tension appliquée sur les électrodes ainsi que la tension appliquée en fonction du temps. Les deux courbes ne sont pas nécessairement représentées pour des moments équivalents. Le déplacement observé pour une tension de 500 mV est de 0.16 nm (12 pixels).	58
Figure 5.1: Mesures SPR et d'impédance simultanées. a) Différents changements de solutions A) transition eau à éthanol 0.1% (4.8×10^{-5} RIU) B) transition eau à eau salée 0.313 mg / 100 ml (2×10^{-7} RIU) C) transition eau à eau salée 0.625 mg / 100 ml (4×10^{-7} RIU) b) Test avec une haute concentration de NaCl de 0.1 g / 100 ml (1.75×10^{-4} RIU).	60
Figure 5.2: Déplacement du pic SPR entre une solution tampon de KH_2PO_4 et une solution du même tampon dilué d'une quantité d'eau correspondante au volume d'oligonucléotides présent dans les mesures subséquentes.	62
Figure 5.3 : Expérience d'attachement des oligonucléotides récepteurs P2. A) Début de l'injection des oligonucléotides récepteurs. B) Arrêt de la pompe pour l'incubation. C) Injection de la solution tampon.	63
Figure 5.4: Principe de l'attachement sélectif des oligonucléotides ainsi que les différentes étapes des expériences.	65
Figure 5.5: Tests SPR avec oligonucléotides. Les trois courbes représentent les tests d'attachement pour les oligonucléotides complémentaires T2 (rouge), les oligonucléotides non complémentaires Tc (noir) ainsi que les oligonucléotides partiellement complémentaires Tn (bleu).	67

Figure 5.6: Résultats électriques pour les tests biologiques a) norme de l'impédance en fonction de la fréquence pour différentes expériences d'attachement avec différentes solutions tampons b) Courbes Nyquist pour le tampon 2xSSC et les oligonucléotides Tc et T2. 68

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Adénine
AC	Courant alternatif
ATR	<i>Attenuated Total reflection</i> (Réflexion totale atténuée)
Bk7	Verre borosilicate
C	Cytosine
CCD	<i>Charged coupled device</i> (Dispositif à transfert de charges)
C_{de}	Capacité diélectrique
C_{dl}	<i>Double layer capacitance</i> (Capacité de double couche)
Cl^-	Ion de chlore
e	Charge d'un électron
Eau DI	Eau déionisée
E-beam	<i>Electron beam</i> (faisceau d'électrons)
FIB	<i>Focused Ion Beam</i> (Faisceau d'ions focalisé)
G	Guanine
\hbar	Constante de Planck réduite
I	Courant
i, j	Nombre imaginaire $\sqrt{-1}$
I_0	Amplitude du courant
IDEs	<i>interdigitated electrodes</i> (Électrodes interdigitées)
\vec{k}	Vecteur d'onde de la lumière
k_x	Projection du vecteur d'onde sur la surface de propagation des plasmons
LOD	<i>Limit of detection</i> (Limite de détection)

m_e	Masse d'un électron
Mist	<i>Modeled integrated scattering tool</i>
Na^+	Ion de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
n_e	Densité électronique
NIST	<i>National Institute of standards and technology</i>
p	Ordre de diffraction
P2	Oligonucléotide récepteur
PS	Plasmon de surface
R	Ridge
RCWA	<i>Rigorous coupled wave analysis</i> (Analyse rigoureuse des ondes couplées)
RIU	<i>Refractive index unit</i> (Unité d'indice de réfraction)
R_{SOL}	Résistance de solution
SNR	<i>Signal over noise ratio</i> (Ratio signal sur bruit)
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> (Résonance de plasmon de surface)
Ssc	Saline-sodium citrate
t	temps
T	Thymine
T2	Oligonucléotide complémentaire
Tc	Oligonucléotide non complémentaire
TE	Transverse électrique (polarisation s)
TM	Transverse magnétique (polarisation p)
Tn	Oligonucléotide partiellement complémentaire
V_0	Amplitude du voltage

Z	Impédance complexe
Z'	Partie réel de l'impédance
Z''	Partie imaginaire de l'impédance
$ Z $	Norme de l'impédance
Z_0	Amplitude de l'impédance
Δ	Différences d'indice de réfraction ou de concentration de deux solutions
Λ	Période des peignes d'électrodes
α	Partie imaginaire de la constante de propagation
β	Partie réelle de la constante de propagation
β_{sp}	Constante de propagation complexe des plasmons de surface
ϵ_0	Permittivité du vide
ϵ_m, ϵ_d	Fonction diélectrique du métal et du milieu diélectrique respectivement
ϵ_p, n_p	Fonction diélectrique et indice de réfraction du prisme de couplage
θ	Angle d'incidence de la lumière pour l'excitation des plasmons de surface
λ	Longueur d'onde
μ	Moyenne de la position d'un pic de résonance plasmonique dans le temps
ν	Fréquence de collision des électrons
σ	Écart type sur la position du pic plasmonique dans le temps
φ	Phase de l'impédance
ω	Fréquence angulaire de la tension
ω_p	Pulsation plasma

INTRODUCTION

Les biocapteurs sont des appareils permettant la détection de cibles biologiques, qui présentent généralement une menace pour la santé ou l'environnement. Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour la détection de bactéries, dans la surveillance de l'environnement (« *environmental monitoring* »), par l'armée dans le domaine de la sécurité intérieure (« *homeland security* ») et dans le domaine médical, pour ne nommer que quelques-unes des utilisations des biocapteurs.

L'histoire des biocapteurs commence en 1962 avec la création d'un capteur électrochimique à base d'enzymes pour la détection du glucose par le professeur Leland C. Clark [1]. Quelques années plus tard, en 1969, G.G. Guilbault présente un biocapteur potentiométrique pour la détection de l'urée [2]. Plusieurs chercheurs de différents domaines commencent à travailler sur les biocapteurs à partir des années 70. Le développement des biocapteurs est le résultat d'un important travail de collaboration entre chimistes, physiciens, biologistes et ingénieurs. En 1983 le premier capteur basé sur la résonance des plasmons de surface est présenté, puis en 1984 la compagnie Pharmacia Biosensor est créée et en 1990 elle présente le premier instrument commercial basé sur cette technologie, le BIAcore [3]. De nos jours, des chercheurs dans tous les domaines scientifiques travaillent dans le but d'améliorer les biocapteurs, que ce soit en développant de nouveaux marqueurs pour la capture sélective des éléments à détecter ou bien en développant des systèmes de mesures toujours plus performants.

Un biocapteur est généralement défini comme un dispositif de détection analytique dans lequel un élément biologique de reconnaissance (« *recognition element* ») est couplé à un transducteur dans le but de détecter quantitativement une réaction biochimique dans une solution [4]. Différentes combinaisons d'éléments biologiques de reconnaissance et de transducteurs différents donnent naissance à plusieurs catégories de biocapteurs. Les principaux éléments biologiques de reconnaissance sont les enzymes, les anticorps, les acides nucléiques ainsi que les tissus biologiques. Les principales méthodes de transduction sont fondées sur des changements de propriétés optiques, électriques, magnétiques, thermiques ou massiques.

Dans le cadre de ce projet il sera traité des capteurs optiques basés sur la résonance des plasmons de surfaces et des capteurs électriques basés sur la mesure de l'impédance.

L'objectif principal est de fabriquer un biocapteur permettant des mesures simultanées de la résonance des plasmons de surface et de l'impédance électrique à l'aide d'un système facile à miniaturiser et peu dispendieux. Comme ces deux types de senseurs (optiques et électriques) permettent une détection d'éléments sans marqueurs (« *label free* ») (ce qui veut dire qu'il n'est pas nécessaire d'attacher un objet sur l'élément que l'on veut détecter) ils sont compatibles pour être combinés. Toutefois, pour y arriver, il faut prendre en considération que la méthode par impédance requiert la présence de composantes électriques sensibles à l'environnement alors que la méthode plasmonique requiert une surface en or qui permet la propagation des ondes de surface.

Afin d'atteindre cet objectif, un peigne d'électrodes interdigitées (IDEs) en or est fabriqué par laser. Les électrodes en or permettent à la fois la connection à un système de mesure électrique et la propagation des plasmons de surface (PS).

La combinaison de ces deux méthodes dans un même système pourrait combiner les avantages de chacune d'entre elles. Comme les deux méthodes ne sont pas sensibles aux mêmes changements de propriétés dans la solution, une plus grande variété d'application serait possible avec un système combinant les deux méthodes. Les capteurs à base de la résonance des plasmons de surface permettent de détecter un changement d'indice de réfraction sur une très courte distance (quelques centaines de nanomètres). Les capteurs d'impédance, quant à eux, peuvent sonder une bien plus grande distance (plusieurs micromètres), mais seront moins sensibles aux évènements qui ont lieu près de la surface de détection. De plus, la possibilité d'appliquer des tensions différentes sur chacune des électrodes permet d'y attacher des cibles biologiques différentes, ou bien de déposer un objet biologique sur une seule des électrodes. Cela pourrait permettre d'utiliser une des électrodes comme contrôle pour la mesure.

Le premier chapitre de ce document présente les principales caractéristiques et les principes de base des biocapteurs. La théorie reliée aux biocapteurs plasmoniques pour la

propagation et l'excitation des plasmons de surface sera tout d'abord expliquée, puis un modèle de capteur d'impédance à base de peignes d'électrodes sera présenté.

Le deuxième chapitre présentera les différentes approches possibles afin d'atteindre l'objectif. Ensuite, à partir de la littérature, des prédictions seront faites par rapport à la combinaison des deux méthodes de biodétection.

Le troisième chapitre présentera la méthode de fabrication des échantillons permettant d'effectuer les deux types de mesures, ainsi que les expériences d'optimisation et de caractérisation de ces échantillons. Des résultats de simulations seront présentés afin de comprendre l'influence des différents paramètres de l'échantillon afin de choisir les paramètres optimaux. Le chapitre se terminera par une présentation de l'échantillon possédant les meilleures caractéristiques pour les expériences.

Dans le quatrième chapitre les systèmes de mesure utilisés dans le cadre de ce projet seront présentés. Deux systèmes de résonance des plasmons de surface ainsi qu'un système de mesure d'impédance pouvant effectuer des expériences simultanément seront caractérisés et comparés.

Finalement, les résultats de plusieurs expériences effectuées à l'aide de ces montages dans le but de déterminer les avantages et limites de chacune des méthodes de détection seront exposés. Pour terminer, des expériences de détection d'oligonucléotides spécifiques aux bactéries de la tuberculose sont présentées pour démontrer la sélectivité du système.

CHAPITRE 1 THÉORIE & REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente la théorie nécessaire à la compréhension de ce mémoire. Dans le cadre de ce projet, un biocapteur est fabriqué dans le but de faire des mesures plasmoniques et d'impédances simultanément et en temps réel sur le même échantillon. Pour être en mesure d'interpréter les résultats obtenus au cours de ce projet, il est nécessaire de comprendre les différentes méthodes de détection utilisées. En premier lieu dans ce chapitre, certains paramètres communs à tous les types de biocapteurs seront présentés. Par la suite, le principe physique ainsi que les méthodes de couplage des plasmons de surface (PS) pour les capteurs plasmoniques seront expliqués. Ensuite, les capteurs d'impédance à base de peignes d'électrodes interdigitées seront présentés.

1.1 Biocapteurs

La figure 1.1 présente le principe de base d'un biocapteur. À l'entrée du biocapteur, on retrouve un analyte dans une solution quelconque, que l'on veut détecter. À l'aide d'un système fluïdique, la solution est amenée à interagir avec un élément biologique spécifique (récepteur), qui permet de sélectionner l'analyte à détecter parmi tous les autres éléments dans la solution. Tels que les enzymes, les anticorps et les acides nucléiques [4]. Pendant que la réaction biologique se produit, le transducteur transforme l'information biologique en un signal mesurable qui se retrouve en sortie du biocapteur. Dans le cadre de ce projet, le transducteur est une combinaison d'un capteur plasmonique et d'un capteur d'impédance.

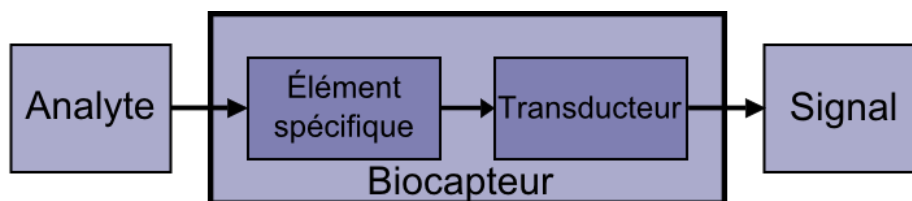


Figure 1.1: Schéma de principe d'un biocapteur.

La figure 1.2 présente le principe de base d'un biocapteur plasmonique et d'un biocapteur électrochimique. Pour les deux types de biocapteurs, un récepteur (anticorps) est lié à une surface de test. En injectant une solution contenant l'élément à détecter (antigène), celui-ci s'attache au

récepteur. Dans le cas du transducteur plasmonique, de la lumière est incident sur l'échantillon, puis à l'aide de la lumière réfléchié ou transmise, il est possible de mesurer un changement qui est lié aux plasmons de surface. Dans le cas du transducteur électrochimique, un changement dans les propriétés électriques de la surface de l'électrode crée une variation dans les mesures de courant et de potentiel. Ces systèmes ont soit 2 ou 3 électrodes.

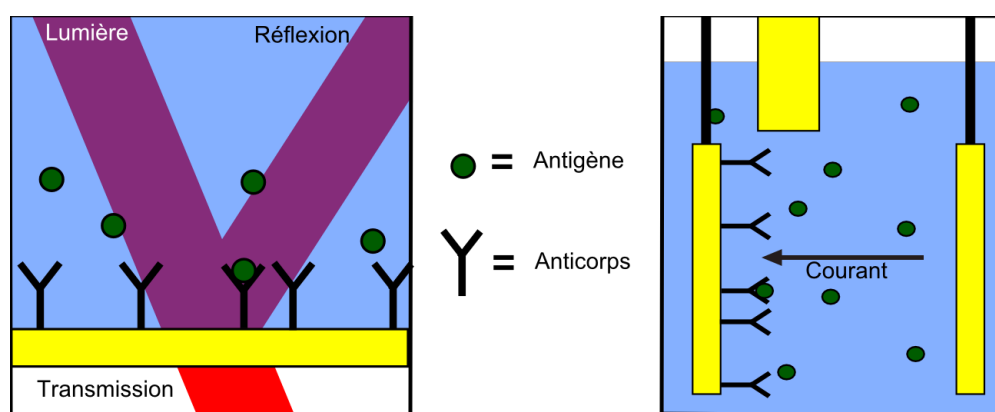


Figure 1.2: Principe de base d'un biocapteur optique (gauche) et électrochimique (droite).

La qualité d'un capteur est définie par différents paramètres tels que la sélectivité, la plage dynamique et la limite de détection [5]. La sélectivité représente la capacité du capteur à détecter l'analyte désiré dans le but d'obtenir le moins de faux positifs possibles. Comme la concentration de l'analyte à détecter peut être très faible par rapport à celles de plusieurs autres éléments, une grande sélectivité est primordiale dans les applications réelles. Dans la littérature, des expériences en laboratoire peuvent être faites en absence des autres éléments, ce qui peut influencer grandement les résultats. La sélectivité est contrôlée par l'élément biologique spécifique utilisé pour fonctionnaliser la surface, ce qui n'est pas au cœur du sujet de ce travail. Dans le chapitre 5, des expériences permettent de mesurer la sélectivité de la méthode de détection à l'aide d'oligonucléotides (courts segments d'acides nucléiques) seront présentées.

La plage dynamique représente le plus grand changement détectable à l'aide du dispositif. On la définit généralement par le rapport entre la plus grande concentration détectable et la limite de détection. Elle peut être limitée de deux façons : soit par la transduction elle-même où nous allons avoir présence d'une saturation du signal physique mesuré; soit par la chimie de surface qui permet la sélectivité, où tous les sites d'adsorption seront bloqués par la molécule à détecter.

La limite de détection (*LOD*) représente le plus petit changement dans le milieu de détection qu'il est possible de mesurer. La *LOD* se calcule à partir du ratio signal sur bruit (*SNR*) pour un changement dans une solution. Les valeurs pour le signal sont prises suite à la stabilisation de celui-ci. Ensuite, on prend l'écart type du signal comme valeur de bruit, ce qui signifie que $SNR = \left| \frac{\bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2}{\bar{\sigma}} \right|$, où les $\bar{\mu}_i$ représentent le signal moyen avant et après le changement dans la solution et $\bar{\sigma}$ représente la moyenne des écarts types pour les deux signaux. La limite de détection est ensuite donnée par $LOD = \frac{\Delta}{SNR}$, où Δ représente le changement dans la propriété mesurée où dans la concentration. Pour les systèmes plasmoniques, le changement d'indice de réfraction est généralement utilisé. Pour caractériser l'échantillon et non le système, on a souvent recours à un paramètre similaire à la *LOD*, soit la sensibilité. La sensibilité présente plutôt le déplacement du pic de résonance plasmonique (angulaire ou spectral) par unité d'indice de réfraction (*RIU*). La sensibilité sert plutôt à caractériser un échantillon. Les propriétés plus spécifiques à chacun des types de capteurs sont présentées dans les sections suivantes.

1.2 Biocapteurs plasmoniques

La théorie de cette section est tirée du livre de J. Homola [3]. Un plasmon est une quasi-particule qui représente l'oscillation d'un nuage d'électron. Il existe deux types de plasmons : le plasmon de volume et le plasmon de surface. Les plasmons de volume ont lieu à l'intérieur d'un métal où les électrons sont libres. À l'arrivée d'une onde électromagnétique, les électrons oscillent avec une fréquence qui correspond à celle de l'onde incidente si celle-ci est inférieure ou égale à la fréquence de résonance des plasmons de volume. Cette résonance, aussi connue sous le nom de pulsation plasma, est définie par l'équation 1-1 suivante :

$$\omega_p = \sqrt{\frac{n_e e^2}{m_e \epsilon_0}} \quad (1-1)$$

où n_e est la densité de charge, e est la charge élémentaire d'un électron, m_e est la masse effective des électrons, et ϵ_0 , la permittivité diélectrique du vide. On associe au plasmon de volume un quanta, qui est $\hbar\omega_p$.

Mathématiquement, le plasmon de surface peut être décrit en résolvant les équations de Maxwell d'une structure constituée d'un guide d'onde à l'interface entre une couche métallique et une couche diélectrique. En effet, la résolution des équations montre qu'il existe des modes transverses magnétiques (TM) qui sont contenus dans le guide d'onde pour certaines conditions sur les fonctions diélectriques des substrats. Pour des substrats sans perte (partie imaginaire de la fonction diélectrique nulle), le mode guidé existe à condition que la permittivité des substrats respecte l'inégalité suivante :

$$\epsilon'_m < -\epsilon'_d \quad (1-2)$$

où ϵ'_i est la partie réelle de la fonction diélectrique du métal et du diélectrique (m et d respectivement). Comme la permittivité des diélectriques est généralement positive, la partie réelle de la fonction diélectrique de la couche métallique doit être négative. En se référant au modèle de l'électron libre, la permittivité diélectrique pour les métaux peut être définie de la façon suivante :

$$\epsilon_m(\omega) = \epsilon_0 \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\nu} \right) \quad (1-3)$$

où ϵ_m est la fonction diélectrique du métal, ϵ_0 est la permittivité du vide, ν est la fréquence de collision et ω_p est la pulsation plasma. Pour $\omega < \omega_p$, la permittivité est négative, ce qui est observé expérimentalement pour différents métaux comme l'or, l'argent et l'aluminium, pour lesquelles la permittivité réelle négative est dans le visible et le proche infrarouge. Pour les applications de biodétection, l'or est principalement utilisé pour sa biocompatibilité et sa chimie de surface (grande stabilité de surface, accroche de molécule par lien hydrogène).

La constante de propagation des PS ($\beta_{sp}(\omega)$), qui définit aussi le vecteur d'onde du plasmon, est représentée par l'équation suivante :

$$\beta_{sp}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m(\omega)}{\epsilon_d + \epsilon_m(\omega)}} \quad (1-4)$$

où ω est la fréquence angulaire, c est la vitesse de la lumière et ϵ_i est la permittivité du diélectrique et du métal. Cette constante de propagation représente le vecteur d'onde du PS. Pour obtenir une résonance des plasmons de surface (SPR), il est nécessaire d'exciter les PS à l'aide d'une onde électromagnétique dont la composante tangentielle de son vecteur d'onde est égale à la constante de propagation des PS.

La partie imaginaire de la fonction diélectrique n'est pas nulle dans les métaux réels. Cependant, si la partie réelle est beaucoup plus grande que la partie imaginaire, il y a quand même la possibilité d'obtenir des modes guidés. La constante de propagation est dans ce cas complexe, ce qui donne lieu à une atténuation des plasmons de surface. En effet, la partie réelle de la constante de propagation (β) permet de déterminer la fréquence de résonance des PS et la partie imaginaire (α) permet d'obtenir de l'information sur l'atténuation des PS.

Les plasmons sont caractérisés par deux types de longueurs différentes, la longueur de propagation sur la surface et la longueur de pénétration dans le métal et le diélectrique. Ces deux longueurs sont, par définition, la distance à laquelle l'énergie du plasmon décroît d'un facteur $1/e$ et elles sont représentées par une exponentielle décroissante. Les longueurs de propagation pour l'or et l'argent, donnée par $L = 1/2\alpha$, est de $8 \pm 2 \mu\text{m}$ et de $61 \pm 2 \mu\text{m}$ respectivement pour une longueur d'onde d'excitation de 633 nm et une épaisseur de la couche mince de 70 nm [7]. La longueur de pénétration est de grande importance pour les applications en biodétection. En effet, cette longueur caractérise la profondeur jusqu'à laquelle le plasmon peut se faire ressentir dans le métal et dans le diélectrique, ou la profondeur jusqu'à laquelle le plasmon de surface sera influencé par un changement de propriété optique. Plus on augmente la longueur d'onde d'excitation, plus la longueur de pénétration est longue. Par conséquent, en fonction de la distance par rapport à la surface de l'objet biologique que l'on désire détecter ou en fonction de

sa grandeur, il est nécessaire d'ajuster la longueur d'onde d'excitation des PS. Pour une longueur d'onde de 633 nm, la longueur de pénétration dans le métal et dans le diélectrique est d'environ 26 nm et 180 nm respectivement, pour un diélectrique équivalent à de l'eau ($n = 1.32$) [4].

1.2.1 Couplage photon-plasmon

La section précédente démontre l'existence des ondes de surface guidées à l'interface entre un métal et un diélectrique. Cependant, ces modes doivent être excités pour que des mesures de biodétections soient concevables. La relation de dispersion de la figure 1.3 permet de comprendre la condition nécessaire à la création des plasmons de surface. En effet, sous des conditions normales, la relation de dispersion de la lumière est $\vec{k} = \frac{\omega}{c}$ et sa composante parallèle à la surface d'or est $k_x = \frac{\omega}{c} \sin(\theta) = \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\theta)$, où x représente la direction, ω est la fréquence angulaire, c est la vitesse de la lumière, θ est l'angle d'incidence et λ est la longueur d'onde.

Cette relation donne le cône de la lumière (représenté en bleu dans la figure 1.3) dans lequel le vecteur d'onde peut se retrouver dépendamment de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence sur l'échantillon. La relation de dispersion des plasmons suit plutôt l'équation 1-4. Pour obtenir un couplage entre la lumière et les plasmons, les relations de dispersion doivent s'intercepter. En d'autres mots, la composante parallèle à la surface de la lumière incidente doit être équivalente au vecteur d'onde des plasmons de surface ($k_x = \beta_{sp}$), tel que représenté schématiquement à la figure 1.4. Ces deux relations ne se croisent pas sous des conditions comme celles-ci, les plasmons de surface ne seront donc pas excités par la lumière incidente. Il est nécessaire d'utiliser des méthodes de couplage photon-plasmon pour obtenir la résonance des plasmons de surface.

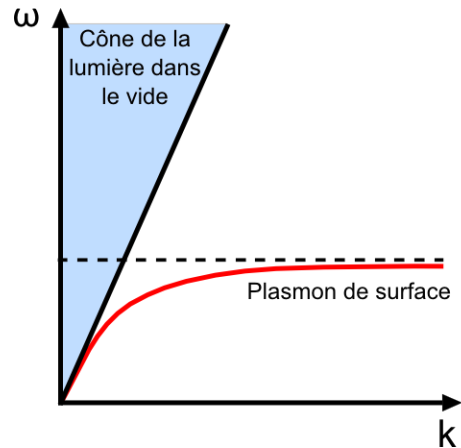


Figure 1.3: Relation de dispersion des plasmons de surface. La courbe en noir représente la relation de dispersion de la lumière et la courbe en rouge celle des plasmons de surface.

