



HAL
open science

Développement de biocapteurs sur fibres optiques : vers le diagnostic moléculaire in vivo

Elodie Engel

► **To cite this version:**

Elodie Engel. Développement de biocapteurs sur fibres optiques : vers le diagnostic moléculaire in vivo. Optique [physics.optics]. Université Grenoble Alpes, 2021. <tel-04932386>

HAL Id: tel-04932386

<https://hal.science/tel-04932386v1>

Submitted on 6 Feb 2025

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

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



HAL Authorization

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Ecole Doctorale de Physique

Spécialité : Physique pour les sciences du vivant

Présentée par

Elodie ENGEL (épouse BIDAL)

Laboratoire Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour
l'Energie et la Santé (SyMMES)

Développement de biocapteurs sur fibres optiques : vers le diagnostic moléculaire *in vivo*

HDR soutenue publiquement le 1^{er} juin 2021
devant le jury composé de :

Mme Sabine SZUNERITS

Professeure, Université de Lille (Rapporteur)

Mme Souhir BOUJDAY

Professeure, Sorbonne Université (Rapporteur)

M. Hervé RIGNEAULT

Directeur de recherche CNRS, Institut Fresnel, Marseille (Rapporteur)

M. Guillaume BACHELIER

Maître de conférence, Université Grenoble Alpes (Examinateur)

M. Philippe CINQUIN

Professeur, Centre Hospitalier Université Grenoble Alpes (Examinateur)

M. Eric LACOT

Professeur, Université Grenoble Alpes (Examinateur)



Table des matières

I. Curriculum Vitae.....	2
I.1. Formation initiale	2
I.2. Parcours professionnel.....	2
I.2.1. Recherche.....	2
I.2.2. Enseignement.....	3
I.3. Publications et communications scientifiques.....	3
I.4. Activités non strictement scientifiques.....	6
I.5. Encadrements, co-encadrements d'étudiants et doctorants	6
I.6. Compétences spécifiques.....	7
II. Résumé des activités de recherche	8
III. Contexte du travail de thèse	10
IV. Développement de biocapteurs plasmoniques	11
IV.1. Introduction – Principe	11
IV.2. Première expérience au CREAB – Etude d'une biopuce capable de capturer et de relarguer spécifiquement des cellules	12
IV.3. Mise au point de biocapteurs plasmoniques sur fibres optiques pour le diagnostic <i>in vivo</i>	16
IV.3.1. Introduction	16
IV.3.2. Conception des biocapteurs plasmoniques sur des assemblages multifibres.....	19
IV.3.3. Caractérisation optique des assemblages plasmoniques	25
IV.3.4. Biodétections	28
IV.3.5. Conclusion et perspectives.....	35
IV.4. Projet « Biocapteur interférométrique sur fibre ».....	36
IV.4.1. Introduction	36
IV.4.2. Principe physique de la détection et état de l'art.....	37
IV.4.3. Présentation des différentes étapes du projet	39
IV.4.4. Faisabilité du projet et conclusion	51
IV.5. Etude du phénomène d'interaction entre modes optiques et plasmons de surface	51
IV.5.1. Introduction	51
IV.5.2. Effet des modifications de l'indice optique sur la distribution spatiale de l'intensité.....	53
IV.5.3. Exploitation du phénomène : optimisation de la sensibilité aux variations d'indice optique	54
IV.5.4. Interprétation modale du phénomène observé	56
IV.5.5. Conclusion et perspectives.....	58
V. Conclusion générale	59
VI. Bibliographie	60

I. Curriculum Vitae

Elodie BIDAL née ENGEL

38 ans, née le 25 novembre 1982

Mariée, 2 enfants nés en 2017 et 2019

✉ : elodie.engel@univ-grenoble-alpes.fr

☎ : 06 61 84 78 04 / +33(0)4 38 78 32 74

Equipe Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages Biologiques (CREAB)

Laboratoire Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé (SyMMES)

Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble (IRIG)

CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9

I.1. Formation initiale

Licence Physique, Université Grenoble Alpes (UGA), Mention Très Bien (2003)

Master I Physique, UGA Mention Bien (2004)

Agrégation en Physique option Physique, concours préparé à l'UGA (2005)

Master II Physique pour les Sciences du Vivant, UGA, rang 1 (2006)

Thèse en biologie cellulaire, moléculaire, biochimie, monitrice en Sciences Physiques (2006-2009)

I.2. Parcours professionnel

I.2.1. Recherche

Depuis septembre 2018 - Recherche 60% - Enseignement 40%

Maître de conférences UGA - CREAB – SyMMES – IRIG

- ✓ **Co-encadrement d'un doctorant** (O. Bratash) – 2019-2022
- ✓ **Obtention d'un financement de thèse PHARE** CEA - 2019-2022
- ✓ **Initiation du projet BiFibre** - IRS (26k€) – 2020-2021
- ✓ **Obtention d'un financement d'équipement** (25k€) CNRS
- ✓ **Poursuites des activités de recherche initiées en tant que collaboratrice extérieure au CREAB (listées ci-dessous)**
- ✓ **3 articles, 2 communications orales**
- ⊕ **Développement de Biocapteurs interférométriques sur Fibres (BiFibre) microstructurées pour le diagnostic endoscopique *in vivo***

Mars 2012 - septembre 2018 - Recherche 20% - Enseignement 80%

Collaboratrice extérieure pour le CEA-Grenoble – CREAB - SyMMES – IRIG

- ✓ **Coordination du projet ANR MOLY**, MOLEcular EndoscopY for *in vivo* diagnosis, (ANR-15-C19-0005-01) octobre 2015 → septembre 2019, **responsable de l'instrumentation optique et de la caractérisation des fibres optiques *in vitro***
- ✓ **Co-encadrement d'un doctorant** et d'un stagiaire de Master II (K. Vindas) – 2014-2017
- ✓ **1 brevet, 2 articles, 3 actes de congrès, 5 communications orales**
- ⊕ **Développement de biocapteurs plasmoniques sur fibres optiques microstructurées pour le diagnostic endoscopique *in vivo***
- ⊕ **Chimie de surface** pour la fonctionnalisation de surfaces d'or, de verre (SAM, électrochimie)
- ⊕ **Caractérisation de surfaces biofonctionnalisées**
- ⊕ **Instrumentation optique**, microscopie, spectroscopie, fibres optiques, lasers

Septembre 2006 - septembre 2009

Doctorat en biologie cellulaire, moléculaire, biochimie – Laboratoire de Transduction du Signal – CEA-Grenoble – Directrice de thèse : Dr M-O. Fauvarque

Titre de la thèse : *Identification des « Ubiquitin Specific Proteases » impliquées dans la régulation des voies de l'immunité chez la drosophile*. Thèse soutenue le 2 juillet 2009

- ✓ **3 articles, 2 actes de congrès, 7 communications orales**
- ⊕ **Etude fonctionnelle** de trois Ubiquitin Specific Proteases (USPs) par transgénèse chez la drosophile
- ⊕ **Mise au point d'un crible** par ARN interférence de la fonction des 21 USPs de drosophile
- ⊕ **Réalisation de clonages** et vérification de l'activité catalytique de trois USPs
- ⊕ **Encadrement** d'un stagiaire de Master I

1.2.2. Enseignement

Depuis septembre 2018

Maître de conférences - 148h/an - 1ère et 2ème année de DUT Mesures Physiques (MP) - IUT1 Grenoble

- ✓ **Mise en place d'un projet « microscopie sans lentille » en collaboration avec le CEA-LETI**
- ✓ **Développement de pédagogie active dans le cadre d'un module de rédaction de CR**
- ⊕ **Enseignements principaux en chimie analytique, optique, structure atomique et moléculaire**

2010 – 2018

PRAG en physique - 384h/an - 1ère et 2ème année de DUT MP - IUT1 Grenoble

- ✓ **Montage d'un Apprentissage Par Problème en Structure Atomique et Moléculaire**, projet financé par la cellule PédagoTICE en 2015
- ✓ **Responsable du cours** de Structure Atomique et Moléculaire (130 étudiants)
- ✓ **Responsable des travaux pratiques** de chimie analytique (1ère année de DUT, 130 étudiants)
- ✓ **Encadrement de projets en électronique et statistiques**, suivi de stages
- ✓ **Travail en collaboration avec des pédagogues du laboratoire d'informatique de Grenoble**
- ⊕ **Enseignements principaux en optique géométrique, ondulatoire, optronique, spectroscopie atomique et moléculaire, chimie analytique, structure atomique et moléculaire**

2009 – 2010

Professeure Agrégée de physique – 420h - 1ère et Terminale STI - Lycée Boissy d'Anglas - Annonay

- ⊕ Enseignement de la physique appliquée

2006 – 2009

Monitrice - 192h - Licence 1 - DLST - Université Joseph Fourier – Grenoble

- ⊕ Enseignement en travaux pratiques pluridisciplinaires : physique, mécanique, chimie, biologie autour du thème de l'eau
- ⊕ Enseignement en mécanique du point, travaux dirigés et travaux pratiques

1.3. Publications et communications scientifiques

1 Brevet / 10 publications dans les journaux à comité de lecture / 5 actes de congrès – proceedings / 9 participations à des conférences

Brevet

[1] Vindas, K., **Engel, E.**, Leroy L., Buhot A., Livache, T. *Procédé de détection d'une variation locale d'indice de réfraction d'un milieu diélectrique situé à la surface d'un capteur optique*. **Demande de brevet n° 1751242, déposé le 15 février 2017**

Revues scientifiques à comité de lecture

[2] Vindas, K., Buhot, A., Livache, T., Garrigue, P., Sojic, N., Leroy, L., **Engel, E.** *Enhanced sensitivity of plasmonic optical fiber sensors by analyzing the distribution of the optical modes intensity*. (2020) *Optics Express* Vol. 28, Issue 20, pp. 28740-28749. doi.org/10.1364/OE.399856

[3] Desmet, C., Vindas, K., Alvarado Meza, R., Garrigue, P., Voci, S., Sojic, N., Maziz, A., Courson, R., Malaquin, L., Leichle, T., Buhot, A., Roupioz, Y., Leroy, L., **Engel, E.** *Multiplexed Remote SPR Detection of Biological Interactions through Optical Fiber Bundles*. (2020) *Sensors*, MDPI, Vol 20 (2), p.511. doi.org/10.3390/s20020511

[4] Vindas, K., Leroy, L., Garrigue, P., Voci, S., Livache, T., Arbault, S., Sojic, N., Buhot, A., **Engel, E.** *Highly-Parallel Remote SPR Detection of DNA Hybridization by Micropillar Optical Arrays*. (2019) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol 411, p2249-2259 doi.org/10.1007/s00216-019-01689-2

[5] **Engel, E.**, Bombera, R., Leroy L., Calemczuk, R., Laplatine, L., Baganizi, D.R, Marche, P. N., Roupioz, Y., Livache, T. (2017) *Chauffage par effet plasmon pour la désorption localisée de cellules capturées sur une biopuce*, *Instrumentation Mesure et Métrologie, I2M, Méthodes d'instrumentation et d'analyse des mesures*, Vol 15/3-4 p.9-27 [doi:10.3166/i2m.15.3-4.9-27](https://doi.org/10.3166/i2m.15.3-4.9-27)

[6] **Engel, E.**, Viargues, P., Mortier, M., Taillebourg, E., Couté, Y., Thevenon, D. and Fauvarque, M-O. (2014) *Identifying USPs regulating immune signals in Drosophila: USP2 deubiquitinates Imd and promotes its degradation by interacting with the proteasome*. *Cell Communication and Signalling*. 12:41 [doi: 10.1186/s12964-014-0041-2](https://doi.org/10.1186/s12964-014-0041-2)

[7] Leroy, L., Bombera, R., **Engel, E.**, Calemczuk, R., Laplatine, L., Baganizi, D-D., Marche, P.N., Roupioz, Y. and Livache, T. (2014) *Photothermal effect for localized desorption of primary lymphocytes arrayed on an antibody/DNA-based biochip*. *Lab on a Chip*. Vol.14(12) p1987-1990 [doi: 10.1039/c4lc00336e](https://doi.org/10.1039/c4lc00336e)

[8] Thevenon, D., **Engel, E.**, Avet-Rochex, A., Gottar, M., Bergeret, E., Tricoire, H., Benaud, C., Baudier, J., Taillebourg, E., and Fauvarque, M-O. (2009) *The Drosophila Ubiquitin Specific Protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signalling*. *Cell Host and Microbes*. Vol. 6, p309-320 [doi: 10.1016/j.chom.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.007)

[9] Bergeret, E., Perrin, J., Williams, M., Grunwald, D., **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Bruckert, F., Cosson, P., and Fauvarque, M-O. (2008) *TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis*. *Journal of Cell Science*. Vol. 121, p3325-3334 [doi: 10.1242/jcs.030163](https://doi.org/10.1242/jcs.030163)

[10] **Engel, E.**, Doss, N., Harris, G., and Tennyson, J. (2005). *Calculated spectra for HeH⁺ and its effect on the opacity of cool metal-poor stars*. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*. Vol. 357, p471-477 doi.org/10.1111/j.1365-2966.2005.08611.x

[11] Lilensten, J., Delorme, P., Samouillan, S., **Engel, E.**, and Barthélémy., M. (2005). *Influence of the thermosphere on electromagnetic waves propagation: Application to GPS signal*. *Radio Science*. Vol. 40, p3057-3064 [doi: 10.1029/2004RS003057](https://doi.org/10.1029/2004RS003057)

Actes de congrès - proceedings

[12] Vindas, K., **Engel, E.**, Garrigue, P., Livache, T., Arbault, S., Sojic, N., Leroy, L. *Nano-Structured Optical Fiber Bundles for Remote SPR Detection: A First Step toward in Vivo Biomolecular Analysis*, Proc. SPIE 10323, 25th International Conference on Optical Fiber Sensors, 1032307 (Jeju, Corée, 24-28/04/2017) récompensé par le **Best Student Paper Award**. [doi: 10.1117/12.2262559](https://doi.org/10.1117/12.2262559)

- [13] **Engel, E.**, Bombera, R., Leroy L., Calemczuk, R., Laplatine, L., Baganizi, D.R, Marche, P. N., Roupioz, Y., Livache, T. *Chauffage par effet plasmon pour la désorption localisée de cellules capturées sur une biopuce*, 7^{ème} colloques Interdisciplinaire en Instrumentation C2I2016 (Saint-Nazaire, 20-21/01/2016) <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01280220/>
- [14] Vindas, K., **Engel, E.**, Livache, T., Sojic, N., Arbault, S., Garrigue P., Leroy L. *Conception d'un laboratoire sur fibre pour l'analyse in vivo*. 7^{ème} colloques Interdisciplinaire en Instrumentation C2I2016 (Saint-Nazaire, 20-21/01/2016) <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01280219>
- [15] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Fauvarque, M-O. *Regulation of NF- κ B paths in ubiquitin specific proteases*. *Bulletin du Cancer*, Vol. **95**, S31-S31, Canceropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (Lyon, 18-19/03/2008)
- [16] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Fauvarque, M-O. *Un crible par ARN interférence des « Ubiquitin Specific Proteases » de drosophile identifie trois nouveaux régulateurs des voies de signalisation NF- κ B*. Conférence Annuelle des Drosophilistes Francophones (St Jean Cap Ferrat, 10-13/10/2007)

Communications orales dans des conférences internationales

- [17] Maziz, A., Courson, R., Mesnilgrete, F., **Engel, E.**, Leroy, L., Sojic, N., Malaquin, L., Leichle, T. *Rapid prototyping of a MEMS-based droplet dispenser using 3D printing*. Micro and Nano Engineering (MNE) (Rhodes, 23-26/09/2019)
- [18] Desmet, C., Vindas, K., Alvarado Meza R., Garrigue P., Arbault S., Sojic N., Leichle, T., Buhot A., Roupioz, R., Leroy L., **Engel, E.** *Multiparametric Sensing on microstructured optical fibers by surface plasmon resonance for multiple applications*, 2nd European Biosensor Symposium EBS 2019 (Florence, 18-21/02/2019)
- [19] **Engel, E.**, Vindas K., Alvarado Meza R., Desmet C., Garrigue P., Livache T., Buhot A., Arbault S., Sojic N., Leroy L. *Remote SPR detection of biomolecular interactions through nano-structured optical fiber bundles*, Europtrode XIV (Naples, 25-28/03/2018)
- [20] Vindas, K., **Engel, E.**, Garrigue, P., Livache, T., Arbault, S., Sojic, N., Leroy, L. *Nano-Structured Optical Fiber Bundles for Remote SPR Detection: A First Step toward in Vivo Biomolecular Analysis*, 25th International Conference on Optical Fiber Sensors, OFS-25, (Jeju, Corée, 24-28/04/2017)
- [21] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Fauvarque, M-O. *Regulation of the NF- κ B pathways by Ubiquitin Specific Proteases*. Canceropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (Lyon, 18-19/03/2008)
- [22] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Fauvarque, M-O. *Identification of three novel regulators of the NF- κ B pathways*. Conférence Annuelle des Drosophilistes Francophones (CADF, St Jean Cap Ferrat, 10-13/10/2007)

Communications orales dans des conférences nationales

- [23] Desmet, C., Alvarado Meza, R., Vindas, K., Garrigue, P., Livache, T., Buhot, A., Arbault, S., Sojic, N., Leichle, T., Leroy, L., Roupioz, Y., **Engel, E.** *Remote SPR detection of biomarkers through nano-structured optical fiber bundles for in vivo diagnosis*, C Nano (Lyon, 5-7/12/2017)
- [24] **Engel, E.**, Bombera, R., Loïc L., Calemczuk, R., Laplatine, L., Baganizi, D.R, Marche, P. N., Roupioz, Y., Livache, T. *Chauffage par effet plasmon pour la désorption localisée de cellules capturées sur une biopuce*, 7^{ème} colloques Interdisciplinaire en Instrumentation C2I2016 (Saint-Nazaire 20-21/01/2016)
- [25] Vindas, K., **Engel, E.**, Livache, T., Sojic, N., Arbault, S., Garrigue, P., Leroy, L. *Conception d'un laboratoire sur fibre pour l'analyse in vivo*. 7^{ème} colloques Interdisciplinaire en Instrumentation C2I2016 (Saint-Nazaire, 20-21/01/2016)

[26] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Mortier, M., Fauvarque, M-O. *Identification des « Ubiquitin Specific Proteases » (USP) impliquées dans la régulation des voies NF- κ B*. Conférences jeunes chercheurs (CEA - Grenoble, 15/05/2009)

[27] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Mortier, M., Fauvarque, M-O. *Utilisation de l'ARN interférence in vitro et in vivo pour trouver de nouveaux régulateurs des voies NF- κ B*. Conférence Mouche-Rhône (Lyon, 2/06/2008)

[28] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, E., Mortier, M., Fauvarque, M-O. *Régulation des voies NF- κ B par les « Ubiquitin Specific Proteases »*. Journée des doctorants. (Université Joseph Fourier (UJF) – Grenoble, 28/05/2008)

[29] **Engel, E.**, Milord, E., Thevenon, D., Taillebourg, E., Mortier, M., Fauvarque, M-O. *Un crible des « Ubiquitin Specific Proteases » de drosophile identifie trois nouveaux régulateurs de la voie Imd/NF- κ B en réponse aux infections*. Conférence sur l'interaction hôte pathogène (Lyon, 4/05/2007)

[30] **Engel, E.**, Milord, E., Thevenon, D., Taillebourg, E., Mortier, M., Fauvarque, M-O. *Un crible par ARN interférence des USP de drosophile identifie trois nouveaux régulateurs de la voie Imd*. Drosoph'Îles de France (Paris, 23/04/2007)

Communications par affiches

[31] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, M., Baudier, J., Fauvarque, M-O. *Régulation des voies NF- κ B par l'ubiquitination*. Journée de la Recherche UJF (Grenoble, 27/10/2008)

[32] **Engel, E.**, Thevenon, D., Taillebourg, M., Baudier, J., Fauvarque, M-O. *Régulation des voies NF- κ B par les « Ubiquitin Specific Proteases »*. Canceropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (Lyon, 18-19/03/2008)

[33] Thevenon, D., **Engel, E.**, Gottar, M., Bergeret, E., Taillebourg, E., Fauvarque, M-O. *La Déubiquitinase UBP64E7 : un nouveau régulateur de la voie NF- κ B chez la drosophile*. CADF (St Jean Cap Ferrat, 11-14 /10/2006)

I.4. Activités non strictement scientifiques

Depuis septembre 2011

Directrice des Etudes de la Formation Continue au département Mesures Physiques – IUT1

- ⊕ **Suivi pédagogique** des alternants
- ⊕ **Aide à la recherche de contrats** de professionnalisation et d'apprentissage
- ⊕ **Relations avec les entreprises** partenaires de l'IUT1

Membre de la commission pédagogie de l'IUT1 (2012-2014)

Reviewer pour Nature Scientific Reports

I.5. Encadrements, co-encadrements d'étudiants et doctorants

Karim Vindas - Master II Nanosciences et Ingénieur Supélec

Université Paris-Sud XI et filière Micro et Nanoélectronique de l'École d'Ingénieurs Supélec (aujourd'hui Centrale-Supélec)

Titre du stage : *Etude de la stabilité thermique d'oligonucléotides pour le tri sélectif de cellules vivantes*

Durée : avril - septembre 2014 (5 mois)

Nature de l'encadrement : définition du sujet, accompagnement dans la réalisation des expériences, encadrement scientifique, soutien technique, taux d'encadrement 50% partagé avec Loïc Leroy (50%).

Karim Vindas – Doctorant (ED-Physique Grenoble) - Spécialité Physique pour les Sciences du Vivant

Université Grenoble Alpes

Titre de la thèse : *Résonance plasmon et développements instrumentaux vers la conception de biopuces et biocapteurs innovants*

Durée : octobre 2014 - octobre 2017 (3 ans)

Financement : Contrat de Formation par la Recherche (CFR, bourse CEA)

Date de la soutenance : 14 décembre 2017

Jury : Dr Christophe Caucheteur (rapporteur), Dr Hervé Rigneault (rapporteur), Dr Aude Barbara (examineur), Dr Elodie Engel (examineur), Prof. Neso Sojic (examineur), Prof. Eric Lacot (Président).

Nature de l'encadrement : définition du sujet de thèse dans la continuité des travaux initiés en stage de Master 2, suivi hebdomadaire de l'avancée de la thèse, encadrement scientifique, soutien technique, aide à la rédaction du manuscrit et à la préparation de la soutenance, taux d'encadrement 40% partagé avec Loïc Leroy (40%) et Arnaud Buhot (20%)

Cloé Desmet – post-doctorante

Université Grenoble Alpes

Durée : août 2019 - janvier 2020 (18 mois)

Financement ANR MOLY (MOLEcular endoscopY)

Nature de l'encadrement : travail en collaboration avec Cloé, participation à l'élaboration des plans d'expériences, accompagnement scientifique et soutien technique, aide à la rédaction des publications, taux d'encadrement 50% partagé avec Loïc Leroy (50%).

Oleksii Bratash - Doctorant (ED-Physique Grenoble) - Spécialité Physique pour les Sciences du Vivant

Université Grenoble Alpes

Titre : Développement et caractérisation de biocapteurs innovants sur fibres optiques

Durée : novembre 2019 – novembre 2022 (3 ans, en cours)

Financement : Thèse PHARE CEA

Nature de l'encadrement : définition du sujet, suivi hebdomadaire de l'avancée de la thèse, encadrement scientifique, soutien technique, organisation du premier CSI (octobre 2020), taux d'encadrement 40% partagé avec Loïc Leroy (40%) et Arnaud Buhot (20%).

I.6. Compétences spécifiques

Optique : microscopies visible, de fluorescence, électronique à balayage, spectrophotométrie, instrumentation, traitement d'images, manipulation de lasers, plasmonique sur prisme et fibres optiques

Chimie de surface : électrochimie, couches auto-assemblées (Self-Assembled Monolayer), silanisation de surfaces, greffage de nano-particules d'or, de molécules thiolées

Biologie : biologie cellulaire (culture cellulaire, transfection transitoire, ARN interférence, immunofluorescence), biochimie (western blots, co-immuno-précipitation), biologie moléculaire (clonage, purification d'acides nucléiques, Q-PCR), génétique

Informatique : programmation en Python et Labview en cours d'apprentissage, programmation en Fortran, C++, maîtrise des logiciels Microsoft Office, Origin

Anglais courant.

II. Résumé des activités de recherche

J'aimerais commencer ce résumé de mes activités de recherches en décrivant les circonstances qui ont amené une physicienne à faire un stage de Master II en biologie cellulaire. Car c'est au cours de ce stage et de la thèse qui a suivi que j'ai véritablement pris goût à la recherche. Après des études de physique, un stage de Master I en astrophysique¹ (2004) et une agrégation de physique (2005), j'ai choisi de faire un Master II en physique pour les sciences du vivant. C'est au cours de cette année de master que lors d'une conférence j'ai croisé le Dr Marie-Odile Fauvarque, chercheuse au laboratoire de Transduction du Signal de la Direction des Sciences du Vivant du CEA de Grenoble. Alors enceinte de huit mois, elle présentait avec passion son modèle génétique, la mouche drosophile, capable de dévoiler les mécanismes complexes de la signalisation cellulaire chez les êtres vivants. Je ne saurais dire si je fus subjuguée par son énergie ou par le sujet de ses recherches, mais je décidai le jour même d'aller à sa rencontre afin de rejoindre son équipe. C'est ainsi que peu de temps après, je m'intéressai à une famille de protéines, les ubiquitines protéases, et à leur implication dans la régulation de la réponse immunitaire chez la drosophile. Ce travail de thèse fut l'occasion de découvrir et d'étudier de nouveaux acteurs de l'immunité²⁻⁴ mais également de me former à la biologie cellulaire et moléculaire, à la biochimie et à la génétique. Associé à un monitorat en physique, ce doctorat a définitivement conforté mon goût pour l'enseignement et la recherche.

A l'issue de cette thèse, et après une année d'enseignement de la physique appliquée en lycée, j'ai obtenu un poste de Professeure Agrégée (PRAG) au département Mesures Physiques (MP) de l'Institut Universitaire de Technologie 1 (IUT1) de Grenoble (2010). Je me suis alors fortement investie dans mes enseignements (principalement en optique et chimie) et j'ai rapidement pris des responsabilités collectives au sein du département : je suis notamment devenue directrice des études de la formation continue (alternance) et responsable d'un cours et de deux cycles de travaux pratiques de première année (130 étudiants). En plus de ces importantes fonctions d'enseignement (384h/an) et de gestion, j'ai souhaité reprendre une activité de recherche. En effet, la démarche exploratoire, les questionnements, les énigmes à résoudre propres à la recherche me manquaient. J'avais envie d'explorer une nouvelle thématique qui combinerait physique, chimie et biologie. Par l'intermédiaire de Loïc Leroy, enseignant chercheur au département MP, j'ai sollicité son chef d'équipe, Thierry Livache, responsable du groupe Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages Biologiques (CREAB) du laboratoire Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé (SyMMES) et dont les thématiques de recherche aux interfaces optique/chimie/biologie me paraissaient particulièrement intéressantes. Je leur ai proposé ma collaboration, en contribuant, sur mon temps libre, à certaines activités de recherche développées au laboratoire. Cette opportunité de soutien a reçu un accueil très enthousiaste et c'est ainsi que j'ai rejoint leur équipe en tant que collaboratrice extérieure en mars 2012. En organisant mes différentes tâches à l'IUT, je suis parvenue à me rendre au laboratoire un jour par semaine. J'ai alors participé à l'étude d'une biopuce capable de réaliser la capture de plusieurs types de cellules (lymphocytes) et leur relargage sélectif par chauffage laser^{5,6}. Motivée par ces résultats, j'ai demandé à la Vice-Présidence Recherche de l'UGA une décharge d'enseignement de 50h/an. Cette décharge m'a été accordée à partir de septembre 2014. J'ai alors pu m'investir davantage au laboratoire et explorer un sujet nouveau pour l'équipe : le

développement de biocapteurs plasmoniques sur fibres optiques. Développer cette activité m'a donné l'opportunité de mettre à profit et de renforcer mes compétences en optique théorique et instrumentale, en chimie de surface et en biologie dans le contexte des biocapteurs. Mon implication dans ce projet, en collaboration avec Loïc Leroy, nous a permis d'obtenir sur la base de nos premiers résultats, la bourse de thèse de Karim Vindas (2014 → 2017) ainsi que l'ANR MOLY (MOLEcular endoscopY for *in vivo* diagnosis, ANR-15-C19-0005-01, 2015 → 2019). Nous avons co-encadré Karim Vindas lors de son stage de Master II et de sa thèse et « co-coordonné » l'ANR MOLY de manière remarquablement complémentaire. Dans ce contexte, nous avons développé des biocapteurs plasmoniques à partir d'assemblages de plusieurs milliers de fibres optiques micro-structurées et dorées. Leurs propriétés optiques ont été exploitées pour détecter à distance l'interaction entre deux brins d'ADN complémentaires⁷. Néanmoins, la fonctionnalisation d'une surface non plane telle que celle d'un assemblage de fibres microstructurées représentait un réel défi. Pour cette raison, seulement une cible d'ADN avait pu, dans un premier temps, être détectée (la même pour chacune des fibres optiques de l'assemblage). Nous avons donc développé une méthode de fonctionnalisation multiple adaptée à une telle surface. Basée sur l'utilisation d'un micro-levier en polymère couplé à un système de déplacement de précision, cette méthode permettant le dépôt de gouttes localisées nous a permis de greffer deux sondes différentes sur l'assemblage multifibre. Bénéficiant de cette double fonctionnalisation, nous avons été en mesure de détecter deux cibles (anticorps) différentes dans des conditions modèles⁸.

Les succès obtenus dans le cadre de l'ANR MOLY et de la thèse de Karim Vindas m'ont permis de pérenniser mon implication au CREAB en devenant maître de conférences à partir de septembre 2018. Je porte désormais officiellement la thématique « fibres optiques » au laboratoire. Je souhaite aujourd'hui, tout en poursuivant mes recherches sur les fibres plasmoniques, explorer une nouvelle approche basée sur l'interférométrie. En effet, la mise en œuvre des biocapteurs plasmoniques a révélé des difficultés que pourrait pallier une méthode interférométrique. Afin de développer cette thématique, j'ai obtenu un financement Initiatives de Recherche Stratégiques (IRS 2020, 26k€) pour lancer le projet BiFibre (pour Biocapteurs Interférométriques sur Fibres). J'ai également obtenu une bourse de thèse auprès du CEA (thèse PHARE CEA (2019-2022)). C'est donc dans le cadre de la thèse d'Oleksii Bratash (2019-2022), que je co-encadre, que sera initié ce projet. Par ailleurs, j'aimerais également, à moyen terme, en apprendre davantage sur le phénomène d'interaction entre modes optiques et plasmons. Nous avons montré que ce phénomène pouvait conduire à une augmentation significative de la sensibilité des biocapteurs plasmoniques⁹. Ainsi, cette approche ouvre des perspectives excitantes pour améliorer sensiblement la détection *in situ* des interactions biologiques ou chimiques dans les milieux liquides ou gazeux ainsi que pour développer de nouvelles stratégies de détection.

Dans ce manuscrit je décris mes principales activités de recherche ainsi que les perspectives envisagées dans les prochaines années. Je commence par un bref paragraphe illustrant le contexte « biologique » de ma thèse. Je décris ensuite les développements réalisés dans le cadre des biocapteurs plasmoniques. Je poursuis avec la description de mon projet sur la mise en œuvre de biocapteurs interférométriques sur fibres optiques. Je termine en

présentant les résultats concernant l'interaction entre modes optiques et plasmons de surface et les perspectives associées.

III. Contexte du travail de thèse

L'idée n'est pas ici de détailler mon travail de thèse mais d'en présenter le contexte très brièvement. Travailler dans le domaine des biocapteurs exige des interactions régulières avec des biologistes. Il est donc important, à mon sens, d'avoir une culture en biologie, et c'est, entre autres choses, ce que ma thèse m'a apportée.

