



HAL
open science

Biocapteurs à fibres optiques fondés sur les réseaux de Bragg en angle fonctionnalisés

Séverine Maguis

► **To cite this version:**

Séverine Maguis. Biocapteurs à fibres optiques fondés sur les réseaux de Bragg en angle fonctionnalisés. Instrumentations et Détecteurs [physics.ins-det]. Ecole Centrale Lyon, 2008. Français. NNT : 2008ECDL0031 . tel-02271294

HAL Id: tel-02271294

<https://cea.hal.science/tel-02271294>

Submitted on 26 Aug 2019

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.

THÈSE

présentée devant

L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Préparée au sein de

**L'ÉCOLE DOCTORALE
ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE
DE LYON**

par

Séverine MAGUIS

Biocapteurs à fibres optiques fondés sur les réseaux de Bragg en angle fonctionnalisés

soutenue le 4 décembre 2008 devant la commission d'examen

J U R Y

Nicole JAFFREZIC-RENAUD	Directeur de Recherche CNRS	<i>Président, Directeur de thèse</i>
Dominique PAGNOUX	Chargé de Recherche CNRS	<i>Rapporteur</i>
Tijani GHARBI	Professeur	<i>Rapporteur</i>
Marie-Claude MILLOT	Professeur	<i>Examineur</i>
Geneviève BOURG-HECKLY	Professeur	<i>Examineur</i>
Pierre FERDINAND	Directeur de Recherche CEA	<i>Examineur</i>
Guillaume LAFFONT	Ingénieur CEA	<i>Encadrant</i>

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été financés par une bourse du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) dans le cadre d'un contrat de formation par la recherche.

Je tiens à remercier :

Guillaume Laffont, mon encadrant de thèse au CEA Saclay, qui a initié cette thèse et m'a guidé et conseillé au quotidien. Il m'a notamment fait découvrir le domaine des capteurs à fibre optique et m'a initié à l'inscription des réseaux de Bragg en angle. L'aboutissement de ce travail de thèse tient en grande partie à l'autonomie et la confiance qu'il a su m'accorder.

Pierre Ferdinand, responsable du Laboratoire de mesures optiques, pour ses conseils, son inventivité et sa grande culture scientifique.

Marie-Claude Millot, professeur à la faculté des sciences de l'université Paris-Est, pour s'être intéressée à mes travaux et avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Nicole Jaffrezic, directeur de recherche CNRS de l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour avoir accepté de diriger mes travaux de thèse.

Dominique Pagnoux, chargé de recherche CNRS à l'Institut Xlim, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Tijani Gharbi, professeur de l'université de Franche-Comté, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Geneviève Bourg-Heckly, Maitre de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, que j'avais déjà côtoyée lors de mon stage de fin d'études, pour avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de mon jury.

Tous les membres du Laboratoire de mesures optique du CEA Saclay, pour leur bonne humeur, leur soutien et les discussions fructueuses que nous avons eues sur des sujets divers.

Les personnes qui m'ont accueilli à l'Institut de chimie et des matériaux Paris-Est, et tout spécialement les membres de l'équipe Systèmes polymères complexes, qui m'ont permis d'évoluer dans un environnement scientifique très riche et diversifié.

À Christophe, à ma famille, à mes amis.

Table des matières

Table des matières	v
1 Introduction	1
1.1 Motivations	1
1.2 Objectifs	2
1.3 Structure de ce mémoire	2
1.4 Collaboration	3
I État de l’art	5
2 Fibres optiques et réseaux de Bragg	7
2.1 Généralités sur les fibres optiques	7
2.1.1 Définitions	7
2.1.2 Fibres optiques monomodes à saut d’indice : approche ondulatoire	9
2.1.2.1 Equation de propagation	9
2.1.2.2 Notion de modes guidés, de gaine, radiatifs	10
2.1.2.3 Notion d’indice effectif	11
2.1.3 Un nouveau type de guide : les fibres microstructurées	11
2.1.3.1 Définition	11
2.1.3.2 Principe de fonctionnement	12
2.1.4 Capteurs à Fibres Optiques (CFO)	13
2.1.4.1 Définition	13
2.1.4.2 Modulation de la lumière et transduction	14

2.2	Réseaux de Bragg dans les fibres optiques	16
2.2.1	Définition	16
2.2.2	Inscription de réseaux de Bragg	17
2.2.2.1	Photosensibilité des fibres dopées à l'oxyde de germanium . .	17
2.2.2.2	Méthodes d'inscription	18
2.2.3	Classification des réseaux de Bragg	20
2.2.3.1	Réseaux de Bragg uniforme	21
2.2.3.2	Réseau à pas court et traits inclinés	23
2.2.4	Transducteurs à réseaux de Bragg	24
2.2.4.1	Sensibilité des réseaux standard	24
2.2.4.2	Sensibilité à l'indice de réfraction environnant	26
3	Principe de fonctionnement des biocapteurs	31
3.1	Définition	31
3.2	Les biorécepteurs	31
3.2.1	Les anticorps	32
3.2.2	Les enzymes	32
3.2.3	L'ADN	33
3.2.4	Les cellules entières	34
3.3	Les méthodes de transduction	34
3.3.1	Les transducteurs thermiques	35
3.3.2	Les transducteurs électrochimiques	35
3.3.2.1	Capteurs potentiométriques	35
3.3.2.2	Capteurs ampérométriques	37
3.3.2.3	Capteurs conductimétriques	38
3.3.3	Les transducteurs acoustiques	39
3.3.3.1	Microbalance piézoélectrique ou à quartz	39
3.3.3.2	Capteur à bras de levier	40
3.3.4	Les transducteurs optiques	40

3.3.4.1	La détection de fluorescence	41
3.3.4.2	Capteurs ellipsométriques	42
3.3.4.3	Capteurs à ondes évanescentes	42
3.4	Les biocapteurs à fibres optiques	47
3.4.1	Définitions	47
3.4.2	Biocapteurs fibrés à ondes évanescentes « classiques »	48
3.4.3	Biocapteurs fibrés à plasmons de surface	49
3.4.4	Biocapteurs fibrés à réseaux de Bragg	50
3.4.5	Biocapteurs à fibres microstructurées	51
4	Fonctionnalisation chimique de surfaces	53
4.1	Biofonctionnalisation directe	54
4.1.1	L'adsorption	54
4.1.2	Le couplage covalent	54
4.1.3	La réticulation	55
4.2	Fonctionnalisation intermédiaire du substrat	55
4.2.1	Multicouches de polyélectrolytes	56
4.2.1.1	Définition	56
4.2.1.2	Méthodes de dépôt	56
4.2.1.3	Multicouches à croissance linéaire	57
4.2.1.4	Influence des paramètres de construction	59
4.2.2	Polymères	60
4.2.2.1	Définitions	60
4.2.2.2	Polymérisation <i>grafting from</i>	61
4.2.3	Silanisation des substrats de silice	62
4.2.4	Immobilisation du biorécepteur	64
4.2.4.1	Adsorption de protéines par interactions électrostatiques	64
4.2.4.2	Greffage covalent de biomolécules	65
4.2.4.3	Affinité avidine biotine	67

4.3	Conclusion	68
II	Méthodologie développée	69
5	Matériels et méthodes de détection	71
5.1	Mesures spectrales	71
5.1.1	Description du montage	71
5.1.2	Principe de fonctionnement de la source accordable	72
5.1.3	Caractéristiques du montage	73
5.2	Inscription du réseau de Bragg à traits inclinés	74
5.2.1	Principe du montage à miroir de Lloyd	74
5.2.2	Inscription des réseaux standard	74
5.2.3	Inscription des réseaux à traits inclinés	75
5.3	Caractéristiques de la réponse spectrale en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés	77
5.3.1	Couplage du mode fondamental vers les modes de gaine	77
5.3.2	Couplage du mode fondamental vers le continuum de modes radiatifs .	78
5.3.3	Distance spectrale entre deux résonances consécutives	79
5.4	Analyse et traitement numérique des spectres	79
5.4.1	Approche discrète	80
5.4.1.1	Suivi du décalage spectral	80
5.4.1.2	Suivi de l'amplitude d'une unique résonance spectrale	80
5.4.2	Exemple d'approche globale : « méthode des aires »	81
5.4.3	Approche globale basée sur l'analyse fréquentielle du spectre	82
5.5	Le système BraggLight	84
6	Réalisation de biocapteurs mettant en œuvre la technologie des réseaux de Bragg	87
6.1	Méthode « tout électrostatique »	88
6.1.1	Matériel et réactifs	88

6.1.1.1	Cuve de fonctionnalisation	88
6.1.1.2	Polyélectrolytes	88
6.1.1.3	Protéines bioréceptrices	89
6.1.2	Protocole de biofonctionnalisation	90
6.1.2.1	Décapage de la surface de la fibre	90
6.1.2.2	Activation de la surface de silice	90
6.1.2.3	Dépôts d'une multicouche de polyélectrolytes	91
6.1.2.4	Adsorption de la biomolécule sonde	92
6.2	Stratégies visant à augmenter la stabilité du biorécepteur	92
6.2.1	Polymères portant la fonction carboxyle	93
6.2.1.1	Dextran carboxyméthylé	93
6.2.1.2	Acide polyacrylique	94
6.2.2	Glutaraldéhyde : utilisation de la fonction aldéhyde	94
6.2.3	Extravidine : utilisation de l'affinité avidine-biotine	95
6.3	Méthode covalente	96
6.3.1	Matériel	96
6.3.2	Protocole de biofonctionnalisation	97
6.3.2.1	Activation	97
6.3.2.2	Silanisation	98
6.3.2.3	Greffage de l'amorceur	98
6.3.2.4	Polymérisation radicalaire sous UV	98
6.3.2.5	Greffage covalent de l'extravidine	101
6.3.2.6	Greffage du biorécepteur par affinité avidine-biotine	102
III	Expérimentation : résultats et discussion	105
7	Elaboration d'un biocapteur « tout électrostatique »	107
7.1	Construction de films de polyélectrolytes	107
7.1.1	Paramètres relatifs à la construction d'une multicouche	108

7.1.1.1	Notion d'indice moyen	108
7.1.1.2	Activation de la silice	109
7.1.2	Cinétiques des étapes de construction d'une multicouche	110
7.1.2.1	Concentrations et temps d'incubation : cas d'une multicouche PEI/DSS	111
7.1.2.2	Choix du solvant	112
7.1.2.3	Cinétique de croissance des films : « modèle des trois zones »	113
7.1.3	Interaction des polyélectrolytes avec le milieu extérieur	114
7.1.3.1	Indice de polymolécularité et longueur des chaînes polymères	114
7.1.3.2	Polyélectrolyte fort ou faible : Sensibilité vis-à-vis du pH . .	115
7.1.4	Point de fonctionnement	116
7.2	Adsorption d'une biomolécule sonde	118
7.2.1	Adsorption de molécules : modèle de Langmuir	118
7.2.1.1	Définition	118
7.2.1.2	Linéarisation	119
7.2.2	Adsorption de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA)	120
7.2.2.1	Choix de la concentration en BSA	120
7.2.2.2	Caractérisation de la surface fonctionnalisée par microscopie à force atomique	122
7.2.2.3	Cinétique d'adsorption de la biomolécule sonde	122
8	Performances et limites du biocapteur « tout électrostatique » : intro- duction de l'extravidine	125
8.1	Performances du biocapteur « tout électrostatique »	126
8.1.1	Reconnaissance anticorps-antigène	126
8.1.2	Détection quantitative d'anti-BSA	128
8.1.3	Analyse des performances du biocapteur « tout électrostatique » . . .	129
8.1.3.1	Sensibilité et limite de détection	131
8.1.3.2	Affinité et concentration limite	131
8.2	Limites du « tout électrostatique » et utilisation de l'affinité avidine-biotine .	132

8.2.1	Dépendance vis-à-vis de la biomolécule sonde	132
8.2.2	Spécificité de la mesure assurée par l'affinité avidine-biotine	134
8.2.3	Biofonctionnalisation de la multicouche de polyélectrolytes	135
8.2.4	Détection quantitative d'anti-BSA	136
8.2.5	Performances du biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine »	137
9	Biocapteur issu d'une fonctionnalisation du substrat de silice faisant intervenir des liaisons covalentes	141
9.1	Fonctionnalisation covalente du substrat de silice	141
9.1.1	Préparation du substrat de silice	142
9.1.1.1	Activation de la silice, silanisation et séchage	142
9.1.1.2	Préparation et greffage de l'amorceur	142
9.1.2	Polymérisation <i>in situ</i>	144
9.1.3	Couplage covalent de l'extravidine	146
9.2	Greffage de la protéine sonde et détection d'anticorps	147
9.2.1	Greffage de la protéine sonde	147
9.2.2	Détection quantitative d'anti-BSA	147
9.2.3	Performances du biocapteur « covalent-extravidine-biotine »	148
9.2.4	Comparaison des biocapteurs « tout électrostatique », « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine »	150
9.2.5	Mesure expérimentale de la concentration limite	152
9.3	Limitations, discussion et perspectives	153
9.3.1	Sensibilité de l'acide polyacrylique vis-à-vis des variations de pH	153
9.3.2	Choix d'un domaine d'application	154
9.3.3	Exemple de stratégie adaptée à la détection de très petites molécules : détection par voie indirecte.	155
10	Conclusion et Perspectives	157
10.1	Conclusion générale	157
10.1.1	Développement des biocapteurs à réseaux de Bragg en angle	158

10.1.2	Détection de biomolécules cibles	158
10.2	Perspectives de recherches	159
10.2.1	Etude de nouveaux biorécepteurs et adaptation du mode de détection	159
10.2.2	Evolution vers l'utilisation de fibre microstructurées	160
	Table des figures	163
	Liste des tableaux	171
	Bibliographie	173
	Publications	193
	Glossaire	195

Chapitre 1

Introduction

Les travaux présentés dans ce mémoire concernent la réalisation d'un Capteur à Fibre Optique (CFO) destiné à l'analyse d'interactions biomoléculaires. Ils sont donc à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Fondé sur le couplage de la technologie des réseaux de Bragg avec celle de la biofonctionnalisation de surface, ce sujet pluridisciplinaire s'inscrit dans le cadre d'un domaine de recherche en pleine effervescence : les biocapteurs, et plus largement ce que l'on appelle la biophotonique.

1.1 Motivations

Afin de remplacer les tests classiques, généralement longs, coûteux et difficiles à mettre en œuvre, l'un des secteurs qui suscite aujourd'hui le plus d'intérêts est très certainement celui relatif à la détection directe, c'est-à-dire sans usage de biomolécules marquées. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce domaine de recherche en proposant un modèle innovant de biocapteur à fibre optique, capable de mettre en évidence et de quantifier la présence de biomolécules spécifiques en milieu aqueux.

Dans le domaine des Capteurs à Fibres Optiques, la sensibilité des caractéristiques spectrales des réseaux de Bragg vis-à-vis de paramètres physiques tels que la température et les déformations mécaniques de la fibre optique est largement exploitée. Depuis environ une dizaine d'années, le Laboratoire de Mesures Optiques du Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay (CEA Saclay) développe des systèmes de mesure fondés sur les propriétés de transduction des réseaux de Bragg photoinscrits dans les fibres optiques monomodes. En parallèle à cet aspect système, des travaux de recherche y sont menés afin de développer des réseaux de Bragg présentant des fonctionnalités nouvelles et donc d'explorer de nouveaux champs d'application de ces composants. Ces travaux se sont concrétisés par la réalisation d'un banc optique de photoinscription permettant l'inscription de réseaux de Bragg en angle (aussi appelés réseaux de Bragg à traits inclinés ou bien encore blazés) et par la mise en œuvre d'une méthode originale et performante de mesure de l'indice de réfraction, désormais brevetée.

Par analogie avec des travaux menés sur les réseaux de Bragg dits à « pas long », nous avons cherché à exploiter cette sensibilité aux changements de la valeur de l'indice de réfraction d'un milieu extérieur à la fibre optique pour des applications de biodétection. L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation de fibres optiques à réseaux de Bragg en angle bio-fonctionnalisées à même la surface de silice afin de détecter quantitativement la présence d'une espèce biologique spécifique en solution aqueuse.

1.2 Objectifs

Cette thèse vise à optimiser les méthodes de mesure d'indice de réfraction et à concevoir un modèle de biocapteur qui permette d'envisager son utilisation pour des analyses biochimiques dont les applications relèvent soit du contrôle qualité et/ou sanitaire dans les domaines agro-alimentaire ou environnemental, soit de l'analyse médicale. Plusieurs techniques, telles que la mesure des variations de masse, avec par exemple une microbalance à quartz, ou l'exploitation des modifications d'une propriété physique, comme la réflectivité, la conductivité ou l'indice de réfraction, permettent de quantifier le résultat. Cependant, quel que soit le procédé de mesure retenu, il est dans tous les cas nécessaire de fixer le composé qui réagira avec la substance à détecter, sur un substrat adapté au processus de mesure choisi. Ainsi, ce sont ces méthodes de fixation d'une nanocouche d'un élément réactif spécifique que nous avons cherché à mettre en œuvre.

Nous proposons dans ces travaux de développer un biocapteur à fibre optique fondé sur la détection directe d'une espèce biologique particulière présente en solution. Ce mode de détection passe donc par le greffage sur la surface sensible du transducteur d'une biomolécule conçue pour réagir de manière spécifique avec l'espèce recherchée : on parle alors de bio-fonctionnalisation. Quant au réseau de Bragg en angle (le transducteur), il convertit l'une des modifications physiques (ici l'indice de réfraction) de la couche contenant l'espèce de reconnaissance en un signal mesurable. En ce sens, nous avons utilisé le modèle classique de détection immunologique directe reposant sur l'interaction spécifique antigène-anticorps. La pertinence d'une détection de molécules biologiques (ou non) par l'intermédiaire d'une des modifications de l'indice de réfraction de la couche contenant l'espèce de reconnaissance lors de l'interaction antigène-anticorps a ainsi pu être démontrée.

1.3 Structure de ce mémoire

Ce mémoire est articulé en trois parties :

La première partie présente un état de l'art dans les domaines des Capteurs à Fibres Optiques et des biocapteurs, de façon à aborder des notions utiles par la suite. Le chapitre 2 introduit des définitions relatives à la propagation de la lumière et au phénomène de photosensibilité dans les fibres optiques monomodes, notamment la notion de modes de propagation (modes guidés, de gaine et radiatifs). S'ensuit la présentation des réseaux de Bragg photoinscrits

dans les fibres optiques monomodes, ce qui nous amène à expliquer comment l'évolution de leurs caractéristiques spectrales sous l'effet de divers paramètres physiques (température, déformations, indice de réfraction) permet de les utiliser à des fins métrologiques. Le chapitre 3 décrit en détail les problématiques liées à la conception d'un biocapteur et présente les modes de transduction classiques qui permettent la détection de molécules biologiques. Le chapitre 4 s'intéresse à la notion de biofonctionnalisation de surfaces en introduisant les principes de base.

Le contenu de la seconde partie correspond à une présentation des modèles de biocapteurs et des outils de détection utilisés afin d'exploiter les propriétés des réseaux de Bragg à traits inclinés pour des applications de biodétection. Le chapitre 5 expose les moyens de détection mis en œuvre et la méthode développée pour le suivi, en temps réel, des étapes de biofonctionnalisation et la détection quantitative de molécules biologiques. Le principe général des différents protocoles de biofonctionnalisation est expliqué dans le chapitre suivant (chapitre 6). Volontairement, les résultats obtenus au cours de la mise au point des différents protocoles de biofonctionnalisation ne sont exposés qu'en troisième partie, dans laquelle ils font l'objet d'une analyse détaillée.

Enfin, la troisième partie présente les résultats expérimentaux.

Le chapitre 7 décrit les observations réalisées lors des différentes étapes de biofonctionnalisation du premier protocole testé (décrit au chapitre 6). Nous montrons ainsi la capacité des réseaux de Bragg en angle à détecter l'accrochage en surface de petites molécules. Le chapitre 8 consigne les résultats expérimentaux en termes de détection de la biomolécule cible et montre l'intérêt d'utiliser le deuxième protocole de biofonctionnalisation décrit au chapitre 6, fondé sur la médiation de l'affinité extravidine-biotine. Le chapitre 9 expose enfin les résultats obtenus en utilisant le dernier protocole de biofonctionnalisation étudié au cours de ces travaux, protocole qui présente l'avantage d'une plus grande stabilité à long terme tout en conservant le gain de sensibilité apporté par l'utilisation de l'affinité extravidine-biotine.

Finalement, nous donnons une conclusion de ce travail, et ouvrons des perspectives pour les travaux à venir, en formulant certaines recommandations.

1.4 Collaboration

Ce travail de thèse a été mené en collaboration entre le CEA LIST Saclay et l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE - UMR 7182). Au CEA Saclay, les travaux ont été réalisés au Laboratoire de Mesures Optiques (LMO) ; à l'ICMPE, ils ont pris place au sein de l'Equipe Systèmes Polymères Complexes (ESPC).

Première partie

État de l'art

Chapitre 2

Fibres optiques et réseaux de Bragg

La technologie des fibres optiques repose sur le principe du guidage de la lumière par réflexion totale interne, connu depuis très longtemps. Cependant, ce n'est qu'au début des années 60, avec l'invention du laser, que les scientifiques se sont vraiment intéressés au développement d'un système de communication optique où le signal lumineux généré par le laser voyagerait à l'intérieur d'une fibre optique. La pureté des verres utilisés pour la fabrication des premières fibres optiques étant insuffisante, ces dernières provoquaient des pertes considérables, inacceptables pour envisager des transmissions sur plusieurs kilomètres. Des scientifiques se sont donc attaqués au problème et ont mis au point des techniques de fabrication permettant d'obtenir des verres dont les pertes intrinsèques étaient réduites de plusieurs ordres de grandeur. En moins de 10 ans, une équipe de scientifiques de l'entreprise Corning [Cattani 2006] a réussi à fabriquer un verre de pureté suffisante pour inciter d'autres chercheurs à se pencher sur d'autres problèmes fondamentaux qui limitaient encore la technologie des fibres optiques.

Aujourd'hui, une fibre optique est capable de transmettre des informations, codées par des variations d'intensité du signal lumineux, entre deux lieux distants de plusieurs centaines, voire milliers, de kilomètres. En permettant les communications à très longue distance et à des débits jusqu'alors inexplorés, le développement des fibres optiques a constitué l'élément clef de la révolution des télécommunications optiques. Au-delà de la transmission de données, les propriétés des fibres optiques sont aussi exploitées dans divers domaines d'applications tels que les lasers à fibre [Wooler 2007, Canning 2006], l'imagerie (endoscope) [Yelin 2006, Pedrini 2003] et bien entendu les capteurs (transducteurs à fibres optiques).

2.1 Généralités sur les fibres optiques

2.1.1 Définitions

Une fibre optique est un guide d'onde optique à symétrie circulaire, constitué de deux ou plusieurs couches de matériaux diélectriques transparents (verre ou plastique) d'indices de réfraction légèrement différents, assurant le confinement de la lumière. La fibre la plus simple

est composée de deux couches homogènes, séparées par un écart d'indice : on parle de fibre à saut d'indice. Le cœur cylindrique d'indice n_c , dans lequel est confinée la lumière, est entouré d'une couche périphérique d'indice n_g légèrement inférieur ($n_c - n_g \sim 10^{-3}$), appelée gaine optique (cf. fig. 2.1). Une fibre optique est réalisée en deux étapes bien distinctes : la réalisation de la préforme sur un tour de verrier et le tirage de cette préforme à l'aide d'une tour de fibrage, transformant par homothétie la préforme en un fil de verre, la fibre optique. Enfin, la gaine optique est entourée d'une (ou plusieurs) gaine(s) mécanique(s) de protection qui peu(ven)t être retirée(s) pour les besoins de certaines applications. La fibre est alors dénudée. Les fibres utilisées en télécommunications sont généralement réalisées en silice. Le cœur est faiblement dopé, par exemple avec du germanium (quelques %), afin de créer une différence entre les indices de réfraction du cœur et de la gaine.

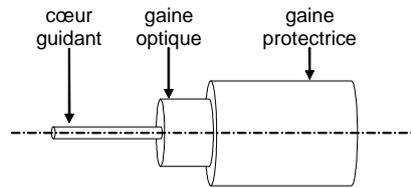


Figure 2.1: Fibre optique composée d'un cœur d'indice de réfraction n_c entouré d'une gaine optique d'indice n_g , puis d'une gaine mécanique protectrice.

Le modèle élémentaire de fonctionnement d'une fibre optique (en l'occurrence multimode), consiste à dire que le guidage de la lumière repose sur le principe de propagation par réflexions totales successives le long de l'interface entre les deux milieux constituant respectivement le cœur et la gaine optique. D'après la loi de Descartes sur la réflexion totale, il existe un angle limite i_{lim} (cf. fig. 2.2) en dessous duquel la lumière incidente sur le dioptre cœur-gaine optique ne peut plus être guidée :

$$i_{lim} = \arcsin\left(\frac{n_g}{n_c}\right) \quad (2.1)$$

La loi de Descartes peut également être utilisée en entrée de la fibre pour déterminer l'angle d'incidence maximal (i_{max}) (cf. fig. 2.2) ou demi-angle au sommet du cône d'acceptance à l'interface entre le milieu extérieur d'indice n_e et le cœur de la fibre, ainsi que l'ouverture numérique ON définie par :

$$ON = n_e \cdot \sin(i_{max}) \quad (2.2)$$

Soit, d'après toujours la loi de Descartes : $ON = n_c \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} - i_{lim}\right) = n_c \cdot \cos(i_{lim}) = n_c \cdot \sqrt{1 - \sin^2(i_{lim})}$

D'où

$$ON = \sqrt{n_c^2 - n_g^2} = \sqrt{2\bar{n} \cdot \Delta n} \quad (2.3)$$

où \bar{n} est la valeur intermédiaire entre n_g et n_c et Δn l'écart d'indice. Ce dernier étant généralement faible (quelques), on a $\bar{n} \simeq n_c \simeq n_g \simeq 1,46$ et l'indice moyen de la silice ; de



Figure 2.2: Schéma d'une fibre optique à saut d'indice. Pour que les rayons lumineux subissent une réflexion totale à l'interface cœur-gaine, l'indice de cœur n_c doit être supérieur à celui de la gaine n_g .

fait, seul le paramètre Δn conditionne en pratique la propagation et le cône d'acceptance en entrée ; d'où son importance en phase de fabrication de la préforme.

Il existe deux grandes catégories de fibres optiques :

- (i) les fibres monomodes, dites aussi unimodales, dans lesquelles le rayon du cœur est suffisamment faible (de l'ordre de quelques microns) pour que l'énergie soit transportée par un seul mode de propagation, appelé mode fondamental.
- (ii) les fibres multimodes, appelées également multimodales dont le rayon de cœur est beaucoup plus grand (traditionnellement $50 \mu m$, moins parfois et jusqu'à plusieurs centaines de microns) et où l'énergie est répartie entre de nombreux modes.

Le calcul de la fréquence normalisée V permet de distinguer ces deux types de guides. Elle est définie par :

$$V = \frac{2\pi a}{\lambda} \cdot ON \quad (2.4)$$

avec λ la longueur d'onde du rayonnement et a la rayon du cœur de la fibre.

La fibre est monomode lorsque sa fréquence normalisée est inférieure à 2,405. Au delà, elle est multimode et le nombre de modes linéairement polarisés est sensiblement égal à $\frac{1}{8} \cdot V^2$ pour une fibre à saut d'indice.

2.1.2 Fibres optiques monomodes à saut d'indice : approche ondulatoire

La description géométrique du guidage est utile pour introduire un certain nombre de paramètres tels que l'ouverture numérique ou la fréquence normalisée que nous venons d'aborder. Cependant, elle n'a de sens que pour des fibres optiques multimodes, dont le diamètre est très supérieur à la longueur d'onde. Dans le cas des fibres monomodes, seules les équations de Maxwell permettent de décrire convenablement la propagation des ondes.

2.1.2.1 Equation de propagation

L'équation de propagation vérifiée par les composantes du champ électromagnétique se propageant dans une fibre optique se déduit des équations de Maxwell correspondant à un milieu diélectrique isotrope et sans pertes. Du fait de la géométrie d'une fibre optique, les champs électrique \vec{E} et magnétique \vec{H} solutions de ces équations à une pulsation ω sont données en

utilisant un système de coordonnées cylindriques (r, φ, z) où z est l'axe de la fibre et r, φ sont les coordonnées radiales et azimuthales dans le plan de section droite de la fibre.

$$\begin{aligned}\vec{E}(r, \varphi, z) &= \vec{e}(r, \varphi) e^{i(\omega t - \beta z)} \\ \vec{H}(r, \varphi, z) &= \vec{h}(r, \varphi) e^{i(\omega t - \beta z)}\end{aligned}\quad (2.5)$$

où β est la constante de propagation longitudinale.

Si Ψ désigne indifféremment $\vec{e}(r, \varphi)$ ou $\vec{h}(r, \varphi)$, l'équation de propagation se présente classiquement sous la forme :

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \Psi}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \Psi}{\partial \varphi^2} + (k^2 n^2 - \beta^2) \Psi = 0 \quad (2.6)$$

où n est l'indice de réfraction du milieu considéré (supposé homogène), $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ la norme du vecteur d'onde et λ la longueur d'onde de la lumière dans le vide. Cette équation étant à variables séparables, les solutions recherchées sont de la forme : $\Psi(r, \varphi) = f(r) g(\varphi)$.

Si la dépendance azimuthale $g(\varphi)$ de Ψ s'exprime sous la forme $e^{il\varphi}$ où l est un nombre entier, l'équation de propagation peut aussi s'écrire sous la forme :

$$\frac{\partial^2 f}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial f}{\partial r} + \left[k^2 n_i^2 - \beta^2 - \frac{l^2}{r^2} \right] f(r) = 0 \quad (2.7)$$

Les solutions générales de l'équation vérifiée par $f(r)$ sont alors soit des combinaisons linéaires de fonctions de Bessel de première ou de seconde espèce et d'ordre entier l (si $k^2 n_i^2 - \beta^2 > 0$), soit des combinaisons linéaires de fonctions de Bessel modifiées de première ou de seconde espèce et d'ordre entier l (si $k^2 n_i^2 - \beta^2 < 0$).

2.1.2.2 Notion de modes guidés, de gaine, radiatifs

Fibre optique à gaine optique infinie La fibre optique se compose de deux milieux concentriques d'indices de réfraction constants dans le cœur (n_c) et dans la gaine optique (n_g). On suppose que cette dernière s'étend à l'infini. Les solutions physiques de la distribution radiale $f(r)$ dans le cœur et dans la gaine optique sont déterminées indépendamment et reliées entre elles par les conditions aux limites et une condition de normalisation de la puissance transportée par un mode.

Les conditions aux limites sont les suivantes :

- (i) champs nuls lorsque r tend vers l'infini,
- (ii) champs finis en $r = 0$,
- (iii) continuité des composantes tangenciales des champs (c'est à dire les composantes longitudinales et azimutales) et de leurs dérivées à l'interface cœur-gaine optique ($r = r_c$).

Pour qu'une onde électromagnétique soit guidée par ce modèle de fibre optique, sa constante de propagation β doit vérifier la relation $k^2 n_g^2 \leq \beta^2 \leq k^2 n_c^2$. Par ailleurs, les conditions de continuité des champs (équation aux valeurs propres) imposent que pour l fixé, il existe un ensemble discret de m valeurs prises par la constante de propagation β , notée β_{lm} . La fibre peut donc guider un ensemble discret de m types d'ondes qui sont appelées *modes*.

Lorsque $\beta^2 \leq k^2 n_g^2$, la condition d'un champ nul à l'infini n'est plus respectée. Les solutions de l'équation d'onde ne correspondent plus à des ondes guidées mais à des modes radiatifs, aussi appelés modes rayonnants. Comme il n'est pas possible de leur associer une équation aux valeurs propres, toute valeur de β telle que $\beta^2 \leq k^2 n_g^2$ est une solution. Ainsi, les modes radiatifs forment un continuum.

Fibre optique à gaine d'épaisseur finie Dans ce cas, la gaine optique a une étendue limitée. Elle est entourée d'un milieu extérieur également supposé isotrope d'indice de réfraction n_e , généralement inférieur à n_g (fibre de silice et milieu extérieur gazeux ou aqueux). La condition de réflexion totale étant vérifiée ($n_e < n_g$), l'interface gaine-milieu forme une seconde cavité optique qui possède ses propres modes guidés, appelé modes de gaine du fait de leur guidage par l'interface gaine-milieu extérieur. Comme dans le cas de l'interface cœur-gaine, ces modes peuvent être considérés comme résultant d'une discrétisation, sur la plage $k^2 n_e^2 \leq \beta^2 \leq k^2 n_g^2$, du continuum de modes rayonnants introduits précédemment.

L'ensemble des modes guidés et rayonnés forme une base orthogonale sur laquelle tout champ peut être décomposé. Il en résulte que la puissance totale transportée est la somme des puissances transportées par chaque mode.

2.1.2.3 Notion d'indice effectif

A chaque mode lm qui se propage avec une constante de propagation β_{lm} est associé un indice de réfraction effectif n_{eff}^{lm} qui dépend de la longueur d'onde λ et correspond à l'indice « vu » par le mode :

$$n_{eff}^{lm} = \frac{\beta_{lm}}{k} \quad (2.8)$$

La condition de guidage sur la constante de propagation β_{lm} impose que la valeur de n_{eff}^{lm} soit comprise entre le plus petit et le plus grand des indices des couches qui constituent le profil d'indice. Dans le cas d'une fibre constituée de deux milieux homogènes concentriques d'indices de réfraction n_c (cœur) et n_g (gaine), $n_g \leq n_{eff}^{lm} \leq n_c$.

2.1.3 Un nouveau type de guide : les fibres microstructurées

2.1.3.1 Définition

Dans les fibres microstructurées, apparues dans le milieu des années 1990 [Birks 1995], la gaine est constituée d'une matrice de canaux d'air colinéaires à l'axe optique. Les premières fibres

silice contenant des canaux d'air ont été réalisées à l'université de Southampton [Knight 1996]. À partir de 2000, le nombre d'acteurs (laboratoires et start-ups) présents dans ce domaine a considérablement augmenté et ces fibres originales ont pris pied dans plusieurs champs d'applications. Des télécommunications à la biophotonique en passant par les capteurs ou les sources laser, les fibres microstructurées offrent des propriétés de propagation tout à fait singulières du fait des multiples interactions possibles entre les champs guidés et la structure hétérogène. Une fibre microstructurée est caractérisée par le diamètre d de ses canaux et le pas Λ du réseau correspondant à la distance entre deux trous consécutifs (cf. fig. 2.3).

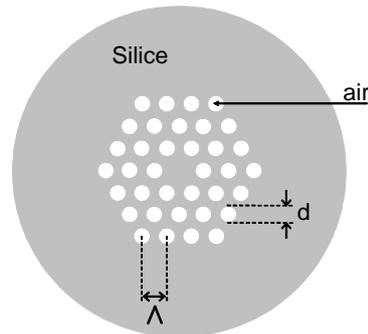


Figure 2.3: Représentation schématique d'une section de fibre microstructurée.

2.1.3.2 Principe de fonctionnement

Guidage par réflexion totale interne Dans une fibre microstructurée à cœur solide, la présence de canaux d'air dans la gaine a pour effet de réduire la valeur de son indice moyen par rapport à celui du cœur. Ainsi, la lumière peut être guidée suivant le principe de réflexion totale. Cependant, l'indice effectif de gaine dépend très fortement de la longueur d'onde du faisceau lumineux qui se propage dans le cœur de la fibre microstructurée [Brechet 2000]. Aux courtes longueurs d'onde, l'indice effectif (vu par la lumière) de gaine est proche de celui de la silice. La lumière pénètre peu dans la gaine et reste confinée dans le cœur de la fibre. En revanche, lorsque la longueur d'onde augmente, l'indice effectif de gaine diminue et la lumière s'étend plus profondément dans les canaux. Cette extension du champ dépend des paramètres optogéométriques d et Λ de la fibre et leur ajustement suffit à obtenir des profils d'indice variés.

Guidage par bande interdite photonique Dans les fibres microstructurées à cœur creux, la propagation du faisceau lumineux par réflexion totale interne ne peut plus avoir lieu. Le guidage est alors fondé sur un phénomène physique différent, observable dans les cristaux photoniques.

Les cristaux photoniques sont constitués d'un arrangement périodique de matériaux d'indices de réfraction différents. En raison de la périodicité, il peut exister une bande de longueurs d'onde pour laquelle la propagation de la lumière est interdite, appelée Bande Interdite Pho-

tonique (BIP). Si un défaut de périodicité est introduit dans le réseau, un faisceau lumineux dont la longueur d'onde appartient à la BIP pourra être piégé et propagé au niveau du défaut.

Les propriétés optiques des cristaux photoniques permettent de réaliser des fibres optiques à guidage par bande interdite photonique dont l'indice de réfraction du cœur d'air (le défaut) est inférieur à celui de la gaine (réseau de canaux d'air formant le cristal photonique) [Cregan 1999]. Le diamètre d et le pas d'échantillonnage Λ des trous permettent de déterminer les longueurs d'onde et les angles d'incidence pour lesquels la lumière est réfléchi. Cependant, la qualité de propagation de l'onde lumineuse dépend directement et fortement de la régularité du réseau et nécessite un contrôle accru des paramètres de fabrication.

Applications Du fait de l'interaction des champs guidés avec les microcanaux d'air présents dans la structure, les fibres microstructurées sont des candidates particulièrement intéressantes pour réaliser des capteurs aux nouvelles fonctionnalités. En effet, c'est la grande proximité entre le champ guidé et un transducteur présent dans les trous qui rend ces fibres séduisantes. Par exemple, un composé chimio-sélectif introduit dans les trous d'une fibre microstructurée peut constituer un capteur ultrasensible en modifiant la propagation du mode guidé en présence du composé à détecter.

2.1.4 Capteurs à Fibres Optiques (CFO)

La technologie des Capteurs à Fibres Optiques est actuellement en plein essor et profite pleinement des progrès réalisés ces dernières années dans les domaines de l'optoélectronique, des fibres optiques et des composants associés, massivement utilisées en télécommunications. L'engouement est tel que le champ d'application de ces capteurs tend aujourd'hui à couvrir celui des capteurs traditionnels dans de nombreux domaines. En effet, les fibres optiques offrent de nombreux avantages tels qu'un faible coût, une faible intrusivité, une mesure *in situ* en temps réel dans des endroits difficilement inaccessibles, le transport de la grandeur mesurée sur de grandes distances ainsi qu'une immunité électromagnétique intrinsèque inhérente au matériau silice.

2.1.4.1 Définition

Un Capteur à Fibres Optiques (CFO) est un dispositif comprenant au moins une fibre optique. L'information représentative de la grandeur observée est créée dans le chemin optique de l'onde lumineuse circulant dans la ou les fibres, par réaction de la lumière à la grandeur à mesurer, avant d'être acheminée vers le récepteur optique [Ferdinand 1992, Ferdinand 2008]. De manière générale, l'architecture d'un CFO comporte les sous-ensembles suivants (cf. fig. 2.4) :

- (i) un émetteur de lumière, constitué d'une ou de plusieurs sources lumineuses monochromatiques, cohérentes ou non, continues ou impulsionnelles,

- (ii) une fibre optique (monomode ou multimode) qui peut être soit standard, soit spécialement réalisée pour effectuer une mesure dans un contexte particulier. Des équipements annexes (coupleurs, polariseur, connecteurs optiques, etc.) doivent généralement lui être adjoints,
- (iii) un transducteur, élément sensible à la grandeur physique à mesurer, qui module le signal émis par la source et donne la correspondance entre la valeur de cette grandeur et la valeur prise par l'une des grandeurs caractéristiques de la lumière (intensité, polarisation, longueur d'onde, etc.). La fibre peut constituer elle-même cet élément sensible. On parle alors de capteur « intrinsèque ». *A contrario*, lorsqu'un élément transducteur est adjoint dans le dispositif, on parle alors de capteur « extrinsèque »
- (iv) un récepteur de lumière : en général une (ou plusieurs) photodiode(s) suivie(s) d'un étage électronique d'amplification,
- (v) une chaîne de traitement du signal, chargée d'extraire les informations sur la grandeur mesurée,
- (vi) des circuits d'alimentation en énergie.

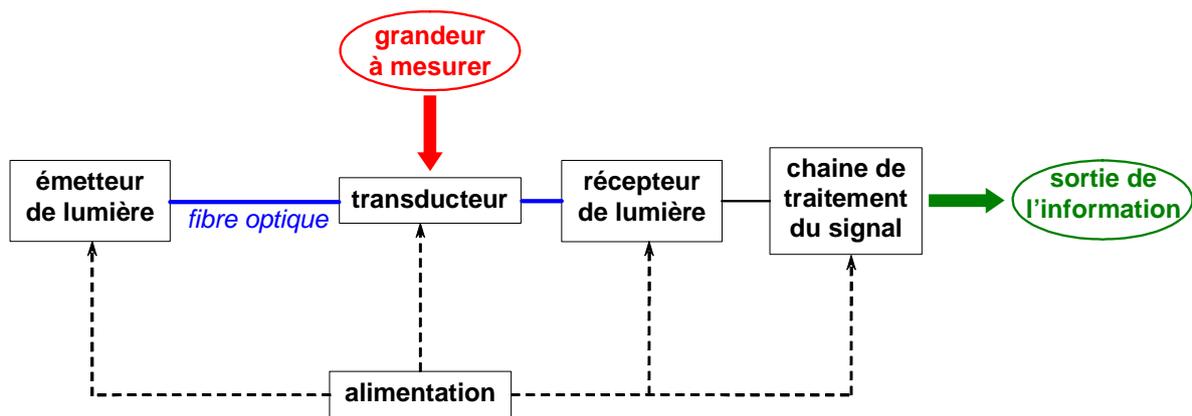


Figure 2.4: Schéma-bloc de fonctionnement d'un capteur à fibre optique.