Plusieurs méthodes de couplage peuvent être utilisées pour obtenir une excitation des plasmons de surface. Les principales méthodes sont le couplage par prisme, par la méthode de réflexion totale atténuée (ATR), le couplage par réseau de diffraction et le couplage par guide d'onde. Cependant, ce rapport se concentrera sur les deux premières méthodes.

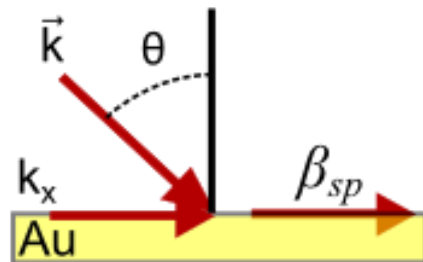


Figure 1.4: Condition pour le couplage photon-plasmon.

Dans le cas du couplage par prisme, la composante tangentielle du vecteur d'onde de la lumière incidente est augmentée par le prisme, grâce à son indice de réfraction ($n_p = \sqrt{\epsilon_p}$) qui est plus grand que celui de l'air. Tel qu'illustré à la figure 1.5a, la lumière, de polarisation TM (polarisation p) pour satisfaire au critère d'existence des plasmons de surface, se propage dans un prisme d'indice de réfraction n_p , avec un angle θ supérieur à l'angle critique de réflexion totale, puis elle est réfléchi par la surface d'or, qui est collée sur le prisme. Une onde évanescente est créée et se propage dans le métal. Si l'épaisseur de la couche métallique est suffisamment mince (moins de 100 nm), l'onde évanescente pénètre suffisamment pour se coupler avec les plasmons

de surface. Dans les bonnes conditions d'angle et de longueur d'onde, les plasmons de surface sont excités à l'interface entre la couche mince d'or et le milieu diélectrique et l'intensité de la lumière réfléchie diminue énormément puisqu'une partie de l'énergie de l'onde évanescente est absorbée par les PS. Cette configuration, où la couche métallique est collée sur le prisme est nommée la configuration Kretschmann. Le cas où le diélectrique est collé sur le prisme et qu'il est suivi par la couche métallique se nomme la configuration Otto. Le vecteur d'onde de la lumière dans le prisme est donné par l'équation suivante :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_p} \sin \theta \quad (1-5)$$

où ω est la fréquence angulaire de la lumière, c est la vitesse de la lumière, ε_p est la permittivité du prisme et θ est l'angle d'incidence à l'intérieur du prisme. La figure 1.5b présente la nouvelle relation de dispersion pour cette méthode de couplage. Il est à noter que la relation de dispersion des plasmons de surface (courbe en rouge) et la relation pour la lumière dans le prisme (courbe en noir) s'intersectent, ce qui signifie qu'il est possible d'exciter les plasmons de surface.

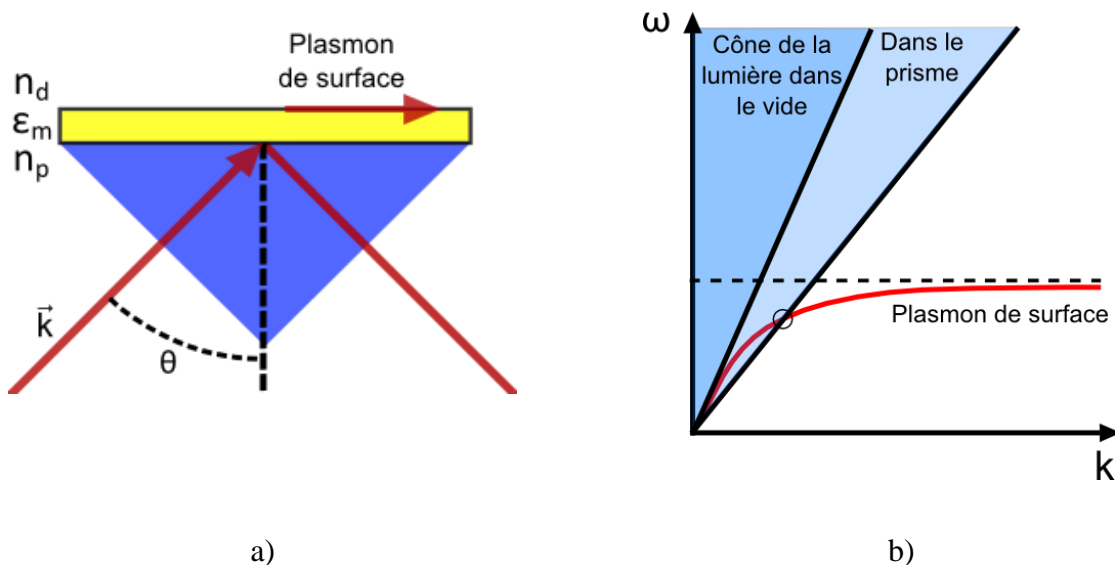


Figure 1.5 : a) Méthode de couplage photon-plasmon par prisme dans la configuration Kretschmann. b) Relation de dispersion associée à la méthode de couplage.

Il est aussi possible d'utiliser un réseau de diffraction pour le couplage photon-plasmon. Tel que présenté à la figure 1.6a, plusieurs ordres de diffractions sont générés lorsque de la

lumière est incidente sur un réseau de diffraction de période Λ , qui agit aussi comme surface pour la propagation des PS. Le vecteur d'onde des ordres de diffraction est maintenant donné par l'équation suivante :

$$k_x^p = k_x + p \frac{2\pi}{\Lambda} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_d} \sin \theta + p \frac{2\pi}{\Lambda} \quad (1-6)$$

où k_x^p est la composante du vecteur d'onde tangentielle à la surface des ordres de diffraction de la lumière, k_x est la composante tangentielle du vecteur d'onde de la lumière incidente sur le réseau, p est l'ordre de diffraction et Λ est la période du réseau.

La figure 1.6b présente la relation de dispersion des ordres de diffraction ainsi que celle des PS. On remarque sur la figure que plusieurs ordres de diffraction peuvent maintenant se coupler avec les PS. Avec les bonnes conditions d'angle et de longueur d'onde, il est possible de sélectionner un ordre de diffraction pour le couplage. La période des réseaux utilisés est généralement de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la lumière, de sorte que le terme $\frac{2\pi}{\Lambda}$ de l'équation 1-6 soit du même ordre de grandeur que le vecteur d'onde de la lumière sans réseau.

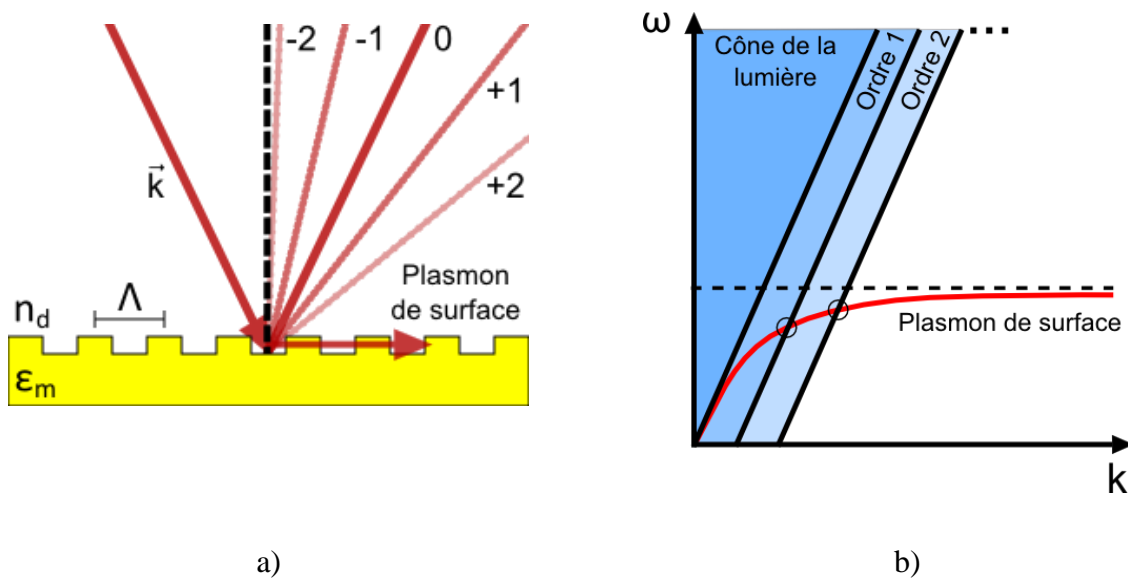


Figure 1.6: a) Couplage par réseau de diffraction. b) Relation de dispersion associée à la méthode de couplage.

1.2.2 Méthode d'interrogation

En utilisant le couplage par prisme, il est possible d'obtenir un spectre de réflexion de la lumière sur l'échantillon tel que présenté à la figure 1.7. Avec un angle d'incidence de 73 degrés et de l'eau comme diélectrique, la longueur d'onde de résonance est de 684 nm. Il est aussi possible d'obtenir des courbes similaires en fonction de l'angle pour une longueur d'onde fixe. La résonance des plasmons de surface (SPR) est extrêmement sensible au changement de propriété optique du milieu diélectrique. Avec une variation d'indice de réfraction du milieu diélectrique, le pic de la courbe SPR se déplacera puisque les conditions de couplage seront changées. Plusieurs graphiques de ce genre seront présentés dans ce document. La majorité du temps, l'axe des ordonnées présentera la réflexion sur l'échantillon pour de la lumière de polarisation p (TM) normalisée par la réflexion pour une polarisation s (TE) en fonction de la longueur d'onde ou de l'angle d'incidence.

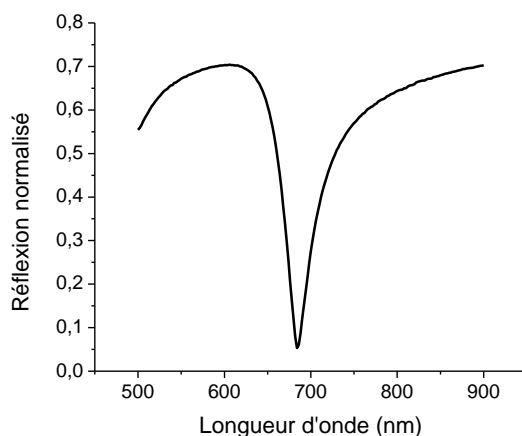


Figure 1.7: Spectre de réflexion de la lumière sur une couche mince d'or de 50 nm en utilisant le couplage par prisme. Dans ce cas, le milieu diélectrique est de l'eau et l'angle d'incidence est de 73 degrés.

La méthode spectrale et la méthode angulaire sont les deux principales méthodes d'interrogation. Un système utilisant la méthode angulaire est présenté dans la figure 1.8. Une source monochromatique émet de la lumière qui sera ensuite filtrée spatialement. La lumière est ensuite polarisée TM puis une lentille focalise la lumière sur l'échantillon d'or à travers le prisme de couplage. La focalisation a pour effet d'obtenir de la lumière à différents angles sur l'échantillon. Par la suite, une partie de la lumière est réfléchiée par l'échantillon et est redirigée à

l'aide d'un miroir et d'une lentille. La lumière est ensuite captée par une caméra. À l'aide d'un traitement de signal, on obtient une courbe similaire à la courbe de la figure 1.7 avec la position angulaire en abscisse. L'échantillon est placé dans une cellule de mesure qui est positionnée à l'angle désiré par un goniomètre. Cette cellule permet l'injection de différentes solutions, ce qui se traduit en un déplacement du pic de résonance plasmonique suivant l'indice de réfraction de la solution. En suivant le déplacement de ce pic en fonction du temps, il est possible de détecter les changements de propriétés optiques près de la surface de l'échantillon.

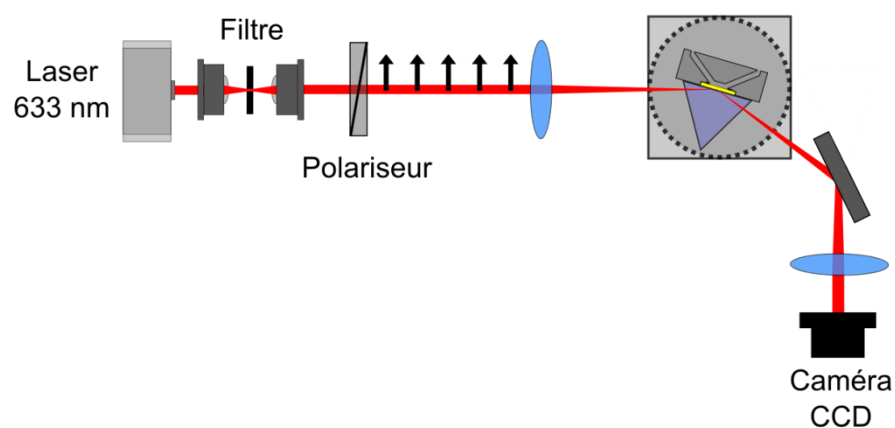


Figure 1.8: Système de mesure angulaire avec couplage par prisme.

Un système basé sur l'interrogation spectrale est très similaire. Les principales distinctions sont que la source utilisée est cette fois-ci polychromatique (source blanche), que la lumière ne doit pas être focalisée sur l'échantillon et qu'un spectromètre est nécessaire pour obtenir le spectre. Comme il ne faut pas focaliser, il est possible d'utiliser une plus grande surface de l'échantillon ce qui permet d'obtenir une réponse moins locale. Un système spectral sera présenté au chapitre 4.

1.2.3 Influence des dimensions de la surface de propagation

La propagation des PS sur des bandes métalliques de largeurs micrométriques est un sujet de recherche fort intéressant. Plusieurs recherches se concentrent sur ce sujet pour des applications d'optique bidimensionnelle [8-9]. À l'aide des plasmons de surface, il serait possible

de transférer des données dans des dimensions inférieures à la limite de diffraction avec des fréquences optiques [10-12].

Dans le cas de la biodétection, la longueur de propagation ne doit pas être trop diminuée par la présence des électrodes pour les mesures électrochimiques. Pour cette raison, l'influence de la largeur de la surface de propagation a été étudiée. Si la longueur de propagation est diminuée, c'est qu'il y aura plus de rémission de l'onde électromagnétique ainsi que moins de modes de propagation possibles. Le milieu sera alors moins sondé pour des changements d'indice de réfraction. Le spectre ne serait pas nécessairement affecté, mais la sensibilité (déplacement du pic pour un changement d'indice de réfraction) pourrait l'être grandement. Tel que mentionné précédemment dans cette section, la longueur de propagation des PS sur une couche mince d'argent de 70 nm d'épaisseur est de 61 μm .

La figure 1.9 présente la longueur de propagation des PS en fonction de la largeur de la bande d'argent ainsi qu'un schéma de l'échantillon utilisé pour la mesurer, tiré de l'article de B. Lamprecht *et al* [7]. Dans cet article, une section de l'échantillon était utilisée pour exciter les PS et une autre section était utilisée pour la propagation, les deux sections étant distinctes par la présence d'une couche d'aluminium dans la section de propagation. La couche d'aluminium permettait aux plasmons de surface de se propager, mais ne leur permettait pas de se coupler dans le prisme pour être réémis (voir figure 1.9a).

Sur la figure 1.9b, on remarque que la longueur de propagation diminue de façon significative lorsque la largeur de la bande est de moins de 20 μm . Les points représentent des données expérimentales et la courbe représente une quadrature sur les données. De plus, la droite en pointillé représente la longueur de propagation sur une couche mince d'argent infini. Comme la longueur de propagation sur l'or est inférieure à celle sur l'argent, on suppose que la longueur de propagation sur l'or ne sera pas affectée pour des largeurs de bande supérieures à 20 micromètres.

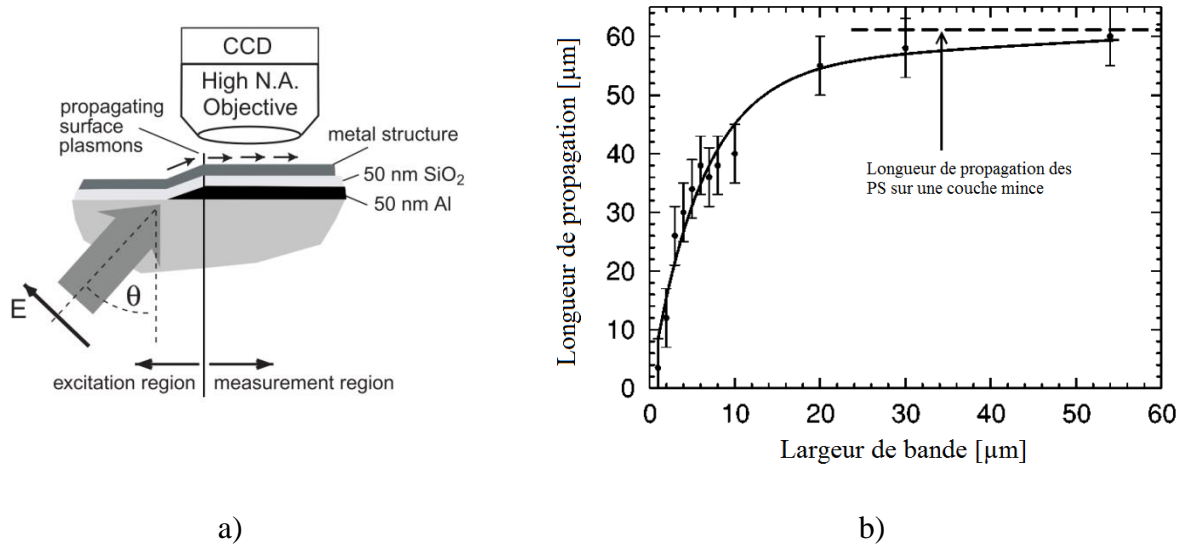


Figure 1.9: a) Système de mesure pour la longueur de propagation. b) Longueur de propagation des plasmons de surface en fonction de la largeur des électrodes en argent [7].

Bien que la longueur de propagation ne semble pas être influencée pour des largeurs d'électrodes de plus de 20 micromètres, il est possible d'observer l'influence des électrodes de largeur finie sur d'autres paramètres. En effet, les électrodes de largeur micrométrique ont aussi pour effet de changer la fréquence de résonance plasmonique des échantillons [12]. Dans le cas d'une couche mince d'or, les modes de propagation ne sont pas confinés dans une largeur et les PS se propagent entièrement sur l'interface métal diélectrique. Par contre, avec la présence d'électrodes de largeur finie, les modes plasmons sont confinés et peuvent possiblement déborder de l'interface. L'article de Rashid Zia [12] présente des simulations qui lui ont permis de déterminer la constante de propagation pour les modes de propagation plasmoniques. La figure 1.10 présente la partie réelle (β) et la partie imaginaire (α) de la constante de propagation pour les 8 premiers modes (le mode fondamental est celui qui commence pour la plus petite largeur d'électrode), en fonction de la largeur de l'électrode en or (W). On remarque que lorsque la largeur de l'électrode augmente, β augmente, ce qui se traduit en un décalage vers le bleu de la fréquence de résonance et que α diminue, ce qui expliquerait l'augmentation de la longueur de propagation. Chacun des modes peut seulement être présent à partir d'une largeur d'électrode critique. En diminuant le nombre de modes possibles sur l'électrode, on s'attend à observer une diminution de la longueur de propagation ainsi qu'un décalage vers le rouge de la résonance plasmonique.

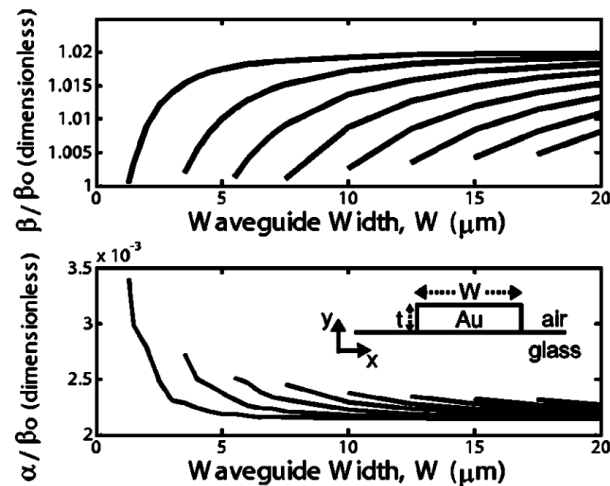


Figure 1.10 : Relation de dispersion des PS pour une bande métallique en fonction de sa largeur [12].

Pour vérifier le modèle, celui-ci a été comparé aux résultats expérimentaux de la figure 1.9. La comparaison est présentée dans la figure 1.11. Dans cette figure, on retrouve les données expérimentales ainsi que 2 courbes théoriques pour la longueur de propagation en fonction de la largeur des électrodes métalliques. La courbe pleine correspond à une simulation pour une couche mince d'argent de 70 nm directement sur un substrat de verre et la courbe en pointillé correspond à une simulation pour une couche mince d'argent déposée sur une couche d'aluminium qui servait à délimiter la zone d'excitation et la zone de propagation dans les expériences. Les données expérimentales et théoriques présentent un comportement asymptotique pour une largeur d'électrode qui augmente et les résultats tendent vers des valeurs similaires. Pour les très petites valeurs de W , on observe une courte longueur de propagation due aux pertes de modes de propagation possibles. Ce comportement est présent pour toutes les données. Pour les valeurs de W entre 5 et 10 μm , les résultats diffèrent. Dans cette gamme de largeurs d'électrode, les pertes supplémentaires dans les données expérimentales sont dues à la diffraction des modes sur les bordures de l'électrode.

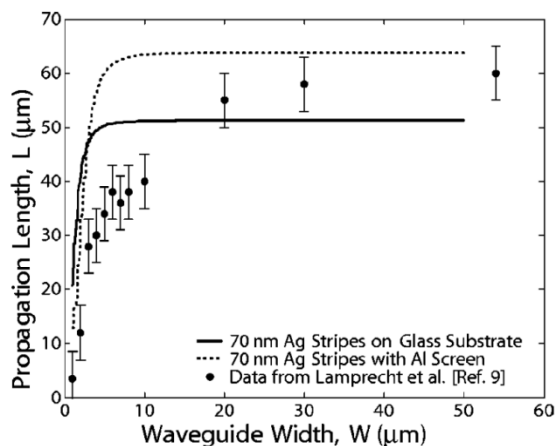


Figure 1.11: Longueur de propagation des PS sur un substrat d'argent de 70 nm d'épaisseur, en fonction de la largeur de la bande métallique. Les données expérimentales sont les mêmes que dans la figure 1.9 et les résultats de simulation sont tirés de l'Article de Rashid Zia [12].

D'après les comparaisons avec les données expérimentales, le modèle semble sous-estimer l'influence de la largeur de l'électrode puisque l'influence de la diffraction sur les bordures est négligée. La comparaison est basée sur la longueur de propagation, donc sur la partie imaginaire de la constante de propagation. Cependant, des conclusions similaires sur les tendances de la partie réelle de la constante de propagation sont supposées. Les spectres de résonance des échantillons composés d'électrodes de dimensions micrométriques devraient donc présenter un décalage vers le rouge de la résonance par rapport au spectre d'une couche mince.

1.3 Biocapteurs électrochimiques

Il existe plusieurs types de capteurs électriques qui sont généralement catégorisés quant à la façon dont la mesure électrique est effectuée. On distingue principalement les capteurs de tension, de courant et d'impédance [4]. Les systèmes d'électrochimie utilisent généralement 2 ou 3 électrodes et parfois 4 [13]. Le principe d'utilisation des systèmes à 2 et à 3 électrodes est présenté à la figure 1.12. Dans cette figure, la cellule de mesure est représentée par un cercle et les électrodes par des flèches. On distingue parmi celles-ci l'électrode de travail (*Working - W*), l'électrode de référence (*reference - R*) et l'électrode auxiliaire (*counter* ou *auxiliary - C*). L'électrode de travail est l'électrode qui est le sujet des mesures (celle sur laquelle les récepteurs sont attachés), l'électrode de référence permet de fixer une référence pour la tension et l'électrode auxiliaire ferme la boucle de courant avec l'électrode de travail. Les expériences à deux

électrodes permettent d'utiliser les systèmes de mesures les plus simples. Dans ce type de système, l'électrode auxiliaire et l'électrode de références sont connectées. Ces systèmes sont utilisés pour des circuits où le courant qui circule est très faible, de sorte que la tension de l'électrode auxiliaire reste le plus stable possible pendant l'expérience. Dans un système à 3 électrodes, la référence et l'électrode auxiliaire ne sont pas connectées ensemble. La référence est plutôt placée près de l'électrode de travail. La particularité de ce type de système est qu'il mesure seulement ce qui se passe sur l'électrode de travail et non sur le système en entier. Il est donc possible de mesurer des réactions de réduction et d'oxydation sur l'électrode de travail de façon isolée. Cet avantage fait que le système à 3 électrodes est le plus répandu.