Après deux expériences de recherche en physique théorique (master I)^{1,10}, j'ai poursuivi mes études en master II « physique pour les sciences du vivant » afin de m'orienter vers des sciences plus expérimentales. A l'issue de ce master, j'ai réalisé une thèse en biologie cellulaire portant sur les mécanismes de la réponse immunitaire innée. Moins connue que l'immunité adaptative, responsable de la production d'anticorps spécifiques, l'immunité innée assure la reconnaissance du non soi et constitue ainsi la première ligne de défense des organismes vivants. Les voies d'activation des facteurs de transcription NF- κ B sont une composante majeure de l'immunité innée. Une dérégulation de ces voies de signalisation est souvent associée à des pathologies inflammatoires chroniques et à des cancers. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'identifier de nouveaux régulateurs négatifs des voies NF- κ B, Toll et Imd, conservées au cours de l'Evolution chez la drosophile.

J'ai tout d'abord réalisé un crible cellulaire qui a mis en évidence trois nouveaux régulateurs négatifs des voies NF- κ B : dUSP2, dUSP34 et dUSP36 (Fig.1). Afin d'étudier ces candidats *in vivo*, j'ai utilisé des outils de biologie moléculaire et de génétique pour construire des lignées de drosophiles mutantes capables de sur-exprimer ou d'inactiver les gènes codant ces protéines. J'ai également mis en œuvre des méthodes de biochimie afin d'identifier les partenaires de dUSP2 et de révéler son mécanisme d'action sur la voie Imd. La publication Engel et al., (2014)² décrit le crible cellulaire ainsi que le mécanisme d'action de dUSP2. L'étude approfondie de dUSP36, à laquelle j'ai contribué, est décrite dans l'article Thevenon et al., 2009³ dont je suis co-auteur. J'ai également participé à l'étude de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et la phagocytose en formant l'auteur de la publication Bergeret et al., 2008⁴ à la PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative.

Les résultats et les publications obtenus pendant cette thèse ont montré ma capacité à faire de la recherche en biologie. Ce fut une expérience très intéressante et riche en terme d'apprentissages. C'est pourquoi, lorsque j'ai souhaité reprendre une activité de recherche en physique, j'ai cherché un laboratoire pluridisciplinaire où je pourrais développer une thématique à l'interface physique/chimie/biologie ayant des applications concrètes dans le domaine des technologies pour la santé. Mes investigations m'ont ainsi amenée à pousser la porte du CREAB.

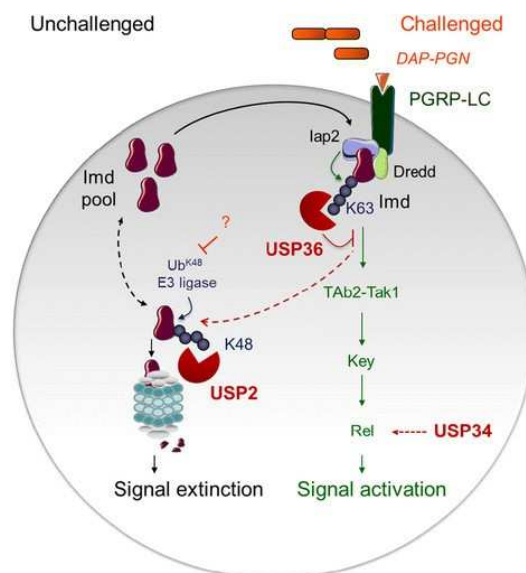


Figure 1 – Illustration du « monde » de la signalisation cellulaire : trois USP régulent l'activation ou la stabilité de la protéine Imd et par conséquent la signalisation de la voie d'activation des facteurs de transcription NF-κB.

IV. Développement de biocapteurs plasmoniques

IV.1. Introduction – Principe

Puisque le terme biocapteur a déjà été et sera encore évoqué à de nombreuses reprises dans ce manuscrit, il est important de le définir. La définition donnée par le journal « Biosensors and Bioelectronics », référence dans le domaine des biocapteurs est la suivante : un biocapteur est un dispositif analytique incorporant du matériel biologique intimement associé à un transducteur. Le matériel biologique reconnaît la cible dans un milieu complexe et le transducteur transforme cette reconnaissance moléculaire en un signal lisible par l'expérimentateur : signal électrique, optique, thermique, etc. (Fig.2).

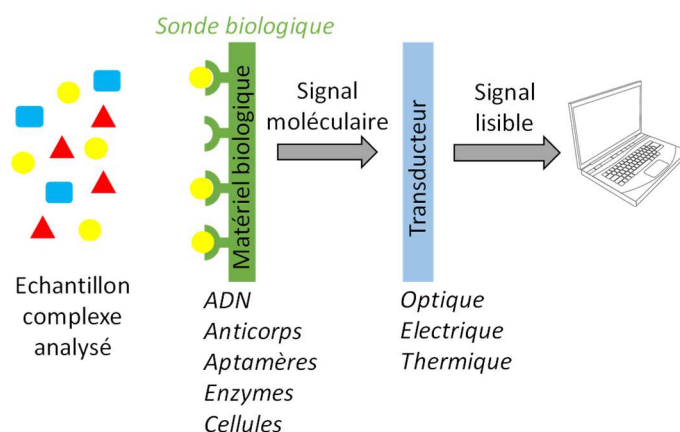


Figure 2 – Schéma de principe d'un biocapteur.

Dans les biocapteurs basés sur la résonance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance en anglais), ce sont les variations locales d'indice optique générées à la surface du capteur par les reconnaissances moléculaires qui permettent de convertir le signal biologique en signal optique et de suivre ainsi en temps réel des interactions biomoléculaires

entre des sondes et leurs cibles en milieu liquide¹¹⁻¹⁹ ou des interactions chimiques en milieu gazeux²⁰⁻²². L'approche standard pour exciter les plasmons de surface d'une fine couche métallique repose sur la configuration de Kretschmann²³ (Fig.3A).

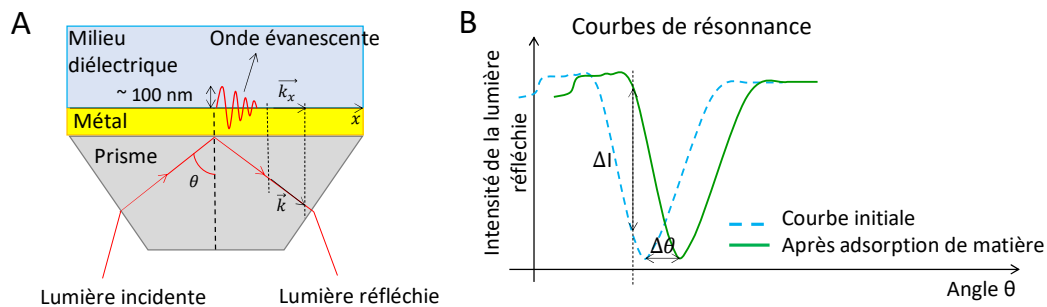


Figure 3 - Biocapteur plasmonique dans la configuration de Kretschmann (A) et courbes de résonance associées (B).

Les plasmons de surface correspondent à des oscillations d'électrons libres se produisant à la surface d'un film métallique. Ils peuvent être générés par une onde électromagnétique incidente dans certaines conditions. Premièrement, l'onde incidente doit arriver sur le métal avec un angle d'incidence supérieur à l'angle de réflexion total interne. Deuxièmement, l'onde incidente doit avoir une constante de propagation suffisamment élevée. Cela n'est pas possible si le milieu d'incidence est l'air. Il est donc nécessaire d'utiliser un diélectrique à haut indice de réfraction afin d'augmenter la constante de propagation de la lumière incidente²⁴. Dans la configuration de Kretschmann, la lumière incidente est injectée à travers un prisme à haut indice de réfraction afin d'augmenter sa constante de propagation. Une fine couche de métal recouvre la surface du prisme en contact avec le milieu diélectrique analysé. Il s'agit le plus souvent d'or, métal compatible avec l'analyse d'échantillons biologiques. Les plasmons sont associés à une onde évanescente pénétrant dans le milieu diélectrique analysé sur quelques centaines de nanomètres²⁴. Pour un angle d'incidence particulier θ , lorsque les projections des vecteurs d'onde des plasmons et de l'onde incidente dans le plan du métal sont égales, il se produit une résonance appelée résonance plasmonique de surface. Lors de cette résonance, un maximum d'énergie de la lumière incidente est transféré aux plasmons et l'intensité de la lumière réfléchi atteint un minimum (voir la courbe bleue en pointillés sur la figure 3B). L'adsorption de matière sur la surface dorée modifie localement l'indice optique, ce qui entraîne une modification de l'angle de résonance (voir la courbe verte complète sur la figure 3B). Pour un angle de travail fixe, on observe une augmentation de l'intensité de la lumière réfléchi ΔI qui atteste de l'adsorption de matière. Cette méthode de détection présente deux avantages essentiels : des mesures en temps réel et sans marquage. Ce dernier atout est essentiel pour des applications *in vivo*.

IV.2. Première expérience au CREAB – Etude d'une biopuce capable de capturer et de relarguer spécifiquement des cellules

L'énergie incidente absorbée par les oscillations des plasmons de surface lors de la résonance plasmonique est dissipée sous forme de chaleur. C'est ce phénomène qui a été exploité dans l'étude à laquelle j'ai participé en rejoignant le CREAB. L'objectif était de réaliser un système miniaturisé (biopuce) capable de capturer plusieurs types de cellules et de les relarguer

sélectivement. Un tel système pourrait avoir des applications particulièrement intéressantes pour l'analyse médicale. En effet, analyser de façon pertinente un milieu complexe comme le sang nécessite de pouvoir extraire des sous-populations de cellules à partir d'un mélange hétérogène²⁵. Assurer ce tri multiplexé dans des conditions compatibles avec la survie cellulaire représente un véritable défi. Il existe des dispositifs capables de séparer des cellules par l'intermédiaire de contraintes mécaniques²⁶, de reconnaissance antigène/anticorps²⁷, d'application d'un champ magnétique²⁸ etc. mais ces techniques, souvent limitées en termes de multiplexage, requièrent généralement un marquage préliminaire des échantillons. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des micro-systèmes basés sur des surfaces « bio-sensibles » capables de faire du tri cellulaire multiplexé et sans marquage²⁹. Le système de tri cellulaire sans marquage conçu au CREAB repose sur les propriétés thermosensibles des doubles brins d'ADN⁵. Les cellules ou les molécules ciblées sont capturées sur la surface d'or d'une biopuce grâce à des anticorps spécifiques conjugués à des brins d'ADN. Les différentes étapes d'assemblage de la biopuce et le principe du relargage spécifique sont représentés sur la figure 4. Premièrement, de courtes séquences d'ADN, les oligonucléotides (Zip), sont greffés sur la surface dorée d'un prisme par électro-polymérisation³⁰. La puce est ensuite assemblée dans un système micro-fluidique afin d'être convertie en puce à anticorps³¹ (Fig.4A). Pour cela, les ADN greffés sur la surface sont hybridés à des brins d'ADN intermédiaires, eux même appariés à des brins d'ADN conjugués aux anticorps spécifiques de certaines cellules (Fig.4B). Les cellules en questions sont ensuite capturées spécifiquement (ici des lymphocytes B et T) (Fig.4C). Afin de désorber spécifiquement un type cellulaire, le prisme est illuminé de façon localisée par le dessous de l'échantillon (Fig.4D). Les ADN double brins ciblés, sous l'effet du chauffage, se déshybrident, ce qui entraîne le relargage contrôlé des objets ciblés (ici des lymphocytes). Dans cette configuration d'illumination, l'échantillon n'est pas exposé à la totalité du flux de lumière incident mais seulement à l'onde évanescente ce qui limite l'exposition du milieu à la chaleur et assure un impact minimal sur les échantillons biologiques libérés. Ce dernier point est essentiel étant donné que la plupart des cellules de mammifère sont très sensibles au stress thermique³².

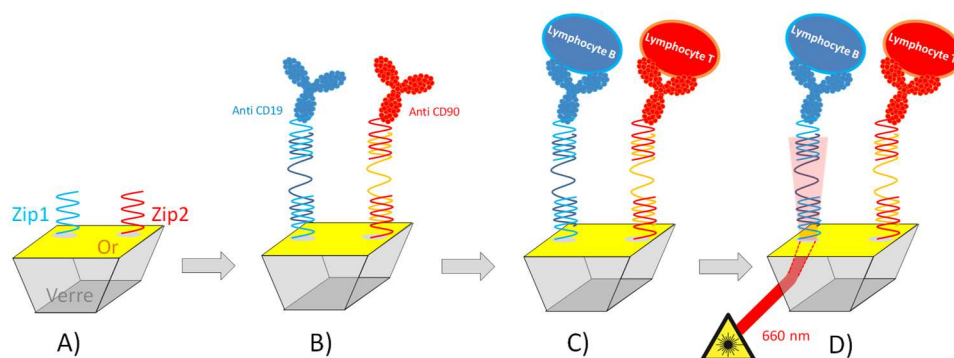


Figure 4 - Principe de la stratégie de capture/relargage des cellules. A) Greffage des ADN sur la surface d'or. B) Hybridation des ADN complémentaires conjugués à des anticorps anti-lymphocytes. C) Immobilisation des lymphocytes B et T. D) Désorption localisée des cellules par chauffage laser.

Lors de mon arrivée au laboratoire, les expériences de capture et de relargage des cellules avaient déjà été menées. Cependant il était nécessaire de rassembler et d'analyser les

résultats disponibles mais également de définir et réaliser d'éventuelles manipulations complémentaires en vue de publier ce travail. J'ai commencé par quantifier l'efficacité du dispositif en terme de capture/relargage/capture secondaire. Cela a nécessité des analyses d'images afin de définir le nombre de cellules fixées par plot, le taux de désorption et l'efficacité d'une deuxième capture. La figure 5 ci-après montre les résultats obtenus lors de la capture de lymphocytes B et T. Des splénocytes de souris, contenant à la fois des lymphocytes B et T, ont été immobilisés à la surface de la biopuce grâce à des anticorps spécifiques³¹ : anti-CD19 et anti-CD90 respectivement. Un anticorps anti-HcB incapable de reconnaître les cellules B et T a servi de contrôle négatif. L'immobilisation des cellules a été imagée par microscopie (Fig.5, t_0). L'introduction de la suspension cellulaire a entraîné une capture efficace des lymphocytes B et T sur les plots Zip1 et Zip2 respectivement (~300 cellules/plot) et pas de capture significative sur le plot contrôle Zip3. Après immobilisation des lymphocytes sur la puce, les cellules ont été sélectivement détachées par illumination laser et sous flux. La désorption photo-thermique a été induite localement sur chaque plot et suivie en temps réel par microscopie (Fig.5, t_1 à t_3). J'ai mesuré et estimé le taux de détachement à $89\pm 6\%$ (Fig.6) pour les deux types cellulaires. La seconde capture (Fig.5, t_4), réalisée après ré-hybridation, semble être légèrement plus efficace que la première (Fig.6). Cela est probablement dû à la variabilité intrinsèque de l'efficacité de capture. Cette seconde capture montre que le chauffage induit seulement l'ouverture de l'ADN double brin et que le système de tri cellulaire proposé est réutilisable.

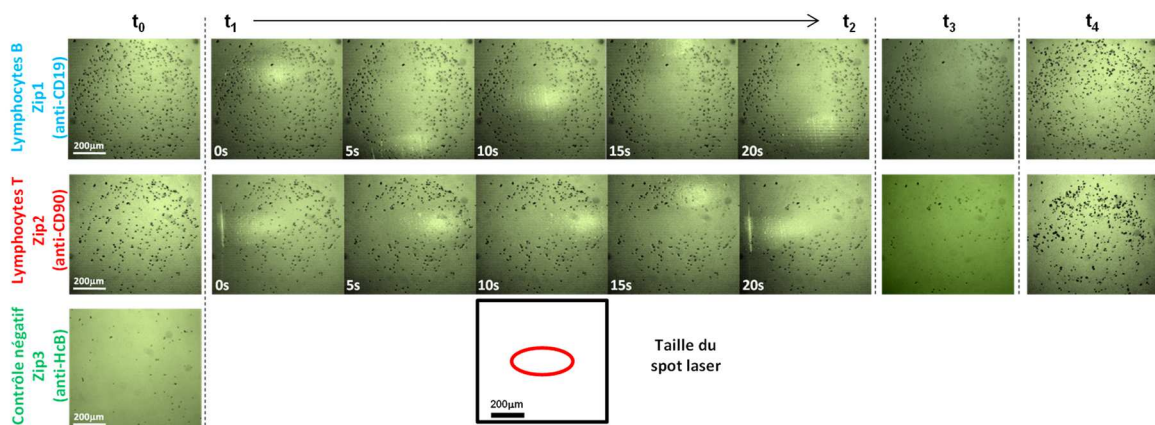


Figure 5 - Désorption localisée de lymphocytes par chauffage local. t_0) image au microscope de cellules capturées sur leurs plots spécifiques ADN/anticorps ; t_1 , t_2) relargage localisé des cellules durant le passage du laser (le plot Zip1 est balayé verticalement par le laser, le plot Zip2 est balayé horizontalement) ; t_3) plots ADN/anticorps observés après le passage du laser; t_4) ré-hybridation de cellules sur leurs plots « sonde » spécifiques après reconstruction de l'assemblage moléculaire.

La preuve de concept de la capture et du relargage étant démontrée, la question de la survie cellulaire restait en suspens. Pour y répondre, j'ai proposé de tester la survie des cellules après une exposition à la chaleur dans des conditions proches de celles rencontrées pendant la phase de désorption laser. J'ai commencé par estimer la température à laquelle étaient exposées les cellules lors du chauffage laser. Pour cela j'ai mesuré par imagerie SPR classique (sur prisme) les températures de dissociation des doubles brins d'ADN utilisés pour la capture cellulaire : Zip1/Zip1* et Zip2/Zip2*. Les courbes de dénaturation (Fig.7A) indiquent une

température de dissociation égale à $63\pm 3^\circ\text{C}$. La température à laquelle sont exposées les cellules est très probablement équivalente.

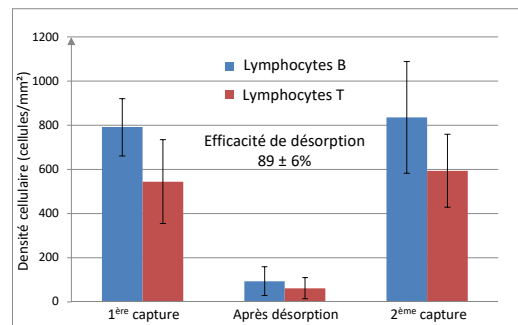


Figure 6 - Efficacité de capture et de désorption des lymphocytes B et T. Les barres d'erreur représentent la déviation standard des densités cellulaires entre les réplicats.

Après analyse des séquences de désorptions, j'ai pu évaluer le temps d'exposition des cellules à cette température à moins de 3 secondes. Afin d'estimer l'impact sur les cellules de la température induite par le chauffage laser, des splénocytes ont donc été exposés à une température de 65°C pendant 3 secondes. Nous avons ensuite mesuré les proportions de cellules vivantes dans les échantillons chauffés et non chauffés (Fig.7B). Le taux de cellules vivantes est de 91% dans l'échantillon non chauffé et passe à 75% dans l'échantillon chauffé. On constate donc que le taux de (sur)mortalité dû au chauffage n'excède pas 16 points. Ces résultats nous ont permis d'évaluer cette surmortalité et d'envisager, pour des développements futurs, d'autres solutions pour réduire la température à laquelle sont exposées les cellules. Par exemple, nous pourrions utiliser un laser pulsé afin d'augmenter le gradient de température entre la surface et les cellules. Nous pourrions également utiliser des séquences d'ADN présentant des défauts d'appariement et donc des températures de dissociation plus faibles.

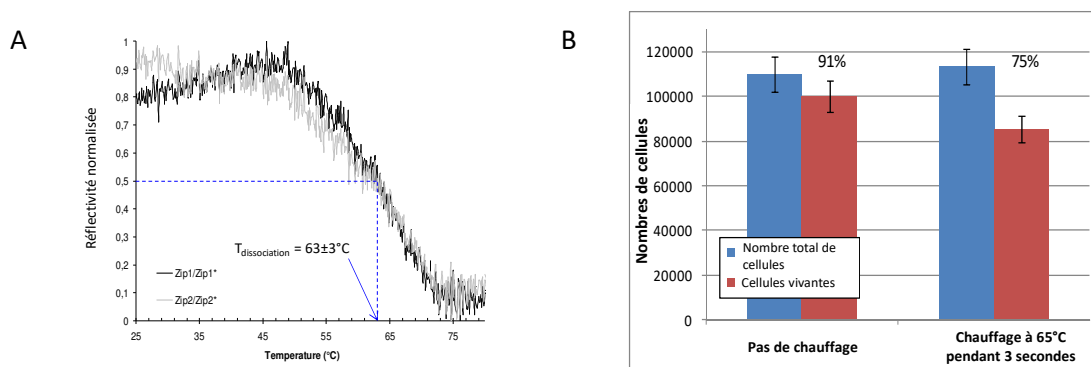


Figure 7 - Impact de la température sur la survie cellulaire. A) Détermination de la température à laquelle les cellules sont exposées pendant la phase de désorption laser : courbes de dénaturation pour Zip1/Zip1* et Zip2/Zip2*. B) Impact sur la survie cellulaire : comptages cellulaires et mesures de viabilité sur les échantillons chauffés à 65°C et non chauffés. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre trois mesures indépendantes (7%).

Pour plus d'informations sur le développement de cette micro-plateforme capable de réaliser la capture multiplexée de cellules vivantes et leur désorption contrôlée, le lecteur pourra se référer aux articles : Leroy et al., 2014⁵ et Engel et al., 2016⁶.

Lors de cette première expérience de recherche au SyMMES, j'ai réalisé des manipulations mettant en œuvre l'imagerie SPR (SPRi), fonctionnalisés des surfaces de prismes dorés, analysé des images, traité des données SPRi... Mais ce fut surtout l'occasion de découvrir le laboratoire et plus particulièrement l'équipe CREAB. J'ai été frappée par les qualités de cet environnement de recherche, aussi bien au niveau scientifique qu'au niveau humain. J'avais trouvé l'endroit idéal pour développer des activités de recherche passionnantes aux interfaces physique/chimie/biologie ! J'ai donc sollicité la Vice-Présidence Recherche de l'université (Yassine Lachnech puis Eric Saint-Aman) afin d'augmenter mon implication au laboratoire. J'ai ainsi obtenu une décharge d'enseignement de 50h/an à partir de septembre 2014. Cela m'a permis d'initier la thématique des biocapteurs plasmoniques sur fibre optique ; thématique sur laquelle je travaille encore aujourd'hui et qui fait l'objet des parties suivantes.

IV.3. Mise au point de biocapteurs plasmoniques sur fibres optiques pour le diagnostic *in vivo*

IV.3.1. Introduction

Lors de ma première visite au CREAB, Thierry Livache m'a présenté son équipe et ses très nombreuses activités de recherche autour de la SPR : allant de la détection de bactéries pathogènes dans des échantillons alimentaires³³ ou sanguins³⁴ à la langue électronique³⁵ en passant par la fonctionnalisation de surface²⁵ ou de pores par électrochimie³⁶. Il a alors évoqué la perspective (qui m'a paru un peu surréaliste sur le moment !) de réaliser des diagnostics *in vivo* par l'intermédiaire de fibres optiques. Cette idée avait émergé de discussions qu'il avait eues avec des médecins lors d'une conférence, il y avait de cela déjà plusieurs années. Depuis, il s'était procuré des assemblages de fibres optiques par le biais d'un de ses collaborateurs, Neso Sojic, de l'Institut des Sciences de la Matière (ISM) de Bordeaux. Faute de ressources humaines disponibles, les fibres en question avaient été conservées dans un tiroir en attendant que quelqu'un trouve le temps de s'intéresser à elles... Je me souviens avoir été intriguée par le concept de « laboratoire sur fibre » et frappée par le potentiel d'une telle approche : aller chercher l'information moléculaire au cœur de la zone malade pour diagnostiquer une pathologie *in situ*. Voilà un défi qui méritait d'être relevé et auquel je souhaitais contribuer. Quelques mois après mon arrivée au laboratoire, je commençai donc à apprivoiser ces fibres et à élaborer un dispositif expérimental afin de caractériser leur réponse aux variations d'indice optique. C'est ainsi que la thématique « fibres optiques plasmoniques » débuta doucement au CREAB.

Lorsqu'on évoque les fibres optiques, on pense en premier lieu aux télécommunications. En effet, déployées sur plusieurs milliards de kilomètres autour de la terre³⁷, les fibres optiques sont largement utilisées pour transporter des volumes de données importants sur de longues distances en très peu de temps. Cependant, leur capacité intrinsèque à explorer des zones difficiles d'accès permet de les utiliser comme endoscope, ce qui ouvre des possibilités dans un grand nombre d'autres domaines. En particulier en médecine, les fibres optiques pouvant être introduites dans des tissus vivants sans causer d'importants dommages, elles permettent, depuis près de 70 ans, d'imager des organes ciblés

très précisément³⁸. Toutefois, imager les tissus que ce soit par endoscopie³⁹ ou par le biais de radiographies⁴⁰, d'échographies⁴¹ ou d'imagerie par résonance magnétique⁴² n'est généralement pas suffisant pour établir un diagnostic précis. La plupart du temps, les médecins associent l'imagerie à l'analyse de paramètres biochimiques. Ces analyses sont réalisées dans un premier temps sur des échantillons accessibles, tels que l'urine, la salive et le sang... Mais il s'avère parfois nécessaire d'analyser le tissu malade en lui-même. Pour cela, il est nécessaire de recourir à des biopsies. Les échantillons de tissus prélevés sont alors analysés en termes de cytologie et de propriétés biochimiques dans des laboratoires équipés. Toutes ces étapes (prélèvement, transport, analyse) font de la biopsie une procédure invasive, longue et coûteuse. Utiliser une fibre optique, plus seulement pour imager mais aussi pour réaliser l'analyse biochimique *in situ* permettrait de s'affranchir des inconvénients de la biopsie : l'analyse moléculaire des biomarqueurs serait réalisée *in vivo*, en temps réel, directement au niveau du tissu malade ce qui permettrait de diminuer l'inconfort des patients et de raccourcir les délais de diagnostic. De plus, l'extrême souplesse des fibres leur permettrait d'atteindre des microenvironnements spécifiques où les biomolécules ciblées sont présentes en plus grande concentration (tumeurs^{43,44} ou ganglions lymphatiques^{45,46} par exemple) afin améliorer les chances de détection précoce. Par ailleurs, des biocapteurs sur fibre permettraient également de lutter contre les maladies nosocomiales. Ces maladies touchent près de 750 000 patients hospitalisés et seraient responsables de 4000 décès chaque année en France⁴⁷. Ces infections sont principalement causées par l'utilisation de dispositifs médicaux impliquant des tubes étroits : sondes urinaires ou trachéales, cathéters, drains... Des fibres optiques dédiées à la surveillance du développement de bactéries dans ces milieux confinés pourraient contribuer à diminuer le risque de contraction de ces infections⁴⁸.

En elle-même, l'idée d'utiliser les fibres optiques comme capteurs médicaux n'est pas nouvelle puisqu'elles ont commencé à être utilisées comme tel dans les années 1970⁴⁹⁻⁵³. Les premières applications ont consisté à réaliser des mesures de pH et de température^{54,55}, puis l'analyse du débit, de la pression ou des gaz du sang a également été décrite^{56,57}. En ce qui concerne la détection de biomolécules par fibre optique, les dispositifs décrits dans la littérature reposent généralement sur l'interaction entre un champ évanescent et le milieu extérieur à analyser. En effet, comme la détection sans marquage et en temps réel est la mieux adaptée pour produire des outils de diagnostic médical rapide, un grand nombre d'approches développées reposent sur le phénomène de résonance plasmonique de surface⁵⁸⁻⁶¹.

A l'instar des biocapteurs sur prismes, il est possible de développer des biocapteurs plasmoniques sur fibre optiques^{7,8,62-69}. Le principe d'excitation des plasmons de surface est similaire à celui décrit pour la configuration de Kretschmann. Le cœur de la fibre joue le rôle du prisme diélectrique à haut indice de réfraction. La gaine optique est retirée sur une petite portion afin de révéler le cœur. Ce dernier est recouvert d'une couche métallique d'une épaisseur de quelques dizaines de nanomètre (généralement autour de 50 nm). Cette zone revêtue de métal constitue la zone active du biocapteur. Dans les dispositifs fonctionnant en transmission, la zone active se trouve en milieu de fibre (Fig.8A). Dans les dispositifs fonctionnant en réflexion, qui sont les mieux adaptés au développement d'outils de diagnostic *in vivo*, la zone active se situe à l'extrémité de la fibre et est associée à un miroir formé sur la surface clivée en ajoutant une épaisse couche d'or (quelques centaines de nanomètres) par exemple (Fig.8B).

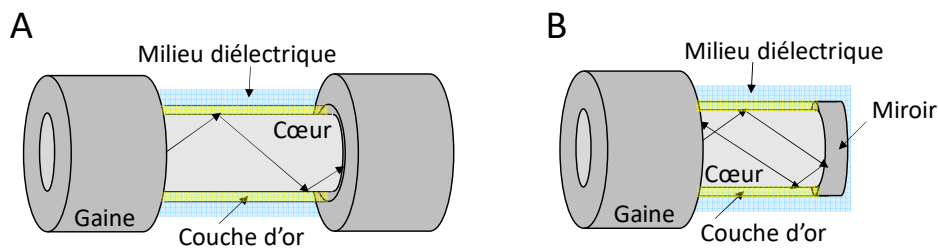


Figure 8 - Exemple de géométries utilisées pour les biocapteurs plasmoniques sur fibre optique dans les configurations de transmission (A) et de réflexion (B).

La résonance plasmonique est obtenue lorsqu'il y a égalité entre la constante de propagation des modes plasmoniques et la constante de propagation des modes optiques guidés dans la fibre (voir⁵⁸⁻⁶¹ pour une revue détaillée). Contrairement à la configuration à base de prisme, où l'angle d'incidence peut être ajusté pour satisfaire la condition de résonance, pour une fibre optique, la constante de propagation des modes guidés est fixée par les propriétés de la fibre (indices de réfraction du cœur et de la gaine, diamètre et géométrie du cœur) et ne peut pas être contrôlée facilement. Malgré ces contraintes intrinsèques, un nombre important de stratégies ont été développées récemment pour exciter les plasmons de surface et permettre au champ évanescent associé d'atteindre le milieu analysé : l'utilisation de réseaux insérés dans le cœur^{66,70,71} mais également diverses gravures de la gaine le long de la fibre (sonde conique, sonde en forme de D, sonde courbée en U) ou à son extrémité (extrémité plate, conique ou polie en angle), etc. conduisant à une importante variété de géométries de fibres optiques plasmoniques⁵⁸⁻⁶¹. Le couplage entre les plasmons de surface et les modes guidés par la fibre est associé à une perte de la lumière transmise ou rétro-réfléchi. La plupart des méthodes d'interrogation SPR sont basées sur la détection de cette perte. Différents moyens d'interrogation ont été envisagés : il s'agit principalement d'interrogation spectrale de la lumière transmise⁷²⁻⁷⁴ ou rétro-réfléchi^{75,76} ou de mesure de l'intensité de la lumière transmise⁷⁷⁻⁷⁹ ou rétro-réfléchi⁸⁰⁻⁸². La plupart des applications décrites jusqu'à présent permettent d'analyser un seul paramètre, ou un seul biomarqueur, à la fois^{63,83,84}, seuls quelques exemples décrivent l'utilisation d'une seule fibre optique pour une analyse multiplexée. C'est le cas de l'équipe de Sciacca et al. qui a réalisé une double détection *in vitro* sur une seule fibre optique en utilisant deux types de nanoparticules (or et argent)⁸⁵. Verma et al. quant à eux ont associé trois zones sensibles, chacune recouverte d'un métal différent, en série sur la même fibre⁸⁶. Malgré les progrès réalisés, ces approches, par leur principe même de fonctionnement, se limitent à un multiplexage réduit (2 à 3 analyses), ne sont pas facilement adaptables à la mesure *in situ* et nécessitent des techniques complexes de fabrication. La capacité de réaliser une détection *in situ* multiplexée reste donc un défi important dans le cas d'un diagnostic médical. Dans ce contexte, où les mesures sont réalisées en milieu complexe (sang, sérum, etc.), le multiplexage est en effet essentiel : il est indispensable de disposer de différentes zones de mesure afin d'inclure des contrôles positifs et négatifs, nécessaires pour corriger le signal des contributions dues à des phénomènes non spécifiques (changement de température, adsorption de matière non spécifique). Par ailleurs, l'établissement d'un diagnostic fiable nécessite la détection, la quantification et la localisation en temps réel de plusieurs biomarqueurs spécifiques de pathologies. C'est pourquoi l'objectif de mes travaux de recherche est de développer un biocapteur sur un réseau de fibres optiques afin de lui

conférer les propriétés requises pour de la détection multiplexée, *in situ*, en milieu complexe. Un tel outil pourrait contribuer significativement à l'essor du diagnostic endoscopique.