2.1.4.2 Modulation de la lumière et transduction

Le transducteur module le signal émis par la source. Dans le cas d'une fibre optique, plusieurs phénomènes optiques peuvent être utilisés pour mesurer diverses grandeurs physiques. Les modes de transduction se répartissent en cinq catégories suivant la manière dont la lumière est modulée par la fibre optique : modulation d'intensité, de phase, de polarisation, de longueur d'onde ou de temps. La sensibilité d'un CFO dépend beaucoup du mode de transduction associé.

Capteurs à modulation d'intensité La grandeur physique à mesurer module directement l'intensité de la lumière traversant la fibre optique. L'onde incidente peut subir une atténuation en cas de micro-courbures [Lagakos 1987] de la fibre ou en présence d'un milieu absorbant, voire diffusant. Inversement, elle sera amplifiée par des phénomènes de luminescence, de fluorescence ou de phosphorescence au cours de sa propagation. Ce type de modulation présente de multiples avantages tels que la simplicité, la résistance à des environnements sévères et le prix de revient modéré. Cependant, la mesure étant sensible aux fluctuations de puissance de la source et à l'affaiblissement du signal par la ligne optique, il est nécessaire de prévoir une voie de référence pour la normalisation des résultats lors du traitement du signal.

Capteurs à modulation de phase La modulation de phase d'une onde optique peut être due à une élévation de la température [Lee 1989], à l'effet de la pression acoustique [Layton 1979] ou de la modification de l'indice de réfraction en surface de la fibre optique. Cette variation de phase de l'onde lumineuse est généralement mesurée de manière indirecte, souvent à l'aide d'un dispositif interférométrique (Michelson, Mach-Zehnder, Sagnac, etc) qui mesure le déphasage entre deux ondes ayant parcouru des chemins optiques différents. Les capteurs optiques fondés sur ce principe sont particulièrement sensibles et beaucoup plus précis que ceux utilisant la modulation d'amplitude.

Capteurs à modulation d'état de polarisation La modulation de polarisation apparaît lors de la propagation d'une onde dans un milieu biréfringent. La mesure consiste à évaluer le déphasage de deux ondes polarisées s'étant propagées suivant les axes neutres d'une fibre optique monomode, biréfringente. Lorsqu'une perturbation est appliquée à une fibre monomode, sa biréfringence (écart entre les indices associés aux deux axes de propagation du guide) s'en trouve modifiée et par voie de conséquence, les constantes des deux modes qui s'y propagent. Il en résulte une variation de l'état de polarisation de la lumière lors de la propagation et par voie de conséquence à la sortie de la fibre, variation liée à l'intensité de la perturbation [Mancier 1995].

Capteurs à modulation spectrale La modulation de longueur d'onde apparaît lors de la propagation d'une onde dans un milieu dont les propriétés d'absorbance ou d'émission sont corrélées à la valeur du paramètre mesuré. Par exemple, les spectres d'absorption des milieux semi-conducteurs ou les spectres de fluorescence des fibres optiques dopées aux terres rares [Wade 2003] varient avec la température. Les réactions chimiques sont elles aussi susceptibles de produire de nombreux phénomènes colorés exploitables par ce type de capteurs.

Notons que les capteurs utilisant la modulation en longueur d'onde reposent généralement sur des modes de détection interférométrique ou différentielle car ces derniers permettent de s'affranchir des effets, souvent non négligeables, des variations parasites d'intensité (par exemple, pertes dues aux câbles et aux connexions). Ils requièrent donc une installation relativement complexe. Néanmoins, la spectrométrie est une technique de mesure performante en termes de résolution et de précision.

Capteurs à modulation de temps La modulation temporelle apparaît lorsqu'une impulsion lumineuse traverse une zone sensible où elle est transformée ou retardée. La mesure repose sur l'analyse des conséquences induites par cette impulsion incidente au sein du cœur de la fibre, en particulier *via* les phénomènes de diffusion qui y prennent naissance (Rayleigh, Raman ou Brillouin). Ainsi, l'analyse de la lumière rétrodiffusée par une fibre optique dans laquelle une impulsion lumineuse est injectée permet de détecter la présence de défauts et d'en déterminer la position grâce à la mesure de son temps de propagation. Cette approche dénommée OTDR (Optical Time-Domain Reflectometer) est utilisée en routine pour caractériser et tester les lignes en télécommunications. Cette technique peut également être utilisée pour la mesure de la distribution le long de la fibre des paramètres (température, contraintes mécaniques, etc.) qui affectent les conditions de propagation de l'impulsion lumineuse et en particulier le phénomène de diffusion Raman sensible aux effets thermiques et celui de diffusion Brillouin influencé tant par les déformations que la température subie par la fibre.

2.2 Réseaux de Bragg dans les fibres optiques

Les modes guidés qui se propagent dans une fibre optique idéale sont orthogonaux. Il ne peut donc pas y avoir de couplage direct entre eux. En revanche, dans une fibre optique réelle, la géométrie n'est jamais parfaitement cylindrique et l'indice de réfraction longitudinal subit de très légères fluctuations. De plus, la fibre ayant une extension radiale limitée, les intégrales de recouvrement ne sont jamais nulles. Il en résulte alors un couplage intermodal.

Dans une fibre monomode, le couplage d'une partie de l'énergie du mode guidé vers un mode radiatif se traduit par une simple atténuation. Cependant, ce n'est pas la seule possibilité de transfert énergétique. Il peut également y avoir couplage avec les modes rétrodiffusés (vers l'arrière), conséquence de la diffusion de la lumière sur les non-uniformités microscopiques du guide. Or, il se trouve que le couplage entre ces modes contrapropagatifs peut être considérablement accru par une variation périodique de l'indice de réfraction (structure non uniforme) induite dans le cœur de la fibre. C'est sur ce principe que repose la technologie des réseaux de Bragg fibrés.

2.2.1 Définition

Un réseau de Bragg consiste en une modulation d'indice induite dans le cœur d'une fibre optique par photo-inscription. Il forme un réseau épais de diffraction qui se comporte comme un réflecteur sélectif en longueur d'onde. Dans le cas d'un réseau de Bragg à pas uniforme Λ , dans lequel la modulation d'indice de réfraction est perpendiculaire à l'axe de propagation de la fibre, la lumière est réfléchi sur une plage spectrale très étroite, centrée sur une longueur d'onde bien spécifique appelée longueur d'onde de Bragg (cf. fig. 2.5). Si l'onde guidée par la fibre optique se propage avec un indice effectif n_{eff} , la longueur d'onde de Bragg est donnée par la relation :

$$\lambda_{Bragg} = 2n_{eff} \cdot \Lambda \quad (2.9)$$

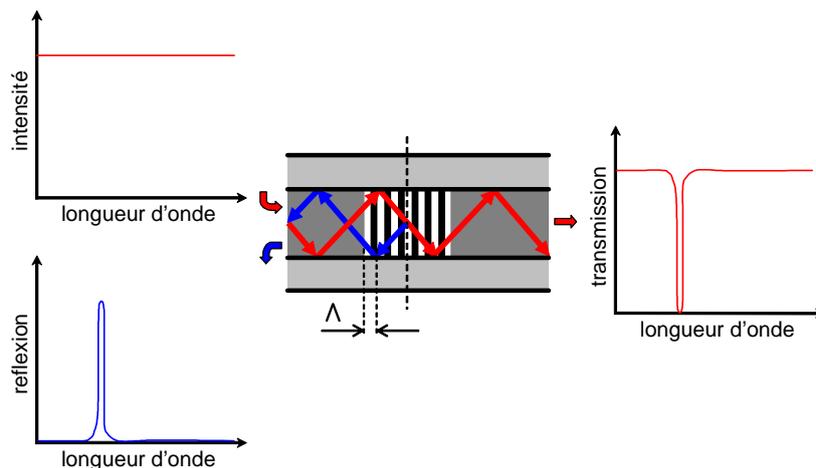


Figure 2.5: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un réseau de Bragg à pas uniforme Λ inscrit dans le cœur d'une fibre optique ainsi que ses réponses en transmission et en réflexion.

2.2.2 Inscription de réseaux de Bragg

Les premières expériences d'inscription de réseaux de Bragg remontent à 1978, lorsque l'équipe de K. O. Hill du CCR (Centre de Recherche sur les Communications optiques), Ottawa, Canada, mit en évidence le phénomène de photosensibilité du cœur d'une fibre optique dopée à l'oxyde de germanium [Hill 1978, Kawasaki 1978]. En y injectant un faisceau laser à 488 nm, ils observèrent une augmentation avec le temps de l'intensité de la lumière rétrodiffusée, jusqu'à rétrodiffusion totale de la lumière injectée. Ce phénomène irréversible fut alors attribué à une modification permanente de l'indice de réfraction du cœur de la fibre sous l'effet d'une irradiation. Dans le même temps, l'équipe de W.W. Morey et G. Meltz à l'UTRC (United Technologies Research Center) travaillent sur le même sujet [Morey 1989]. Ces deux laboratoires sont de fait les « co-inventeurs » des réseaux de Bragg et les propriétaires de plusieurs brevets de bases sur cette technologie.

2.2.2.1 Photosensibilité des fibres dopées à l'oxyde de germanium

Comme nous l'avons mentionné en amont, lors de la fabrication d'une fibre optique, le cœur est généralement dopé, par exemple à l'oxyde de germanium, afin d'ajuster le profil d'indice. L'inscription d'un réseau de Bragg dans le cœur d'une fibre optique repose sur les propriétés de photosensibilité de la silice ainsi dopée, susceptible de subir une modification permanente de son indice de réfraction sous l'action d'un rayonnement ultraviolet. La photosensibilité des fibres dopées à l'oxyde de germanium met en jeu des phénomènes complexes liés aux dopants, allant de la présence de bandes d'absorption situées autour de 240 nm [Hosono 1992] à la création de centres colorés [Hand 1990, Cohen 1957] en passant par la relaxation structurale et la densification des molécules [Poumellec 1996].

Le pic d'absorption de la silice dopée à l'oxyde de germanium étant proportionnel à la concentration de dopants, la photosensibilité des fibres à haute teneur en germanium est accrue. Ce-

pendant, la fabrication de telles fibres s'avère complexe (fortes contraintes dans la préforme) et donc coûteuse. Cependant, plusieurs techniques permettent d'augmenter considérablement la photosensibilité d'une fibre faiblement dopée, la plus utilisée étant l'hydrogénation. Pour ce faire, la fibre est placée dans une enceinte sous pression (typiquement 200 bar) contenant de l'hydrogène pendant plusieurs jours [Lemaire 1993]. Les molécules d'hydrogène diffusent dans le cœur de la fibre et réagissent avec le germanium pour créer des défauts supplémentaires, sensibles à l'irradiation au rayonnement ultraviolet. Ainsi, des fibres standard et peu coûteuses comme celles destinées aux télécommunications peuvent être utilisées pour l'inscription de réseaux de Bragg. L'inconvénient de cette technique se situe au niveau des pertes par absorption induite par l'hydrogénation dans la fenêtre proche infrarouge utilisée dans les télécommunications optiques. Des travaux portant sur le remplacement de l'hydrogène par du deutérium [Stone 1987] ont montré que cette technique permettait de décaler cette bande d'absorption vers les hautes longueurs d'onde. Plus complexe et coûteux, l'emploi de deutérium reste cependant marginal. D'autre part, des études ont montré que les réseaux de Bragg inscrits dans des fibres optiques photosensibilisées par hydrogénation à haute pression et température ambiante présentent une stabilité inférieure à celle des réseaux inscrits dans des fibres non traitées. La mise au point d'une nouvelle méthode de photosensibilisation, l'hypersensibilisation par UV, résulte de ce constat. Cette dernière consiste à insoler uniformément par rayonnement UV une fibre optique préalablement hydrogénée à haute pression. Cette méthode permet d'améliorer la réflectivité des réseaux par rapport à ceux inscrits dans des fibres uniquement hydrogénées ou non traitées [Canning 2000]. Plus récemment, des chercheurs ont montré qu'il était possible d'augmenter considérablement la photosensibilité des fibres standard destinées aux télécommunications en leur appliquant une tension mécanique longitudinale (amplitude typique équivalente à un allongement de 3 %) lors de l'inscription du réseau [Salik 2000].

2.2.2.2 Méthodes d'inscription

Dans le cas particulier de l'expérience de K. O. Hill, l'inscription du réseau de Bragg résulte de la création d'une onde stationnaire se formant par interférence (succession de zones sombres et brillantes) entre les ondes incidente et rétrodiffusée en bout de fibre par réflexion de Fresnel. La longueur d'onde de la lumière réfléchiée par le réseau est donc accordée sur celle de la lumière émise par le laser utilisé pour l'inscription, soit 488 nm.

Méthode interférométrique transverse Suite à la mise en évidence du phénomène de photosensibilité et à l'invention du réseau de Bragg, l'équipe de G. Meltz [Meltz 1989] proposa une amélioration fondamentale du procédé d'inscription. Il s'agit d'une méthode d'inscription transverse, permettant de créer des réseaux fonctionnant à n'importe quelle longueur d'onde. Au lieu d'inscrire le réseau selon un procédé longitudinal, l'inscription du réseau de Bragg dans le cœur d'une fibre optique dopée à l'oxyde de germanium résulte de l'insolation latérale avec une figure d'interférence (succession de franges sombres et brillantes). De fait, toute

longueur d'onde caractéristique (longueur d'onde de Bragg) est accessible à ce type de réseau *via* l'ajustement du pas Λ des franges d'interférences.

En 1981, une étude détaillée a montré qu'à 488 nm, la variation d'indice induite dans le cœur de la fibre est proportionnelle au carré de l'intensité de la lumière utilisée pour l'inscription du réseau, ce qui correspond à un processus d'absorption à deux photons [Lam 1981] (absorption de deux photons, émission d'un photon). L'utilisation d'un seul photon de fréquence double et donc de longueur d'onde moitié, soit 244 nm, a permis d'améliorer considérablement l'efficacité du processus d'absorption et par voie de conséquence celle du protocole d'inscription de réseau de Bragg. Dans l'expérience de G. Meltz, la figure d'interférence est donc générée par un interféromètre à deux ondes et un laser à 244 nm. Le pas Λ de la figure d'interférences se réglant simplement en changeant l'angle θ entre les deux faisceaux qui interfèrent (cf. fig. 2.6), il est désormais possible de choisir la longueur d'onde de la lumière réfléchie par le réseau. La relation entre le pas Λ et l'angle θ est donnée par l'équation :

$$\Lambda = \frac{\lambda_0}{2 \sin \theta} \quad (2.10)$$

où λ_0 est la longueur d'onde du rayonnement UV servant à l'inscription du réseau. Le principal avantage du banc interférométrique transverse (par exemple de type miroir de Lloyd) est donc de donner accès à tout un éventail de longueurs d'ondes de Bragg ; son inconvénient se situe au niveau de la difficulté des réglages.

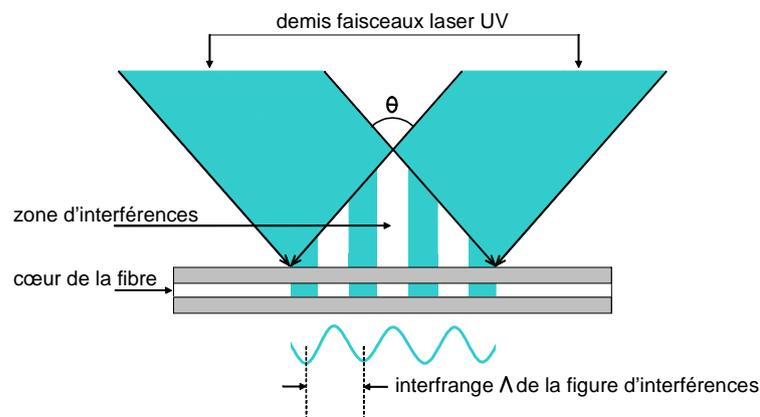


Figure 2.6: Inscription d'un réseau par la méthode interférométrique transverse. Le pas du réseau Λ est égal à l'interfrange de la figure d'interférences, réglée en changeant l'angle θ entre les deux demi-faisceaux.

Méthode du masque de phase Quelques années plus tard, une seconde méthode d'inscription fut mise au point, celle du masque de phase [Hill 1993a, Hill 1993b], dont le principal intérêt réside dans la simplicité du montage optique. Le masque de phase consiste en une lame de verre transparente aux UV, sur laquelle sont gravés des sillons régulièrement espacés d'une distance d . Le principe consiste à placer la fibre à insoler au quasi contact du masque, perpendiculairement aux traits de ce dernier, puis à éclairer l'ensemble à l'aide d'un faisceau UV collimaté en incidence normale. En traversant le masque, le faisceau UV est diffracté suivant plusieurs ordres. Or, en jouant sur la profondeur des sillons, il est possible de

concentrer l'énergie dans les ordres impairs et obtenir ainsi jusqu'à 40 % de l'énergie dans les premiers ordres pour seulement quelques pour-cent dans l'ordre zéro. Les faisceaux d'ordre $+1$ et -1 forment, en interférant, un système de franges qui éclaire la fibre (cf. fig. 2.7). La période du réseau de Bragg inscrit par cette méthode est donc égale à la moitié du pas du masque de phase ($\Lambda = d/2$). Comme le pas du réseau est fixé par celui du masque, il faut disposer d'un masque de phase pour chaque longueur d'onde de Bragg, c'est là l'inconvénient majeur de ce dispositif ; *a contrario*, il assure la reproductibilité des conceptions, très utile en production..

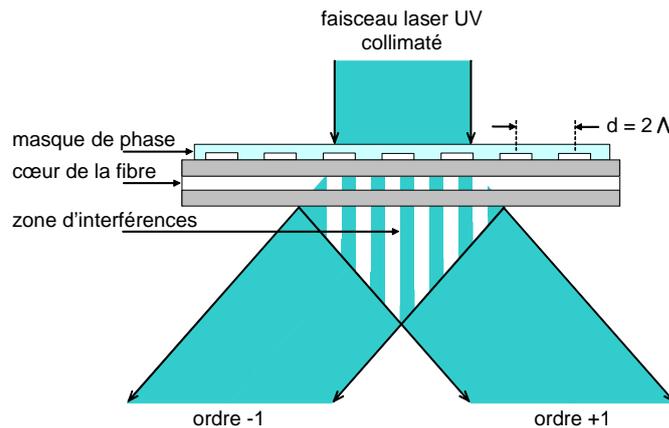


Figure 2.7: Inscription d'un réseau par la méthode du masque de phase. Le pas du réseau Λ est égal à l'interfrange de la figure d'interférences, soit la moitié du pas d du masque de phase.

Il existe d'autres méthodes d'inscription, mais celles qui viennent d'être présentées sont les deux les plus utilisées. Par ailleurs, il est important de rappeler que les caractéristiques finales d'un réseau de Bragg ne dépendent pas seulement de son pas. D'autres paramètres d'inscription, tels que la longueur d'onde, le régime de fonctionnement (impulsionnel ou continu) et la puissance du laser utilisé, la longueur du réseau, l'indice effectif de propagation des ondes dans la fibre optique utilisée pour l'inscription ou encore l'amplitude de la modulation d'indice, ont une incidence. Ils agissent aussi bien sur la réflectivité maximale à la longueur d'onde de Bragg du réseau, la largeur du pic à mi-hauteur ainsi que sur sa capacité à supporter des températures élevées [Guan 2000, Fokine 2004] ou de forts allongements. Aussi les qualités intrinsèques (coefficients thermo-optique, élasto-optique) des matériaux (verres) qui constituent les fibres optiques ont-elles une influence sur les propriétés de transduction des réseaux de Bragg.

2.2.3 Classification des réseaux de Bragg

Les propriétés de transduction des réseaux de Bragg sont en partie liées à la valeur du pas Λ et au profil de la modulation d'indice. Ainsi, un réseau à pas court présente généralement un Λ inférieur au micron tandis que cette valeur excède la centaine de microns dans le cas d'un réseau à pas long. Parallèlement, les réseaux de Bragg, à pas long ou à pas court, se distinguent par leur profil de modulation d'indice, uniforme ou non.

Il existe de nombreux types de réseaux de Bragg dont les profils d'indice dépendent des applications auxquelles ils sont destinés. Ne seront présentées ici que des applications faisant intervenir des réseaux de Bragg uniformes à pas court (les plus courants) ou long ainsi que des réseaux à pas court et traits inclinés (ces deux derniers étant en particulier sensibles aux variations d'indice de réfraction du milieu qui les entoure).

2.2.3.1 Réseaux de Bragg uniforme

Dans ce type de réseaux de Bragg, la modulation d'indice photoinduite est uniforme, aussi bien longitudinalement (période constante) que dans une section transverse du cœur de la fibre optique (modulation d'indice perpendiculaire à l'axe de propagation de la fibre). L'évolution de l'indice de réfraction du cœur, sur la portion de fibre de longueur L correspondant au réseau et suivant son axe de propagation z , est purement sinusoïdale. En fonction du pas de cette sinusoïde, les réseaux uniformes présentent des réponses spectrales et des fonctionnalités très différentes. De manière générale, ils se divisent en deux catégories :

- (i) les réseaux à pas court (ou réflecteur de Bragg) dans lesquels le couplage se produit entre des modes se propageant en sens opposés ;
- (ii) les réseaux à pas long dans lesquels le couplage se produit entre des modes qui se propagent dans la même direction.

Pour appréhender le fonctionnement de tels réseaux, une approche simple consiste à les assimiler à de simples réseaux de diffraction. Les modes de la fibre optique peuvent alors être représentés selon une approche géométrique de la propagation, c'est-à-dire sous la forme de pinceaux de rayons lumineux [Erdogan 1997]. Ainsi, le mode fondamental incident se propageant sous la forme d'un rayon lumineux incliné d'un angle θ_1 par rapport à la normale à l'axe de propagation de la fibre est diffracté par le réseau de Bragg dans le cœur de la fibre selon l'équation habituelle de la diffraction [Brorson 1988] :

$$n \cdot \sin(\theta_2) = n \cdot \sin(\theta_1) + p \cdot \frac{\lambda}{\Lambda} \quad (2.11)$$

où θ_2 est l'angle du rayon diffracté par rapport à la normale à l'axe de propagation de la fibre et l'entier relatif p l'ordre de diffraction (cf. fig. 2.8). Dans un réseau de Bragg, c'est généralement l'ordre -1 qui domine.

Réseau à pas court La période typique d'un réseau de Bragg uniforme à pas court (réseau standard) est de l'ordre de $0,5 \mu\text{m}$, ce qui correspond à une longueur d'onde de Bragg située dans la fenêtre spectrale des télécommunications optiques, soit $1,5 \mu\text{m}$. Comme le montre la figure 2.8.a, dans le cas d'un réseau à pas court, l'ordre -1 de diffraction correspond à un faisceau contra-propagatif (se propageant en sens opposé à celui du faisceau incident). Pour que ce faisceau soit guidé, l'angle θ_2 doit respecter les conditions de réflexion totale à l'interface cœur-gaine de la fibre optique et être associé à un mode guidé de la fibre optique. Si la fibre optique est monomode, ces conditions ne peuvent être remplies que si $\theta_2 = -\theta_1$ (cf.

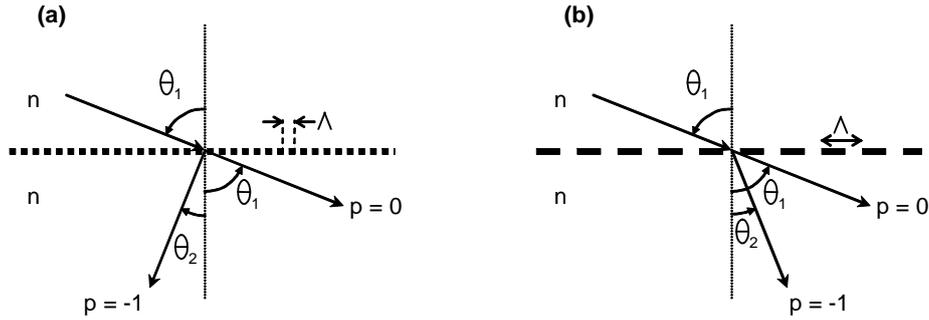


Figure 2.8: Diffraction de la lumière par un réseau à pas Λ court (a) ou long (b).

fig. 2.9). Il y a ainsi couplage entre les deux modes fondamentaux guidés contra-directifs. La relation de Bragg est retrouvée :

$$\lambda_{Bragg} = 2n_{eff} \cdot \Lambda \quad (2.12)$$

avec $n_{eff} = n_{cœur} \cdot \sin(\theta_1)$.

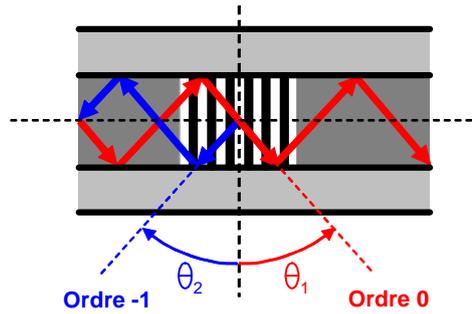


Figure 2.9: Couplage du mode fondamental co-propagatif avec le mode fondamental contra-propagatif, induit par un réseau de Bragg à traits droits inscrit dans une fibre monomode.

Réseau à pas long L'utilisation de réseaux à pas long est beaucoup plus récente. La première publication sur le sujet remonte à 1996 [Vengsarkar 1996]. Les périodes de ces réseaux sont supérieures d'au moins un facteur 100 à celles des réseaux à pas court. Elles valent typiquement plusieurs centaines de micromètres. Comme le montre la figure 2.8.b, dans le cas d'un réseau à pas long, l'ordre -1 de diffraction correspond à un faisceau co-propagatif (se propageant dans le même sens que celui du faisceau incident). Ainsi, contrairement aux réseaux de Bragg à pas court employés habituellement comme réflecteurs, les réseaux de Bragg à pas long sont utilisés en transmission. Si la fibre optique est monomode, l'angle θ_2 ne peut jamais correspondre à un mode guidé (cf. fig. 2.10). Le couplage s'opère donc entre le mode fondamental incident et des modes de gaine co-propagatifs. Pour que le mode fondamental du cœur puisse se coupler dans la gaine, l'angle θ_2 doit respecter les conditions de réflexion totale à l'interface gaine / milieu extérieur de la fibre optique et être associé à

un mode de gaine. La condition de résonance se réécrit alors sous la forme :

$$\lambda_{res} = (n_{eff,coeur} - n_{eff,gaine}^m) \cdot \Lambda \quad (2.13)$$

où λ_{res} est la longueur d'onde de résonance, $n_{eff,coeur}$ l'indice effectif du mode se propageant dans le coeur et $n_{eff,gaine}^m$ l'indice effectif du $m^{ième}$ mode de gaine. Le signe $-$ résulte du couplage de faisceaux co-propagatifs.

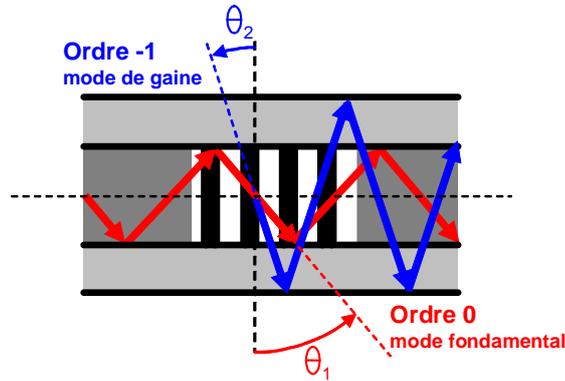


Figure 2.10: Couplage induit par un réseau de Bragg uniforme à pas long entre un mode guidé et un mode de gaine co-propagatif.

Ainsi, un réseau de Bragg à pas long engendre des pertes sélectives en longueur d'onde, présentes sur le spectre de transmission, par couplage du mode fondamental vers des modes de gaine co-propagatifs. Aucune énergie optique n'est réfléchi aux longueurs d'onde voisines de celles définies par la relation (2.13).

Dans le cas d'un réseau à pas court, le couplage du mode fondamental vers des modes de gaine contra-propagatifs associés à l'extension limitée de la gaine optique possède des propriétés similaires : ces modes de gaine ne se propageant que sur de très courtes distances, aucune trace de ce couplage n'apparaît au niveau de la réponse en réflexion. Cependant, deux différences essentielles distinguent les spectres de transmission de réseaux de Bragg à pas court et long. D'une part, l'écart spectral entre deux résonances consécutives n'excède généralement pas le nanomètre tandis qu'il atteint plusieurs dizaines de nanomètres pour un réseau de Bragg à pas long. D'autre part, la largeur à mi-hauteur d'une résonance donnée ne vaut que quelques centaines de picomètres, contre plusieurs nanomètres dans le cas d'un réseau de Bragg à pas long. Par ailleurs, la sensibilité thermique des réseaux à pas long est très supérieure à celle des réseaux à pas court.

2.2.3.2 Réseau à pas court et traits inclinés

Les réseaux de Bragg à pas court et traits inclinés, aussi appelés réseaux blazés, sont des réseaux à profil radial non uniforme, dans lesquels la modulation d'indice est inclinée d'un angle θ par rapport à la perpendiculaire à l'axe de propagation de la fibre [Erdogan 1996]. Du fait de la rupture de symétrie introduite par l'inclinaison des traits de la modulation d'indice, les caractéristiques spectrales de ce type de réseau sont plus complexes que celles des réseaux

uniformes. Le couplage du mode fondamental vers des modes de gaine contra-propagatifs (cf. fig. 2.11) se traduit par un grand nombre de résonances sur le spectre de transmission. La condition de résonance se met alors sous la forme :

$$\lambda_{res} = (n_{eff,cœur} - n_{eff,gaine}^m) \cdot \frac{\Lambda}{\cos \theta} \quad (2.14)$$

où λ_{res} est la longueur d'onde de résonance, $n_{eff,cœur}$ l'indice effectif du mode se propageant dans le cœur et $n_{eff,gaine}^m$ l'indice effectif du $m^{ième}$ mode de gaine. Le signe + résulte du couplage de faisceaux contra-propagatifs.

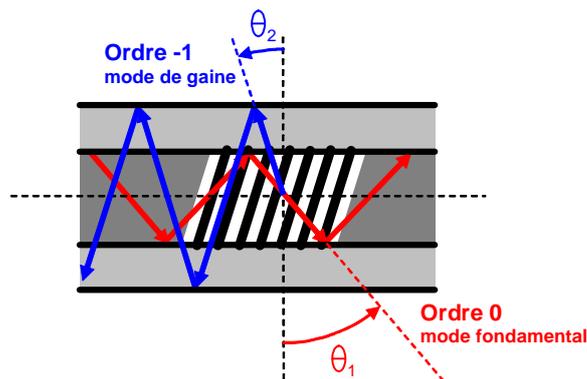


Figure 2.11: Couplage induit par un réseau de Bragg à pas court et à traits inclinés entre le mode fondamental guidé et un mode de gaine contra-propagatif.

2.2.4 Transducteurs à réseaux de Bragg

La ou les longueurs d'onde de résonance d'un réseau de Bragg dépendent du pas du réseau et de l'indice effectif du ou des modes guidés (dans le cœur et / ou dans la gaine). Ainsi, tout phénomène venant perturber l'un de ces paramètres engendre une modification de la ou des longueurs d'onde de résonance. Le suivi de ces déplacements spectraux permet donc de remonter aux paramètres physico-chimiques inducteurs [Ferdinand 1999]. Classiquement, les réseaux de Bragg permettent d'effectuer des mesures de température, déformations, pression et d'indice de réfraction.

2.2.4.1 Sensibilité des réseaux standard

Dans le cas d'un réseau standard (uniforme à pas court) inscrit dans une fibre optique monomode, il existe une seule longueur d'onde de résonance sur le spectre en réflexion appelée longueur d'onde de Bragg. Le décalage spectral relatif de cette dernière est couramment utilisé pour mesurer des variations de température ou d'état de contraintes ¹. Il peut être

¹La fibre subit des contraintes mais on réalise la mesure au travers de déformations (relatives). La fibre à réseau de Bragg est donc une jauge de déformation (strain gauge) et non une jauge de contraintes comme certains auteurs l'indiquent parfois de manière erronée.

décomposé sous la forme d'une somme de trois contributions relatives à la température ΔT , aux allongements $\varepsilon = \Delta L/L$ dans l'axe du guide et à la pression exercée sur la fibre ΔP :

$$\Delta\lambda_B/\lambda_B = a \cdot \Delta T + b \cdot \varepsilon + c \cdot \Delta P \quad (2.15)$$

avec a , b et c des coefficients dépendant des caractéristiques de la fibre. Ainsi, une mesure précise du décalage spectral de la longueur d'onde de Bragg par rapport à une référence initiale permet de remonter à l'amplitude des variations du phénomène qui en est responsable.

Sensibilité thermique La dépendance en température de la longueur d'onde de Bragg correspond à la superposition de deux phénomènes. D'une part, la dilatation (ou la contraction) de la silice qui a pour effet de modifier le pas du réseau. D'autre part, la dépendance de l'indice de réfraction de la silice à la température (effet thermo-optique) qui modifie l'indice effectif de propagation. Le décalage spectral relatif lié aux variations de température peut ainsi s'écrire sous la forme :

$$\Delta\lambda_B/\lambda_B = a \cdot \Delta T = \left[\frac{1}{\Lambda} \cdot \frac{d\Lambda}{dT} + \frac{1}{n} \cdot \frac{dn}{dT} \right] \cdot \Delta T \quad (2.16)$$

Dans la bande spectrale centrée sur 1500 nm, la sensibilité en température du réseau de Bragg à température ambiante est de l'ordre de 10 pm/K. Elle augmente légèrement à haute température (elle double pratiquement vers 1000 K) [Ternier 1998] et diminue asymptotiquement vers zéro lorsque les températures deviennent cryogéniques. Pour résoudre ce problème, une technique consiste à amplifier les variations de pas du réseau en fixant la fibre à réseau de Bragg sur un substrat possédant un fort coefficient de dilatation thermique tel que l'aluminium, le téflon [Mizunami 2001] ou le poly(méthyl méthacrylate) [Gupta 1996].

Sensibilité aux déformations L'allongement d'une fibre à réseau de Bragg sous l'effet de contraintes est également susceptible de modifier la longueur d'onde caractéristique du réseau. Dans le cas simple où un réseau de Bragg soumis à une contrainte d'origine mécanique supporte un allongement axial $\varepsilon = \Delta L/L$ où L représente la longueur de fibre optique, la variation de longueur d'onde de Bragg se décompose sous la forme d'une somme de trois effets :

- (i) Effet mécanique : l'allongement longitudinal de la fibre modifie le pas du réseau. Le décalage relatif du pas est égal à l'allongement subi par la fibre : $\Delta\Lambda/\Lambda = \Delta L/L = \varepsilon$.
- (ii) Effet élasto-optique : la variation de l'indice de réfraction par déformation de la fibre modifie l'indice effectif de propagation. Cet effet est caractérisé par les coefficients élasto-optiques p_{11} et p_{12} du matériau, silice en général, constituant la fibre.
- (iii) Effet de contraction transversale : la diminution du diamètre de la fibre induit également des variations d'indice effectif. Elle est liée au coefficient de Poisson ν du matériau.

Ainsi, la variation de longueur d'onde de Bragg d'un réseau de Bragg subissant une contrainte axiale ε est donné par la relation [Ferraro 2002] :

$$\Delta L/L = (1 - p_e) \cdot \varepsilon \quad (2.17)$$

avec p_e le coefficient photo-élastique du cœur de la fibre. Ce coefficient s'exprime en fonction de l'indice de réfraction du cœur de la fibre optique n_c , des coefficients élasto-optiques p_{11} et p_{12} et du coefficient de Poisson ν du matériau constituant la fibre. Pour une fibre de silice, il vaut environ 0,22 [Kersey 1997] et la relation (2.17) devient :

$$\Delta L/L = 0,78 \cdot \varepsilon \quad (2.18)$$

Ainsi, pour une longueur d'onde de Bragg située aux alentours de 1500 nm, un allongement de 1 $\mu\text{m}/\text{m}$ provoque un décalage spectral d'environ 1,2 pm. La valeur exacte dépend ensuite des caractéristiques propres de la fibre, telles que son dopage.

Sensibilité à la pression hydrostatique Lorsqu'une fibre à réseau de Bragg est soumise à une variation de pression, elle se dilate ou se contracte, ce qui modifie le pas du réseau. De plus, l'indice de réfraction du matériau constituant la fibre dépend de la pression. Ainsi, le décalage spectral lié à une variation de pression peut être scindé en deux termes, le premier étant lié à la déformation mécanique et le second à la variation d'indice [Hocker 1979] :

$$\Delta\lambda_B/\lambda_B = c \cdot \Delta P = \left[\frac{1}{\Lambda} \cdot \frac{d\Lambda}{dP} + \frac{1}{n} \cdot \frac{dn}{dP} \right] \cdot \Delta P \quad (2.19)$$

Dans le cas simple d'un réseau de Bragg inscrit dans une fibre optique de silice dopée au germanium et soumise à de simples variations de pression hydrostatique, c'est-à-dire plongée dans un fluide immobile, la valeur du coefficient c est de l'ordre de $-5 \cdot 10^{-6} \text{ MPa}^{-1}$ [Xu 1993]. Ainsi, la sensibilité d'un réseau dont la longueur d'onde de Bragg se situe aux alentours de 1500 nm est de l'ordre de $-7,5 \text{ pm/MPa}$ ($-0,75 \text{ pm/bar}$).

2.2.4.2 Sensibilité à l'indice de réfraction environnant

Les réseaux de Bragg standard sont très peu sensibles aux variations d'indice de réfraction du milieu qui les entoure car il n'y a pas d'interaction entre ce dernier et le mode fondamental qui se propage dans le cœur de la fibre. Il reste confiné dans le cœur guidant et par conséquent demeure isolé du milieu extérieur par une couche de plusieurs dizaines de microns de silice. En revanche, la résonance de Bragg d'un réseau standard inscrit dans le cœur d'une fibre microstructurée est potentiellement sensible aux variations d'indice de réfraction d'un fluide présent dans les canaux qui parcourent la gaine [Phan Huy 2006b]. De la même façon, la présence de modes de gaine dans les fibres à réseaux blazés [Laffont 2001c] ou uniformes à pas long [Patrick 1998] rend ces composants sensibles aux variations d'indice du milieu qui les entoure.

Réseaux standard dans les fibres microstructurées Les micro-canaux des fibres microstructurées (cf. fig. 2.12) peuvent être utilisés pour la circulation de fluides. Dans ce cadre, le principal avantage de ces fibres sur les fibres standard réside dans leur structure transverse qui renforce les interactions du champ optique de l'onde qui s'y propage avec les

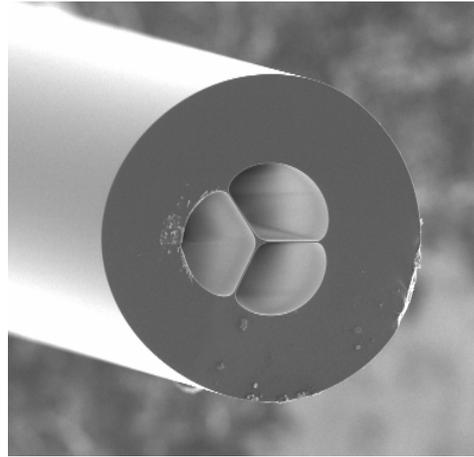


Figure 2.12: Photographie d'une fibre microstructurée développée au Laboratoire de mesures optiques constituée d'une couronne de trois trous.

fluides présents dans les canaux. La sensibilité de la résonance de Bragg vis-à-vis de l'indice de réfraction du milieu inséré dans les canaux de la fibre peut être optimisée en favorisant ces interactions. Rappelons que pour que le mode s'étende dans la gaine et interagisse avec le milieu, la longueur d'onde d'étude et le diamètre du cœur de la fibre doivent être du même ordre de grandeur. Ainsi, le choix doit s'orienter vers un profil de fibre microstructurée constitué d'une ou plusieurs couronnes de trous et d'un petit cœur de diamètre proche de la longueur d'onde de travail. Les contraintes pratiques telles que l'inscription du réseau de Bragg ou l'insertion de fluides dans les canaux de la fibre permettent ensuite de préciser les caractéristiques optogéométriques de la fibre (diamètre des canaux, nombre de couronnes). La réalisation et l'étude de fibres microstructurées à réseaux de Bragg destinées à des applications de réfractométrie a fait l'objet d'une thèse au Laboratoire de Mesures Optiques [Phan Huy 2006a].

Réseaux uniformes à pas long Rappelons que dans une fibre à réseau de Bragg uniforme à pas long, le couplage s'effectue entre le mode fondamental et un mode de gaine co-propagatif. Aussi la sensibilité à l'indice de réfraction du milieu qui entoure un tel réseau provient-elle de la dépendance de la condition de résonance (cf. eq. 2.13) à l'indice effectif des modes de gaine. Les changements d'indice de réfraction du milieu entourant le réseau se traduisent par des modifications de l'indice effectif du mode de gaine et donc un décalage spectral de la résonance dont l'amplitude dépend de la plage d'indice de réfraction sur laquelle sont effectuées les mesures [Bhatia 1996, Patrick 1998, Khaliq 2002]. La sensibilité des réseaux uniformes à pas long est adéquate pour des indices de réfraction inférieurs à celui de la gaine et s'accroît lorsqu'il s'en rapproche. En revanche, lorsque l'indice de réfraction dépasse celui de la gaine, cette dernière ne fait plus office de guide d'onde et la sensibilité chute. D'autre part, les mesures réfractométriques fondées sur l'utilisation de réseaux uniformes à pas long peuvent être gênées par la grande sensibilité croisée de ce type de réseaux à la température et aux déformations subies par la fibre. Pour mesurer les variations d'indice, il est donc

généralement nécessaire de découpler les différents paramètres d'influence, en utilisant par exemple des réseaux standard insensibles aux variations d'indice.