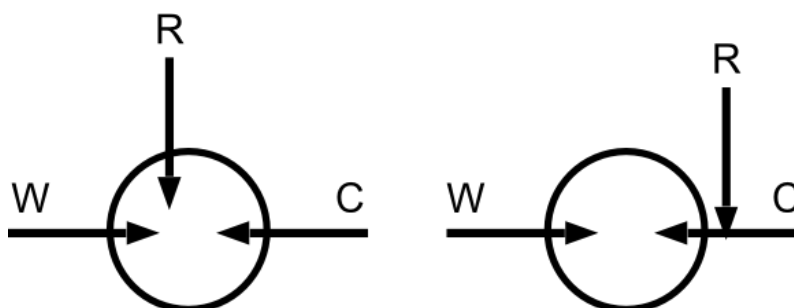


Figure 1.12: Principe d'utilisation d'un système électrochimique à 3 (gauche) et à 2 (droite) électrodes. On distingue 3 électrodes dans cette figure. L'électrode de travail (W), l'électrode de référence (R) et l'électrode auxiliaire (C).

Dans une expérience d'impédance, une faible tension alternative (AC) de forme sinusoïdale est appliquée entre les deux électrodes dans le but de mesurer l'impédance de l'échantillon à différentes fréquences (voir équation 1.7). Pour ce faire, on mesure le un courant alternatif qui circulent entre les électrodes et qui est décrit par l'équation 1.8. L'impédance est ensuite donnée par la loi d'Ohm présenté à l'équation 1.9. Dans ces équations, V représente la tension entre les électrodes, V_0 l'amplitude de la tension, ω la fréquence angulaire, t le temps, I le courant, I_0 l'amplitude du courant, φ le déphasage du courant par rapport à la tension, Z l'impédance complexe et Z_0 l'amplitude de l'impédance. Deux paramètres de l'impédance peuvent varier lorsqu'un changement dans l'environnement de l'échantillon à lieu, l'amplitude Z_0 ou la phase φ .

$$V(t) = V_0 \sin(\omega t) \quad (1.7)$$

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (1.8)$$

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (1.9)$$

Pour analyser les résultats des tests, il est nécessaire d'utiliser un modèle pour l'impédance de l'échantillon. La figure 1.13 présente un modèle électrique pour l'impédance des peignes d'électrodes interdigités, tiré de la littérature [14-16]. D'après ce modèle, l'impédance est influencée par trois paramètres, la capacité diélectrique de la solution (C_{de}), la capacité de la double couche (C_{dl}) formée à la surface de l'électrode et la résistance de la solution (R_{SOL}). On retrouve un circuit avec deux branches en parallèle. Dans la première branche on retrouve C_{de} et dans la deuxième, on retrouve R_{SOL} et C_{dl} en série. Plusieurs autres modèles sont utilisés dans la littérature et sont répertoriés dans l'article de M. Varshney *et al* [15].

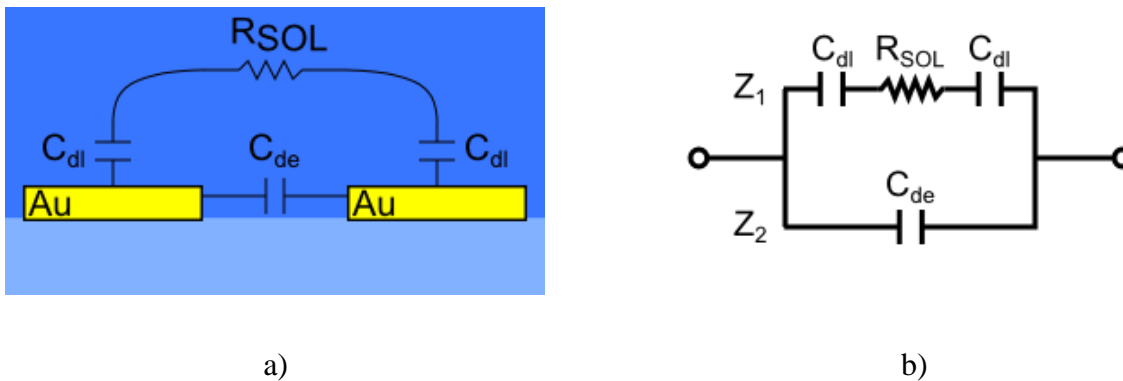


Figure 1.13: Modèle électrique des peignes interdigités a) schéma des électrodes b) schéma électrique

L'impédance d'une résistance est simplement $Z_R = R$ et l'impédance d'un condensateur est donné par $Z_C = 1/j\omega C$, où $j = \sqrt{-1}$, ω est la fréquence angulaire et C est la capacitance. En fonction de la fréquence, l'impédance d'une résistance est donc constante et l'impédance d'un condensateur est inversement proportionnelle à celle-ci. L'impédance du circuit équivalent est donnée par l'équation 1.10.

$$Z_T = Re(Z_T) + j \times Im(Z_T) \quad (1.10)$$

$$Re(Z_T) = \frac{R_{SOL}(C_{dl}/2)^2}{(C_{de} + C_{dl}/2)^2 + (\omega R_{SOL} C_{de} C_{dl}/2)^2}$$

$$Im(Z_T) = \frac{C_{de} + C_{dl}/2 + C_{de}(\omega R_{SOL} C_{dl}/2)^2}{\omega[(C_{de} + C_{dl}/2)^2 + (\omega R_{SOL} C_{de} C_{dl}/2)^2]}$$

La figure 1.14 présente des courbes de l'impédance sous deux formes différentes pour $R_{SOL} = 500 \Omega$, $C_{dl} = 1 \times 10^{-6} \text{ F}$ et $C_{de} = 1 \times 10^{-8} \text{ F}$. La valeur de C_{dl} est choisie supérieure à C_{de} puisqu'en pratique, la capacitance d'une double couche est supérieure à la capacitance diélectrique aussi appelée capacitance géométrique [14]. On observe les courbes d'impédance et de phase en fonction de la fréquence dans la figure 1.14a (diagramme de bode) avec une échelle logarithmique. Dans ce type de graphique, une impédance purement résistive est représentée par un plateau et une impédance purement capacitive est représentée par une droite à pente de -1.

À partir de ce modèle, il est possible d'établir 3 régions de fréquences pour lesquelles seulement certaines des composantes du modèle électrique influencent l'impédance. À haute fréquence, l'impédance des condensateurs est très faible. L'impédance dans le circuit est donc dominée par la résistance R_{SOL} , ce qui impose que le courant doit passer principalement par C_{de} dans la branche Z_2 du circuit. Cette situation est présentée dans la région 1 de la figure 1.14a. Pour des fréquences moyennes, comme la capacité de C_{de} est supérieure à la capacité de C_{dl} , le courant passe par la branche 1 et l'impédance de cette branche est dominée par la résistance de la solution. On observe donc un plateau d'impédance dans la région 2 de la figure. À basse fréquence l'impédance totale est dominée par les condensateurs, principalement C_{de} comme sa capacité est plus faible et la résistance est négligeable. Le courant passe donc une fois de plus dans la branche 1 ou l'impédance est dominée par C_{dl} tel que présenté dans la région 3. Dans un cas où la résistance de la solution est très faible, le plateau disparaît et on observe une droite décroissante en fonction de la fréquence.

Pour les mesures en temps réel, la fréquence est fixée puis on mesure l'impédance en fonction du temps. Dépendamment de ce que l'on souhaite mesurer pendant les expériences, il est

nécessaire de bien choisir la fréquence. Pour obtenir une information sur l'attachement à la surface qui peut être spécifique, on cherche à obtenir de l'information sur C_{dl} . On utilise donc des basses fréquences. Par contre, si l'on désire obtenir de l'information sur la solution, on utilise des fréquences moyennes ou élevées.

La figure 1.14b présente une courbe de Nyquist dans le plan complexe. Dans ce type de figure, on présente la partie imaginaire de l'impédance en fonction de sa partie réelle pour différentes fréquences. Les hautes fréquences sont généralement présentées de cette façon dans la littérature [17-19]. En fonction des propriétés électriques de la solution autour de l'échantillon, la courbe se modifie. Ces courbes requièrent plusieurs prises de données à différentes fréquences, ce qui empêche les mesures en temps réel. Cependant il est possible de prendre les mesures une fois que la solution est stable. Dans ce type de courbe, les composantes électroniques provoquant un déphasage du signal (condensateurs) apparaissent dans la partie imaginaire de l'impédance tandis que les composantes ne produisant aucun déphasage (résistance) apparaissent dans la partie réelle de l'impédance [20]. Les points 1 et 2 sur la figure présentent la valeur de la résistance d'entrée du circuit ainsi que la résistance de solution R_{SOL} respectivement. Comme les électrodes sont en or dans le cadre de ce projet, la résistance d'entrée est considérée nulle.

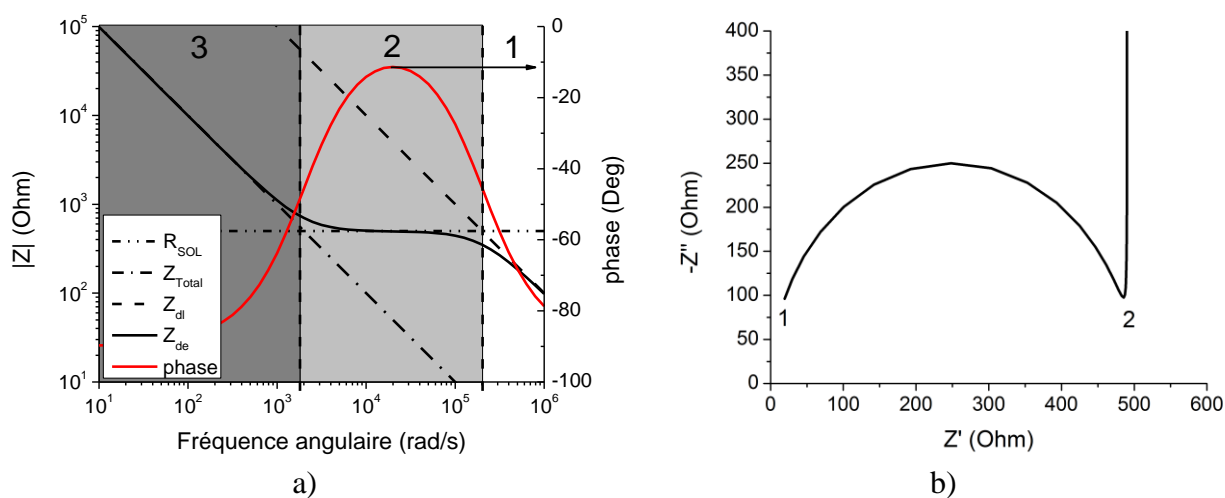


Figure 1.14: Courbes d'impédance pour un système de peignes interdigités. a) Impédance de phase en fonction de la fréquence b) Courbe Nyquist dans le plan complexe.

Afin de visualiser l'influence des propriétés électriques sur les courbes d'impédance, la figure 1.15 montre les courbes d'impédance obtenues pour différentes valeurs de R_{SOL} et C_{dl} . Des valeurs de R_{SOL} de 100 Ohms, 500 Ohms et 1000 Ohms ont été utilisées pour la figure 1.12a en utilisant des capacités de valeur constante. On remarque que ce changement provoque un changement du niveau du plateau dans la région 2 de la courbe et un changement des fréquences de transition entre les régions. En variant C_{dl} avec des valeurs de 5×10^{-6} F, 1×10^{-6} F et 5×10^{-5} F on remarque plutôt dans la figure 1.12b un déplacement de la fréquence de transition entre la région 2 et 3 et un élargissement de la région 2 pour une capacité qui augmente. Ces valeurs ont été choisies puisqu'elles sont du même ordre de grandeur que celles obtenus pour l'eau salée.

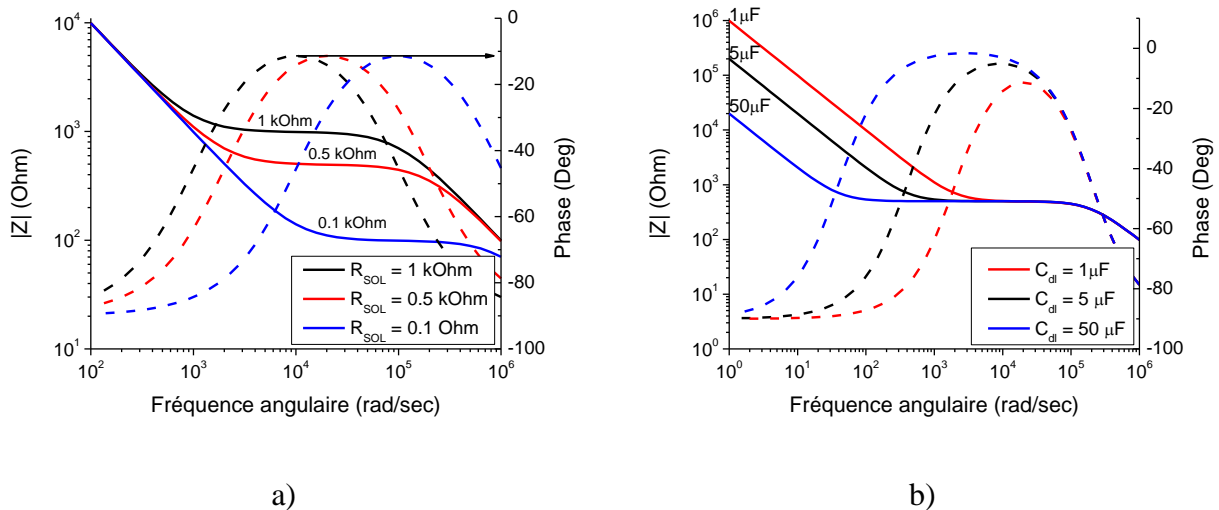


Figure 1.15: Courbes d'impédance pour le modèle présenté a) pour des résistances de solution différentes b) pour des capacités de double couche différentes.

Une des différences majeures entre les techniques SPR et les techniques électrochimiques est que les mesures électriques ne sont pas limitées à une couche mince de quelques centaines de nanomètres. En effet, la longueur de pénétration du champ électrique dans le milieu diélectrique, tel que présenté dans la figure 1.16, est de l'ordre de grandeur de la période du réseau [21]. Dans cette illustration, qui présente des résultats de simulation, L représente la période des peignes d'électrodes et le pourcentage représente la proportion de courant qui passe à l'intérieur de chaque courbe en cloche. D'après cette figure, 80% du courant, passe à une distance inférieure à $L/2$ de la surface de l'électrode, ce qui peut représenter plusieurs micromètres.

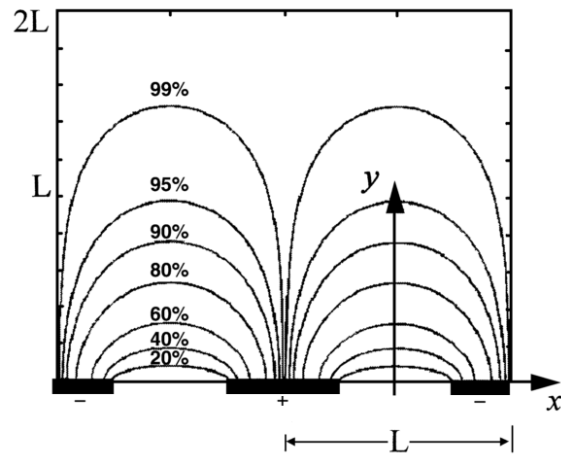


Figure 1.16 : Profondeur de pénétration du champ électrique dans le milieu de test [21].

Maintenant que la théorie sur les systèmes SPR et électrochimiques a été présentée, le prochain chapitre présente la proposition de projet.

CHAPITRE 2 PROPOSITION DE RECHERCHE

L'objectif principal de ce projet est de fabriquer un capteur permettant la prise de données simultanée, de la résonance des plasmons de surface et de l'impédance électrique à l'aide d'un système facile à miniaturiser et peu dispendieux.

La combinaison de ces deux méthodes permet l'utilisation des avantages de chacune d'entre elles. Ces deux méthodes sont sensibles à des changements différents dans le milieu de test. Dans le cas du capteur SPR, la détection est liée à un changement de propriété optique tandis que pour l'impédance, la détection est liée à un changement dans les propriétés électriques. Ces deux méthodes sont donc plus sensibles à différentes solutions. De plus, tel que présenté dans le chapitre précédent, les deux méthodes peuvent sonder la solution sur des longueurs de pénétrations différentes. La longueur de pénétration des capteurs SPR dépend de la fonction diélectrique du milieu et de la longueur d'onde de la lumière. Cette longueur est de l'ordre de la centaine de nanomètres, tandis que les méthodes d'impédances ont une longueur de pénétration de l'ordre de plusieurs micromètres. Bien que la longueur de pénétration soit inférieure pour les mesures SPR, ce type de système est plus sensible à l'intérieur de cette région. De plus, l'utilisation de différentes fréquences de test pour les mesures d'impédance permettent d'étudier différentes paramètres du système.

Parmi les toutes premières applications de la SPR, on retrouve des applications qui impliquaient des systèmes électrochimiques. Ces systèmes ont permis entre autres de mesurer la formation d'oxyde [22-24] et l'adsorption d'ions sur des électrodes de métal noble [25]. Ensuite, des mesures combinant les deux méthodes ont permis d'étudier l'adsorption de biopolymères [26] et les processus d'adsorption induite par l'application d'une tension [27-28]. Par la suite, des mesures simultanées de SPR et d'électrochimie ont permis de caractériser différents films conducteurs de polymère [29,30] ainsi que plusieurs procédés de catalyse électrochimiques [29,31]. Parmi toutes ces applications, la majorité des systèmes de mesure combinent un système de détection SPR angulaire dans la configuration Kretschmann avec un montage d'électrochimie à trois électrodes qui étudiait les changements sur une couche mince d'or.

Différentes options se présentent afin d'atteindre l'objectif. En effet, pour ce qui est de la mesure SPR, il est possible d'utiliser un système de couplage avec prisme, réseau, guide d'onde ou encore un système basés sur les propriétés nanoplasmoniques. Pour les mesures électrochimiques, il est possible d'utiliser un système à 2 ou à 3 électrodes et d'utiliser différentes configurations d'électrodes, par exemple, des électrodes interdigitées (IDEs).

Afin d'obtenir un système simple et facile à miniaturiser, l'approche à deux électrodes est conservée. Comme un système à deux électrodes prend des mesures sur l'ensemble de l'échantillon, il est favorable d'utiliser une structure symétrique pour que le signal des deux électrodes soit le même. Puisque le courant entre les électrodes est très faible pour des électrodes interdigitées, un système à deux électrodes est approprié puisque la variation de tension sur les électrodes est faible. En effet, l'utilisation d'une électrode de référence est seulement essentielle lorsque la tension sur l'électrode de travail peut varier beaucoup. De plus, comme les électrodes sont en or et que l'or est inerte, la surface ne devrait pas trop changer suite à l'application d'une tension faible. Une structure en peigne d'électrodes interdigitées permet d'utiliser des électrodes sur un même plan, dans cette configuration, il est possible de sonder les 2 électrodes avec un seul système SPR. Deux électrodes planes en configuration parallèle ne pourraient pas être sondées par un seul système SPR. Maintenant que le système d'impédance est choisi, il suffit de déterminer le système SPR à utiliser, qui est compatible avec l'utilisation des peignes d'électrodes interdigitées.

Comme les IDEs peuvent être considérées comme un réseau de diffraction, il est possible de penser que le couplage par réseau serait la meilleure solution pour l'excitation des PS. Cependant, pour cette méthode, un échantillon avec un réseau à profil sinusoïdal est généralement utilisé. Les lignes du réseau sont perpendiculaires à la propagation des plasmons de surface. Avec des électrodes interdigitées, la distance de propagation est trop diminuée puisqu'il y a un espacement entre les électrodes et que la période du réseau avec cette méthode de couplage est de l'ordre de la centaine de nanomètres. Le couplage par réseau ne sera donc pas utilisé.

Le couplage par guide d'onde n'a pas été utilisé puisqu'il présente une plus grande complexité dans la fabrication, mais qu'il ne présente pas d'avantages par rapport au couplage par prisme mis à part la facilité d'intégration. Les méthodes restantes sont donc le couplage

prisme et la nanoplasmonique, deux méthodes qui sont à priori, compatibles avec l'utilisation des peignes d'électrodes interdigitées. Le couplage par prisme requiert une largeur d'électrode plus grande que la nanoplasmonique, de sorte que la longueur de propagation ne soit pas trop affectée. Tel que présenté au chapitre précédent, la longueur de pénétration d'un système d'impédance basé sur des IDEs est de l'ordre de grandeur de la période de celui-ci. L'utilisation du couplage par prisme permet de profiter davantage de la différence dans la longueur de pénétration des deux méthodes.

Dans le cadre de ce projet, la méthode de couplage par prisme avec un peigne d'électrodes interdigitées de dimension micrométrique est utilisée laissant ainsi de côté les propriétés nanoplasmoniques pour de futures expériences.

Afin d'atteindre l'objectif, l'échantillon représenté par le schéma de la figure 2.1 a été fabriqué. Comme présenté par la vue de dessus, l'échantillon est composé de 2 électrodes en or. Le milieu de test est au centre de l'échantillon, où le peigne d'électrodes interdigitées a été fabriqué. La vue de côté présente la structure de l'échantillon. Le peigne avec une période Λ en or est sur un substrat de verre (BK7). L'épaisseur des électrodes est de 50 nm et la largeur d'électrode est définie par la valeur du « *Ridge* » (R).

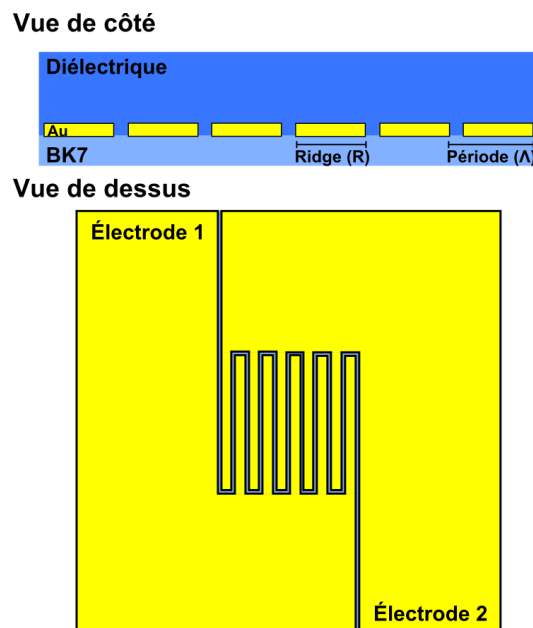


Figure 2.1: Schéma de l'échantillon à fabriquer. Vue de côté et vue de dessus.

Afin d'exciter les plasmons de surface sur cet échantillon, celui-ci est collé sur un prisme en verre à l'aide d'huile d'adaptation à l'indice de réfraction (« *matching oil* »). La lumière blanche est ensuite dirigée sur les IDEs avec les bonnes conditions d'excitation des plasmons. De cette façon, il est possible d'obtenir deux types d'informations complémentaires pour un même test.

L'échantillon proposé met en évidence deux nouveaux avantages du système de biodétection combiné. En effet, la présence de deux électrodes dans le milieu de tests permet d'utiliser une des électrodes comme référence pour les expériences SPR en fonctionnalisant différemment les deux électrodes. L'attachement de certains éléments est influencé par l'application d'une tension sur la couche métallique. De cette façon, il est possible d'obtenir des électrodes avec différents éléments en surface en appliquant différentes tensions sur les électrodes pendant la fonctionnalisation [27-28]. Si l'une de ces électrodes est saturée d'un élément non spécifique d'indice de réfraction différent de l'élément spécifique qui se retrouve sur la deuxième électrode, il serait possible de l'utiliser comme référence pour limiter l'effet de « *drift* » causé par des changements de températures. Le deuxième avantage provient de l'effet réseau de l'échantillon. Ce réseau, de période micrométrique crée de la diffraction avec la lumière d'excitation, tel que représenté à la figure 2.2 pour un échantillon dans la configuration Kretschmann. Pour obtenir le spectre SPR de l'échantillon, il est possible de mesurer la lumière dispersée du premier ordre de diffraction de l'échantillon directement, à la place d'utiliser un spectromètre comme dans les systèmes SPR spectraux habituels.

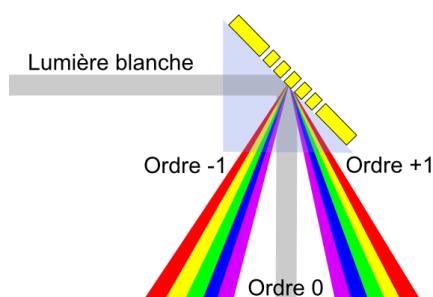


Figure 2.2: Schéma représentant la diffraction de la lumière par les peignes d'électrodes interdigitées en configuration Kretschmann.