IV.3.2. Conception des biocapteurs plasmoniques sur des assemblages multifibres

Lorsque je me suis lancée dans cette thématique, j'ai commencé par explorer les propriétés d'un assemblage multifibre⁸⁷ fourni au laboratoire par un de nos collaborateurs, Neso Sojic, de l'ISM de Bordeaux (Fig.9). Cet assemblage d'un diamètre d'environ 300 μm était constitué de 6000 fibres optiques individuelles ayant chacune un cœur de diamètre 3,5 \pm 0,5 μm . Leur extrémité, préalablement clivée, avait été gravée en pointe par une procédure de gravure humide dans une solution tampon d'acide fluorhydrique (Fig.9C). Une couche d'or avait été déposée ensuite sur les pointes par évaporation thermique.

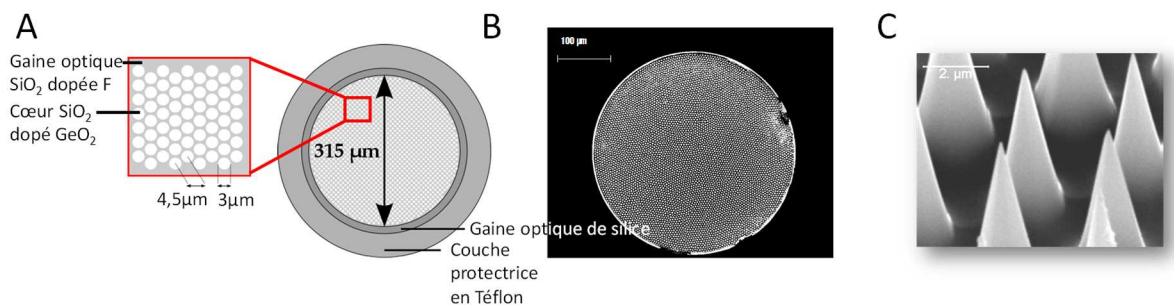


Figure 9 – Présentation de l'assemblage multifibre. Schéma et composition de l'assemblage (A), image de l'assemblage en microscopie électronique à balayage (MEB) : vue d'ensemble (B) et vue de la gravure en pointes de l'extrémité des fibres (C).

Je disposais alors d'assemblages ayant des épaisseurs d'or différentes, de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres (dues à des temps de dépôts différents) et je souhaitais les caractériser optiquement pour déterminer s'ils étaient sensibles à des variations d'indice optique. Pour y parvenir, j'ai commencé par réaliser un montage optique dont le principe est schématisé sur la figure suivante (Fig.10).

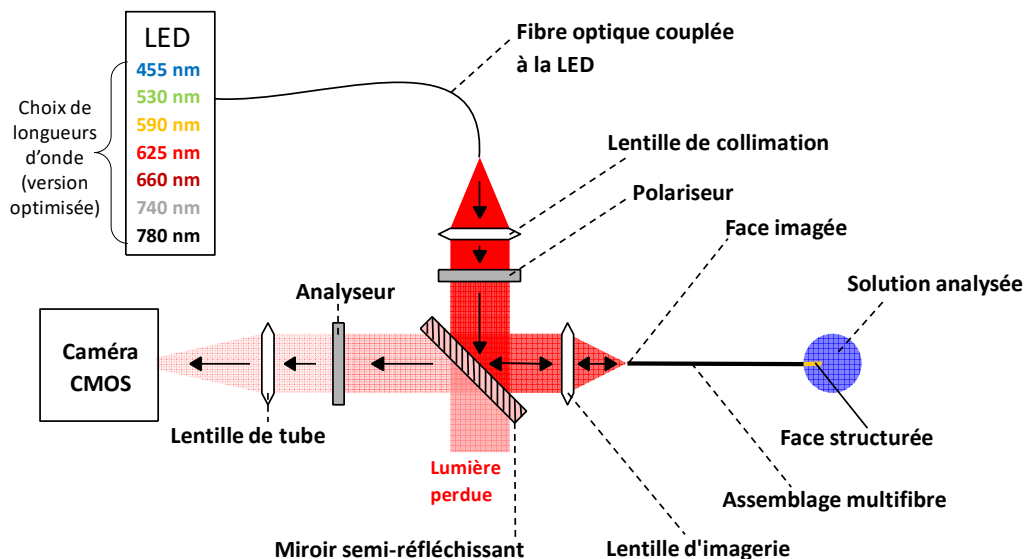


Figure 10 – Montage utilisé pour la caractérisation optique des assemblages multifibres.

La lumière incidente provenant d'une diode électroluminescente (LED pour Light Emitting Diode) fibrée est injectée via la face clivée de l'assemblage (l'extrémité non structurée et non recouverte d'or) et est guidée par réflexion interne dans les différents cœurs de l'assemblage. Lorsqu'elle atteint la face structurée et recouverte d'or, une fraction de la lumière est rétro-réfléchi, guidée en sens inverse par le même cœur et finalement détectée au niveau de la face clivée. L'intensité de la lumière rétro-réfléchi dépend fortement du couplage entre l'onde incidente et les plasmons de surface existant au niveau de la couche d'or. L'indice optique du milieu environnant les structures dorées influence fortement ce couplage. Il en résulte qu'en imageant la face clivée de l'assemblage à l'aide d'une caméra CMOS capable de mesurer en temps réel l'intensité de la lumière rétro-réfléchi par chaque cœur, il est possible de détecter des modifications locales d'indice optique se produisant au niveau des structures dorées. Comme le faisceau de fibres optiques est cohérent (signal optique propre à chaque cœur), cela revient à disposer de milliers de capteurs SPR dont les réponses sont lisibles individuellement. Autrement dit, le réseau de capteurs sonde différents microenvironnements couvrant l'ensemble de la surface de l'assemblage.

Afin de caractériser la sensibilité des fibres de l'assemblage aux variations d'indice optique, j'ai commencé par simplement immerger la surface dorée dans des solutions d'indice optique connu et par enregistrer plusieurs images de la face d'entrée pour chaque valeur d'indice. La mesure de l'intensité rétro-réfléchi I moyenné sur ces images et sur l'ensemble de l'assemblage en fonction de la valeur de l'indice optique n permettait ainsi d'accéder à la sensibilité globale de l'assemblage (dérivée de la courbe $I(n)$). Après avoir testé de nombreux assemblages, j'ai obtenu des résultats intéressants montrant que certains faisceaux de fibres étaient effectivement sensibles aux variations d'indice optique. Sur la base de ces résultats préliminaires, j'ai souhaité proposer un stage de Master II afin de réaliser des tests plus systématiques (sensibilité versus épaisseur d'or, longueur d'onde). Le montage optique étant opérationnel, les protocoles de test et d'analyse de données validés, Karim Vindas nous a rejoint pour son stage de Master II et a tenté de reproduire mes résultats sur de nouveaux échantillons fournis par l'ISM. Nous avons constaté avec surprise qu'aucun des nouveaux échantillons ne présentait de sensibilité importante. Nous avons alors observé les nouveaux et les anciens échantillons en microscopie électronique à balayage (MEB) et constaté que sur les anciens assemblages, la couche d'or était très altérée (Fig.11). Les nouveaux échantillons présentaient quant à eux une couche d'or homogène. Nous avons alors conclu que la sensibilité que j'avais observée venait probablement d'un phénomène de résonance plasmonique localisée au niveau des défauts de la couche d'or. Nous avons constaté expérimentalement que cette sensibilité se dégradait au fur et à mesure que nous testions les échantillons. Les étapes de nettoyage et les mouillages/séchages successifs de la surface dorée avaient eu pour effet de progressivement altérer la couche d'or vieillissante des premiers échantillons testés. Nous avons remarqué que cette détérioration se produisait aussi sur les échantillons plus récents : à force de les manipuler, la couche d'or finissait également par être altérée. Cela venait de la méthode utilisée pour réaliser le dépôt d'or : l'évaporation thermique réalisée à l'ISM, sans couche d'accroche, ne suffisait pas à produire un revêtement d'or suffisamment robuste.

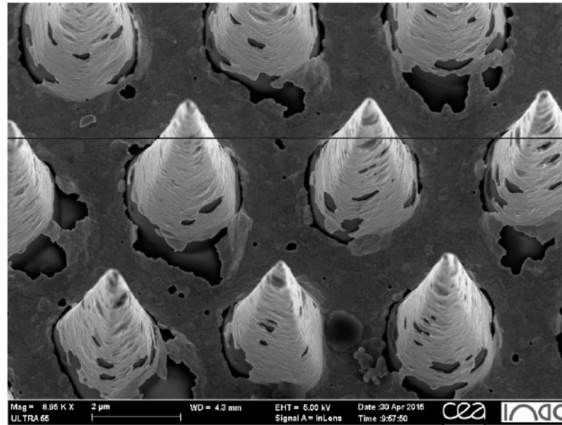


Figure 11 - Endommagement de la couche d'or des fibres dorées à l'ISM par évaporation thermique.

La première question que nous nous sommes posée a été : pourquoi des fibres gravées en pointe et recouvertes d'une couche d'or homogène (sans défaut) ne présentaient pas de sensibilité aux variations d'indice optique ? A posteriori, l'explication nous a paru évidente ! En effet, on s'aperçoit, en observant la trajectoire d'un rayon lumineux dans la pointe dorée, que cette géométrie entraîne un nombre très important de réflexions (Fig.12A). Au fur et à mesure que le nombre de réflexions augmente, l'incidence de la lumière sur la pointe devient de plus en plus normale, ce qui favorise les fuites (on est de plus en plus loin de la réflexion totale, condition requise pour exciter les plasmons de surface). Plus l'indice optique augmente, plus les fuites deviennent importantes. Ces fuites ne favorisent pas le retour de la lumière et peuvent entraîner un faible signal SPR et une faible sensibilité. Pour cette raison, nous avons alors choisi de développer une nouvelle géométrie en forme de cône tronqué ou micropilier (Fig.12B). Dans cette configuration, le nombre de réflexions est limité grâce au sommet plat ce qui devrait favoriser le signal SPR rétro-réfléchi.

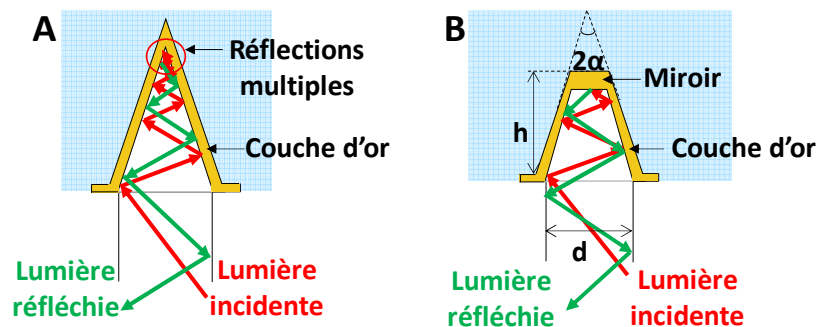


Figure 12 - Représentation schématique du phénomène SPR se produisant dans une fibre optique individuelle dans la configuration (A) pointes ou (B) micropiliers.

La préparation et la caractérisation de cette nouvelle géométrie ont demandé un travail considérable qui a été mené dans le cadre de la thèse de Karim Vindas. Pour commencer, les conditions de gravure humide ont été adaptées par nos collaborateurs de l'ISM à partir de celles connues pour donner des pointes. Le principe de la structuration repose sur une gravure sélective cœur/gaine obtenue grâce aux différents taux de gravure entre le cœur à haut indice optique dopé à l'oxyde de germanium (GeO_2) et la gaine à faible indice optique dopée au fluor

(F). Dans certaines conditions (immersion de la face clivée de l'assemblage dans une solution de fluorure d'ammonium NH_4F et d'acide fluorhydrique), la gaine fluorée est préférentiellement attaquée et dissoute et cela permet de structurer le cœur en forme de cône. En adaptant la composition de la solution et le temps de gravure il est possible d'obtenir des cônes tronqués ou micropiliers (Fig.13).

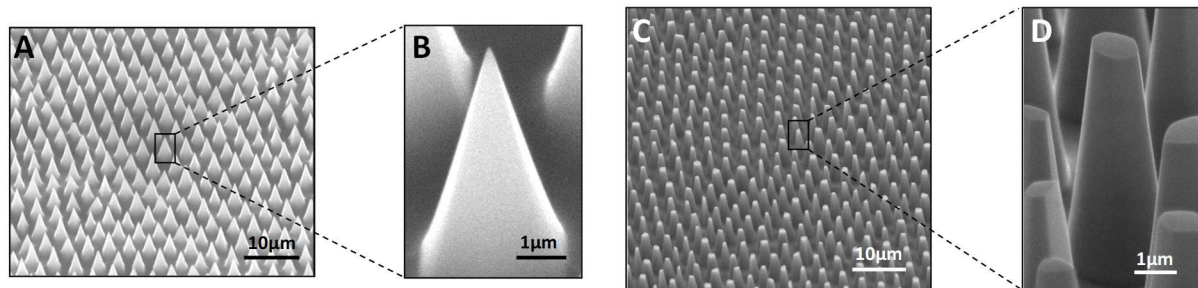


Figure 13 - Images MEB de l'extrémité de l'assemblage pour des géométries différentes. Pointes : vue d'ensemble (A) et vue d'une pointe (B). Micropiliers : vue d'ensemble (C) et vue d'un micropilier (D).

Afin de disposer d'une couche d'or plus robuste que celle obtenue par évaporation thermique, nous avons opté pour un dépôt par pulvérisation cathodique à l'aide d'un canon à électron. Ce type de dépôt était possible à la Plateforme de Technologie Amont (PTA)⁸⁸ du CEA mais n'était pas destiné à être appliqué à nos substrats. Un important travail a donc été réalisé pour adapter la procédure aux fibres optiques et contrôler les paramètres du dépôt : épaisseur, rugosité, homogénéité. Tout d'abord, le flux d'or étant très directionnel, il a fallu concevoir un support pour adapter le procédé à la géométrie cylindrique des fibres optiques (Fig.14).

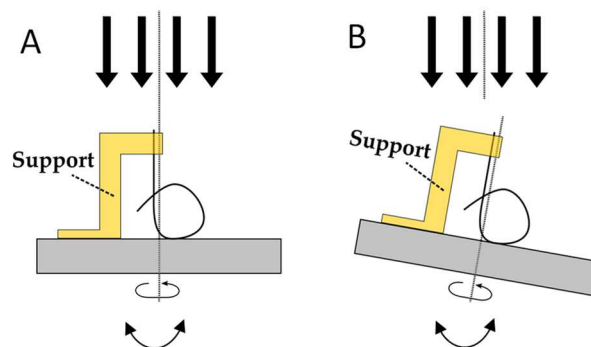


Figure 14 - Support spécifique conçu pour la métallisation. A) Pas d'inclinaison, B) Support incliné.

Le support conçu permet simultanément la rotation et l'inclinaison de l'échantillon. Pour l'homogénéité de la couche d'or déposée lors de la métallisation, le support a été à la fois mis en rotation et incliné successivement à $+5^\circ$, 0° et -5° comme illustré sur la figure 14B (pendant les mêmes durées). L'aspect de la couche d'or qui en résulte est homogène sur l'ensemble du faisceau (Fig.15).

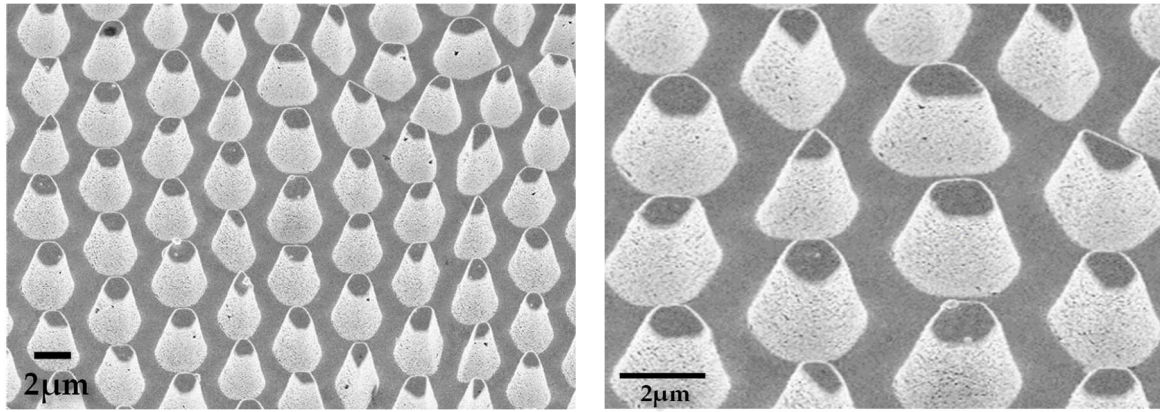


Figure 15 - Vue d'ensemble du faisceau de fibres métallisées (gauche) et zoom (droite).

Afin de trouver un compromis entre rugosité de la couche d'or et temps de dépôt, plusieurs vitesses de dépôt ont été testées et la qualité du dépôt a été validée visuellement par des images MEB.

Afin d'estimer l'épaisseur d'or déposée sur les faces latérales des cônes, nous avons tout d'abord fait appel à de simples considérations géométriques. Le dispositif de dépôt est équipé d'une microbalance à quartz qui permet de mesurer l'épaisseur d'or déposée sur une surface plane perpendiculaire au faisceau d'or. Pendant la métallisation, la quantité d'or déposée par unité de longueur (le long de l'axe des x , Fig.16) est considérée comme constante. Par conséquent, si la surface dorée est inclinée, l'or est distribué sur une plus grande distance L et l'épaisseur ($Au_{côté}$) de la couche latérale est réduite par rapport à l'épaisseur ($Au_{sommets}$) déposée sur une surface plane sur la distance l . On obtient alors l'épaisseur ($Au_{côté}$) à partir du demi-angle au sommet du cône tronqué α et de ($Au_{sommets}$) : $(Au_{côté}) = (Au_{sommets}) \times \sin(\alpha)$.

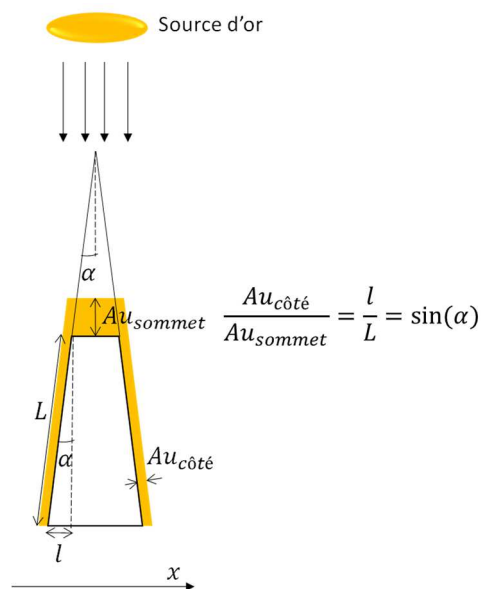


Figure 16 - Principe d'estimation de l'épaisseur d'or sur les faces latérales des micropiliers.

Les estimations d'épaisseurs fournies par cette méthode de calcul ont été validées en réalisant des mesures d'épaisseur à partir d'images MEB représentant des défauts (trous dans la couche d'or) et à partir de coupes de micropiliers réalisées par un faisceau d'ions focalisé (FIB pour Focal Ion Beam) (Fig.17).

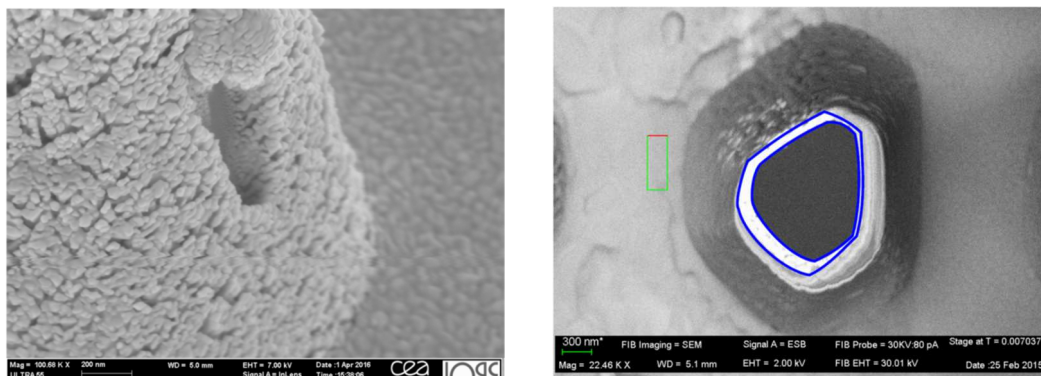


Figure 17 - Mesure de l'épaisseur d'or sur des défauts ponctuels dans la métallisation (A) ou en coupant une section transversale de la fibre avec un FIB (B).

L'observation des échantillons au MEB a également permis de mesurer α . L'estimation de cet angle peut être réalisée ainsi : on incline l'échantillon jusqu'à ce qu'un des flancs de la face latérale du micropilier coïncide avec l'axe d'observation. Cela donne un premier angle ω_1 . On répète la même opération pour le flanc diamétralement opposé, ce qui donne un deuxième angle ω_2 . La différence $|\omega_1 - \omega_2|$ donne une estimation de 2α . Le principe de mesure est illustré par la figure 18. Cette méthode donne une estimation de α à 1 degré près.

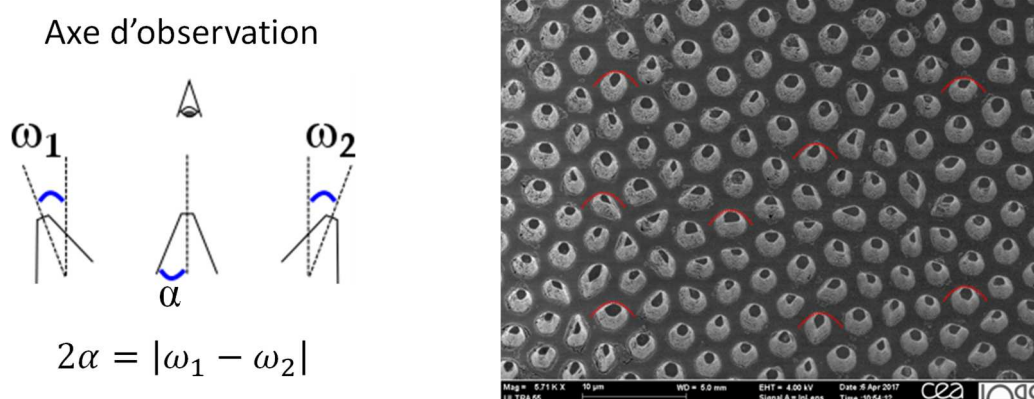


Figure 18 - Principe de mesure du demi-angle au sommet α à partir d'une observation au MEB d'un faisceau de fibres optiques structurées en micropiliers.

C'est seulement après avoir développé toutes ces méthodes de caractérisation que les études paramétriques ont pu débuter. Nous avons successivement fait varier l'angle au sommet du cône tronqué, la hauteur du micropilier, l'épaisseur d'or et la longueur d'onde d'excitation. Parallèlement à cette étude expérimentale, Karim a développé un modèle numérique basé sur l'optique géométrique afin de simuler l'influence des paramètres géométriques et de la longueur d'onde sur la sensibilité des biocapteurs⁸⁹. Ce modèle nous a permis de mieux appréhender l'effet des différents paramètres sur la sensibilité et de nous rendre compte de l'importance de l'influence des différents paramètres. En particulier, l'épaisseur d'or, considérée comme optimale autour de 50 nm dans les dispositifs classiques sur prisme²⁴, peut varier de quelques dizaines de nanomètres (50 ± 20 nm) sur nos capteurs sans corrompre leur sensibilité. En revanche, la hauteur des micropiliers et le demi-angle au sommet sont des paramètres clés qui influencent de manière importante la sensibilité des

dispositifs. Leur influence vient du fait qu'ils conditionnent le nombre de réflexions utiles (capables de faire entrer en résonance les plasmons) se produisant au sein du micropilier : un nombre de réflexions trop faible ne permet pas de détecter une modification suffisante de l'intensité rétro-réfléchie, au contraire, un nombre de réflexions trop important nous rapproche de la configuration en pointe et entraîne une perte de signal réfléchi. Les résultats de ces simulations, associées aux contraintes pratiques, ont guidé nos choix concernant les gammes de paramètres à tester. Les meilleures performances ont finalement été obtenues pour des micropiliers présentant les caractéristiques suivantes : un diamètre de base entre 2 et 3 μm , une hauteur entre 7 et 10 μm , un demi-angle au sommet entre 7 et 10°, pour une longueur d'onde d'excitation comprise entre 590 nm et 660 nm et une épaisseur de la couche d'or sur les faces latérales égale à environ 50 nm.

Dans la suite, je vais décrire précisément les moyens mis en œuvre pour caractériser optiquement chacune des fibres de ces assemblages et présenter les expériences de détection d'interactions moléculaires qu'ils nous ont permis de réaliser.

IV.3.3. Caractérisation optique des assemblages plasmoniques

Afin de caractériser optiquement les assemblages, nous avons optimisé le traitement des images pour accéder au comportement individuel de chacune des fibres du faisceau. C'est le dispositif expérimental présenté sur la figure 10 dans une version optimisée (augmentation du choix des longueurs d'onde d'excitation, automatisation de l'acquisition des images) qui a permis d'imager et de quantifier la lumière rétro-réfléchie par chacun des cœurs et ainsi de caractériser leur sensibilité et leur résolution c'est-à-dire la plus petite variation d'indice optique pouvant être mesurée par le capteur. Le principe de la mesure est décrit ci-après. La figure 19A montre un empilement d'images de la face clivée (c'est-à-dire la face plate sans microstructuration) utilisée à la fois pour injecter la lumière d'excitation et pour collecter la lumière rétro-réfléchie. Au moins dix images ont été enregistrées pour chaque indice optique (l'extrémité structurée étant immergée dans des mélanges eau-glycérol en proportions variables et d'indice connu) afin de réduire l'influence du bruit photonique. Les images ont été ré-alignées afin de réduire l'influence des mouvements mécaniques de l'assemblage (chaque cœur ayant un diamètre de 3 μm , un décalage mécanique de 1 μm suffit à perturber la mesure). Les zones à analyser sont ensuite sélectionnées ; la figure 19B illustre le principe de la sélection pour 20 cœurs. Pour chacune des zones sélectionnées (ici des cœurs), l'intensité rétro-réfléchie $I(n)$ a été mesurée à différents indices optiques n . $i(n)$, l'intensité rétro-réfléchie relative normalisée représentée sur la figure 19C est définie par : $i(n) = \frac{I(n)-I_{ref}}{I_{ref}}$ où $I_{ref} = I_{H_2O}$ représente l'intensité rétro-réfléchie dans l'eau, milieu de référence. La sensibilité S , définie comme la pente de la courbe de l'intensité rétro-réfléchie relative normalisée en fonction de l'indice optique $\frac{di}{dn}$ a également été mesurée et s'exprime en %/RIU (RIU pour Refractive Index Unit).

$$i(n) = \frac{I(n)-I_{ref}}{I_{ref}}, S = \frac{di}{dn} \quad (1)$$

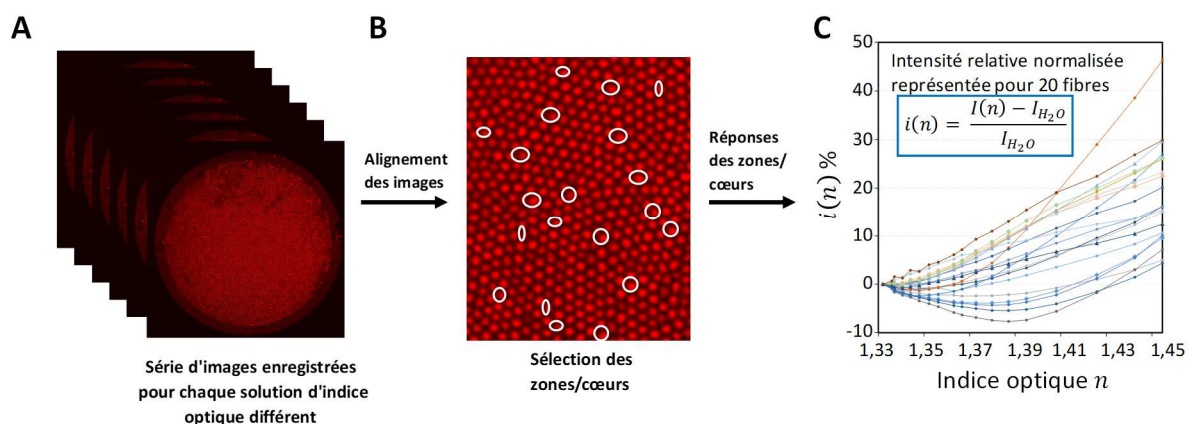


Figure 19 - Principe de l'analyse d'images pour la mesure de l'intensité rétro-réfléchie relative normalisée. **A) Acquisition d'images (10 images par RIU)** de la face clivée du faisceau de fibres en configuration rétro-réfléchie (la face structurée étant plongée dans différentes solutions eau/glycérol avec des indices optiques allant de 1,332 à 1,455) et **réalignement des images.** **B) Sélection des zones ou des cœurs à analyser** (20 cœurs ont été sélectionnés pour illustrer le principe de l'analyse d'images et les différents comportements rencontrés dans l'assemblage. **C) Tracé de l'intensité rétro-réfléchie relative normalisée** en fonction de l'indice optique pour les 20 fibres individuelles sélectionnées.

Pour caractériser les performances du système, la résolution n_{res} a été calculée à partir de la sensibilité $S = \frac{di}{dn}$ et de σ , le bruit maximal de l'intensité normalisée relative sur 10 images (évalué à 0,01%) ainsi :

$$n_{res} = \frac{3\sigma}{\frac{di}{dn}} \quad (2)$$

L'assemblage caractérisé ici (Fig.19) présente des micropiliers ayant les caractéristiques suivantes : un diamètre de base entre 2 et 3 μm , une hauteur entre 7 et 10 μm , un demi-angle au sommet égal à $7 \pm 1^\circ$. Les faces latérales des micropiliers ont été recouverte par 50 nm d'or et la longueur d'onde utilisée pour la caractérisation optique est égale à 660 nm. En observant la figure 19A de près on remarque que l'intensité rétro-réfléchie varie entre les différents cœurs. Certains cœurs, apparaissant en rouge foncé, présentent des fuites de lumière à leur extrémité dorée, potentiellement dues à un défaut local et/ou à l'adsorption de matières contaminantes. L'intensité rétro-réfléchie relative normalisée est représentée sur la figure 19C en fonction de l'indice optique pour vingt cœurs individuels ayant des comportements représentatifs de l'ensemble de l'assemblage. Les courbes $i(n)$ présentent des formes diverses : strictement croissantes ou avec un minimum. Ces différents comportements sont dus aux légères mais inévitables hétérogénéités entre les géométries des extrémités des cœurs du réseau de micropiliers (Fig.15). Ce qui est important pour sonder les interactions biologiques, c'est la valeur absolue de la sensibilité (c'est-à-dire la valeur absolue des pentes des courbes $i(n)$) et non son signe. Si l'on considère la valeur absolue des pentes autour de l'indice optique de l'eau (de 1,332 à 1,340), la sensibilité moyenne obtenue pour ce réseau de micropiliers est

de 118%/RIU. Cette sensibilité a été évaluée sur l'assemblage avant toute fonctionnalisation, sur de l'or nu. C'est cette grandeur qui nous a permis de comparer les performances optiques des assemblages en fonction des différents paramètres (géométrie, épaisseur d'or, longueur d'onde d'excitation). Mais lorsqu'on souhaite réaliser une biodétection, il est également intéressant de disposer de la sensibilité locale de chacune des fibres autour de la valeur de l'indice optique du milieu de détection des molécules après tous les traitements de préparation (nettoyage, biofonctionnalisation) et donc juste avant de procéder à la biodétection. Pour cela une caractérisation rapide sur deux points a été effectuée. Le faisceau de fibres optiques structurées et biofonctionnalisées (voir paragraphe suivant pour le détail de cette étape) a d'abord été plongé dans une solution tampon saline au phosphate (PBS pour Phosphate Salin Buffer) d'indice optique 1,3364, puis dans une autre contenant du glycérol avec un indice optique de 1,3421. La figure 20 montre la distribution spatiale des sensibilités locales S de chaque cœur individuel du faisceau. On constate encore une fois que les réponses SPR des micropiliers présentent une distribution relative en raison de leurs légères hétérogénéités géométriques induisant des couplages plasmoniques variables. Cependant, il est intéressant de noter que chaque capteur peut être calibré individuellement puisque, comme cela a déjà été mentionné, tous les capteurs sont lisibles séparément. De plus, la position (c'est-à-dire les coordonnées X, Y) peut être assignée à chaque fibre individuelle, ce qui permet d'adresser spatialement chaque micropilier à travers la fibre et de corrélérer le signal d'un micropilier donné avec une position définie de l'échantillon. À partir de l'image de la distribution des sensibilités, il est alors possible d'estimer que 78 % des micropiliers présentent des sensibilités ayant une valeur absolue supérieure à 75 %/RIU. Dans nos conditions expérimentales, cela correspond à une résolution d'indice optique de l'ordre de 10^{-4} RIU.