Réseaux à pas court et traits inclinés Dans un réseau à traits inclinés (ou réseau blazé), la rupture de symétrie de révolution du composant autorise des couplages entre le mode fondamental guidé et des modes de gaine (cf. fig. 2.13) dont la partie évanescente du champ est susceptible d'interagir très fortement avec un milieu entourant la fibre optique. Ainsi, selon l'indice de réfraction du fluide extérieur, une partie de l'énergie diffracté par un réseau blazé peut être couplée à des modes radatifs.

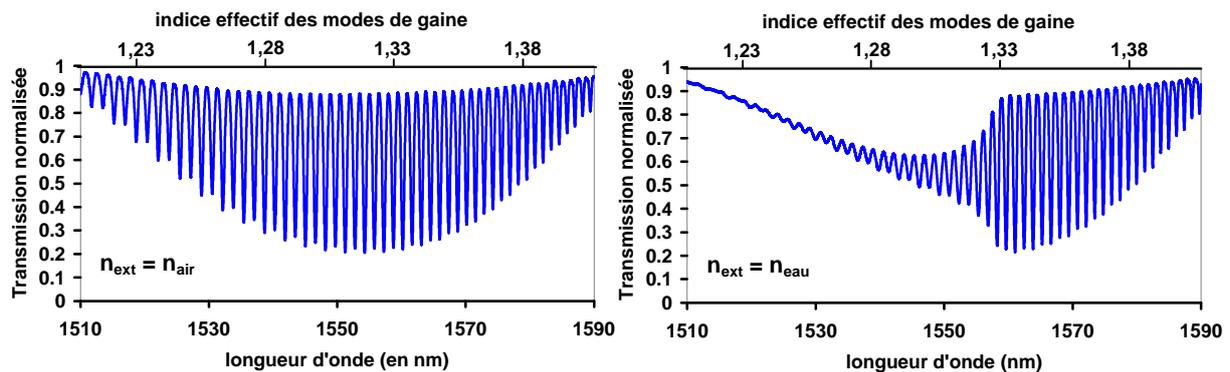


Figure 2.13: Spectres de transmission d'un réseau blazé pour deux valeurs d'indice de réfraction du milieu extérieur, dans l'air et dans l'eau.

Les réseaux en angle présentent une réponse spectrale plus complexe que les réseaux simples. Le grand nombre de résonances spectrales traduit le caractère multimodal de la cavité optique constituée par la gaine de la fibre. Comme le montre la figure 2.13, ce spectre est fortement sensible aux changements d'indice de réfraction du milieu extérieur. Lorsque l'indice de réfraction augmente, les résonances associées aux modes de gaines qui se propagent avec un indice effectif inférieur à celui du milieu disparaissent et l'apparence globale du spectre est modifiée. Le mode guidé fondamental n'est plus seulement couplé vers les modes de gaine contra-propagatifs, mais également vers le continuum de modes radatifs. Les variations de l'aire délimitée par les enveloppes supérieure et inférieure peuvent être utilisées comme élément de transduction d'un capteur d'indice. Cette méthode a été développée au cours d'une thèse effectuée au Laboratoire de Mesures Optiques [Laffont 2001a]. Une autre méthode, plus rapide en terme de traitement informatique, d'exploitation des variations spectrales a été mise au point pour l'exploitation de résultats présentés dans ce manuscrit. Elle est décrite en deuxième partie.

Lorsque l'indice du milieu extérieur atteint celui de la gaine, les modes de gaine ne sont plus guidés, les résonances disparaissent et la réponse spectrale du réseau devient une courbe lisse. Enfin, dans le cas où l'indice de réfraction extérieur prend des valeurs supérieures à celle de l'indice de la gaine optique, l'augmentation de l'indice de réfraction a pour conséquence la réapparition d'un couplage sélectif en longueur d'onde, et ce sur l'ensemble du spectre : il s'agit de réflexions de Fresnel. Une partie de l'énergie se retrouve dans la cavité sous forme de

modes de gaine et comme la valeur du coefficient de Fresnel croît avec l'indice de réfraction extérieur, l'amplitude de ces résonances augmente aussi [Laffont 2001b].

Chapitre 3

Principe de fonctionnement des biocapteurs

Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'espèces biochimiques et biologiques sont souvent coûteux, complexes et volumineux. D'autre part, les phases de préparation et d'incubation des échantillons ainsi que l'exploitation des résultats augmentent la durée totale d'analyse. Suite aux premiers travaux réalisés par Clark et Lyons [Clark Jr 1962] pour la détection du glucose, des efforts de recherche considérables ont été produits pour développer des dispositifs plus simples et plus compacts, appelés biocapteurs. Ils sont aujourd'hui considérés comme une solution complémentaire particulièrement intéressante aux techniques analytiques traditionnelles telles que la chromatographie ou la spectrométrie.

3.1 Définition

Un biocapteur est un dispositif analytique qui se situe à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Conçu pour transformer un phénomène biochimique ou biologique en un signal mesurable, il combine un élément de reconnaissance moléculaire appelé *biorécepteur* à un *transducteur* représentant le mode de détection.

Le biorécepteur confère une sélectivité à l'interaction biomolécule-analyte cible. Le transducteur joue ensuite le rôle d'un traducteur en convertissant les interactions ou les reconnaissances physico-chimiques entre le biorécepteur et la substance cible en un signal physique (électrique, optique ou autre). Ces signaux seront ensuite traités et corrélés par exemple à la concentration de molécule cible.

3.2 Les biorécepteurs

Le fonctionnement des biocapteurs nécessite l'utilisation d'un biorécepteur dont dépend le signal biologique émis. Au moins trois types de molécules biospécifiques peuvent jouer le

rôle de biorécepteur. Les immunoespèces (anticorps, antigène), les enzymes et les acides nucléiques (ADN, ARN) servent à concevoir respectivement des capteurs immunologiques, des capteurs enzymatiques, et des biopuces. Le principe de détection du capteur immunologique repose sur les modifications physico-chimiques de la couche sensible, induites par la formation des complexes immuns. Dans le cas du capteur enzymatique, la mesure s'effectue par l'intermédiaire de la détection d'un produit de la réaction chimique catalysée par l'enzyme. Enfin, le fonctionnement des biopuces repose sur des phénomènes d'hybridation.

Il est également possible de concevoir des biocapteurs à base de cellules entières. La détection consiste alors à suivre certains signaux représentatifs de leur métabolisme.

3.2.1 Les anticorps

Les anticorps sont couramment utilisés pour la conception de biocapteurs car ces protéines possèdent des sites capables de reconnaître spécifiquement une substance cible, qui constitue l'antigène correspondant.

Les anticorps sont formés de quatre chaînes polypeptidiques, dont deux lourdes et deux légères. Elles sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. Chaque chaîne polypeptidique est formée d'une partie constante et d'une partie variable. Les parties constantes sont caractérisées par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre. Ils ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Les parties variables sont situées aux extrémités des deux « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère constitue le site de reconnaissance de l'antigène. Ainsi, un anticorps possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras (cf. fig. 3.1). Ces deux sites sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps [Janeway 2003].

La détection de l'interaction anticorps-antigène peut être basée sur des méthodes dites de marquage. En effet, de nombreux travaux ont eu recours au marquage de l'anticorps ou de l'antigène par une enzyme ou un fluorochrome qui permet de suivre facilement la réaction de reconnaissance moléculaire. Cependant, ce sont les méthodes de détection immunologique directe, c'est-à-dire n'utilisant pas de molécules marquées, qui suscitent aujourd'hui un intérêt croissant. La mise au point de ces méthodes suppose qu'un signal physique induit par la formation du complexe immun (ou complexe antigène-anticorps) puisse être mesuré. À ce jour, les modes de détection optique, piézoélectrique et électrochimique ont déjà été envisagés.

3.2.2 Les enzymes

Une enzyme est un catalyseur biologique, une protéine permettant d'accélérer jusqu'à dix millions de fois les réactions chimiques se déroulant aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de

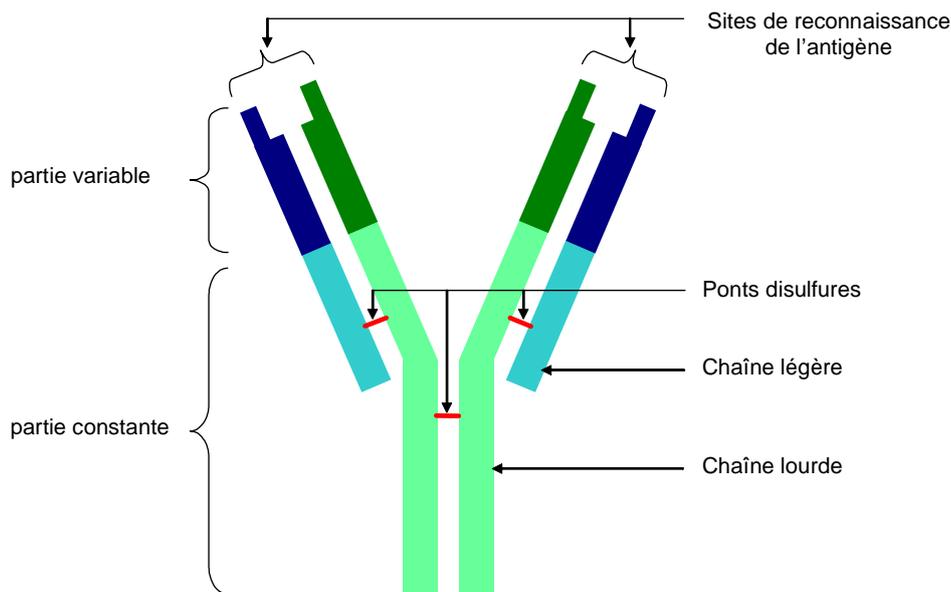


Figure 3.1: Schéma de la structure d'un anticorps

la cellule [Splittgerber 1985]. Elles agissent à faible concentration et se retrouvent intactes en fin de réaction.

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site actif dans lequel peut venir se fixer le substrat de forme complémentaire. Une fois fixé, le substrat va réagir pour donner le produit. Le site actif est donc une zone particulièrement importante de la protéine puisqu'elle assure la fixation du substrat (site de fixation) et sa transformation (zone du site de fixation correspondant au site de catalyse). Les enzymes présentent ainsi une grande spécificité par rapport aux substrats et vis-à-vis des réactions qu'elles catalysent.

La spécificité de la réaction que catalyse chaque enzyme en fait un biorécepteur adapté à la conception de biocapteurs sélectifs. Ainsi, de nombreux travaux portent sur la mise au point de biocapteurs permettant le suivi de l'activité enzymatique [Dzyadevych 2003]. Le suivi des réactions enzymatiques est généralement assuré par l'intermédiaire des quantités de produits formés ou de réactifs disparus. Cependant, de nombreux facteurs, tels que les concentrations en enzyme et en substrat ou les caractéristiques physico-chimiques du milieu (température, pH, etc.) peuvent venir perturber les réactions enzymatiques et doivent être ajustés pour optimiser les performances des biocapteurs enzymatiques.

3.2.3 L'ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) renferme les informations nécessaires à la synthèse des protéines. Les séquences formées à partir des quatre molécules de base de l'ADN, appelées nucléotides (adénine, guanine, cytosine, thymine), constituent un message codé portant l'information génétique. Chaque molécule d'ADN est composée de deux brins complémentaires se faisant face et formant une double hélice [Watson 1953], les nucléotides ayant la

particularité de s'apparier sélectivement deux à deux. La succession de nucléotides trouvée dans un brin possède une unique succession de nucléotides complémentaires avec laquelle il peut interagir.

Le principe de la puce à ADN repose sur la sélectivité de l'interaction entre deux chaînes de nucléotides et la capacité d'un brin d'ADN à reformer spontanément la double hélice face au brin complémentaire. Le champ d'application de cette technique s'étend à un grand nombre de problèmes biologiques tels que le séquençage du génome humain [Brown 1999], l'étude de l'expression d'un gène ou la recherche des mutations ponctuelles responsables de certaines maladies génétiques comme la mucoviscidose [Mannelli 2006].

Il est aujourd'hui possible de fixer sur une même plaque plusieurs dizaines de milliers de fragments de brins d'ADN complémentaires des chaînes à détecter.

3.2.4 Les cellules entières

Les cellules entières possèdent de nombreuses enzymes membranaires. Il est possible de suivre certains signaux représentatifs du fonctionnement de ces enzymes ainsi que leur perturbation après une exposition à un toxique.

Les cultures de cellules sont souvent simples à mettre en œuvre. Ainsi, leur utilisation directe permet de s'affranchir des étapes d'extractions ou de purifications nécessaires dans le cas de biocapteurs à enzymes pures. Enfin, étant donné qu'elles sont sollicitées dans leur environnement naturel, les enzymes membranaires (présentes sur les membranes cellulaires) sont plus stables et moins sensibles aux variations des caractéristiques physico-chimiques du milieu que les enzymes pures [D'Souza 2001].

Afin d'étendre le domaine d'application de ce type de biorécepteur, il est possible d'utiliser des cellules génétiquement modifiées. Généralement, un *gène marqueur* (ou rapporteur), codant pour un produit rapidement visualisable et précisément quantifiable, est fusionné avec une séquence de nucléotides appelée *promoteur*, qui régule l'expression du gène associé.

Certains promoteurs ont la particularité d'être impliqués dans les réponses cellulaires à certains changements du milieu environnant. Par exemple, en associant le gène marqueur *lacZ* codant pour l'enzyme β -galactosidase à des promoteurs *zntA* répondant à la présence de métaux lourds, le signal de fluorescence émis par les cellules est directement proportionnel à la concentration du milieu en métaux lourds [Biran 2003].

3.3 Les méthodes de transduction

Les méthodes de transduction permettent de transformer les phénomènes physiques résultant des interactions biomoléculaires avec le biorécepteur en un signal observable et quantifiable. Les méthodes basées sur l'utilisation de marqueurs fluorescents sont progressivement complétées par des méthodes permettant d'éviter toute modification moléculaire et assurant un

suivi en temps réel du déroulement des interactions entre molécule cible et biorécepteur. Les modes de détection thermiques, reposant sur la mesure des variations de température associées aux réactions chimiques, électrochimiques, étudiant les variations de charge, acoustiques, exploitant les variations de masse, et optiques, mettant à profit les variations des propriétés optiques des surfaces, font aujourd'hui l'objet de nombreux travaux de recherche.

3.3.1 Les transducteurs thermiques

Décrit pour la première fois en 1976 par Spink et Wadso [Ramanathan 2001a], le mode de transduction thermique repose sur la transformation du signal biochimique correspondant à la réaction entre le biorécepteur et la molécule cible en un signal thermique. Le composé biologique immobilisé est relié à un microcalorimètre ou à une résistance thermique capable de mesurer les changements de température liés à la réaction.

Les biocapteurs thermiques les plus utilisés sont de type enzymatique. La concentration en molécule cible est proportionnelle à la variation de température associée à la réaction enzymatique, qui peut être exothermique ou endothermique. Ce type de biocapteur enzymatique est un peu particulier puisqu'il ne repose pas sur la mesure des quantités de produits issus de la réaction.

Les biocapteurs thermiques actuels permettent de faire des mesures différentielles. Un premier capteur de température sert de référence afin de s'affranchir du bruit de fond provenant des variations thermiques du milieu. L'enzyme bioréceptrice est immobilisée sur un second capteur pour mesurer les changements de température liés à la réaction enzymatique.

Ces biocapteurs, réutilisables et adaptés aux mesures en continu, sont principalement utilisés dans les domaines pharmaceutique et clinique, comme par exemple pour le dosage du cholestérol [Raghavan 1999] ou du glucose [Ramanathan 2001b, Harborn 1997].

3.3.2 Les transducteurs électrochimiques

Les transducteurs électrochimiques sont classés en trois catégories [Stetter 2003] : les détecteurs potentiométriques, ampérométriques et conductimétriques. Dans tous les cas, les interactions biologiques sont détectées *via* l'enregistrement des variations de densité de charges présentes en solution ou sur une surface comprise entre deux électrodes.

3.3.2.1 Capteurs potentiométriques

Le principe de fonctionnement des capteurs potentiométriques repose sur la mesure, à courant constant ou nul, de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une autre de ré-

férence [Killard 2000]. Grace à la loi de Nernst¹, il est possible de remonter à la concentration de l'espèce chimique à doser, le signal étant proportionnel au logarithme de sa concentration.

Pour les réactions d'électrodes réversibles (oxydo-réduction) et à l'équilibre, l'équation de Nernst est applicable :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Ox]}{[Réd]} \right) \quad (3.1)$$

E_0 : potentiel standard du couple oxydant-réducteur de la réaction d'électrode,

R : constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$),

T : température absolue (en K),

n : nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction,

F : constante de Faraday (96487 C.mol^{-1}).

$[Ox]$ et $[Réd]$: concentrations de l'oxydant et du réducteur de la réaction d'électrode (ou plutôt les concentrations de tout ce qui se trouve du côté de l'oxydant et de tout ce qui se trouve du côté du réducteur, notamment les éventuels protons H^+ , puisque cette formule sert souvent à calculer le pH d'une solution)

L'électrode potentiométrique la plus utilisée est l'électrode de pH . C'est la composition particulière de sa membrane, constituée d'un verre spécial échangeur de protons, qui lui confère sa sensibilité. Des électrodes spécifiques à d'autres ions tels que les nitrates [Gallardo 2004] ont été développées en modifiant la composition du verre qui compose l'électrode de mesure.

Il existe également des électrodes potentiométriques à diffusion gazeuse qui permettent de mesurer la pression partielle d'un gaz dissout en solution. Elles sont constituées d'une électrode de pH et d'une membrane hydrophobe perméable aux gaz. Entre l'électrode de verre et la membrane hydrophobe est placée une solution de remplissage dont la composition dépend de la nature du gaz à détecter. Le gaz diffuse à travers la membrane pour entrer en contact avec la solution de remplissage dont il modifie le pH . L'électrode à CO_2 développée par Severinghaus il y a un demi siècle fonctionne sur ce principe [Severinghaus 1958].

Le développement d'un biocapteur repose sur la combinaison de ces deux types d'électrodes avec une enzyme, greffée sur la membrane de l'électrode. Aussi l'enzyme doit-elle être judicieusement choisie afin que les produits consommés ou générés par la réaction enzymatique soient détectables par l'électrode. Un certain nombre d'espèces chimiques, tels que des pesticides [Schöning 2003], des sucres [Aoki 2002] ou certains antibiotiques comme la pénicilline [Seki 1998], peuvent ainsi être détectés.

¹La loi de Nernst est une loi qui intervient dans la migration des espèces dans les solides cristallins, lorsque des défauts cristallins sont soumis à une force. Cette loi permet de calculer la vitesse de migration des espèces en fonction de l'intensité de la force et du coefficient de diffusion de l'espèce dans le cristal.

3.3.2.2 Capteurs ampérométriques

Le principe de fonctionnement des capteurs ampérométriques repose sur la mesure, à potentiel constant, de l'intensité du courant qui traverse le biorécepteur. Cette intensité dépend de la concentration des éléments pouvant être oxydés ou réduits au niveau de l'électrode indicatrice, tandis qu'une seconde électrode sert de référence. Un étalonnage préalable permet ainsi de déterminer, à partir de l'intensité mesurée, la concentration de certaines espèces en solution telles que le glucose [Rahman 2005], l'aspartame [Qu 1999], ou certains pesticides [Rekha 2000].

Typiquement, cette méthode de caractérisation est appliquée aux biocapteurs élaborés par immobilisation d'une enzyme à la surface d'une électrode métallique (platine, or, argent, graphite, etc.). Les espèces consommées ou produites lors de la réaction enzymatique sont ainsi détectées *via* leur oxydation ou leur réduction à la surface de l'électrode.

De nombreux biocapteurs utilisent la conversion enzymatique de la substance recherchée en peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la détection se fait *via* la quantité de peroxyde d'hydrogène produite lors de la réaction enzymatique. En effet, si la différence de potentiel est positive par rapport à une électrode de référence, le peroxyde d'hydrogène est oxydé par l'électrode ampérométrique suivant la réaction suivante :



Ainsi, le courant généré est proportionnel à la quantité de peroxyde d'hydrogène produite, ce qui permet d'en déduire la concentration de l'espèce recherchée dans l'échantillon.

Le détecteur ampérométrique de créatinine décrit pour la première fois par Tsuchida et Yoda [Tsuchida 1983] fonctionne sur ce principe (cf. fig. 3.2).

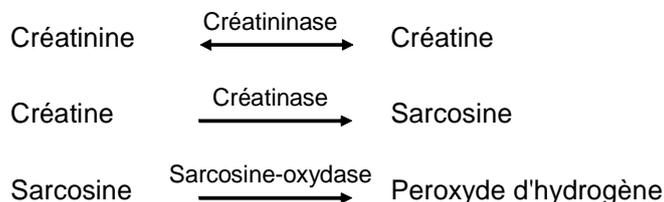


Figure 3.2: Réactions enzymatiques en cascade conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène dans un détecteur ampérométrique de créatinine.

La créatinine est d'abord convertie en créatine par l'enzyme créatininase. La créatine est ensuite convertie en sarcosine par l'enzyme créatinase. Enfin, la sarcosine est convertie en peroxyde d'hydrogène, oxydé lorsqu'un potentiel positif est appliqué à l'électrode.

3.3.2.3 Capteurs conductimétriques

Le principe de fonctionnement des capteurs conductimétriques repose sur la mesure des variations de conductivité électrique d'une solution. Ainsi, cette méthode permet le suivi de la consommation ou de la production d'espèces chargées, la conductivité étant directement liée à la présence de charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions dans la solution.

La mesure de la conductivité électrique d'une solution s'effectue à l'aide d'une cellule de mesure composée de deux électrodes de surface A , espacées d'une distance L .

Pour des tensions appliquées faibles, les solutions ioniques se comportent comme des conducteurs ohmiques. Ainsi, la tension appliquée aux électrodes et le courant circulant dans la solution sont proportionnels :

$$u = R.i \quad (3.3)$$

ou

$$i = G.u \quad (3.4)$$

avec R la résistance (en ohms, Ω) et $G = \frac{1}{R}$ la conductance (en siemens, S) de la portion de solution située entre les deux électrodes de la cellule de mesure.

Les valeurs de résistances étant très élevées, il est généralement plus intéressant de mesurer la conductance. Ainsi, les valeurs mesurées resteront exploitables, même en présence de faibles intensités.

La conductance d'une portion de solution ionique de surface A et de longueur L peut également s'exprimer sous la forme suivante :

$$G = \sigma \frac{A}{L} \quad (3.5)$$

avec σ la conductivité (en $S.m^{-1}$) de la solution.

La conductivité caractérise la capacité de la solution à conduire le courant électrique et elle est indépendante de la cellule de mesure. D'autre part, pour des solutions faiblement concentrées (concentration inférieure à $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), la conductivité dépend de la nature des ions et de leurs concentrations en solution.

$$\sigma = \sum_i \lambda_i \cdot [X_i] \quad (3.6)$$

avec λ_i la conductivité molaire de l'ion X_i (en $S.m^2.mol^{-1}$) et $[X_i]$ sa concentration (en $mol.m^{-3}$).

Après étalonnage, la cellule de mesure est immergée dans la solution et soumise à un courant. La mesure des conductivités s'effectue alors en mesurant la tension aux bornes de la cellule plongeant dans la solution et l'intensité du courant qui y circule. Pour ne pas avoir d'électrolyse, il est préférable d'utiliser un générateur de courant alternatif. Ainsi, le même phénomène a lieu tantôt à une électrode, tantôt à l'autre et les effets s'annulent à chaque changement de signe.

L'un des inconvénients majeurs de cette technique, c'est que la mesure intègre tous les ions présents dans la solution. Il n'y a donc pas de sélectivité. Ainsi, les biocapteurs conductimétriques sont moins répandus que ceux de types potentiométriques et ampérométriques. Cependant, certains travaux récents montrent un intérêt croissant pour ce type de capteurs. Par exemple, un biocapteur destiné au suivi de la pollution en milieu aquatique propose ce mode transduction. Dans ce dispositif, des cellules algales (issues d'algues) sont immobilisées sur des capteurs conductimétriques afin de suivre les perturbations de certaines de leurs activités enzymatiques en présence de pesticides et de métaux lourds [Chouteau 2005].

3.3.3 Les transducteurs acoustiques

Les capteurs acoustiques sont des dispositifs gravimétriques qui mesurent la masse d'un échantillon déposé sur la surface d'un matériau par l'intermédiaire de la fréquence de résonance caractéristique. Les interactions biologiques se déroulant à la surface d'un détecteur acoustique entraînent une variation de la masse à la surface du matériau ce qui induit une diminution de sa fréquence de vibration. Le suivi de ces variations en temps réel, permet d'observer les interactions entre molécules cible et sonde [Lec 1998].

Les matériaux piézoélectriques permettent de convertir une onde acoustique en signal électrique et inversement. Ils représentent donc la majorité des transducteurs acoustiques utilisés pour émettre ou détecter des ondes acoustiques dans toutes les gammes de fréquences. L'engouement actuel pour les micro et nanotechnologies a conduit au développement d'un nouveau type de transducteur acoustique, consistant à mesurer les variations de masse résultant de l'interaction biomoléculaire à la surface d'un micro levier.

3.3.3.1 Microbalance piézoélectrique ou à quartz

Une microbalance piézoélectrique permet de mesurer des variations de masse très faibles en mesurant le changement de fréquence associé d'un cristal piézoélectrique. Les matériaux piézoélectriques sont très nombreux. En raison de son excellent facteur de qualité, le quartz est le matériau le plus utilisé pour ce système de mesure.

Le dispositif de microbalance à quartz est constitué d'une lame de quartz extrêmement fine dont les deux faces sont recouvertes d'un dépôt métallique faisant office d'électrodes [Fung 2001, Percival 2002, Zhou 2002]. Les fréquences de résonance f_0 (de l'ordre de quelques mégahertz) d'un tel dispositif dépendent de la configuration du capteur et de la fréquence de la tension alternative appliquée aux électrodes (cf. fig. 3.3).

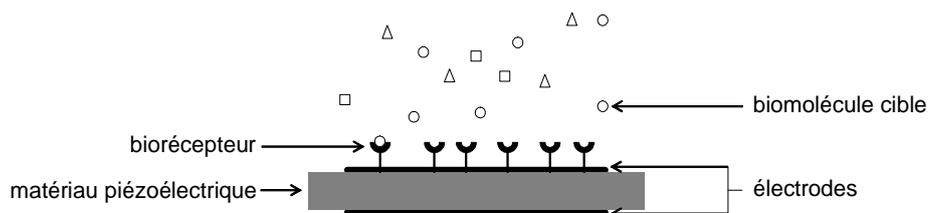


Figure 3.3: Schéma d'un détecteur acoustique à microbalance piézoélectrique.

Les variations de fréquence mesurées sont de l'ordre de la centaine de hertz. La relation entre les variations de masse Δm et de fréquence Δf de résonance est décrite par l'équation de Sauerbrey [Wong 2002] :

$$\Delta f = \frac{-2.3 \cdot 10^6 \cdot f_0^2 \cdot \Delta m}{A} \quad (3.7)$$

où Δf est la variation de fréquence de résonance en Hz, f_0 la fréquence de résonance du crystal en MHz, Δm la variation de masse en g et A l'aire de la zone de dépôt en cm^2 .

3.3.3.2 Capteur à bras de levier

La miniaturisation continue des dispositifs de mesure a conduit certains laboratoires de recherche à utiliser des micro-leviers, appelés aussi « cantilevers ». Le principe de cette technique acoustique alternative consiste à mesurer les variations de masse résultant de la fixation d'une biomolécule cible en surface d'un micro-levier. Ces perturbations se traduisent par une déflexion du bras de levier nanométrique et de fait par une variation de sa fréquence de vibration [Ziegler 2004]. Par exemple, dans le cas des interactions anticorps/antigène, la reconnaissance spécifique entraîne une augmentation de la masse déposée sur la surface supérieure du bras de levier [Lee 2004, Dutta 2003]. La tension exercée sur cette surface augmente et le bras de levier s'infléchit. La mesure de cette déflexion par l'intermédiaire d'un microscope à force atomique permet de suivre le déroulement de l'interaction. Le dépôt de masse change aussi la fréquence de vibration propre du bras de levier. Une excitation acousto-mécanique ou magnétique permet d'évaluer cette variation et de remonter à la masse déposée [Su 2003].

3.3.4 Les transducteurs optiques

De nombreux paramètres tels que les variations du coefficient d'absorption, de la fluorescence ou de l'indice de réfraction de la surface d'un capteur peuvent affecter les propriétés optiques d'un faisceau lumineux. Ces informations, transportées par la lumière, sont à la base des capteurs optiques qui forment un vaste groupe de transducteurs.

De nombreux capteurs sont basés sur la détection de fluorescence. D'autres méthodes reposent sur la mesure des variations d'indice de réfraction induite, à la surface, par l'interaction

biologique. Les capteurs optiques issus de cette dernière technologie utilisent l'éllipsométrie, voire des ondes évanescentes.

3.3.4.1 La détection de fluorescence

Biopuces Dès la fin des années 80, la détection par fluorescence a suscité l'intérêt des chercheurs. Aujourd'hui, cette technique est largement utilisée pour la fabrication de biopuces et plusieurs compagnies (par exemple BioMérieux) commercialisent des instruments prêts à l'emploi, très répandus dans le milieu médical.

La biopuce est obtenue en fixant différents fragments d'ADN sondes sur une surface solide de façon à obtenir une matrice à forte densité de plots (sondes). Affymétrie, *leader* dans le domaine des biopuces, propose des matrices de 500 000 plots espacés de seulement 16 μm . La détection consiste ensuite à hybrider les sondes avec des séquences cibles marquées par un fluorophore. Les cibles peuvent être des fragments d'ADN dans le cas du séquençage et du diagnostic médical ou d'ARN dans le cas de l'étude de l'expression d'un gène. La puce obtenue après hybridation est ensuite rincée pour éliminer toute fluorescence parasite puis lue par un scanner. Les régions fluorescentes indiquent les plots ayant réagi. Comme chaque plot correspond à une séquence d'ADN spécifique, les plots fluorescents correspondent aux séquences cibles présentes dans l'échantillon testé.

Aujourd'hui, la fluorescence est une méthode de référence pour la fabrication de biopuces de par sa sensibilité et sa capacité à analyser simultanément un grand nombre de données. D'autre part, la présence d'un marqueur permet d'effectuer des mesures très sensibles qui ne dépendent pas de la taille de la molécule. La mesure ne dépend que du type de marqueur utilisé et est totalement indépendante de la molécule d'intérêt.

Cependant, l'absence de marquage dans les biocapteurs optiques présente d'autres avantages, le premier étant la possibilité de vérifier toutes les étapes de fabrication et d'utilisation du biocapteur. En effet, les méthodes indirectes ne permettent que le contrôle des étapes mettant en jeu les molécules marquées. En revanche, une détection sans marquage peut être utilisée pour suivre l'ensemble du processus, de la fonctionnalisation à l'interaction biomoléculaire d'intérêt en passant par les interactions intermédiaires. De plus, dans le cas d'une analyse fine des interactions mises en jeu, c'est-à-dire de la visualisation en temps réel des cinétiques de réaction, le marquage est susceptible de changer la fonctionnalité des biomolécules et par là-même de modifier l'affinité des sites de reconnaissance.

Quantum dots Un quantum dot (qdot) ou particule quantique est un nanocristal de matériaux semi-conducteur dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm. Du fait de sa petite taille, il se comporte comme un puits de potentiel qui confine les électrons dans trois dimensions, dans une région d'une taille de l'ordre de la longueur d'onde des électrons, soit quelques nanomètres. À cause du confinement, les électrons du quantum dot ont des niveaux d'énergie discrets et quantifiés, de façon similaire à un atome. Les niveaux d'énergie peuvent être contrôlés par le changement de la taille et de la forme du nanocristal. En

d'autres termes, lorsqu'il reçoit une énergie suffisante, le quantum dot émet une lumière dont la longueur d'onde, et donc la couleur, dépend de sa taille.

De par leur petite taille, les quantum dots peuvent être fonctionnalisés et ainsi utilisés comme marqueurs fluorescents dans des applications de biodétection [Mitchell 1999, Chang 2005]. En outre, les quantum dots ne sont pas seulement utilisés pour le développement de biocapteurs *in vitro*, mais également pour la mise au point de techniques d'imagerie *in vivo*, à l'intérieur même des cellules [Smith 2004].

3.3.4.2 Capteurs ellipsométriques

L'ellipsométrie permet de déterminer l'épaisseur et l'indice de réfraction de matériaux déposés en couches nanométriques sur une surface. La mesure repose sur l'analyse des changements de polarisation d'une onde plane réfléchie sur un substrat composé de couches multiples. Découvertes par P. Drude il y a plus de 100 ans, les techniques ellipsométriques connaissent un net regain d'intérêt [Vedam 1998], en grande partie dû à l'augmentation des vitesses de calcul des ordinateurs qui diminue les temps de mesure. Leur utilisation en tant que biocapteurs reste cependant confidentielle [Arwin 1998] comparée aux autres méthodes de détection.

Les configurations des ellipsomètres utilisés pour l'étude *in situ* d'interactions biomoléculaires imposent certaines limitations, notamment à cause des solutions utilisées qui forment une couche épaisse sur la surface. Pour éviter les réflexions parasites sur ces interfaces, l'échantillon est immergé dans une cellule et le faisceau incident est orienté de façon à arriver perpendiculairement sur la face externe de la cellule de mesure (cf. fig. 3.4).

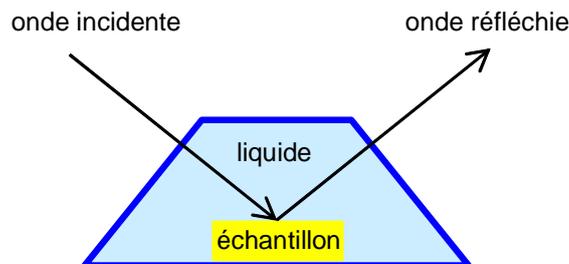


Figure 3.4: Schéma d'une cellule de mesure pour ellipsométrie en milieu liquide.

3.3.4.3 Capteurs à ondes évanescentes

Une onde évanescente est obtenue au niveau d'un dioptre lorsque l'onde incidente, issue d'un milieu d'indice de réfraction plus élevé (prisme, guide d'onde, etc.), arrive sur l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle de réfraction limite. L'amplitude de l'onde évanescente chute de manière exponentielle au fur et à mesure que sa distance à l'interface augmente. Elle est donc confinée au voisinage de la surface du dioptre. La profondeur de

pénétration de l'onde ΔZ_c est définie comme la distance au bout de laquelle l'amplitude du champ vaut $\frac{1}{e}$ de sa valeur maximale. L'onde évanescente est ensuite insensible aux perturbations situées hors de cette zone de confinement ($Z > \Delta Z_c$).

Le champ évanescent offre ainsi la possibilité de sonder en temps réel les changements d'indice de réfraction, d'épaisseur de couche, d'adsorption ou de fluorescence causées par des réactions se produisant à des distances inférieures à la profondeur de pénétration de l'onde, soit quelques centaines de nanomètres (cf. fig. 3.5). En effet, ces changements perturbent la propagation de l'onde évanescente et se traduisent par des variations de phase et d'amplitude du faisceau réfléchi.

Ainsi, la fixation de molécule sur la surface d'un dioptre peut être suivie en temps réel par cette méthode qui ne nécessite pas systématiquement l'utilisation de marqueurs. En effet, comme l'ellipsométrie, les biocapteurs fondés sur cette technique sont sensibles au produit de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la couche déposée à la surface du capteur.

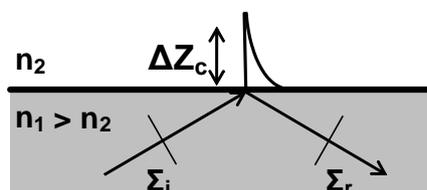


Figure 3.5: L'onde incidente (Σ_i), totalement réfléchi (Σ_r) à l'interface des deux milieux, donne naissance à une onde évanescente, confinée sur une profondeur ΔZ_c .

Un certain nombre de biocapteurs exploitent les propriétés de confinement des modes évanescents. Ceux basés sur la résonance des plasmons de surface (SPR) ont fait l'objet de nombreux travaux. Au début des années 90, les premiers instruments SPR ont été commercialisés par BiaCore. Les années 2000 marquèrent le démarrage de nouvelles techniques optiques : le guide d'onde planaire et le miroir résonant.

Guide d'ondes planaire Un guide d'onde diélectrique est composé d'un film mince d'indice de réfraction élevée n_g qui constitue la structure guidante. Cette dernière est encadrée de deux milieux diélectriques d'indices de réfraction plus faibles. Lorsqu'un guide d'onde est utilisé en tant que biocapteur, les deux milieux encadrant la structure guidante sont le substrat d'indice n_s , sur lequel est déposé le film mince, et le milieu couvrant d'indice n_c , dans lequel vont se produire les interactions biomoléculaires. Lorsqu'un faisceau lumineux est injecté dans le guide, une onde évanescente se propage aux deux interfaces de la structure guidante (cf. fig. 3.6).

Miroir résonant

Un biocapteur à miroir résonant consiste en un guide d'onde diélectrique dans lequel l'onde lumineuse est couplée par un prisme. Généralement, ce guide d'onde se compose d'une couche de quelques centaines de nanomètres de silice faisant office de substrat de faible indice et d'une couche d'une centaine de nanomètres de dioxyde de titane

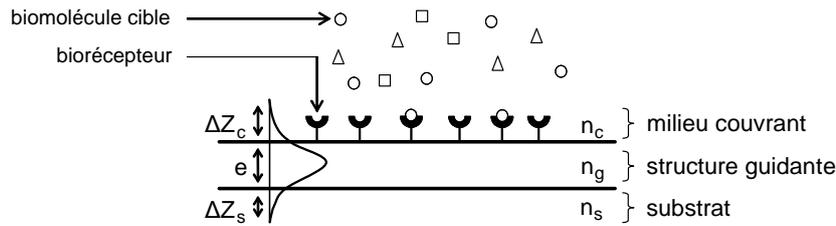


Figure 3.6: Propagation d'une onde lumineuse dans un guide d'onde d'épaisseur e . Le milieu couvrant est biofonctionnalisé.

servant de structure guidante d'indice de réfraction élevé. La surface est recouverte du milieu couvrant biologique.

Un faisceau lumineux incident est polarisé à 45° du plan d'incidence pour que ses composantes transverse magnétique (TM) et transverse électrique (TE) soient de même amplitude. S'il y a accord de phase entre le faisceau incident et les modes résonants de la structure guidante, un couplage efficace dans le guide se produit. Si l'angle d'incidence est différent de l'angle de résonance TE ou TM, le faisceau est réfléchi directement par le prisme. Si l'angle d'incidence correspond à la résonance, une des deux composantes se propage dans le guide avant d'être réfléchi, ce qui se traduit par un retard de phase de cette composante [George 1995]. En cas de couplage dans la structure guidante, le faisceau incident traverse la couche de substrat de faible indice de réfraction, appelée structure résonante. Elle forme une barrière entre le prisme et le guide et son épaisseur a une influence directe sur le rendement du couplage.

La structure guidante étant un système à faibles pertes, la résonance ne se traduit pas par un pic d'absorption dans la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence mais par un saut de phase de la lumière réfléchi à la résonance. En effet, en dehors des conditions de résonance, le faisceau est totalement réfléchi par le prisme sans être influencé par le guide. En revanche, dans les conditions de résonance, il n'est totalement réfléchi qu'après s'être brièvement propagé dans le guide, d'où le déphasage. La position de ce saut de phase peut alors être utilisée pour suivre des changements au niveau du milieu extérieur, dans la limite de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

Les résonances TM et TE étant largement séparées, ces deux polarisations peuvent servir de référence l'une pour l'autre. Un simple analyseur à 45° du plan d'incidence permet d'obtenir des pics de lumière étroits autour de la résonance et un signal nul en dehors (cf. fig. 3.7). Leur position évolue alors en fonction des interactions biomoléculaires qui se produisent en surface [Hengsakul 1997, Hirno 1998].

La résonance des plasmons de surface (SPR) Comme les biocapteurs à base de guides d'ondes ou de miroirs résonants, les biocapteurs exploitant la résonance des plasmons de surface sont sensibles aux variations d'indice de réfraction induites à la surface du capteur dans les limites de la profondeur de pénétration d'une onde évanescente.

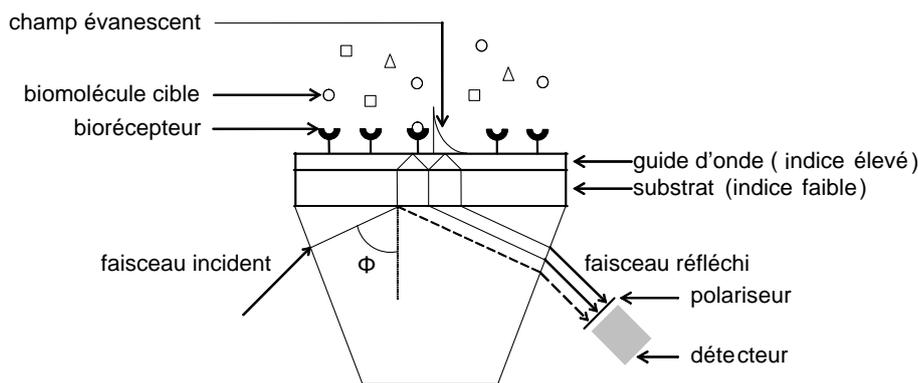


Figure 3.7: Biocapteur à miroir résonant. Le faisceau incident polarisé à 45 degrés du plan d'incidence est couplé à un guide d'onde par l'intermédiaire d'un prisme. Si l'angle d'incidence ne correspond pas à l'angle de résonance TE ou TM, le faisceau est totalement réfléchi sur le prisme (rayon en pointillés). Dans le cas contraire, une des deux composantes se propage dans le guide avant d'être réfléchi (rayons en traits pleins), ce qui se traduit par un retard de phase de cette composante.