Plusieurs paramètres ont dû être pris en considération afin d'obtenir un biocapteur fonctionnel tels que l'influence des électrodes de largeur finie sur les propriétés SPR, l'influence de l'application d'une tension sur la surface de propagation des plasmons et l'influence du réseau sur le système optique. Tel que présenté dans le chapitre 1, la largeur des bandes métalliques influence la constante de propagation des plasmons de surface. En effet, plus la largeur d'électrode diminue, plus la longueur de propagation diminue et plus la position spectrale de la résonance est déplacée vers le rouge. Plusieurs échantillons avec des largeurs d'électrodes différentes seront présentés au chapitre 3 afin de vérifier ce comportement. Puisque le peigne agit comme un réseau, il influence le vecteur d'onde de la lumière d'excitation des plasmons. Cependant, l'influence est très faible puisque la période du réseau est micrométrique.

De plus, comme une tension sera appliquée sur les électrodes pendant les prises de mesure, il est nécessaire de vérifier l'influence de cette tension sur les propriétés plasmoniques de l'échantillon. La résonance plasmonique peut aussi varier en fonction de la densité électronique dans la couche d'or. En effet, la fonction diélectrique de la couche mince d'or change si le nuage électronique est enrichi ou appauvri d'électrons. Dans le cas des réactions électrochimiques, des charges sont transférées entre le milieu et l'électrode pendant la réaction chimique. La majorité des systèmes de mesures où la SPR et l'électrochimie sont combinées se servent de cette variation de la résonance pour étudier les réactions sur la surface d'or. Comme on tient à évaluer seulement les réactions sur cette surface, un système à 3 électrodes est généralement utilisé avec un système SPR angulaire [32-44]. Dans ce type d'expérience, le courant ainsi que le déplacement du pic de résonance plasmonique sont mesurés en fonction de la tension appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Il est possible que l'angle de résonance se déplace de plus de 30 millidegrés pour certaines réactions chimiques [45].

Aucun système de mesure basé sur un peigne d'électrodes interdigitées, combinant des mesures d'impédance et des mesures plasmoniques ne se retrouve dans la littérature scientifique actuelle. L'utilisation des peignes d'électrode comme surface de propagation pour les plasmons de surface est donc considérée originale.

Dans le cadre de ce projet, les deux électrodes participeront à la réaction électrochimique s'il y a lieu. Les deux électrodes devraient donc s'enrichir ou s'appauvrir en électrons de façon

équivalente. Bien que dans le cadre de ce travail aucune réaction électrochimique ne sera étudiée, il a été nécessaire de vérifier l'influence de l'application d'une différence de tension entre les électrodes sur le spectre de résonance plasmonique. Comme des tensions différentes sont appliquées sur les deux électrodes, il pourrait y avoir séparation de deux pics provenant chacun d'une des électrodes. Si le déplacement est petit, il devrait seulement y avoir un élargissement du pic puisque les deux pics seraient confondus.

Comme présenté dans l'article de J. Homola *et al* [46], les ordres de diffraction contiennent l'information plasmonique utile à la biodétection. Il est donc possible en captant un ordre de diffraction de suivre le pic de résonance plasmonique. Aucun spectromètre n'est nécessaire pour obtenir les résultats puisque le réseau a pour effet de disperser la lumière. Dans le cadre de ce projet, un système de mesure se servant de l'ordre 1 (voir figure 2.2) est comparé à un autre système se servant de la réflexion spéculaire sur l'échantillon.

Maintenant que la théorie a été présentée, les prochains chapitres auront comme sujet la fabrication et la caractérisation des propriétés plasmoniques des IDEs, la caractérisation des systèmes de mesures, suivi des résultats expérimentaux de biodétection.

CHAPITRE 3 FABRICATION ET OPTIMISATION DES MICROÉLECTRODES INTERDIGITÉES

Plusieurs échantillons ont dû être fabriqués dans le but de caractériser les propriétés optiques et plasmoniques des peignes d'électrodes interdigitées. Plusieurs contraintes ont dû être respectées afin d'avoir la possibilité de prendre des mesures plasmoniques et électriques sur un même échantillon. Pour les mesures électriques, il est nécessaire d'obtenir un échantillon avec des électrodes interdigitées sans contact entre celles-ci sur la totalité de l'échantillon. Pour ce qui est des mesures plasmoniques, la qualité de surface doit être maintenue pendant le processus de fabrication et la largeur des électrodes a dû être bien optimisée afin d'obtenir de bons spectres SPR, sensibles à l'environnement. Ce chapitre se consacre à la présentation du processus de fabrication ainsi qu'aux étapes d'optimisation des paramètres de fabrication.

Plusieurs courbes expérimentales ont été prises à l'aide d'un ellipsomètre de J.A. Woollam Co. afin de bien caractériser les échantillons fabriqués. Un ellipsomètre permet de prendre des mesures optiques en réflexion ou en transmission pour différentes polarisations. Les courbes présentées dans ce chapitre montrent les résultats en réflexion de la polarisation p normalisée par la polarisation s , en fonction de la longueur d'onde ou de l'angle d'incidence sur l'échantillon. Les expériences ont été comparées à des résultats de simulation exécutés à l'aide du logiciel MIST (*Modeled integrated scatter tool*); logiciel créé par le *National Institute of Standards and Technology* [47]. Ce logiciel est basé sur la méthode d'analyse rigoureuse des ondes couplées (« *rigorous coupled wave method (RCWA)* ») [48]. Le logiciel a par la suite été utilisé afin d'étudier certaines des propriétés des échantillons.

Toutes ces expériences et simulations ont pour but de déterminer la meilleure géométrie de fabrication, afin d'obtenir le meilleur pic de résonance plasmonique. La qualité du pic de résonance plasmonique est évaluée par rapport à sa largeur et sa profondeur. Le pic doit être le plus profond possible, ce qui représente un meilleur couplage entre la lumière et les plasmons de surface, et le plus étroit possible, ce qui représente les conditions de couplage les plus constantes. Par exemple, si l'épaisseur de l'échantillon n'est pas constante, la condition de couplage varie un peu et par conséquent, le pic de résonance plasmonique élargit.

3.1 Fabrication des microélectrodes

Un laser titane-saphir femtoseconde de *Newport* a été utilisé pour la fabrication d'échantillons avec un motif d'électrodes interdigitées en or afin d'être en mesure de faire du prototypage rapide. Dans ce cas-ci, le faisceau laser est focalisé sur le substrat avec une incidence normale, puis en déplaçant l'échantillon, un motif peut être créé sur la surface. Le procédé de fabrication est présenté à la figure 3.1. Des lames de microscope en verre (BK7) avec une couche mince d'or de 50 nm (près de l'épaisseur optimale pour le couplage photon-plasmon par prisme) et une couche d'adhérence de titane achetées de *Phasis* ont été utilisées comme substrat de base. Le laser a un temps d'impulsion de 120 fs, une longueur d'onde de 800 nm et un taux de répétition de 1kHz. Un porte-échantillon est positionné sur une table de translation possédant des moteurs pour les 2 axes et un troisième moteur de translation est utilisé pour déplacer la lentille de focalisation par rapport à l'échantillon. Plusieurs lentilles de focalisation différentes ont été testées pour la fabrication, puis finalement, un objectif de grossissement 15x avec une distance de travail de 5cm a été utilisé. La puissance de sortie maximale du laser est d'environ 600 mW, mais il y a possibilité de l'atténuer avec plusieurs filtres neutres. Pour la fabrication, la puissance utilisée se situait entre 5 et 15 mW, ce qui correspond à une énergie de 5 à 15 $\mu\text{J}/\text{pulse}$. Dans ces conditions, des trous de 5 à 10 μm sur l'échantillon d'or peuvent être formés.

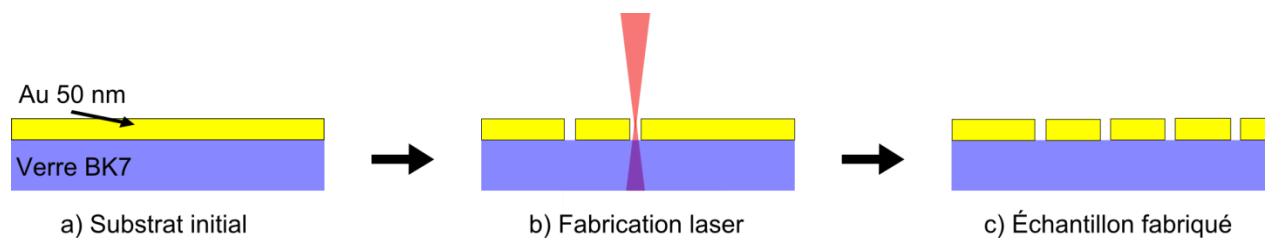


Figure 3.1: Étapes de la fabrication des échantillons par laser. a) Structure du substrat initiale. b) Fabrication laser. c) échantillon fabriqué.

Pour obtenir les trous les plus petits possible, il a été nécessaire de maîtriser très précisément la position de la lentille afin que celle-ci soit placée de sorte que le laser soit focalisé sur la couche mince d'or. Le diamètre de trou minimal atteignable pendant la fabrication a été d'environ 4 μm , car les échantillons ont été fabriqués sur des grandes surfaces (4mm par 4mm) et

que l'échantillon n'a pas été parfaitement à niveau. Cependant, comme il est primordial que les deux électrodes soient séparées complètement, un diamètre de trou d'environ $6\ \mu\text{m}$ a été utilisé.

La vitesse de déplacement des moteurs a été limitée à $1\ \text{mm/s}$ pour que l'espacement entre deux impulsions distinctes soit inférieur à $1\ \text{micron}$. La figure 3.2a présente une image d'un échantillon fabriqué avec la méthode expliquée ci-dessus et est prise avec un microscope optique en transmission. Cette figure présente aussi la signification du terme «*ridge*» qui sera utilisé à plusieurs reprises dans ce document. Le *ridge*, ou crête en français, correspond à la largeur de l'électrode d'or, aussi désigné par W dans le chapitre 1. La figure 3.2b présente le profil d'intensité de l'image. Ce type de graphique a été utilisé pour mesurer la largeur des *ridges*. Comme la largeur des périodes est préétablie par le programme de fabrication, il suffit de faire une règle de trois pour obtenir la largeur du *ridge*. Pour désigner la séparation entre les électrodes, le terme «*fente*» sera utilisé. La période est donc la somme du *ridge* et de la fente.

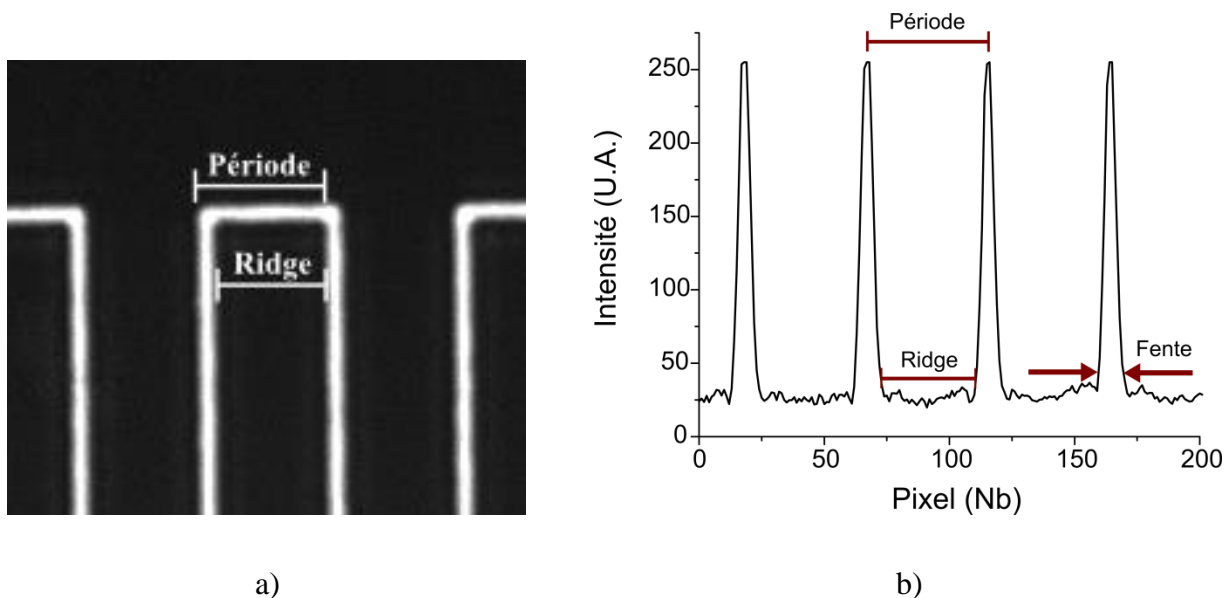


Figure 3.2: a) Image d'un échantillon avec une période de $40\ \mu\text{m}$, prise avec un microscope optique en transmission, b) profil d'intensité de l'image.

3.2 Optimisation de la fabrication

Dans le but d'assurer la conservation de la qualité de surface pendant la fabrication au laser, une chambre à vide a été utilisée pour limiter le dépôt du matériel ablaté par le laser sur la

surface des électrodes. Comme le dépôt du matériel ablaté est un processus plutôt aléatoire, la chambre à vide permet aussi d'améliorer la reproductibilité des échantillons. Du matériel sous forme de particules est éjecté de la surface pendant l'ablation. La basse pression dans l'environnement de fabrication a pour effet d'augmenter le libre parcours moyen de ces particules. À l'aide d'une pression suffisamment basse, les particules se déposent sur les murs de la chambre à vide et non sur l'échantillon. Une pompe mécanique a été utilisée pour créer le vide. Avec l'absence d'une chambre à vide, la pression est d'une atmosphère, soit environ 735 Torr, et il est possible à l'aide de la pompe d'obtenir une pression d'environ 10^{-4} Torr. La figure 3.3 présente le spectre SPR pour deux échantillons fabriqués sous les mêmes conditions de laser et avec les mêmes paramètres de fabrication (période, vitesse des moteurs), mais avec des conditions pression différentes. Ces courbes sont prises avec un ellipsomètre. Un des échantillons est fabriqué à la pression atmosphérique (courbe en noir) tandis que le deuxième est fabriqué avec un vide dans la chambre (courbe en rouge). La période des deux échantillons est de $40\ \mu\text{m}$ et la distance entre les électrodes est de $6\ \mu\text{m}$. On remarque une grande amélioration de la courbe SPR pour l'échantillon fabriqué sous vide. En effet, le minimum de réflexion normalisée passe de 0.44 à 0.21 pour l'échantillon fabriqué à pression atmosphérique et sous vide respectivement. Tous les échantillons dans la suite de ce document ont été fabriqués sous des conditions de vide.

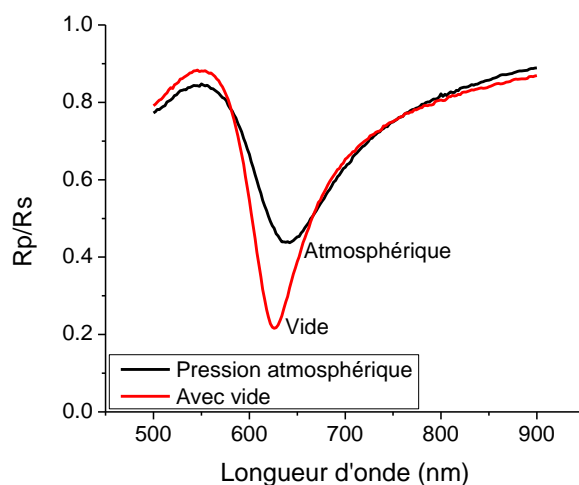


Figure 3.3: Comparaison de la courbe SPR spectrale de deux échantillons (période = $40\ \mu\text{m}$, fente = $6\ \mu\text{m}$) préparés dans les mêmes conditions, à l'exception du vide dans la chambre de fabrication. R_p/R_s signifie réflexion de la polarisation p divisée par la réflexion de la polarisation s .

3.3 Caractérisation des échantillons

Plusieurs échantillons ont été caractérisés à l'aide d'un ellipsomètre afin d'être en mesure de déterminer la période ainsi que la largeur R à utiliser pour les tests SPR et électriques. Ces courbes expérimentales ont été comparées avec des simulations exécutées à l'aide de la méthode d'analyse rigoureuse des ondes couplées. Comme il s'agit d'un peigne d'électrodes interdigitées en or, l'orientation du peigne par rapport au prisme de couplage peut influencer les propriétés plasmoniques. Pour cette raison deux configurations orthogonales ont été étudiées telles que représentées à la figure 3.4. Dans la première de ces configurations, les électrodes sont orientées perpendiculairement à la polarisation p de la lumière, tandis que dans la deuxième configuration, les électrodes sont orientées parallèlement à cette polarisation. Comme le peigne d'électrode agit aussi comme réseau de diffraction, ces deux orientations donnent des ordres de diffractions qui sortent du prisme orthogonalement. Dans la suite de ce document, les configurations parallèles et perpendiculaires feront référence à l'orientation des peignes d'électrodes par rapport à la polarisation p .

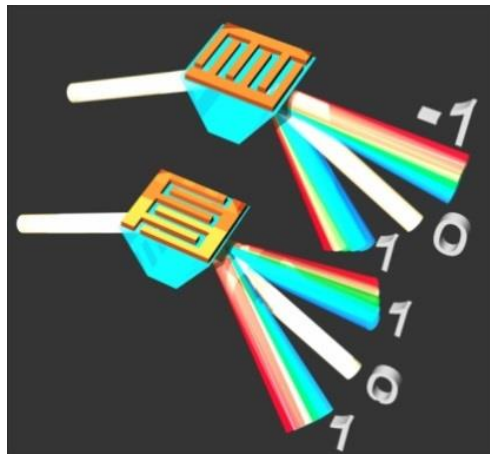


Figure 3.4: Positionnement perpendiculaire et parallèle de l'échantillon par rapport à la polarisation de la lumière incidente.

Pour caractériser les échantillons en fonction de la période du réseau, 4 échantillons ont été fabriqués avec des périodes de $11\ \mu\text{m}$, $15\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$ et $30\ \mu\text{m}$. Trois de ces échantillons sont présentés dans la figure ci-dessous (figure 3.5).

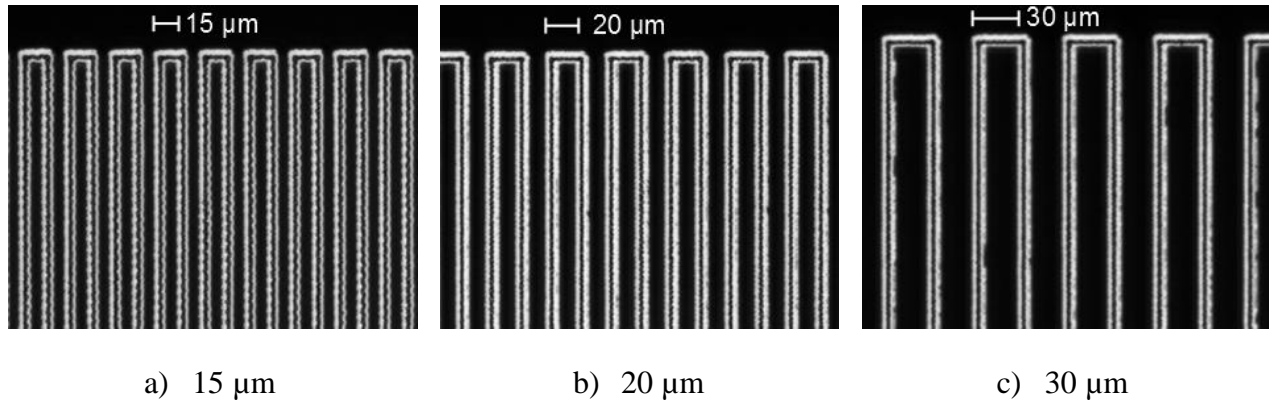


Figure 3.5: Images prises avec un microscope optique en transmission pour 3 échantillons de période différente. a) 15 μm , b) 20 μm et c) 30 μm .

Chacun de ces échantillons a un espacement entre les électrodes d'environ 6 μm , ce qui correspond à des largeurs de *ridge* de 5 μm , 9 μm , 14 μm et 24 μm . La figure 3.6 présente une comparaison entre la théorie (3.6a) et des mesures expérimentales (3.6b) pour la position des ordres de diffractions des différents échantillons. Dans la figure théorique, des résultats pour les deux configurations de l'échantillon sont présentés. La configuration parallèle à la polarisation p est centrée à 0° et la configuration perpendiculaire à la polarisation p est centrée en 72.5° ce qui correspond à l'angle d'interrogation SPR. Les mesures expérimentales ont été prises avec une caméra CCD linéaire sur un échantillon dans une cellule de mesure SPR incluant le prisme de couplage dans la configuration parallèle. Comme le chemin optique dans le prisme de chacun des ordres de diffraction est différent, on observe une courbure dans le spectre de diffraction. Cette courbure rend difficile l'alignement de plusieurs ordres de diffractions sur une caméra CCD linéaire. Pour cette raison, les spectres expérimentaux ont été pris avec une saturation de l'ordre 0, pour obtenir un bon signal des premiers ordres. Donc, il ne faut pas se fier à l'intensité des ordres de diffractions dans le graphique expérimental. De plus, les mesures expérimentales ont été prises à l'aide d'une source blanche tandis que les simulations sont faites pour une longueur d'onde de 633 nm.

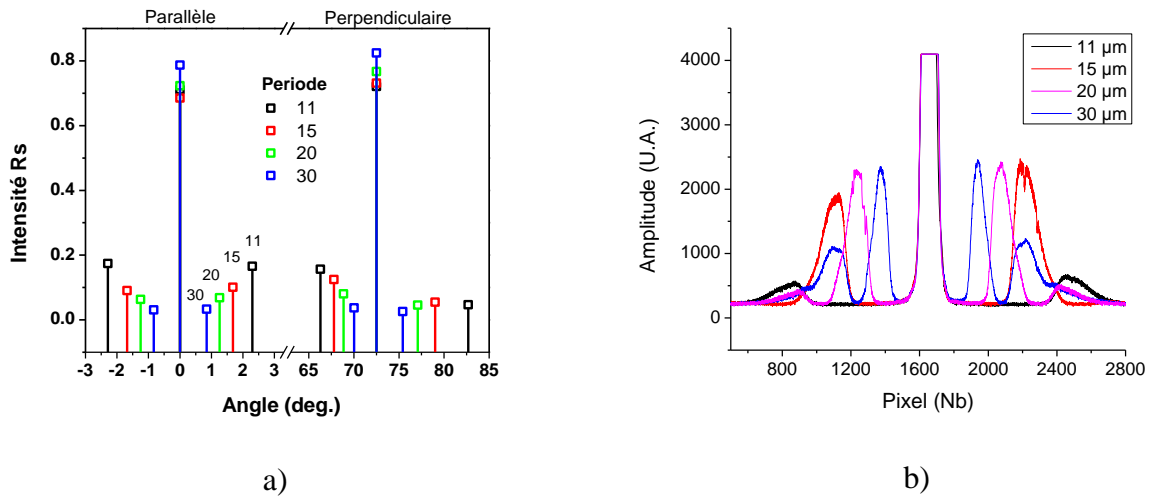


Figure 3.6: a) Angle de diffractions théorique de l'ordre 1 pour un échantillon positionné de façon orthogonale et parallèle à la polarisation s avec une longueur d'onde de 633 nm. b) mesures expérimentales pour un échantillon positionné orthogonalement par rapport à la polarisation s avec une source blanche.

Malgré toutes ces différences, les espacements entre les ordres de diffraction sont proportionnels. En effet, en normalisant l'espacement de chacun des ordres de diffraction avec l'espacement entre l'ordre 0 et l'ordre 1 de l'échantillon de 11 μm , on obtient les valeurs de la table 3.1, qui se comparent très bien entre elles. Le bon accord entre les simulations et les résultats expérimentaux, confirme que les électrodes interdigitées fabriqués se comportent selon la théorie de la diffraction.

Tableau 3.1: Espacement normalisé pour le premier ordre de diffraction de 4 échantillons. Comparaison entre la théorie et les résultats expérimentaux dans la configuration parallèle.

Période	Simulation	Expérience
30 μm	0.36	0.35
20 μm	0.55	0.52
15 μm	0.74	0.68
11 μm	1	1

Les ordres de diffractions doivent être suffisamment séparés les uns des autres afin d'être en mesure de les analyser séparément. Il aurait été possible d'analyser les ordres de diffractions avec une période un peu plus grande que 30 μm , mais cette largeur de période a été retenue

comme limite supérieure pour les expériences avec le premier ordre, puisqu'elle permet une analyse à une distance raisonnable (moins de 2 mètres) de l'échantillon, sur une table optique. La possibilité d'analyser seulement un des ordres de diffraction permet aussi d'utiliser la diffraction du réseau pour faire des mesures spectrales des propriétés plasmoniques sans l'utilisation d'un spectromètre dispendieux.