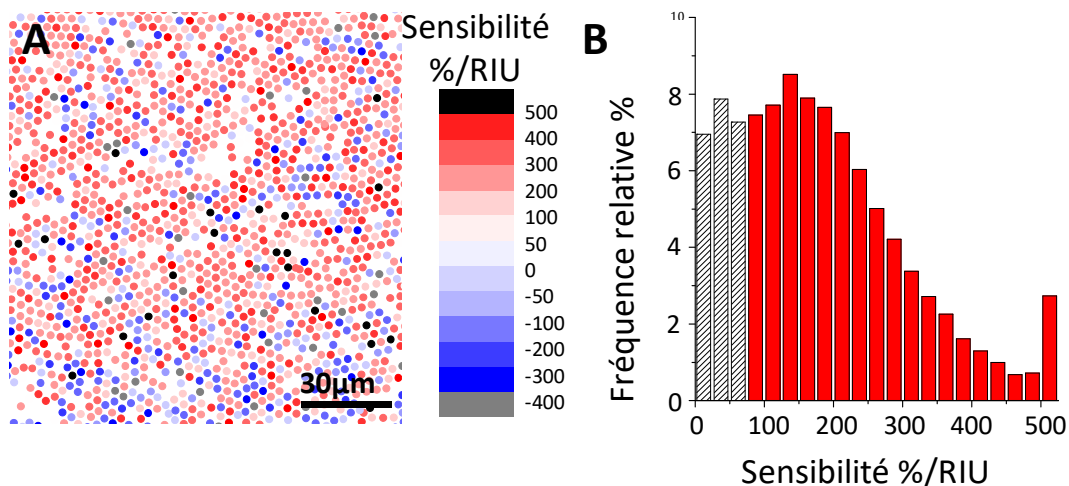


Figure 20 – Distribution spatiale de la sensibilité des différents cœurs de l'assemblage. A) La sensibilité représentée en fausses couleurs est en corrélation avec l'emplacement des cœurs. B) Distribution de la sensibilité (en valeur absolue) pour l'ensemble du réseau de micropiliers.

Une résolution de 10^{-4} RIU était alors l'une des meilleures rapportées dans la littérature^{61,90}. L'équipe de Malara et al. avait obtenu une résolution de 10^{-5} RIU, la plus faible jamais enregistrée pour les capteurs sur fibre optique SPR en configuration de réflexion⁹¹. Dans leur

étude, cette résolution est améliorée de 10^{-4} à 10^{-5} RIU par l'utilisation d'un résonateur inclus dans une monofibre plasmonique nanostructurée. Mais leur configuration, contrairement à la nôtre, n'était pas compatible avec la détection multiple. En résumé, la résolution obtenue par près de 80% des fibres formant le réseau de micropiliers était comparable aux résolutions obtenues dans la littérature et chose encore plus importante, a priori suffisante pour la détection biologique. Par conséquent, nous avons utilisé l'assemblage de micropiliers pour détecter la formation de monocouches biomoléculaires et l'hybridation de l'ADN (appariement de deux brins d'ADN complémentaires).

IV.3.4. Biodétections

IV.3.4.a. Monofonctionnalisation et détection de l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires

La cinétique complète, de la biofonctionnalisation des micropiliers avec des simples brins d'ADN à la détection de l'hybridation, est représentée sur la figure 21. Chaque étape débute ($t = 0$) par le changement du milieu en contact avec la face microstructurée. Les intensités rétro-réfléchies de chaque cœur $I(t)$ ont été mesurées en fonction du temps selon le même principe que celui décrit pour obtenir les sensibilités. Des séquences d'images ont été enregistrées et moyennées chaque seconde. L'intensité initiale I_0 de l'étape correspondante a été soustraite à $I(t)$ et cette différence d'intensité $I(t) - I_0$ a été normalisée par l'intensité rétro-réfléchie I_0 de façon à obtenir $i(t)$ l'intensité rétro-réfléchie relative normalisée en % en fonction du temps :

$$i(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_0} \quad (3)$$

Pour obtenir une vue globale de l'ensemble de la cinétique, l'intensité $i(t)$ a été cumulée d'une étape à la suivante. Cela signifie que l'intensité $i(t)$ cumulée à une étape donnée (k) a été obtenue en ajoutant la dernière valeur de l'intensité $i(t)$ cumulée atteinte par l'étape précédente ($k - 1$). La figure 21 représente la valeur moyenne de l'intensité rétro-réfléchie relative normalisée cumulée, mesurée sur l'ensemble des cœurs du faisceau de fibres. Dans la première étape (Fig.21A, A), le réseau a été biofonctionnalisé avec des molécules thiolées nécessaires à la détection de l'ADN ciblé. En raison de leur forte affinité pour les surfaces des métaux nobles, les thiols (R - SH) sont régulièrement utilisés pour former des monocouches auto-assemblées (SAM en anglais pour Self-Assembling Monolayer). Cette forte affinité permet la réalisation de dépôts auto-assemblés compacts. L'équipe de Whitesides⁹² a particulièrement étudié les phénomènes d'auto-assemblage d'alcanethiols sur des surfaces d'or. L'auto-assemblage des thiols se produit spontanément sur une surface d'or propre lorsque celle-ci est immergée dans une solution contenant le thiol d'intérêt. Il suffit de quelques minutes pour que les molécules de thiols soient physisorbées sur la surface du métal. Au contraire, la formation de la monocouche nécessitant la réorganisation des thiolates est un processus très lent. Plusieurs heures sont requises pour former une monocouche exempte de défauts. La surface dorée de la fibre a été exposée à un brin d'ADN1 (10 μ M) et à du polyéthylène glycol (PEG2k 2 kDa, 5 μ M) thiolés, ce qui a entraîné une augmentation rapide de l'intensité relative dans les 15 premières secondes, suivie d'une augmentation lente dans les minutes suivantes jusqu'à une valeur moyenne de 1,4 %. Plus de 80 % des fibres présentent une augmentation de l'intensité relative entre 0,8 % et 2 %. Les profils de fonctionnalisation

mesurés sur les fibres sont semblables aux profils SPR obtenus par Debono et al.⁹³ lors de la fonctionnalisation de prismes.

A. Mono-fonctionnalisation et suivi de l'hybridation d'ADN

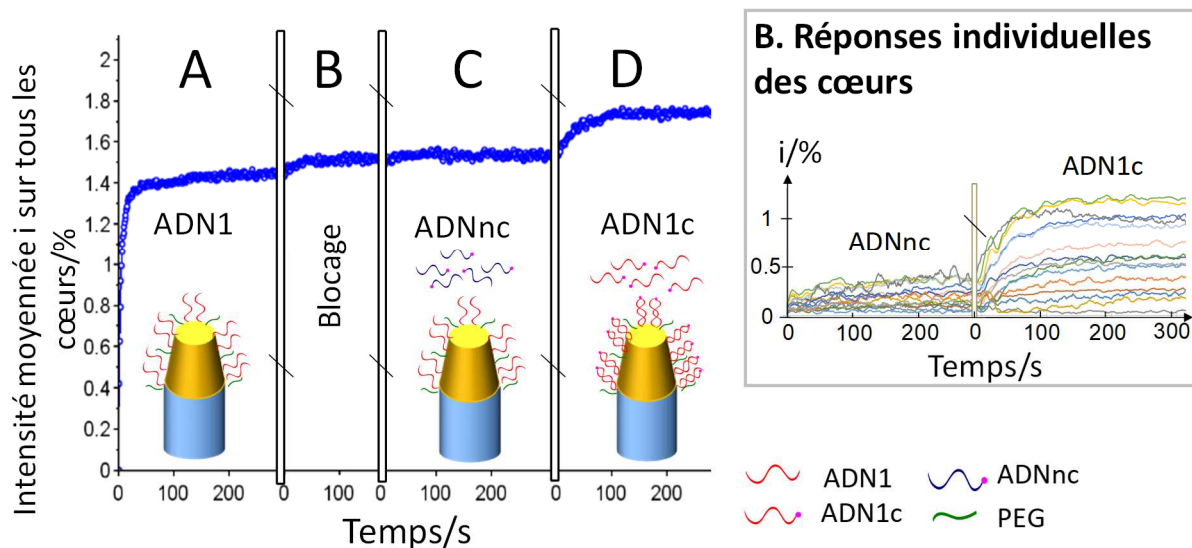


Figure 21 – Suivi cinétique par SPR de la fonctionnalisation de l'assemblage multifibre et de l'interaction entre deux brins d'ADN complémentaires : fonctionnalisation avec l'oligonucléotide thiolé ADN1 (10 μ M) et PEG2k (5 μ M) (A). Incubation avec PEG2k (100 μ M) (B), oligonucléotide non complémentaire ADNnc (1 μ M) (C), puis oligonucléotide complémentaire ADN1c (1 μ M). **Encart :** Suivi cinétique (en valeur absolue) pour 15 fibres individuelles, choisies aléatoirement parmi les 5% des meilleures en terme de rapport signal sur bruit.

Lors de l'étape B, le réseau de micropiliers a été exposé à du PEG2k (100 μ M) pour bloquer la surface afin de limiter les interactions non spécifiques. La surface étant déjà fonctionnalisée avec un brin d'ADN1 thiolé, l'augmentation du signal a été inférieure à 0,1 % par rapport aux 1,4 % de l'étape précédente. Au cours de l'étape C, la surface dorée a été exposée à une séquence d'ADN non complémentaire ADNnc (1 μ M) (témoin négatif). Le signal n'a pas été modifié de manière significative, ce qui indique qu'aucune interaction biologique mesurable ne s'est produite. Pendant l'étape D, la surface a été exposée à l'ADN complémentaire ADN1c (1 μ M) (7,9 kDa), ce qui a entraîné un accroissement de l'intensité relative dans les 90 premières secondes, suivie d'une lente progression dans les minutes suivantes pour une augmentation globale de 0,2 %, ce qui correspond à un niveau vingt fois supérieur au niveau de bruit. Cette augmentation du signal indique une reconnaissance entre les deux brins d'ADN complémentaires. Cette reconnaissance a été confirmée de manière indépendante par fluorescence : pour cela les fibres ont été mises en contact avec de la streptavidine R-Phycoérythrine (SAPE) qui a interagit avec la partie biotinylée du brin complémentaire ADN1c. Des études sur l'hybridation de l'ADN réalisées sur des monofibres optiques par Pollet et al.⁶³ ont rapporté la détection de brins d'ADN complémentaires ayant des concentrations allant de 5 μ M à 1 μ M comme démontré ici.

Cette expérience a montré que l'assemblage multifibre était capable de détecter l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires. La mesure ayant été effectuée simultanément par

environ 6000 capteurs SPR indépendants, il est possible d'accéder à chaque signal individuel. La figure 21B représente la cinétique en valeur absolue au cours des étapes C-D de 15 fibres choisies parmi les 5 % des plus performantes en termes de rapport signal sur bruit. Les fibres présentent des variations d'intensité relatives similaires à celles observées sur les dispositifs SPR à base de prisme (1 à 2 % pour l'hybridation de l'ADN^{94,95}). La détection est spécifique puisque l'incubation avec un ADN non complémentaire n'induit pas de modification de l'intensité relative. De plus, 77,2 % des cœurs présentent un rapport signal/bruit supérieur à 3 pour l'étape d'hybridation de l'ADN complémentaire (étape D). Cette valeur est conforme à la distribution des sensibilités présentée sur la figure 20.

En résumé, nous avons démontré que des fibres optiques individuelles microstructurées en forme de micropiliers sont capables de détecter à distance des variations d'indice optique. En moyenne, la sensibilité obtenue avec cette nouvelle géométrie est supérieure à 75 %/RIU pour 78 % des fibres de l'assemblage ce qui correspond à une résolution de l'ordre de 10^{-4} RIU. Une telle résolution nous a permis de détecter et de suivre la cinétique de la biofonctionnalisation de l'assemblage, correspondant à l'adsorption de couches moléculaires auto-assemblées, et de suivre les interactions biologiques entre deux brins d'ADN complémentaires. La détection à distance des interactions biologiques par SPR a ainsi été démontrée à travers plusieurs milliers de fibres optiques microstructurées dont certaines présentent une résolution comparable à celle rapportée sur les dispositifs d'imagerie SPR standard. Cette preuve de concept a fait l'objet de la publication Vindas et al., 2019⁷. En démontrant que chaque fibre optique pouvait être utilisée comme un capteur SPR individuel, nous avons franchi une étape essentielle vers la détection multiplexée. Néanmoins, à ce stade, la fonctionnalisation d'une surface non plane telle que celle d'un assemblage de fibres microstructurées représentait un réel défi⁹⁶⁻¹⁰¹. Cela était dû au fait que nous ne disposions alors pas d'une méthode de fonctionnalisation multiple adaptée à une telle surface. Pour cette raison, seulement une cible d'ADN avait pu être détectée (la même pour chacune des fibres optiques de l'assemblage). Nous avons donc essayé différentes techniques de fonctionnalisation multiple avant de parvenir à notre objectif : réaliser une double détection.

IV.3.4.b. Fonctionnalisation multiple et double détection d'anticorps

IV.3.4.b.i. Caractérisation optique préliminaire de l'assemblage

L'assemblage utilisé pour réaliser la détection multiple présentait les mêmes caractéristiques que l'assemblage précédent à la seule différence du demi-angle au sommet des micropiliers, égal cette fois à $10 \pm 1^\circ$. La caractérisation optique de l'assemblage a été réalisée à 625 nm à l'aide du dispositif de caractérisation optique déjà présenté. Ce dernier a également permis de suivre le dépôt de gouttes sur les différentes fibres composant le faisceau, mais aussi de suivre par SPR toute les modifications survenant sur les zones sensibles de la surface. La sensibilité S a été évaluée à l'aide de trois solutions d'indices optiques différents (eau déionisée ($n_{eau} = 1,332$), PBS ($n_{PBS} = 1,3364$), PBS et glycérol 5% ($n_{PBS+glycérol} = 1,3421$)) à -250 %/RIU pour l'ensemble du faisceau de fibres. Comme indiqué précédemment, cette sensibilité correspond à une résolution de l'ordre de 10^{-4} RIU. Ces valeurs de sensibilité et de résolution valident les différentes étapes de préparation des faisceaux (gravure, couche d'or) et sont compatibles avec la mesure d'interactions biomoléculaires.

IV.3.4.b.ii. Multi-fonctionnalisation de la surface de l'assemblage

L'assemblage plasmonique étant sensible aux changements d'intensité dus à des phénomènes non spécifiques, une mise en œuvre directe pour une application biomédicale serait problématique. En effet, il est nécessaire de prendre en considération tous les changements d'indice du milieu exploré non corrélés avec la présence d'une molécule cible. Pour cela, il faut définir différentes zones de détection à la surface du capteur. Cela passe par la fonctionnalisation multiple de la surface qui permettra de distinguer le signal induit par un phénomène non spécifique (changement global de l'indice optique ou interactions de surface non spécifiques) de la reconnaissance d'une cible spécifique. En outre, il est largement admis que la détection d'une combinaison de biomarqueurs permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité des diagnostics et pronostics d'un très large éventail de maladies¹⁰²⁻¹⁰⁴. Alors que la géométrie des faisceaux de fibres optiques microstructurés leur confère leurs propriétés plasmoniques et que leur taille les rend intéressants pour la détection *in vivo*, ces deux aspects rendent extrêmement difficile le processus de fonctionnalisation. Différentes méthodes ont été testées pour pallier cette difficulté (photo-inscription, chauffage laser, micro-levier...) et immobiliser plusieurs sondes sur la surface microstructurée du faisceau. C'est finalement l'utilisation d'un micro-levier souple en polymère couplé à un système de déplacement de précision permettant le dépôt de gouttes localisées qui s'est révélée la plus adaptée en raison de la complexité de la surface à fonctionnaliser. Les premiers essais de dépôt de gouttes suivant cette méthode ont été réalisés avec des micro-leviers en silicium, utilisés auparavant par nos partenaires du LAAS pour la fonctionnalisation de fibres optiques⁹⁸. Cependant, ces leviers, du fait de leur rigidité, ne nous ont pas permis de réaliser des dépôts corrects. En effet, le contact (même bref) de ces leviers avec la surface des assemblages suffisait à décoller le revêtement d'or et pouvait même aller jusqu'à casser les microstructures (Fig.22).

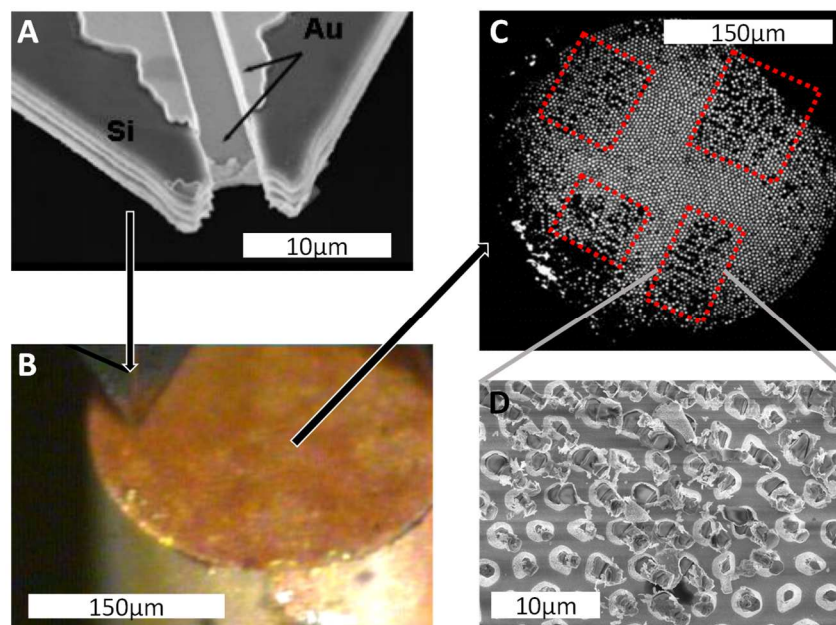


Figure 22 – Altération des microstructures lors de la fonctionnalisation à l'aide d'un micro-levier en silicium. A) Image MEB d'un micro-levier en silicium. B) Image optique du processus de dépôt à l'aide d'un micro-levier en silicium. C) Image en rétro-réflexion d'un assemblage multi-fonctionnalisé. D) Image MEB des défauts induits par la fonctionnalisation.

Pour résoudre ce problème, le LAAS a développé un nouveau micro-levier conçu par impression 3D d'une photo-résine^{105,106} (Fig.23). Ce levier comporte un micro-canal de 1 mm de long, 20 μm de large et 50 μm de profondeur conduisant à une extrémité (empreinte) de 60 par 60 μm^2 . Des renforts latéraux ont été ajoutés pour améliorer la raideur du levier.

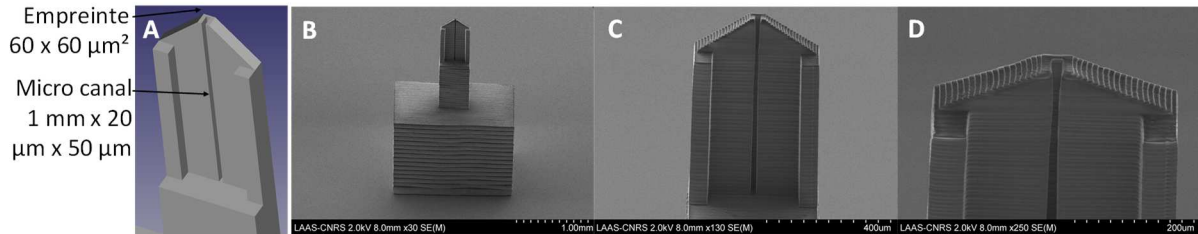


Figure 23 – Représentation des micro-leviers en polymère utilisé pour immobiliser les anticorps. A) Représentation schématique et dimensions et B, C, D) Images MEB d'un micro-levier en polymère à différents grossissements.

Ce levier en polymère s'est révélé suffisamment souple pour toucher la surface microstructurée sans casser les structures ni endommager la couche d'or, et pour déposer des microgouttes de solution de taille appropriée (voir figure 24 pour le plan de dépôt des gouttelettes (i), le schéma de principe du dépôt (ii) et les images des gouttelettes déposées avec le micro-levier (iii, iv)). Pour réaliser les dépôts de manière localisée, le micro-levier a été assemblé avec une caméra équipée d'un puissant zoom (x200) sur une platine de déplacement : le mouvement horizontal en X-Y était contrôlé par ordinateur avec un pas de 5 μm et le mouvement vertical Z était contrôlé manuellement avec une précision micrométrique. Différentes solutions d'anticorps non modifiés à une concentration de 1 μM ont été utilisées pour fonctionnaliser la face sensible du capteur par adsorption physique. Les solutions d'anticorps ont été préparées avec 5 % de glycérol afin de les rendre plus visqueuses et éviter un séchage complet du plot une fois la goutte déposée. Une première solution de sonde anticorps a été chargée sur le micro-levier par immersion, une goutte a été déposée sur une surface de verre plane afin d'assurer un dépôt correct avant d'amener le micro-levier dans une position X, Y localisée sur le dessus du faisceau. Une microgoutte a ensuite été déposée sur la face microstructurée du faisceau, couvrant une surface d'environ 200 micropiliers (correspondant approximativement à 2000 μm^2 , soit environ 1/20 de la surface totale). Le micro-levier a été soigneusement rincé avant de charger la deuxième solution de sonde pour un dépôt ultérieur. Nous avons laissé les surfaces en contact avec les micro-gouttes pendant au moins 30 minutes afin de permettre l'immobilisation des protéines par auto-adsorption. Le processus de dépôt a été suivi en temps réel par le dispositif optique. La différence d'intensité lumineuse rétro-réfléchiée entre les surfaces sèches et celles recouvertes de solution a d'abord permis de valider le dépôt des gouttes au contact de la surface, mais aussi de localiser précisément les plots pour l'analyse des événements d'interaction biomoléculaire à la surface (Fig.24B). Afin de démontrer la preuve de concept, trois dépôts ont été réalisés sur la surface ; deux sondes différentes ont été utilisées, une immunoglobuline G (IgG) de lapin et une IgG de rat ; la solution d'IgG de rat a été déposée en double. Toute la surface a ensuite été rincée par immersion dans du PBS et bloquée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA pour Bovin Serum Albumine) afin de réduire l'adsorption non spécifique de protéines. La fonctionnalisation du

faisceau de fibres par les deux sondes a été confirmée de manière complémentaire et indépendante par fluorescence. Pour cela, des anticorps biotinylés ont été utilisés comme cibles et révélés en SPR (voir partie détection ci-après) mais également par fluorescence. La figure 24C montre par fluorescence la localisation spécifique des trois plots correspondant aux deux sondes immobilisées.

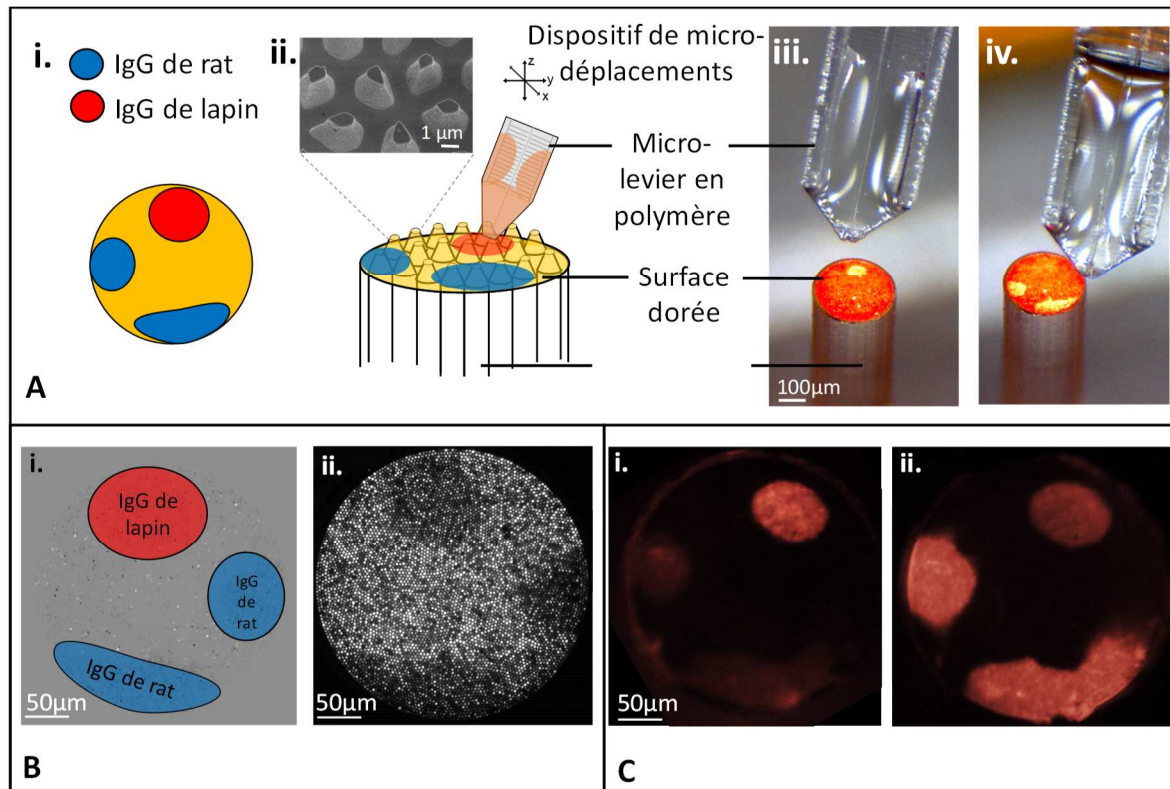


Figure 24 (A) - Multifonctionnalisation de la surface microstructurée et dorée selon i. Plan des dépôts, et ii. Schéma de principe de la réalisation des dépôts, avec l'image correspondant à iii. Formation de goutte d'IgG de lapin, et iv. Formation de gouttes d'IgG de rat. Insert en (A) ii. Image MEB de la surface microstructurée et dorée. (B). Vue en SPR du dépôt des gouttelettes avec i. Plan des dépôts sur l'image différentiel (différence entre l'image après dépôt des gouttes et l'image avant dépôt), ii. Image de la lumière rétro-réfléchié ; (C) Confirmation de l'immobilisation et détection des anticorps par fluorescence avec de la streptavidine R-phycoérythrine (SAPE) après ajout des anticorps biotinylés : i. Anti-lapin et ii. Anti-rat.

IV.3.4.b.iii. Double détection d'anticorps

Afin de démontrer la faisabilité d'une détection multiplexée par SPR sur le faisceau de fibres optiques microstructurées, et de la confirmer ensuite par microscopie de fluorescence, deux anticorps anti-espèces biotinylés (IgG anti-lapin et IgG anti-rat) ont été utilisés comme cibles. La surface biofonctionnalisée a été successivement immergée dans les différentes solutions de cibles, à des concentrations allant de $0,1 \text{ nmol.L}^{-1}$ à $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Chaque solution a été incubée pendant 15 minutes afin d'atteindre une stabilisation du signal, l'incubation a été suivie d'un rinçage dans du PBS pendant 3 minutes. Le signal SPR a été suivi par le système optique pendant toute l'expérience en mesurant l'intensité de la lumière rétro-réfléchié $I(t)$ sur les différents plots en fonction du temps. Le signal initial sur chaque plot à t_0 , au début de l'expérience (avant l'incubation des solutions cibles), a été réduit à zéro par soustraction de

l'intensité moyenne sur la zone à t_0 , $I(t_0)$. Les zones non fonctionnalisées de la surface du faisceau ont été utilisées comme zones « témoin négatif » afin de détecter tout changement non spécifique se produisant à la surface. L'intensité moyenne sur une zone « témoin négatif » de surface égale à la surface du plot considéré $I_{neg}(t) - I_{neg}(t_0)$ a été soustraite au signal précédent tout au long de l'expérience afin de s'affranchir des variations d'intensité induites par des phénomènes non spécifiques (modifications de température, variations globales de l'indice optique ou interactions non spécifiques sur la surface). Le signal exploité $i(t)$ pour chaque plot est finalement donné par :

$$i(t) = (I(t) - I(t_0)) - (I_{neg}(t) - I_{neg}(t_0)) \quad (4)$$

Le faisceau a d'abord été immergé dans la gamme de solutions d'IgG anti-lapin puis dans celle d'IgG anti-rat. Le signal $i(t)$ défini précédemment est représenté pour les deux plots dans les figures 25A et B.

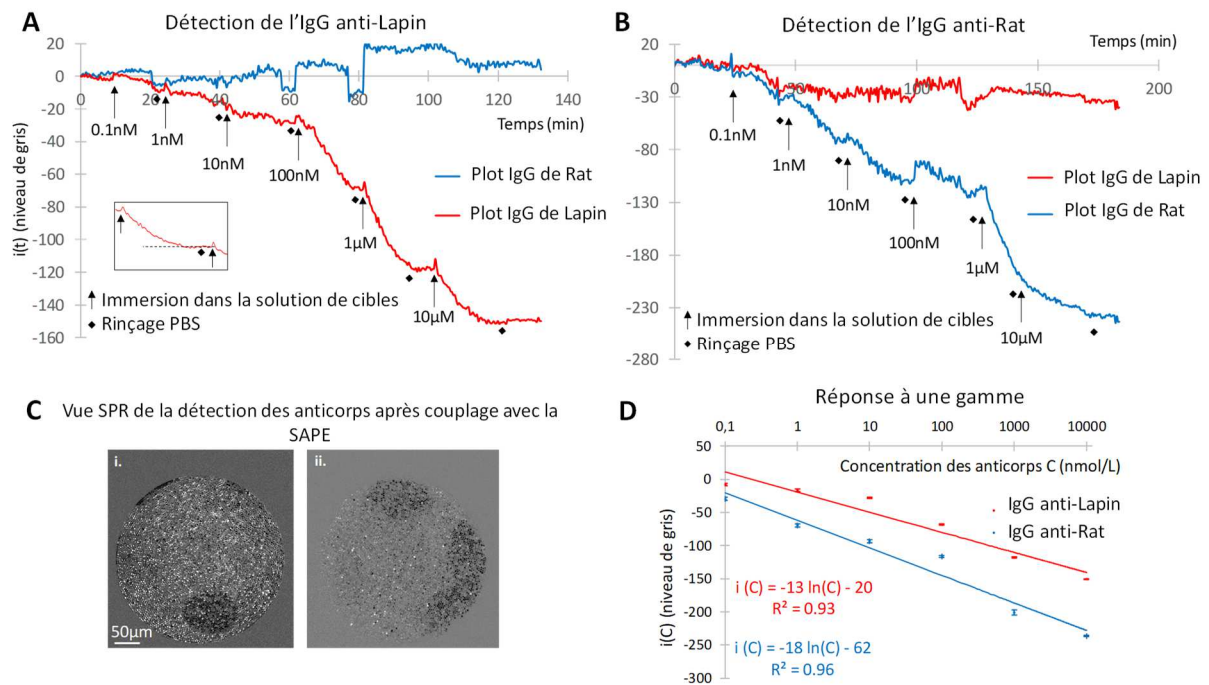


Figure 25 - Suivi cinétique du signal SPR ($i(t)$, en niveau de gris) sur les différents plots de l'assemblage pour la détection (A) des IgG anti-lapin et (B) des IgG anti-rat; (C). Images SPR de la lumière rétro-réfléchiée sur les fibres après injection de i. IgG anti-lapin et ii. IgG anti-rat suivie d'un couplage avec la streptavidine- R-phycoérythrine. (D). Réponse à une gamme : signal SPR sur les différents plots en fonction de la concentration d'anticorps spécifiques correspondante. Insert dans A. Zoom sur une partie de la courbe, montrant la stabilisation du signal et le rinçage dans la solution de PBS.