Les plasmons de surface sont des ondes électromagnétiques qui se propagent à l'interface entre deux milieux de permittivité opposée, en l'occurrence un métal (or, argent, cuivre, aluminium, etc.) et un diélectrique (milieu biologique). Ce phénomène peut être décrit comme une oscillation longitudinale collective des électrons libres dans un métal, soit une fluctuation de la densité de charge dans le temps et l'espace. L'onde électromagnétique de surface résultant de cette fluctuation se propage sur l'interface métal-diélectrique et présente une décroissance exponentielle de part et d'autre de cette interface. Les plasmons de surface se propagent sur une distance limitée. Ils sont caractérisés par une longueur de propagation L et des profondeurs de pénétration dans les milieux métallique (ΔZ_m) et diélectrique (ΔZ_d), qui correspondent aux distances au bout desquelles l'amplitude du champ vaut $1/e$ de sa valeur maximale. Les profondeurs de pénétration sont plus faibles dans le milieu métallique que dans le milieu diélectrique, et le champ reste confiné au voisinage de l'interface métal/diélectrique du côté du diélectrique, c'est-à-dire du côté du milieu biologique.

Le phénomène de résonance des plasmons de surface peut être provoqué par la réflexion totale d'une onde optique. Sous certaines conditions d'angle, de longueur d'onde et de polarisation du faisceau optique incident, l'onde évanescente créée peut exciter un mode plasmon de surface. L'énergie cédée par le faisceau incident au plasmon de surface correspond à une perte d'énergie dans le faisceau réfléchi. Les variations d'indice de réfraction, d'épaisseur et de masse induites par la fixation de molécules biologiques sur l'interface modifient la réfringence du milieu et influent sur la position angulaire de la résonance plasmon.

Le phénomène de résonance plasmon ne distingue pas les réactions chimiques en tant que telles. La spécificité d'analyse réside dans la sélection de paires de molécules réagissant entre elles, le biorécepteur étant greffé à la surface du métal. Chaque paire de substances qui présente des interactions spécifiques peut être analysée par cette méthode (anticorps-antigène, ADN-protéine, enzymes, etc.), rapidement et sans traitement préalable des échantillons. L'onde plasmon joue ainsi le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction

biomoléculaire. Bien que présentant une sensibilité plus faible que les méthodes utilisant des marqueurs, les nombreux avantages des techniques de détection basées sur la résonance des plasmons de surface (suivi en temps réel, préparation simplifiée des échantillons) sont des atouts d'importance pour l'analyse quantitative des interactions biomoléculaires. Aussi l'imagerie en résonance des plasmons de surface permet-elle aujourd'hui de mesurer simultanément de nombreuses interactions, comme les méthodes avec marqueurs fluorescents [Guedon 2000, Bassil 2003, Maillart 2004].

Plusieurs configurations existent pour mettre en évidence la résonance de plasmons de surface. Des réseaux de diffraction [Lawrence 1996] ou des guides optiques [Dostálek 2001] sont utilisés mais c'est le couplage par prisme, connu sous le nom de configuration de Kretschmann (cf. fig. 3.8), qui est la structure la plus employée [Chegel 1998, Homola 1999].

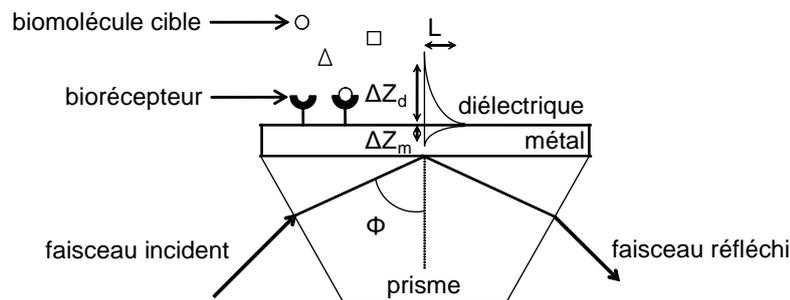


Figure 3.8: Excitation des plasmons de surface par un prisme de verre recouvert d'une couche mince métallique (configuration de Kretschmann). La résonance d'un plasmon de surface a lieu à l'interface métal / milieu biologique (diélectrique), pour un certain angle d'incidence Φ du faisceau incident.

Les trois principales méthodes de détection reposent sur :

- (i) la mesure de l'intensité de l'onde optique réfléchi aux alentours de la résonance, à position angulaire constante (source monochromatique) ;
- (ii) la mesure de la position angulaire correspondant à la résonance (source monochromatique) ;
- (iii) la mesure de la longueur d'onde correspondant à la résonance, à position angulaire constante (source large).

D'autres méthodes portant sur la variation de polarisation [Kruchinin 1996, Homola 1998] ou de phase [Nelson 1996, Xinglong 2003] ont aussi été explorées. Cependant, les configurations les plus utilisées restent celles basées sur la mesure du minimum de réflectivité correspondant à la résonance, en interrogation angulaire (ii) ou en longueur d'onde (iii), qui offrent le meilleur rapport signal/bruit.

Depuis la mise au point de cette configuration par Kretschmann et Otto en 1968, la SPR a connu un fort développement. Plusieurs sociétés ont acquis un savoir-faire et une maîtrise qui font que la résonance des plasmons de surface est devenue l'instrument privilégié pour la mesure en temps réel de toute interaction biologique. La limite de détection de ce type de

biocapteur étant fortement dépendante des performances du détecteur (bruit, conversion du signal analogique-numérique) et des méthodes d'analyses employées (choix des algorithmes traitant les variations du pic de résonance), des progrès peuvent encore être réalisés. Les limites de détection en termes de variations d'indice de réfraction sont aujourd'hui de l'ordre de 10^{-6} .

Les biocapteurs optiques sont bien implantés dans le monde industriel et font figure d'instruments privilégiés pour la mesure en temps réel d'interactions biomoléculaires. La tendance actuelle étant à la conception de biocapteurs miniaturisés, multiparamétriques et portables, les différentes technologies développées dans les capteurs optiques traditionnels sont progressivement transférées sur les fibres optiques.

3.4 Les biocapteurs à fibres optiques

La technologie des Capteurs à Fibres Optiques (CFO) est actuellement en plein essor et l'engouement est tel que le champ d'application de ces capteurs tend aujourd'hui à couvrir celui des capteurs traditionnels dans de nombreux domaines. En effet, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, l'utilisation de fibres optiques présente de nombreux avantages. C'est donc dans ce contexte que de nombreux travaux se sont intéressés à la réalisation de biocapteurs à fibres optiques.

3.4.1 Définitions

Un Capteur à Fibre(s) Optique(s) est un dispositif comprenant une (ou plusieurs) fibre(s) optique(s) qui détecte et transporte une information lumineuse représentative d'une (ou plusieurs) grandeur(s) à mesurer [Boisde 1990]. Cette définition exclut les assemblages comportant un capteur conventionnel et un système de transmission par fibres optiques. Par contre, le transducteur peut être ou non la fibre optique. Dans le premier cas, il s'agit de capteurs intrinsèques, dans l'autre de capteurs extrinsèques.

Un CFO est en effet qualifié d'extrinsèque s'il inclut un élément transducteur supplémentaire qui convertit la perturbation induite par le phénomène à détecter en une perturbation sur la lumière transmise par la fibre. Un tel capteur utilise donc un élément sensible externe à la fibre. Ce peut être un biorécepteur immobilisé sur la surface et dont l'interaction avec le composé à doser change certaines propriétés optiques telles que l'absorption, la fluorescence ou l'indice de réfraction. Dans ce cas, la fibre ne joue pas de rôle dans la transduction mais sert au transport de la lumière vers l'élément sensible (le transducteur) et son retour vers l'appareil de mesure. Ce sont souvent les capteurs extrinsèques qui servent de base à la réalisation de biocapteurs. Le CFO devient intrinsèque lorsque l'élément sensible est constitué par une (ou plusieurs) fibre(s) optique(s) dont une ou plusieurs caractéristiques de transmission, de réflexion, ou d'émission de la lumière sont des fonctions de la grandeur à mesurer. La zone sensible est directement intégrée à la fibre. Ces capteurs sont généralement

utilisés pour la détection des variations de pression, de température, de déformation ou de courbure.

Une distinction peut également être faite entre capteurs actifs et passifs. Dans le premier cas, la source de lumière est générée par une source optique. L'onde lumineuse qui se propage dans la fibre est modifiée directement ou indirectement par le phénomène physique à mesurer. Dans le second cas, la lumière est générée par le phénomène physique lui-même. Il est ainsi possible de suivre la lumière émise lors de la sollicitation d'un biorécepteur. Différents signaux peuvent être adaptés à ce type de détection comme la fluorescence de cellule ou les réactions enzymatiques au cours desquelles se forment des produits fluorescents.

Enfin, les mesures peuvent être réalisées de manière ponctuelle ou répartie. Pour les mesures ponctuelles le phénomène physique ou chimique est mesuré localement, à l'extrémité de la fibre par exemple. Le biorécepteur est déposé en bout de fibre et le biocapteur fonctionne généralement en réflexion. Dans l'autre cas, la grandeur physique peut être décelée, et moyennée, sur une certaine longueur -petite ou grande- de fibre. Le biorécepteur est déposé sur la surface périphérique de la fibre. Le biocapteur peut alors fonctionner en réflexion et/ou en transmission.

La technologie des biocapteurs à fibre optique découle de celle utilisée pour la réalisation de capteurs traditionnels. C'est pour cette raison que de nombreux biocapteurs à fibres optiques sont basés sur la détection de fluorescence ou l'exploitation des propriétés du champ évanescent [Wolfbeis 2004]. Les biocapteurs à fibres optiques basés sur une mesure de champs évanescents directe ainsi que ceux fondés sur la SPR (résonance des plasmons de surface) feront l'objet des deux paragraphes suivants. Les biocapteurs à fibre optique reposant sur la technologie des réseaux de Bragg en angle photoinscrits dans le cœur des fibres seront ensuite présentés. Enfin, un dernier paragraphe sera consacré aux fibres optiques à cristal photonique ou microstructurées, leurs propriétés de guidage les rendant prometteuses pour le développement de biocapteurs.

3.4.2 Biocapteurs fibrés à ondes évanescentes « classiques »

Les capteurs à fibres basés sur les techniques optiques évanescentes sont issus de la technologie des guides d'ondes diélectriques car les fibres optiques présentent une structure similaire. La structure guidante est réalisée par le cœur de la fibre et le substrat par la gaine optique qui l'entoure.

Le milieu couvrant, siège des interactions biomoléculaires, est obtenu en affinant la gaine optique afin de déposer la couche bioréceptrice à proximité du cœur de la fibre. Au moins trois types d'architectures permettent d'obtenir ce résultat (cf. fig. 3.9) :

(i) La zone sensible peut se trouver en extrémité de fibre (pour une étude en réflexion) ou le long de la fibre (pour une étude en transmission et/ou en réflexion). Elle est obtenue en dénudant la fibre à proximité du cœur [Bendoula 2005].

(ii) La zone sensible est obtenue par étirement. La fibre est effilée par chauffage afin de diminuer ses dimensions.

(iii) La zone sensible est obtenue par polissage. La fibre est maintenue dans un bloc, en général à base de sol gel (silice poreuse) et l'ensemble est poli pour dégager une zone à proximité du cœur.

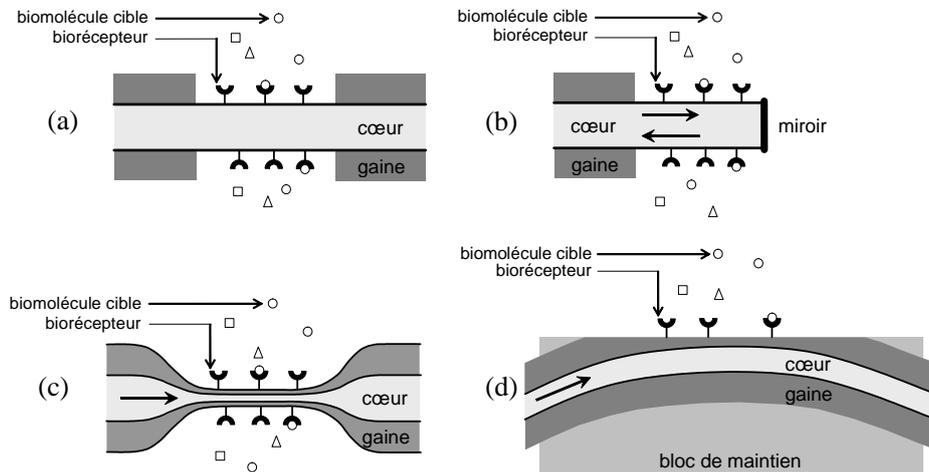


Figure 3.9: Exemples de biocapteurs fibrés à ondes évanescentes. Fibras dénudés sur une certaine longueur (a) ou en extrémité (b), fibre effilée (c) et fibre polie (d) pour dégager une zone sensible à proximité du cœur.

La sensibilité du biocapteur est directement liée à la longueur de la zone sensible qui correspond à la zone d'interaction. Pour des raisons mécaniques, cette longueur doit cependant rester limitée.

Les biocapteurs à ondes évanescentes ont connu un essor considérable et couvrent aujourd'hui un large champ d'applications. Utilisés pour détecter la présence d'espèces chimiques [Shriver-Lake 1995], biologiques [Anderson 1994, Lim 2003], ou bactériennes [John 2002] et mesurer leurs concentrations en phases liquides ou gazeuses, les biocapteurs fibrés à ondes évanescentes sont également destinés à la réalisation de mesures *in vivo* [Grant 2001].

3.4.3 Biocapteurs fibrés à plasmons de surface

L'architecture des biocapteurs SPR fibrés est issue de la technologie des capteurs évanescents pour dégager une zone sensible à proximité du cœur. Le principe du couplage reste identique au couplage par prisme des capteurs SPR classiques. Le cœur de la fibre fait office de prisme et le métal est déposé soit à la surface du cœur, soit à quelques nanomètres du cœur. Ainsi, l'utilisation d'une fibre optique permet de s'affranchir des problèmes liés aux déplacements mécaniques des appareillages traditionnels à prisme ou à réseau de diffraction.

Les montages utilisés sont basés sur l'excitation d'un plasmon de surface par une onde optique guidée dans le cœur d'une fibre. Le décalage de la résonance ne fait donc pas l'objet d'une interrogation angulaire. En revanche, quelle que soit la géométrie utilisée (fibre dénudée, polie

ou effilée), une étude de la modulation d'intensité ou de la longueur d'onde de résonance peut être menée. D'autre part, la fibre peut être utilisée en transmission ou en réflexion (miroir ou zone active en bout de fibre).

En 1993, Jorgenson et Yee sont les premiers à proposer d'utiliser une fibre optique dans un capteur à plasmon de surface [Homola 1999]. La zone sensible est obtenue en dénudant et métallisant une fibre multimode à proximité du cœur en extrémité de fibre. La lumière injectée dans la fibre est issue d'une source blanche. Elle subit de multiples réflexions sur la zone active où certaines longueurs d'onde sont absorbées par les plasmons de surface. Un miroir disposé sur la face de sortie de la fibre réfléchit la lumière. Elle est ensuite analysée spectralement pour déterminer les variations d'indice de réfraction au niveau de la surface active (métalisée). Si l'indice augmente, le minimum correspondant à la résonance des plasmons de surface est décalé vers les hautes longueurs d'onde. La résolution en termes de variations d'indice de réfraction atteint 5.10^{-5} dans une gamme d'indice comprise entre 1,2 et 1,4.

En 2001, Slavik propose d'utiliser une autre configuration, capable de mesurer des variations d'indice de réfraction de 5.10^{-7} . Le capteur est constitué d'une fibre standard monomode à $825 \mu\text{m}$, maintenue dans un bloc et polie pour dégager une zone à proximité du cœur [Slavik 2001]. La zone plane polie est recouverte d'une fine couche d'or, susceptible de propager une onde plasmon. Un miroir placé en extrémité de la fibre permet de réaliser les mesures en réflexion. La lumière d'une source complètement dépolarisée est injectée dans la fibre puis recueillie dans un mélangeur de polarisation et enfin dans un spectromètre. Il faut cependant noter que l'effet de la polarisation est crucial puisque la résolution du capteur en mode statique, c'est-à-dire sans suppression complète des effets de polarisation, n'est plus que de 3.10^{-5} .

Les biocapteurs fibrés à plasmon de surface présentent un degré de miniaturisation et de flexibilité inégalé. Leurs performances en termes de mesures de variations d'indice de réfraction sont identiques à celles obtenues avec une optique massive, de l'ordre de 10^{-6} . Toutefois, ils n'ont pas fait l'objet du même engouement commercial que celui suscité par les biocapteurs SPR classiques, les coûts de réalisation restant élevés, compte tenu de l'utilisation de spectromètres.

3.4.4 Biocapteurs fibrés à réseaux de Bragg

Un réseau de Bragg à traits droits inscrit dans une fibre optique standard n'est pas intrinsèquement sensible aux variations d'indice de réfraction du milieu qui l'entoure. Cependant, comme dans le cas des biocapteurs fibrés à ondes évanescentes « classiques » ou utilisant la résonance des plasmons de surface, une zone sensible peut être dégagée en affinant la gaine optique pour déposer une couche bioréceptrice à proximité du cœur de la fibre dans lequel est inscrit un réseau de Bragg à traits droits. Une première solution consiste à associer une fibre optique conventionnelle de section circulaire, dont la gaine a été attaquée à l'acide fluorhydrique, à un réseau de Bragg à traits droits [Iadicco 2004]. Une seconde solution consiste à inscrire un réseau de Bragg à pas court dans une fibre de section en forme de D, dont la sen-

sibilité est augmentée par l'abrasion chimique ou mécanique d'une partie de la gaine optique et parfois même du cœur [Schroeder 2001a, Zhou 2004, Chen 2007]. Cependant, l'attaque chimique ou l'usinage fragilise la fibre. Cette fragilité s'avère particulièrement préjudiciable pour certaines applications, notamment celles qui requièrent l'utilisation de procédés de fonctionnalisation agressifs tels que la silanisation d'une surface de silice.

Dans les capteurs fibrés à réseaux de Bragg en angle [Laffont 2001c] ou à pas long [Patrick 1998, Falciai 2001], cette zone sensible se situe au niveau de la surface externe de la gaine optique, autour du réseau gravé dans le cœur de la fibre. Seule la gaine externe protectrice (par exemple en polyimide) doit être retirée pour permettre l'inscription d'un réseau et sa biofonctionnalisation en surface périphérique. Le capteur est ainsi beaucoup moins fragile. La mesure repose sur le couplage du mode fondamental guidé avec des modes de gaine dont la partie évanescente du champ est susceptible d'interagir avec le milieu entourant la fibre optique. En fonction de l'indice de réfraction en surface de la fibre, une partie du champ évanescent des modes de gaine peut être rayonné.

Un certain nombre de travaux se sont intéressés à la fonctionnalisation de fibres à réseaux de Bragg à pas longs destinées à la fabrication de capteurs d'humidité [Tan 2005], de gaz [Gu 2006], de substances chimiques [Cusano 2005, Pilla 2005] et de biocapteurs [Wang 2005a, Wang 2005b]. C'est loin d'être le cas des réfractomètres fibrés à réseaux de Bragg en angle, qui font l'objet de l'étude proposée dans ce manuscrit.

3.4.5 Biocapteurs à fibres microstructurées

Les fibres microstructurées offrent des propriétés hors du commun du fait de l'interaction des champs guidés avec les microcanaux d'air présents dans la structure (cf. fig. 3.10). Grâce à un choix judicieux des paramètres de la fibre, une fraction importante du champ optique qui se propage dans la fibre donne naissance à une onde évanescente. Elle pénètre dans les trous et peut ainsi interagir avec l'échantillon qui s'y trouve. Les trous d'une fibre microstructurée permettent donc à l'échantillon d'accéder à la zone du champ évanescent sans avoir besoin de retirer la gaine optique et la gaine protectrice, ce qui leur confère une plus grande robustesse. Des travaux portant sur des capteurs de gaz [Ritari 2004, Cubillas 2007, Li 2007] et des biocapteurs utilisant des fluorophores [Emiliyanov 1987, Jensen 2004, Rindorf 2008], ont montré que les fibres microstructurées permettaient d'obtenir des limites basses de détection au moins égales, voire meilleures que celles obtenues avec des capteurs fibrés à onde évanescente « classique ».

Une nouvelle approche consiste à associer les fibres microstructurées aux réseaux de Bragg et à la biofonctionnalisation des surfaces, de manière à rendre la détection sélective. Le principe de la mesure repose sur le fait que le champ optique des différents modes d'une fibre microstructurée est en interaction forte avec le milieu inséré dans ses canaux. Lorsque l'indice de réfraction du fluide y circulant change, les modes optiques d'ordre supérieur, dont l'étendue transverse est la plus vaste, voient leurs propriétés de guidage évoluer. Les molécules cibles s'accrochant en surface des trous modifient cet indice et par suite les propriétés de guidage de

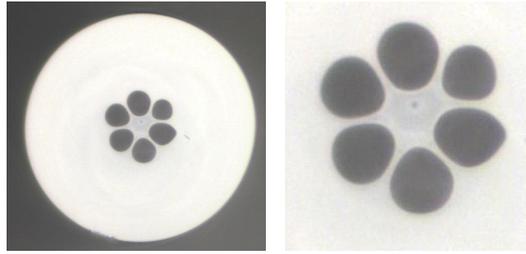


Figure 3.10: Photographies de la section d'une fibre microstructurée constituée d'une couronne de six trous.

certaines modes. Actuellement, une optimisation des fibres microstructurées et des réseaux de Bragg intégrés a permis d'atteindre des résolutions de l'ordre de 10^{-6} en termes de variations d'indice de réfraction [Phan Huy 2007], mais sans sélectivité jusqu'à lors, les canaux des fibres n'étant pas fonctionnalisés.

Chapitre 4

Fonctionnalisation chimique de surfaces

La fonctionnalisation chimique des surfaces est un domaine de recherche en constante expansion. Elle consiste à ajouter de nouvelles fonctions aux surfaces de substrats telles que la résistance à l'adhésion cellulaire ou la détection spécifique d'espèces chimiques ou biologiques. Certains procédés de traitement des surfaces sont basés sur l'adsorption [Nakanishi 2001, Barrias 2005] ou le couplage covalent [Piehler 1996] de molécules actives, d'autres sur les monocouches auto-assemblées [Chaki 2001, Arslan 2006], d'autres encore sur le traitement des surfaces par plasma [Schroeder 2001b, Meyer-Plath 2003]. Le matériau, la géométrie et les dimensions des supports utilisés pour la construction dépendent des applications envisagées et des techniques de caractérisation employées.

Un biocapteur est généralement obtenu en associant un biorécepteur à la surface d'un transducteur qui peut être une électrode, un cristal piézoélectrique ou, comme ici, une fibre optique. L'étape d'immobilisation du biorécepteur constitue donc un des points critiques de la réalisation des biocapteurs. Elle conditionne aussi bien la stabilité, la durée de vie, la sensibilité, la dynamique de mesure que la capacité du biocapteur à être régénéré puis réutilisé. Elle a également une influence sur l'accessibilité au biorécepteur et sa réactivité car l'utilisation de matériel biologique impose un certain nombre de contraintes. Il est notamment nécessaire de s'assurer que l'immobilisation n'interfère pas, ou alors de façon limitée, avec le signal biologique car certaines techniques peuvent dénaturer l'élément biologique (anticorps, antigène, enzymes) ou le rendre non viable (cellules).

De nombreux procédés ont été ou sont en cours d'élaboration et reposent sur deux grands principes. Lorsque les propriétés de surface du transducteur le permettent, le biorécepteur peut être directement immobilisé : on parlera de biofonctionnalisation directe. Le plus souvent, la surface du transducteur ne présente pas les « propriétés adaptées » à un greffage direct de biomolécules et il est nécessaire de recourir à la biofonctionnalisation indirecte, basée sur des procédés de fonctionnalisation intermédiaires des substrats. La dernière étape consiste alors à greffer le biorécepteur sur la surface fonctionnalisée en exploitant les affinités qu'il peut avoir avec certains groupements fonctionnels.

Au-delà de ces méthodes de fixation de biorécepteurs empruntés au monde du vivant, des reconnaissances artificielles, rassemblées sous le terme de biomimétisme, peuvent être mises au point, notamment par le biais de Polymères à Empreinte Moléculaire (PEM) [Yano 1999, Haupt 2000, Percival 2002, Ye 2004].

4.1 Biofonctionnalisation directe

Ces techniques de biofonctionnalisation consistent à fixer directement les molécules biologiques (biorécepteurs) sur le substrat éventuellement fonctionnalisé au préalable.

4.1.1 L'adsorption

L'adsorption repose sur les interactions physiques ou chimiques qui peuvent exister entre un composé biologique et une surface. Différents types de liaisons interviennent dans les réactions d'adsorption à savoir l'échange d'ions, les interactions de Van der Waals (interactions électriques de faible intensité) et la liaison hydrogène. Cette dernière est une liaison chimique de type dipôle-dipôle qui relie des molécules en impliquant un ou plusieurs de leurs atomes d'hydrogène respectifs. Elle est d'intensité vingt fois plus faible que la liaison covalente et environ dix fois supérieure à la liaison résultant des forces de Van der Waals.

Cette technique permet une immobilisation simple des molécules biologiques. Cependant, l'immobilisation de biomolécules par adsorption présente un fort degré de réversibilité. À de rares exceptions près, les forces impliquées dans la liaison sont très faibles et la stabilité reste fortement dépendante du pH, de la force ionique, de la température ou du solvant [Albareda-Sirvent 2000]. D'autre part, la répartition irrégulière des biomolécules sur la surface et leur orientation aléatoire est très dommageable pour la sensibilité et la spécificité des capteurs basés sur l'adsorption. Cependant, ce mode de biofonctionnalisation peut se révéler très utile pour des études préliminaires, avant d'envisager la mise en œuvre de procédés plus complexes.

4.1.2 Le couplage covalent

Le couplage covalent de molécules biologiques sur un transducteur nécessite la présence d'un groupement fonctionnel sur la surface de celui-ci, ce qui nécessite une fonctionnalisation préalable. Les plus utilisés sont les groupements carboxyle (COOH), amine (NH₂), hydroxyle (OH) et sulfhydryle (SH) (thiols). Comme ils sont chimiquement peu réactifs, il est généralement nécessaire de les activer pour qu'ils réagissent dans des conditions douces avec des groupements fonctionnels du biorécepteur n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire.

Cette technique est particulièrement intéressante car la réaction, irréversible, assure une fixation durable de l'élément biologique, condition requise pour garantir une certaine durée

de vie aux sondes biologiques. D'autre part, cette technique permet d'obtenir des répartitions surfaciques de biomolécules relativement uniformes et contrôlées.

Le principal inconvénient du couplage covalent se situe au niveau de la perte d'activité des molécules biologiques, étant donné que toute modification chimique d'une molécule biologique peut être considérée comme une altération de son intégrité. Pour éviter ce problème, il faut que les réactions chimiques impliquées dans le greffage aient lieu à des positions prédéfinies sur la protéine, c'est-à-dire au niveau de sites qui ne sont pas impliqués dans les processus de reconnaissance spécifique des biorécepteurs.

4.1.3 La réticulation

L'immobilisation par réticulation consiste à créer des liaisons chimiques entre molécules bioréceptrices en utilisant un agent réticulant, par exemple une molécule bifonctionnelle permettant d'assurer la liaison entre deux composés. Le glutaraldéhyde, qui possède deux groupements aldéhydes, est un agent de réticulation intermoléculaire très efficace qui réagit avec les groupements amines des protéines. Les membranes ainsi obtenues sont insolubles dans l'eau et s'adsorbent sur n'importe quelle surface solide [Liu 2000].

Néanmoins, il est difficile de contrôler la réaction. Les multiples réticulations peuvent aboutir à la formation d'un réseau tridimensionnel de biorécepteurs à l'activité biologique fortement réduite et dont les sites actifs sont rendus inaccessibles. Il est possible de minimiser ces effets en utilisant le glutaraldéhyde sous sa forme gazeuse [Arkhypova 2003]. Ce procédé de bio-fonctionnalisation est principalement utilisé pour la réalisation de biocapteurs enzymatiques.

4.2 Fonctionnalisation intermédiaire du substrat

Il est également possible de procéder à la fonctionnalisation préalable du substrat pour changer la nature des groupements de surface (cf. fig. 4.1). Cette couche de fonctionnalisation, qui peut être plus ou moins épaisse, permet d'obtenir des caractéristiques de surface indépendantes de la nature du substrat. Elle fait office d'espaceur permettant d'isoler le biorécepteur de la surface du substrat. Il est ainsi possible d'éviter d'éventuelles effets toxiques de la surface sur le biorécepteur et/ou des interactions parasites pouvant survenir entre la biomolécule cible et le substrat. Les méthodes de fixation indirecte aboutissent donc à des structures de surface plus complexes. Elles peuvent être formées de multicouches de polyélectrolytes mettant à profit des interactions électrostatiques ou de chaînes polymères présentant des groupements fonctionnels pouvant interagir de façon covalente avec une molécule intermédiaire ou le biorécepteur.

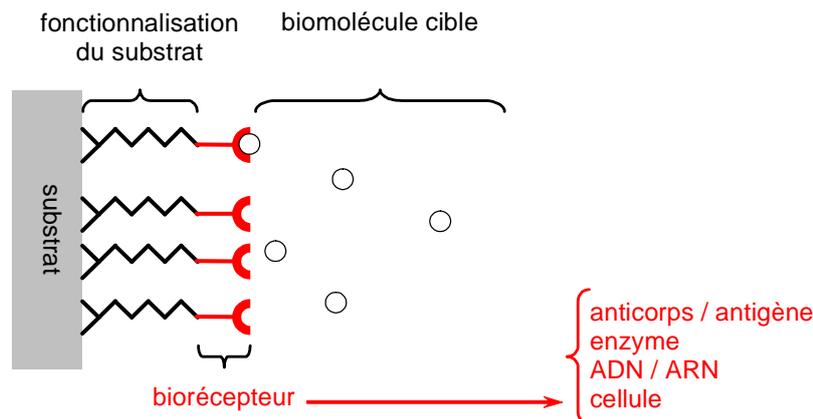


Figure 4.1: Schéma de principe de la biofonctionnalisation indirecte du substrat.

4.2.1 Multicouches de polyélectrolytes

4.2.1.1 Définition

Cette technique permet la construction d'assemblages macromoléculaires par adsorption successive de polyélectrolytes de charges opposées. Elle repose sur le dépôt couche par couche (*layer by layer* en anglais) de polyanions et polycations sur un substrat chargé par interactions électrostatiques, c'est-à-dire sur l'attraction entre la surface du substrat et la première couche de polyélectrolyte puis l'attraction entre les polyélectrolytes de charge opposée des couches suivantes (cf. fig. 4.2). Le moteur de croissance de ces films réside dans l'excès ou surcompensation de charges qui apparaît après chaque nouveau dépôt de polyélectrolyte et qui permet une interaction avec le polyélectrolyte de signe opposé [Decher 1997]. Ainsi, le rajout du polyanion (ou polycation) sur le film se terminant par un polycation (ou polyanion) entraîne la neutralisation de l'excès de charges positives (négatives) et la création d'un nouvel excès de charges négatives (positives).

Ce type de films se construit aussi bien sur des lames de verre [Lvov 1993] que sur des supports de silice [Liu 1997], de quartz [Lvov 1997], de mica [Kim 1999], de silicium [Izquierdo 2005] ou encore sur des supports métalliques d'or [Caruso 1997]. Peu importe la nature, la topographie ou la taille du substrat, il suffit qu'il soit chargé. D'autre part, ces structures alternées mettent en jeu aussi bien des polymères organiques que des biomolécules comme l'ADN et les protéines.

4.2.1.2 Méthodes de dépôt

La méthode de dépôt par trempages successifs dans les différentes solutions est *a priori* la méthode la plus simple à mettre en œuvre. Elle s'adapte à tous les substrats et peut même être réalisée mécaniquement par un automate. Toutefois, d'autres techniques de dépôt existent.

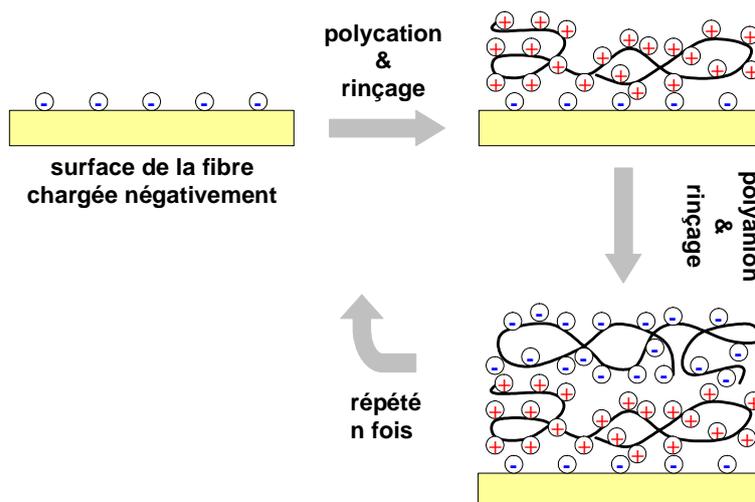


Figure 4.2: Schéma simplifié du principe de construction d'une multicouche de polyélectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions et par répétition cyclique des deux étapes représentées.

Les polyélectrolytes peuvent être déposés à l'aide d'un procédé aérosol, le spray contenant alternativement des polycations et polyanions [Schlenoff 2000]. Chaque étape de dépôt doit être suivie d'une phase de rinçage. Les multicouches de polyélectrolytes obtenues par ce procédé ont la même structure que celles obtenues par trempages.

Une autre méthode consiste à étaler par force centrifuge une gouttelette de polyélectrolytes déposée sur une surface en rotation. Cette technique de *spin coating* [Lee 2001] permet de réduire le temps de dépôt de chaque couche à quelques secondes. L'utilisation de solvants volatiles permet de construire des films sans rinçage entre les dépôts de polyélectrolytes. Les couches déposées par cette méthode présentent une épaisseur homogène.

Ainsi, la méthode d'assemblage doit être choisie selon des critères liés au contexte industriel ou individuel de la construction.

4.2.1.3 Multicouches à croissance linéaire

Les multicouches les plus fréquemment décrites dans la littérature présentent une croissance linéaire de leur masse et de leur épaisseur avec le nombre de dépôts de couches de polyélectrolytes réalisés [Mendelsohn 2000, Wang 2005a]. L'épaisseur par bicouche "polyanion/polycation" est généralement faible (quelques nanomètres), et peut être ajustée en jouant sur les conditions de construction (taux de sel, pH, etc.) [Dubas 1999, Shiratori 2000]. L'épaisseur totale des films peut également être modulée par le nombre de couches déposées.

La structure des films de polyélectrolytes à croissance linéaire n'est cependant pas uniforme sur toute l'épaisseur de la multicouche [Ladam 2000a]. Il convient de distinguer trois zones (cf. fig. 4.3).

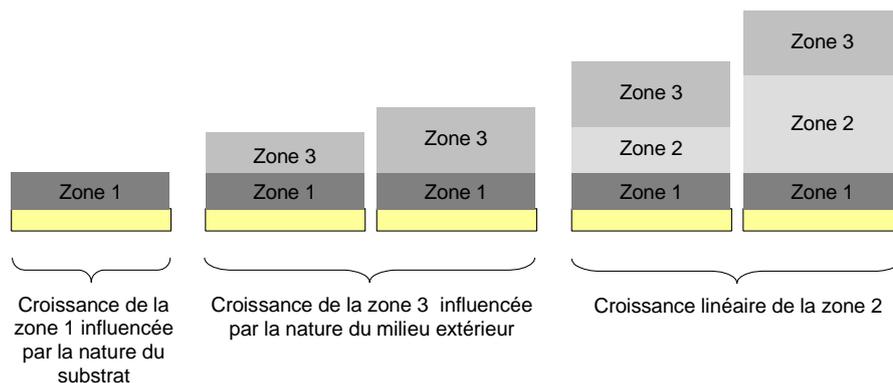


Figure 4.3: Représentation schématique du modèle des trois zones d'un film à croissance linéaire.

L'adsorption des polyélectrolytes déposés lors des premiers cycles de dépôt ainsi que leur arrangement sont influencés par la nature du substrat. C'est grâce aux multiples interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et les charges de surface que la multicouche présente une bonne adhésion sur le substrat. Cependant, outre les interactions électrostatiques, des forces secondaires à courte distance, comme les interactions hydrogènes et hydrophobes, ont également une influence sur l'épaisseur et la morphologie finales de ces premières couches qui constituent la zone 1. Généralement, l'épaisseur des couches de polyélectrolytes de la zone 1 est inférieure à celles des couches déposées par la suite [Lösche 1998]. Une fois les premières couches déposées, ce sont les interactions avec le milieu extérieur qui dirigent le dépôt, soit ici la solution dans laquelle trempe la fibre. C'est dans cette zone qu'il y a surcompensation pour permettre l'adsorption des couches successives de polyélectrolytes. Il s'agit de la zone 3. Après le dépôt d'un certain nombre de paires de couches, une zone intermédiaire apparaît. C'est la zone 2 dans laquelle la structure du film n'est plus contrôlée par les interfaces du film avec le substrat et le milieu extérieur. Il y a alors compensation totale des charges et les bicouches ont toutes la même épaisseur.

Le dépôt des couches supplémentaires a lieu en zone 3, mais au fur et à mesure que le processus de construction se poursuit, le bas de la zone 3 se restructure pour former la zone 2. C'est donc la zone 2 qui croît en épaisseur tandis que la zone 3 conserve une épaisseur constante à l'interface entre le film et le milieu extérieur.

Les films multicouches de polyélectrolytes possèdent donc rapidement, au cours de leur construction, des caractéristiques indépendantes du substrat. Ainsi, la multicouche de polyélectrolytes fait office d'espaceur permettant d'isoler le biorécepteur de la surface du substrat et donc d'éviter d'éventuelles interactions entre ce dernier et la biomolécule cible.

Cette technique offre par ailleurs un large choix quand aux matériaux utilisés et aux propriétés des films obtenus. Par sa simplicité et la diversité des applications possibles, les champs de recherche de cette récente technique de fonctionnalisation sont encore très larges. Toutefois, les interactions ioniques sont fortement dépendantes des variations de pH et de force ionique.

4.2.1.4 Influence des paramètres de construction

Influence du pH des solutions de polyélectrolytes Le degré d'ionisation (densité de charges par chaîne) et par voie de conséquence la conformation des chaînes de polyélectrolytes en solution (interactions intra-chaînes) est fortement dépendant du pH.

Ces effets sont décrits par Shiratori et Rubner qui montrent que lors de la construction d'une multicouche (PAA¹-PAH²), l'incrément d'épaisseur à chaque dépôt dépend du pH de la solution de polyélectrolyte correspondante [Shiratori 2000]. À $pH = 7$, l'épaisseur de chaque couche n'est que de 0,5 nanomètre tandis qu'à $pH = 5$ ou 9 , elle est comprise entre 4 et 8 nanomètres. D'après les auteurs, cette différence est directement liée aux variations de quantités de charges présentes sur la chaîne de polyélectrolytes. À $pH = 7$, les chaînes sont très ionisées car le pI (pH correspondant à une densité de charge nulle : les charges positives et négatives se compensent) du PAA est de 5 et celui du PAH est de 9. Le PAA est fortement chargé « moins » tandis que le PAH est fortement chargé « plus ». La densité de charge élevée induit une répulsion forte le long de chaque chaîne. Ces dernières adoptent une conformation allongée, d'où des quantités de polyélectrolytes déposées plus faibles. À $pH = 5$ ou 9 , l'un des polyélectrolytes est proche de la neutralité tandis que l'autre est très fortement chargé. Les chaînes très ionisées conservent une conformation allongée tandis que celles qui le sont peu adoptent une conformation plutôt sous forme de pelote et l'incrément d'épaisseur après chaque dépôt est plus grand.

Influence de la force ionique Lösche a démontré que la force ionique peut avoir une influence sur l'épaisseur et la rugosité des multicouches de polyélectrolytes [Lösche 1998]. L'épaisseur et la rugosité des couches déposées augmentent généralement de manière significative lorsque la concentration saline des solutions de polyélectrolytes utilisées lors de la construction augmente. Ces observations résultent des changements de conformation des chaînes de polyélectrolytes engendrés par les variations de force ionique. À force ionique faible, la répulsion entre les charges présentes le long des chaînes n'est pas suffisamment écrantée par les ions. Les chaînes adoptent une conformation allongée (en bâtonnet) pour agrandir au maximum la distance entre les charges et ainsi diminuer la force de répulsion. À force ionique élevée, l'écrantage est plus important. La répulsion entre les charges de chaque chaîne est donc plus faible et elles adoptent une conformation en pelote, dont l'effet est alors d'augmenter l'épaisseur du film. Néanmoins, ces variations sont fortement dépendantes du couple de polyélectrolytes choisi [Dubas 1999, Schönhoff 2003].