3.3.1 Spectre des échantillons dans l'air

Des courbes théoriques (figure 3.7) obtenues par la méthode d'analyse rigoureuse des ondes couplées (RCWA) ainsi que des courbes expérimentales obtenues avec un ellipsomètre nous ont permis d'analyser l'influence de R sur le spectre de résonance plasmonique. La figure 3.7 présente des courbes spectrales pour les 4 échantillons à périodes différentes ainsi que pour une couche mince d'or. Les échantillons ont été placés dans la configuration parallèle ainsi que dans la configuration perpendiculaire. Le milieu diélectrique considéré dans ces tests est de l'air et l'angle d'interrogation SPR est de 44 degrés. Les figures 3.7a et 3.7b présentent les simulations pour les deux configurations de l'échantillon et les figures 3.7c et 3.7d présentent les résultats expérimentaux pour les deux configurations. Dans toutes les courbes, on remarque un décalage vers le rouge des pics de résonance plasmonique. Les positions des minimums sont résumées dans le tableau 3.2. L'incertitude sur les positions vient de la régression utilisée pour déterminer la position du minimum. De plus, pour les valeurs expérimentales, la méthode de mesure ajoute une incertitude sur la position angulaire de l'échantillon. Comme une déviation de 1 degré peut déplacer la résonance d'environ 30 nm dans cette région spectrale, l'erreur du au système de mesure est estimé à 3 nm, ou 0.1 degré. On remarque que les tendances sont les mêmes pour les simulations que pour les expériences. Premièrement, plus la période est petite, plus il y a un décalage vers le rouge et plus la période est grande, plus on s'approche du cas de la couche mince. Ce décalage vers le rouge s'explique par la diminution de la constante de propagation telle que présentée dans le chapitre 1. Deuxièmement, pour la configuration perpendiculaire de l'échantillon, les pics plasmons sont élargis davantage, principalement pour les petites périodes. Les courbes expérimentales présentent un décalage un peu plus prononcé, ce qui doit être le résultat de l'imperfection des échantillons. Pour les simulations, les électrodes ont été considérées parfaitement rectangulaires, cependant, pour ce qui est des échantillons réels, le bord des électrodes a dû être courbé dû à la forme gaussienne du faisceau laser. De plus, on remarque que

les courbes expérimentales sont plus lisses que les courbes théoriques, principalement pour les petites périodes dans la configuration perpendiculaire. Nous croyons que cette amélioration est due à la méthode de fabrication. Le procédé laser ablate partiellement le verre sur lequel est ablaté l'or tandis que pour les simulations, le verre dans les fentes est considéré complètement plat. Le verre plat permet à la lumière d'être réfléchi pour les deux polarisations, plus efficacement tandis que le verre ablaté diffuse la lumière. Cette réflexion supplémentaire détruit le contraste entre les deux polarisations. L'information principale qui ressort de ces résultats est que les propriétés SPR sont bien meilleures pour un échantillon placé parallèlement à la polarisation p , puisque la distance sur laquelle les plasmons peuvent se propager est plus longue. Cette distance explique aussi le déplacement de la résonance théorique en fonction de la configuration. De plus, on remarque que plus le *ridge* est large, plus le pic plasmon est de bonne qualité. Ceci s'explique simplement par le fait que plus la période est grande, plus la surface susceptible d'exciter le PS est grande, puisque la largeur de la fente est toujours la même. Dans la suite de ce document, l'échantillon sera toujours placé dans la configuration parallèle.

Tableau 3.2: Position des pics de résonances plasmoniques des courbes présentées à la figure 3.7.

	Théorie parallèle (nm)	Expérience parallèle (nm)	Théorie orthogonal (nm)	Expérience orthogonal (nm)
Couche mince	622±1	621±4	621±1	621±4
30 μm	630±1	637±4	639±1	649±4
20 μm	637±1	640±4	676±1	658±4
15 μm	652±1	653±4	-	-
10 μm	656±1	658±4	-	-

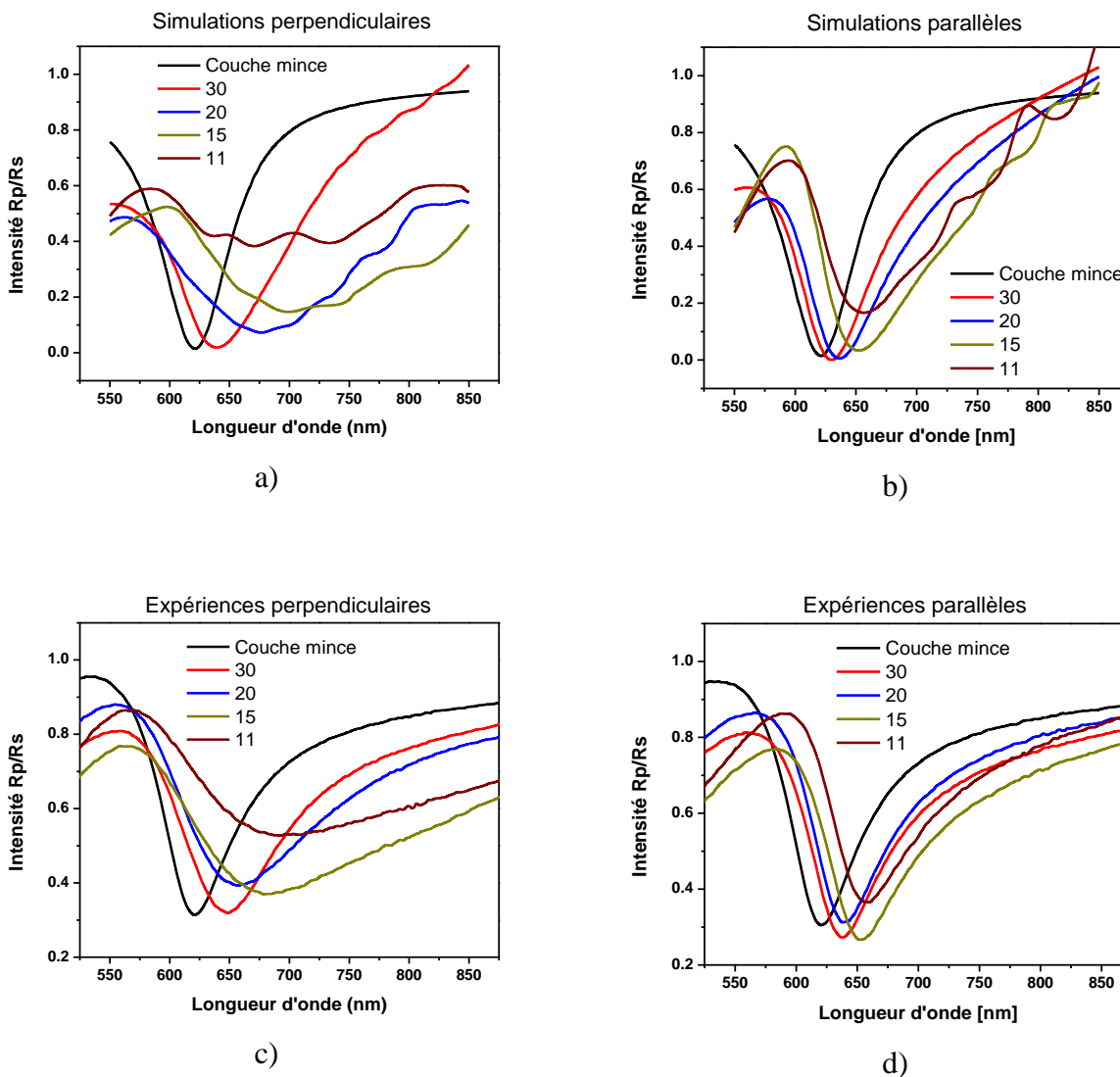


Figure 3.7: Courbes de résonance spectrales pour des réseaux de 30, 20, 15 et 11 μm dans l'air avec un angle de 44 degrés. a), b) Simulations pour des réseaux placés perpendiculairement et parallèlement respectivement [47] c), d) résultats expérimentaux correspondants.

Suite à ces résultats, des simulations ont été faites pour déterminer la sensibilité face à un changement d'indice de réfraction pour les différents ordres de diffractions. Pour la simulation, un échantillon de 40 μm de période a été utilisé avec une largeur de fente de 7 μm . L'angle d'incidence est de 44 degrés et le changement d'indice de réfraction est de 10^{-3} RIU par rapport à l'air ($n_{\text{air}} = 1$). Les courbes obtenues sont présentées dans la figure 3.8. Les courbes en noir correspondent à l'ordre 0, donc à la réflexion spéculaire de la lumière sur l'échantillon, pour les deux valeurs d'indice de réfraction du milieu ambiant. Les courbes en rouge et en vert

représentent les ordres de diffraction de premier ordre et de deuxième ordre respectivement. Un changement dans la longueur d'onde de résonance est observé dans les 3 cas, cependant le déplacement de la courbe pour l'ordre 0 est supérieur.

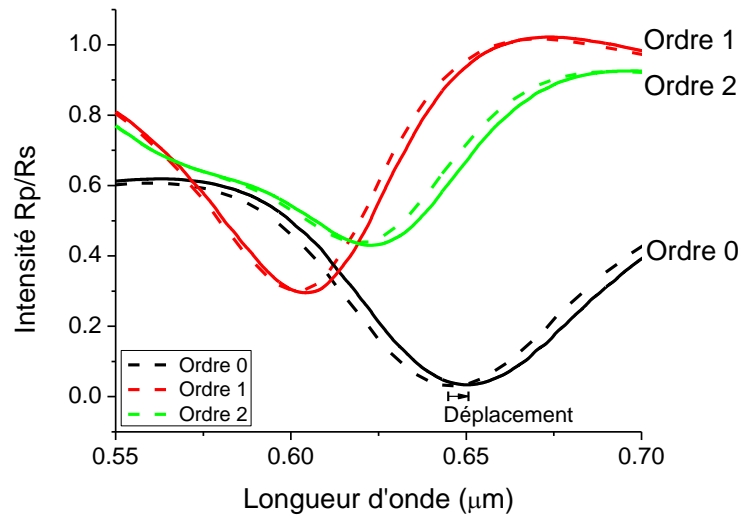


Figure 3.8: Simulations de la résonance plasmonique pour différents ordres de diffractions avec un changement d'indice de réfraction de $\Delta\text{RIU} = 0.001$.

Le tableau 3.3 présente le déplacement de la longueur d'onde de résonance pour les courbes de la figure 3.8. Le déplacement du pic pour l'ordre 0 est de 4.5 nm. Cela correspond à une sensibilité de 4500 nm/RIU. Pour les ordres 1 et 2 de diffraction, on a une sensibilité de 2500 nm/RIU. De plus, l'intensité des ordres de diffraction est inférieure à celle de l'ordre 0, ce qui peut être un problème si la source d'excitation utilisée n'est pas suffisamment puissante. Ces résultats nous montrent qu'il est possible d'utiliser un ordre de diffraction pour des applications de biodétection. Cependant ces capteurs ne possèderaient pas une aussi bonne sensibilité, ce qui affecte directement la limite de détection atteignable. La détection directe avec un ordre de diffraction pourrait être la bonne option à utiliser lorsque la limite de détection n'est pas la priorité, mais que le prix et la possibilité à miniaturiser le sont.

Tableau 3.3: Déplacement du pic SPR des courbes présentées à la figure 3.8.

Ordre de diffraction	Déplacement du pic SPR (nm)
Ordre 0	4.5
Ordre 1	2.5
Ordre 2	2.5

Par la suite, d'autres simulations ont été effectuées afin de comparer le spectre du pic plasmon du premier ordre de diffraction pour des échantillons avec des périodes différentes. La figure 3.9 présente ces spectres pour les 4 mêmes échantillons de périodes différentes présentées précédemment. Pour comparer les pics de résonance, la profondeur du pic et la largeur à mi-hauteur ont été utilisées comme paramètres. La profondeur, correspond à la différence en intensité 50 nm vers le bleu de la courbe et le minimum au centre de la résonance et la mi-hauteur correspond à l'intensité à mi-chemin entre les deux valeurs utilisées pour la profondeur.

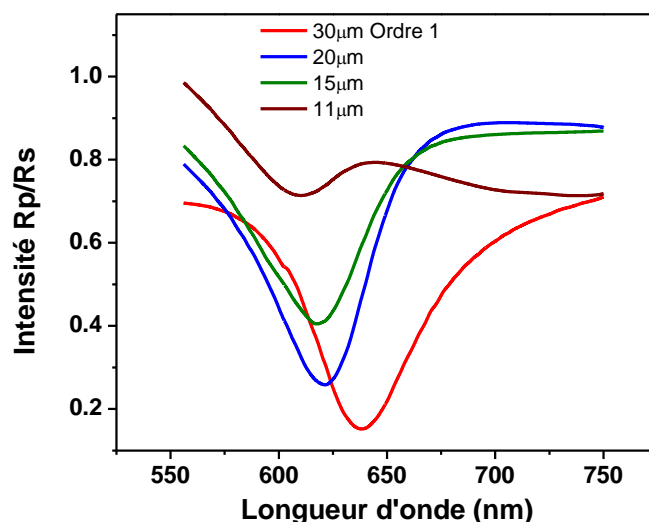


Figure 3.9: Courbes de résonance SPR théorique pour le premier ordre de diffraction pour 4 périodes de réseaux différents (30, 20, 15 et 11 μ s) en comparaison avec l'ordre zéro d'un échantillon avec une période de 30 μ m.

Le tableau 3.4 présente les paramètres pour les courbes. Pour les échantillons de 30 et de 20 μm , la profondeur et la largeur du pic de résonance sont similaires avec des valeurs de 0.49 et 0.45 pour la profondeur et 50 nm et 44 nm pour la largeur respectivement. Pour l'échantillon de 15 μm , on remarque que la profondeur du pic s'est détériorée. Le pic de résonance de l'échantillon avec la période de 11 μm est essentiellement disparue.

Tableau 3.4: Paramètres de comparaison pour les courbes de la figure 3.9.

Échantillon	Profondeur	Largeur à mi-hauteur
30 μm	0.49	50 nm
20 μm	0.45	44 nm
10 μm	0.37	47 nm

Dans le prochain chapitre, un test pour déterminer la limite de détection sera présenté pour le premier ordre de diffraction avec un échantillon de 30 μm de période.

3.3.2 Spectre des échantillons dans l'eau

Comme l'objectif du projet est de faire un biocapteur, les spectres expérimentaux pour les 4 mêmes échantillons dans l'eau ont été obtenus avec un ellipsomètre. Pour ces tests, une cellule avec un réservoir de liquide a été utilisée. Comme le milieu diélectrique est de l'eau dans ces expériences, l'angle d'interrogation SPR utilisé est de 73 degrés et un prisme de BK7 à base de triangle équilatéral a été utilisé. Tel que le démontrent les courbes de la figure 3.10, les tendances sont les mêmes que pour les tests dans l'air, on observe encore un décalage vers le rouge au fur et à mesure que la période diminue. Cependant, le déplacement est beaucoup moins significatif. Le déplacement est de quelques nanomètres à la place de quelques dizaines de nanomètres.

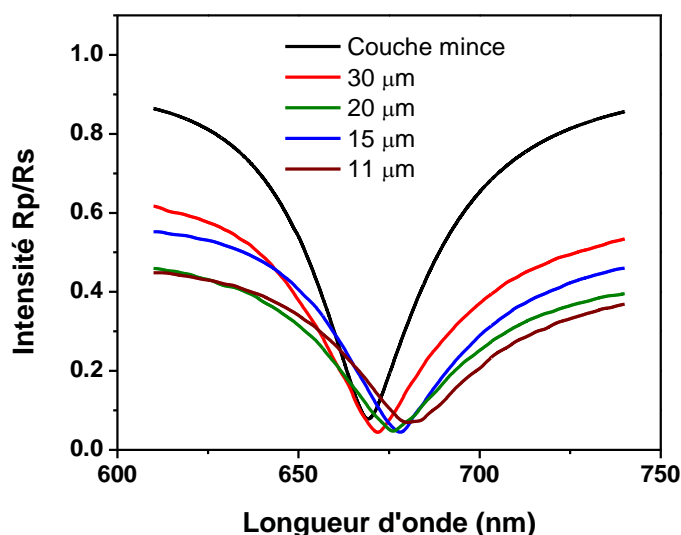


Figure 3.10: Courbes SPR expérimentales dans l'eau pour 4 périodes de réseaux différentes en comparaison avec la courbe d'une couche mince d'or (50 nm).

Il est à noter que l'échantillon de 30 μm présente les meilleurs paramètres puisque la résonance est plus profonde. Ceci est démontré en comparant la profondeur de résonance et la largeur à mi-hauteur qui sont résumées dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5: Comparaison des échantillons en fonction de la résonance SPR, de la profondeur de la résonance et de la largeur à mi-hauteur.

Échantillon	Résonance (nm)	Profondeur	Largeur à mi-hauteur (nm)
30 μm	672	0.54	39
20 μm	676	0.38	40
15 μm	678	0.47	38
11 μm	681	0.34	44

La section suivante traitera de l'échantillon utilisé pour les tests puisque l'influence des différents paramètres de fabrication a été présentée.

3.4 Présentation de l'échantillon optimisé

Suite à toutes ces caractérisations, il a été décidé de fabriquer un échantillon avec une période de $30\ \mu\text{m}$. La figure 3.11 présente des images de cet échantillon. Une vue d'ensemble du peigne d'électrodes interdigitées et des deux électrodes est présentée dans la figure 3.11a et une image agrandie, prise avec un microscope en transmission est présentée en 3.11b. L'échantillon est de forme carrée avec des côtés de $12.5\ \text{mm}$. La surface du peigne interdigité est de $4\ \text{mm}$ par $4\ \text{mm}$ et les deux électrodes ont été séparées par laser avec une plus grande puissance que celle utilisé lors de la fabrication du peigne, ce qui donne les gros traits noirs sur l'image de l'échantillon complète. L'épaisseur de l'or initiale est de $50\ \text{nm}$ ce qui ne devrait pas avoir changé pendant la fabrication. Une mesure de résistance entre les deux électrodes a donné une valeur trop élevée pour le multimètre, ce qui montre que les électrodes étaient bien déconnectées.

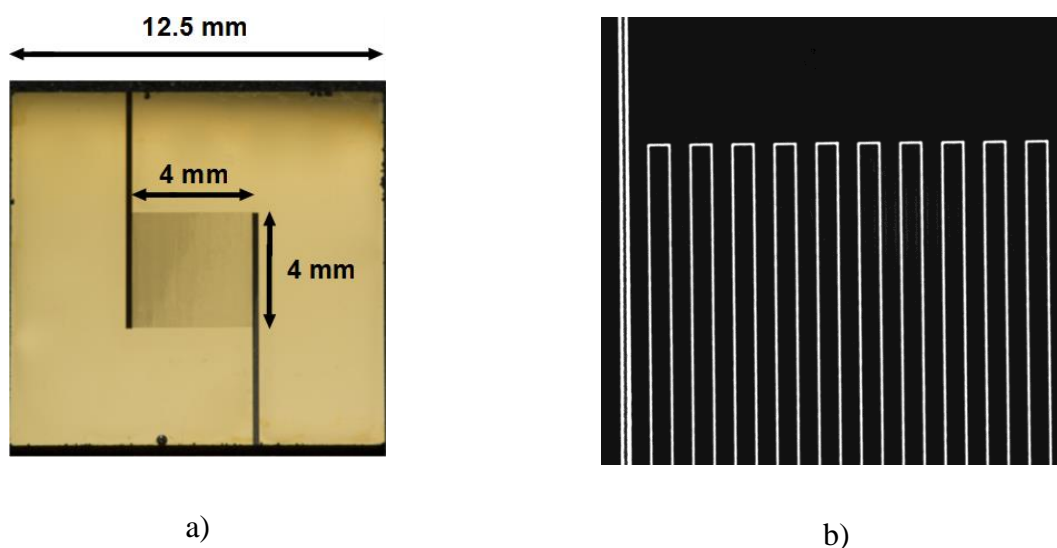


Figure 3.11: a) Image globale de l'échantillon utilisé pour les tests. La période de l'échantillon est de $30\ \mu\text{m}$. b) Image de l'échantillon prise avec un microscope optique en transmission.

Une fois l'échantillon fabriqué, des mesures de résonances angulaires et spectrales dans l'eau ont été prises avec l'ellipsomètre. La figure 3.12a présente les courbes de résonances angulaires de l'échantillon pour 4 longueurs d'onde d'excitation. Bien que les mesures angulaires donnent de bonnes courbes SPR, cette approche sur un échantillon ayant un peigne d'électrode ne sera pas utilisée. En effet, dans un système angulaire, la lumière est focalisée sur l'échantillon, et serait concentrée sur une seule électrode ou bien encore sur une fente. Pour sonder sur une

surface d'échantillon plus grande, et pour permettre l'utilisation du premier ordre de diffraction, un système spectral sera utilisé. La figure 3.12b présente les courbes de résonance plasmoniques spectrales pour 4 angles d'interrogation différents. Les 4 courbes présentent des pics étroits avec une bonne profondeur (R_p/R_s inférieur à 20%). La sélection de l'angle d'interrogation dépendra donc de la plage spectrale de la source utilisée.

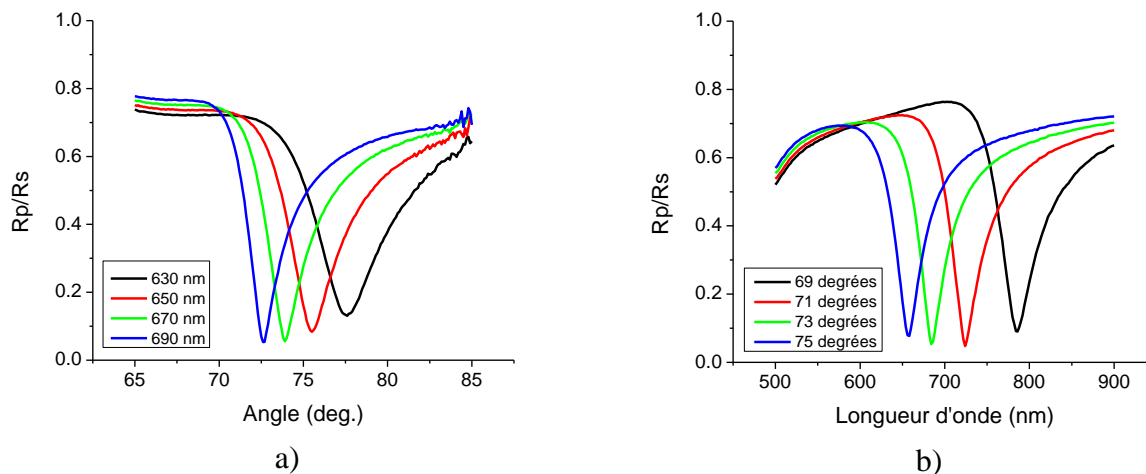


Figure 3.12: Mesures spectrales et angulaires de l'échantillon présenté à la figure 3.11.

Donc, ce chapitre a permis de discerner les différents paramètres qui ont dû être optimisés pour obtenir des peignes d'électrodes interdigitées en or fabriqués par laser capable de supporter des plasmons de surface. Dans le chapitre suivant, les systèmes de mesures utilisés pour les expériences de détection seront présentés et caractérisés.

CHAPITRE 4 CARACTÉRISATION DES SYSTÈMES DE MESURES

Les caractéristiques de l'échantillon plasmonique ayant été analysées, il est maintenant possible de l'utiliser pour faire de la biodétection à l'aide d'un système optique et électrique. Dans ce chapitre, plusieurs systèmes de mesures et expériences seront présentés.

Tout d'abord, les systèmes de détection optique sont étudiés dans la première section. Deux systèmes de mesures seront présentés et comparés, principalement en ce qui a trait à leur limite de détection. Par la suite, Le système de mesure pour les expériences d'impédance est exposé ensuite dans la deuxième section.

4.1 Systèmes SPR

4.1.1 Description du montage SPR

La figure 4.1 présente le système SPR spectral utilisé dans le cadre de ce projet avec la réflexion spéculaire de l'échantillon. Un laser supercontinuum acheté chez Fianium est utilisé comme source blanche, ayant une plage spectrale de 390 à 2600 nm. La sortie du laser étant fibrée, il n'est pas nécessaire de filtrer spatialement la lumière qui en sort. De plus, la lumière à la sortie de la fibre est collimatée. Comme il est seulement nécessaire d'avoir une plage spectrale de quelques centaines de nanomètres dans le visible, un filtre passe-bas a été utilisé pour éliminer toutes les longueurs d'ondes supérieures à 900 nm. Le laser ayant une puissance de sortie de 2.6 W, un filtre neutre est aussi utilisé pour diminuer la puissance sur l'échantillon. Un polariseur est ensuite utilisé pour donner une polarisation p (TM) à la lumière avant son entrée dans le prisme de couplage.