En observant la figure 25A, on constate une modification importante de l'intensité du signal sur le plot IgG de lapin et une variation de signal beaucoup plus faible sur le plot IgG de rat. Cela indique d'une part qu'il y a, comme attendu, une interaction biomoléculaire entre les IgG de lapin et les IgG anti-lapin et d'autre part une faible réactivité croisée entre les anticorps. On remarque également qu'on atteint une stabilisation du signal à chaque concentration testée et que ce palier reste stable pendant l'étape de rinçage. Cela signifie que seules les molécules

faiblement liées sont éliminées de la surface par lavage, tandis que les interactions anticorps-antigène spécifiques restent stables. En raison du large excès de sondes immobilisées comparé à la concentration des cibles en solution, le signal obtenu pour une concentration de cibles n'est pas affecté par la précédente concentration : il reste suffisamment de sondes libres pour réagir avec les nouvelles cibles en solution. De plus, l'effet de la gamme de concentration est clairement visible puisqu'une augmentation de la concentration cible entraîne une augmentation (négative) du signal mesuré pour le plot correspondant uniquement. Des concentrations de protéines aussi faibles que 1 nmol.L^{-1} ont été spécifiquement détectées par SPR. La SAPE a ensuite été incubée sur toute la surface afin de valider la détection spécifique non seulement par SPR mais aussi par microscopie de fluorescence. Cette étape a permis de visualiser les plots par fluorescence (Fig.24C) et d'améliorer le signal SPR afin qu'il puisse être directement visualisé comme indiqué sur la figure 25C. Comme mentionné précédemment, la fluorescence observée sur la figure 24C valide la biofonctionnalisation de la surface microstructurée, mais elle confirme également l'interaction biomoléculaire spécifique se produisant à la surface de l'assemblage et démontre que la fonctionnalité des anticorps est préservée après leur adsorption sur le faisceau de fibres. Les mêmes étapes ont été mises en œuvre avec des IgG anti-rat et les mêmes conclusions peuvent être tirées ce qui valide le potentiel de détection multiplexée du dispositif.

La figure 25D représente les courbes de calibration correspondant à la variation du signal pour les deux anticorps détectés en fonction de leur concentration. Le signal $i(C)$ correspondant à une concentration C donnée a été évalué à partir de la valeur plateau du signal $i(t)$ obtenu à l'équilibre. Les données expérimentales ont montré que la réponse à l'équilibre $i(C)$ évolue de façon logarithmique avec la concentration, comme c'est généralement le cas pour une gamme de concentration dans les immuno-essais *in vitro* ou les études dose-réponse. Afin de permettre une meilleure interprétation des données, l'axe des x est donc présenté en échelle logarithmique dans la figure 25D. Les barres d'erreur des courbes de calibration ont été évaluées pour chaque concentration à partir de l'écart-type du signal σ observé entre les valeurs constituant les plateaux des figures 25A et 25B. Ces incertitudes correspondent à l'écart-type entre neuf mesures individuelles à la même concentration. Comme observé sur la figure 25D, la réponse $i(C)$ en fonction du logarithme de la concentration est linéaire $i(C) = \alpha \ln(C) + \beta$ pour les deux anticorps : $i(C) = -13 \ln(C) - 20$ pour l'anti-lapin et $i(C) = -18 \ln(C) - 62$ pour l'anti-rat. Cette relation linéaire permet de déterminer la limite de détection (LOD pour Limit Of Detection) comme étant la concentration la plus faible conduisant à un signal égal à 3 fois σ : $i(LOD) = 3\sigma$. Les LOD pour la détection des IgG anti-lapin et des IgG anti-rat ont été respectivement estimées à 0,4 nM et 0,1 nM. Ces limites de détection, de l'ordre de quelques dixièmes de nanomoles par litre, démontrent une bonne sensibilité du capteur sur fibre et représentent à ma connaissance les premières LOD mesurées pour la détection d'anticorps par un capteur plasmonique multiplexé sur fibre optique utilisé en réflexion.

IV.3.5. Conclusion et perspectives

Pour résumer, nous avons utilisé l'assemblage de fibres optiques microstructurées comme plateforme optique multifonctionnelle pour valider la preuve de concept d'une

détection multiplexée, à distance et sans marquage de deux anticorps. La réponse à une gamme de concentration des anticorps ciblés nous a permis de déterminer les LOD qui sont de l'ordre de quelques dixièmes de nanomoles par litre pour les deux anticorps. Cela représente une première estimation des LOD d'anticorps par un capteur plasmonique multiplexée sur fibre optique utilisé en réflexion. Chaque étape, de la fonctionnalisation de l'assemblage à la détection des biomolécules, a été suivie par imagerie SPR et a été validée par une méthode alternative de fluorescence. Bien que les anticorps utilisés ici ne soient pas cliniquement pertinents, ils ont permis de faire la preuve de concept de la biodétection multiplexée et nous pourrions tout à fait envisager d'appliquer ce système à la détection de cibles cliniquement pertinentes, telles que les auto-anticorps biomarqueurs pour le diagnostic du cancer^{104,107-109} ou les anticorps résultant de la vaccination¹¹⁰. La capacité démontrée du capteur à effectuer une double détection et son aptitude intrinsèque à être utilisé dans des microenvironnements spécifiques ouvrent la voie au diagnostic *in vivo*. Cependant, de nombreux obstacles restent à franchir avant de pouvoir utiliser notre dispositif *in vivo*. La détection de biomolécules réalisée ici *in vitro* a été effectuée dans un environnement tampon sans changement du pH ou de la température du milieu ce qui n'est pas une situation réaliste. Les effets liés à ce type de changements représentent la limitation la plus importante du système mais nous pourrions nous en affranchir grâce aux différentes zones de la fibre (et notamment aux zones « témoins négatifs »). Un autre paramètre à prendre en compte est la stabilité de la surface. Dans un environnement composé d'une grande quantité de biomolécules, une instabilité de la surface pourrait diminuer la sensibilité du capteur. Pour améliorer la stabilité de la biofonctionnalisation de la surface, nous devons utiliser une chimie plus spécifique comme l'auto-assemblage de thiol sur la surface d'or, qui conduit à une liaison or-soufre chimiquement plus stable que la simple adsorption mise en œuvre ici. Cependant, même si la chimie des thiols est compatible avec des applications dans des milieux complexes tels que le plasma sanguin ou le sérum, nous devons tout de même évaluer la stabilité du greffage des sondes dans les milieux biologiques. De plus, comme pour tout essai immunologique, la réactivité croisée des différentes sondes et cibles devra être évaluée en fonction de l'application, afin de garantir une détection fiable des biomarqueurs. Les prochaines étapes pour améliorer ce biocapteur plasmonique vont être de créer un réseau de sondes (une dizaine) avec une meilleure résolution et de réaliser des détections en milieu complexe comme le sang ou le sérum afin de se rapprocher des applications médicales.

IV.4. Projet « Biocapteur interférométrique sur fibre »

IV.4.1. Introduction

J'envisage bien entendu de poursuivre mes recherches sur les biocapteurs plasmoniques notamment en réalisant les perspectives décrites dans le paragraphe précédent. Mais je souhaite également développer une nouvelle approche de détection basée sur l'interférométrie. A l'heure actuelle, les principales méthodes de détection d'interactions moléculaires mises en œuvre par les biocapteurs sur fibres optiques sont la fluorescence, la bioluminescence, la SPR ou l'interférométrie. Parce qu'il s'agit d'approches « sans marquage », les deux dernières méthodes, plasmonique et interférométrique, sont les plus intéressantes pour le diagnostic *in vivo*. Comme décrit précédemment, les travaux réalisés sur les assemblages multifibres plasmoniques m'ont permis de faire la preuve de concept de la

détection moléculaire à travers le suivi de l'interaction entre deux brins d'ADN complémentaires⁷ et de réaliser la détection de deux anticorps différents⁸. Cependant, ces travaux ont mis en évidence d'importantes difficultés à surmonter : la structuration des assemblages multifibres nécessaire pour leur conférer des propriétés plasmoniques, bien que simple à mettre en œuvre, génère une importante hétérogénéité et une grande complexité pour les étapes de fonctionnalisation : il est particulièrement difficile d'obtenir un greffage reproductible de plusieurs sondes. Par ailleurs, la couche d'or déposée est fragile ce qui entraîne de fortes contraintes dans la manipulation des assemblages. Tous ces obstacles rendent difficile la mise au point d'un outil robuste adapté à une utilisation pratique en médecine. Car il faut bien avoir à l'esprit que ces fibres, à terme, si on souhaite les utiliser pour des détections moléculaires *in situ* en remplacement de la biopsie, devront être introduites dans des tissus, leur surface fonctionnalisée devra donc être suffisamment stable. C'est pourquoi j'envisage une nouvelle approche, basée sur l'interférométrie optique.

A ce jour il n'existe aucun capteur capable de réaliser une analyse biomoléculaire *in situ*, en temps réel, sans marquage, fortement multiplexée, adapté aux mesures en milieu complexe tel que l'*in vivo*. L'objectif du projet proposé est de développer un tel outil. Pour cela, plusieurs défis devront être relevés :

- Concevoir un biocapteur interférométrique sur un assemblage de fibres optiques capable de détecter des changements d'indice optique avec une résolution compatible avec la détection d'interactions moléculaires,
- Mettre au point une méthode de multi-fonctionnalisation qui conférera à l'outil la capacité de détecter plusieurs cibles biologiques en parallèle : réaliser une multi-détection sur un même capteur est indispensable pour s'affranchir des variations de signal non spécifique,
- Réaliser des détections multiplexées en milieu de plus en plus riche pour aller progressivement vers l'*in vivo*.
- Rendre l'outil suffisamment stable et robuste pour qu'il puisse être exploité en situation réel, *in vivo*

IV.4.2. Principe physique de la détection et état de l'art

Les fibres optiques interférométriques utilisent les interférences qui se produisent entre (au moins) deux ondes lumineuses se propageant à travers deux chemins optiques différents. Quel que soit le dispositif, l'onde incidente doit être séparée en deux et recombinaison. Il faut faire en sorte que l'un des chemins optiques soit facilement affecté par le milieu extérieur à analyser. Plusieurs techniques sont utilisées pour produire deux ondes lumineuses à partir de l'onde incidente. Une première approche utilisée dans les dispositifs interférométriques classiques consiste à séparer l'onde incidente en deux ondes amenées à parcourir des chemins physiquement différents : réflexion sur un miroir semi-réfléchissant pour créer une cavité type Fabry-Perot¹¹¹, séparation à l'aide d'un coupleur vers deux fibres (type Mach Zehnder), les deux fibres pouvant avoir des longueurs différentes et être associées à des miroirs (type Michelson)¹¹². S'agissant de fibres optiques, il est également possible de faire interférer des modes optiques. Dans ce cas, les longueurs des chemins parcourus par le mode de référence et le mode sensible sont physiquement les mêmes mais il existe une différence de chemin optique due à la dispersion modale (les indices effectifs des deux modes étant différents). Il

existe plusieurs méthodes pour produire deux modes optiques à partir d'un seul. Cela est possible via l'insertion de réseaux¹¹³. Au niveau d'un premier réseau, une partie de la lumière guidée dans le cœur d'une fibre monomode excite des modes de la gaine. Un second réseau permet de renvoyer dans le cœur la lumière guidée par la gaine, ce qui génère des interférences entre les modes de la gaine et le mode du cœur. Une autre approche consiste à insérer une discontinuité à l'intérieur d'une fibre monomode : diminution brutale du diamètre de la fibre¹¹⁴, accolage de deux fibres en décalé¹¹⁵ ou insertion en décalé d'une section de fibre entre deux sections de fibres monomodes¹¹⁶. Cette discontinuité génère l'apparition de modes se propageant avec des indices effectifs différents du mode initial ce qui génère des interférences lors de leur recombinaison. Quelle que soit l'origine des interférences, celles-ci sont sensibles à l'indice optique du milieu à analyser. Si la surface en contact avec ce milieu est fonctionnalisée avec des sondes biologiques, l'association des sondes avec leurs cibles va modifier localement l'indice optique du milieu et donc les interférences obtenues. Ces différents types de biocapteurs interférométriques sur fibres ont été utilisés avec succès pour détecter des protéines¹¹⁷, des anticorps¹¹⁶, des microARN¹¹⁸. Cependant, la fabrication de ce type de capteurs est souvent complexe et il est difficile de les adapter à une détection multiplexée. Dans le domaine industriel, la société ForteBio¹¹⁹ a commercialisé un dispositif sur fibre basé sur le principe des bio-couches interférométriques (BLI pour Bio-Layer Interferometry)¹²⁰. La détection est basée sur l'analyse des figures d'interférences causées par l'interaction de la lumière blanche réfléchiée par une couche réfléchissante interne et une couche de biomolécules immobilisées sur le biocapteur. Lors de la reconnaissance des cibles par les biomolécules sondes, la figure d'interférence se déplace, ce qui peut être mesuré en temps réel. Leur outil est mis en œuvre *in vitro* pour mesurer des cinétiques d'interaction^{121,122} et détecter des cibles biologiques avec une très bonne limite de détection : jusqu'à 6,7 nM pour la protéine Tau, un biomarqueur de maladie neurodégénérative¹²³. Qu'il s'agisse de ce dispositif industriel ou des différents prototypes développés dans la recherche, aucun ne répond à l'heure actuelle aux exigences de la détection *in situ* d'échantillons biologiques réels. L'une des principales difficultés à surmonter pour parvenir à cet objectif est l'intégration d'analyses multiplexées. C'est pourquoi nous proposons d'adapter l'approche interférométrique sur un réseau de fibres optiques afin de lui conférer les propriétés requises pour de la détection multiplexée, *in situ*, en milieu complexe. A ce jour, l'utilisation de faisceaux de fibres dans le domaine de la biologie se restreint à l'imagerie. En particulier, la société française Mauna Kea Technologies¹²⁴ a développé un faisceau de fibres capable d'imager des déplacements cellulaires *in vivo*, en temps réel par fluorescence¹²⁵. L'existence de ce système commercial conforte la faisabilité d'utiliser des assemblages multifibres pour des applications *in vivo* et *in situ*.

La figure ci-après représente un schéma de principe de l'outil que nous souhaitons développer (Fig.26). Le dispositif consiste en un assemblage de fibres optiques sur lequel sont déposées deux couches : une couche interne réfléchissante et une cavité au bout de laquelle seront greffées des sondes biologiques. Cette structuration génère deux interfaces : la première apparaît entre le faisceau de fibres optiques et la couche interne réfléchissante, tandis que la seconde est formée entre la cavité et le milieu testé. Lors de son incidence sur la première interface, la lumière guidée par la fibre se divise en deux ondes. La première onde se réfléchit dans la direction de l'excitation, tandis que la seconde se propage vers l'avant à travers la

cavité, sonde le milieu de détection et se réfléchit en se recombinaut avec la première onde réfléchi. Une interaction entre les sondes immobilisées sur la surface du biocapteur et leurs cibles dans le milieu de détection provoque une augmentation de l'épaisseur de la cavité optique à l'extrémité du biocapteur. Cela induit un décalage spectral $\Delta\lambda$ de la réponse du biocapteur (voir la flèche rouge horizontale sur la figure 26B). Ce décalage spectral peut être interprété comme un décalage de la réflectance ΔR si l'interrogation est réalisée à une longueur d'onde particulière (voir la flèche rouge verticale de la figure 26B). L'information sur le décalage ΔR pourra être obtenue en imageant l'entrée de l'assemblage multifibre et la mesure de l'intensité de la lumière rétro-réfléchi recombinaut permettra de rendre compte d'interactions biologiques se produisant en temps réel au niveau de l'extrémité fonctionnalis. Dans cette configuration chaque cœur de l'assemblage jouera le rôle d'un biocapteur individuel. Le principal avantage de cette méthode par rapport à la méthode SPR précédemment mise en œuvre est l'absence de microstructures 3D complexes et de la couche d'or fragile. Avec cette nouvelle approche nous devrions être capable de tirer profit de la géométrie plane afin d'obtenir un greffage des sondes plus facile à mettre en œuvre et plus robuste. Afin d'initier ce projet, j'ai recruté Oleksii Bratash, en stage de Master 2 puis en thèse et obtenu un financement Initiative de Recherche Stratégique (IRS) de 26keuros.

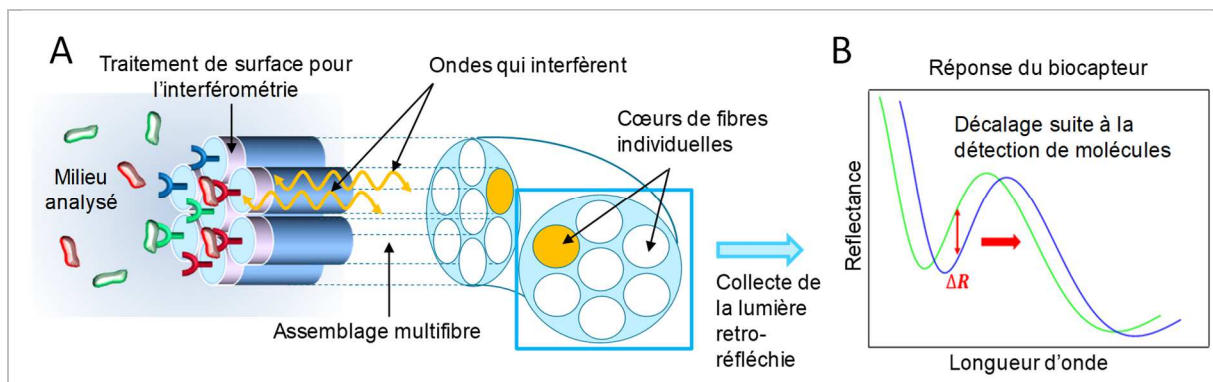


Figure 26 – Schéma de principe du biocapteur interférométrique multiplexé qui sera développé dans le projet

IV.4.3. Présentation des différentes étapes du projet

Le projet se décompose en plusieurs étapes représentées sur la figure 27. Je vais décrire pour chacune d'elle les pistes envisagées pour les réaliser et les résultats préliminaires obtenus le cas échéant.

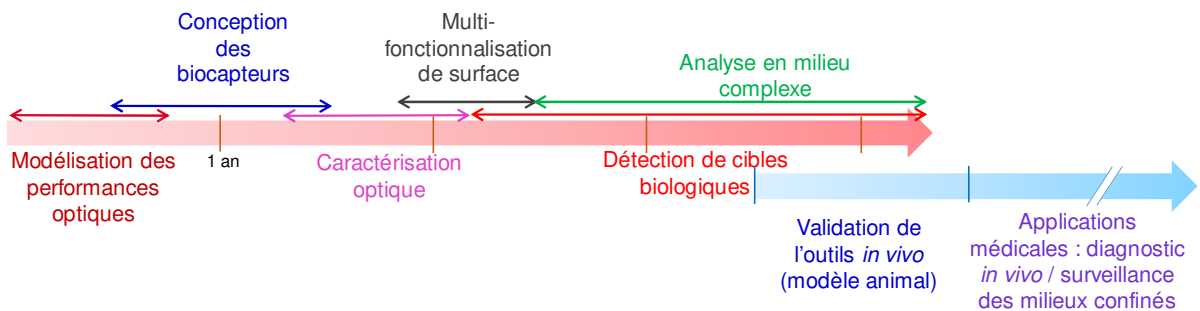


Figure 27 – Représentation des différentes étapes du projet à moyen terme (flèche rouge) et long terme (flèche bleu).

IV.4.3.a. Modélisation des performances optiques : simulation du biocapteur interférométrique

La première étape consiste à modéliser les phénomènes optiques mis en œuvre afin de les optimiser pour la détection biologique. Simuler un dispositif avec différents paramètres tels que l'épaisseur des couches interférométriques, les matériaux composant ces couches (i.e. l'indice optique) ainsi que la longueur d'onde d'excitation devrait nous apporter des indices sur la réponse du système et la possibilité de trouver la configuration offrant la meilleure sensibilité aux changements d'indice optique du milieu environnant. Pour évaluer les performances de détection du biocapteur, il sera également possible de modéliser les cibles détectées au travers d'une couche supplémentaire en bout de capteur en explorant différents paramètres (épaisseur, indice optique, densité, homogénéité de la couche...). Une fois les principaux paramètres choisis grâce aux simulations, il faudra très probablement adapter le modèle aux contraintes liées au processus de fabrication des biocapteurs. Nous serons en effet contraints par la nature des fibres optiques disponibles (matériaux, dimensions, résistance à la température...), par les matériaux disponibles pour réaliser les interfaces et cavités ainsi que par les dimensions physiques possibles pour la géométrie du système. Quoi qu'il en soit les paramètres simulés permettront de limiter considérablement le nombre de conditions à tester expérimentalement.

Pour réaliser ces simulations nous avons cherché un logiciel approprié capable de modéliser des phénomènes optiques dans des modèles 3D complexes d'une taille comparable à la longueur d'onde. L'un des candidats les plus appropriés était le logiciel COMSOL Multiphysics basé sur la méthode des éléments finis (FEM pour Finite Element Method)¹²⁶. Ce programme permet de réaliser une simulation et une analyse complètes des phénomènes optiques non seulement en géométrie plane simple mais aussi dans des structures très irrégulières qui ne sont pas accessibles par les méthodes d'analyse conventionnelles. COMSOL permet un prototypage flexible et rapide du modèle grâce à des balayages multiparamétriques incluant la géométrie, le type de matériau, les conditions initiales et le champ d'excitation. De plus, il est possible de travailler sur des systèmes complexes qui combinent plusieurs domaines de la physique comme l'optique et la microfluidique ce qui pourra éventuellement nous servir plus tard dans la modélisation des milieux complexes.

En particulier, le module d'optique ondulatoire (Wave Optics) répond entièrement aux besoins de notre projet. Il permet de calculer les champs électrique et magnétique et d'étudier leur distribution à l'intérieur de la structure conçue. Plus précisément, dans l'option « frequency domain » du module Wave Optics, l'équation d'onde peut être représentée sous la forme suivante en supposant que la conductivité électrique $\sigma = 0$ et la perméabilité relative $\mu_r = 1$:

$$\nabla \times (\nabla \times E) - k_0^2 \epsilon_r E = 0 \quad (5)$$

Avec le champ électrique :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}) \quad (6)$$

Où $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ est le nombre d'onde et $\epsilon_r = (n - ik)^2$ la permittivité relative avec n et k les parties réelle et imaginaire de l'indice optique. Le nombre d'onde est calculé à partir des conditions d'excitation définies par l'utilisateur, tandis que la permittivité relative est tirée du matériau

sélectionné. Le programme résout l'équation d'onde pour le champ électrique à chaque élément fini, qui est ensuite utilisée pour construire la distribution du champ et réaliser les calculs des transmittance et réflectance. La réflectance ainsi calculée sera utilisée pour optimiser les performances du capteur simulé.

Afin de simplifier la modélisation nous avons commencé par un modèle 2D d'une seule fibre (Fig.28). Le modèle représente une partie du cœur de la fibre optique avec une largeur W , une épaisseur d_1 et un indice optique n_1 . Deux couches sont déposées sur la fibre : la première couche sert de miroir semi-réfléchissant d'épaisseur h et d'indice optique n_r , la seconde, d'épaisseur d_2 et d'indice optique n_2 forme la cavité. L'interface entre la cavité et le milieu de détection d'épaisseur d_3 et d'indice optique n_3 forme la deuxième interface réfléchissante. Il est possible d'ajouter une « couche biologique », (épaisseur d_4 , indice optique n_4) simulant la présence de matière biologique entre la cavité et le milieu de détection. L'excitation utilisée dans ce modèle consiste en une onde plane progressive monochromatique transverse électrique (TE) polarisée rectilignement suivant z et se propageant selon la direction y .

L'analyse des dispositifs existant tels que celui développé par ForteBio¹²⁰ ou certaines simulations réalisées dans la littérature sur des fibres associées à des cavités Fabry-Pérot¹²⁷ nous ont permis de déterminer un point de départ pour choisir les paramètres de nos simulations.

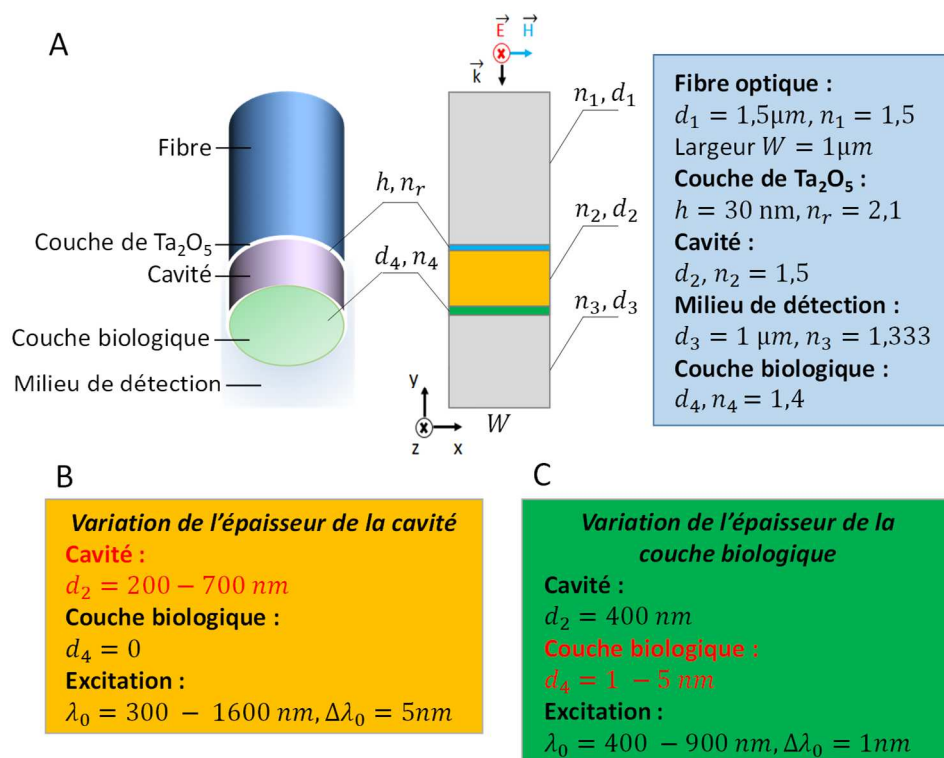


Figure 28 – Présentation du modèle et de ses paramètres. A) Représentation schématique de la fibre simulée (vision 3D et 2D), des différentes couches interférentielles et des paramètres associés (épaisseurs, indices optiques). Paramètres utilisés pour simuler des variations de l'épaisseur de la cavité (B) et de la couche biologique (C).

IV.4.3.a.i. Variation de l'épaisseur de la cavité – résultats préliminaires

Nous avons commencé par tester l'effet de l'épaisseur de la cavité sur la réponse du système. Pour cela, nous avons fait varier l'épaisseur d_2 entre 200 et 700 nm tout en conservant fixes les autres paramètres du modèle. Les valeurs de l'indice optique n_h et de l'épaisseur h de la couche semi-réfléchissante étaient de 2,1 et 30 nm, respectivement. L'indice optique du milieu de détection n_3 a été défini comme étant de 1,333, ce qui correspond à l'indice de l'eau. Aucune couche biologique n'a été considérée dans cette première simulation. La configuration globale du modèle est donnée dans la figure 28B. Nous avons calculé la réflectance pour différentes valeurs de longueurs d'onde d'excitation comprises entre 300 et 1600 nm (Fig.29).

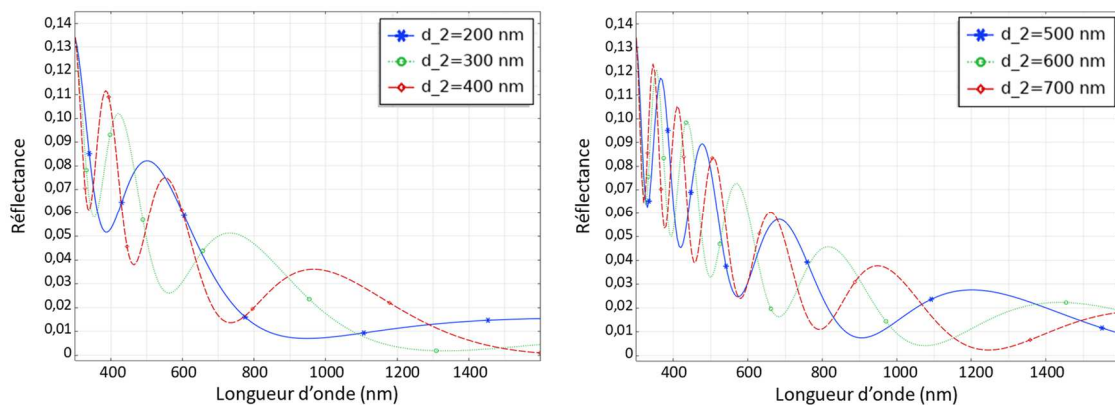


Figure 29 - Réflectance en fonction de la longueur d'onde. Gauche – Réponses pour des épaisseurs de cavité entre 200 et 400 nm. Droite - Réponses pour des épaisseurs de cavité entre 500 et 700 nm.

À mesure que l'épaisseur de la cavité augmente, on observe de plus en plus de franges d'interférence qui deviennent de plus en plus étroites. Pour une épaisseur de cavité de 200 nm (courbe bleue à gauche dans la figure 29), on observe un seul pic autour de 500 nm suivi par un minimum relativement plat aux environs de 950 nm. Lorsque la cavité atteint 300 nm (courbe verte à gauche dans la figure 29), le premier maximum est atteint pour 730 nm et est suivi d'un minimum à 1330 nm. Ce décalage s'accompagne d'une diminution de la réflectance. Ceci s'observe de manière générale (Fig.29) : lorsque l'épaisseur augmente, les premiers pics se déplacent vers les grandes longueurs d'onde et la réflectance diminue. Comme nous souhaitons par la suite effectuer une interrogation d'intensité, à une longueur d'onde fixée où le changement de réflectance est maximal, le choix de l'épaisseur de la cavité est très important. Il faut donc choisir une épaisseur qui donne une importante variation de réflectance sur une plage linéaire suffisamment grande. Nous sommes également contraints par la gamme de longueurs d'onde adaptée au bon fonctionnement de la fibre et des éléments optiques constituant le dispositif qui sera utilisé pour la caractérisation optique du biocapteur. Nous estimons que cette gamme se situe entre 400 et 880 nm. Il faut donc choisir dans cette plage de fonctionnement une épaisseur qui donnera un pic de réflectance exploitable : plus ce dernier sera étroit, plus la sensibilité sera importante. Cependant, s'il est trop étroit, une légère erreur sur l'épaisseur pourrait conduire à un décalage en dehors du pic. A l'heure actuelle, nous ne savons pas quelle sera la précision sur l'épaisseur de la couche déposée. De plus les étapes

ultérieures de fonctionnalisation et de reconnaissance viendront modifier cette épaisseur optique ce qui entrainera un décalage de ce pic. Si le pic est trop étroit, le décalage risque de nous faire « sortir » de la réponse linéaire... Il faut donc faire un compromis entre finesse du pic et sensibilité. Nous estimons que pour la gamme de longueurs d'onde envisagée, une épaisseur entre 300 et 600 nm devrait convenir.

IV.4.3.a.ii. Optimisation de la sensibilité – résultats préliminaires

Pour analyser de manière plus exhaustive la réponse du système nous avons testé sa réponse suite à l'adhésion d'une biocouche et mesuré sa sensibilité. Pour cela, une couche biologique a été simulée sous la forme d'une fine couche homogène déposée en bout de cavité. Nous avons fait varier l'épaisseur de la couche biologique entre 1 et 5 nm et lui avons attribué un indice optique de 1,4¹²⁸. Les paramètres utilisés dans ce modèle sont représentés sur la figure 28C. La plage de longueurs d'onde a été réduite entre 400 et 900 nm. La figure 30A représente le spectre de la réflectance obtenue pour différentes épaisseurs de la biocouche.