D'autre part, un film construit en utilisant des solutions de force ionique élevée pour augmenter la quantité de polyélectrolytes déposée et l'épaisseur de la multicouche gonfle lorsqu'il est mis en contact avec une solution de force ionique plus faible. Ce gonflement est néanmoins totalement réversible une fois que le film est remis dans les conditions initiales de concentration saline [Ladam 2000b].

¹PAA : poly(acide acrylique), polyélectrolyte chargé négativement.

²PAH : poly(allylamine hydrochloride), polyélectrolyte chargé positivement.

Polyélectrolytes utilisés Tous les polyélectrolytes portant une densité de charge suffisante sont susceptibles d'être intégrés dans l'architecture des films multicouches. Des polyélectrolytes synthétiques non dégradables, tels les polyanions PSS (polystyrenesulfonate), PAA (acide polyacrylique), PMA (acide polyméthacrylique), PVS (polyvinylsulfonate) et les polycations PEI (polyéthylèneimine), PAH (polyallylamine sous forme hydrochlorure), sont largement utilisés car ils sont produits à échelle industrielle. Des polyélectrolytes à base d'acides aminés tels que le (acide polyglutamique) et les (acide polyaspartique) sont aussi synthétisés pour leur propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité.

Des polyélectrolytes biologiques (protéines ou ADN) naturels ou synthétiques sont utilisés pour le développement de surfaces biocompatibles. Ainsi, la fonction amine libre de la PLL (poly(L-lysine)), protéine synthétique utilisée en biologie pour améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaire, offre également la possibilité d'être conjuguée à des molécules bioactives telles que des peptides [Mezö 2000] ou de l'ADN [Wu 1987, Wagner 1991]. Des polysaccharides comme le chitosane [Richert 2004] ou le dextrane peuvent également être intégrés dans une multicouche de polyélectrolytes.

4.2.2 Polymères

4.2.2.1 Définitions

La surface du transducteur peut être modifiée par greffage d'un polymère [Zhao 2000]. Deux méthodes sont envisageables.

La première façon de procéder, dite *grafting onto*, consiste à greffer une macromolécule fonctionnelle (par exemple un polymère) sur le substrat. Cette méthode autorise une grande diversité de combinaisons chimiques entre la nature du polymère et celle du lien chimique avec le support. La diffusion des espèces au sein de cette couche polymère constitue cependant une limitation majeure à l'utilisation de cette méthode. Elle est d'autant plus marquée que la longueur des chaînes est importante, car le volume occupé par les premières chaînes greffées gêne l'accès aux sites réactifs vacants sur le substrat, ce qui ne permet pas d'atteindre des densités de greffage très importantes.

La seconde méthode, dite *grafting from*, permet d'obtenir des couches de polymère de densité plus importante. Elle consiste à greffer le polymère par croissance des chaînes à partir de la surface, par addition successive de monomères à partir d'un site d'amorçage. Le greffage est donc obtenu en deux étapes :

- (i) immobilisation de l'amorceur sur la surface,
- (ii) croissance des chaînes par polymérisation *in situ* des monomères

4.2.2.2 Polymérisation *grafting from*

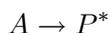
Le greffage de polymères nécessite une première étape (qui peut dans certains cas être divisée en plusieurs sous-étapes) de modification des surfaces qui permet la création de fonctions chimiques qui seront utilisées comme centres actifs pour l'amorçage des réactions de polymérisation. La nature du centre actif porté par l'amorceur doit être compatible avec le monomère utilisé pour la polymérisation. Trois types de centres actifs sont communément considérés :

- (i) les charges positives,
- (ii) les charges négatives,
- (iii) les électrons célibataires ou radicaux libres.

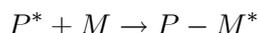
Les charges positives et négatives donnent respectivement lieu à des polymérisations cationiques et anioniques. Les radicaux libres, présents sur les entités porteuses d'un nombre impair d'électrons, donnent naissance à des polymérisations radicalaires.

Quelle que soit la nature du centre actif, le schéma général d'une polymérisation *grafting from* est le suivant :

Activation de l'amorceur Sous l'action de la chaleur ou de la lumière, un centre actif primaire P^* est généré par un amorceur A fixé sur la surface.



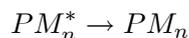
Amorçage Le centre actif P^* active une molécule de monomère M en transférant le centre actif sur l'unité monomère.



Propagation Elle constitue la phase importante du mécanisme puisque c'est au cours de cette étape que se forme la macromolécule. L'espèce active nouvellement formée PM^* réagit à son tour avec une autre molécule de monomère M pour transférer le centre actif sur la nouvelle entité monomère générée et ainsi de suite.



Terminaison Elle peut se produire à n'importe quel degré de polymérisation de la chaîne en croissance, lorsque la source de lumière ou de chaleur est arrêtée.



4.2.3 Silanisation des substrats de silice

Il est possible, cela ayant été montré depuis une vingtaine d'années, de procéder à la fonctionnalisation des substrats de silice (comme les fibres optiques) par des silanes pour changer la nature des groupements fonctionnels de surface. Ceux-ci peuvent ensuite être directement liés à un biorécepteur. La silanisation permet alors d'obtenir une couche d'accrochage qui assure la fixation entre le support inorganique solide (substrat de silice) et les molécules biologiques. Cependant, elle constitue souvent la première étape d'un processus de fonctionnalisation plus complexes. Elle est notamment utilisée comme briques de base servant à fixer l'amorceur nécessaire à la polymérisation *grafting from*.

La silice est constituée d'un réseau de tétraèdres SiO_4 . Les atomes Si de surface conservent leur coordination avec quatre atomes d'oxygène sous forme de groupes silanols ou de ponts siloxanes (cf. fig. 4.4).

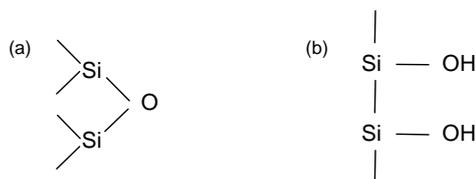


Figure 4.4: Pont siloxane (a) et groupe silanol (b), présents sur les surfaces de silice.

Pour être réactifs, les groupements de surface doivent être sous leur forme silanol car la fixation de molécules organiques (comme les silanes) à la surface de la silice implique un greffage covalent où les silanols en surface réagissent avec un organosilane (cf. fig. 4.5).



Figure 4.5: Schéma d'une réaction de silanisation. Les silanols en surface réagissent avec un organosilane tri-fonctionnel où EtO est le groupement fonctionnel pouvant réagir avec les silanol et R le groupement organique à fixer.

Trois types d'organosilanes peuvent être utilisés : mono-, di- et trifonctionnels qui possèdent respectivement un, deux et trois groupement fonctionnels pouvant réagir avec les silanols

présents sur la surface de silice. Les organosilanes monofonctionnels présentent l'avantage de ne se greffer que sous la forme d'une monocouche. Cependant, leur réactivité est faible et ne permet pas d'obtenir des couches denses. Les silanes di- et trifonctionnels sont plus réactifs. Par contre, ils peuvent se polymériser en solution (cf. fig. 4.6) avant le greffage à la surface, ce qui peut générer la formation de multicouches où l'accessibilité aux fonctions réactives devient plus limitée. Ce phénomène est considérablement réduit lorsque les silanes sont utilisés en milieu organique. Pour optimiser la réaction de silanisation, il est également nécessaire de prendre en compte différents paramètres tels que la température [Parikh 1994] et le temps de greffage, la concentration et la nature de l'organosilane en solution ou le type de solvant [McGovern 1994, Chen 1982].

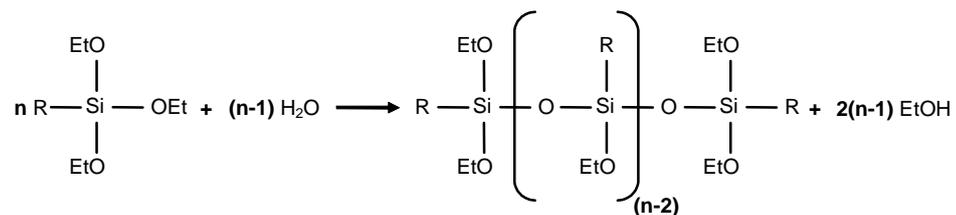


Figure 4.6: Polymérisation d'un organosilane trifonctionnel en présence de molécules d'eau.

De nombreux travaux traitant du greffage d'organosilanes sur un substrat de silice utilisent un protocole faisant intervenir une synthèse en milieu organique [Subramanian 1999] et/ou à haute température [Xiao 1996]. Cependant, certains auteurs ont rapporté des méthodes de greffage à basse température et en milieu aqueux [Péré 2005]. En présence d'eau, le groupe alkoxy (par exemple EtO) de l'organosilane s'hydrolyse facilement en silanol. Le silane hydrolysé peut ensuite réagir à la surface de la silice (cf. fig. 4.7).

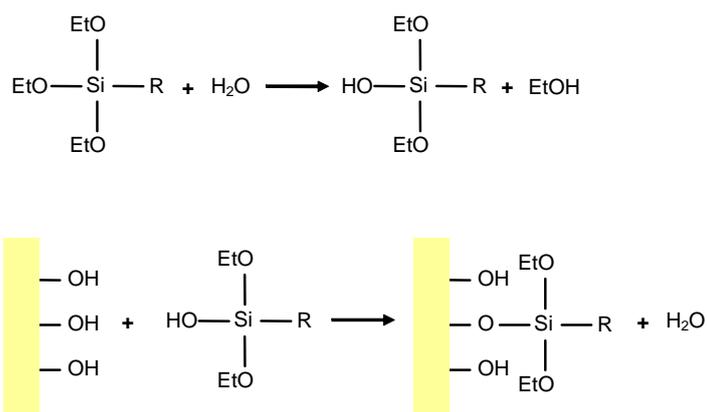


Figure 4.7: Réaction d'hydrolyse de l'organosilane et sa fixation à la surface de silice.

De la même façon, le retour en milieu aqueux d'un substrat silanisé en milieu organique conduit à l'hydrolyse des groupes alkoxy (EtO) n'ayant pas réagi. Ils se greffent alors entre eux et forment une couche de polymère sur le substrat [Kallury 1994].

4.2.4 Immobilisation du biorécepteur

La fixation du biorécepteur repose généralement sur des interactions électrostatiques, des liaisons covalentes ou la grande affinité pouvant exister entre des entités chimiques telles que l'avidine et la biotine.

4.2.4.1 Adsorption de protéines par interactions électrostatiques

Définition : point isoélectrique Le point isoélectrique (pI) d'une molécule (la plupart du temps une protéine ou un peptide) est défini comme étant le pH pour lequel la charge globale de cette molécule est nulle. Cela ne signifie pas pour autant qu'elle ne possède aucun groupement chargé mais seulement que les charges positives compensent les charges négatives. Si le pH est inférieur au pI, la charge globale est positive, car la molécule a tendance à conserver ses protons ou à en capter du milieu acide. En revanche, lorsque le pH devient supérieur au pI, la charge globale est négative, car la molécule a tendance à céder ses protons au milieu basique.

Les protéines possèdent neuf groupes ionisables. Trois acides aminés (lysine, arginine et histidine) et le groupe fonctionnel terminal amine ($\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$) peuvent contribuer à les charger positivement tandis que deux autres acides aminés (aspartate et glutamate) et le groupe fonctionnel terminal acide carboxylique (COOH/COO^-) sont susceptibles de porter une charge négative. Chaque groupe ionisable ayant une constante d'ionisation différente, le point isoélectrique de chaque protéine dépend de sa composition [Weiller 2004].

Adsorption de protéines sur une multicouche de polyélectrolytes Les protéines étant des molécules chargées, elles peuvent être adsorbées par interactions électrostatiques sur une surface fonctionnalisée par une multicouche de polyélectrolytes [Ladam 2002]. Les modalités d'adsorption varient en fonction de la charge globale portée par la protéine et celle de la dernière couche de polyélectrolytes.

Lorsque la dernière couche et la protéine sont de charges opposées, il y a adsorption mais également diffusion des protéines dans la multicouche. Ce phénomène de diffusion est d'autant plus important que la multicouche de polyélectrolytes est épaisse. Ainsi, la quantité de protéines absorbées augmente avec le nombre de couches de polyélectrolytes. La présence de protéines en profondeur de la multicouche a été mise en évidence par spectroscopie infrarouge [Salloum 2004]. En mesurant la quantité de protéines présentes en profondeur pour différentes valeurs du nombre de bicouches, il a même été possible de déterminer le coefficient de diffusion des protéines dans la multicouche de polyélectrolytes. L'observation par microscopie à force atomique montre que la surface des échantillons biofonctionnalisés est relativement homogène.

Des protéines de même charge que la dernière couche de polyélectrolytes peuvent être adsorbées mais elles restent en surface de la multicouche. Ainsi, la quantité de protéines absorbées reste faible et ne dépend plus du nombre de couches de polyélectrolytes. L'analyse par spectroscopie infrarouge permet de confirmer cette hypothèse. L'observation par microscopie à

force atomique met alors en évidence la formation d'îlots de protéines agglomérées. Deux hypothèses sont proposées :

- (i) Certaines zones de la surface de la multicouche de polyélectrolytes sont modifiées, peut-être par interactions hydrophobes, ce qui permet aux protéines de se fixer en surface, mais comme les agrégats de protéines sont de même charge, ils se repoussent.
- (ii) Comme les couches de polymères chargés positivement et négativement sont intimement liées et imbriquées, il est possible que certaines portions de polymères de charges opposées à celle de la protéine émergent en surface et permettent ainsi l'immobilisation de quelques protéines en surface.

Ainsi, afin d'assurer une adsorption uniforme et maximale, la dernière couche de polyélectrolytes doit être de charge opposée à celle de la protéine au pH de travail.

Influence de la force ionique La concentration en sel du milieu peut avoir une influence sur la quantité de protéines bioréceptrices immobilisées dans la multicouche. En effet, les ions de charge opposée à celle de la surface, présents dans les solutions de force ionique non-nulle, peuvent venir se fixer sur les sites chargés, diminuant ainsi la quantité de protéines qui pourraient potentiellement être absorbées. Mais l'influence de la force ionique ne s'arrête pas là car, même des protéines absorbées à faible concentration ionique risquent d'être remplacées par des ions si la surface biofonctionnalisée est placée dans un milieu de force ionique importante : la protéine est remplacée par des ions de même charge.

4.2.4.2 Greffage covalent de biomolécules

La fonctionnalisation d'un substrat peut être réalisée en plusieurs étapes et aboutir à un assemblage complexe composé de plusieurs couches. Pour que le greffage du biorécepteur puisse se faire de façon covalente, le dernier étage de cette construction chimique possède généralement des groupements fonctionnels destinés à fixer de façon covalente les biorécepteurs par leur extrémité amine, cette fonction faisant partie intégrante de la majorité des molécules biologiques. Les extrémités amines ne sont pas les seules à être utilisées pour le greffage covalent (thiol SH, carboxyle COOH) mais les autres cas ne seront pas traités.

Il existe un certain nombre de groupes fonctionnels autorisant le greffage des biorécepteurs par l'intermédiaire de leur groupement amine. Seuls deux exemples seront évoqués : les groupes fonctionnels carboxyle et aldéhyde ou cétone.

Groupe fonctionnel carboxyle Les carbodiimides sont utilisés pour former une liaison amide entre une fonction amine d'un biorécepteur et une fonction carboxylique COOH présente sur la surface du transducteur [Grabarek 1990]. Ils sont généralement utilisés en combinaison avec du N-hydroxysuccinimide (NHS) qui s'hydrolyse lentement en phase aqueuse. L'avantage de l'utilisation combinée du NHS et des carbodiimides est de permettre la stabi-

lisation de l'intermédiaire actif, afin qu'il puisse finalement réagir avec le groupement amine primaire NH_2 .

Les travaux de Johnson ont montré que le rendement est optimal lorsque les groupements carboxyles COOH sont activés par une solution de N-hydroxysuccinimide (NHS) à 0,05 mol/L et 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) à 0,2 mol/L fraîchement préparée [Johnson 1991]. Cette étape d'activation des groupes COOH aboutit à la formation de groupes esters de NHS, susceptibles de réagir avec des nucléophiles (cf. fig. 4.8).

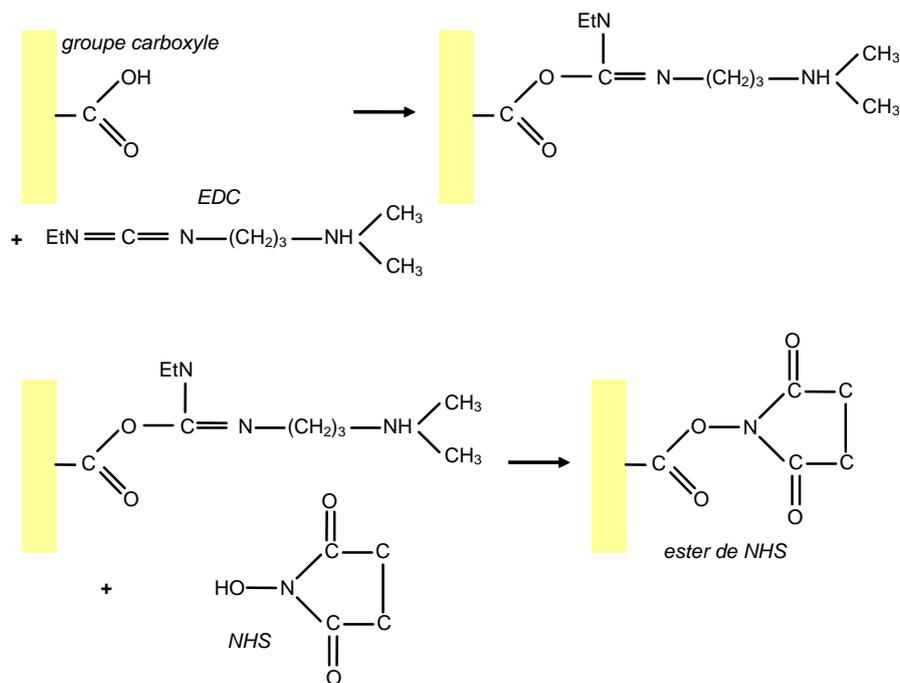


Figure 4.8: Réactions successives de l'EDC et du NHS permettant la création d'un groupement ester de NHS.

Après rinçage à l'eau ultra pure (18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$), l'ester de NHS réagit avec la fonction amine primaire présente sur les molécules biologiques en libérant le groupement NHS pour former une liaison covalente (cf. fig. 4.9).

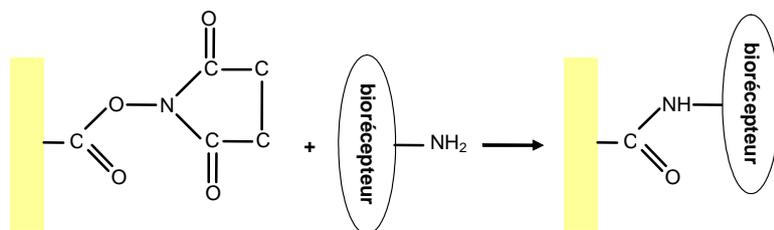


Figure 4.9: Réaction de l'ester de NHS permettant la création d'une liaison covalente entre un acide carboxylique et une fonction amine primaire présente sur le biorécepteur.

Pour éviter d'éventuelles répulsions de type électrostatique, il peut être utile que le pH de la solution soit inférieur au point isoélectrique de la biomolécule (anticorps, antigène).

Groupe fonctionnel aldéhyde ou cétone La fonction amine primaire présente sur les molécules biologiques peut réagir avec un groupement aldéhyde ou cétone présent à la surface du transducteur. Ces réactions passent par un état intermédiaire instable qui se déshydrate spontanément (cf. fig. 4.10).

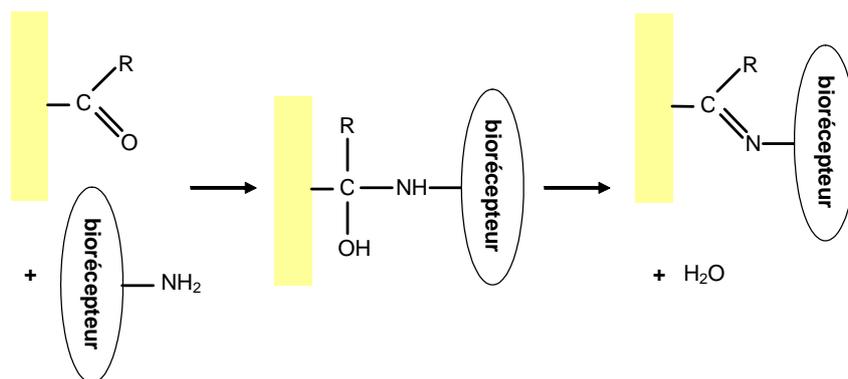


Figure 4.10: Réaction du groupe fonctionnel aldéhyde (R = H) ou cétone (R = chaîne carbonée) avec une fonction amine primaire présente sur le biorécepteur.

4.2.4.3 Affinité avidine biotine

Les travaux de Green, publiés en 1963, ont montré que l'avidine offre une forte affinité pour la biotine [Green 1963]. Le système avidine-biotine est aujourd'hui utilisé dans une très large gamme d'applications de biodétection [González-García 2000]. Cet engouement s'explique par l'absence d'interaction entre l'avidine et la chaîne latérale portant le groupement acide carboxylique de la biotine. Ce site peut donc être modifié pour fixer un biorécepteur sans risque d'altération de la fixation de l'autre partie de la biotine sur l'avidine. Un grand nombre de molécules biologiques destinées à des applications de biodétection sont aujourd'hui commercialisées sous leur forme biotinylée.

La configuration la plus courante consiste à greffer la biomolécule réceptrice biotinylée sur une surface fonctionnalisée par l'avidine ou l'une de ses molécules dérivées (la streptavidine, l'extravidine, etc). L'avidine peut être fixée sur la surface par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques sur une monocouche ou une multicouche de polyélectrolytes ou de façon covalente sur un substrat recouvert d'un assemblage moléculaire assurant d'un côté la liaison avec la surface et de l'autre présentant un groupe fonctionnel pouvant réagir avec l'avidine. Il est même possible d'utiliser l'affinité avidine-biotine une seconde fois [Birkert 2000] en utilisant un substrat recouvert d'une molécule assurant d'un côté la liaison avec la surface et de l'autre présentant une biotine capable de fixer l'avidine telles que des silanes biotinilés [Busse 2002].

4.3 Conclusion

Dans cette première partie, les définitions relatives à la mise au point de biocapteurs issus de la technologie des réseaux de Bragg en angle fibrés ont été données. Du principe de fonctionnement des transducteurs à fibres optiques aux méthodes de biofonctionnalisation garantissant la sélectivité des biocapteurs, en passant par la description d'un certain nombre de technologies de biocapteurs, cette revue bibliographique permet d'aborder la seconde partie de ce manuscrit, consacrée à la description des stratégies adoptées pour la mise en œuvre pratique de biocapteurs à fibres optiques fondés sur la technologie des réseaux de Bragg en angle fonctionnalisés.

Deuxième partie

Méthodologie développée

Chapitre 5

Matériels et méthodes de détection

Lors des différentes étapes de réalisation et de test des biocapteurs fondés sur la technologie des réseaux de Bragg à traits inclinés, les caractéristiques de la réponse spectrale en transmission du réseau sont analysées en temps réel. La même instrumentation est également utilisée pour le suivi en temps réel des cinétiques d'inscription de réseaux de Bragg en angle. Cette méthode d'inscription sera détaillée en deuxième partie de ce chapitre. Il a déjà été démontré qu'un réseau de Bragg à traits inclinés inscrit dans le cœur d'une fibre monomode peut être utilisé comme transducteur pour la mesure de l'indice de réfraction du milieu entourant la gaine optique [Laffont 2001c]. Cette propriété, qui résulte du couplage du mode guidé vers les modes de gaine et le continuum de modes radiatifs, les rend également intéressants pour la détection du greffage ou de la désorption de molécules en surface de la gaine optique et donc la réalisation de biocapteurs. Une méthode originale d'analyse numérique, permettant un traitement rapide et en temps réel des données, sera présentée en dernière partie de ce chapitre.

5.1 Mesures spectrales

5.1.1 Description du montage

Chaque étape de biofonctionnalisation ou de détection est suivie en temps réel au moyen d'un système d'analyse capable de détecter les variations de réponse spectrale en transmission, induites par le greffage (ou la désorption) de molécules sur la surface d'un réseau de Bragg à traits inclinés. Les spectres de transmission du réseau de Bragg en angle sont enregistrés sur la bande spectrale [1490 nm ; 1590 nm] avec une cadence d'acquisition d'un spectre toutes les cinq secondes.

Pour ce faire, le système de mesure se compose d'une source accordable connectée sur l'entrée de la fibre à réseau de Bragg et d'un détecteur qui mesure le signal en sortie de la fibre. L'utilisation d'un coupleur permet d'envoyer le signal issu de la source sur un second détecteur. L'acquisition d'un spectre de référence acquis grâce à un second détecteur est destinée à

la normalisation de la réponse spectrale en transmission du réseau. Source et détecteurs sont reliés à un ordinateur qui assure le balayage sur la plage spectrale d'intérêt et l'acquisition des spectres de mesure et de référence (cf. fig. 5.1). En temps que source accordable, nous avons utilisé une diode laser à cavité externe et comme détecteurs, des photodiodes InGaAs.

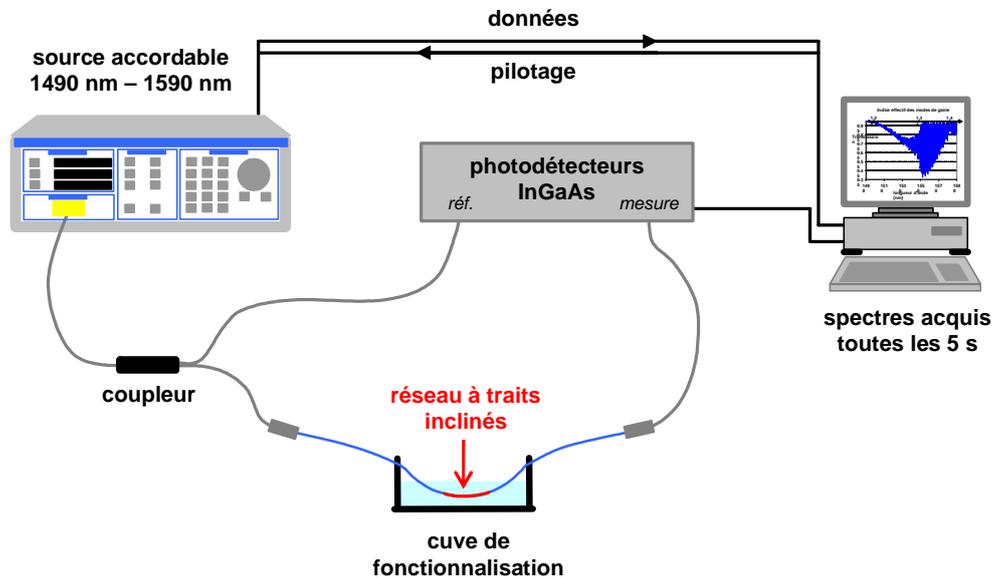


Figure 5.1: Schéma de principe du système d'analyse spectrale en transmission.

5.1.2 Principe de fonctionnement de la source accordable

La mesure consiste à balayer une large plage de longueurs d'onde au moyen d'une raie d'émission laser très fine spectralement. Aussi la source accordable, de modèle Tunics-PR et de marque Photonetics¹, consiste-t-elle en une diode laser couplée à un réseau de diffraction permettant de sélectionner un mode de la cavité laser. Cette dernière est composée d'une lentille de collimation, du réseau et d'un dièdre réflecteur. L'introduction du dièdre réflecteur dans la cavité (configuration Littman-Metcalf) permet la conservation du rapport longueur de cavité L_c sur longueur d'onde émise lors du balayage du spectre, obtenu par la rotation du dièdre autour du point A (cf. fig. 5.2).

La cavité optique est associée à un ensemble de modes de résonance fréquemment espacés de $\frac{c}{2L_c}$ où c désigne la vitesse de la lumière. Le réseau de diffraction permet de sélectionner l'un de ces modes de résonance. Cette configuration de cavité permet théoriquement une accordabilité continue (exempte de sauts de modes) de la longueur d'onde d'émission sur une large plage.

¹PME française basée à Marly-le-Roi, rachetée fin 2000 par le groupe danois GN Nettest.

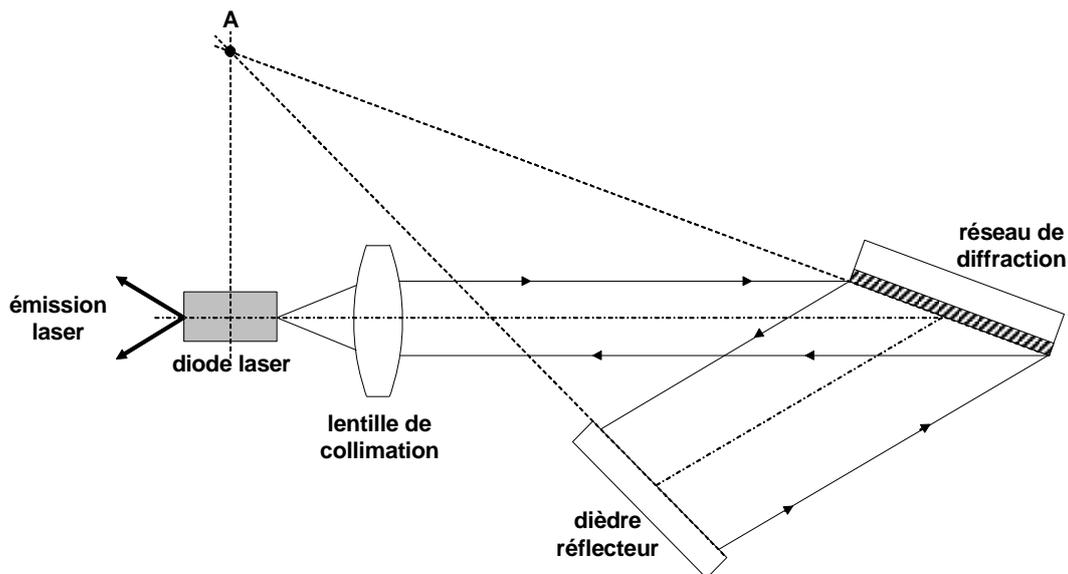


Figure 5.2: Schéma de principe de la cavité laser d'une source accordable spectralement (configuration Littman-Metcalf).

5.1.3 Caractéristiques du montage

La source permet d'accorder la longueur d'onde d'émission sur une plage allant d'environ 1490 nm à 1590 nm, avec une puissance de sortie pouvant atteindre 3 mW. La largeur de la raie d'émission est de 100 kHz, ce qui correspond à une largeur spectrale de 0,8 fm. La résolution spectrale de la source lors du balayage en longueur d'onde correspond à l'incrément minimum de 1 pm de la longueur d'onde d'émission. Cette valeur permet une caractérisation très fine du spectre des réseaux de Bragg. En pratique, cette résolution peut être dégradée par des sauts de mode ($\simeq 40$ pm) ou des fluctuations de puissance de la source. Pour s'en affranchir, les spectres sont normalisés. Une seconde voie de détection, faisant office de référence, est ajoutée pour l'enregistrement du spectre d'émission de la source. La normalisation est obtenue en faisant le rapport de la réponse spectrale en transmission du réseau de Bragg à traits inclinés sur le spectre d'émission de la source.

La fonction d'accordabilité de la source peut être utilisée en mode de balayage pas-à-pas ou en mode rapide. Ce dernier mode, utilisé pour le suivi en temps réel des cinétiques d'adsorption de molécules en surface du transducteur, permet de parcourir l'intervalle spectral de 100 nm en à peine plus d'une seconde. Le mouvement de balayage étant très rapide, il présente des phases d'accélération et de décélération du moteur pilotant la rotation du réseau, respectivement en début et fin de plage spectrale. Il est donc nécessaire de réaliser les mesures en-dehors de ces plages, couvrant environ 2 nm pour une plage spectrale analysée de 100 nm. Dans le cadre des travaux qui sont présentés dans ce manuscrit, l'étendue spectrale utile est sensiblement inférieure à 100 nm. Cette contrainte ne représente donc pas une limitation. Dans le cas de travaux nécessitant le suivi ou la mesure exacte d'une longueur d'onde, il est préférable

d'utiliser des références en longueur d'onde telles que des réseaux de Bragg conditionnés de façon à ne pas présenter de dérive spectrale (par exemple avec la température).

5.2 Inscription du réseau de Bragg à traits inclinés

L'inscription des réseaux de Bragg à traits inclinés fait intervenir un montage à miroir de Lloyd qui fait partie des interféromètres à division du front d'onde.

5.2.1 Principe du montage à miroir de Lloyd

Le banc d'inscription à miroir de Lloyd se décompose en trois modules :

- (i) le module source constitué d'un laser émettant à 244 nm en régime continu,
- (ii) le module optique de mise en forme du faisceau laser composé d'un système afocal pour l'extension du faisceau et d'un micro trou de filtrage spatial,
- (iii) le module interférométrique servant à la création du champ d'interférences nécessaire à l'inscription du réseau.

Le champ d'interférences est créé en divisant et en recombinaut le faisceau mis en forme à l'aide d'un miroir de Lloyd. Ce dernier intercepte une partie du faisceau laser UV incident selon un angle α_{ext} (cf. fig. 5.3). Les interférences se produisent alors dans la zone de superposition entre les parties réfléchiées par le miroir de Lloyd et non réfléchiées du faisceau incident. La valeur de l'interfrange de la figure d'interférence ne dépend que de l'angle d'incidence α_{ext} et de la longueur d'onde λ_{UV} du rayonnement incident (supposé monochromatique). Elle est donnée par la relation :

$$\Lambda_{\perp} = \frac{\lambda_{UV}}{2 \cos \alpha_{ext}} \quad (5.1)$$

5.2.2 Inscription des réseaux standard

Lors de l'inscription d'un réseau de Bragg standard (à traits droits et pas courts), la fibre est maintenue par deux supports magnétiques de sorte que son axe de propagation soit perpendiculaire au plan réfléchissant du miroir de Lloyd ($\theta_{ext} = 0$). Une lentille cylindrique de génératrice parallèle à l'axe de propagation de la fibre optique focalise le faisceau dans le cœur de la fibre. Le réseau de pas égal à l'interfrange de la figure d'interférence s'inscrit dans la portion de fibre située dans le champ d'interférences.

En couplant l'équation donnant la valeur de l'interfrange à la relation de Bragg, il est possible d'en déduire la longueur d'onde de Bragg du réseau en fonction de l'angle d'incidence α_{ext} du faisceau laser UV :

$$\lambda_{Bragg} = \frac{n_{eff} \cdot \lambda_{UV}}{\cos \alpha_{ext}} \quad (5.2)$$

avec n_{eff} l'indice effectif du mode guidé fondamental.

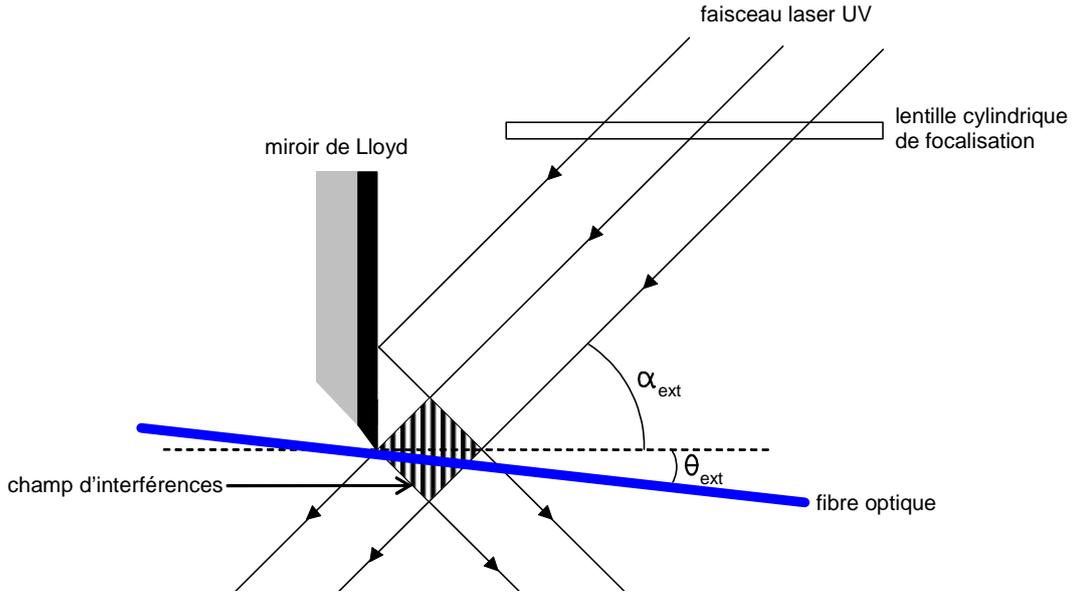


Figure 5.3: Schéma de principe du montage interférométrique à miroir de Lloyd utilisé pour l'inscription de réseaux de Bragg à traits inclinés.

La longueur d'onde de Bragg peut donc être réglée en changeant la valeur de l'angle d'incidence α_{ext} , c'est-à-dire par simple rotation simultanée du miroir de Lloyd et de la lentille sphérique de focalisation de la figure d'interférences sur le cœur de la fibre. A cette fin, la fibre optique est disposée sur une platine de rotation R1 dont l'axe de rotation est confondu avec l'arête du miroir de Lloyd biseauté. Le miroir de Lloyd et la platine de rotation R1 sont fixés sur une seconde platine de rotation R2 dont l'axe de rotation est confondu avec l'arête du miroir et l'axe de rotation de R1. Cette platine R2 permet de régler la valeur de l'angle d'incidence α_{ext} du faisceau laser UV sur le miroir de Lloyd biseauté qui détermine la valeur du pas des franges du champ d'interférences. La platine de rotation R1 sert à introduire un angle θ_{ext} non nul entre la perpendiculaire au plan réfléchissant du miroir de Lloyd et l'axe de propagation de la fibre, nécessaire à l'inscription de réseaux à traits inclinés. Compte tenu de la précision avec laquelle on souhaite généralement ajuster la longueur d'onde de Bragg (100 pm), la résolution des platines de rotation motorisées est de 10^{-3} degré d'angle.

5.2.3 Inscription des réseaux à traits inclinés

Lors de l'inscription d'un réseau de Bragg à traits inclinés, l'introduction d'un angle θ_{ext} entre la fibre et la normale au plan réfléchissant du miroir de Lloyd induit dans le cœur de la fibre optique une inclinaison θ de la figure d'interférences et une période Λ_{eff} différentes respectivement des valeurs de θ_{ext} et Λ_{\perp} correspondant à la figure d'interférences située en-dehors de la fibre. Ce phénomène résulte de la réfraction des rayons lumineux interférents dans le cœur de la fibre au niveau, essentiellement, de l'interface air-gaine optique. En raison de la très faible différence d'indice, l'interface gaine-cœur peut être négligée [Erdogan 1996].

L'angle θ d'inclinaison du plan des franges d'interférences dans la gaine par rapport à l'axe de propagation de la fibre optique et l'angle α entre le rayon réfracté transmis dans la gaine et les franges d'interférences (cf. fig. 5.4) peuvent être calculés en utilisant les relations de Descartes :

$$\begin{cases} n_g \sin(\alpha - \theta) = \sin(\alpha_{ext}^\perp - \theta_{ext}) \\ n_g \sin(\alpha + \theta) = \sin(\alpha_{ext}^\perp + \theta_{ext}) \end{cases} \quad (5.3)$$

où θ_{ext} est l'angle par rapport à la normale aux plans d'égale intensité du champ d'interférences (cf. fig. 5.3) et $\alpha_{ext}^\perp = \frac{\pi}{2} - \alpha_{ext}$ l'angle entre le rayon incident sur la fibre et le plan réfléchissant du miroir de Lloyd.

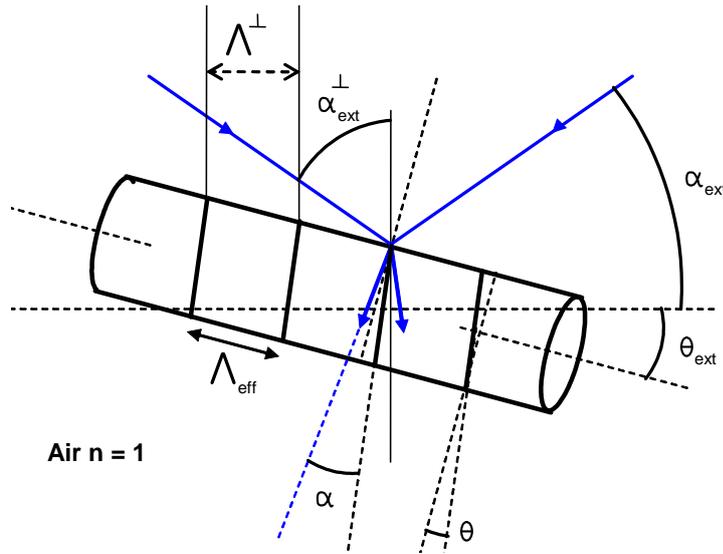


Figure 5.4: Schéma représentant l'influence de la réfraction air-gaine optique sur l'inscription d'un réseau de Bragg à traits inclinés avec un interféromètre à miroir de Lloyd.