L'échantillon est maintenu en place à l'aide d'une cellule de mesure qui a été machinée pour les expériences. La cellule se trouve sur un goniomètre pour permettre de choisir la position angulaire avec précision. La cellule possède une entrée et une sortie pour de la fluide qui est contrôlée par une valve et une pompe. La cellule est aussi percée afin de permettre un contact électrique avec les électrodes en or pour les mesures d'impédance. Il est à noter que l'échantillon étant en configuration parallèle, les ordres de diffractions sortent du plan de ce schéma. À l'aide

d'un miroir et d'une lentille avec la distance focale appropriée, l'ordre zéro est focalisé à l'entrée d'un spectromètre Andor (Modèle Shamrock 500). Comme le diamètre du faisceau est d'environ 1 mm, une lentille de 35 mm de distance focale est utilisée pour optimiser l'utilisation du réseau du spectromètre. Le réseau de diffraction du spectromètre qui est utilisé pour les expériences a 1800 lignes/mm. La plage spectrale obtenue est de 27.13 nanomètres. Il est aussi possible d'utiliser des réseaux de 150 lignes/mm et de 1200 lignes/mm. Suite à la dispersion de la lumière par le réseau, la lumière est dirigée sur une caméra CCD achetée de Andor (modèle Newton). À l'aide du réseau de 150 lignes/mm, il est possible d'observer le spectre de la lumière totale qui entre dans le spectromètre.

Ce spectre est présenté dans la figure 4.1 pour la polarisation s et p (noir et rouge respectivement). La plage spectrale de la source une fois filtrée est d'environ 650 nm à 800 nm. Il est possible d'observer dans ce graphique un pic de résonance plasmonique pour la polarisation p autour de 700 nm. Pendant les expériences, le spectre de la polarisation s est enregistré, puis il sert de référence pour le spectre de polarisation p . Le pic de résonance plasmonique est donc normalisé par le spectre de référence pour obtenir un meilleur signal à analyser.

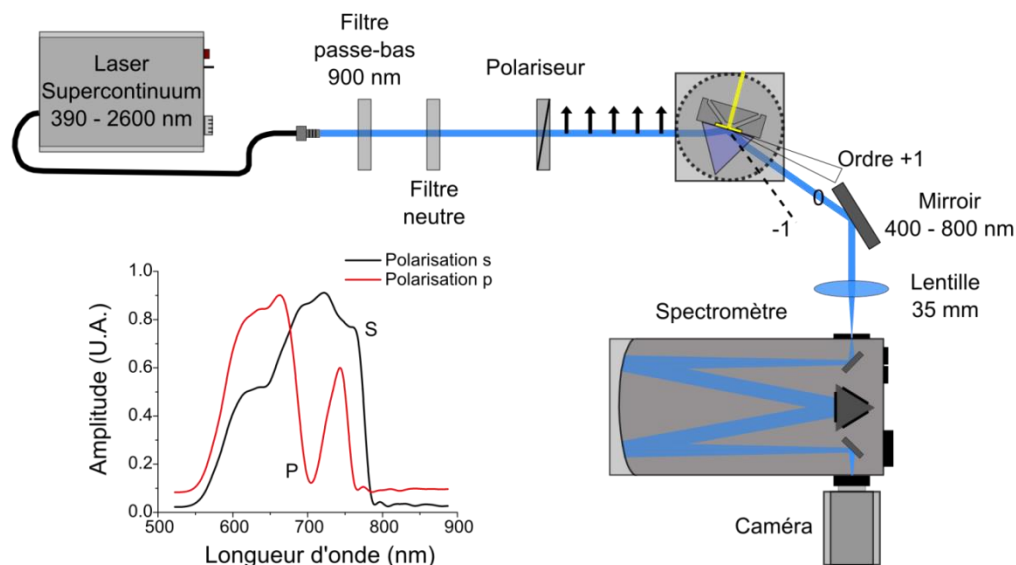


Figure 4.1 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la SPR spectrale avec le spectre obtenu. La courbe en rouge correspond à la polarisation p et la courbe en noir à la polarisation s .

4.1.2 Détermination de la limite de détection du système SPR

Pour déterminer la limite de détection du système, des tests avec une solution d'eau déionisée (eau DI) et une solution d'éthanol à 0.1% ont été faits. Pour ces expériences, de l'eau DI a initialement été injectée dans le système fluïdique. Par la suite, un changement de solution était fait toutes les 10 minutes. La figure 4.2a présente les résultats d'une expérience sur une couche mince d'or sans les peignes d'électrodes, avec un système SPR angulaire tel que présenté dans le chapitre 1. Cette courbe sert de référence comme elle représente un système et un échantillon tel qu'il est possible d'en retrouver sur le marché. Pour obtenir ce type de courbe, une régression polynomiale du pic de résonance plasmonique est exécutée en temps réel et la valeur de la position du minimum est enregistrée. L'axe des ordonnées donne donc la position du minimum SPR. Cette position est donnée en pixel, mais elle représente l'angle d'incidence pour les systèmes angulaires, ou la longueur d'onde pour les systèmes spectraux. Comme une régression polynomiale est utilisée, des régressions quadratiques, cubiques et d'ordres 4 ont été utilisées.

La courbe dans la figure 4.2a présente des discontinuités, telles que présentées par la flèche, qui sont dues à la valve automatique pendant le changement de solution. Suite au changement de solution par la valve, un certain temps est nécessaire pour que le changement d'indice de réfraction se fasse ressentir sur l'échantillon. Ce temps correspond au temps nécessaire pour que le liquide se rende de la valve à l'échantillon dans les tubes. Le changement d'indice de réfraction entre l'eau et l'éthanol à 0.1% est de 4.8×10^{-5} RIU [49]. La limite de détection obtenue pour le système angulaire est de 2.4×10^{-7} RIU, ce qui se compare très bien aux systèmes commerciaux.

La figure 4.2b présente les courbes de détection pour la même expérience sur le système spectral avec l'échantillon fabriqué par laser. Pour ces courbes, la LOD est de 9.1×10^{-7} RIU, 7.9×10^{-7} RIU et 8.5×10^{-7} RIU pour la régression quadratique, la régression cubique et la régression d'ordre 4. La régression quadratique ne suit pas aussi bien la position du pic plasmonique se qui se traduit en une augmentation de la LOD par rapport aux autres méthodes de régressions. Les régressions d'ordre 3 et 4 suivent bien le pic plasmonique, mais elles sont plus

affectées par le bruit. Comme la meilleure LOD a été obtenue avec une régression polynomiale cubique, ce type de régression sera utilisé pour les autres expériences décrites dans ce chapitre.

La limite de détection est moins bonne d'un facteur d'environ 3 pour le système spectral. Cette perte dans la LOD est causée par plusieurs facteurs :

- Premièrement, comme l'échantillon est composé d'un réseau en or, la réflexion spéculaire n'est pas aussi efficace que pour une couche mince d'or (moins de surface de réflexion pour une même grosseur de faisceau, soit environ 80%);
- Deuxièmement, le montage expérimental nécessite un plus grand nombre de pièces optiques, ce qui cause des imperfections dans l'alignement;
- Troisièmement (et possiblement le facteur le plus important), la source utilisée est beaucoup plus puissante, mais aussi moins stable, ce qui augmente la limite de détection.

Toutefois, malgré les pertes dans la limite de détection, celle-ci reste du même ordre de grandeur que les systèmes commerciaux.

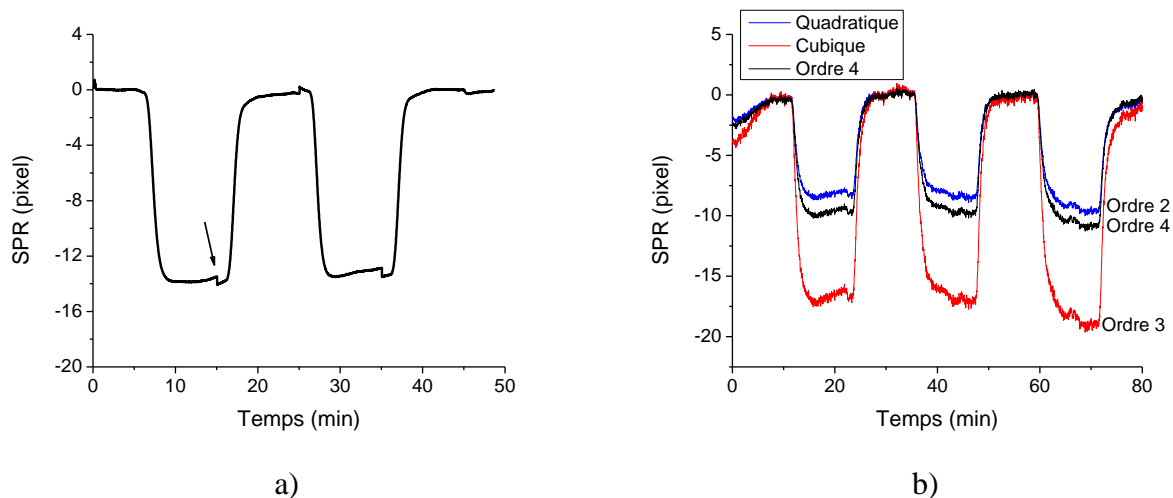


Figure 4.2: a) Résultat pour un test de limite de détection avec un montage SPR angulaire sur une couche mince d'or pour un changement d'indice de réfraction de 4.8×10^{-5} RIU. b) Résultat pour un test de limite de détection avec le montage SPR spectral de la figure 4.1 pour un changement d'indice de réfraction de 4.8×10^{-5} RIU. Trois types de quadratures différentes ont été utilisés pour modéliser le pic SPR.

4.1.3 Présentation d'un système SPR utilisant le premier ordre de diffraction de l'échantillon

La figure 4.3 présente un système de mesure pour utiliser le premier ordre de diffraction, incluant les résultats d'une expérience de limite de détection.

Pour le test de LOD, le laser supercontinuum du montage précédent a été utilisé. Il n'était donc pas nécessaire d'avoir un filtre et une lentille de collimation. À la sortie du laser, la lumière est polarisée et elle se rend dans le prisme puis sur l'échantillon de la même façon que précédemment. À la sortie du prisme, un des ordres de diffraction (ordre -1 dans cette image) est sélectionné à l'aide d'un miroir et orienté sur une caméra CCD linéaire. Pour obtenir la LOD, des solutions d'eau DI et d'éthanol 0.5% ont été utilisés. Le changement d'indice de réfraction entre les deux solutions est de 2.4×10^{-4} RIU. Une limite de détection de 7.2×10^{-6} RIU est obtenue pour le test avec le premier ordre de diffraction. Bien que la limite de détection soit d'un ordre de grandeur plus grand que pour le système précédent, le résultat est encourageant puisque le système est beaucoup moins dispendieux. En effet, en utilisant la dispersion du premier ordre de diffraction, il n'est pas nécessaire d'utiliser un spectromètre.

L'augmentation de la limite de détection est limitée par la sensibilité de l'ordre de diffraction qui est environ 2 fois moins sensible à un changement d'indice de réfraction que la réflexion spéculaire de l'ordre 0, tel que présenté dans la figure 3.8.

La sensibilité du premier ordre de diffraction étant seulement 2 fois plus faible, il devrait être possible d'améliorer le montage pour obtenir une meilleure LOD. En effet, il serait possible, à l'aide d'un système optique un peu plus particulier, d'utiliser l'ordre de diffraction +1 et -1. En suivant la séparation des deux pics à la place de la position d'un seul pic, la sensibilité devrait être doublée. La caméra CCD utilisée dans le premier montage est de très grande qualité et très coûteuse. Cette caméra est refroidie pendant l'acquisition des données tandis que la caméra CCD linéaire est moins sophistiquée, ce qui la rend moins cher, mais offre une performance moindre. De plus, pour le système de la figure 4.3, aucun spectromètre n'est nécessaire. Pour avoir une meilleure comparaison des deux systèmes SPR présentés, la même caméra aurait dû être utilisée.

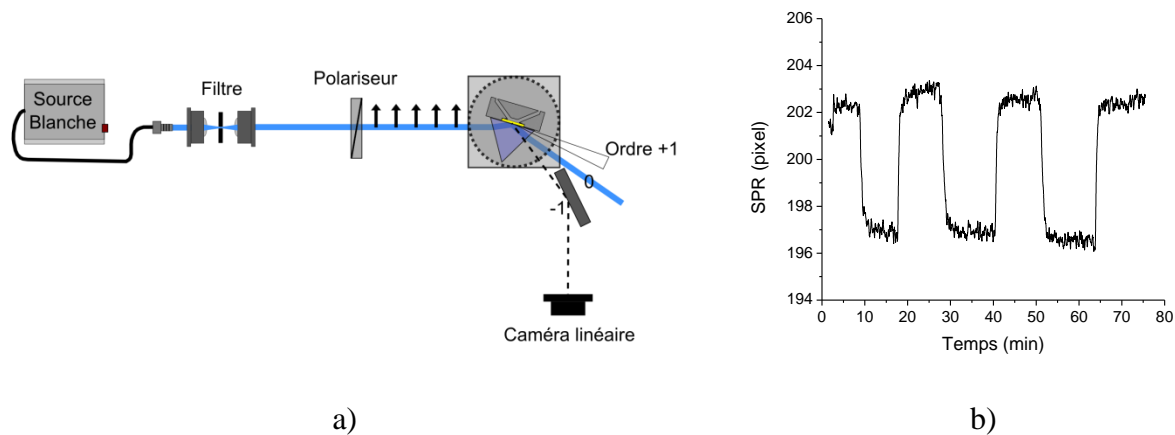


Figure 4.3: a) Montage expérimental utilisé pour faire des mesures directement avec le premier ordre de diffraction de l'échantillon. b) Résultat pour un test de limite de détection avec le montage SPR spectral de la figure a), pour un changement d'indice de réfraction de 2.38×10^{-4} RIU.

En utilisant le premier ordre de diffraction, l'intensité de la lumière à analyser est diminuée par rapport à la réflexion spéculaire. Cette réduction de signal se traduit en perte de limite de détection, surtout si la source n'est pas très puissante. Toutefois, bien que la diminution d'intensité entre l'ordre 1 et l'ordre 0 soit inévitable, il est possible d'optimiser la structure pour qu'un maximum d'intensité se retrouve dans le premier ordre de diffraction. En effet, en fonction de la profondeur de la fente du réseau, la distribution d'intensité dans les ordres de diffraction varie. Les simulations de la figure 4.4 analysent un réseau avec une fente au fond plat. Les simulations présentent l'intensité des ordres de diffraction pour 5 profondeurs de fentes différentes, allant de 0.1 micron à 0.5 micron. Un maximum d'intensité dans l'ordre 1 est obtenu pour une profondeur de fente de 0.4 micron. Bien qu'il soit difficile de contrôler la profondeur des fentes par laser, Cela devrait être possible. Les méthodes de microfabrication devraient aussi permettre la fabrication de ces dispositifs.

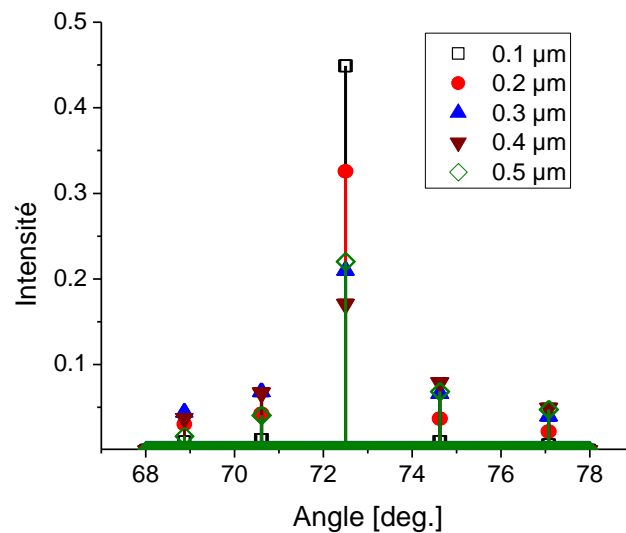


Figure 4.4: Optimisation de l'intensité des ordres de diffraction en fonction de la profondeur de la fente.

Les mesures SPR sont influencées par différentes conditions de test. Parmi celles-ci, la température est de très grande importance. En effet, un « *drift* », causé par un changement de température est toujours observé dans les mesures. Pour limiter cet effet, les solutions sont stabilisées thermiquement à l'aide d'un bain d'eau dans lequel elles se situent. De plus, la solution est injectée pour une période suffisamment longue pour que le système soit en équilibre thermique avant la prise de mesure.

4.2 Description et caractérisation du système à mesure d'impédance

Le montage expérimental de la figure 4.5 est une extension du montage optique de la figure 4.1. La modification vient du fait qu'un potentiostat acheté de Solartron Analytical est maintenant connecté sur les deux électrodes de l'échantillon. Le potentiostat permet d'appliquer une tension sur les électrodes et de faire des tests d'impédance à différentes fréquences.

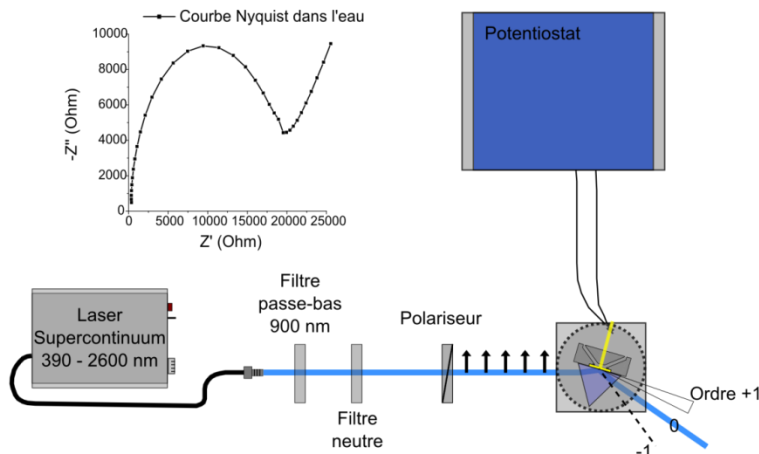


Figure 4.5: Montage expérimental utilisé pour les mesures d'impédance.

Pour les premières expériences avec le potentiostat, des solutions d'eau saline ont été utilisées puisque l'éthanol a des propriétés électriques proches de celles de l'eau. Quatre solutions d'eau salée avec des concentrations de 0.156 mg/100ml, 0.313 mg/100ml, 0.625 mg/100ml et 2.5 mg/100ml ont été utilisées dans les expériences de caractérisation du système d'impédance. Une tension sinusoïdale avec une fréquence de 10 Hz est appliquée pour mesurer les changements dans la capacité de double couche C_{dl} .

Des tests d'impédance pour 3 des concentrations d'eau salée, présentés à la figure 4.6, montrent que les expériences en temps réel permettent de suivre le changement de solutions et que l'impédance revient environ à la même valeur d'un test à l'autre. La quatrième concentration (2.5 mg/100ml) n'est pas présentée dans cette figure puisque le changement d'impédance était très élevé, ce qui rendait les autres courbes trop aplatit. Dans le cas où la valeur de l'impédance ne reviendrait pas à la même impédance pour l'eau DI entre les tests, le changement pourrait s'expliquer par une contamination dans les tuyaux du système de fluide, ou par un changement sur l'échantillon. Cependant, en se limitant à de faibles tensions sur l'échantillon, celui-ci ne devrait pas s'abimer. La limite de détection pour de l'eau est salée d'après ses résultats est de 1.3×10^{-3} mg/100ml.

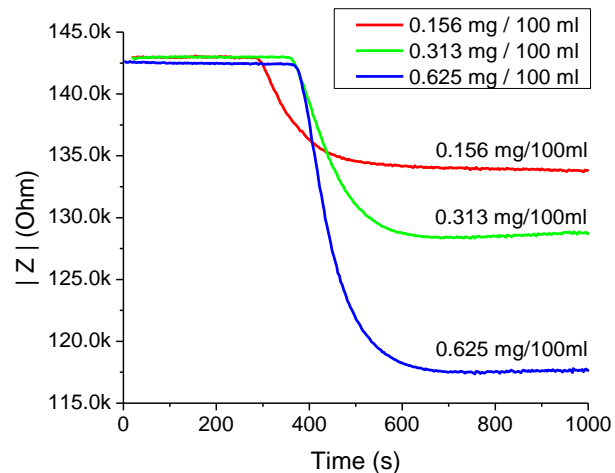


Figure 4.6: Mesures en temps réel avec le potentiostat pour des solutions d'eau avec différentes concentrations de NaCl. La fréquence est de 10 Hz.

Des courbes d'impédance en fonction de la fréquence de la tension sinusoïdale appliquée ont été mesurées pour chacune des solutions lorsque la mesure en temps réel présente une stabilisation dans l'impédance. Les courbes de Nyquist dans le plan complexe sont présentées dans la figure 4.7a et les courbes de l'impédance et de la phase en fonction de la fréquence sont présentées dans la figure 4.7b.

Les courbes ainsi que leurs déplacements ressemblent énormément au modèle de l'impédance présenté au chapitre 1, avec des changements dans la concentration de NaCl. Les courbes d'impédance présentent les trois mêmes régions qui se déplacent en fonction du changement dans la résistance de la solution. Comme il n'y a pas d'attachement spécifique à la surface des électrodes, la capacité de double couche ne change pas beaucoup. D'après ce modèle, les résistances de solution telles que présentées dans le tableau 4.1 sont obtenues.

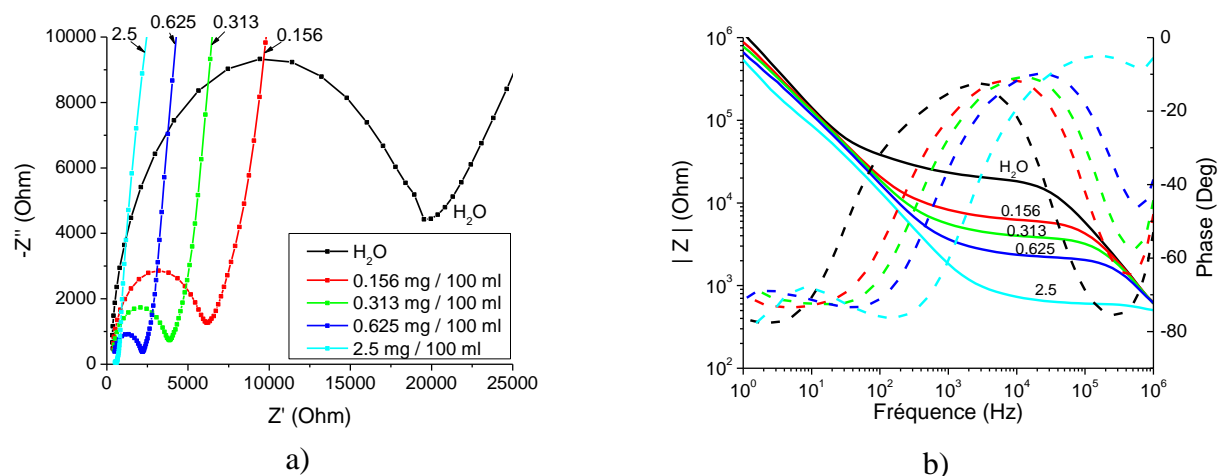


Figure 4.7: a) Courbes Nyquist pour des solutions d'eau avec différentes concentrations de NaCl b) Courbes d'impédance et de phases correspondantes aux courbes en a). La légende s'applique aux 2 graphiques.

La résistance pour la solution d'eau DI est la plus élevée, puis en augmentant la concentration de NaCl, la résistance diminue à cause de la formation d'ions de sodium (Na^+) et de chlore (Cl^-).

Tableau 4.1: Valeurs obtenue pour R_{SOL} pour 4 concentrations d'eau salée.

Solution	R_{SOL} ($\text{k}\Omega$)
Eau DI	19.5 ± 0.4
Eau salée 0.156 mg/100ml	6.2 ± 0.1
Eau salée 0.313 mg/100ml	3.84 ± 0.06
Eau salée 0.625 mg/100ml	2.20 ± 0.03
Eau salée 2.5 mg/100ml	0.596 ± 0.004

À la lumière de ces observations, le système de mesure ainsi que le modèle théorique utilisé semblent être compatibles.

4.3 Combinaison des deux types de mesures

Ayant démontré que les deux systèmes fonctionnent bien lorsqu'ils sont utilisés individuellement, Nous passons maintenant aux tests de mesures simultanées sur les deux types de systèmes.

Dans un premier temps, des mesures SPR pendant lesquelles une différence de potentiel était appliquée entre les deux électrodes seront présentées. Des tests en parallèle pour les deux méthodes de détections seront ensuite exposés dans le chapitre 5.

4.3.1 Influence de l'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes sur le pic SPR

Pour vérifier l'influence de l'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes sur les mesures SPR, une rampe de tension a été appliquée sur une des électrodes de l'échantillon. La rampe de tension était entre 0 V et 500 mV avec une vitesse de 10 mV/s et elle était appliquée périodiquement sous forme d'ondes triangulaires. Ces tests ont été exécutés dans une cellule de mesure contenant de l'eau DI.