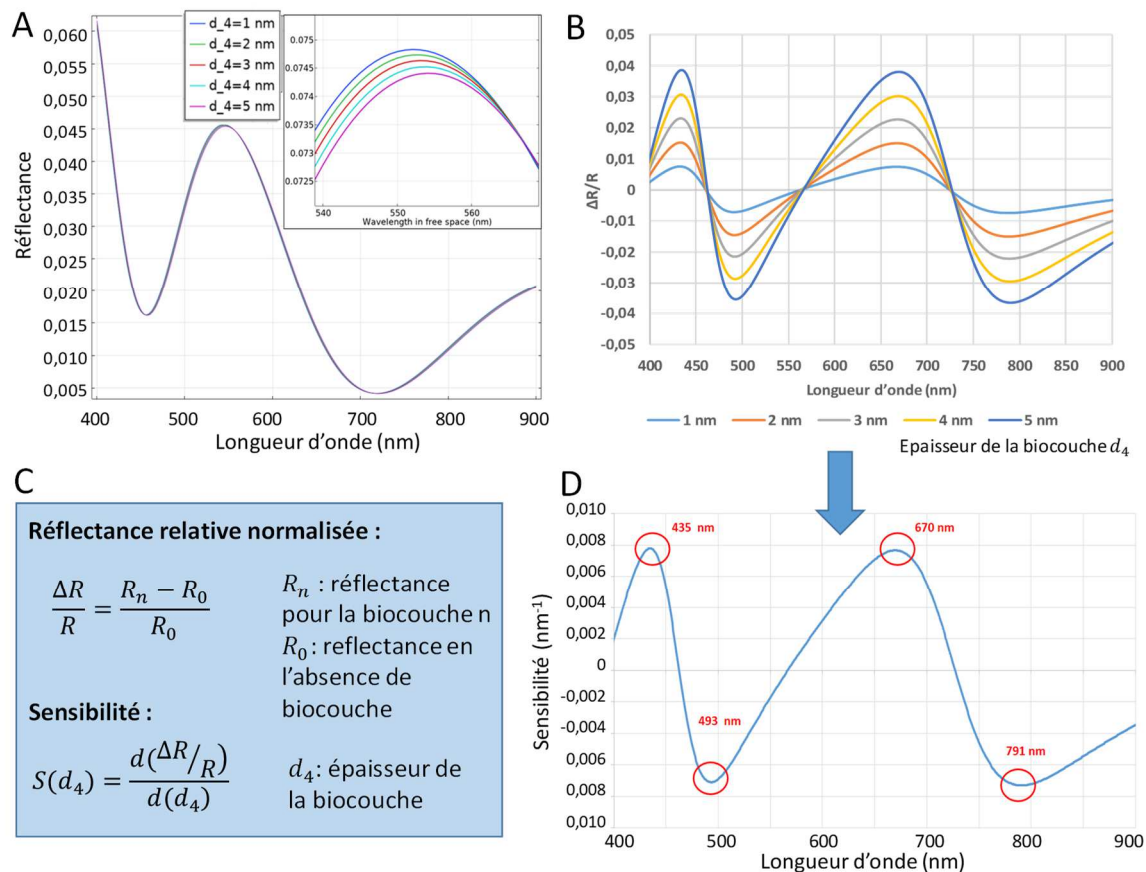


Figure 30 - Représentation des différents résultats menant à l'estimation de la sensibilité du dispositif simulé en présence d'une biocouche. A) Représentation du spectre de la réflectance en fonction de l'épaisseur de la biocouche. B) Représentation de l'intensité relative normalisée pour différentes épaisseurs de biocouche en fonction de la longueur d'onde. C) Estimation de la sensibilité en fonction de la longueur d'onde.

On constate que plus l'épaisseur augmente, plus la réflectance diminue et se décale vers les grandes longueurs d'onde (encart en haut à droite de la figure 30A). Afin de mieux appréhender la variation du signal, nous avons calculé la réflectance relative normalisée pour chaque épaisseur de couche biologique en fonction de la longueur d'onde en suivant la formule :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_n - R_0}{R_0}$$

Où R_n est la réflectance en présence de la biocouche tandis que R_0 représente la réflectance en l'absence de couche biologique. Le résultat $\frac{\Delta R}{R}$ en fonction de λ apparaît sur la figure 30B. On constate que plus la couche biologique est épaisse, plus la variation de la réflectance relative normalisée est importante. Cependant cette variation dépend fortement de la longueur d'onde : alors qu'elle atteint des extrema pour certaines longueurs d'onde, elle est nulle pour d'autres.

La dernière étape a consisté à estimer la sensibilité en calculant la dérivée de $\frac{\Delta R}{R}$ par rapport à l'épaisseur de la biocouche d_4 pour toute la gamme des longueurs d'onde simulées :

$$S(d_4) = \frac{d(\Delta R/R)}{d(d_4)}$$

La sensibilité calculée est représentée sur la figure 30D en fonction de la longueur d'onde, pour une épaisseur de cavité de 400 nm et une épaisseur de couche réfléchissante de 30 nm. Ce type de représentation donne des informations sur les longueurs d'onde d'excitation qui offrent la plus grande sensibilité. Dans ce cas particulier, la biodétection à 435, 493, 670 et 791 nm permet d'atteindre une sensibilité d'environ $0,0075 \text{ nm}^{-1}$.

La procédure de calcul de la sensibilité décrite ci-dessus a été effectuée pour une gamme d'épaisseurs de couches réfléchissantes h comprise entre 5 et 30 nm. Les courbes obtenues sont similaires, les longueurs d'onde donnant les maxima de sensibilité sont légèrement différentes mais surtout on constate que ces maxima augmentent en intensité lorsque l'épaisseur de la couche semi-réfléchissante diminue. Les sensibilités les plus grandes s'obtiennent pour des épaisseurs inférieures à 15 nm. Cependant, une diminution de l'épaisseur de la couche semi-réfléchissante entraîne également une diminution du signal rétro-réfléchi (cela a été confirmé par les simulations). Si ce dernier est trop faible, il risque d'être difficilement exploitable (problème de bruit, diffusion de la lumière par la source, à l'entrée de la fibre). Là encore, il s'agira de trouver un compromis entre sensibilité et quantité de signal récolté !

Néanmoins, l'ensemble de ces résultats nous aideront à sélectionner des longueurs d'onde de travail pertinentes ainsi que les points de départ des épaisseurs de la cavité et de la couche semi-réfléchissante.

IV.4.3.b. Conception des biocapteurs : dépôt de couches interférentielles

Une fois les premières simulations réalisées, la couche semi-réfléchissante ainsi que la cavité devront être formées sur l'extrémité clivée d'un réseau de fibre optique afin de concevoir expérimentalement le biocapteur simulé. Pour cela un dépôt de couche(s) mince(s) sera mis en œuvre et nous essaierons de nous approcher au maximum des paramètres simulés. Cela va nécessiter de choisir des méthodes de dépôt appropriées capables d'effectuer des dépôts denses et homogènes des matériaux choisis avec un contrôle précis de l'épaisseur des couches. La principale difficulté est que les méthodes conventionnelles de dépôt de couches minces sont généralement adaptées aux substrats plats tels que les plaques de silicium et loin d'être compatibles avec des fibres optiques. Il faudra donc adapter les méthodes disponibles en tenant compte de nos contraintes : à savoir, des contraintes de température (les fibres, et surtout leurs revêtements, ne peuvent supporter qu'une certaine plage de températures) et des contraintes géométriques liées à la taille de la chambre de fabrication (les fibres ne pouvant être excessivement courbées).

Concernant les matériaux utilisés pour la couche semi-réfléchissante et la cavité, nous sommes partis des contraintes suivantes : le matériau de la couche réfléchissante ne doit pas absorber fortement la lumière tout en possédant un indice de réfraction suffisamment élevé pour diviser efficacement la lumière guidée en deux faisceaux qui participeront plus tard au phénomène d'interférence ; par ailleurs, le matériau constituant la cavité optique doit être transparent pour permettre la propagation de la lumière vers le milieu de détection. Tous ces matériaux doivent être compatibles entre eux et avec les moyens de fabrication conventionnels disponibles. Nous avons commencé les simulations avec de l'oxyde de tantale (Ta_2O_5) pour la couche semi-réfléchissante et de la silice (SiO_2) pour la cavité. Sur la base de l'étude de la littérature et des matériaux disponibles à la PTA⁸⁸ ainsi qu'au DTBS (Département Technologies pour la Biologie et la Santé) du CEA de Grenoble, laboratoires où la fabrication du dispositif pourrait être planifiée, nous avons dressé une liste de candidats potentiels qui pourraient également être utilisés et devront être testés par simulation (tableau 1).

Couche semi-réfléchissante	Cavité
Diélectriques : HfO_2 , TiN, Al_2O_3 ¹²⁰ , TiO_2 ¹²⁰	Parylène C
Métaux : Cr, Pt, Al	Résine photosensible SU-8 ¹²⁹

Tableau 1 - Liste des candidats possibles pour la fabrication

Nous envisageons éventuellement pour ces dépôts de faire appel à des sociétés telles que HEF Durferrit¹³⁰ spécialiste dans le développement de nouvelles méthodes de dépôts adaptées à des substrats issus de la recherche. Nous commencerons par réaliser les dépôts de couches minces en testant plusieurs conditions (3 épaisseurs de couche semi-réfléchissante (entre 10 et 30 nm), 3 épaisseurs de cavité (entre 300 et 600 nm) et éventuellement plusieurs matériaux.

Concernant le substrat de départ, nous commencerons par faire des essais sur des monofibres dans un premier temps. Ensuite, nous serons amenés à concevoir des assemblages multifibres composés de quelques dizaines à quelques centaines de fibres. Pour cela nous nous

rapprocherons de sociétés spécialistes dans la conception de réseaux de fibres telles que PERFOS¹³¹ ou PLC Connection¹³².

IV.4.3.c. Caractérisation optique : caractérisation des sensibilité, résolution et limite de détection aux variations d'indice optique

Les dispositifs interférométriques établis seront qualifiés *in vitro* à différentes longueurs d'onde. En particulier, leur sensibilité aux variations d'indice optique ainsi que leur résolution seront évaluées à l'aide d'un montage optique permettant d'imager la face non structurée et de mesurer l'intensité de la lumière rétro-réfléchi. Cette étape de caractérisation optique fournira des résultats expérimentaux qui seront comparés avec le modèle. En fonction de la corrélation observée entre les résultats simulés et expérimentaux, le modèle sera affiné afin de correspondre autant que possible à l'observation expérimentale. Ce processus itératif entre la modélisation, la fabrication et l'étape de caractérisation optique nous aidera à mieux comprendre les phénomènes physiques qui se produisent. Ces tests qualifieront l'efficacité de la fibre et aideront à préciser les paramètres optiques et géométriques nécessaires pour atteindre la meilleure résolution.

IV.4.3.d. Multi-Fonctionnalisation de surface

Dès qu'une résolution compatible avec la détection biologique aura été atteinte, la surface du capteur devra être fonctionnalisée avec des sondes biologiques. Cette étape nécessitera de relever plusieurs défis. Tout d'abord, nous devons mettre en œuvre une chimie de surface compatible avec les surfaces de silice : un procédé de silanisation sera utilisé¹³³ (Fig.31). Ce procédé consiste à recouvrir la surface de verre avec un réactif contenant des groupes silanes et amines. Une fois la surface silanisée, il est possible de greffer tous types de sondes biologiques par l'intermédiaire d'un agent de réticulation. La figure 31 illustre une procédure mise en œuvre et optimisée au laboratoire. Une lame de verre, fraîchement nettoyée et activée par traitement plasma (75% O₂ et 25% Ar à 80% de la puissance (Femto 4)¹³⁴ pendant 3 minutes) est soumise à une procédure de silanisation au cours de laquelle elle est exposée à du 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES) pendant 5h à température ambiante. Les groupes amines apparus à la surface du substrat de verre après l'étape de silanisation sont ensuite mis en contact avec l'ester N- γ -maléimidobutyryl-oxysulfosuccinimide (Sulfo-GMBS), un agent de réticulation NHS-Maléimide. Le groupe ester activé de l'agent de réticulation réagit avec les groupes amines, rendant le groupe réactif maléimide disponible pour le couplage ultérieur avec toute molécule contenant un thiol. L'avantage d'une telle approche est que toutes les biomolécules thiolées testées sur des surfaces d'or peuvent être utilisées pour des substrats en verre sans aucune modification.

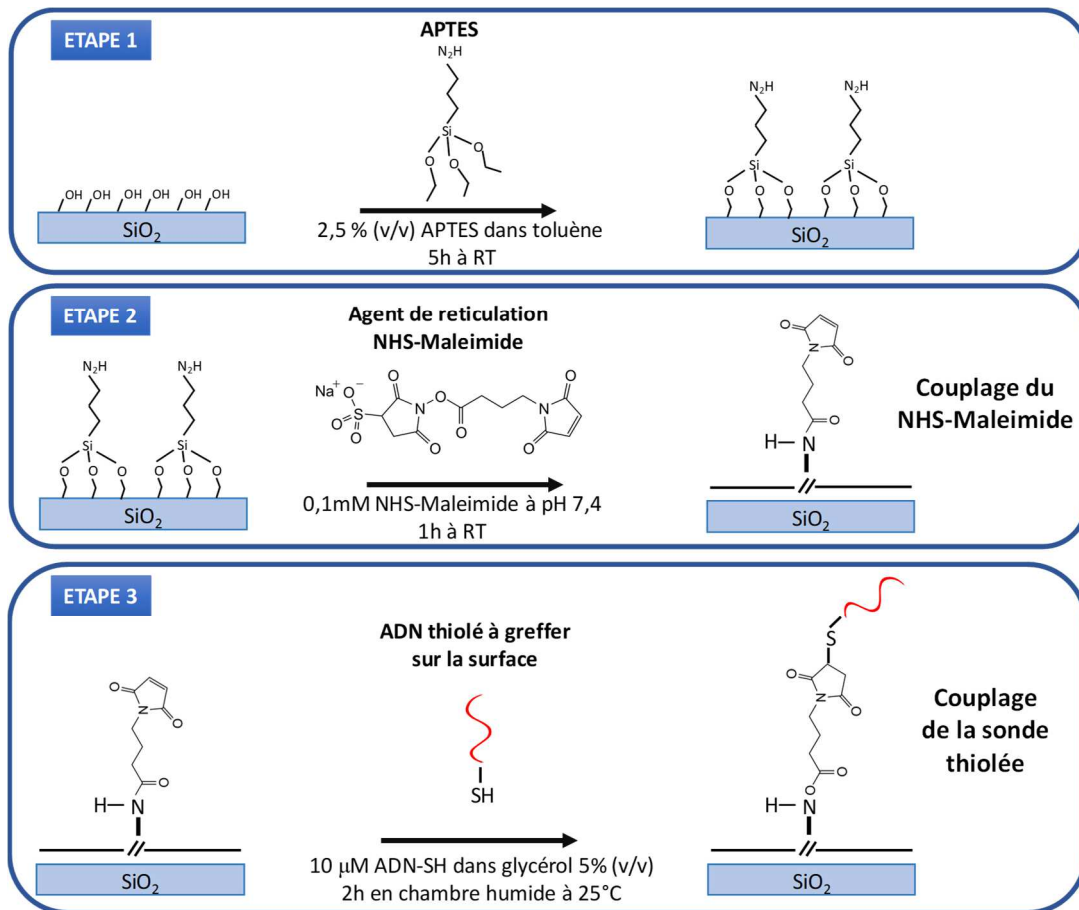


Figure 31 – Stratégie de fonctionnalisation d’une surface en verre (SiO₂) par silanisation

Plusieurs zones de l’assemblage multifibre seront fonctionnalisées avec différentes sondes (au moins trois pour les contrôles positifs/négatifs et la sonde correspondante). Nous commencerons par des systèmes de bio-reconnaissance sondes/cibles modèles (ADN, anticorps) pour lesquelles des contrôles fluorescents pourront également être réalisés. Cette stratégie permet de gérer de façon indépendante l’efficacité de la fonctionnalisation de surface et la réponse optique des fibres à une molécule cible donnée. Réaliser une fonctionnalisation multiple sur un capteur de quelques centaines de μm de diamètre va demander de faire appel à des méthodes de dépôts non conventionnelles permettant un dépôt très précis d’un réseau de sondes sur le même biocapteur ayant une surface minuscule. Pour cela, les micro-levers en polymère^{105,106}, qui ont permis la multidétection sur les assemblages plasmoniques, pourront être utilisés pour réaliser les dépôts. Il sera également intéressant d’envisager l’impression de sondes par microcontact, technique de lithographie douce potentiellement adaptable aux fibres optiques. Des méthodes optiques de fonctionnalisation photo-assistées développées au CREAB pourront également être envisagées. Le montage optique est en cours d’adaptation pour permettre des essais de chauffage laser⁸⁹ ou d’illumination UV¹³⁵ sur seulement quelques fibres. Ces désorptions pourraient mettre à nu la surface (préalablement protégée) sur seulement quelques zones et permettre de les fonctionnaliser successivement à l’aide de molécules thiolées par exemple.

Des premiers essais de silanisation sur lame de verre ont été menés au laboratoire selon le protocole présenté dans la figure 31. En particulier, nous avons greffé des ADN thiolés sur une lame de verre et révélé leur présence par fluorescence à l'aide d'un ADN complémentaire biotinylé couplé à la SAPE (Figure 32A, B et C). De tout premiers essais de fonctionnalisation sur fibre silanisée viennent d'être réalisés mais vont nécessiter de nombreux ajustements du protocole avant de s'avérer concluants (Figure 32D).

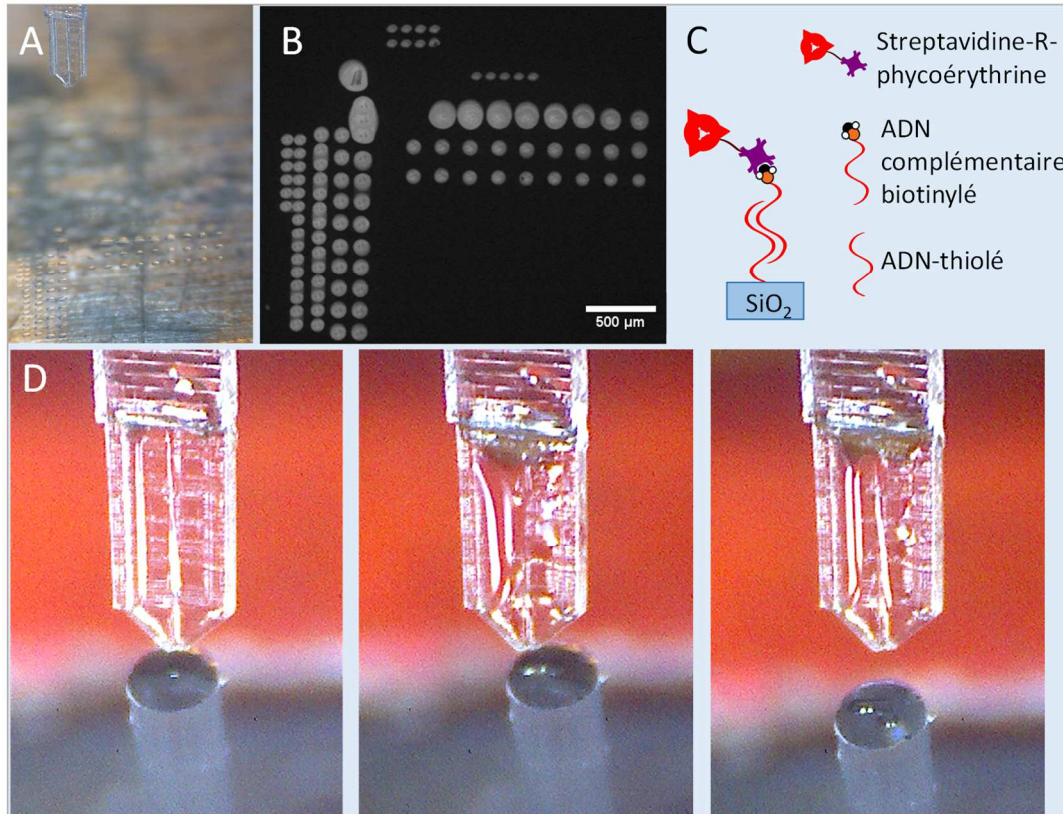


Figure 32 – Résultats préliminaires obtenus dans le cadre de la fonctionnalisation par silanisation.

A) Formation de gouttes de sondes thiolées sur une lame de verre silanisée. B) Révélation de l'ADN greffé par fluorescence selon la stratégie représentée schématiquement en C). D) Essais préliminaires de dépôts de gouttes d'ADN thiolé sur un assemblage multifibre silanisé.

IV.4.3.e. Détection de cibles biologiques : évaluation des limites de détection

Une fois que la stratégie de fonctionnalisation aura été optimisée, les limites de détection des cibles biologiques seront évaluées. Le test de sensibilité *in vitro* sera réalisé par immersion de l'extrémité fonctionnalisée de la multifibre dans des solutions tampons contenant différentes concentrations d'une cible donnée. Le milieu de détection sera enrichi progressivement jusqu'à la réalisation de détections dans des échantillons complexes réels (salive, sérum, sang). Ces détections se feront dans un premier temps sur des couples sonde/cible d'ADN, molécule bien plus robuste et facile à manipuler que les protéines. Ensuite, j'utiliserai des couples de protéines modèles. Je commencerai par réaliser la détection de l'ovalbumine par un anticorps anti-ovalbumine (ou l'inverse) ou celle de l'interaction streptavidine-biotine. Ce dernier modèle d'interaction, très classique en biologie, présente l'avantage de pouvoir être couplé facilement à de la fluorescence. Je pourrais également greffer de l'immunoglobuline de type G (IgG) de lapin et détecter l'anticorps anti-IgG de lapin avec comme contrôle négatif, une zone

fonctionnalisée avec de l'IgG de souris tel que ce qui a été fait sur les assemblages plasmoniques.

IV.4.3.f. Analyse en milieu complexe : vers un contexte biologique pertinent et des applications médicales concrètes

Une fois l'outil validé sur des cibles protéiques classiques, il faudra le mettre en œuvre dans un contexte biologique plus intéressant. L'inflammation constitue un modèle d'étude *in vivo* pertinent puisque cette réaction immunitaire induit la sécrétion de nombreuses molécules solubles susceptibles d'être détectées¹³⁶.

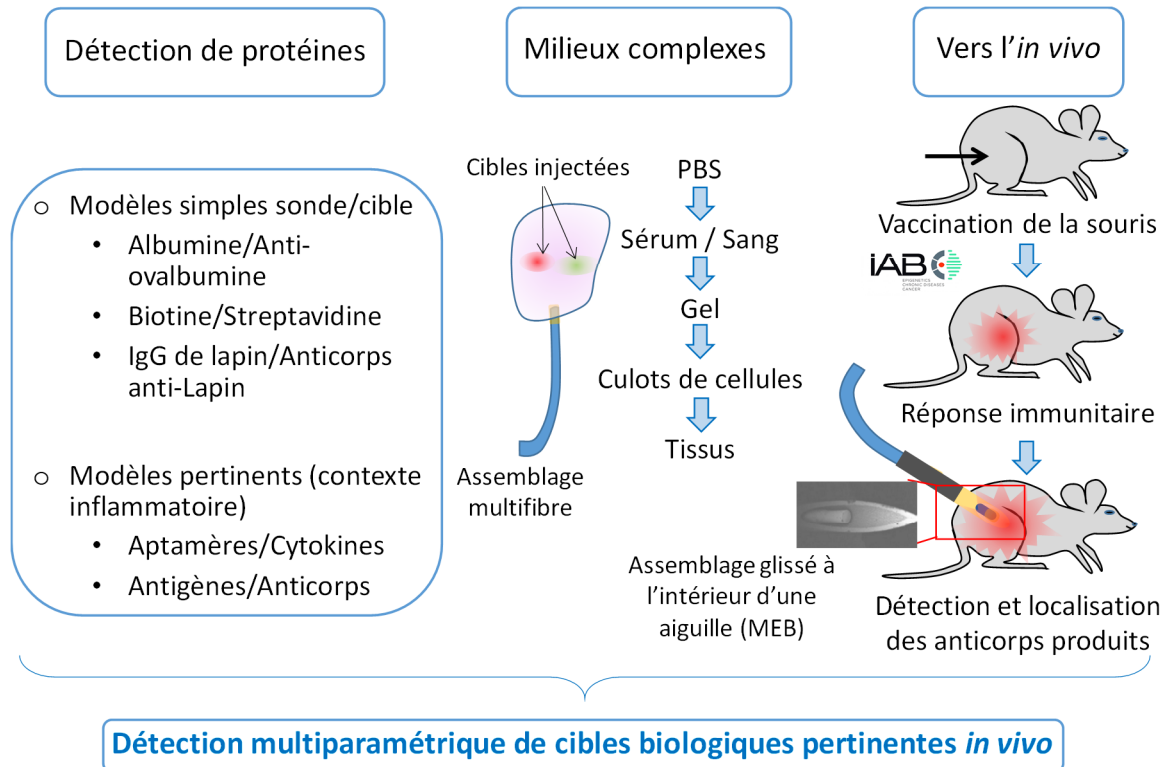
Les molécules ciblées pourront être des cytokines (IL-1 et IL-6 en premier choix, ensuite d'autres molécules comme TNF α , IFN β , TGF γ ou la protéine C-réactive). Ces molécules sont abondamment produites lors de l'inflammation et de nombreux anticorps performants existent pour les détecter. Il existe également des aptamères capables de détecter certaines cytokines. Les aptamères sont de petites séquences d'ADN qui se replient sur elles-mêmes créant un site de reconnaissance spécifique. Plus robuste que les anticorps, ces sondes pourraient s'avérer intéressantes d'autant plus que le CREAB dispose de l'expertise nécessaire pour les mettre en œuvre.

Après avoir établi la sensibilité de détection des cibles en solution dans du PBS, j'évaluerai l'efficacité de détection de chaque cible dans du sérum afin de confronter l'outil à un milieu biologique complet. Ensuite, j'effectuerai la détection simultanée de plusieurs cytokines. Je passerai après à la détection dans des tissus artificiels (Fig.33). J'utiliserai pour cela des lignées cellulaires en culture connues pour sécréter les molécules à détecter (des monocytes/macrophages comme J774 et Raw264, les lymphocytes T EL-4 et les lymphocytes B A20). Les cellules seront culotées par centrifugation afin de mimer des tissus. Elles pourront également être cultivées en 3D dans des gels d'acide hyaluronique. Pour faciliter sa pénétration dans les tissus, la multifibre sera introduite dans un cathéter ou une aiguille (Fig.33). Les cellules seront activées (ou non) par du LipoPolySaccharide (LPS), des ligands des Toll like receptors (TLR) ou des activateurs de lymphocytes (anti-CD40, anti-CD3, etc.) en fonction des cytokines à détecter. Dans une étape ultérieure, la combinaison de plusieurs types cellulaires sera utilisée afin de mimer des tissus immunitaires. Dans ce cas, chaque type cellulaire sera identifié par l'expression de protéines fluorescentes après transfections de « Green » ou « Yellow Fluorescent Protein » (GFP, YFP) ce qui permettra une localisation précise des différents types cellulaires au sein de la matrice et le guidage de la fibre optique. La capacité de la fibre à détecter des zones marquées sera alors démontrée. Des tests similaires seront également réalisés sur des organes tels que le foie ou les muscles *ex vivo*.

Enfin, les cytokines seront détectées dans des échantillons de sang de souris après injection de LPS dans le péritoine. Ceci induit une forte inflammation. Toutes ces mesures seront réalisées parallèlement à des techniques classiques (ELISA par exemple). Ce travail fournira une validation de la plateforme d'analyse multiplexée permettant la mesure de plusieurs cytokines dans le sang, milieu biologique de référence.

L'expérimentation *in vivo* sera finalement réalisée en modèle murin (Fig.33). L'inflammation sera induite par l'injection de LPS (ou de ligands TLR). Chez la souris, l'injection de ces molécules dans une patte arrière provoque, en quelques heures, une forte

inflammation locale caractérisée par l'activation de cellules immunitaires des ganglions lymphatiques. Ce modèle, bien établi, sera utilisé pour détecter les molécules cibles sur le site de l'inflammation (patte), dans le ganglion (genou) et dans l'espace intermédiaire (jambe). Il permettra l'adaptation de la plateforme d'analyse multiplexée à des conditions *in vivo*.



Détection multiparamétrique de cibles biologiques pertinentes *in vivo*

Figure 33 – Stratégies développées dans le cadre du projet de recherche. De gauche à droite : présentation des différents modèles biologiques envisagés ; illustration de la détection de cibles biologiques dans des tissus artificiels et augmentation progressive de la complexité du milieu de détection ; illustration des différentes étapes de validation de la preuve de concept *in vivo* en modèle murin dans le contexte inflammatoire.

Dans l'hypothèse où les cytokines se révéleraient difficiles à détecter (car ce sont de petites molécules, de 8 à 50kD), nous pourrions recentrer nos efforts sur la détection d'anticorps en immobilisant les antigènes adéquats sur les fibres optiques. Le capteur pourrait alors être utilisé pour témoigner de l'activation du système immunitaire adaptatif et révéler une pathologie. Dans l'hypothèse où seules des cibles de tailles importantes pourraient être détectées, nous pourrions envisager la détection de bactéries et nous orienter vers la détection de pathogènes dans les dispositifs médicaux confinés tels que les drains, cathéter, sondes, etc. La partie *in vivo* de ce projet sera menée en collaboration l'IAB (Institute for Advanced Biosciences) de Grenoble qui fournira son expertise dans l'expérimentation animale. Une fois les essais en souris réalisés (durée estimée pour y arriver : 2 ans), la technique développée aura atteint la maturité nécessaire pour envisager des études sur l'Homme. Cela nécessitera alors d'impliquer des médecins et de réaliser des essais cliniques pour valider l'approche dans des applications médicales. J'ai participé au lancement de l'Institut de Technologie pour la Santé de Grenoble (ITSG) le 24 septembre 2020 et constaté un réel intérêt pour l'outil proposé ; j'espère entamer prochainement des collaborations avec des médecins et biologistes de ce

nouvel institut afin de pouvoir dans les années à venir proposer un dispositif utilisable sur le terrain. Pour cela, je prévois également de me rapprocher des équipes médicales de Clinatex (Cécile Moro, Madjid Hihi) et du Centre Léon Bérard de Lyon (Jean-Yves Blé) par l'intermédiaire de Pascal Mailley membre de l'ITSG et du comité de suivi de thèse d'Oleksii.

IV.4.4. Faisabilité du projet et conclusion

Mes travaux préalables sur les fibres optiques plasmoniques m'ont permis d'acquérir de solides compétences dans la conception, la caractérisation et l'optimisation de biocapteurs sur fibre. Cette expérience pourra largement être mise à profit pour ce nouveau projet de conception d'un capteur interférométrique multiplexé. Le banc expérimental nécessaire à la caractérisation des fibres et à leur fonctionnalisation est déjà en place et fonctionnel. Par ailleurs, le groupe CREAB dispose d'une grande expertise dans la détection de cibles biologiques. Même si l'interférométrie représente une nouvelle approche pour l'équipe, toutes les méthodes de biochimie utilisées couramment au laboratoire pourront être adaptées au projet. En particulier, les méthodes de fonctionnalisation de surface ainsi que la connaissance des systèmes sonde/cible modèles seront particulièrement utiles.

S'appuyant sur ces compétences multidisciplinaires, ce projet ouvrira de nouvelles perspectives qui aboutiront à la création d'un outil innovant capable d'assurer une détection moléculaire à la fois :

- ***In situ*** grâce au micro-réseau de sondes construit sur l'extrémité d'un assemblage de fibres optiques permettant une détection à distance,
- **En temps réel et sans marquage** via la mesure de l'intensité de la lumière rétro-réfléchi,
- **Multiplexée** grâce à l'utilisation d'un assemblage de fibres optiques fonctionnalisées sur plusieurs zones indépendantes,
- **Compatible avec l'analyse d'échantillons complexes** car reposant sur des phénomènes de surface et de ce fait insensible à l'ensemble de l'échantillon complexe.