Après développement du couple d'équations 5.3 résultant de l'application des lois de Descartes, la somme des équations membre à membre permet d'aboutir à la relation suivante :

$$n_g \sin \alpha \cos \theta = \sin \alpha_{ext}^\perp \cos \theta_{ext} \quad (5.4)$$

Il est alors possible d'en déduire la valeur de l'angle θ d'inclinaison du plan des franges d'interférences dans la gaine optique en fonction des angles θ_{ext} entre la fibre et la normale au plan réfléchissant du miroir de Lloyd et α_{ext}^\perp entre le rayon incident sur la fibre et le plan réfléchissant du miroir de Lloyd :

$$\theta = \frac{1}{2} \left\{ \arcsin \left[\frac{\sin(\alpha_{ext}^\perp + \theta_{ext})}{n_g} \right] - \arcsin \left[\frac{\sin(\alpha_{ext}^\perp - \theta_{ext})}{n_g} \right] \right\} \quad (5.5)$$

D'autre part, la période effective Λ_{eff} des franges d'interférences dans la gaine optique peut s'exprimer en fonction de la valeur Λ_\perp de l'interfrange de la figure d'interférence, donnée par la relation 5.1 :

$$\Lambda_{eff} = \frac{\Lambda_\perp}{\cos \theta_{ext}} = \frac{\lambda_{UV}}{2 \sin \alpha_{ext}^\perp \cdot \cos \theta_{ext}} \quad (5.6)$$

La longueur d'onde de Bragg étant donnée par la formule $\lambda_{Bragg} = 2n_{eff}\Lambda_{eff}$, la relation entre la longueur d'onde de Bragg et l'angle d'inclinaison θ_{ext} est la suivante :

$$\lambda_{Bragg} = 2n_{eff} \cdot \frac{\Lambda_{\perp}}{\cos \theta_{ext}} = \frac{\lambda_{Bragg}^{\perp}}{\cos \theta_{ext}} \quad (5.7)$$

avec n_{eff} l'indice effectif du mode guidé fondamental.

5.3 Caractéristiques de la réponse spectrale en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés avec des réseaux de Bragg à traits inclinés présentant un angle d'inclinaison externe θ_{ext} de 20° .

5.3.1 Couplage du mode fondamental vers les modes de gaine

La réponse spectrale d'un réseau de Bragg à traits inclinés inscrit dans le cœur d'une fibre optique monomode est gouvernée par la condition de résonance suivante :

$$\lambda_{res} = \left(n_{eff}^{01} + n_{eff}^{lm} \right) \cdot \frac{\Lambda}{\cos \theta}$$

où n_{eff}^{01} correspond à l'indice de propagation effectif du mode fondamental, n_{eff}^{lm} à l'indice de propagation effectif du mode de gaine lm , Λ au pas de la modulation d'indice du réseau et θ à l'angle d'inclinaison des traits dans le cœur de la fibre.

Chaque résonance spectrale correspondant au couplage entre le mode fondamental et un mode de gaine contra-directif lm particulier est caractérisée par son coefficient de couplage Ω_{lm} , représentatif de l'intensité du phénomène : les amplitudes des résonances spectrales sont proportionnelles à leurs coefficients de couplage respectifs (cf. fig. 5.5.a). Tant que l'indice de réfraction du milieu extérieur évolue tout en restant inférieur à l'indice de réfraction de la gaine optique, la notion de mode de gaine reste valable puisque la condition de propagation guidée par réflexion totale sur l'interface gaine / milieu extérieur est possible. Toutefois, la valeur de l'indice de réfraction extérieur influence les valeurs des constantes de propagation, et donc des indices effectifs, des modes de propagation de la fibre optique. Par conséquent, les longueurs d'onde des résonances entre le mode guidé et les modes de gaine évoluent avec l'indice de réfraction extérieur.

La réponse spectrale en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés placé dans un milieu d'indice quelconque (inférieur à celui de la gaine) présente des résonances spectralement décalées par rapport au cas classique des réseaux placés dans l'air. Une augmentation de l'indice de réfraction extérieur (en partant de l'indice de l'air) se manifeste par un décalage spectral de l'ensemble des résonances vers les grandes longueurs d'onde (cf. fig. 5.6.a). Lorsque l'indice de réfraction du milieu entourant la gaine optique se rapproche de la valeur de l'indice effectif des modes de gaine, ce phénomène s'accompagne d'une disparition progressive

des différentes bandes de résonance composant la réponse spectrale en transmission (cf. fig. 5.6.b). Il y a alors couplage du mode fondamental vers le continuum de modes radiatifs.

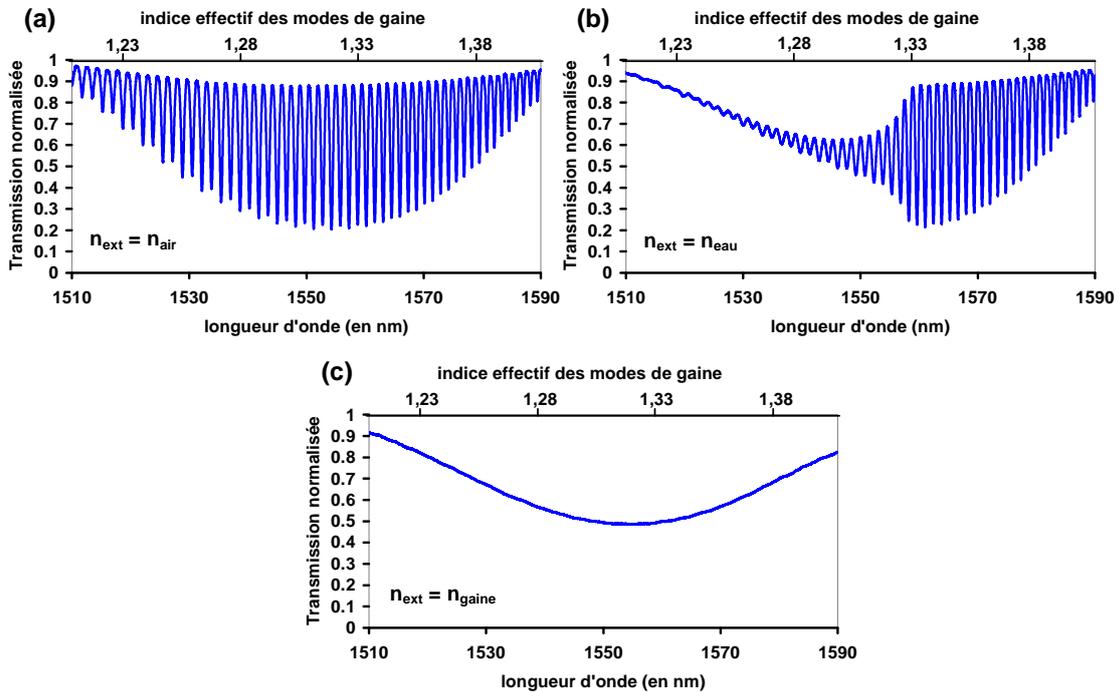


Figure 5.5: Exemple de spectres de transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés ($\theta_{ext} = 20$ degrés) pour trois valeurs de l'indice de réfraction extérieur n_{ext} .

5.3.2 Couplage du mode fondamental vers le continuum de modes radiatifs

Un mode de gain fuit vers le milieu extérieur dès lors que son indice effectif de propagation devient inférieur à l'indice de réfraction moyen du milieu entourant la gaine optique. Il s'agit alors de modes radiatifs. Ces modes n'étant plus résonants, le caractère discret qui prévaut pour les modes guidés et de gain disparaît. Les modes radiatifs forment un continuum. Ces modifications se répercutent sur les valeurs des coefficients de couplage entre modes, et par conséquent sur l'amplitude des différentes résonances composant la réponse spectrale en transmission du réseau de Bragg à traits inclinés. Lorsque l'indice de réfraction extérieur augmente, ce sont les résonances de plus basses longueurs d'ondes, associées aux indices effectifs de gain les plus bas, qui disparaissent en premier. Au fur et à mesure que l'indice extérieur augmente, les amplitudes des résonances correspondant à des longueurs d'onde plus élevées disparaissent à leur tour, ce qui donne lieu à un lissage progressif du spectre (cf. fig. 5.5.b). Le cas extrême correspond à un indice extérieur égal à celui de la gaine optique. Les modes de gain n'existent plus car la cavité formée par la gaine a disparu (la gaine s'étend à l'infini) et ils sont remplacés par des modes radiatifs. Le spectre de pertes observé est alors complètement lisse (cf. fig. 5.5.c).

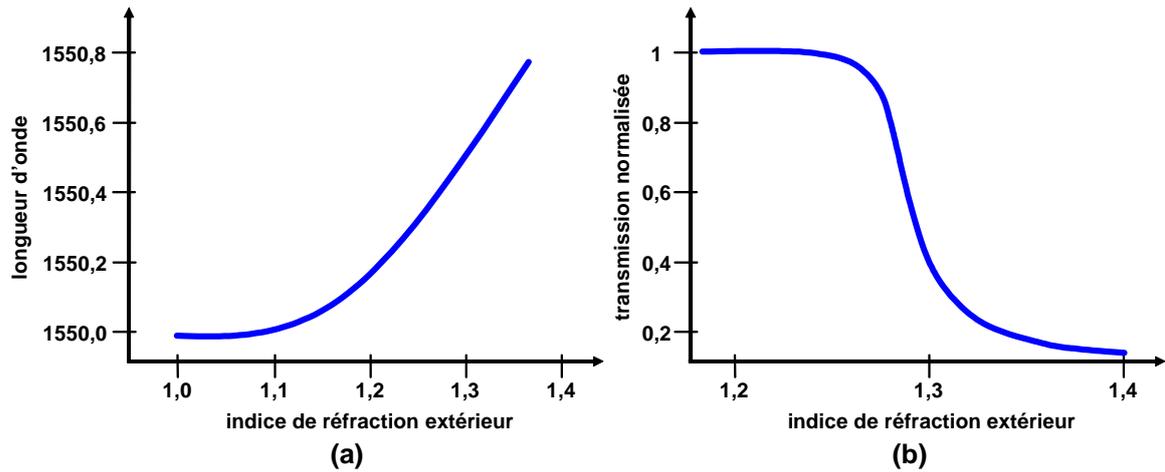


Figure 5.6: Une augmentation de l'indice de réfraction extérieur s'accompagne d'un décalage vers les grandes longueurs d'onde de chaque résonance spectrale (a) ainsi que de la décroissance brutale de son minimum de transmission quand l'indice de réfraction extérieur est proche de l'indice effectif du mode associé (b).

5.3.3 Distance spectrale entre deux résonances consécutives

Comme le montre la figure 5.7, la distance spectrale entre deux résonances consécutives, généralement comprise entre un et deux nanomètres, dépend du mode de gaine associé à la longueur d'onde de résonance. Elle est d'autant plus élevée que la longueur d'onde de résonance associée au mode de gaine est faible. Les variations d'indice de réfraction du milieu entourant la gaine optique ne modifient que faiblement la distance spectrale qui sépare deux résonances consécutives, un gradient négatif est cependant observable.

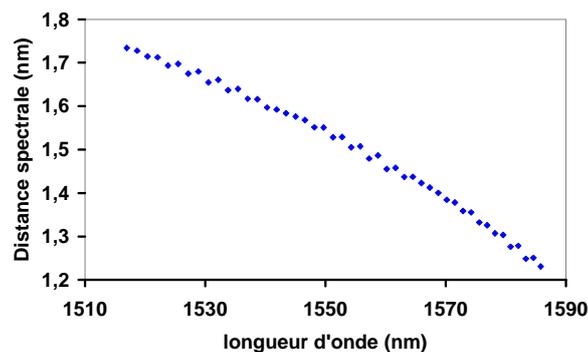


Figure 5.7: Distance spectrale entre deux résonances spectrales consécutives en fonction de la longueur d'onde de résonance associée au mode de gaine correspondant.

5.4 Analyse et traitement numérique des spectres

La sensibilité d'un réseau de Bragg à traits inclinés vis-à-vis des variations de l'indice de réfraction du milieu extérieur se manifeste par des modifications de sa réponse spectrale en

transmission. Des méthodes d'analyse peuvent ainsi être mises au point pour l'exploiter. Ces dernières doivent notamment permettre de remonter de façon univoque à la valeur de l'indice de réfraction du milieu entourant la gaine optique, éventuellement par l'intermédiaire d'une courbe de calibrage. Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, les mesures d'indice de réfraction s'effectuent essentiellement en solution aqueuse. La dynamique de mesure intéressante correspond donc à une plage d'indices de réfraction comprise entre 1,3 et 1,4, c'est-à-dire toujours inférieure à l'indice de gaine.

5.4.1 Approche discrète

Toute augmentation de l'indice de réfraction extérieur sur la plage d'indice de réfraction comprise entre indice de l'air et celui de la gaine se traduit tout d'abord par un décalage spectral de chaque résonance de gaine vers les grandes longueurs d'onde et pour des valeurs d'indice de réfraction extérieur suffisamment élevées (à partir de $n_{ext} = 1,21$ dans le cas d'un réseau pour lequel $\theta_{ext} = 20$ degrés), par une diminution progressive de l'amplitude des différentes résonances de gaine.

5.4.1.1 Suivi du décalage spectral

Le décalage spectral de la longueur d'onde centrale d'une résonance spectrale vis-à-vis de l'indice de réfraction extérieur étant monotone, sa mesure peut constituer un premier critère d'analyse. Cependant, cette approche impose une très grande résolution sur la mesure du décalage spectral. A titre d'exemple, l'obtention d'une résolution de l'ordre de 10^{-4} u.i.r. (unité d'indice de réfraction) sur la mesure de l'indice extérieur nécessite une résolution inférieure au picomètre sur la mesure du décalage spectral dans la plage de longueur d'onde d'intérêt.

5.4.1.2 Suivi de l'amplitude d'une unique résonance spectrale

Un second critère d'analyse consiste à mesurer l'évolution de l'amplitude d'une unique résonance spectrale vis-à-vis de l'indice de réfraction extérieur puisque celle-ci décroît lorsque la valeur de l'indice augmente. Cependant, cette décroissance ne se manifeste de façon significative que sur une plage d'indices de réfraction bien précise, centrée sur l'indice de propagation effectif du mode de gaine associé à la résonance spectrale. La dynamique de mesure pourrait être étendue en considérant successivement plusieurs résonances de gaine. Chaque résonance permettrait alors la mesure de l'indice de réfraction sur une plage de valeurs bien précise. La difficulté de cette approche réside dans la mise au point d'un algorithme de choix de la résonance spectrale à considérer pour la mesure, sachant que la valeur de l'indice du milieu entourant la gaine optique est *a priori* inconnue, et du raccord entre zones.

Finalement, les méthodes d'analyse discrètes, consistant à utiliser un paramètre numérique individualisant une résonance spectrale par rapport au reste du spectre, ne sont pas appropriées à la détermination simple et rapide de l'indice de réfraction extérieur sur une large

plage de mesures. Une solution plus efficace consiste à utiliser la sensibilité spectrale des réseaux de Bragg à traits inclinés vis-à-vis de l'indice de réfraction du milieu extérieur en exploitant la réponse spectrale en transmission dans sa globalité.

5.4.2 Exemple d'approche globale : « méthode des aires »

La « méthode des aires », brevetée par le laboratoire, s'appuie sur le constat suivant : dans le cas d'un indice de réfraction inférieur à celui de la gaine, son augmentation se traduit par une diminution progressive de l'amplitude des différentes résonances spectrales. Par conséquent, la surface occupée par l'ensemble des résonances présentes sur le spectre en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés décroît lorsque la valeur de l'indice augmente. Cette méthode consiste donc à calculer la surface se situant entre les *extrema* du spectre de transmission, ce qui revient finalement à sommer les variations d'amplitude des résonances sur l'ensemble du spectre.

D'un point de vue pratique, cette méthode d'analyse fait intervenir les étapes de traitement des données suivantes :

- (i) Acquisition de la réponse spectrale en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés,
- (ii) Normalisation du spectre par rapport au spectre d'émission de la source mesuré sur la voie de référence, ce qui permet de s'affranchir des fluctuations de puissance optique entre deux mesures consécutives,
- (iii) Détermination numérique des minima et des maxima du spectre correspondant respectivement aux pieds et aux sommets des résonances spectrales,
- (iv) Calcul des enveloppes inférieure et supérieure, c'est-à-dire les courbes passant respectivement par les pieds et les sommets des résonances spectrales,
- (v) Calcul de l'aire délimitée par ces deux enveloppes (cf. fig. 5.8).

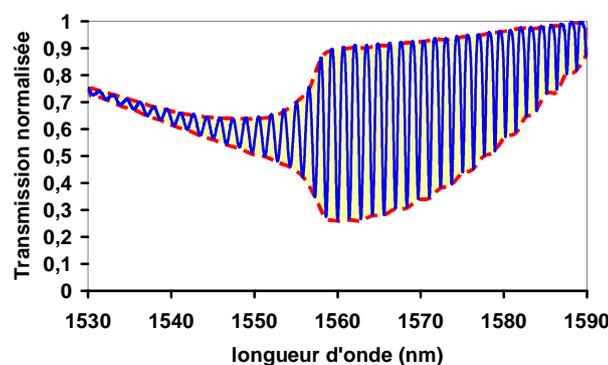


Figure 5.8: Exemple de calcul d'aire associée au spectre en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés.

L'aire ainsi calculée décroît tandis que l'indice de réfraction du milieu entourant la gaine optique augmente et tend vers zéro lorsque ce dernier se rapproche de l'indice de la gaine. L'utilisation de la « méthode des aires » à des fins de mesure passe par une phase d'étalonnage qui permet d'obtenir la loi d'évolution de « l'aire du spectre » pour un réseau de Bragg à traits inclinés donné. Cette dernière est obtenue expérimentalement en utilisant une série de liquides d'indices de réfraction connus très précisément.

La « méthode des aires » est une méthode très puissante qui permet de mesurer des variations d'indice de réfraction sur une large plage de mesure. Son utilisation permet même de mesurer des variations d'indice de réfraction dont la valeur dépasse celle de la gaine [Laffont 2001a]. Néanmoins, la détermination numérique d'une centaine de points correspondant aux pieds et aux sommets de l'ensemble des résonances spectrales ainsi que l'évaluation des enveloppes inférieure et supérieure requièrent un certain nombre de calculs. Ce n'est pas un problème lorsque les mesures d'indice de réfraction sont faites en différé ou avec une faible cadence de mesure. En revanche, pour le suivi en temps réel de cinétiques de réactions chimiques, il peut être intéressant de limiter le temps de calcul. C'est dans ce contexte qu'au cours des travaux présentés dans ce manuscrit, une méthode d'analyse numérique innovante a été implémentée. Il s'agit de la « méthode des fréquences ».

5.4.3 Approche globale basée sur l'analyse fréquentielle du spectre

Cette méthode s'appuie sur le constat suivant : le peigne de résonances spectrales de la réponse spectrale en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés peut être assimilé à un signal pseudo périodique. Il est donc légitime de s'intéresser à l'analyse fréquentielle du spectre de transmission.

La méthode d'analyse développée au cours de ces travaux repose sur l'analyse spectrale par transformée de Fourier rapide (FFT) du spectre de transmission.

Comme le montre la figure 5.7, l'espacement en longueur d'onde entre deux pics de résonances spectrales consécutifs est d'autant plus élevé que leurs longueurs d'onde associées sont faibles. Ainsi, les résonances spectrales associées aux faibles longueurs d'onde sont à l'origine des composantes de faibles fréquences de la transformée de Fourier du spectre de transmission qui se présente donc sous la forme d'un continuum de fréquences. Lorsque l'indice de réfraction du milieu extérieur augmente, les fréquences les plus faibles disparaissent au fur et à mesure que les longueurs d'onde de résonance associées aux modes de gaines se propageant avec un indice effectif inférieur à l'indice de réfraction du milieu entourant la gaine optique ne sont plus guidées.

Cette analyse conduit au raisonnement suivant : lorsque l'indice de réfraction extérieur varie, la fréquence maximale du continuum obtenu par transformée de Fourier du spectre de transmission varie également et dans le même sens. Ainsi, le suivi des variations de la fréquence du maximum permet de remonter aux changements d'indice du milieu extérieur (cf. fig. 5.9).

D'un point de vue pratique, cette méthode d'analyse fréquentielle fait intervenir les étapes de traitement des données suivantes :

- (i) Acquisition de la réponse spectrale en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés,
- (ii) Normalisation du spectre par rapport au spectre d'émission de la source mesuré sur la voie de référence, ce qui permet de s'affranchir des fluctuations de puissance optique entre deux mesures consécutives,
- (iii) Calcul de la transformée de Fourier rapide du spectre,
- (iv) Calcul de la fréquence du maximum.

Cette méthode fréquentielle permet donc de limiter la charge de calcul. La rapidité des mesures s'en trouve franchement améliorée. Au cours de ces travaux, compte tenu du gain de temps obtenu sur le volet traitement du signal grâce à cette nouvelle méthode d'analyse numérique, nous avons également assuré la mise au point d'un second système d'acquisition, plus compact et plus rapide lui aussi : c'est l'objet du prochain paragraphe.

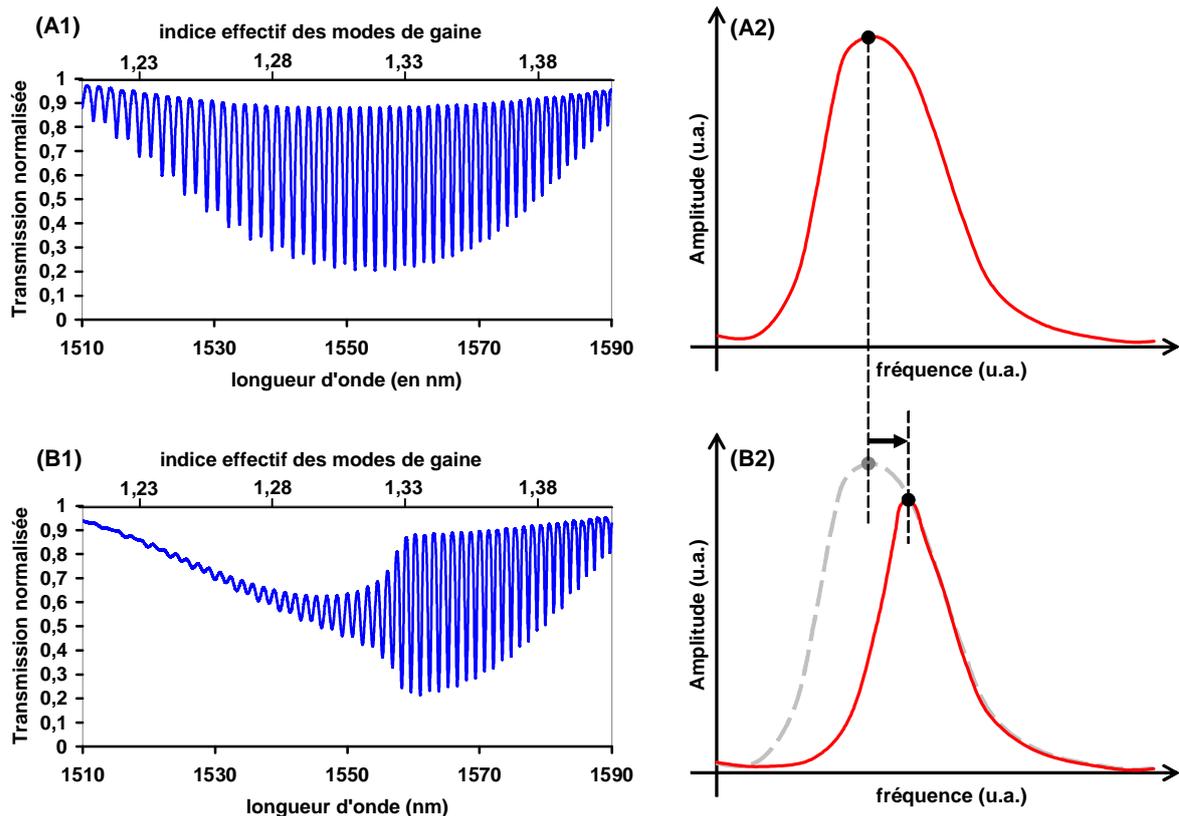


Figure 5.9: Spectres de transmission d'un réseau blazé dans l'air (A1) et dans l'eau (B1). Continuum de fréquences obtenus par transformée de Fourier des spectres de transmission dans l'air (A2) et dans l'eau (B2).

Enfin, pour appliquer cette méthode de traitement des spectres de transmission à la mesure d'indice, une courbe d'étalonnage a été établie à l'aide d'une gamme de liquides d'indices connus (cf. fig. 5.10).

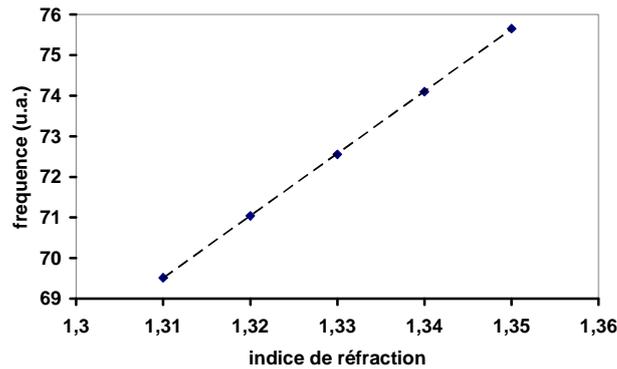


Figure 5.10: Courbe d'étalonnage d'un réseau de Bragg à traits inclinés.

5.5 Le système BraggLight

Contrairement au matériel de mesure précédemment décrit (source accordable et mesure en extrémité de finale de fibre), le système BraggLight développé au laboratoire est cette fois destiné à l'interrogation des réfractomètres à réseaux de Bragg en angle *via* une analyse spectrale en réflexion. Il est constitué d'un boîtier compact connecté à un ordinateur intégrant un logiciel dédié à l'analyse fréquentielle des spectres réfléchis. La communication avec l'ordinateur et l'alimentation est assurées par un unique cordon USB (cf. fig. 5.11).

Compatible avec les contraintes des systèmes embarqués, le système BraggLight développé au Laboratoire de Mesure Optique permet une mesure dynamique précise à des cadences pouvant atteindre 200 Hz. La rapidité de ce système autorise le moyennage des mesures, ce qui s'accompagne d'une amélioration du rapport signal à bruit et par conséquent d'une augmentation de la résolution en terme de variation d'indice. En ce sens, le système BraggLight répond aux besoins de domaines d'applications tels que le suivi en temps réel de cinétiques de réactions lentes et générant de faibles variations d'indice de réfraction.

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, le système BraggLight a pu être utilisé grâce à l'implémentation de la méthode de mesure d'indice de réfraction basée sur l'exploitation de la transformée de Fourier de la réponse spectrale des réseaux de Bragg en angle. Ce mode de calcul est compatible avec la cadence de mesure maximale, soit 200 Hertz. Un moyennage sur 100 points permet d'améliorer la résolution d'un facteur au moins égal à 10. Compte tenu de ces performances, le système BraggLight a servi à évaluer les limites de détection, en terme de concentration en biomolécule cible, des biocapteurs conçus à partir de transducteurs à réseaux de Bragg en angle. Nous allons aborder ces points à l'occasion du prochain chapitre.

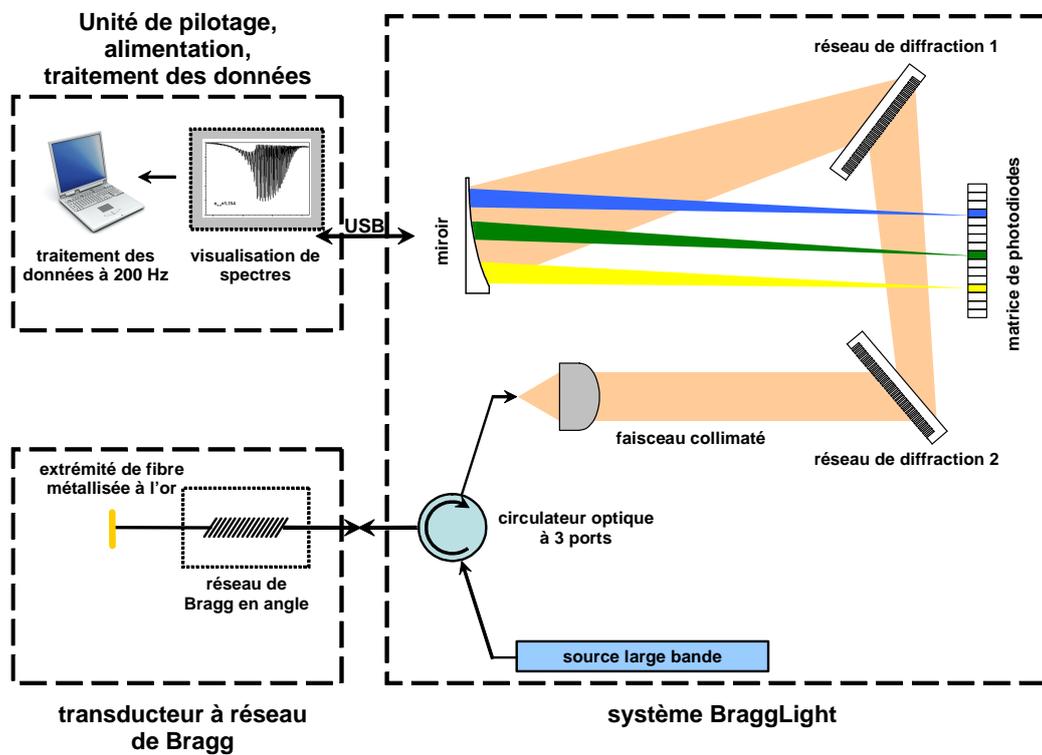


Figure 5.11: Schéma décrivant le principe de fonctionnement du système BraggLight.

Chapitre 6

Réalisation de biocapteurs mettant en œuvre la technologie des réseaux de Bragg

Cette étude vise à concevoir un Capteur à Fibres Optiques biosélectif fondé sur la technologie des réseaux de Bragg en angle, dits aussi réseaux blazés, composants « tout fibre » sensibles aux variations d'indice de réfraction du milieu qui les entoure. Ce type de réfractomètres devient potentiellement sensible vis-à-vis d'un seul type de molécules cibles si la surface du substrat de silice que constitue la fibre optique est biofonctionnalisée, ce qui consiste à greffer, en surface du capteur, un biofilm conçu pour réagir de manière sélective. L'accrochage de la molécule cible sur le biofilm se traduit alors par des variations d'épaisseur et/ou d'indice de réfraction du film qui se répercutent sur la réponse spectrale du réseau blazé. La partie sensible d'un tel réfractomètre intègre donc deux fonctions complémentaires : d'une part le biofilm sélectif permettant la détection de la molécule cible en codant l'évènement sous forme d'une variation physique de la couche sensible, et d'autre part le réseau blazé transformant cette variation d'épaisseur/indice en une modification du spectre qu'il transmet.

Ce travail consiste à optimiser la réponse et la sensibilité d'un capteur d'indice fondé sur la technologie des réseaux de Bragg en angle en fonction des différents polymères et molécules biologiques déposés en couches minces, en vue d'une utilisation pour des applications de bio-détection.

Bien maîtrisée dans le cas de substrats plans, la biofonctionnalisation reste peu répandue dans le cas de substrats cylindriques de faible diamètre, tels que les fibres optiques. Afin de valider le concept de biocapteur fondé sur la technologie des réseaux de Bragg en angle, un protocole de biofonctionnalisation peu contraignant et relativement simple à mettre en œuvre a été utilisé. Il s'agit d'une technique de fixation de type *layer-by-layer* qui permet la construction d'assemblages macromoléculaires par adsorptions successives de polyélectrolytes de charges opposées. Afin d'accroître la stabilité de la couche bioréceptrice, notamment à force ioniques élevées, des stratégies ont été développées pour renforcer la liaison entre la multicouche de

polyélectrolytes et la biomolécule sonde. Enfin, un protocole de fonctionnalisation covalent basé sur la polymérisation *in situ* et en solvant aqueux a été développé.

6.1 Méthode « tout électrostatique »

Ce procédé repose sur la fixation de couches macromoléculaires par interactions électrostatiques, c'est-à-dire sur l'attraction entre la surface du substrat de silice (ici la fibre) et des macromolécules (en solution) de charges opposées.

6.1.1 Matériel et réactifs

6.1.1.1 Cuve de fonctionnalisation

La fibre est maintenue en position par des *V-groove* dans une cuve en téflon où les réactifs sont versés (cf. fig. 6.1). Un agitateur magnétique permet de maintenir l'homogénéité des solutions. À la fin de chaque étape, les réactifs sont retirés de la cuve à l'aide d'une pipette. La cuve, le barreau aimanté et la fibre sont rincées deux à trois fois (à l'eau ou au tampon PBS, suivant les cas) avant de passer à l'étape suivante.

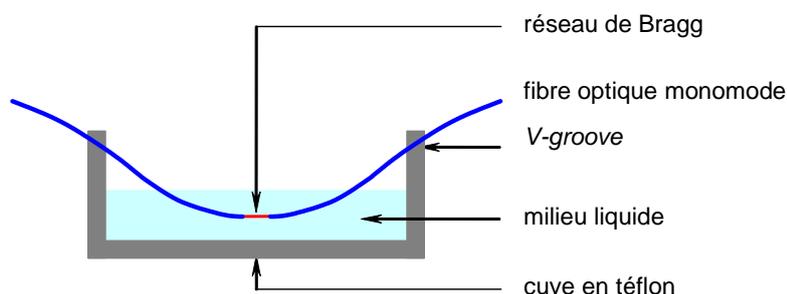


Figure 6.1: Schéma de la cuve de fonctionnalisation.

6.1.1.2 Polyélectrolytes

Les polyélectrolytes utilisés pour la construction de la multicouche de polyélectrolytes sont le polyéthylène imine (PEI) et le dextrane sulfaté (sel de sodium) (DSS). Ils peuvent être utilisés en solution dans l'eau ultrapure ou dans un tampon PBS.

Le PEI est un polymère de synthèse de charge positive (polycation). Il peut donc se fixer sur une surface chargée négativement. Les premiers tests ont été réalisés en utilisant du PEI de faible masse molaire (10 000 g/mol) mais il s'est avéré que pour obtenir des couches suffisamment épaisses et denses, il était préférable d'orienter notre choix vers des polymères de fortes masses molaires. Le PEI retenu est acheté sous sa forme non linéaire (polymère branché) et avec une masse molaire élevée. Il s'agit d'un Polyéthylène imine en solution dans

l'eau à 50% en masse, de masse molaire moyenne 750 000g/mol et d'indice de polymolécularité de 12,5 (cf. fig. 6.2).

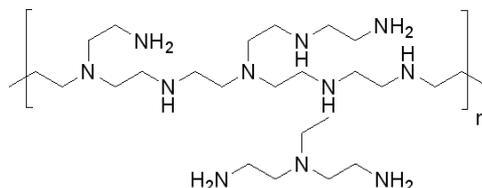


Figure 6.2: Structure du polyéthylène imine.

L'indice de polymolécularité I donne une idée de la distribution des masses molaires autour de la masse molaire moyenne des différentes macromolécules au sein du polymère. Pour un polymère parfait, où toutes les macromolécules ont même longueur (et donc même masse molaire), I est égal à 1. Plus les longueurs de chaîne sont différentes, plus l'indice de polymolécularité est élevé.

Le DSS est un polysaccharide exclusivement composés de glucose, synthétisé par des bactéries (*leuconostoc*). C'est un polyélectrolyte naturel chargé négativement (polyanion). Comme dans le cas du PEI, les DSS de forte masse molaire donnent de meilleurs résultats. Le DSS utilisé est un dextrane sulfaté (sel de sodium) pur, de masse molaire moyenne 500 000 g/mol et indice de polymolécularité de 3 (cf. fig. 6.3).

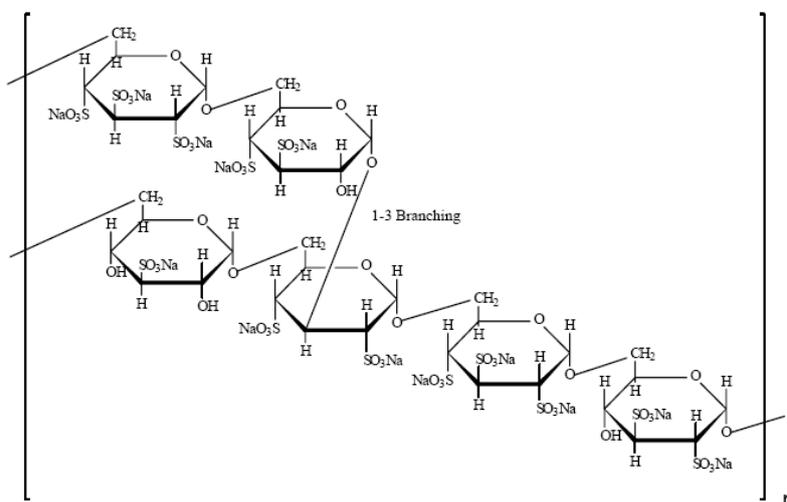


Figure 6.3: Structure du dextrane sulfaté (sel de sodium).

6.1.1.3 Protéines bioréceptrices

Deux protéines modèles ont été testées (cf. tab. 6.1) : la BLG (β -lactoglobuline) et la BSA (albumine de sérum bovin).

protéines	BLG	BSA
masse molaire (g/mol)	18 400	68 000
point isoélectrique (pI)	5,2	4,8

Tableau 6.1: Masses molaires et points isoélectriques de la BLG et de la BSA.

La β -lactoglobuline est une protéine du lait. Elle est absente chez la femme (lait maternel), mais assez abondante chez la vache (de l'ordre de 2,5 g à 3 g par litre de lait de vache), ce qui en fait une protéine très allergisante pour l'être humain, notamment chez les jeunes enfants. Elle peut entraîner des réactions très violentes chez les nouveau-nés âgés de moins d'un an. Les anticorps produits par le corps pour se défendre contre cette protéine sont capables de la reconnaître de manière spécifique.

L'albumine de sérum bovin ou (BSA pour *bovine serum albumin*), est l'une des protéines extraites du sérum de bovin et largement utilisée en laboratoire de biologie. Sa large utilisation est due à sa stabilité et son faible coût : elle est disponible très facilement et en grande quantité étant donné qu'elle provient de sang de bovins purifié, lui-même un sous-produit de l'industrie bovine. C'est une protéine modèle qui ne présente *a priori* aucun intérêt d'un point de vue immunologique.

6.1.2 Protocole de biofonctionnalisation

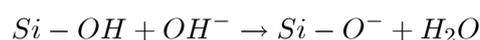
6.1.2.1 Décapage de la surface de la fibre

Afin d'éliminer toute impureté susceptible de se trouver en surface de la fibre, la fonctionnalisation proprement dite est précédée d'une étape de « décapage » à l'acide chlorhydrique. Ce traitement permet notamment de supprimer d'éventuelles traces de composés inorganiques (carbonate de calcium, sulfate de calcium, sulfate de barium, etc.) ou métalliques (oxydes / hydroxydes de fer, manganèse, cuivre, etc.) par l'intermédiaire de réactions acido-basiques. La fibre est ainsi nettoyée par immersion dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol/L pendant 20 minutes.

6.1.2.2 Activation de la surface de silice

La surface à fonctionnaliser, c'est-à-dire la silice d'une fibre optique, ne présente pas ou très peu de charges en surface pour permettre l'amorçage d'une fonctionnalisation par interactions électrostatiques. Il est donc nécessaire de créer des charges en surface de la silice.

L'activation de la silice consiste à créer des sites chargés négativement en surface, c'est-à-dire à transformer une partie des sites $Si - OH$ en sites $Si - O^-$. Cette réaction se produit en milieu basique :



Le substrat est activé à l'aide d'une solution de soude à 1 mol/L, concentration choisie pour créer suffisamment de sites chargés sans pour autant endommager la surface de la fibre. En effet, l'utilisation d'une solution de soude plus concentrée entraîne une détérioration de la surface de silice. Une telle dégradation est directement observable sur le spectre de transmission du réseau de Bragg et se manifeste par une rapide diminution de l'amplitude des résonances spectrales et du maximum de fréquence de la transformée de Fourier.

Suite à cette étape d'activation de la surface de silice, il serait éventuellement possible d'envisager l'accrochage par interactions électrostatiques d'une protéine chargée positivement. Cependant, cette solution d'apparence simple présente plusieurs limitations :

- (i) La surface de silice activée à la soude est chargée négativement, ce qui autorise l'accrochage de protéines chargées positivement (par exemple le lysozyme) par interactions électrostatiques mais ne permet pas l'accrochage de protéines chargées négativement au pH de travail comme la BSA ou la BLG,
- (ii) Le contact direct avec la surface risque de changer la conformation de la protéine sonde et/ou de la dénaturer [Roach 2005],
- (iii) Des interactions non-spécifiques sont possibles entre la molécule cible et la surface.

Pour palier ces inconvénients, une multicouche de polyélectrolytes peut être déposée sur la surface de silice activée.

6.1.2.3 Dépôts d'une multicouche de polyélectrolytes

Une multicouche de polyélectrolytes consiste en un empilement de couches de polyanions et polycations, polymères chargés respectivement négativement et positivement. Sa construction repose donc sur des interactions électrostatiques. Les polyélectrolytes servant à la fonctionnalisation sont dissouts dans un tampon phosphate (PBS) à 10^{-2} mol/L, pH 7,4. Ces polymères sont préparés en solution dans le PBS 10^{-2} M, pH 7,4, à des concentrations de 1 g/L.

Après activation de la silice, la surface de la fibre est chargée négativement. Ainsi, la construction de la multicouche débute par un dépôt de polycation qui s'adsorbe à la surface du substrat. Le surplus est éliminé par simple rinçage. Après cette phase de rinçage, la surface n'est pas neutre mais chargée positivement car il y a surcompensation de charge lors de l'adsorption [Schlenoff 2001]. La surface est ensuite exposée à une solution de polyanion qui peut interagir et s'adsorber sur la surface chargée positivement. Cette adsorption est suivie d'une étape de rinçage à l'issue de laquelle le signe de la charge de surface est à nouveau inversé. C'est cette surcompensation de charge à chaque étape du dépôt qui constitue le principe même de construction des multicouches de polyélectrolytes. La répétition du cycle alternant l'adsorption de polycations et de polyanions permet ainsi la croissance de la multicouche de polyélectrolytes.