La figure 4.8 présente la position du pic SPR en fonction du temps ainsi que le profil de tension appliqué. Le test SPR a été commencé avant l'application de la tension. Les courbes ne sont donc pas nécessairement représentées pour des moments équivalents. La forme triangulaire de la tension est rapidement reconnue dans le graphique. Le déplacement du pic SPR est d'environ 12 pixels, comme la plage spectrale est de 27 nanomètres et qu'il y a 2048 pixels sur la caméra, le déplacement de 12 pixels correspond 0.16 nm. Pour les expériences d'impédance, la tension appliquée est de 10 mV. En considérant que l'influence de l'application de la tension est linéaire, le déplacement du pic devrait être de 0.003 nm ou 0.24 pixel, avec une fréquence de 10 Hz. Dans les meilleures conditions, le bruit du système SPR, est de 0.2 pixel, ce qui correspond à 1 fois l'écart type. Le niveau de bruit pourrait donc doubler avec l'application de la tension. De plus, comme une seule donnée SPR est enregistrée par seconde, l'influence de la tension devrait être moyennée sur 10 cycles de tension. Suite à ce résultat, il est raisonnable de considérer que l'application d'une tension de 10 mV sur l'échantillon influence très peu les mesures SPR.

Expérimentalement, cette influence avec une onde sinusoïdale de 10 mV d'amplitude a été évalué négligeable, puisque aucune différence sur les courbes SPR n'a été observé.

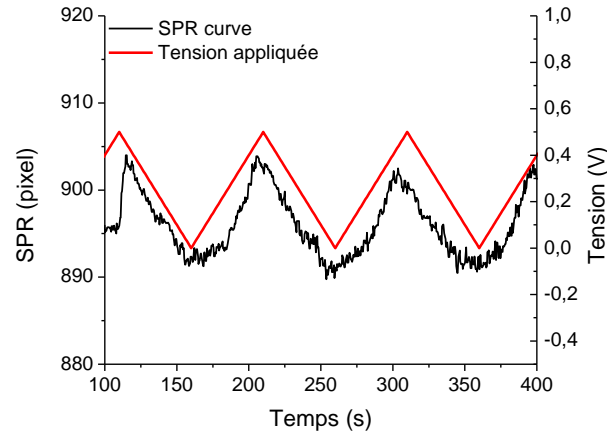


Figure 4.8: Déplacement du pic SPR en fonction de la tension appliquée sur les électrodes ainsi que la tension appliquée en fonction du temps. Les deux courbes ne sont pas nécessairement représentées pour des moments équivalents. Le déplacement observé pour une tension de 500 mV est de 0.16 nm (12 pixels).

Des spectres du pic plasmonique ont aussi été mesurés en fonction de la tension appliquée. Pour une tension de 500 mV, le pic de résonance semblait être un peu élargi, mais de manière très peu significative. Dans le chapitre qui suit, les expériences avec le biocapteur combiné seront présentées.

CHAPITRE 5 BIOCAPTEUR PLASMONIQUE ET ÉLECTROCHIMIQUE COMBINÉ

Ce chapitre présente des expériences simultanées avec les deux méthodes de biodétection (optique et électrique). Ces expériences permettent de mettre en évidence les avantages de chacune des méthodes. Finalement, des expériences de biodétection avec des oligonucléotides utilisant les deux systèmes en parallèle sont présentés

5.1 Résultats expérimentaux des deux types de mesures prises simultanément

Des expériences en temps réel pour différentes solutions avec les deux systèmes de mesures sont présentées à la figure 5.1. Dans l'expérience de la figure 5.1a, 3 solutions (identifiées comme A), B) et C) dans la figure) sont utilisées pour comparer les systèmes de mesures.

Solution A) : L'expérience est commencée avec de l'eau DI dans la cellule de mesure. La solution est substituée pour une solution d'éthanol 0.1% au temps A. Ce changement de solution correspond à un changement d'indice de réfraction de 4.8×10^{-5} RIU et à un très petit changement dans les propriétés électriques. Pour cette transition, le rapport signal sur bruit est meilleur pour la mesure SPR que pour la mesure d'impédance (54.8 et 23.1 respectivement). Le système SPR est donc meilleur pour la détection de l'éthanol.

Solution B) : La transition au temps B réinjecte de l'eau dans le système. Une solution d'eau salée avec une concentration de 0.313 mg/100ml est ensuite injectée. Comme le changement d'indice de réfraction est de 2×10^{-7} RIU et que ce changement est inférieur à la limite de détection du système SPR, aucun changement n'est observé sur la courbe SPR pour ce changement de solution. Du côté des mesures d'impédance, un changement d'impédance de plus de 10 k Ω est observé. Les mêmes conclusions peuvent être tirées du 3^e changement de solution.

Solution C) : La 3^e solution est de l'eau salée avec une concentration de 0.625 mg/100ml. La variation d'indice de réfraction est sous la limite de détection du système SPR (2×10^{-7} RIU),

aucun changement n'est détecté avec ce système. Par contre, le système électrique mesure une grande variation d'impédance.

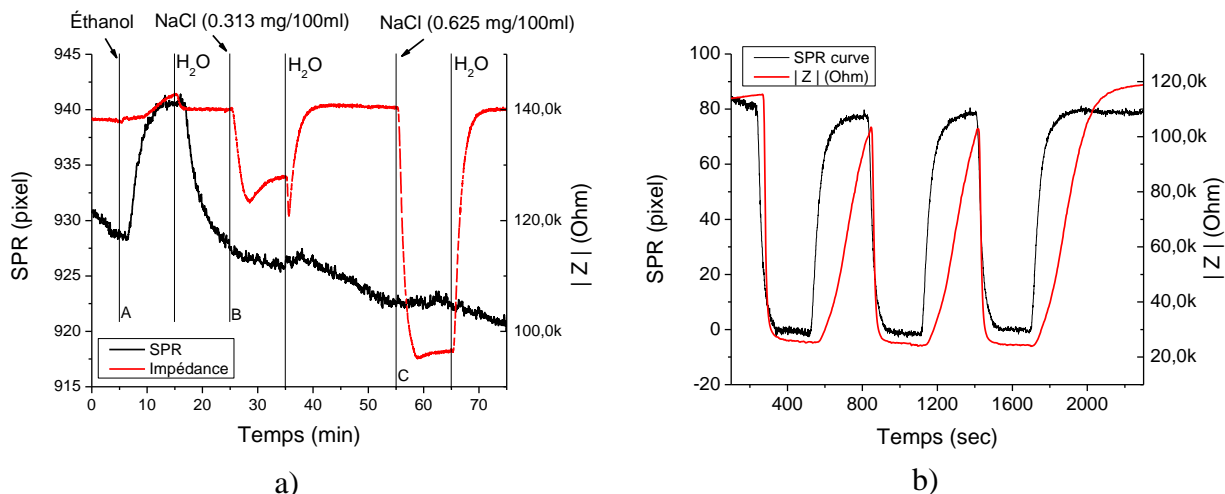


Figure 5.1: Mesures SPR et d'impédance simultanées. a) Différents changements de solutions A) transition eau à éthanol 0.1% (4.8×10^{-5} RIU) B) transition eau à eau salée 0.313 mg / 100 ml (2×10^{-7} RIU) C) transition eau à eau salée 0.625 mg / 100 ml (4×10^{-7} RIU) b) Test avec une haute concentration de NaCl de 0.1 g / 100 ml (1.75×10^{-4} RIU).

La figure 5.1b présente à son tour, une expérience avec une solution d'eau salée de haute concentration (100 mg/100ml). Le changement d'indice de réfraction est bien supérieur à la LOD du système SPR, soit de 1.75×10^{-4} RIU. Pour ce test, chacune des solutions était injectée pendant des intervalles de 5 minutes. Le rapport de signal sur bruit pour le système SPR et le système d'impédance est de 95 et 269 respectivement. Le système d'impédance est une fois de plus, plus sensible au changement de quantité de sel dans l'eau. La dynamique de la courbe donne aussi une information sur le système d'impédance. En effet, à l'arrivée d'une solution d'eau salée, le signal d'impédance sature très rapidement (moins d'une minute) tandis que lorsqu'une solution d'eau DI est injectée, la saturation de l'impédance est beaucoup plus longue à atteindre. L'augmentation dans le temps de saturation vient de l'attachement des ions sur la surface. La surface doit être nettoyée par l'eau DI qui circule pendant un certain temps avant que les ions retournent dans la solution.

Ces résultats démontrent que chaque méthode de mesures présente son avantage, en fonction de la substance à détecter : le système de mesure SPR est plus sensible au changement

de concentration d'éthanol alors que le système d'impédance est plus sensible au changement de concentrations de solutions salines. Par contre, dans le cas où les solutions sont très conductrices, le système d'impédance perd sa sensibilité.

5.2 Expériences avec des oligonucléotides

Suite à la caractérisation des deux systèmes et à la démonstration de leur fonctionnement en parallèle, une première expérience de biodétection a été faite. La procédure utilisée dans le cadre de cette expérience avec des oligonucléotides est présentée en détail dans l'article de A. Rachkov *et al* [50]. Un oligonucléotide est un court segment d'acides nucléiques. Pour l'ADN, il existe 4 types de nucléotides : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C). Chacun des nucléotides a un autre nucléotide qui lui est complémentaire. L'adénine s'attache avec la thymine (A-T) et la guanine s'attache avec la cytosine (G-C). Comme l'oligonucléotide est composé d'une suite de nucléotides, l'oligonucléotide complémentaire doit être composé d'une chaîne de nucléotides complémentaires un à un avec les nucléotides du premier oligonucléotide.

Dans le cadre de ce projet, les oligonucléotides utilisés proviennent des gènes normaux et mutants de la bactérie qui cause la tuberculose. Les oligonucléotides ont été obtenus de la compagnie IDT (Integrated DNA technologies). L'oligonucléotide P2 (ACCCACAAGCGCCGACTGTTG) a été utilisé comme agent biologique spécifique. P2 a été chimiquement modifié pour avoir un groupement thiol lié à son premier nucléotide, puisque ceux-ci s'attachent très fortement sur l'or. Pour les expériences, les oligonucléotides se trouvent dans une solution tampon pour optimiser l'attachement. Pour P2, le tampon est une solution de 0.5 M de KH_2PO_4 . À partir de cette solution, 1 μM de P2 est ajouté. P2 se retrouve initialement dans de l'eau DI, en ajoutant P2 dans la solution tampon, l'indice de réfraction de celui-ci diminue. Pour cette raison, une solution tampon, avec un volume d'eau équivalent au volume de P2 qui doit être ajouté a été préparée pour faire le test dont le résultat est montré sur la figure 5.2.

Dans cette expérience, la solution tampon est initialement injectée, puis la solution tampon diluée est injectée à son tour. La diminution de l'indice de réfraction dans le volume est marquée par une baisse d'une dizaine de pixels.

Dans les prochaines expériences, l'attachement des oligonucléotides sur la surface provoquera une augmentation de l'indice de réfraction, ce qui se traduit en une augmentation dans les courbes SPR. Cependant, l'attachement n'est pas instantané, il est donc possible de voir une diminution causée par le changement d'indice du volume avant de voir une augmentation.

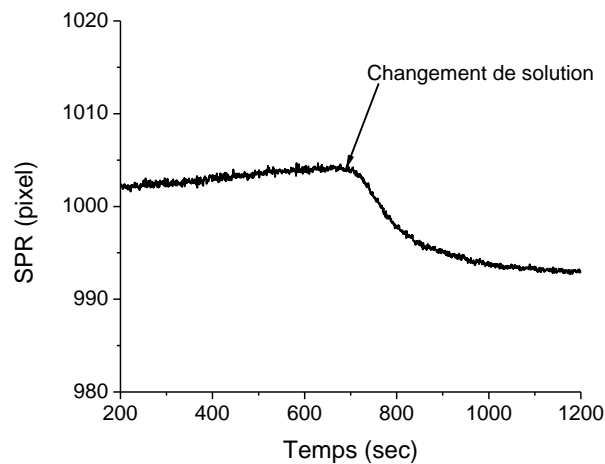


Figure 5.2: Déplacement du pic SPR entre une solution tampon de KH_2PO_4 et une solution du même tampon dilué d'une quantité d'eau correspondante au volume d'oligonucléotides présent dans les mesures subséquentes.

La figure 5.3 présente les résultats SPR et d'impédance pour les tests d'attachement des oligonucléotides P2. La solution tampon est initialement injectée. Puis, au temps A, la solution est injectée dans la cellule. Pendant 20 minutes, P2 est injecté à vitesse constante. Ensuite à partir du temps B, la pompe est arrêtée et la solution d'oligonucléotides reste stagnante dans la cellule pour 40 minutes. Pendant ce temps, les oligonucléotides s'attachent à la surface. Par la suite, la pompe est repartie au temps C et la solution tampon est réinjectée pour enlever les oligonucléotides qui ne sont pas attachés à la surface.

L'attachement est détecté par les deux méthodes. Cependant, les résultats de la méthode SPR présentent un meilleur rapport signal sur bruit pour la détection d'oligonucléotides (1131 comparé à 46).

Suite au changement de solution au temps A, le signal SPR diminue un peu à cause de la diminution de l'indice de réfraction du volume. Par la suite, le signal monte lorsque les

oligonucléotides s'attachent à la surface. Suite à la réinjection de la solution tampon au temps C, le signal augmente puisque l'indice de réfraction du volume augmente, mais cette augmentation est aussi due à la présence d'oligonucléotides dans les tubes d'injection. Suite au nettoyage avec la solution tampon, la réponse SPR se stabilise et ne diminue pas. Cela signifie que les oligonucléotides sont bien attachés à la surface. L'information que nous donne la courbe d'impédance est similaire. La diminution brusque observée suite à l'injection de P2 vient du changement de solution. Par la suite, l'augmentation progressive de l'impédance vient de l'attachement de P2 à la surface. La présence de P2 à la surface déloge les ions qui se trouvent près de la surface ce qui diminue la capacité de double couche et augmente l'impédance. Suite au nettoyage de la solution tampon, l'impédance augmente un peu, dû à l'arrivée d'oligonucléotides qui étaient dans les tubes, puis le signal sature. Le pic de résonance plasmonique pour l'attachement s'est déplacé de (620 ± 1) pixels, ce qui correspond à un déplacement de (8.21 ± 0.01) nm pour la longueur d'onde.

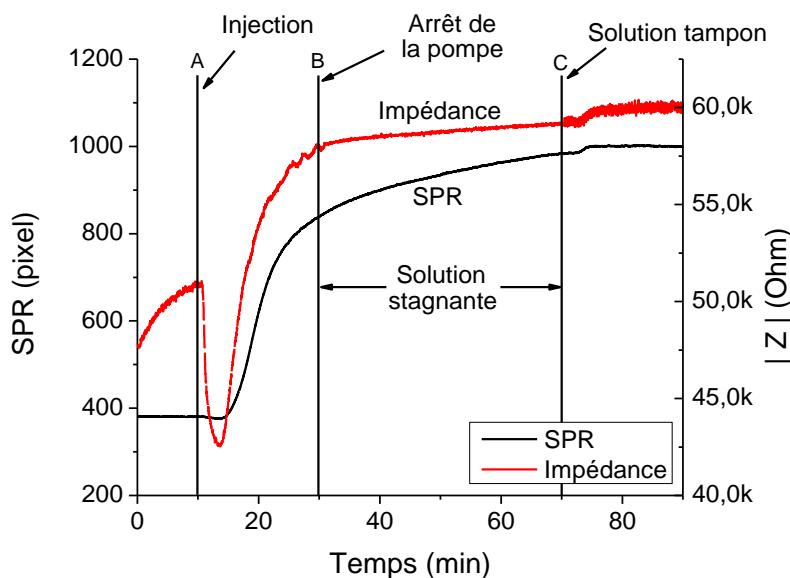


Figure 5.3 : Expérience d'attachement des oligonucléotides récepteurs P2. A) Début de l'injection des oligonucléotides récepteurs. B) Arrêt de la pompe pour l'incubation. C) Injection de la solution tampon.

Suite à l'attachement du récepteur P2, la surface d'or est saturée de groupements thiols. Pour ce faire, une solution de 1 mM de 1-mercapto-6hexanol est utilisée. Cette solution a été injectée pendant 45 minutes, mais n'a pas été suivie en temps réel par le système de mesure.

Cependant, les courbes d'impédance prises avant et après l'injection seront présentées à la figure 5.6 dans la suite de ce document.

Voici les trois autres oligonucléotides qui ont ensuite été utilisés pour vérifier la spécificité du capteur :

- Oligonucléotide complémentaire T2 (CAACAGTCGGCGCTTGTGGGT);
- Oligonucléotide non complémentaire Tc (GCTATCAGCCACGAACACCCA);
- Oligonucléotide partiellement complémentaire Tn (CGACAGTCGGCGCTTGTGGGT).

Dans la séquence de nucléotide de Tc, seulement un de ceux-ci n'est pas complémentaire à P2. Pour ces oligonucléotides, la solution tampon utilisée est du 2xSSC (2x *saline-sodium citrate*) qui est composé de 300 mM de NaCl et 30 mM de citrate de sodium. La concentration des oligonucléotides dans la solution tampon est de 200 nM.

La figure 5.4 présente schématiquement les interactions avec tous les objets utilisés. Les oligonucléotides récepteurs P2, qui sont préalablement liés à des groupements thiols, sont attachés à la surface qui est initialement propre (nettoyée à l'aide d'une solution de Pyranha). La surface est par la suite saturée par des groupements thiols pour éviter les attachements non spécifiques dans les tests de complémentarité. Les oligonucléotides complémentaires (T2 – étape 3c) peuvent se lier entièrement avec le récepteur, les acides nucléiques des oligonucléotides partiellement complémentaires (Tn – étape 3b) peuvent se lier à l'exception d'une paire (T-G en haut de la chaîne) et les oligonucléotides non-complémentaires (Tc – étape 3a) ne peuvent pas se lier puisque la majorité des paires d'acides nucléiques sont non-complémentaires à celles du récepteur.

Pour ces expériences, la solution tampon est initialement dans la cellule, puis la solution d'oligonucléotide est injectée pendant 5 minutes. Après 5 minutes, la pompe est arrêtée et la solution reste stagnante pendant 15 minutes. Par la suite, la solution tampon est réinjectée pour faire éjecter tous les oligonucléotides non attachés.

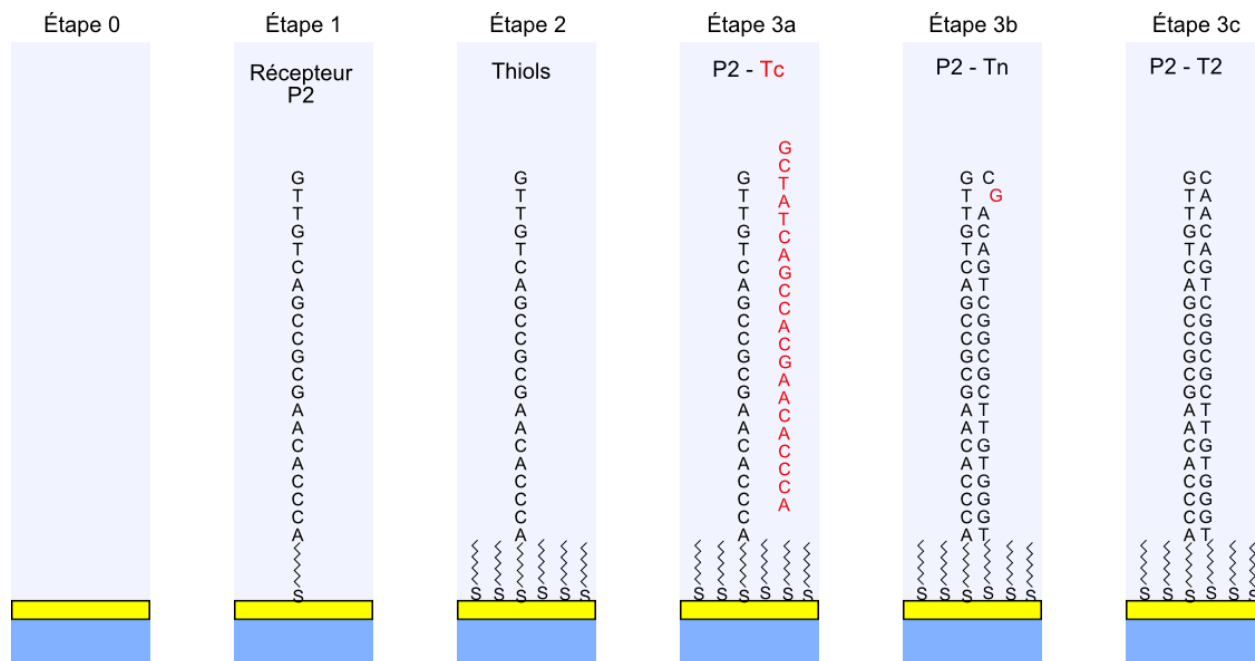


Figure 5.4: Principe de l'attachement sélectif des oligonucléotides ainsi que les différentes étapes des expériences.

La figure 5.5 présente les résultats de ces expériences. Toutes ces expériences ont été exécutées en commençant avec un échantillon ayant les récepteurs et les groupements thiols à la surface, sans la présence d'aucun autre agent biologique. Le temps A dans le graphique correspond au changement des solutions avec la valve automatique. Le temps B correspond à l'arrêt de la pompe pour la période d'incubation et le temps C correspond au redémarrage de la pompe pour l'injection de la solution tampon.

La courbe en bleu présente les résultats pour les oligonucléotides non complémentaires Tc. Suite à l'injection de Tc, une diminution du signal est observée puisque l'indice de réfraction du volume a diminué. Ensuite, une légère augmentation a lieu puisque les oligonucléotides se rapprochent de la surface. Comme ils sont non complémentaires, ils ne s'attachent pas et suite à l'injection de la solution tampon pour le nettoyage, une augmentation rapide est provoquée par le changement dans le volume puis le signal diminue puisque les oligonucléotides qui étaient près de la surface sont enlevés.

Les résultats pour les oligonucléotides Tn, partiellement complémentaires, sont représentés par la courbe noire. Un seul des nucléotides n'est pas complémentaire au récepteur,

l'attachement peut donc avoir lieu, mais de façon moins préférentielle. Suite à l'injection de la solution contenant Tn, une diminution est une fois de plus observée, ce qui est causé par l'indice de réfraction du volume. Par la suite, une forte augmentation du signal au causé par l'attachement des oligonucléotides Tn. Au redémarrage de la pompe, une autre augmentation est observée, causé par les oligonucléotides qui étaient dans les tubes d'injection et le changement d'indice du volume. L'attachement de Tn sur les récepteurs est marqué par un déplacement du pic de (34.8 ± 0.7) pixels, ce qui correspond à (0.46 ± 0.01) nm.

La courbe en rouge présente les résultats pour l'attachement des oligonucléotides complémentaires T2. Les mêmes caractéristiques sont observées que pour Tn. Cependant, l'attachement est marqué d'un plus grand déplacement du pic, dû à la meilleure complémentarité des oligonucléotides. En effet, le déplacement est (91.9 ± 0.7) pixels, ce qui correspond à (1.22 ± 0.01) nm.

Ces résultats présentent la spécificité de l'agent biologique utilisé pour le biocapteur. La réponse SPR est plus grande pour les segments de nucléotides complémentaires que pour les non complémentaires. Le système SPR est une excellente méthode pour détecter l'attachement des segments de nucléotides puisque la dimension des segments est très petite. Par contre les mesures avec le système d'impédance en temps réel ne permettaient pas de détecter l'attachement.

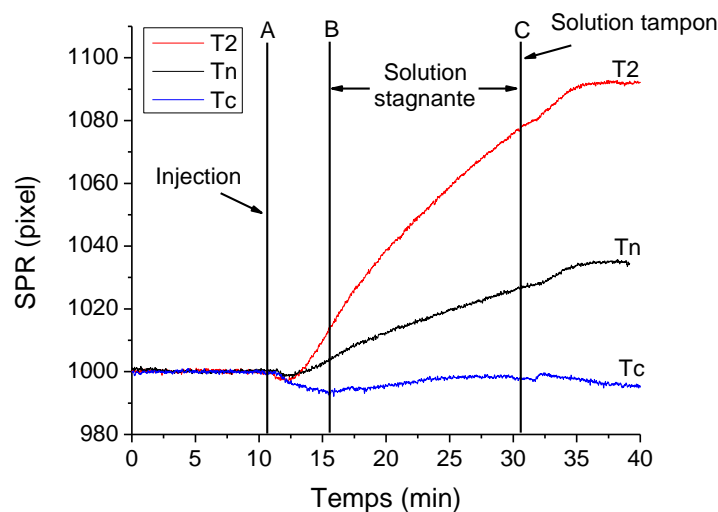


Figure 5.5: Tests SPR avec oligonucléotides. Les trois courbes représentent les tests d'attachement pour les oligonucléotides complémentaires T2 (rouge), les oligonucléotides non complémentaires Tc (noir) ainsi que les oligonucléotides partiellement complémentaires Tn (bleu).