Des discussions avec des professionnels de santé sont prévues, en lien avec les expériences passées de l'équipe, afin d'intégrer de façon appropriée les innovations qui découleront de la mise en œuvre de ce projet dans des applications médicales pertinentes.

Enfin, ce projet se place à l'avant-garde dans les domaines de la micro-structuration, de la micro-fonctionnalisation et de l'interférométrie sur fibres dédiées à des applications biologiques. Au-delà du fait que l'outil développé apportera des progrès significatifs dans le domaine de la santé, nous pouvons espérer également des avancées importantes dans les domaines des nano- et micro-technologies, de l'optique, de la chimie de surface et en biochimie.

IV.5. Etude du phénomène d'interaction entre modes optiques et plasmons de surface

IV.5.1. Introduction

Mes travaux sur les fibres optiques plasmoniques m'ont également amenée à découvrir un phénomène intéressant. En regardant de plus près à l'intérieur d'un cœur de fibre individuelle, nous avons constaté qu'une modification de l'indice optique à proximité de la zone active

n'affecte pas seulement la valeur de l'intensité lumineuse rétro-réfléchi, mais également sa distribution spatiale (Fig.34).

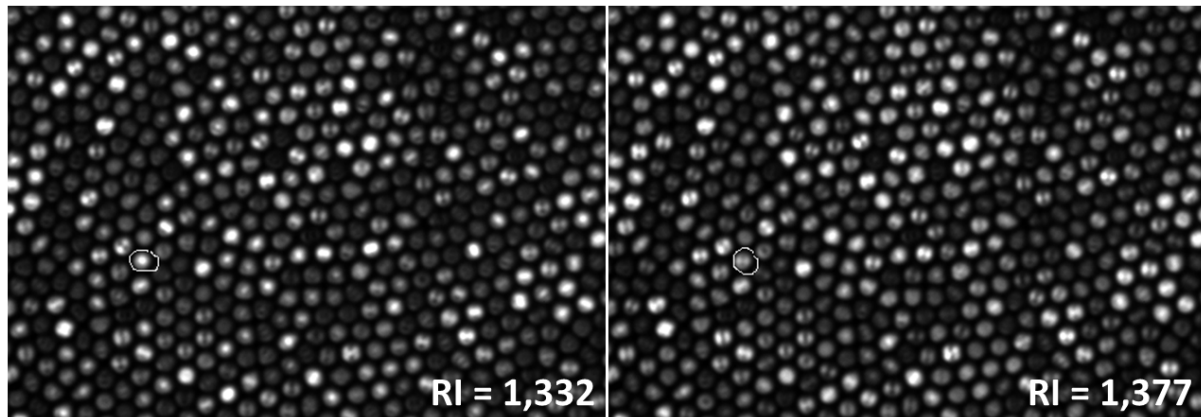


Figure 34 – Vu d’ensemble de la distribution spatiale de l’intensité rétro-réfléchi par plusieurs cœurs de l’assemblage multifibre pour deux valeurs d’indice optique. Un cœur dans lequel la distribution spatiale d’intensité a particulièrement évolué entre les deux indices est entouré.

La modification de la distribution spatiale de l'intensité lumineuse est principalement due aux différentes interactions entre les modes optiques, qui se propagent dans la fibre et les plasmons générés. Chaque mode optique peut interagir différemment : certains verront leur intensité augmenter ou diminuer et d'autres ne seront pas influencés par les plasmons de surface. En général, lorsque plusieurs modes peuvent se propager dans une fibre, tous ces différents comportements n'ont, en moyenne, qu'un faible effet sur la distribution de l'intensité lumineuse. La difficulté d'observer cet effet explique pourquoi, même si les modes optiques sont bien connus et exploités de diverses manières¹³⁷⁻¹⁴¹, la perturbation différentielle de ces modes par les plasmons n'a jamais été utilisée comme méthode de transduction pour sonder les interactions moléculaires à travers les variations d'indice optique.

Pour observer une modification significative de la distribution spatiale de l'intensité lumineuse suite à un changement d'indice optique à proximité de la zone active, plusieurs conditions doivent être remplies. Tout d'abord, la fibre optique ne doit tolérer que quelques modes (2 à 10) avec des profils d'intensité aussi différents que possible. Deuxièmement, l'ouverture numérique doit être grande ($NA > 0,2$ par exemple) afin d'avoir des modes avec des indices effectifs suffisamment différents pour qu'ils se comportent différemment. Enfin, la géométrie de la zone active doit favoriser différentes interactions mode/plasmon. Ces conditions peuvent être créées dans des fibres optiques avec de petits cœurs (généralement, moins de $5 \mu\text{m}$ de diamètre). Mais ces cœurs de petites dimensions nécessitent des dispositifs d'imagerie offrant une résolution suffisante. Par chance, il s'est trouvé que les fibres optiques individuelles de nos assemblages remplissaient ces conditions ! Avec leurs cœurs de faible dimension et une grande ouverture numérique, égale à $0,41$ (l'indice de réfraction du cœur et de la gaine étant de $1,497$ et $1,438$, respectivement), nos assemblages nous ont permis d'observer ce phénomène. Les faisceaux de fibres sur lesquels nous avons constaté et étudié cet effet étaient constitués de micropiliers ayant les caractéristiques suivantes : un diamètre de base de $3,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$, un demi-angle au sommet égal à $5 \pm 1^\circ$, un plateau supérieur de diamètre $1,2 \mu\text{m}$. Les faces latérales des micropiliers étaient recouvertes de 50 nm d'or (correspondant

à 570 nm sur le plateau) et la longueur d'onde utilisée pour la caractérisation optique égale à 590 nm. Comme cela peut être visualisé sur la figure 34 ou le film associé¹⁴², le phénomène a été mis en évidence sur la plupart des fibres individuelles de cet assemblage. Néanmoins, pour plus de clarté, nous avons choisi de nous concentrer sur la réponse et la sensibilité d'une seule fibre individuelle.

IV.5.2. Effet des modifications de l'indice optique sur la distribution spatiale de l'intensité

La réponse de la fibre aux changements d'indice optique a été étudiée en immergeant la face gravée et dorée dans des solutions de glycérol dont l'indice optique connu varie entre 1,332 et 1,455. Pour chaque indice optique, 20 images ont été acquises avec le système optique précédemment décrit. L'intensité rétro-réfléchie $I(n)$ a été mesurée à chaque indice optique n . L'intensité rétro-réfléchie normalisée $i(n)$ est définie comme suit : $i(n) = \frac{I(n)}{I_{ref}}$ où $I_{ref} = I_{H_2O}$ représente l'intensité rétro-réfléchie dans l'eau pure. La sensibilité $S = \frac{\Delta i}{\Delta n}$ a été mesurée ainsi que la résolution : $n_{res} = \frac{3\sigma}{S}$, σ correspondant à l'écart-type relatif entre les niveaux de gris des 20 images enregistrées pour chaque indice optique.

L'intensité rétro-réfléchie collectée par le cœur de la fibre optique et sa distribution spatiale sont présentées sur la figure 35 pour 17 valeurs d'indices optiques. Le film correspondant représentant l'évolution du profil d'intensité 3D est également disponible ici¹⁴³.

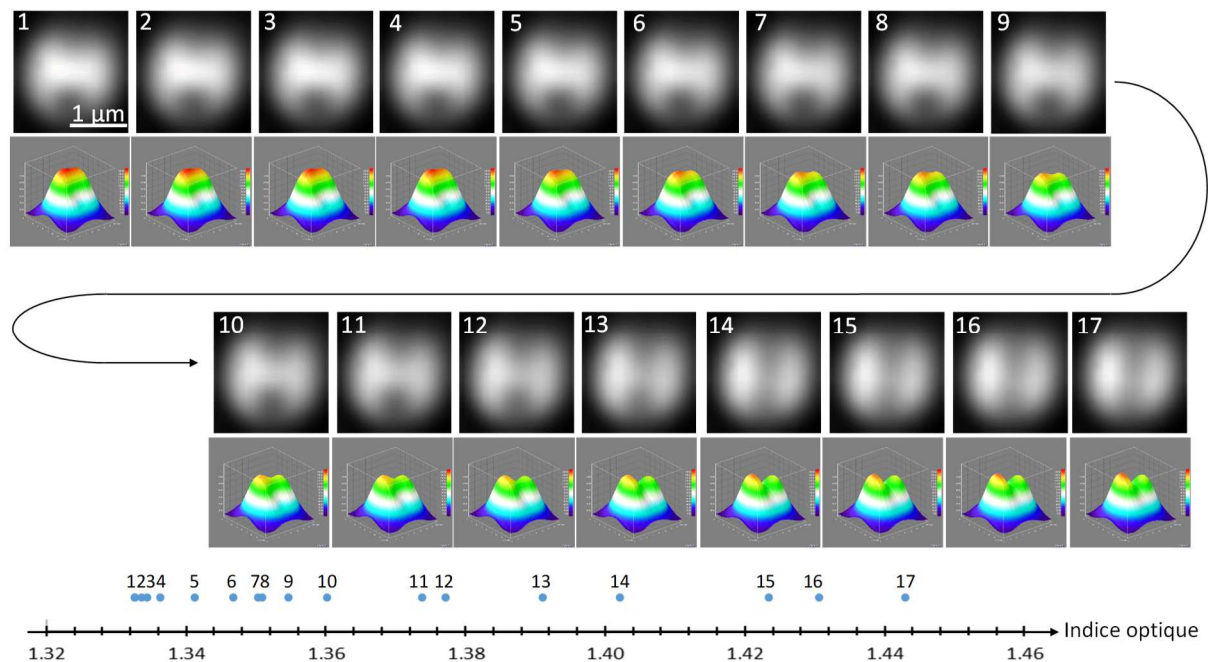


Figure 35 - Effet de l'indice optique sur la distribution spatiale de l'intensité rétro-réfléchie. Les images 1 à 17 illustrent la distribution spatiale de l'intensité rétro-réfléchie telle qu'elle a été enregistrée par la caméra. Les profils d'intensité sont présentés sous chaque image avec le plugin 3D Surface Plot d'ImageJ®. Les indices optiques correspondant aux milieux dans lesquels la zone active de la fibre optique est immergée sont présentés sur l'échelle en bas de la figure.

L'effet de l'indice sur la distribution spatiale de l'intensité rétro-réfléchi est clairement visible : le profil d'intensité évolue lentement, passant d'une forme de "montagne" (un maximum) à une forme de "vallée" (deux maxima séparés). La pertinence du critère "distribution spatiale de l'intensité" par rapport au critère d'"intensité globale" est mise en évidence dans la figure 36. Pour des indices optiques de 1,336 et 1,423, on obtient respectivement les images 4 et 15. Les intensités normalisées mesurées à partir de ces images sont de 98,9% et 98,8% et diffèrent de moins de 0,2%. Cependant, les profils d'intensité correspondants sont clairement différents (formes de montagnes et de vallées).

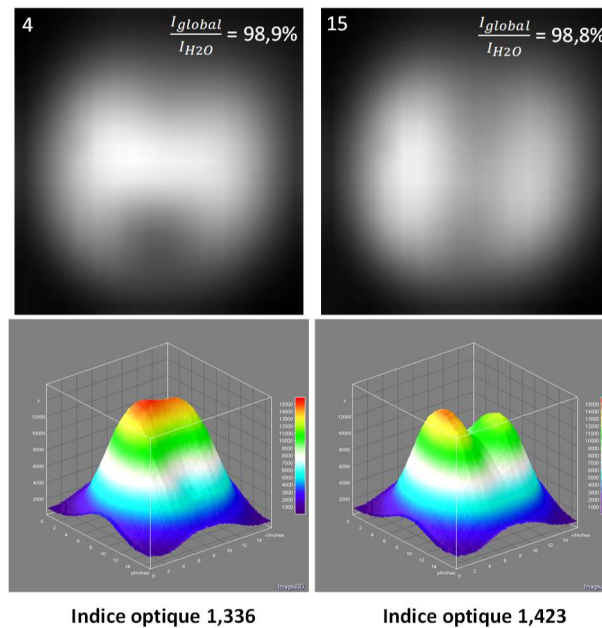


Figure 36 - Illustration de la pertinence des critères "distribution spatiale de l'intensité" et "intensité globale". Pour deux indices optiques donnant des valeurs d'intensité globale très proches, les profils d'intensité correspondants sont clairement différenciables.

IV.5.3. Exploitation du phénomène : optimisation de la sensibilité aux variations d'indice optique

L'intensité rétro-réfléchi normalisée a été mesurée pour trois régions différentes des images. Les trois régions sont présentées sur la figure 37A (encart) : la région 1 comprend le cœur entier ; la mesure sur cette région correspond donc à la mesure de l'intensité globale ; la région 2 représente le centre du cœur et la région 3 une partie inférieure du cœur. Les régions 2 et 3 ont été définies sur des zones d'intensité particulièrement variable. L'intensité rétro-réfléchi normalisée est tracée sur chaque région dans la figure 37B en fonction de l'indice optique. Les barres d'erreur présentées dans la figure 37 ont été évaluées à partir de σ l'écart type relatif du niveau de gris observé sur les images correspondant à vingt mesures individuelles au même indice optique.

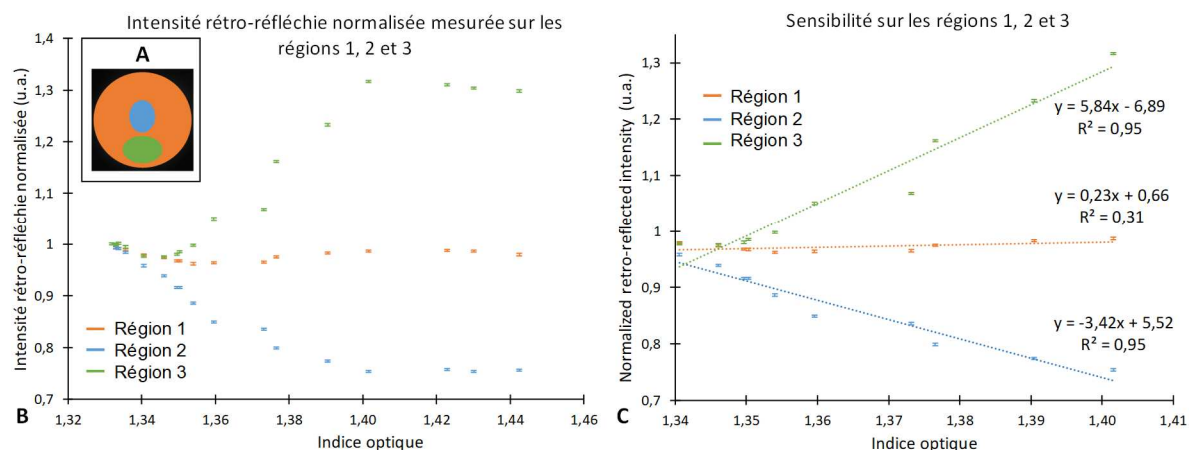


Figure 37 - Evaluation de la sensibilité sur les différentes régions analysées. A) Représentation des différentes régions pour lesquelles les intensités et les sensibilités ont été mesurées. B) Intensité rétro-réfléchie normalisée mesurée sur les régions 1, 2 et 3 sur toute la gamme d'indices testée. C) Détermination des sensibilités sur les trois régions analysées sur la partie linéaire des courbes.

Les variations d'intensité sont beaucoup plus importantes sur les régions 2 et 3 comparées à la variation observée sur l'ensemble du cœur (région 1). Dans la région 2, l'intensité diminue avec l'indice optique alors qu'elle augmente dans la région 3. La diminution d'intensité observée sur la région 2 correspond à l'apparition de la vallée alors que la montagne initiale de la région 2 se scinde au profit d'une augmentation de l'intensité vers la région 3. La faible variation de l'intensité globale résulte de la moyenne entre ces deux phénomènes ce qui entraîne une faible sensibilité. Les sensibilités moyennes pour chaque région ont été calculées sur des parties linéaires des courbes $i(n)$ pour un indice optique compris entre 1,34 et 1,40 (Fig.37C). Les incertitudes sur les sensibilités (pentes $\Delta i/\Delta n$) ont été estimées à partir de la dispersion des points. Une sensibilité de $23 \pm 12\%/RIU$ est obtenue sur la région 1, elle atteint $-341 \pm 28\%/RIU$ sur la région 2 et $584 \pm 46\%/RIU$ sur la région 3. La sensibilité la plus élevée correspond dans notre expérience à une résolution $n_{res} = 8.10^{-4}$, σ étant égal à 0.16%. Comme les sensibilités présentent des signes opposés sur les régions 2 et 3, elles se compensent sur l'ensemble du cœur (région 1). En mesurant l'intensité sur différentes régions, la sensibilité est augmentée d'un facteur de 15 en valeur absolue sur la région 2 et d'un facteur de 25 sur la région 3 par rapport à la sensibilité globale. Il est donc possible d'améliorer considérablement la sensibilité de ce capteur en analysant la distribution spatiale de l'intensité des modes optiques. Bien que l'objectif de cette étude était de démontrer cette capacité d'augmenter la sensibilité, il est tout de même intéressant de comparer les performances obtenues par notre dispositif à celles de dispositifs décrits dans la littérature. En particulier, les fibres optiques plasmoniques fonctionnant en transmission utilisées par les équipes de Chiu et de Liu présentent des sensibilités respectives de 4000 %/RIU et 1136 %/RIU^{77,78}. Même si elles ont été calculées à partir des mesures de l'intensité globale, ces sensibilités sont considérablement plus élevées que celles que nous avons obtenues. Cependant, la configuration en transmission présente un inconvénient important : contrairement à notre dispositif, elle n'est pas adaptée à l'analyse en bout de fibre et donc incompatible avec la détection d'interactions *in situ*. Le dispositif de Kurihara¹⁴⁴, en configuration réflexion, est basé sur l'utilisation d'une fibre monomode et d'un

amplificateur synchrone pour améliorer l'intensité rétro-réfléchi collectée. Néanmoins, il a une sensibilité de 320%/RIU qui est inférieure à celle obtenue ici. Les équipes de Schuster et de Suzuki ont obtenu des sensibilités plus élevées, respectivement de 1000 et 2100%/RIU^{81,82}. La sensibilité importante du dispositif de Schuster peut s'expliquer d'une part par l'utilisation d'une fibre monomode dans laquelle est gravé un réseau de Bragg à longue période et d'autre part par une zone active de 1,5 mm bien plus longue que notre zone active de 15 μm de long. En ce qui concerne le dispositif sur fibre proposé par l'équipe de Suzuki, ils ne se contentent pas d'une simple mesure d'intensité mais utilisent alternativement deux diodes électroluminescentes dont les longueurs d'onde bien choisies correspondent à une sensibilité positive et à une sensibilité négative. En prenant la différence entre les deux signaux de signes opposés, la sensibilité finale est multipliée par deux. De plus, leur zone active mesure 20 mm de long. Cependant, comme ils utilisent une fibre optique multimode, leur sensibilité pourrait encore être améliorée en imageant les intensités des modes optiques.

Dans notre cas, l'amélioration de la sensibilité a été facilement obtenue car la distribution spatiale de l'intensité rétro-réfléchi a été imagée par une caméra haute résolution. Cela a été possible grâce au faible nombre de modes optiques supportés par la fibre. Cependant, cette méthode d'analyse pourrait être adaptée de différentes manières pour les fibres hautement multimodes. A priori, dans une fibre multimode, seuls quelques modes peuvent interagir avec les plasmons et les variations de leurs intensités peuvent également se compenser. Noyée parmi de nombreux modes insensibles (parce que trop confinés au centre du cœur par exemple), la variation d'intensité de tous les modes sensibles peut ne pas être suffisante pour modifier de manière significative la distribution spatiale de l'intensité totale sortant de la fibre. Deux solutions peuvent être utilisées dans ce cas : il est possible d'agir à l'entrée de la fibre pour sélectionner et injecter uniquement les modes sensibles en utilisant par exemple le processus de sélection des modes décrit par Kresing et al.¹³⁸, ou de trier les modes sensibles et insensibles à la sortie de la fibre en utilisant la spectrophotométrie par exemple comme rapporté par Nicholson et al.¹³⁷.

IV.5.4. Interprétation modale du phénomène observé

Suite à l'obtention de ces résultats, nous avons souhaité interpréter plus précisément les variations de la distribution spatiale de l'intensité. L'idée n'était alors pas de réaliser une étude quantitative de la décomposition modale de l'intensité mais de donner une explication qualitative des variations des profils d'intensité observés. En utilisant Scilab, et en entrant les paramètres de la fibre optique (diamètre du cœur égal à 3 μm , indices du cœur (1,497) et de la gaine (1,438), profil parabolique de l'indice du cœur, longueur d'onde égale à 590 nm), nous avons pu démontrer qu'en théorie 4 modes pouvaient être guidés dans la fibre. Il s'agit des modes linéairement polarisés LP01, LP11, LP21 et LP02 dont les profils d'intensité sont représentés sur la figure 38. Nous pouvons supposer que les 4 modes guidés sont orthogonaux¹⁴⁵ et que l'intensité totale après propagation dans la fibre est une combinaison linéaire des intensités de chaque mode¹⁴⁶. Les indices effectifs des 4 modes se propageant dans la fibre ont été calculés par la méthode de Wentzel-Kramers-Brillouin (WKB)¹⁴⁷ en tenant compte des paramètres de la fibre et de la longueur d'onde de la lumière. Comme l'ouverture numérique de la fibre est grande (0,41), les indices effectifs des quelques modes guidés

(respectivement égaux à 1,4795 ; 1,4686 ; 1,4517 ; 1,4439 pour LP01, LP11, LP21 et LP02) sont très espacés sur l'intervalle $[n_{coeur}; n_{gaine}] = [1,497, 1,438]$. Par conséquent, on peut s'attendre à des réponses individuelles très différentes pour chaque mode.

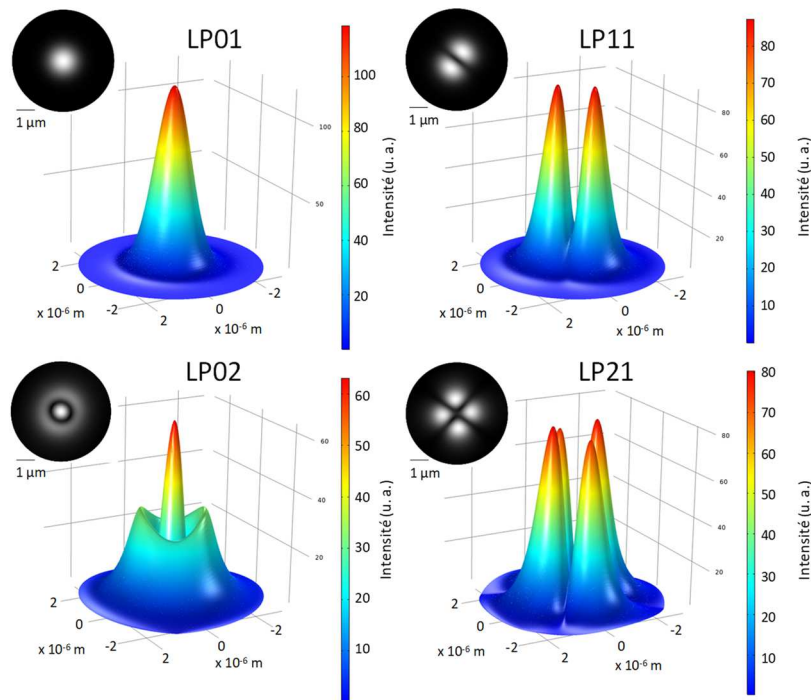


Figure 38 - Profils d'intensité des modes LP01, LP11, LP02 et LP21. Les profils colorés 3D et les vues en niveaux de gris 2D ont été obtenus avec Comsol 5.5.

En examinant les distributions d'intensité des modes se propageant dans la fibre, il semble que le profil d'intensité de départ (première image de la figure 35, n_{eau}) corresponde principalement à une combinaison des profils d'intensité des modes LP01 et LP11. À mesure que l'indice optique augmente (image 2 à 17 de la figure 35), il semble que l'intensité du mode LP01 diminue, probablement parce que le couplage de ce mode avec les plasmons augmente avec l'indice optique, ce qui entraîne une diminution de son intensité réfléchi. La distribution de l'intensité présentée dans la dernière image (image numéro 17 de la figure 35) semble correspondre principalement à celle du mode LP11. Dans cette expérience, nous sommes en mesure d'identifier uniquement les modes LP01 et LP11. Le fait que les modes LP21 et LP02 ne soient pas visibles peut s'expliquer de plusieurs façons. Premièrement, il se peut que nous n'ayons pas une résolution optique et/ou une sensibilité suffisantes pour les distinguer. Ensuite, le nombre de modes guidés est extrêmement sensible au rayon de la fibre. La simulation a été réalisée pour un rayon de $1,5 \mu\text{m}$, mais si le rayon diminue ne serait-ce que de quelques dixièmes de micron, le nombre de modes guidés diminue également. Étant donné les faibles indices effectifs des modes LP21 et LP02 (ce sont les modes ayant les indices effectifs les plus bas), il se peut qu'ils n'existent tout simplement pas dans la fibre étudiée. Ces observations qualitatives indiquent qu'avec une résolution suffisante, il peut être possible, à partir d'une analyse d'image, de reconstruire le profil d'intensité total à partir d'une combinaison linéaire des profils d'intensité des quatre modes guidés. Cette opération

correspond mathématiquement à une décomposition du signal optique global dans la base formée par les quatre modes guidés.

IV.5.5. Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons démontré que si elles remplissaient certaines conditions (faible nombre de modes guidés ayant des indices effectifs suffisamment différents), certaines fibres optiques étaient capables de révéler l'effet de l'interaction des modes optiques avec les plasmons de surface sur la distribution spatiale de l'intensité lumineuse rétro-réfléchie. Ce phénomène a été mis en évidence en agissant sur les plasmons de surface via la modification de l'indice optique du milieu environnant l'extrémité microstructurée et dorée de la fibre optique. Les variations de la distribution de l'intensité qui en résultent ont été interprétées qualitativement à partir des profils d'intensité des modes guidés par la fibre. La sensibilité optique a été mesurée en tenant compte de l'intensité rétro-réfléchie globale provenant de l'ensemble du cœur et en ne prenant en compte que des régions sélectionnées de la distribution de l'intensité rétro-réfléchie. L'exploitation de l'hétérogénéité de la distribution spatiale de l'intensité, due aux différentes interactions entre modes optiques et plasmons, nous a permis d'augmenter la sensibilité du capteur d'un facteur 25. Cette approche est particulièrement intéressante pour les biocapteurs fonctionnant en réflexion car, contrairement aux biocapteurs basés sur la transmission, il est difficile d'augmenter la taille de la zone sensible dans cette configuration. Ainsi, cette approche ouvre des perspectives très prometteuses pour améliorer de manière significative la détection *in situ* des interactions biologiques ou chimiques dans les milieux liquides ou gazeux.

L'observation du phénomène à l'origine de cette étude a été relativement fortuite ! Nous avons eu la chance de disposer de fibres réunissant toutes les conditions nécessaires à sa mise en évidence. J'aimerais désormais améliorer ma compréhension de ce phénomène d'une part et d'autre part l'exploiter pour augmenter la sensibilité des dispositifs plasmoniques et éventuellement proposer de nouvelles méthodes de fonctionnalisation et de détection.

Concernant l'amélioration de la compréhension du phénomène, cela passera par la modélisation. Je propose d'utiliser le logiciel COMSOL grâce auquel j'ai simulé les profils d'intensité des modes LP se propageant dans nos fibres et obtenus par combinaison linéaire des modes vectoriels calculés par COMSOL. Même si j'ai appris à simuler les modes à l'occasion de cette étude, ce travail demande à être largement approfondi en collaboration avec des personnes spécialisées dans la simulation telles qu'Arnaud Buhot au CREAB ou Pascale Pham du DTBS, experte en simulation COMSOL et membre du comité de suivi de thèse d'Oleksii. Ces simulations me permettront de décomposer de manière quantitative cette fois l'intensité totale sur la base des intensités propres à chacun des modes guidés par la fibre. Je pourrais également suivre les variations de distribution spatiale de l'intensité en modifiant l'indice optique en bout de fibre. En simulant une fibre optique réelle dont les paramètres seront précisément connus et maîtrisés (rayon, indice de cœur, indice de gaine, profil de variation des indices) je pourrais comparer théorie et expérience et ainsi affiner le modèle et je l'espère ma compréhension du phénomène.

Le modèle me donnera la possibilité d'injecter un par un les différents modes susceptibles de se propager dans la fibre. De cette façon, il sera possible de déterminer les

modes les plus sensibles. En excitant expérimentalement préférentiellement ces modes sensibles, il deviendra alors possible d'améliorer encore bien davantage la sensibilité des capteurs. Une excitation sélective des modes pouvant se propager à l'intérieur d'une fibre optique est possible, cela a été réalisé par l'équipe de Kreysing¹³⁸. En utilisant l'optique adaptative, ils sont parvenus à produire des faisceaux ayant une grande pureté modale et une distribution d'intensité très bien définie dans les trois dimensions. Leur approche est particulièrement robuste sur des fibres peu multimodes où les profils d'intensité générés sont peu sensibles à la flexion des fibres, ce qui représente un atout pratique important.

Enfin, il pourrait être intéressant d'utiliser la distribution de l'intensité pour réaliser des fonctionnalisations sélectives au sein d'un même cœur. En choisissant le ou les modes excités, seule une zone du cœur pourrait être éclairée et fonctionnalisée en mettant en œuvre des méthodes de fonctionnalisation optique (photo-désorption UV par exemple). Cela donnerait alors accès à de la multi-détection au sein d'un même cœur : un mode pour interroger une interaction, un autre mode pour une autre interaction. Creuser ces aspects modaux me semble donc particulièrement intéressant et prometteur pour le domaine des biocapteurs plasmoniques comme interférométries.

V. Conclusion générale

Mon expérience au CREAB m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences en optique, plus particulièrement en plasmonique, en micro-structuration de fibres, mais aussi en chimie de surface dans le contexte riche des biocapteurs. Par ailleurs, mon implication dans l'ANR MOLY a été pour moi l'occasion de développer des compétences dans la gestion de projet. Ce financement (417 keuros) a été obtenu en 2015 grâce à mes résultats préliminaires et à un important travail de prospection et de rédaction auquel j'ai largement contribué. J'ai coordonné cette ANR avec l'aide de Loïc Leroy. J'étais responsable de l'instrumentation optique et de la caractérisation des fibres optiques *in vitro*. Coordonner le travail de 4 équipes (~20 personnes réparties entre Grenoble, Bordeaux et Toulouse) m'a demandé tact et énergie. Si provoquer les rencontres n'est qu'une question d'organisation, l'aspect gestion de projet prend tout son sens lorsqu'il s'agit de faire collaborer les différents intervenants provenant de disciplines très éloignées, répartir les tâches, gérer le planning scientifique ainsi que le budget... Autant d'aspects « non scientifiques » que j'ai appris à gérer à travers ce projet. Ce financement a permis des développements importants et intéressants que j'ai su valoriser ces dernières années⁷⁻⁹. Désormais, je souhaite explorer l'approche interférométrique. Celle-ci, encore inédite au laboratoire, nous permettra de développer de nouvelles méthodes de structurations (couches minces), de fonctionnalisation et de détection et je l'espère de mettre au point, à terme, un dispositif fiable de diagnostic *in vivo*. Ce projet promet d'être riche en apprentissages, à la fois pour moi mais également et surtout pour les doctorants qui seront encadrés dans ce contexte. Ma première expérience de co-encadrement de la thèse de Karim Vindas (2014-2017) m'a permis d'expérimenter le rôle essentiel (et parfois difficile) des encadrants de thèse. Engager un étudiant sur une thématique nouvelle, basée (fort heureusement !) sur des résultats préliminaires prometteurs, est une responsabilité qui n'est pas à prendre à la légère. Il me tenait donc à cœur, tout au long de la thèse d'être présente en

soutien scientifique, technique et psychologique à mon étudiant. En effet, la thèse est une expérience qui demande beaucoup de travail et de persévérance, les doctorants ont besoin d'être accompagnés, motivés et guidés dans leurs recherches. Avec Loïc Leroy et Arnaud Buhot, j'ai accompagné Karim de mon mieux : à la fois en amont de la thèse puisque j'ai encadré Karim durant son stage de M2, dans la définition du sujet de la thèse, dans l'analyse des résultats au jour le jour et dans la planification des expériences. Nous organisons des réunions tous les quinze jours (à minima) pour suivre l'avancée de son travail. La complémentarité de l'équipe encadrante était un réel atout pour répondre à tous les besoins de l'encadrement de la thèse. En effet, étant maître de conférence et donc seulement présente au laboratoire la moitié du temps, je pense qu'il est nécessaire de favoriser un encadrement multiple. Ce fonctionnement est rassurant, à la fois pour l'étudiant et pour les encadrants qui à deux (ou plus !) assurent un encadrement à 100%. Concernant l'encadrement actuel d'Oleksii Bratash, j'ai défini son sujet de stage ainsi que celui de sa thèse et obtenu les financements nécessaires pour le recruter (Thèse PHARE CEA 2019-2022) et pour lui assurer un accompagnement financier tous au long de sa thèse (IRS, BiFibre 2020-2021). Lors de son arrivée dans l'équipe, j'ai contribué à l'organisation des formations nécessaires pour lui permettre d'être rapidement autonome dans son travail. Le quotidien de sa thèse est devenu très difficile à partir de la crise sanitaire et surtout lors du premier confinement. Fort heureusement, il a pu mettre à profit une partie de cette période pour avancer sur les aspects simulations. La situation reste aujourd'hui difficile pour la recherche expérimentale mais j'essaie d'assurer au mieux mon rôle, à savoir : être disponible aussi souvent que nécessaire (même virtuellement !), l'aider au quotidien dans la planification des expériences, l'interprétation des résultats, l'orienter vers les bonnes plateformes et/ou personnes pour la réalisation de certaines expériences spécifiques, organiser les CSI, etc. Dans l'avenir, je l'accompagnerai comme je l'ai fait pour Karim dans la rédaction des articles scientifiques, dans celle de son manuscrit de thèse et dans l'organisation de sa soutenance, je l'inciterai dès que cela sera à nouveau possible à participer à des conférences nationales ou internationales. Par la suite, j'envisage bien entendu de poursuivre l'avancée de mes projets de recherche et cela nécessitera forcément la formation et l'encadrement de nombreux étudiants. C'est pourquoi je souhaite être habilitée à diriger des recherches. Cela accordera plus de souplesse à mon équipe dans la gestion de l'encadrement des étudiants et me permettra de m'investir davantage auprès d'eux en tant que directrice de thèse.