6.1.2.4 Adsorption de la biomolécule sonde

La multicouche de polyélectrolytes peut être biofonctionnalisée par adsorption d'une biomolécule sonde, susceptible de réagir spécifiquement avec la molécule cible à détecter. Les deux protéines testées (la BSA de pI 4,8 et la BLG de pI 5,2) sont chargées négativement à pH 7,4 (pH du tampon PBS utilisé pour la préparation des solutions de protéines). Elles peuvent être adsorbées par interactions électrostatiques sur la dernière couche de polyélectrolytes, à condition que celle-ci soit de charge opposée. Le dépôt multicouche se termine donc par une couche de PEI et la protéine (BSA ou BLG) est adsorbée sur la surface chargée positivement (cf. fig. 6.4).

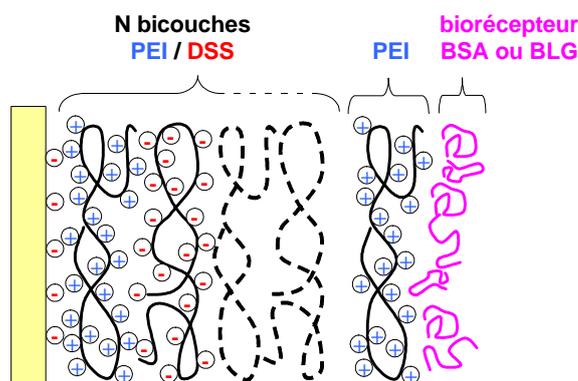


Figure 6.4: Structure de la surface biofonctionnalisée par la méthode « tout électrostatique ».

Les expériences menées avec la BSA ont permis d'obtenir une couche bioréceptrice suffisamment dense et stable pour envisager son utilisation pour des applications de détection. En revanche, la quantité de BLG désorbée lors du retour en solution tampon est très importante, de l'ordre de 50 %.

6.2 Stratégies visant à augmenter la stabilité du biorécepteur

Afin d'accroître la stabilité de la protéine sonde tout en conservant la multicouche de polyélectrolytes, des stratégies de biofonctionnalisation visant à rendre la surface apte à fixer le biorécepteur ont été mises en œuvre. Plusieurs techniques de préparation ont été testées avant de choisir la configuration optimale. Les premières mettaient en œuvre des molécules susceptibles d'interagir de façon covalente avec les fonctions amines primaires (NH_2) de la protéine bioréceptrice. Cependant, les résultats expérimentaux ont montré que ces configurations n'étaient pas adaptées au greffage de protéines sur une multicouche de polyélectrolytes. C'est finalement en exploitant la grande affinité de l'avidine pour la biotine que la stabilité de la couche bioréceptrice a pu être améliorée, en même temps que son activité.

6.2.1 Polymères portant la fonction carboxyle

Le dextrane carboxyméthylé et l'acide polyacrylique sont des polymères choisis pour leurs propriétés anioniques, qui autorisent leur fixation sur le PEI par interactions électrostatiques, et leurs fonctions carboxyles, qui permettent le greffage covalent des protéines après activation par une solution de NHS/EDC.

6.2.1.1 Dextran carboxyméthylé

Une couche de dextran carboxyméthylé (DCM) est intercalée entre la multicouche de poly-électrolytes et la couche de protéine, le DCM venant se fixer sur la dernière couche de PEI par interactions électrostatiques tandis que la protéine se lie de manière covalente.

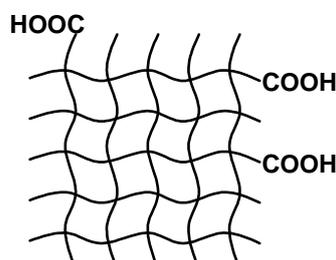


Figure 6.5: Structure du dextran carboxyméthylé.

L'utilisation de DCM (cf. fig. 6.5) impose certaines contraintes liées à son point isoélectrique (4,8) et à celui de la protéine. En effet, à pH inférieur à 4,8, le DCM n'est plus sous la forme COO^- et risque de se désorber de la couche de PEI sur laquelle il est fixé par interactions électrostatiques. D'autre part, à pH supérieur au point isoélectrique de la protéine bioréceptrice (5,2 pour la BLG et 4,8 pour la BSA), cette dernière est chargée négativement. Les expériences menées ont montré que lorsque la protéine est chargée négativement (solution de protéine dans le PBS à pH 7,4), son approche est rendue impossible en raison d'interactions électrostatiques répulsives entre la protéine et le DCM, également chargé négativement à ces valeurs de pH. Il est donc nécessaire de se placer dans une zone de pH supérieur à 4,8 (point isoélectrique du DCM) et inférieur au point isoélectrique de la protéine à greffer (pour qu'elle soit de charge opposée au DCM) de manière à pouvoir fixer la protéine sans pour autant provoquer la désorption des molécules de DCM.

Le DCM est utilisé en solution à 1 g/L dans le PBS, de la même façon que le PEI et le DSS. Les solutions de BLG et de BSA sont préparées avec un tampon acétate à 10^{-2} mol/L dont le pH est ajusté à 5,15 et 4,8 respectivement.

Les étapes de fixation du DCM et d'activation des fonctions carboxyle se déroulent normalement et ont pu être observées en temps réel. En revanche, lors de la dernière étape correspondant à la fixation de la protéine à pH 5,15 ou 4,8, nous assistons dans les deux cas à une désorption de la couche de DCM, certainement en raison des valeurs de pH, trop proches de son point isoélectrique.

6.2.1.2 Acide polyacrylique

Comme le DSS, l'acide polyacrylique (PAA) est un polyanion. Il peut être utilisé en remplacement du DSS et servir à la construction d'une multicouche de polyélectrolytes PEI/PAA. Comme il possède des groupements fonctionnels carboxyles, ces derniers peuvent être utilisés pour le greffage covalent de la protéine bioréceptrice, à condition que la construction du film multicouche se termine par un dépôt de PAA. Les premiers essais ont été réalisés avec un PAA de faible masse (10 000 g/mol) mais les couches obtenues n'étaient pas suffisamment denses. Il a finalement été remplacé par un PAA de masse molaire 450 000 g/mol (cf. fig. 6.6).

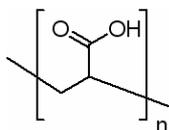


Figure 6.6: Structure de l'acide polyacrylique.

La solution de PAA à 10 g/L dans le PBS a un pH compris entre 3 et 4. Afin de ne pas provoquer de variations de pH trop importantes, le pH est ajusté à 7 en ajoutant de la soude à 1 mol/L. L'ajustement du pH permet également d'augmenter l'épaisseur de la couche de PAA obtenue à chaque dépôt : comme le groupe carboxyle est majoritairement sous la forme chargée COO^- , les interactions électrostatiques sont plus fortes à pH moins acide.

Les étapes de construction de la multicouche PEI/PAA ont pu être observées en temps réel. Les couches de PAA sont plus épaisses que les couches de DSS. Le nombre de bicouches nécessaires à l'optimisation des performances du TFBG est donc plus faible que dans le cas PEI/DSS. En revanche, lors de l'étape d'activation de la dernière couche de PAA avec une solution de NHS/EDC, il semble que les groupes carboxyles activés réagissent directement avec les fonctions amines de la couche de PEI qui se trouve en dessous [Ghoul 2003]. Ainsi, lorsque la fibre est rincée puis plongée dans une solution de protéine, la quantité greffée est très faible. La densité de protéine sonde est alors insuffisante pour des applications de détection de l'anticorps correspondant.

6.2.2 Glutaraldéhyde : utilisation de la fonction aldéhyde

Le glutaraldéhyde est utilisé comme agent de réticulation des protéines. Chaque molécule possède deux fonctions aldéhydes (cf. fig. 6.7) qui peuvent réagir avec les fonctions amines (NH_2) présentes sur les protéines (biorécepteurs) mais également sur le PEI. Accroché de façon covalente au PEI par l'une de ses fonctions aldéhydes, le glutaraldéhyde est censé jouer le rôle du trait d'union entre la multicouche de polyélectrolytes et la protéine sonde sur laquelle il peut se fixer par l'intermédiaire de sa seconde fonction aldéhyde.

Néanmoins, malgré toutes ces précautions, l'utilisation de glutaraldéhyde n'a pas mené au résultat escompté. Il s'avère en effet que la dernière couche de PEI mise en contact avec

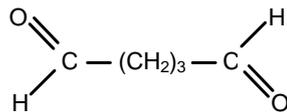


Figure 6.7: Structure du glutaraldéhyde.

le glutaraldéhyde est si réactive qu'elle s'en trouve réticulée, même lorsque la concentration en glutaraldéhyde est faible et le temps de réaction très court. Une fois la couche de PEI réticulée, les protéines ne peuvent plus être greffées sur la surface, même par interactions électrostatiques. Cette question nous a conduit à faire évoluer notre protocole de fonctionnalisation.

6.2.3 Extravidine : utilisation de l'affinité avidine-biotine

L'avidine et l'extravidine sont deux protéines qui présentent de nombreuses similitudes. Leur masse est d'environ 65 000 g/mol. Leur point commun essentiel est une très grande affinité pour leur substrat, la biotine (vitamine H). Il s'agit de l'interaction non covalente naturelle la plus forte connue à ce jour [Green 1975], de constante d'affinité $K = 10^{15}$. Ces deux protéines sont également très robustes [Marttila 2000] car relativement peu sensibles aux variations de pH et de température. Dans le cadre de ces travaux, leur différence essentielle se situe au niveau du point isoélectrique : 10,5 pour l'avidine et 6,5 pour l'extravidine.

La stratégie développée dans cette étude repose sur l'ancrage non covalent du biorécepteur en utilisant le système avidine-biotine. C'est par l'intermédiaire de la biotine (substrat naturel de l'avidine) greffée sur la protéine sonde (protéine sonde biotinylée) que cette dernière peut se fixer de manière quasiment irréversible sur la protéine hôte (l'extravidine), elle-même adsorbée sur le film multicouche par interactions électrostatiques (cf. fig. 6.8). La fibre fonctionnalisée par une multicouche de polyélectrolytes terminée par un dépôt de PEI est plongée dans une solution d'extravidine à 1 g/L dans le PBS pendant 30 minutes. Après rinçage au PBS, la dernière couche de biofonctionnalisation est obtenue en laissant incuber la fibre pendant une heure dans une solution de biorécepteur biotinylé à 1 g/L.

Le suivi en temps réel des différentes étapes montre que cette approche fonctionne. L'utilisation de l'affinité avidine-biotine semble bien adaptée à la conception d'un biocapteur reposant sur l'utilisation d'une multicouche de polyélectrolytes. En outre, cette stratégie présente d'autres avantages :

- (i) La couche d'extravidine se comporte comme un film passif qui isole la surface de la couche de polyélectrolytes et évite ainsi les phénomènes d'adsorption non-spécifique,
- (ii) Les substrats fonctionnalisés par l'extravidine permettent d'aboutir à une répartition plus homogène des biorécepteurs (biotinylés) sur la surface,

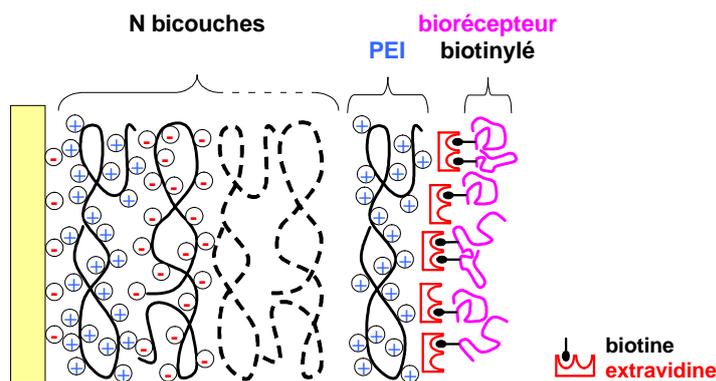


Figure 6.8: Structure de la surface biofonctionnalisée obtenue en couplant un film multicouche à l'affinité extravidine-biotine.

(iii) La procédure d'immobilisation reposant sur l'affinité avidine-biotine est généralement plus respectueuse de l'intégrité de la protéine sonde. L'activité de cette dernière s'en trouve préservée [Rubtsova 1998].

Cela étant, bien qu'ayant très bien fonctionné, cette méthode de biofonctionnalisation présente certains inconvénients, liés notamment au manque de stabilité à moyen et long termes des empilements de couches successives faisant intervenir des interactions électrostatiques. Pour augmenter la stabilité du biofilm, la stratégie adoptée consiste dès lors à substituer la multicouche de polyélectrolytes par des chaînes polymères greffées de manière covalente sur la surface de la fibre à réseau de Bragg en angle.

6.3 Méthode covalente

6.3.1 Matériel

Le protocole de fonctionnalisation covalente faisant intervenir une étape en solvant organique anhydre, la cuve de fonctionnalisation ayant jusqu'alors servi à la construction de la multicouche de polyélectrolytes ne peut pas être utilisée. Un ballon tricol a donc été spécialement conçu pour cette application (cf. fig. 6.9). L'étanchéité est assurée par des septums (bouchons en caoutchouc) qui permettent également de maintenir la fibre en place. Ce ballon est suffisamment petit pour que 7 mL de réactifs suffisent à immerger complètement la zone de la fibre correspondant au réseau de Bragg en angle. Un agitateur magnétique permet de maintenir l'homogénéité des solutions. À la fin de chaque étape, les réactifs sont retirés du ballon. Ce dernier est ensuite rincé quatre à cinq fois (à l'eau, à l'éthanol ou en utilisant un solvant organique suivant les cas), en même temps que le barreau aimanté et la fibre, avant de passer à l'étape suivante.

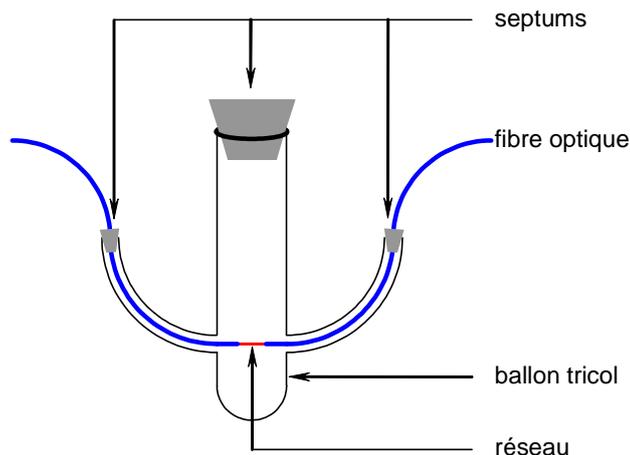


Figure 6.9: Schéma du ballon tricol utilisé dans le protocole de fonctionnalisation covalente.

6.3.2 Protocole de biofonctionnalisation

6.3.2.1 Activation

La surface de silice doit être activée afin d'augmenter la densité de groupes silanol, nécessaires à la réaction de silanisation. La littérature fait état de traitements reposant sur l'utilisation de solution piranha à chaud [Guo 2003, Kudo 2008] ou de mélange sulfochromique [Mosiello 2003, Ali 2007].

La solution piranha est un mélange à concentration variable d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il est préparé en versant lentement le peroxyde d'hydrogène dans l'acide sulfurique, sous hotte et avec protections. La réaction étant exothermique, le mélange se met à bouillir pendant plusieurs minutes. Relativement instable, il n'est efficace que dans les heures suivant sa fabrication. Le mélange sulfo-chromique est préparé en ajoutant des chromates (oxydant puissant) à une solution d'acide sulfurique. L'ion chromate ($Cr_2O_7^{2-}$), composé de chrome à l'état d'oxydation VI, est très toxique, contrairement aux dérivés du chrome III. Il faut prendre des précautions particulières lors de son utilisation (gants, hotte, lunettes de protection, etc).

Au final, ces produits sont extrêmement agressifs. Or, comme la zone dénudée correspondant au réseau de Bragg en angle est relativement fragile, notamment en raison de son faible diamètre ($125 \mu m$), ces traitements risquent d'endommager la fibre optique (casse). Il semble donc préférable d'utiliser un mode d'activation plus doux. C'est ainsi que nous avons opté pour un traitement à l'acide nitrique à 10 % dans l'eau, pendant deux heures et à température ambiante.

Rappelons pour mémoire qu'avant l'étape d'inscription du réseau de Bragg, la fibre optique est dénudée à l'acide sulfurique concentré, utilisé à chaud pendant quelques minutes. Ce traitement peut être considéré comme un préliminaire à l'étape d'activation dans le sens où il contribue également à la création de groupements silanol en surface de la fibre. Ainsi, la

combinaison de ce prétraitement et de l'activation à l'acide nitrique assure une densité de groupes silanol suffisante.

6.3.2.2 Silanisation

La surface de silice activée est silanisée en utilisant une solution de 3-aminopropyl-triméthoxysilane (APTS) à 10 % dans l'eau, pendant une heure et à température ambiante (cf. fig. 6.10). La fibre est ensuite rincée trois fois à l'eau puis deux fois à l'éthanol. L'étape suivante (greffage de l'amorceur) doit être réalisée en milieu organique anhydre pour éviter que l'amorceur ne s'hydrolyse. Pour que la fibre soit parfaitement sèche, elle est chauffée à 80°C (une température plus élevée risquerait d'effacer quelque peu le réseau) et placée sous atmosphère d'azote pendant une nuit.

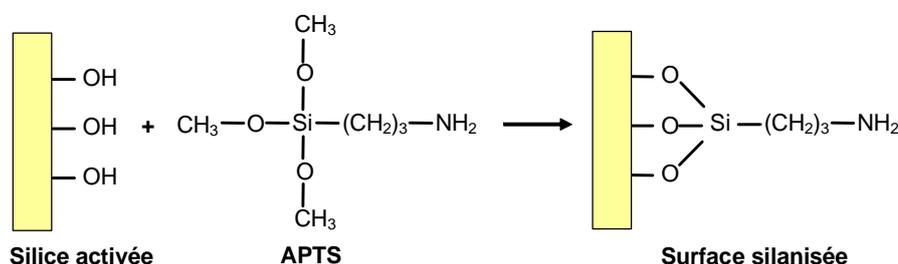


Figure 6.10: Silanisation de la silice activée par l'APTS (3-aminopropyl-triméthoxysilane).

6.3.2.3 Greffage de l'amorceur

C'est la seule étape qui nécessite l'utilisation d'un solvant organique. Elle ne peut donc pas être suivie en temps réel par notre système de mesure car l'indice de réfraction de tels solvants est supérieur à celui de la silice.

L'amorceur utilisé est le chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) (ACVC). Son greffage covalent se fait par l'intermédiaire de la fonction amine (NH_2) présente sur le silane greffé en surface de la fibre (cf. fig. 6.11), avec une solution à 0,25 mol/L d'ACVC dans le diméthylformamide (DMF). Après trois heures d'incubation, la fibre est rincée au DMF puis à l'eau.

6.3.2.4 Polymérisation radicalaire sous UV

Une fois l'amorceur (ACVC) greffé sur la surface, 10 mL d'une solution d'acide acrylique à 5 % dans l'eau sont préparés pour l'étape de polymérisation. Avant utilisation de ce réactif, il est nécessaire de faire buller de l'azote gazeux pendant 30 minutes afin de désoxygéner la solution car la présence d'oxygène risque de gêner la réaction de polymérisation. Les 10 mL de solution ainsi préparés sont ensuite introduits dans le ballon qui est ensuite placé dans une

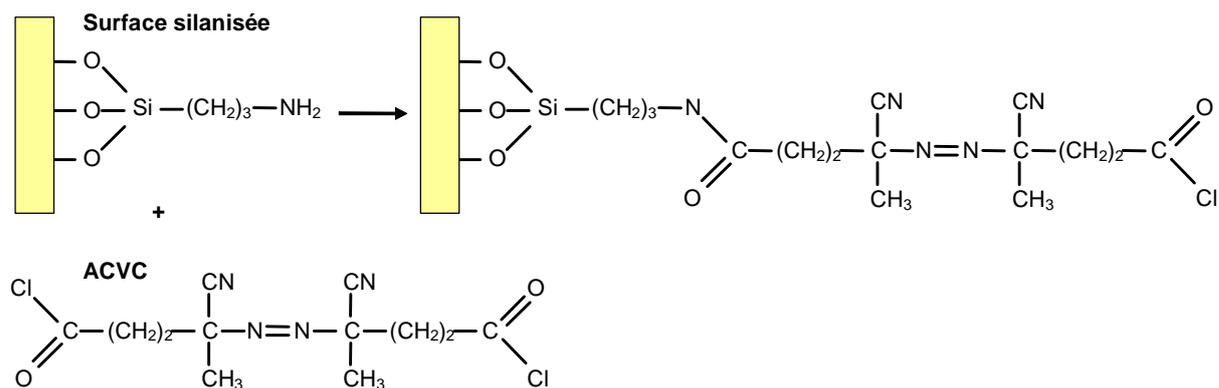


Figure 6.11: Greffage covalent de l'amorceur (ACVC) sur la surface silanisée.

enceinte à rayonnements ultraviolets. La polymérisation radicalaire de l'acide polyacrylique à partir de la surface de la fibre (*grafting from*) peut alors commencer. C'est une réaction en chaîne que se divise en trois étapes : l'amorçage, la propagation et la terminaison.

L'amorçage conduit à la formation de radicaux libres (espèce chimique ayant un électron célibataire). Ces derniers sont produits par rupture homolytique¹ de l'amorceur greffé en surface de la fibre, sous l'action d'un rayonnement ultraviolet (cf. fig. 6.12). Les radicaux libres étant des espèces très instables, ils réagissent rapidement avec les molécules d'acide acrylique (monomère) présentes dans la solution. Il y a alors transfert du site actif (cf. fig. 6.13).

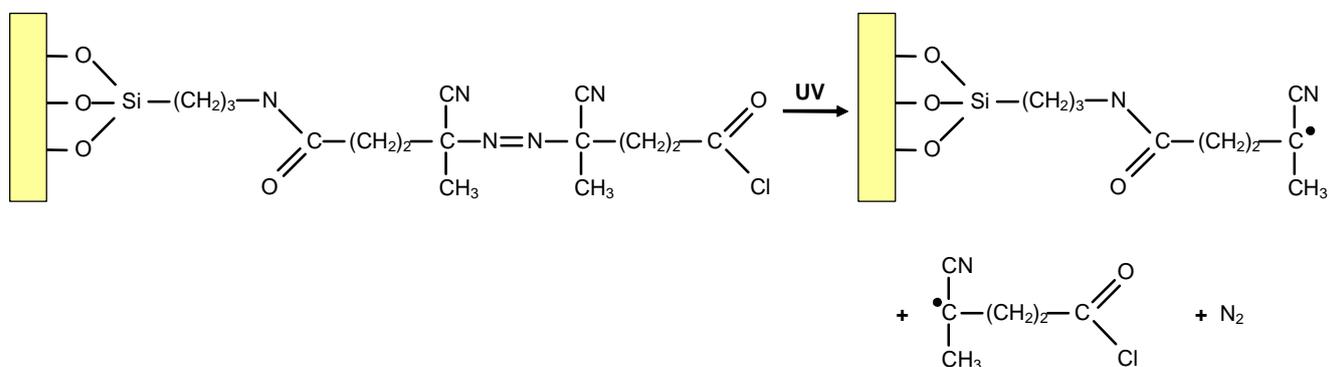


Figure 6.12: Réaction de dissociation de l'amorceur conduisant à la formation de radicaux libres.

La propagation est l'étape principale de la polymérisation radicalaire. Elle conduit à la croissance des chaînes polymères par additions successives d'unités monomères sur les radicaux polymères, issus du transfert des radicaux libres initiés lors de l'étape d'amorçage. C'est lors de cette étape que les molécules monomères (acide acrylique) sont utilisées (cf. fig. 6.14).

Il est important de noter que lors de l'étape d'amorçage, la rupture homolytique de l'amorceur greffé en surface de la fibre aboutit également à la formation de radicaux libres en solution

¹rupture symétrique d'une liaison covalente.

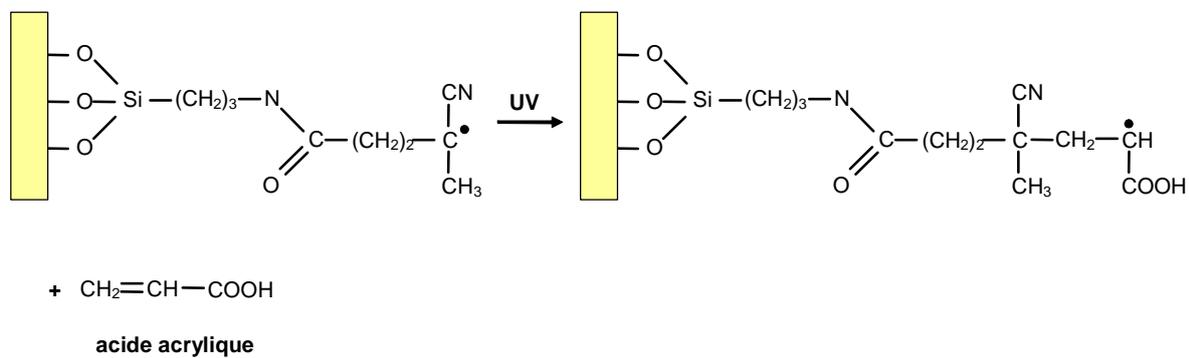


Figure 6.13: Transfert du site actif sur une molécule d'acide acrylique (monomère).

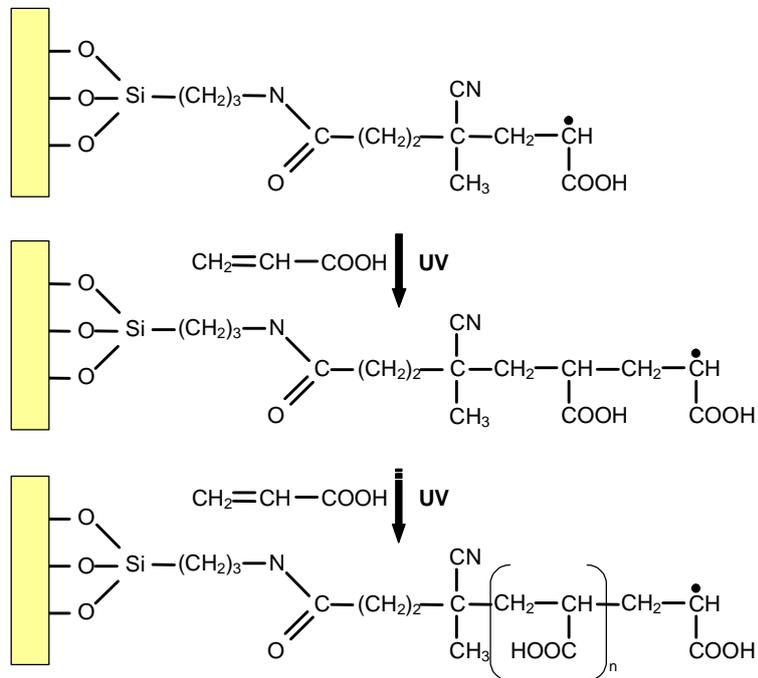


Figure 6.14: Croissance des chaînes polymères par transfert de radicaux libres.

(cf. fig.6.12). Ces radicaux réagissent avec les molécules monomères présentes dans le milieu réactionnel. La formation d'acide polyacrylique en solution aboutit à une augmentation de la viscosité. Si le temps d'exposition aux ultraviolets se prolonge, le milieu prend en masse et forme un gel. La fibre devient alors inutilisable. Il est donc indispensable de surveiller l'état du milieu au cours de l'étape de polymérisation et de stopper le rayonnement ultraviolet dès que le milieu réactionnel commence à devenir visqueux. Les durées d'exposition généralement constatées sont de l'ordre de 20 à 25 minutes.

Lorsque l'exposition aux ultraviolets est suspendue, la croissance des chaînes est interrompue par des réactions de terminaison au cours desquelles deux radicaux polymères se neutralisent, soit par recombinaison, soit par dismutation (cf. fig.6.15).

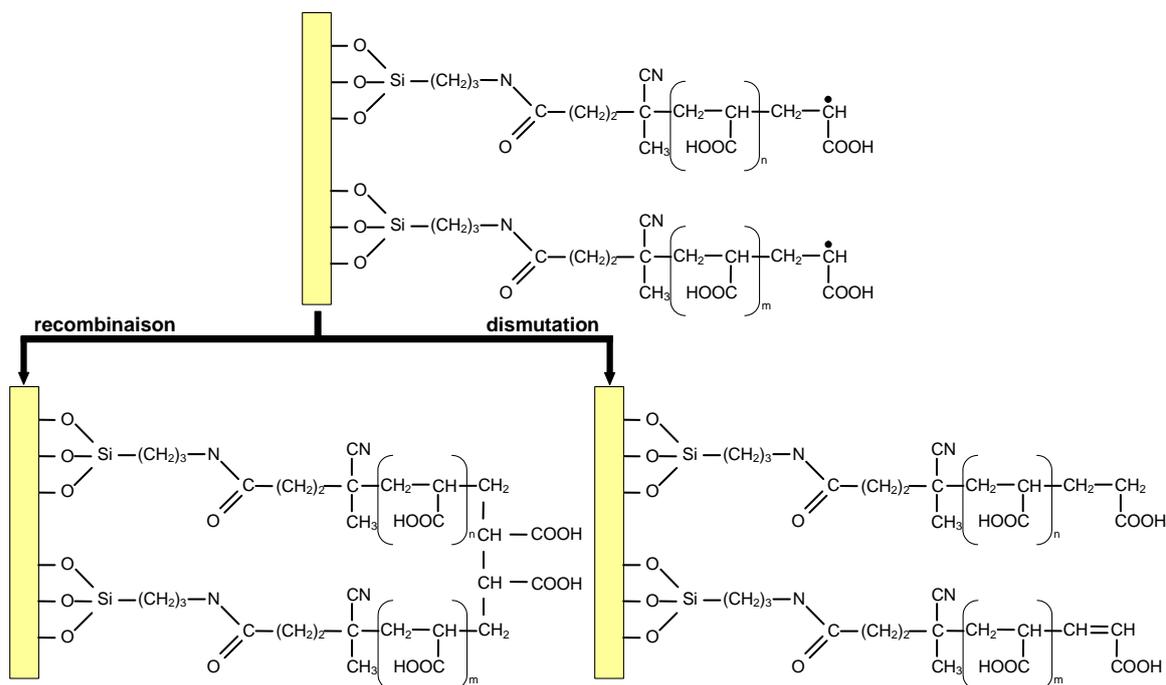


Figure 6.15: Réaction de combinaison au cours de laquelle deux radicaux polymères se neutralisent par recombinaison ou dismutation. La recombinaison conduit au couplage de deux radicaux polymères. Ils s'additionnent en formant une liaison covalente pour produire une chaîne plus longue. Lors de la dismutation, deux radicaux polymères réagissent ensemble. Le premier forme une double liaison (extrémité insaturée) en captant l'électron célibataire (radical libre) du second en lui transférant un atome d'hydrogène.

6.3.2.5 Greffage covalent de l'extravidine

Les quatre premières étapes conduisant à la fonctionnalisation de la surface de silice par l'acide polyacrylique sont résumées sur la figure 6.16. Les groupements carboxyles peuvent être utilisés pour le greffage covalent de protéines. Néanmoins, le greffage covalent direct du biorécepteur sur les fonctions carboxyles peut aboutir à la destruction partielle ou totale de ses propriétés de reconnaissance. Afin de ne pas dénaturer la protéine bioréceptrice, les fonctions carboxyles présentes sur la surface sont utilisées pour le greffage d'une couche intermédiaire d'extravidine.

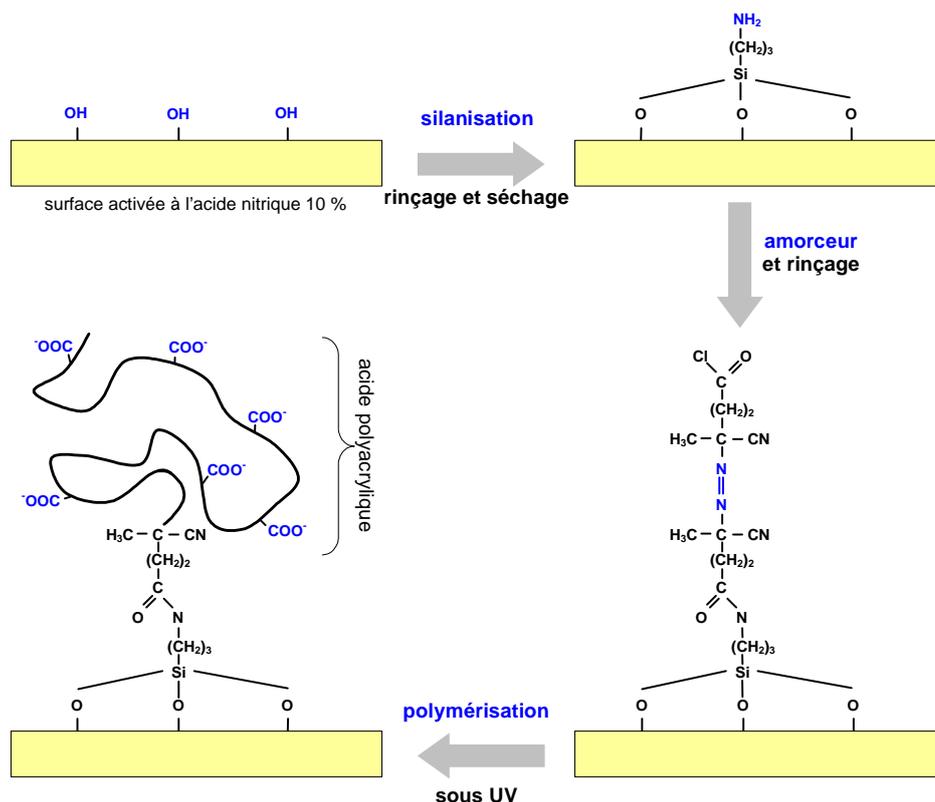


Figure 6.16: Fonctionnalisation *in situ* de la surface par l'acide polyacrylique (méthode *grafting from*).

Après activation par le mélange NHS/EDC, la fibre est plongée dans une solution d'extravidine à 1g/L dans le PBS pendant environ deux heures. La fibre est ensuite rincée. Afin d'hydrolyser les éventuelles fonctions carboxyles activées mais n'ayant pas réagi avec l'extravidine, la fibre est conservée pendant une nuit dans le PBS. Cette étape permet d'éviter que le biorécepteur biotinylé ne se fixe sur un groupe carboxyle activé par liaison covalente plutôt que sur l'extravidine par affinité avidine-biotine.

6.3.2.6 Greffage du biorécepteur par affinité avidine-biotine

Le biorécepteur biotinylé est fixé sur la surface fonctionnalisée par l'extravidine. Comme dans le cas électrostatique, la solution de protéine sonde à 1 g/L est incubée pendant une heure. Le réseau de Bragg en angle biofonctionnalisé est alors prêt à être utilisé pour des applications de biodétection spécifique (cf. fig. 6.17).

Troisième partie

Expérimentation : résultats et discussion

Chapitre 7

Elaboration d'un biocapteur « tout électrostatique »

Le principe d'élaboration de ces biocapteurs repose sur la construction d'une multicouche de polyélectrolytes en surface de la gaine optique d'une fibre à réseau de Bragg à traits inclinés et l'adsorption d'une protéine sonde (biorécepteur) par interactions électrostatiques. C'est une approche relativement simple qui consiste à adsorber alternativement des espèces anioniques et cationiques à partir de solutions aqueuses. La préparation de ces biocapteurs est destinée à des tests de reconnaissance spécifique de type antigène-anticorps.

Les multiples expériences entreprises pour la mise au point de ce premier biocapteur et des protocoles de biofonctionnalisation qui en sont à l'origine ont été très instructives. Elles ont d'abord permis de démontrer la capacité des capteurs d'indice de réfraction à réseau de Bragg en angle fibré à détecter l'accrochage en surface de la gaine optique de polymères et de protéines. Par ailleurs, elles ont mis en évidence la nécessité d'optimiser l'épaisseur de la multicouche (couche de fonctionnalisation) qui détermine le point de fonctionnement du biocapteur afin de se placer dans sa zone de réponse linéaire et ainsi garantir une sensibilité et une dynamique de mesure optimales en termes de variations d'indice de réfraction. Enfin, l'immobilisation des sondes sur la multicouche, qui résulte des interactions électrostatiques qui existent entre une surface (la multicouche) et des molécules (l'antigène) en solution de charges opposées, a donné lieu à une étude de ces réactions d'adsorption, basée sur l'utilisation du modèle de Langmuir. Il a ainsi été possible de déterminer la concentration d'antigène nécessaire à l'obtention d'une monocouche de biorécepteur, indispensable à l'obtention d'un biocapteur opérationnel.

7.1 Construction de films de polyélectrolytes

L'exploitation des interactions électrostatiques mises en jeu lors de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes présente de nombreux avantages. Du travail en milieu aqueux à la possibilité d'incorporer dans les multicouches de nombreux constituants différents (orga-

niques, inorganiques ou biologiques, pourvu qu'ils soient solubles dans l'eau), en passant par l'obtention d'architectures entièrement définies par les conditions et la séquence des adsorptions, les films de polyélectrolytes ouvrent de nombreuses voies d'exploration vers les sciences appliquées [Decher 1997].

Au cours des différentes étapes de construction d'une multicouche de polyélectrolytes, la réponse spectrale en transmission du réseau de Bragg à traits inclinés est enregistrée et analysée à la cadence d'une mesure toutes les 5 secondes (cf. chapitre 5). Le greffage des différentes couches de polyélectrolytes est ainsi étudié par réfractométrie. Cette technique, qui permet de contrôler la construction effective du biofilm sur la fibre par mesure des variations d'indice de réfraction, est utilisée pour suivre les cinétiques d'adsorption ou éventuellement de désorption des polymères et des protéines en surface du transducteur.

7.1.1 Paramètres relatifs à la construction d'une multicouche

7.1.1.1 Notion d'indice moyen

Dans un réfractomètre à réseau de Bragg à traits inclinés, le champ reste confiné au voisinage de l'interface gaine optique-milieu extérieur dans la limite de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente qui correspond à la distance au bout de laquelle l'amplitude du champ vaut $1/e$ de sa valeur maximale, soit une épaisseur d'environ un micron. Ainsi, l'indice de réfraction mesuré ne se limite pas aux « dépôts solides » effectués sur la surface. Il dépend aussi fortement de l'indice de la solution dans laquelle est plongée la fibre. Le résultat de la mesure correspond à une moyenne de l'indice de réfraction sur la zone correspondant à la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Cette sensibilité se manifeste par des sauts d'indices induits par les différences d'indice entre solutions utilisées. Pour s'en affranchir et pouvoir comparer l'état d'un dépôt en surface de la gaine optique, il est donc nécessaire de se placer dans un milieu de référence pour effectuer des mesures comparatives. Ce milieu de référence correspond généralement au solvant ayant servi à la préparation des solutions de polyélectrolyte ou à la solution de rinçage entre chaque étape de construction de la multicouche de polyélectrolytes.

A titre d'exemple, le tableau (7.1) rassemble les valeurs d'indices de réfraction mesurées au réfractomètre d'Abbe d'une solution de référence comme le PBS (tampon phosphate à 10^{-2} mol/L et pH 7,4, *Phosphate Buffered Saline* en anglais) et de solutions de PEI et DSS préparées à différentes concentrations dans cette solution de référence. Ces résultats montrent que les solutions de PEI et de DSS ont des indices de réfraction d'autant plus éloignés que les concentrations en polyélectrolytes sont élevées. Pour des solutions de polyélectrolytes à 10 g/L, cet écart d'indice de réfraction entre les solutions de PEI (1,3354) et DSS (1,3341) atteint une valeur supérieure à 10^{-3} , mettant ainsi en évidence la nécessité de se replacer dans un milieu de référence (ici le PBS) à la fin de chaque étape.

D'autre part, au fur et à mesure de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes, la croissance de cette dernière se traduit par des augmentations de densité et/ou d'épaisseur.

Solution	PBS	PEI 1 g/L	DSS 1 g/L	PEI 10 g/L	DSS 10 g/L
Indice	1,3330	1,3332	1,3330	1,3354	1,3341

Tableau 7.1: Valeurs des indices de réfraction des solutions de PBS, de PEI et de DSS à 1 g/L dans le PBS et de PEI et de DSS à 10 g/L dans le PBS, mesurées au réfractomètre d'Abbe.

La mesure de ces variations est basée sur le calcul des modifications d'indice de réfraction observées en surface de la gaine optique. Cependant, ces variations d'indice de réfraction résultent des effets cumulés de variations de densité et d'épaisseur et ne permettent pas de différencier les deux phénomènes. Ainsi, une couche de polyélectrolytes dense mais de faible épaisseur peut donner lieu aux mêmes variations d'indice qu'une couche moins dense mais d'épaisseur plus importante (cf. fig. 7.1). Il n'est pas possible de distinguer ces deux morphologies, puisqu'au final on est sensible au « chemin optique » vu par l'onde évanescente, c'est à dire le produit des deux.