La figure 5.6 présente les courbes d'impédances en fonction de la fréquence ainsi que les courbes de Nyquist pour les expériences avec les oligonucléotides. Les solutions tampons utilisées pour l'attachement des récepteurs ainsi que pour les tests d'attachement des oligonucléotides sont très conductrices à cause de la présence d'ions (K^+ et $H_2PO_4^-$ ou Na^+ et Cl^-). La valeur de R_{SOL} est donc nulle pour le modèle électrique. Les courbes d'impédance en fonction de la fréquence présentent donc des droites puisque la réponse est entièrement reliée à la capacité qui est plus grande, soit C_{dl} (voir les courbes bleues et rouges). Le changement de direction des droites à haute fréquence n'est pas expliqué par le modèle utilisé. Pour obtenir une droite croissante dans un graphique qui présente un modèle pour la norme de l'impédance, il faut soit utiliser une inductance, ou bien un condensateur avec un courant qui est inversé.

Les droites nous donnent tout de même de l'information sur ce qui se passe à la surface de l'échantillon. Suite à l'attachement du récepteur, les courbes en rouge montrent une augmentation de l'impédance. Cette augmentation vient d'une diminution de la capacité de double couche (C_{dl}) due au délogement des ions sur la surface. Le même comportement est observé pour l'attachement des oligonucléotides complémentaires. Cependant, la différence dans l'impédance est beaucoup plus faible puisque le nombre d'attachements est inférieur au nombre d'attachement des récepteurs sur la surface, ce qui confirme les résultats SPR.

La figure 5.6b présente les résultats pour l'attachement de Tc et de T2 sous la forme de courbe de Nyquist. Les courbes pour la solution tampon et pour les oligonucléotides non complémentaires se chevauchent presque parfaitement, ce qui confirme qu'il n'y a pas eu d'attachement avec P2. La courbe pour T2 par contre est déplacée, ce que confirme aussi les résultats SPR (qui présentent eux-aussi un attachement pour les complémentaires).

La figure 5.6a présente les courbes avant et après l'attachement des groupements thiols sur la surface. Puisque l'eau DI est utilisée comme solution tampon dans ce cas, la résistance de solution n'est pas nulle et nous retrouvons les 3 régions de la courbe d'impédance présentées au chapitre 1. En comparant la courbe de l'eau et la courbe prise suite à l'attachement des thiols, il

est évident qu'un important changement a eu lieu pour C_{dl} qui est responsable des changements dans la région 3. L'impédance augmente beaucoup puisque la surface devient entièrement saturée de groupements thiols, ce qui diminue C_{dl} .

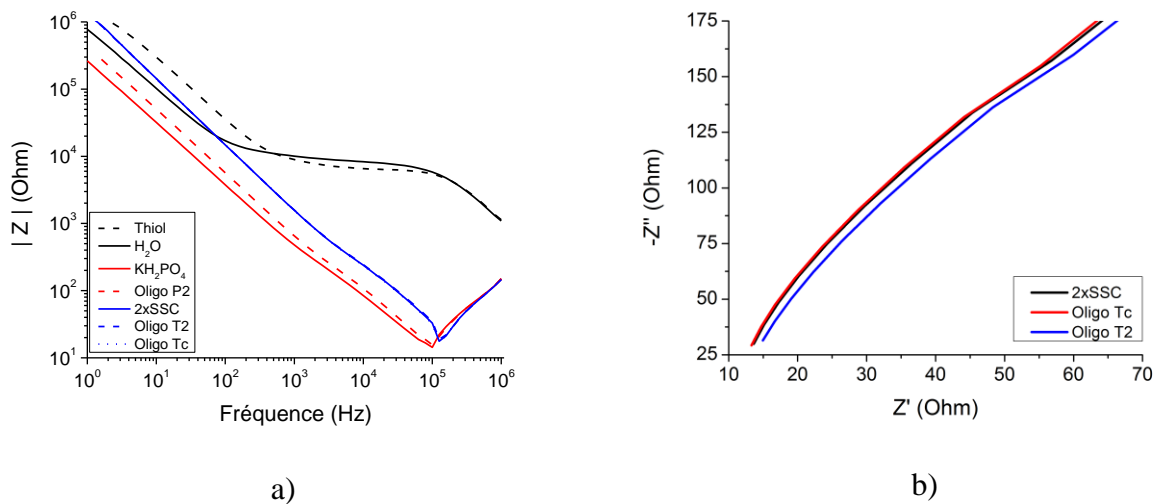


Figure 5.6: Résultats électriques pour les tests biologiques a) norme de l'impédance en fonction de la fréquence pour différentes expériences d'attachement avec différentes solutions tampons b) Courbes Nyquist pour le tampon 2xSSC et les oligonucléotides Tc et T2.

CONCLUSION

L'objectif de ce projet était de fabriquer un biocapteur sur lequel il est possible d'exécuter simultanément des mesures de plasmonique et d'impédance. Pour ce faire, une couche mince d'or a été micro usinée par laser, afin d'obtenir un motif de peignes d'électrodes interdigitées en surface. Un échantillon bien optimisé a permis de mesurer en temps réel des changements de solutions à l'aide des 2 systèmes puisque l'or permet la propagation des plasmons de surface et que les électrodes permettent des mesures d'impédance.

Les électrodes interdigitées ont été fabriquées à l'aide d'un laser femtoseconde dans une enceinte sous vide. Les paramètres optimaux de l'échantillon pour obtenir de bonnes propriétés plasmoniques ont été déterminés à l'aide des spectres de résonance plasmonique présentés au chapitre 3. La période optimale du peigne permettant de faire les mesures désirées est de 30 μm et la distance entre deux électrodes est de 6 μm . Avec l'aide de la méthode de réflexion totale atténuée en configuration Kretschmann, il a été déterminé que les peignes doivent être orientés de façon à être parallèles à la polarisation p de la lumière incidente pour obtenir de meilleures résonances.

Deux systèmes de mesures SPR ont été présentés dans ce mémoire : l'un se servant de la réflexion spéculaire pour suivre la résonance plasmonique, l'autre se servant du premier ordre de diffraction de l'échantillon. Les deux systèmes présentent une limite de détection comparable aux systèmes commerciaux. Cependant, la meilleure limite de détection est obtenue avec le système se servant de la réflexion spéculaire, soit 7.9×10^{-7} RIU en comparaison avec 7.2×10^{-6} RIU. Ce système a donc été utilisé pour toutes les autres expériences.

Un montage expérimental pour les mesures d'impédance a aussi été présenté. Une limite de détection de 1.3×10^{-3} mg/100ml a été obtenue en mesurant le changement dans l'impédance pour différentes solutions d'eau salée. Les résultats obtenus permettent de conclure que le modèle d'impédance présenté au chapitre 1 est compatible avec des mesures d'impédance avec des solutions présentant une résistance d'au moins 596 Ohms. En effet, les solutions tampons utilisées dans les expériences de biodétection présentent une rupture du modèle pour les hautes fréquences. Le spectre d'impédance respecte le modèle jusqu'à une fréquence critique où

l'impédance recommence à augmenter. Pour les faibles fréquences, la capacité de double couche modélise bien le système électrique, puis, à partir de la fréquence critique l'impédance grimpe.

Les deux méthodes de mesure ont présenté des avantages dans la détection de différentes substances. En effet, la SPR est plus sensible à la présence d'éthanol, et l'impédance est plus sensible aux solutions où il y a des ions conducteurs, si les concentrations restent faibles. En combinant les deux méthodes, il est possible d'utiliser les avantages des deux systèmes. Cependant, cette combinaison peut aussi créer des inconvénients. Tel que présenté dans le chapitre 4, l'application d'une tension sur les électrodes a pour effet de déplacer le pic de résonance plasmonique. Cependant, comme la tension appliquée pendant les expériences est faible, ce déplacement est négligeable, mais il est toujours présent dans le bruit.

Les expériences avec les oligonucléotides ont montré l'importance d'utiliser un élément biologique spécifique. En effet, les oligonucléotides Tc ne se sont pas du tout accrochés aux récepteurs comme ils étaient non complémentaires. Par contre, Tn a provoqué un déplacement de la résonance de (0.46 ± 0.01) nm et T2 à un déplacement de (1.22 ± 0.01) nm. Les mêmes conclusions pouvaient être tirées des résultats SPR et des résultats d'impédance à saturation. Comme le changement dans ces expériences avait lieu pour une très petite épaisseur sur l'électrode, la méthode SPR permettait une meilleure détection. Pour obtenir de l'information sur la solution et non l'attachement qui est déjà sondé par la SPR, des plus grandes fréquences de tension appliquée auraient dû être utilisées.

L'objectif de ce projet a été atteint puisque des mesures avec les deux types de systèmes de mesures ont été réalisées simultanément. Cependant, plusieurs modifications peuvent être faites pour améliorer le système afin qu'il soit miniaturisé et plus abordable.

Afin d'être en mesure d'utiliser le système avec le premier ordre de diffraction de l'échantillon, il serait nécessaire, pour la suite de ce projet, de l'améliorer en optimisant davantage l'échantillon. Il serait entre autre possible d'optimiser le premier ordre de diffraction en utilisant une profondeur de fente assurant plus d'intensité. De plus, il pourrait être avantageux de fabriquer les échantillons en salle blanche avec les méthodes de microfabrication standards. Comme les dimensions du réseau sont compatibles avec les techniques de photolithographie, la

principale difficulté serait de trouver une méthode pour contrôler la profondeur des fentes dans le verre avec précision afin d'obtenir un maximum d'intensité dans le premier ordre de diffraction. L'état de la surface dans les fentes peut aussi jouer un rôle important sur les propriétés plasmoniques. En effet, les résultats avec les échantillons fabriqués par laser démontrent qu'une surface rugueuse est avantageuse puisqu'elle limite la réflexion sur le verre. Cet effet est moins important pour de petites largeurs de fente, mais il joue tout de même un rôle.

Pour la suite de ce projet, il serait intéressant et même nécessaire de vérifier d'autres modèles d'impédance pour le système électrique, principalement pour expliquer le comportement des courbes pour les solutions très conductrices. Il serait aussi intéressant de diminuer la période du réseau dans les dimensions nanométriques pour profiter des propriétés plasmoniques des « *nanoslits* » [51-56]. Les réseaux nanométriques pourraient aussi être utilisés comme électrodes. Pour obtenir un échantillon de cet ordre de grandeur, un faisceau d'ions focalisé (FIB) ou une lithographie utilisant un faisceau d'électrons (E-beam) pourrait être utilisé. Ces échantillons présentent de bonnes propriétés plasmoniques en transmission, ce qui facilite la miniaturisation du système.

Une autre orientation pour le projet serait de se concentrer vers une détection à l'aide des ordres de diffractions +1 et -1 sur un même système. L'élaboration d'un système de mesure utilisant les 2 ordres de diffraction, permettrait d'obtenir une limite de détection comparable aux systèmes utilisant la réflexion spéculaire, mais à bien moindre coût puisque le spectromètre n'est plus nécessaire.

À l'aide d'un système combiné tel que présenté dans le cadre de ce projet, il serait intéressant d'étudier la viabilité des bactéries pendant une expérience de biodétection. Le système SPR permet la détection des bactéries, puis des mesures d'impédance pourraient indiquer la viabilité de celles-ci. Dans la première étape de la croissance des bactéries, celles-ci éjectent des molécules [57], ce qui pourrait être mesuré par impédance. Dans le cas où les bactéries sont mortes, aucune molécule n'est éjectée.

RÉFÉRENCES

- [1] L. C. Clark and C. Lyons, “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, no. 1, pp. 29–45, Oct. 1962.
- [2] G. G. Guilbault and J. G. Montalvo, “Urea-specific enzyme electrode,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 91, no. 8, pp. 2164–2165, Apr. 1969.
- [3] I. Palchetti, M. Mascini, D. Chimica, and V. Lastruccia, “Sensors and Microsystems,” vol. 54, pp. 15–23, 2010.
- [4] E. Kougiianos, “Biosensors : A tutorial review,” no. April, pp. 35–40, 2006.
- [5] J. S. Daniels and N. Pourmand, “Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges.,” *Electroanalysis*, vol. 19, no. 12, pp. 1239–1257, May 2007.
- [6] J. Homola, *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer. Berlin: , 2006, p. 251.
- [7] B. Lamprecht, J. R. Krenn, G. Schider, H. Ditlbacher, M. Salerno, N. Felidj, a. Leitner, F. R. Aussenegg, and J. C. Weeber, “Surface plasmon propagation in microscale metal stripes,” *Applied Physics Letters*, vol. 79, no. 1, p. 51, 2001.
- [8] J. R. Krenn and J.-C. Weeber, “Surface plasmon polaritons in metal stripes and wires.,” *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, vol. 362, no. 1817, pp. 739–56, Apr. 2004.
- [9] W.-C. Tan, T. Preist, J. Sambles, and N. Wanstall, “Flat surface-plasmon-polariton bands and resonant optical absorption on short-pitch metal gratings,” *Physical Review B*, vol. 59, no. 19, pp. 12661–12666, May 1999.
- [10] M. Quinten, a Leitner, J. R. Krenn, and F. R. Aussenegg, “Electromagnetic energy transport via linear chains of silver nanoparticles.,” *Optics letters*, vol. 23, no. 17, pp. 1331–3, Sep. 1998.
- [11] J. Takahara, S. Yamagishi, H. Taki, a Morimoto, and T. Kobayashi, “Guiding of a one-dimensional optical beam with nanometer diameter.,” *Optics letters*, vol. 22, no. 7, pp. 475–7, Apr. 1997.
- [12] R. Zia, M. Selker, and M. Brongersma, “Leaky and bound modes of surface plasmon waveguides,” *Physical Review B*, vol. 71, no. 16, p. 165431, Apr. 2005.

- [13] Gamry, “Two-, Three-, and Four-Electrode Experiments,” *Gamry instruments*. [Online]. Available: <http://www.gamry.com/assets/Application-Notes/2-3-4-Electrodes.pdf>. [Accessed: 27-Mar-2013].
- [14] S. Rana, R. H. Page, and C. J. McNeil, “Impedance spectra analysis to characterize interdigitated electrodes as electrochemical sensors,” *Electrochimica Acta*, vol. 56, no. 24, pp. 8559–8563, Oct. 2011.
- [15] M. Varshney and Y. Li, “Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells,” *Biosensors & bioelectronics*, vol. 24, no. 10, pp. 2951–60, Jun. 2009.
- [16] Z. Zou, J. Kai, M. J. Rust, J. Han, and C. H. Ahn, “Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 136, no. 2, pp. 518–526, May 2007.
- [17] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao, and Q.-J. Zhang, “Impedimetric biosensors,” *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 97, no. 4, pp. 219–26, Jan. 2004.
- [18] R. de la Rica, C. Fernández-Sánchez, and A. Baldi, “Polysilicon interdigitated electrodes as impedimetric sensors,” *Electrochemistry Communications*, vol. 8, no. 8, pp. 1239–1244, Aug. 2006.
- [19] E. Valera, J. Ramón-Azcón, Á. Rodríguez, L. M. Castañer, F.-J. Sánchez, and M.-P. Marco, “Impedimetric immunosensor for atrazine detection using interdigitated μ -electrodes (ID μ E’s),” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 125, no. 2, pp. 526–537, Aug. 2007.
- [20] A. Bonanni and M. del Valle, “Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: a review,” *Analytica chimica acta*, vol. 678, no. 1, pp. 7–17, Sep. 2010.
- [21] P. Van Gerwen, W. Laureyn, W. Laureys, G. Huyberechts, M. Op De Beeck, K. Baert, J. Suls, W. Sansen, P. Jacobs, L. Hermans, and R. Mertens, “Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 49, no. 1–2, pp. 73–80, Jun. 1998.
- [22] R. Kötz, D. M. Kolb, and J. K. Sass, “Electron density effects in surface plasmon excitation on silver and gold electrodes,” *Surface Science*, vol. 69, no. 1, pp. 359–364, Dec. 1977.
- [23] J. G. Gordon II and S. Ernst, “Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface,” *Surface Science*, vol. 101, no. 1–3, pp. 499–506, Dec. 1980.

- [24] A. Otto, "Investigation of electrode surfaces by surface plasmon polariton spectroscopy," *Surface Science*, vol. 101, no. 1–3, pp. 99–108, Dec. 1980.
- [25] A. Tadjeddine, D. M. Kolb, and R. Kötz, "The study of single crystal electrode surfaces by surface plasmon excitation," *Surface Science*, vol. 101, no. 1–3, pp. 277–285, Dec. 1980.
- [26] C. E. Jordan and R. M. Corn, "Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Electrostatic Biopolymer Adsorption onto Chemically Modified Gold Surfaces.," *Analytical chemistry*, vol. 69, no. 7, pp. 1449–56, Apr. 1997.
- [27] R. J. Heaton, a W. Peterson, and R. M. Georgiadis, "Electrostatic surface plasmon resonance: direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 7, pp. 3701–4, Mar. 2001.
- [28] Y. Zhang, K. Zhang, and H. Ma, "Electrochemical DNA Biosensors Based on Gold Nanoparticles / Cysteamine / Poly(glutamic acid) Modified Electrode," *American Journal of Biomedical Sciences*, pp. 115–125, Apr. 2009.
- [29] A. Baba, W. Knoll, and R. Advincula, "Simultaneous in situ electrochemical, surface plasmon optical, and atomic force microscopy measurements: Investigation of conjugated polymer electropolymerization," *Review of Scientific Instruments*, vol. 77, no. 6, pp. 64101–64106, 2006.
- [30] S. Sriwichai, A. Baba, S. Deng, C. Huang, S. Phanichphant, and R. C. Advincula, "Nanostructured Ultrathin Films of Alternating Sexithiophenes and Electropolymerizable Polycarbazole Precursor Layers Investigated by Electrochemical Surface Plasmon Resonance (EC-SPR) Spectroscopy," *Langmuir*, vol. 24, no. 16, pp. 9017–9023, Jul. 2008.
- [31] A. Baba, R. C. Advincula, and W. Knoll, "In Situ Investigations on the Electrochemical Polymerization and Properties of Polyaniline Thin Films by Surface Plasmon Optical Techniques," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 7, pp. 1581–1587, Jan. 2002.
- [32] K. a. Assiongbon and D. Roy, "Electro-oxidation of methanol on gold in alkaline media: Adsorption characteristics of reaction intermediates studied using time resolved electrochemical impedance and surface plasmon resonance techniques," *Surface Science*, vol. 594, no. 1–3, pp. 99–119, Dec. 2005.

- [33] H. Gu, Z. Ng, T. C. Deivaraj, X. Su, and K. P. Loh, "Surface plasmon resonance spectroscopy and electrochemistry study of 4-nitro-1,2-phenylenediamine: a switchable redox polymer with nitro functional groups.," *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 22, no. 8, pp. 3929–35, Apr. 2006.
- [34] R. Maalouf, C. Fournier-Wirth, J. Coste, H. Chebib, Y. Saïkali, O. Vittori, A. Errachid, J.-P. Cloarec, C. Martelet, and N. Jaffrezic-Renault, "Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance.," *Analytical chemistry*, vol. 79, no. 13, pp. 4879–86, Jul. 2007.
- [35] S. Helali, H. Ben Fredj, K. Cherif, a. Abdelghani, C. Martelet, and N. Jaffrezic-Renault, "Surface plasmon resonance and impedance spectroscopy on gold electrode for biosensor application," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 28, no. 5–6, pp. 588–593, Jul. 2008.
- [36] M. Manesse, V. Stambouli, R. Boukherroub, and S. Szunerits, "Electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies of DNA hybridization on gold/SiO_x interfaces.," *The Analyst*, vol. 133, no. 8, pp. 1097–103, Aug. 2008.
- [37] C. N. Tharamani, K. a. Mahmoud, G. R. Vasanthakumar, and H.-B. Kraatz, "Studies into the interaction of a ferrocene-conjugates of Gly-Gly-Arg-Tyr with papain: AC voltammetry, impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 137, no. 1, pp. 253–258, Mar. 2009.
- [38] C. H. Choi and A. C. Hillier, "Resonance for Angle Spread Imaging of Multielement Electrode Arrays with a multielement electrode array is described . An," vol. 82, no. 14, pp. 6293–6298, 2010.
- [39] G. Gupta, a S. B. Bhaskar, B. K. Tripathi, P. Pandey, M. Boopathi, P. V. L. Rao, B. Singh, and R. Vijayaraghavan, "Supersensitive detection of T-2 toxin by the in situ synthesized π -conjugated molecularly imprinted nanopatterns. An in situ investigation by surface plasmon resonance combined with electrochemistry.," *Biosensors & bioelectronics*, vol. 26, no. 5, pp. 2534–40, Jan. 2011.
- [40] M. D. L. Oliveira, C. P. de Melo, G. Oliva, and C. a S. Andrade, "Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100A12 protein.," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 82, no. 2, pp. 365–70, Feb. 2011.
- [41] T. N. Tun, P. J. Cameron, and a T. a Jenkins, "Sensing of pathogenic bacteria based on their interaction with supported bilayer membranes studied by impedance spectroscopy

- and surface plasmon resonance.,” *Biosensors & bioelectronics*, vol. 28, no. 1, pp. 227–31, Oct. 2011.
- [42] L.-G. Zamfir, I. Geana, S. Bourigua, L. Rotariu, C. Bala, A. Errachid, and N. Jaffrezic-Renault, “Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 159, no. 1, pp. 178–184, Nov. 2011.
- [43] J. Lu, W. Wang, S. Wang, X. Shan, J. Li, and N. Tao, “Plasmonic-based electrochemical impedance spectroscopy: application to molecular binding,” *Analytical chemistry*, vol. 84, no. 1, pp. 327–33, Jan. 2012.
- [44] K. Nakamoto, R. Kurita, and O. Niwa, “Electrochemical surface plasmon resonance measurement based on gold nanohole array fabricated by nanoimprinting technique,” *Analytical chemistry*, vol. 84, no. 7, pp. 3187–91, Apr. 2012.
- [45] S. Wang, X. Huang, X. Shan, K. J. Foley, and N. Tao, “Electrochemical surface plasmon resonance: basic formalism and experimental validation,” *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 3, pp. 935–41, Feb. 2010.
- [46] O. Telezhnikova and J. I. Homola, “New approach to spectroscopy of surface plasmons,” *Optics letters*, vol. 31, no. 22, pp. 3339–41, Nov. 2006.
- [47] T. Germer, “Modeled integrated scatter tool (MIST),” *National institute of standards and technology*, 2008. [Online]. Available: http://www.nist.gov/pml/div685/grp06/scattering_mist.cfm. [Accessed: 27-Mar-2013].
- [48] M. G. Moharam and T. K. Gaylord, “Rigorous coupled-wave analysis of planar-grating diffraction,” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 71, no. 7, p. 811, Jul. 1981.
- [49] J. Troy A. Scott, “Refractive Index Of Ethanol-Water mixtures And Density Refractive Index Of Ethanol-Water-Ethyl Ether Mixtures,” no. 1, pp. 406–412, 1946.
- [50] a Rachkov, S. Patskovsky, a Soldatkin, and M. Meunier, “Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis,” *Talanta*, vol. 85, no. 4, pp. 2094–9, Sep. 2011.
- [51] M. R. Gadsdon, I. R. Hooper, and J. R. Sambles, “Optical resonances on sub-wavelength silver lamellar gratings,” *Optics express*, vol. 16, no. 26, pp. 22003–28, Dec. 2008.
- [52] S. Patskovsky, N. Rousset, M. Meunier, and É. P. De Montréal, “Double peak nanoplasmonic sensor for multiple biosensing,” vol. 3, pp. 83–85, 2011.

- [53] P. Lalanne, J. P. Hugonin, and J. C. Rodier, "Approximate model for surface-plasmon generation at slit apertures.," *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, vol. 23, no. 7, pp. 1608–15, Jul. 2006.
- [54] M. Maisonneuve, O. d'Allivy Kelly, a-P. Blanchard-Dionne, S. Patskovsky, and M. Meunier, "Phase sensitive sensor on plasmonic nanograting structures.," *Optics express*, vol. 19, no. 27, pp. 26318–24, Dec. 2011.
- [55] L. Martín-Moreno, F. J. García-Vidal, H. J. Lezec, K. M. Pellerin, T. Thio, J. B. Pendry, and T. W. Ebbesen, "Theory of extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays.," *Physical review letters*, vol. 86, no. 6, pp. 1114–7, Feb. 2001.
- [56] M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. a Rogers, and R. G. Nuzzo, "Nanostructured plasmonic sensors.," *Chemical reviews*, vol. 108, no. 2, pp. 494–521, Feb. 2008
- [57] A. Novick, "Growth of Bacteria," *Annual Review of Microbiology*, vol. 9, Oct. 1955, pp. 97-110.