VI. Bibliographie

- 1 Engel EA, Doss N, Harris GJ, Tennyson J. Calculated spectra for HeH⁺ and its effect on the opacity of cool metal-poor stars. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 2005; **357**: 471–477.
- 2 Engel E, Viargues P, Mortier M, Taillebourg E, Couté Y, Thevenon D *et al.* Identifying USPs regulating immune signals in *Drosophila*: USP2 deubiquitinates Imd and promotes its degradation by interacting with the proteasome. *Cell Communication and Signaling* 2014; **12**: 41.
- 3 Thevenon D, Engel E, Avet-Rochex A, Gottar M, Bergeret E, Tricoire H *et al.* The *Drosophila* Ubiquitin-Specific Protease dUSP36/Scny Targets IMD to Prevent Constitutive Immune Signaling. *Cell Host & Microbe* 2009; **6**: 309–320.

- 4 Bergeret E, Perrin J, Williams M, Grunwald D, Engel E, Thevenon D *et al.* TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *Journal of Cell Science* 2008; **121**: 3325-3334. doi:10.1242/jcs.030163.
- 5 Leroy L, Bombera R, Engel E, Calemczuk R, Laplatine L, Baganizi DR *et al.* Photothermal effect for localized desorption of primary lymphocytes arrayed on an antibody/DNA-based biochip. *Lab on a Chip* 2014; **14**: 1987–1990.
- 6 Engel E, Bombera R, Leroy L, Calemczuk R, Laplatine L, Baganizi D *et al.* Chauffage par effet plasmon pour la désorption localisée de cellules capturées sur une biopuce. 2016. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01280220/document>
- 7 Vindas K, Leroy L, Garrigue P, Voci S, Livache T, Arbault S *et al.* Highly parallel remote SPR detection of DNA hybridization by micropillar optical arrays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2019; **411**: 2249–2259.
- 8 Desmet C, Vindas K, Alvarado Meza R, Garrigue P, Voci S, Sojic N *et al.* Multiplexed Remote SPR Detection of Biological Interactions through Optical Fiber Bundles. *Sensors* 2020; **20**: 511.
- 9 Vindas K, Buhot A, Livache T, Garrigue P, Sojic N, Leroy L *et al.* Enhancing the sensitivity of plasmonic optical fiber sensors by analyzing the distribution of the optical modes intensity. *Opt Express* 2020; **28**: 28740–28749.
- 10 Liliensten J, Delorme P, Samouillan S, Engel E, Barthélémy M. Influence of the thermosphere on electromagnetic waves propagation: Application to GPS signal. *Radio Science* 2005; **40**:1-8. doi:10.1029/2004RS003057.
- 11 Bocková M, Slabý J, Špringer T, Homola J. Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging and Microscopy and Their Biological Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2019; **12**: 151–176.
- 12 Wang D, Loo FJ, Chen J, Yam Y, Chen S-C, He H *et al.* Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors. *Sensors* 2019; **19**: 1266. doi:10.3390/s19061266.
- 13 Boulade M, Morlay A, Piat F, Roupioz Y, Livache T, Charette PG *et al.* Early detection of bacteria using SPR imaging and event counting: experiments with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *RSC Advances* 2019; **9**: 15554–15560.
- 14 Melaine F, Saad M, Faucher S, Tabrizian M. Selective and High Dynamic Range Assay Format for Multiplex Detection of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* RNAs Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal Chem* 2017; **89**: 7802–7807.
- 15 Shabani A, Tabrizian M. Design of a universal biointerface for sensitive, selective, and multiplex detection of biomarkers using surface plasmon resonance imaging. *Analyst* 2013; **138**: 6052–6062.
- 16 Costella M, Avenas Q, Frénéa-Robin M, Marchalot J, Bevilacqua P, Charette PG *et al.* Dielectrophoretic cell trapping for improved surface plasmon resonance imaging sensing. *Electrophoresis* 2019; **40**: 1417–1425.
- 17 Scarano S, Mariani S, Minunni M. SPR-Based Affinity Biosensors as Innovative Analytical Devices. *Journal of Lightwave Technology* 2015; **33**: 3374–3384 doi:10.1109/JLT.2015.2442997.

- 18 He L, Pagneux Q, Larroulet I, Serrano AY, Pesquera A, Zurutuza A *et al.* Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips. *Biosensors and Bioelectronics* 2017; **89**: 606–611.
- 19 Béland R, Charette PG, Aimez V, Cloarec J-P, Souteyrand E, Chevotot Y. Micro-fabrication process for an integrated biosensor composed of a spr transducer coupled to a microcalorimetric sensor. *Int J Nanosci* 2012; **11**: 1240010.
- 20 Brenet S, John-Herpin A, Gallat F-X, Musnier B, Buhot A, Herrier C *et al.* Highly-Selective Optoelectronic Nose Based on Surface Plasmon Resonance Imaging for Sensing Volatile Organic Compounds. *Analytical Chemistry* 2018; **90**: 9879–9887.
- 21 Hurot C, Brenet S, Buhot A, Barou E, Belloir C, Briand L *et al.* Highly sensitive olfactory biosensors for the detection of volatile organic compounds by surface plasmon resonance imaging. *Biosensors and Bioelectronics* 2019; **123**: 230–236.
- 22 Gaggiotti S, Hurot C, Weerakkody JS, Mathey R, Buhot A, Mascini M *et al.* Development of an optoelectronic nose based on surface plasmon resonance imaging with peptide and hairpin DNA for sensing volatile organic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2020; **303**: 127188.
- 23 Kretschmann E, Raether H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch A* 1968; **23**: 2135.
- 24 Homola J. Electromagnetic Theory of Surface Plasmons. In: Homola J (ed). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2006, pp 3–44.
- 25 Roupioz Y, Berthet-Durore N, Leichlé T, Pourciel J-B, Mailley P, Cortes S *et al.* Individual Blood-Cell Capture and 2D Organization on Microarrays. *Small* 2009; **5**: 1493–1497.
- 26 Kim SM, Lee SH, Suh KY. Cell research with physically modified microfluidic channels: A review. *Lab Chip* 2008; **8**: 1015.
- 27 Liu J, Bombera R, Leroy L, Roupioz Y, Baganizi DR, Marche PN *et al.* Selective Individual Primary Cell Capture Using Locally Bio-Functionalized Micropores. *PLoS One* 2013; **8**. doi:10.1371/journal.pone.0057717.
- 28 Adams JD, Kim U, Soh HT. Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; **105**: 18165–18170.
- 29 Didar TF, Tabrizian M. Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab Chip* 2010; **10**: 3043.
- 30 Fuchs J, Dell’Atti D, Buhot A, Calemczuk R, Mascini M, Livache T. Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Analytical Biochemistry* 2010; **397**: 132–134.
- 31 Bombera R, Leroy L, Livache T, Roupioz Y. DNA-directed capture of primary cells from a complex mixture and controlled orthogonal release monitored by SPR imaging. *Biosensors and Bioelectronics* 2012; **33**: 10–16.
- 32 Chen Q, Fisher DT, Kucinska SA, Wang W-C, Evans SS. Dynamic control of lymphocyte trafficking by fever-range thermal stress. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 299–311.

- 33 Bouguelia S, Roupioz Y, Slimani S, Mondani L, Casabona MG, Durmort C *et al.* On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria. *Lab Chip* 2013; **13**: 4024–4032.
- 34 Templier V, Livache T, Boisset S, Maurin M, Slimani S, Mathey R *et al.* Biochips for Direct Detection and Identification of Bacteria in Blood Culture-Like Conditions. *Sci Rep* 2017; **7**. doi:10.1038/s41598-017-10072-z.
- 35 Hou Y, Genua M, Tada Batista D, Calemczuk R, Buhot A, Fornarelli P *et al.* Continuous Evolution Profiles for Electronic-Tongue-Based Analysis. *Angewandte Chemie* 2012; **124**: 10540–10544.
- 36 Bouchet-Spinelli A, Descamps E, Liu J, Ismail A, Pham P, Chatelain F *et al.* Polarization Induced Electro-Functionalization of Pore Walls: A Contactless Technology. *Biosensors* 2019; **9**: 121.
- 37 As telecom demands grow, optical fibers will need to level up. Chemical & Engineering News. <https://cen.acs.org/materials/photonics/telecom-demands-grow-optical-fibers/98/i10> (accessed 24 Jul2020).
- 38 Laemmel E, Genet M, Goualher GL, Perchant A, Gargasson J-FL, Vicaut E. Fibered Confocal Fluorescence Microscopy (Cell-viZio™) Facilitates Extended Imaging in the Field of Microcirculation. *JVR* 2004; **41**: 400–411.
- 39 Subramanian V, Raganath K. Advanced Endoscopic Imaging: A Review of Commercially Available Technologies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014; **12**: 368-376.
- 40 Hoheisel M. Review of medical imaging with emphasis on X-ray detectors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 2006; **563**: 215–224.
- 41 Aaron F, Dónal BD, H. Neale Cardinal. Three-dimensional ultrasound imaging. *Physics in Medicine & Biology* 2001; **46**: R67.
- 42 Fuzari HKB, Dornelas de Andrade A, Vilar CF, Sayão LB, Diniz PRB, Souza FH *et al.* Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging in post-traumatic brachial plexus injuries: A systematic review. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2018; **164**: 5–10.
- 43 Ahn S-M, Simpson RJ. Body fluid proteomics: Prospects for biomarker discovery. *PROTEOMICS – Clinical Applications* 2007; **1**: 1004–1015.
- 44 Haslene-Hox H, Madani A, Berg KCG, Woie K, Salvesen HB, Wiig H *et al.* Quantification of the concentration gradient of biomarkers between ovarian carcinoma interstitial fluid and blood. *BBA Clin* 2014; **2**: 18–23.
- 45 Andrian UH von, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 867–878.
- 46 Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M *et al.* Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV: A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues. *Journal of Experimental Medicine* 2001; **194**: 1361–1374.
- 47 Infections nosocomiales. Inserm - La science pour la santé. <https://www.inserm.fr/information-essante/dossiers-information/infections-nosocomiales> (accessed 4 Feb2021).

- 48 Rainone Mike, Plowman Thomas Edward, Baird Daniel, Hantke Richard, Schultz Tod Hoover, Philips Erica M *et al.* Implantable devices for fiber optic based detection of nosocomial infection. 2008.<http://europepmc.org/patents/PAT/WO2009074890>.
- 49 Marazuela M, Moreno-Bondi M. Fiber-optic biosensors – an overview. *Anal Bioanal Chem* 2002; **372**: 664–682.
- 50 Miguel López-Higuera J. Handbook of Optical Fibre Sensing Technology | Wiley. Wiley.com. [https://www.wiley.com/en-us/Handbook of Optical Fibre Sensing Technology p-9780471820536](https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Optical+Fibre+Sensing+Technology+p-9780471820536) (accessed 9 Dec2019).
- 51 Monk DJ, Walt DR. Optical fiber-based biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2004; **379**: 931–945.
- 52 Barnard SM, Walt DR. A fibre-optic chemical sensor with discrete sensing sites. *Nature* 1991; **353**: 338–340.
- 53 Mignani AG, Baldini F. Biomedical sensors using optical fibres. *Rep Prog Phys* 1996; **59**: 1–28.
- 54 Baldini F, Bechi P, Bracci S, Cosi F, Pucciani F. In vivo optical-fibre pH sensor for gastro-oesophageal measurements. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1995; **29**: 164–168.
- 55 Peterson JL, Goldstein SR, Fitzgerald RV, Buckhold DK. Fiber optic pH probe for physiological use. *Anal Chem* 1980; **52**: 864–869.
- 56 Poeggel S, Tosi D, Duraibabu D, Leen G, McGrath D, Lewis E. Optical Fibre Pressure Sensors in Medical Applications. *Sensors (Basel)* 2015; **15**: 17115–17148.
- 57 Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 1972; **11**: 936–944.
- 58 Zhao Y, Tong R, Xia F, Peng Y. Current status of optical fiber biosensor based on surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics* 2019; **142**: 111505.
- 59 Gupta BD, Kant R. Recent advances in surface plasmon resonance based fiber optic chemical and biosensors utilizing bulk and nanostructures. *Optics & Laser Technology* 2018; **101**: 144–161.
- 60 Sharma AK, Pandey AK, Kaur B. A Review of advancements (2007–2017) in plasmonics-based optical fiber sensors. *Optical Fiber Technology* 2018; **43**: 20–34.
- 61 Klantsataya E, Jia P, Ebendorff-Heidepriem H, Monro TM, François A. Plasmonic Fiber Optic Refractometric Sensors: From Conventional Architectures to Recent Design Trends. *Sensors (Switzerland)* 2016; **17**: 12.
- 62 Caucheteur C, Guo T, Albert J. Review of plasmonic fiber optic biochemical sensors: improving the limit of detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015; **407**: 3883–3897.
- 63 Pollet J, Delpont F, Janssen KPF, Jans K, Maes G, Pfeiffer H *et al.* Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA–protein interactions. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; **25**: 864–869.
- 64 Walt DR. Fiber Optic Imaging Sensors. *Accounts of Chemical Research* 1998; **31**: 267–278.
- 65 LaFratta CN, Walt DR. Very High Density Sensing Arrays. *Chemical Reviews* 2008; **108**: 614–637.

- 66 Loyez M, Hassan EM, Lobry M, Liu F, Caucheteur C, Wattiez R *et al.* Rapid Detection of Circulating Breast Cancer Cells Using a Multiresonant Optical Fiber Aptasensor with Plasmonic Amplification. *ACS Sens* 2020; **5**: 454–463.
- 67 Allsop TDP, Neal R, Wang C, Nagel DA, Hine AV, Culverhouse P *et al.* An ultra-sensitive aptasensor on optical fibre for the direct detection of bisphenol A. *Biosensors and Bioelectronics* 2019; **135**: 102–110.
- 68 Pantano P, Walt DR. Ordered Nanowell Arrays. *Chemistry of Materials* 1996; **8**: 2832–2835.
- 69 Antohe I, Spasic D, Delpont F, Li J, Lammertyn J. Nanoscale patterning of gold-coated optical fibers for improved plasmonic sensing. *Nanotechnology* 2017; **28**: 215301.
- 70 Shevchenko Y, Francis TJ, Blair DAD, Walsh R, DeRosa MC, Albert J. In Situ Biosensing with a Surface Plasmon Resonance Fiber Grating Aptasensor. *Analytical Chemistry* 2011; **83**: 7027–7034.
- 71 Shevchenko YY, Albert J. Plasmon resonances in gold-coated tilted fiber Bragg gratings. *Opt Lett* 2007; **32**: 211–213.
- 72 Jorgenson RC, Yee SS. A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1993; **12**: 213–220.
- 73 Kanso M, Cuenot S, Louarn G. Sensitivity of Optical Fiber Sensor Based on Surface Plasmon Resonance: Modeling and Experiments. *Plasmonics* 2008; **3**: 49–57.
- 74 Hosoki A, Nishiyama M, Igawa H, Seki A, Watanabe K. A hydrogen curing effect on surface plasmon resonance fiber optic hydrogen sensors using an annealed Au/Ta₂O₅/Pd multi-layers film. *Opt Express* 2014; **22**: 18556–18563.
- 75 Hlubina P, Kadulova M, Ciprian D, Sobota J. Reflection-based fibre-optic refractive index sensor using surface plasmon resonance. *Journal of the European Optical Society-Rapid Publications* 2014; **9**: 14033. doi:10.2971/jeos.2014.
- 76 Liu Z, Wei Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhao E, Yang J *et al.* Twin-core fiber SPR sensor. *Opt Lett* 2015; **40**: 2826–2829.
- 77 Chiu M-H, Shih C-H, Chi M-H. Optimum sensitivity of single-mode D-type optical fiber sensor in the intensity measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007; **123**: 1120–1124.
- 78 Liu Y, Liu Q, Chen S, Cheng F, Wang H, Peng W. Surface Plasmon Resonance Biosensor Based on Smart Phone Platforms. *Sci Rep* 2015; **5**: 12864–12864.
- 79 Nguyen TT, Lee E-C, Ju H. Bimetal coated optical fiber sensors based on surface plasmon resonance induced change in birefringence and intensity. *Opt Express* 2014; **22**: 5590–5598.
- 80 Kurihara K, Ohkawa H, Iwasaki Y, Niwa O, Tobita T, Suzuki K. Fiber-optic conical microsensors for surface plasmon resonance using chemically etched single-mode fiber. *Analytica Chimica Acta* 2004; **523**: 165–170.
- 81 Suzuki H, Sugimoto M, Matsui Y, Kondoh J. Fundamental characteristics of a dual-colour fibre optic SPR sensor. *Measurement Science and Technology* 2006; **17**: 1547–1552.

- 82 Schuster T, Herschel R, Neumann N, Schaeffer C. Miniaturized Long-Period Fiber Grating Assisted Surface Plasmon Resonance Sensor. *Journal of Lightwave Technology* 2012; **30**: 1003–1008.
- 83 Xu Y, Luo Z, Chen J, Huang Z, Wang X, An H *et al.* Ω -Shaped Fiber-Optic Probe-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Real-Time Detection of *Salmonella* Typhimurium. *Analytical Chemistry* 2018; **90**: 13640–13646.
- 84 Nguyen TT, Bea SO, Kim DM, Yoon WJ, Park J-W, An SSA *et al.* A regenerative label-free fiber optic sensor using surface plasmon resonance for clinical diagnosis of fibrinogen. *Int J Nanomedicine* 2015; **10**: 155–163.
- 85 Sciacca B, Monro TM. Dip Biosensor Based on Localized Surface Plasmon Resonance at the Tip of an Optical Fiber. *Langmuir* 2014; **30**: 946–954.
- 86 Verma R, Gupta B. SPR Based Three Channels Fiber Optic Sensor for Aqueous Environment. *International Society for Optics and Photonics*, San Francisco, CA, USA, 1–6 February 2014; 8992.
- 87 Chigusa Y FK. Properties of silica glass image fiber and its applications. *Optoelectronics {Devices and Technologies}* 1986; **1**: 203-215.
- 88 PTA | Upstream Technological Platform. <http://pta-grenoble.com/> (accessed 4 Feb2021).
- 89 Yassine KV. *Résonance plasmon et développements instrumentaux vers la conception de biopuces et biocapteurs innovants*. 2017. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01801300> (accessed 4 Feb2021).
- 90 Chen J, Shi S, Su R, Qi W, Huang R, Wang M *et al.* Optimization and application of reflective LSPR optical fiber biosensors based on silver nanoparticles. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2015; **15**: 12205–12217.
- 91 Malara P, Crescitelli A, Di Meo V, Giorgini A, Avino S, Esposito E *et al.* Resonant enhancement of plasmonic nanostructured fiber optic sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2018; **273**: 1587–1592.
- 92 Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews* 2005, **105**: 1103-1170.
- 93 Reno F, Debono, Glenn D. Loucks, Deborah Della Manna, Ulrich J. Krull. Self-assembly of short and long-chain n-alkyl thiols onto gold surfaces: A real-time study using surface plasmon resonance techniques. *Canadian Journal of Chemistry* 1996; **74**: 677–688.
- 94 Mannelli I, Lecerf L, Guerrouache M, Goossens M, Millot M-C, Canva M. *DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems*. 2007; **22**: 803-809.
- 95 Fiche JB, Buhot A, Calemczuk R, Livache T. Temperature effects on DNA chip experiments from surface plasmon resonance imaging: isotherms and melting curves. *Biophysical Journal* 2007; **92**: 935–946.
- 96 Smythe EJ, Dickey MD, Whitesides GM, Capasso F. A Technique to Transfer Metallic Nanoscale Patterns to Small and Non-Planar Surfaces. *ACS Nano* 2009; **3**: 59–65.
- 97 Carter JC, Alvis RM, Brown SB, Langry KC, Wilson TS, McBride MT *et al.* Fabricating optical fiber imaging sensors using inkjet printing technology: A pH sensor proof-of-concept. *Biosensors and Bioelectronics* 2006; **21**: 1359–1364.

- 98 Descamps E, Duroure N, Deiss F, Leichlé T, Adam C, Mailley P *et al.* Functionalization of optical nanotip arrays with an electrochemical microcantilever for multiplexed DNA detection. *Lab Chip* 2013; **13**: 2956–2962.
- 99 Chen K, Adam C, Sojic N, Schmittl M. Photochemical functionalisation of optical nanotips with a rhodamine chemosensor for remote through-fiber detection of Hg²⁺. *RSC Adv* 2013; **3**: 24140–24145.
- 100 Shu Q, Adam C, Sojic N, Schmittl M. Electrochemiluminescent polymer films with a suitable redox “turn-off” absorbance window for remote selective sensing of Hg²⁺. *Analyst* 2013; **138**: 4500–4504.
- 101 Lipomi DJ, Martinez RV, Kats MA, Kang SH, Kim P, Aizenberg J *et al.* Patterning the Tips of Optical Fibers with Metallic Nanostructures Using Nanoskiving. *Nano Lett* 2011; **11**: 632–636.
- 102 Sandquist M, Wong HR. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; **10**: 1349–1356.
- 103 Meisner A, Kerr KF, Thiessen-Philbrook H, Wilson FP, Garg AX, Shlipak MG *et al.* Development of biomarker combinations for postoperative acute kidney injury via Bayesian model selection in a multicenter cohort study. *Biomark Res* 2018; **6**. doi:10.1186/s40364-018-0117-z.
- 104 Desmet C, Le Goff GC, Brès J-C, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA. Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies. *Analyst* 2011; **136**: 2918–2924.
- 105 Accardo A, Courson R, Riesco R, Raimbault V, Malaquin L. Direct laser fabrication of meso-scale 2D and 3D architectures with micrometric feature resolution. *Additive Manufacturing* 2018; **22**: 440–446.
- 106 Maziz A, Courson R, Mesnilgrente F, Engel E, Leroy L, Sojic N *et al.* Rapid prototyping of a MEMS-based droplet dispenser using 3D printing. In *Proceedings of the 45th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE 2019)*, Rhodes, Greece, 23–26 September 2019.
- 107 Qiu J, Madoz-Gurpide J, Misek DE, Kuick R, Brenner DE, Michailidis G *et al.* Development of Natural Protein Microarrays for Diagnosing Cancer Based on an Antibody Response to Tumor Antigens. *J Proteome Res* 2004; **3**: 261–267.
- 108 Casiano CA, Mediavilla-varela M, Tan EM. *Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer*. *Mol. Cell Proteom.* 2006; **5**: 1745–1759.
- 109 Liu W, Peng B, Lu Y, Xu W, Qian W, Zhang J-Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in cancer immunodiagnosis. *Autoimmun Rev* 2011; **10**: 331–335.
- 110 Odinsen O, Owusu-Ofori S, Dompok A, Sarkodie F, Opare-Sem O, Parker D *et al.* Antibody Detection and Kinetics of Antibody Production during Early Stages of Immunization with Hepatitis B Virus Vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**: 1623–1628.
- 111 Chen LH, Chan CC, Menon R, Balamurali P, Wong WC, Ang XM *et al.* Fabry–Perot fiber-optic immunosensor based on suspended layer-by-layer (chitosan/polystyrene sulfonate) membrane. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2013; **188**: 185–192.
- 112 Wysokiński K, Budnicki D, Fidelus J, Szostkiewicz Ł, Ostrowski Ł, Murawski M *et al.* Dual-core all-fiber integrated immunosensor for detection of protein antigens. *Biosensors and Bioelectronics* 2018; **114**: 22–29.

- 113 Allsop T, Reeves R, Webb DJ, Bennion I, Neal R. A high sensitivity refractometer based upon a long period grating Mach–Zehnder interferometer. *Rev Sci Instrum* 2002; **73**: 5.
- 114 Huang Y, Ding M, Guo T, Zhang N, Tian Z, Sun L-P *et al.* Ultrasensitive and label-free detection of γ -aminobutyric acid using fiber-optic interferometric sensors functionalized with size-selective molecular sieve arrays. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017; **244**: 934–940.
- 115 Zhou J, Wang Y, Liao C, Sun B, He J, Yin G *et al.* Intensity modulated refractive index sensor based on optical fiber Michelson interferometer. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015; **208**: 315–319.
- 116 Wang B-T, Wang Q. An interferometric optical fiber biosensor with high sensitivity for IgG/anti-IgG immunosensing. *Optics Communications* 2018; **426**: 388–394.
- 117 Li Z, Liao C, Chen D, Song J, Jin W, Peng G-D *et al.* Label-free detection of bovine serum albumin based on an in-fiber Mach-Zehnder interferometric biosensor. *Opt Express* 2017; **25**: 17105–17113.
- 118 Liang L, Jin L, Ran Y, Sun L-P, Guan B-O. Interferometric detection of microRNAs using a capillary optofluidic sensor. *Sens Actuator B-Chem* 2017; **242**: 999–1006.
- 119 Octet Label-Free Detection Systems. Sartorius. <https://www.sartorius.com/en/products/protein-analysis/octet-label-free-detection-systems> (accessed 4 Feb2021).
- 120 Tan H, Tan Y, Chen DJ, Witte KL. Fiber-optic assay apparatus based on phase-shift interferometry. 2005. <https://patents.google.com/patent/WO2005047854A2/en?q=layer&q=interferometry&oq=layer+interferometry> (accessed 4 Feb2021).
- 121 Wallner J, Lhota G, Jeschek D, Mader A, Vorauer-Uhl K. Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; **72**: 150–154.
- 122 Shah NB, Duncan TM. Bio-layer Interferometry for Measuring Kinetics of Protein-protein Interactions and Allosteric Ligand Effects. *J Vis Exp* 2014. doi:10.3791/51383.
- 123 Ziu I, Laryea ET, Alashkar F, Wu CG, Martic S. A dip-and-read optical aptasensor for detection of tau protein. *Anal Bioanal Chem* 2020; **412**: 1193–1201.
- 124 Découvrez l'endomicroscopie confocale laser - Mauna Kea Technologies. <https://www.maunakeatech.com/fr/> (accessed 4 Feb2021).
- 125 Davenne M, Custody C, Charneau P, Lledo P-M. In Vivo Imaging of Migrating Neurons in the Mammalian Forebrain. *Chem Senses* 2005; **30**: i115–i116.
- 126 COMSOL: Multiphysics Software for Optimizing Designs. COMSOL. <https://www.comsol.fr/> (accessed 4 Feb2021).
- 127 Hirsch M, Majchrowicz D, Wierzba P, Weber M, Bechelany M, Jędrzejewska-Szczerska M. Low-Coherence Interferometric Fiber-Optic Sensors with Potential Applications as Biosensors. *Sensors* 2017; **17**. doi:10.3390/s17020261.
- 128 Laplatine L. Spatial resolution of prism-based surface plasmon resonance microscopy. *Opt Express* 2014; **22**: 22771-22784.

- 129 Zhao J, Huang X, He W, Chen J. High-Resolution and Temperature-Insensitive Fiber Optic Refractive Index Sensor Based on Fresnel Reflection Modulated by Fabry–Perot Interference. *Journal of Lightwave Technology* 2010; **28**: 2799–2803.
- 130 OPTAL - Couches optiques - HEF. <https://www.hef.fr/fr/optal-couches-optiques.html> (accessed 5 Feb2021).
- 131 Tous les produits de PERFOS. <https://www.photonics-bretagne.com/fr/perfos/produits/> (accessed 4 Feb2021).
- 132 PLCC | Fiber Arrays. <https://www.plcconnections.com/fa.html> (accessed 4 Feb2021).
- 133 Arroyo-Hernández M, Martín-Palma RJ, Pérez-Rigueiro J, García-Ruiz JP, García-Fierro JL, Martínez-Duart JM. Biofunctionalization of surfaces of nanostructured porous silicon. *Materials Science and Engineering: C* 2003; **23**: 697–701.
- 134 Low-pressure plasma system: Femto. <https://www.plasma.com/en/low-pressureplasma-femto/> (accessed 21 Sep2020).
- 135 Alvarado- Meza R. *Stratégies de fonctionnalisation pour le développement de biopuces innovantes*. 2018. <http://www.theses.fr/2018GREAV030> (accessed 4 Feb2021).
- 136 Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 240–273.
- 137 Nicholson JW, Yablon AD, Ramachandran S, Ghalmi S. Spatially and spectrally resolved imaging of modal content in large-mode-area fibers. *Opt Express* 2008; **16**: 7233–7243.
- 138 Kreysing M, Ott D, Schmidberger MJ, Otto O, Schürmann M, Martín-Badosa E *et al.* Dynamic operation of optical fibres beyond the single-mode regime facilitates the orientation of biological cells. *Nature Communications* 2014; **5**: 5481.
- 139 Lee KS, Erdogan T. Fiber mode conversion with tilted gratings in an optical fiber. *J Opt Soc Am A* 2001; **18**: 1176–1185.
- 140 Li S, Mo Q, Hu X, Du C, Wang J. Controllable all-fiber orbital angular momentum mode converter. *Opt Lett* 2015; **40**: 4376–4379.
- 141 Chen S, Huang H, Zou H, Li Q, Fu J, Lin F *et al.* Optical manipulation of biological particles using LP₂₁ mode in fiber. *Journal of Optics* 2014; **16**: 125302.
- 142 Visualization 3 - Global behavior of the bundle.avi. figshare. 2020. https://osapublishing.figshare.com/articles/media/Visualization_3_-_Global_behavior_of_the_bundle_avi/12620108
- 143 Visualization 4 - Plots.avi. figshare. 2020. https://osapublishing.figshare.com/articles/media/Visualization_4_-_Plots_avi/12453311
- 144 Kurihara K, Ohkawa H, Iwasaki Y, Niwa O, Tobita T, Suzuki K. Fiber-optic conical microsensors for surface plasmon resonance using chemically etched single-mode fiber. *Analytica Chimica Acta* 2004; **523**: 165–170.
- 145 Snyder AW, Love J. *Optical Waveguide Theory*. Springer US, 1983 doi:10.1007/978-1-4613-2813-1.

- 146 Ghatak A, Thyagarajan K. Optical Fibers. In: Träger F (ed). *Springer Handbook of Lasers and Optics*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012, pp 1171–1208.
- 147 Ankiewicz A. Comparison of wave and ray techniques for solution of graded index optical waveguide problems. *Optica Acta* 1978; **25**: 361–373.