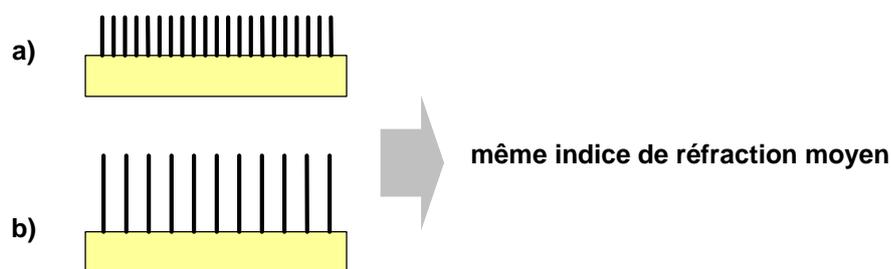


Figure 7.1: Schéma de deux films de morphologies (a) fine et dense ou (b) épaisse et lâche, pouvant donner une réponse optique similaire.

Cette absence de discrimination des phénomènes de densité, d'épaisseur et de dépendance vis-à-vis de l'indice du milieu environnant doit être prise en compte lors de l'observation dynamique des cinétiques de réaction correspondant à la fixation du polyanion ou du polycation.

7.1.1.2 Activation de la silice

La silice peut donner du silicate de sodium Na_2SiO_3 par réaction avec de l'hydroxyde de sodium. Cette réaction se produit généralement lorsque la concentration en l'hydroxyde de sodium (soude) est élevée et elle est favorisée par le chauffage. Pour ne pas risquer d'endommager la gaine optique de la fibre lors de l'étape d'activation de la silice à la soude, il est préférable d'utiliser une solution dont la concentration garantit la conservation de l'intégrité de la surface.

A titre d'exemple, la figure 7.2 permet de visualiser les variations d'indices de réfraction mesurées lors d'un étape d'activation réalisée avec des solutions d'hydroxyde de sodium à une ou cinq moles par litre. Avec une solution de soude à 1 mol/L, la variation d'indice est faible et monotone. En revanche, dans le cas d'une solution de soude à 5 mol/L, l'évolution

rapide de départ et l'inversion de pente laissent penser que ce traitement est trop agressif. Il risque de modifier l'état de surface de la fibre optique, relativement lisse à l'origine. C'est pour cette raison que par la suite, toutes les phases d'activation ont été réalisées avec une solution de soude à 1 mol/L.

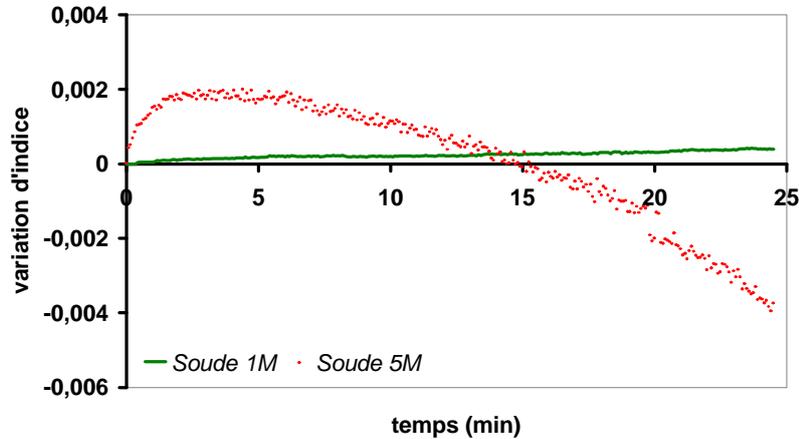


Figure 7.2: Comparaison des variations d'indice de réfraction mesurées lors d'une étape d'activation de la silice réalisée avec des solutions de soude à 1 mol/L et 5 mol/L.

Dans ce contexte, l'utilisation de polyélectrolytes de forte masse est avantageuse car elle permet de s'affranchir des défauts de charge de la surface en établissant des ponts par-dessus ces défauts. Ainsi, même dans le cas où le substrat présente une densité de charge très faible, la première couche de polyélectrolytes est capable de s'adsorber par l'intermédiaire d'un faible nombre de liaisons ioniques et expose alors vers la solution un grand nombre de charges opposées [Laurent 1997]. Cette multiplication des charges de surface continue généralement sur quelques couches avant l'instauration du régime linéaire de croissance de la multicouche de polyélectrolytes [Hoogeveen 1996]. D'autre part, l'adsorption d'une molécule est d'autant meilleure que le nombre de liaisons ioniques créées avec la surface est important, ce qui vient encore justifier l'utilisation de grosses molécules.

7.1.2 Cinétiques des étapes de construction d'une multicouche

Les concentrations usuelles des solutions de polyélectrolytes utilisés pour la construction de multicouches sont de quelques grammes par litres de solution. Le temps d'adsorption de chaque couche, habituellement de l'ordre de quelques minutes [Ramsden 1995, Hoogeveen 1996], dépend entre autre de la nature et de la masse molaire du polyélectrolyte, de sa concentration en solution, de l'agitation. Suite à la formation d'une couche de polyélectrolyte, plusieurs étapes de rinçage sont nécessaires pour éviter la contamination de la solution suivante, la stabiliser et/ou chasser les polymères faiblement adsorbés [Hoogeveen 1996].

Les multicouches de polyélectrolytes réalisées dans le cadre de ces travaux sont préparées en alternant l'adsorption du DSS ou du PAA avec celle du PEI, employée comme couche précurseur. Les premiers essais ont permis de démontrer la capacité des réfractomètres à

réseaux de Bragg à traits inclinés à détecter l'accrochage de molécules en surface de la gaine optique, alors même que la littérature indique que l'épaisseur de chaque couche de polymère n'excède pas quelques nanomètres [Kolasínska 2007].

7.1.2.1 Concentrations et temps d'incubation : cas d'une multicouche PEI/DSS

La cinétique de croissance d'une multicouche PEI/DSS a été étudiée pour des concentrations en polyélectrolyte de 10 g/L puis 1 g/L. L'eau est utilisée comme solvant, solution de rinçage et milieu de référence.

Les premiers essais, réalisés avec des solutions de PEI ou de DSS à 10 g/L dans l'eau, ont mis en évidence des courbes de cinétique de réaction *a priori* en contradiction avec un accrochage de molécules en surface. En effet, lorsque la fibre est plongée dans une solution de polyélectrolytes à 10 g/L, l'indice de réfraction mesuré au voisinage de la fibre diminue progressivement jusqu'à atteindre un palier. Cette observation semble donc contredire l'hypothèse d'un accrochage de molécules en surface (cf. fig. 7.3).

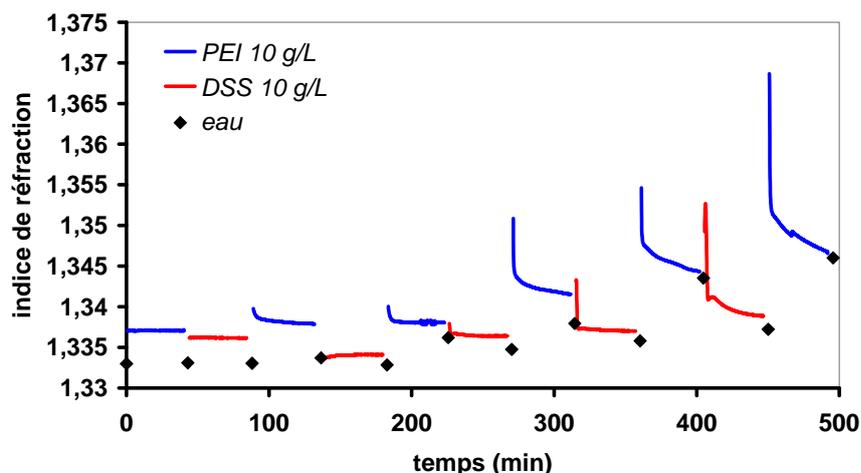


Figure 7.3: Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et DSS sont à 10 g/L dans l'eau. Le temps d'incubation est de 40 minutes par couche.

C'est en se référant à l'évolution de l'indice de réfraction mesuré dans le milieu de référence (l'eau) à la fin de chaque étape de fixation des polyélectrolytes que l'augmentation d'indice devient visible. L'hypothèse envisagée pour expliquer la diminution d'indice observée au cours d'une étape de trempage de la fibre dans une solution de polyélectrolytes (PEI ou DSS) est la suivante : A forte concentration en polyélectrolytes, la cinétique de fixation est si rapide qu'elle n'a pas le temps d'être observée. Seul le décrochage d'une partie des polymères et/ou leur réarrangement en surface de la gaine optique est observé. Afin de vérifier ces investigations, la concentration des solutions de polyélectrolytes est divisée par 10 dans l'espoir de ralentir la cinétique des réactions.

L'utilisation de solutions de PEI ou de DSS à 1 g/L dans le PBS à 10^{-2} mol/L a permis de confirmer l'hypothèse d'une cinétique de fixation plus rapide à forte concentration en polyélectrolytes. En effet, lorsque la fibre est plongée dans une solution de polyélectrolytes à 1 g/L, l'indice de réfraction mesuré au voisinage de la fibre augmente. Comme dans le cas des solutions de polyélectrolytes à 10 g/L, une diminution de l'indice de réfraction est ensuite observée (cf. fig. 7.4).

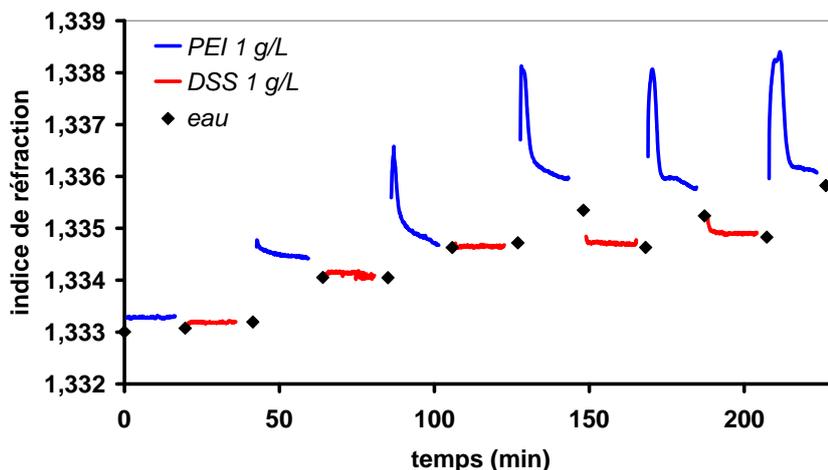


Figure 7.4: Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et DSS sont à 1 g/L dans l'eau. Le temps d'incubation est de 15 minutes par couche.

La diminution de l'indice est vraisemblablement liée à une stabilisation de la couche et /ou une élimination lente des polymères faiblement adsorbés. Ce phénomène est généralement accéléré par les étapes de rinçage. Par la suite, les durées d'incubation ont été adaptées de sorte que seule l'augmentation d'indice de réfraction, correspondant *a priori* à l'adsorption de polyélectrolytes, soit visualisée. La durée des étapes de PEI et DSS en solution à 1 g/L a ainsi été fixée à environ 7 minutes.

7.1.2.2 Choix du solvant

Suite aux premiers essais de construction de multicouches, l'eau utilisée comme solvant pour la préparation des premières solutions de polyélectrolytes a été remplacée par le PBS. Ce choix se justifie par la nécessité de réaliser les étapes d'adsorption de protéine dans un solvant compatible avec l'utilisation de matériel biologique tel que le PBS. En effet, étant donné que les propriétés des films multicouches dépendent de facteurs tels que le pH ou la force ionique de la solution, il est préférable d'utiliser le même solvant et surtout le même milieu de référence du début à la fin de l'élaboration du biocapteur.

Ce changement de solvant impose deux contraintes majeures sur la préparation des solutions de PEI :

(i) La concentration des solutions de PEI dans le PBS ne peut pas excéder 1 g/L. Au-delà de cette concentration, le PEI précipite avec les ions phosphates présents dans la solution de PBS.

(ii) Le pH de la solution de PEI dans le PBS doit être supérieur à 8. En-deçà de ce pH, le PEI précipite.

Les solutions de PEI utilisées par la suite sont donc des solutions à 1 g/L de PEI dans le PBS et le pH est ajusté à 8,2 par ajout d'acide chlorhydrique concentré pour éviter les sauts de pH trop importants entre la solution de référence à pH 7,4 et la solution de PEI. Par voie de conséquence, le DSS est également utilisé à une concentration de 1 g/L dans le PBS. Aucun ajustement de pH n'est nécessaire dans le cas des solutions de DSS qui conserve le pH de la solution tampon avec laquelle il est préparé, soit 7,4.

La durée de trempage correspondant à la construction de chaque couche de polyélectrolytes a été fixée à environ 7 minutes. En tenant compte du temps de rinçage entre chaque étape, la durée nécessaire au dépôt d'un film de huit ou neuf couches (4 bicouches plus éventuellement une dernière couche de PEI) est d'environ 1h30. La figure 7.5 montre les variations d'indices de réfraction mesurées lors des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes, constituée ici de 4 bicouches PEI/DSS et d'une dernière couche de PEI. Il apparaît clairement sur ce graphe que le changement de solvant permet de rendre la croissance des couches plus régulière.

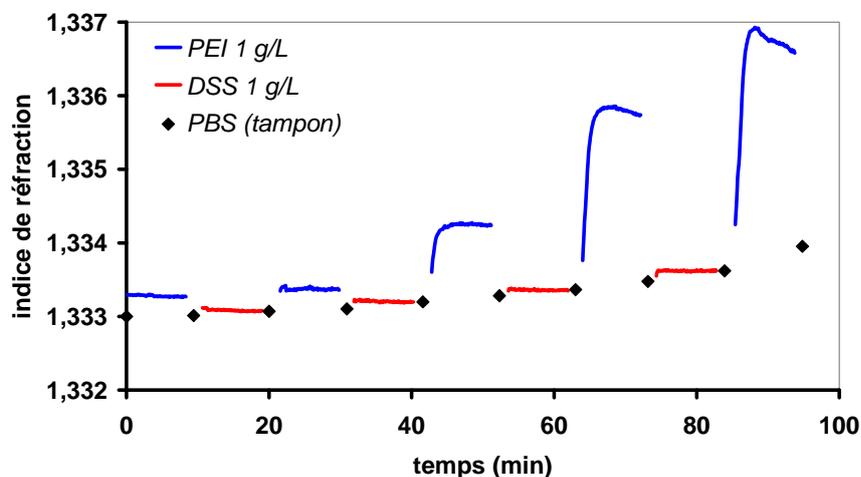


Figure 7.5: Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et DSS sont à 1 g/L dans le PBS. Le temps d'incubation est de 7 minutes par couche.

7.1.2.3 Cinétique de croissance des films : « modèle des trois zones »

Les variations d'indice mesurées lors de la construction des deux premières bicouches sont très faibles, pour les étapes de PEI (quelques 10^{-3}) comme celles de DSS ($< 10^{-3}$). D'après le modèle des trois zones [Ladam 2000a] précédemment décrit (partie 2 chapitre 6), la dis-

position des premières couches de polyélectrolytes (zone 1) est fortement liée à la nature du substrat, ici la silice. Il est généralement constaté qu'elles sont de plus faible épaisseur que les suivantes.

A partir de la troisième bicouche, les cinétiques observées lors des étapes de PEI et de DSS sont très différentes. En effet, l'indice de réfraction mesuré varie peu lors de la fixation du DSS, tandis que les variations observées lors des étapes de PEI sont plus importantes. Toujours en se référant au modèle des trois zones, ce changement de comportement correspond certainement à la croissance de la zone 3.

En effet, dans cette zone, la conformation des couches est régie par des interactions avec le milieu extérieur, soit ici les solutions de PEI et DSS.

Enfin, dès la troisième bicouche, la croissance d'indice rapide observée lors des étapes de PEI est suivie d'une décroissance qui s'accroît lors de la formation des bicouches suivantes (exemple entre la quatrième et la cinquième bicouche, observable sur la figure 7.5). Au-delà de la cinquième bicouche (non représenté), les vitesses et amplitudes de décroissance deviennent reproductibles d'une bicouche à l'autre et sont observées aussi bien dans le cas du PEI que du DSS. Ces observations sont certainement dues, au moins en partie, à la formation de la zone 2, c'est-à-dire à la réorganisation de polyélectrolytes se situant entre la zone en interaction avec le substrat (zone 1) et celle qui interagit avec le milieu extérieur (zone 3).

7.1.3 Interaction des polyélectrolytes avec le milieu extérieur

Pour expliquer les différences de cinétique observées entre PEI et DSS, correspondant certainement à des différences d'interactions avec le milieu extérieur, au moins deux différences majeures peuvent être évoquées : l'indice de polymolécularité et la conformation des polyélectrolytes.

7.1.3.1 Indice de polymolécularité et longueur des chaînes polymères

La synthèse de polymères aboutit le plus souvent à une distribution de chaînes de longueurs différentes, ce qui mène à remplacer la notion de masse molaire par celle de masse molaire moyenne.

Soit M_i la masse molaire d'une chaîne de degré de polymérisation i et N_i le nombre de chaînes de masse molaire M_i . La masse molaire moyenne peut être définie en nombre :

$$M_n = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i}{\sum_i N_i}$$

ou en masse :

$$M_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^2}{\sum_i N_i \cdot M_i}$$

Considérant les définitions précédentes, il est évident que, pour la même distribution de macromolécules, la relation $M_w > M_n$ est toujours vérifiée.

L'indice de polymolécularité est défini de la manière suivante :

$$I = \frac{M_w}{M_n}$$

Il donne une première idée de la distribution des masses molaires des différentes macromolécules au sein du polymère. Pour un polymère parfait, où toutes les macromolécules ont la même longueur (et donc la même masse molaire), I est égal à 1.

Dans le cas du DSS, l'indice de polymolécularité n'est que de 3, ce qui signifie que les molécules ont des longueurs de chaîne assez proches, et donc des masses proches. En revanche, dans le cas du PEI, l'indice de polymolécularité de 12,5 indique une plus grande variabilité de longueur de chaîne. Ainsi, les variations importantes observées lors des étapes de fixation du PEI peuvent en partie être attribuées à une réorganisation des molécules de PEI. Les chaînes les plus courtes, plus légères donc plus mobiles, se fixent plus rapidement sur la surface que les chaînes les plus longues. Cependant, ces dernières possèdent un plus grand nombre de sites positifs permettant un meilleur ancrage sur la surface chargée négativement et peuvent ensuite venir décrocher certains points d'ancrage des polymères les plus courts. Lors du rinçage, seuls restent les polymères suffisamment bien fixés sur la surface. Les polymères de plus longue chaîne donnant des films minces d'indice plus élevé, il en résulte que les couches de PEI ont un indice de réfraction plus élevé que celles de DSS.

7.1.3.2 Polyélectrolyte fort ou faible : Sensibilité vis-à-vis du pH

Le PEI est un polyélectrolyte faible pour lequel le degré d'ionisation dépend directement du pH du milieu. Le PEI possède un pKa compris entre 8 et 9. Pour que ses fonctions amines soient majoritairement sous leur forme NH_3^+ , le pH doit être inférieur au pKa. Le PEI est alors totalement dissocié et forme un polycation. Par voie de conséquence, les chaînes de PEI sont d'autant plus expansées (en raison des répulsions entre charge de même signe) que le pH est inférieur au pKa, ce qui n'est pas le cas de la solution de PEI utilisée pour la formation des couches (pH 8,2). Lors du retour en milieu PBS, à pH 7,4, la répulsion électrostatique est plus importante et les chaînes s'expansent. D'autre part, le PEI est un polymère branché, c'est-à-dire qu'il possède un grand nombre de chaînes ramifiées. Comme la densité d'une couche de polyélectrolytes dépend fortement de la répulsion électrostatique entre chaînes de même charge, la présence de ramifications mène à une large expansion des molécules de PEI fixées en surface dans le PBS à pH 7,4. Les moins bien fixées sont éliminées lors du rinçage.

A l'inverse, le DSS est un polyélectrolyte fort, anionique dans l'eau, pour lequel le taux de charge est indépendant de la composition du milieu. Le groupement sulfonate présent sur la chaîne polymère est une base infiniment faible dans l'eau car conjuguée de l'acide fort HSO_3 . Il n'a donc aucune affinité pour les protons et conserve sa charge négative quel que soit le pH du milieu. La conformation du DSS ne dépend donc pas du pH de la solution. Il est en permanence sous sa forme expansée. Les chaînes polymère étant linéaires, le DSS garde une conformation « étendue ».

Comme le PEI, le PAA est un polyélectrolyte faible pour lequel le degré d'ionisation dépend directement du pH du milieu. Ainsi, pour que les groupes carboxyles du PAA soient sous leur forme ionisée COO^- , le pH de la solution de PAA à 10 g/L ($pH = 3$) dans le PBS est ajusté à 7 par ajout de soude concentrée. Lors de l'élaboration de films multicouches PEI/PAA, le phénomène de croissance rapide observé lors des étapes de PEI est également observé lors des étapes de PAA (cf. fig. 7.6).

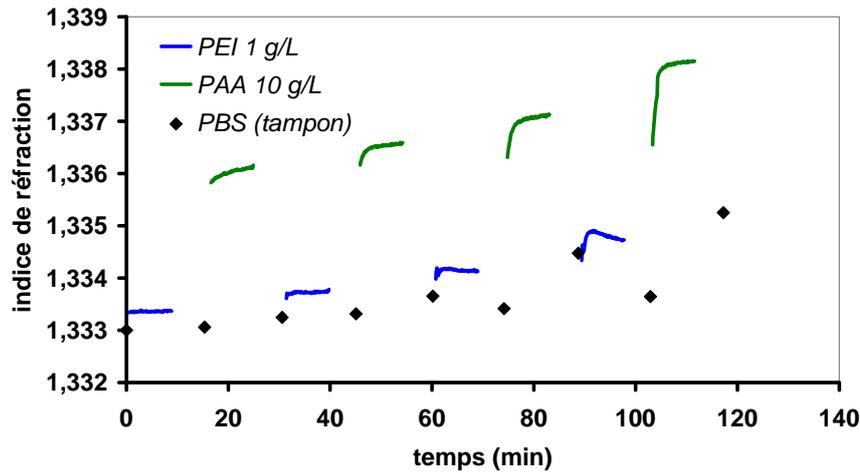


Figure 7.6: Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et PAA sont à respectivement 1 g/L et 10 g/L dans le PBS. Le temps d'incubation est de 7 minutes par couche.

7.1.4 Point de fonctionnement

Les différents tests effectués montrent que ces capteurs deviennent fortement sensibles à partir d'un certain nombre de bicouches (polycation + polyanion), démontrant ainsi que la multicouche de polyélectrolytes joue un rôle d'espaceur qui permet d'ajuster et d'optimiser la sensibilité du capteur. Cependant un phénomène de saturation de la réponse des réseaux de Bragg à traits inclinés intervient lorsque le nombre de bicouches devient trop important. Ce dernier se manifeste par un écrasement total des résonances spectrales. Dans la pratique, il s'agit donc de choisir le nombre de bicouches permettant d'obtenir la plus grande plage de mesure, c'est-à-dire de se placer à un point de fonctionnement le plus éloigné possible de la zone de saturation du capteur.

Afin d'estimer l'épaisseur optimale du biofilm et donc le nombre de couches de fonctionnalisation permettant d'obtenir les meilleures performances, des couches de PEI et DSS sont déposées alternativement jusqu'à saturation de la réponse du transducteur. Le tracé de l'évolution de l'indice de réfraction mesuré après le dépôt de chaque couche de polyélectrolytes montre que si la variation d'indice de réfraction est relativement faible au cours des premières étapes, elle devient ensuite significative à chaque nouvelle bicouche de polymères déposée avant d'atteindre la zone de saturation du réseau (cf. fig. 7.7).

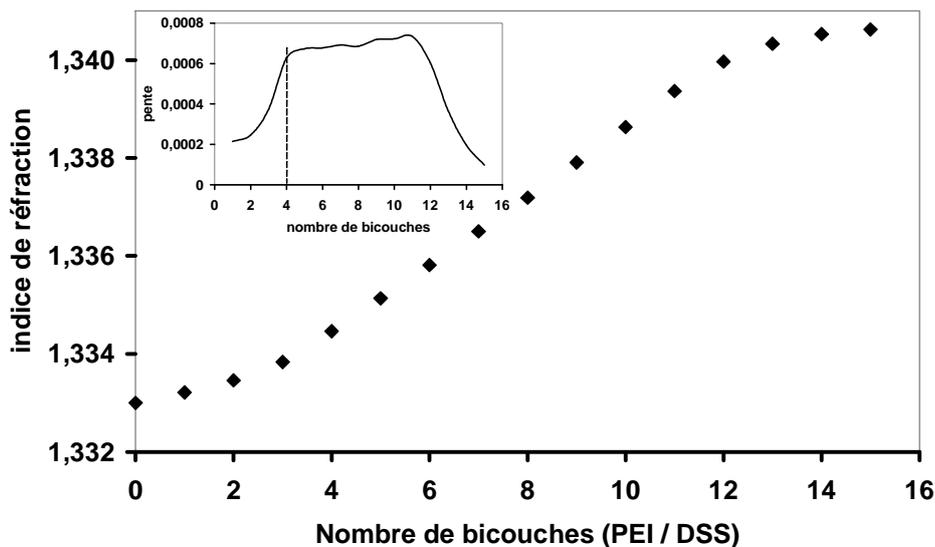


Figure 7.7: Courbe de sensibilité d'un réseau à trais inclinés.

La sensibilité devient donc optimale pour un nombre de bicouches de fonctionnalisation qu'il est nécessaire de choisir judicieusement. Dans le cas de la figure 7.7, le tracé de la pente (la dérivée) de la courbe de variation d'indice en fonction du nombre de bicouches déposées en surface de la fibre montre que la croissance du film devient linéaire au-delà de quatre bicouches. D'après la théorie du modèle des trois zones [Ladam 2000a], lorsque la croissance du film devient linéaire, les caractéristiques du film multicouche ne dépendent plus de la nature du substrat. La multicouche de polyelectrolytes fait alors bien office d'espaceur.

Cependant, pour accroître la sensibilité du capteur sans pour autant réduire sa plage de mesure utile, il est nécessaire de se placer le plus loin possible de la zone de saturation du réseau. En effet, lorsque l'indice de réfraction devient trop élevé, les résonances spectrales disparaissent et le capteur devient « aveugle ». Afin de réaliser un capteur de sensibilité optimale sur une large plage de mesures, quatre bicouches sont déposées dans le cas d'un film PEI/DSS. Dans le cas d'une multicouche PEI/PAA, le nombre optimal de bicouches n'est que de trois. Ce petit nombre de bicouches (3 ou 4) est intéressant car il réduit le temps de réalisation.

En fonction du signe de la charge portée par la biomolécule sonde, une couche de PEI supplémentaire peut être déposée. Ainsi, dans le cas de biomolécules sondes de point isoélectrique inférieur au pH de travail (ici $pH = 7,4$), leur charge négative impose l'ajout d'une couche de PEI afin que la surface de la fibre soit de charge opposée. En revanche, dans le cas d'une biomolécule sonde de point isoélectrique supérieur à 7,4 (par exemple le lysozyme, $pI = 11$), elle est chargée positivement à pH 7,4 et peut directement venir se fixer sur la dernière couche de DSS.

Finalement, la multicouche de polyelectrolytes permet d'abord d'isoler les biomolécules sondes du substrat de silice, susceptible d'interagir avec elles et donc de les dénaturer. Elle contribue également à l'ajustement du signe des charges en surface de la fibre, assurant ainsi

l'immobilisation des biomolécules sondes par interactions électrostatiques. Au-delà de ce double intérêt, la multicouche de polyélectrolytes sert à ajuster l'épaisseur de la couche de biofonctionnalisation et donc à l'optimisation des performances de nos capteurs en termes de sensibilité et de plage de mesure.

7.2 Adsorption d'une biomolécule sonde

7.2.1 Adsorption de molécules : modèle de Langmuir

7.2.1.1 Définition

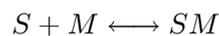
L'étude de l'adsorption de biomolécules sur une surface consiste à déterminer les isothermes d'adsorption. Ces isothermes sont des courbes donnant, à température constante, la quantité de biomolécules adsorbées en fonction de leur concentration à l'équilibre.

L'allure des isothermes d'adsorption donne une information qualitative sur le processus d'adsorption et sur l'étendue de la surface recouverte par l'adsorbat. Ces courbes isothermes sont référencées selon cinq allures de base [Brunauer 1940]. Celle de type 1 sont associées aux systèmes dans lesquels l'adsorption se fait sous la forme d'une monocouche tandis que les quatre autres types impliquent la formation de multicouches. Dans le cas d'allures de courbes isotherme de type 1, le modèle développé par Langmuir (1915) demeure l'un des plus utilisés.

Les hypothèses de base du modèle de Langmuir sont les suivantes :

- (i) Les molécules sont adsorbées sur des sites tous identiques de la surface,
- (ii) Chaque site ne peut adsorber qu'une seule molécule (hypothèse de la monocouche),
- (ii) L'énergie d'adsorption est la même sur tous les sites (température constante),
- (iv) Les molécules adsorbées n'interagissent pas entre-elles.

Le modèle de Langmuir traite l'adsorption comme une réaction stoechiométrique 1 : 1 de constante de réaction K dans laquelle une molécule unique M vient occuper un site d'adsorption unique S .



La description mathématique de cette réaction d'adsorption repose sur les principes de la loi d'action de masse à l'équilibre (7.1) et de la conservation de la matière (7.2). Leur combinaison conduit à l'équation classique non linéaire de l'isotherme de Langmuir (7.3) exprimant la densité surfacique Γ_M de molécules M adsorbées en fonction de leur concentration C_M dans la phase dissoute.

$$K = \frac{C_{SM}}{C_S \cdot C_M} \quad (7.1)$$

où K est la constante de réaction, C_{SM} la concentration en sites occupés à l'équilibre, C_S la concentration en sites non occupés à l'équilibre et C_M la concentration de molécules dans la

phase dissoute.

$$\Gamma_{\max} = \Gamma_S + \Gamma_{SM} \quad (7.2)$$

où Γ_{\max} est la densité totale de sites de surface, Γ_S la densité de sites de surface libres et Γ_{SM} la densité de sites de surface occupés.

$$\Gamma_M = \Gamma_{\max} \cdot \frac{K \cdot C_M}{1 + K \cdot C_M} \quad (7.3)$$

7.2.1.2 Linéarisation

Si le modèle non linéaire de Langmuir semble correspondre à des données expérimentales de façon satisfaisante, alors les valeurs de Γ_{\max} et K peuvent être estimées. Différents modes de linéarisation de l'équation de Langmuir ont été proposés pour faciliter l'estimation de ces paramètres [Kinniburgh 1986]. Celui formulé par Langmuir lui-même [Langmuir 1918] consiste à tracer C_M/Γ_M en fonction de C_M et porte le nom de forme y-réciproque :

$$\frac{C_M}{\Gamma_M} = f(C_M) = \frac{1}{\Gamma_{\max}} \cdot C_M + \frac{1}{K \cdot \Gamma_{\max}} \quad (7.4)$$

L'isotherme (7.3) peut être linéarisé sous deux autres formes [Rundlett 1996] qui portent respectivement les noms de formes double réciproque (7.5) et x-réciproque (7.6) :

$$\frac{1}{\Gamma_M} = f\left(\frac{1}{C_M}\right) = \frac{1}{\Gamma_{\max}} + \frac{1}{K \cdot \Gamma_{\max} \cdot C_M} \quad (7.5)$$

$$\frac{\Gamma_M}{C_M} = f(\Gamma_M) = K \cdot (\Gamma_{\max} - \Gamma_M) \quad (7.6)$$

La constante de réaction K ainsi que la densité totale de sites de surface Γ_{\max} peuvent être déterminées expérimentalement à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine des relations linéaires précédentes. Les trois relations définies par les équations (7.4), (7.5) et (7.6) semblent être identiques puisque l'une d'entre-elles suffit à obtenir les autres formes. Néanmoins, ces méthodes ne sont pas nécessairement équivalentes du fait des différences d'incertitudes relatives sur les variables Γ_M et C_M . L'incertitude relative sur C_M peut être contrôlée par l'expérimentateur qui prépare les solutions. En revanche, le paramètre Γ_M est soumis à plus ou moins d'erreurs expérimentales. Dans le cas où l'erreur sur ce paramètre est relativement faible, la forme y-réciproque est plus fiable et présente l'avantage de conserver la variable C_M et l'espacement entre les points de mesure sur l'axe des abscisses. C'est cette dernière forme que nous avons choisie d'utiliser pour étudier l'adsorption des biomolécules sondes sur la multicouche de polyelectrolytes.

Dans le cas de capteurs d'indice où le paramètre mesuré est la variation d'indice de réfraction, proportionnel à la quantité de molécules fixées en surface, les équations (7.3) et (7.4) peuvent être réécrites sous la forme des équations (7.7) et (7.8) :

$$\Delta n = \Delta n_{\max} \cdot \frac{K \cdot C}{1 + K \cdot C} \quad (7.7)$$

$$\frac{C}{\Delta n} = \frac{1}{\Delta n_{\max}} \cdot C + \frac{1}{K \cdot \Delta n_{\max}} \quad (7.8)$$

où K est la constante de réaction, C la concentration de molécules dans la phase dissoute, Δn_{\max} la variation d'indice de réfraction si tous les sites de surface étaient occupés et Δn la variation d'indice de réfraction mesurée.

7.2.2 Adsorption de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA)

7.2.2.1 Choix de la concentration en BSA

La biomolécule sonde, ici la BSA, est adsorbée sur la multicouche de polyélectrolytes précédemment décrite, soit 4 bicouches PEI / DSS et une dernière couche de PEI pour que la surface soit chargée positivement.

Pour évaluer l'influence de la concentration en protéine sonde, plusieurs solutions de concentration croissante en BSA dans le tampon PBS sont préparées. La variation d'indice engendrée par la fixation de BSA à ces différentes concentrations est mesurée après un temps d'incubation de 30 minutes, temps au bout duquel le signal atteint un plateau (cf. fig. 7.8).

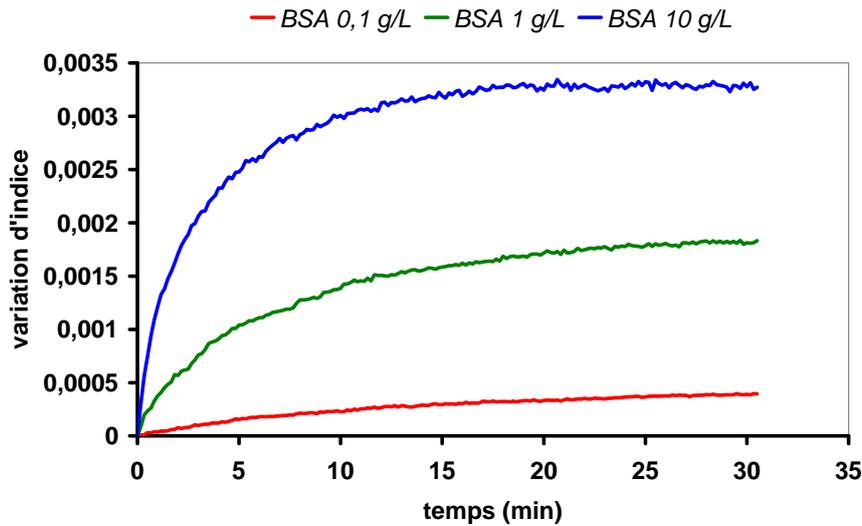


Figure 7.8: Cinétiques d'adsorption de la BSA contenue dans des solutions à 0,1 g/L, 1 g/L et 10 g/L.

La figure 7.9 rassemble les variations finales d'indice de réfraction mesurées pour des concentrations C en protéine allant de 0,1 g/L à 10 g/L. Cette variation d'indice Δn correspond à la différence des indices de réfraction mesurés avant et après adsorption de la protéine, toujours dans le PBS, milieu de référence également utilisé pour la préparation des solutions et le rinçage de la fibre. Le tracé de $\frac{C}{\Delta n}$ en fonction de C (cf. fig. 7.10) permet d'obtenir l'expression du modèle de Langmuir sous sa forme linéaire (cf. eq. 7.8) où Δn est la variation d'indice mesurée avec une solution de concentration C en BSA, Δn_{\max} la variation d'indice correspondant à l'adsorption maximale (monocouche de BSA) et K une constante fonction de l'énergie d'adsorption.

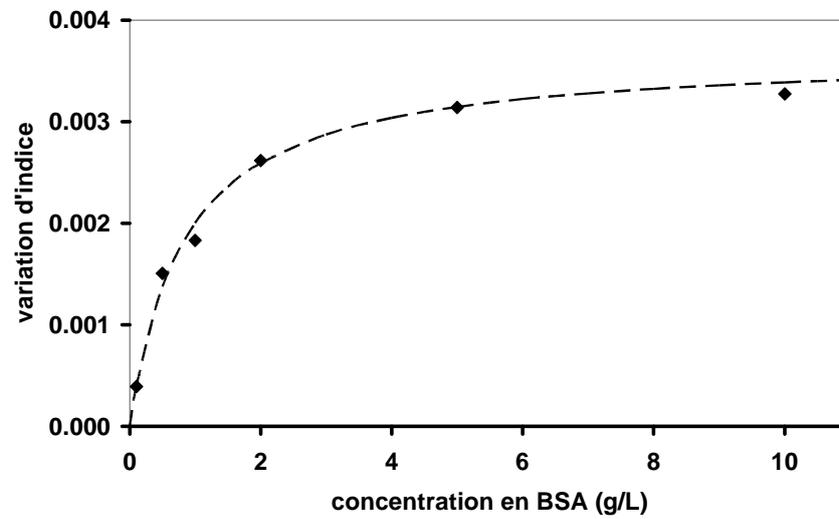


Figure 7.9: Variation de l'indice de réfraction mesurée pour différentes concentrations en BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.

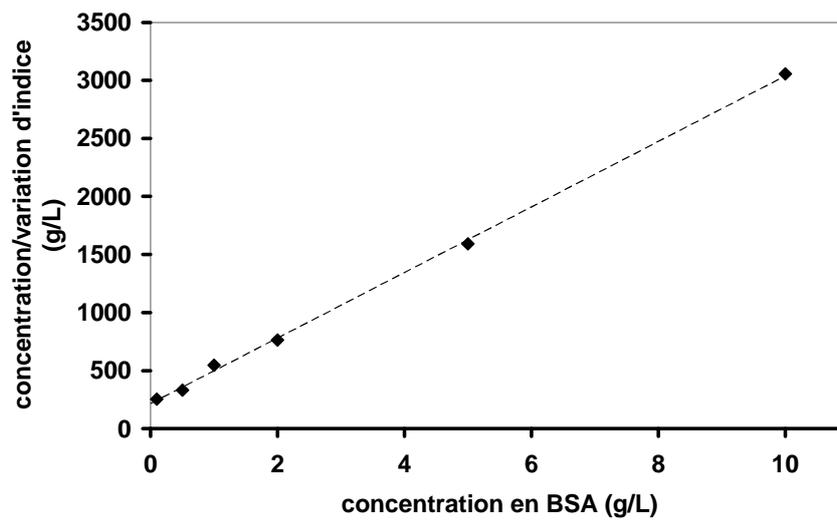


Figure 7.10: Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.

La figure 7.10 correspondant à la forme linéaire du modèle de Langmuir est une droite de coefficient de corrélation proche de 1 (0,99). Le modèle de Langmuir est donc adapté pour décrire la fixation de BSA sur une multicouche de polyélectrolytes. Après avoir déterminé l'équation de cette droite de Langmuir, les valeurs des paramètres Δn_{\max} et K obtenues sont les suivantes :

$$\Delta n_{\max} = 0,00354 \text{ et } K = 1,31 \text{ L/g}$$

La variation d'indice mesurée dans les cas d'une solution de BSA à 10 g/L ($\Delta n = 0,00327$) est proche de celle correspondant à la monocouche de BSA (Δn_{\max}). Pour la suite des expérimentations, les solutions de BSA servant à la formation d'une couche bioréceptrice dans le cas de biocapteurs « tout électrostatique » sont préparées à 10 g/L.

7.2.2.2 Caractérisation de la surface fonctionnalisée par microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (ou AFM pour Atomic Force Microscopy en anglais) est une technique de microscopie à sonde locale qui permet d'observer le relief d'une surface au moyen d'une pointe très fine supportée par un micro levier balaye l'échantillon (cf. fig. 7.11). La pointe très proche de la surface subit de la part de celle-ci une force attractive ou répulsive selon la distance pointe-surface mesurée par la déviation du levier. En stabilisant au cours du balayage la position de la pointe pour obtenir une déviation constante, on obtient ainsi une image iso-force de la surface qui reflète sa topographie. Il existe trois modes d'utilisation de l'AFM : le mode contact, le mode non-contact, et enfin le mode contact intermittent. C'est ce dernier que nous avons utilisé : il consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface (essentiellement de façon répulsive), l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.

Nous avons utilisé cette technique de caractérisation pour comparer l'état de surface d'échantillons de fibres avant (multicouche de polyélectrolytes se terminant par une couche de PEI) et après immobilisation de la protéine sonde. Les différences de topographie observées (cf. fig. 7.12) ont permis de confirmer la fixation de la protéine sonde, déjà observée par réflectométrie à réseau de Bragg en angle.

7.2.2.3 Cinétique d'adsorption de la biomolécule sonde

Les variations d'indice mesurées en temps réel lors de la phase d'adsorption de la BSA permettent d'observer la cinétique d'accrochage de la protéine sur la multicouche de polyélectrolytes. Au bout d'un certain temps, le signal atteint un plateau qui indique que l'équilibre entre la surface et la solution a été atteint. Nous avons ainsi estimé à 30 minutes le temps d'incubation nécessaire pour atteindre cet équilibre avec une solution de BSA à 10 g/L dans le PBS. Cependant, tout ceci n'est vrai que dans le cas d'une agitation en continu. En effet,

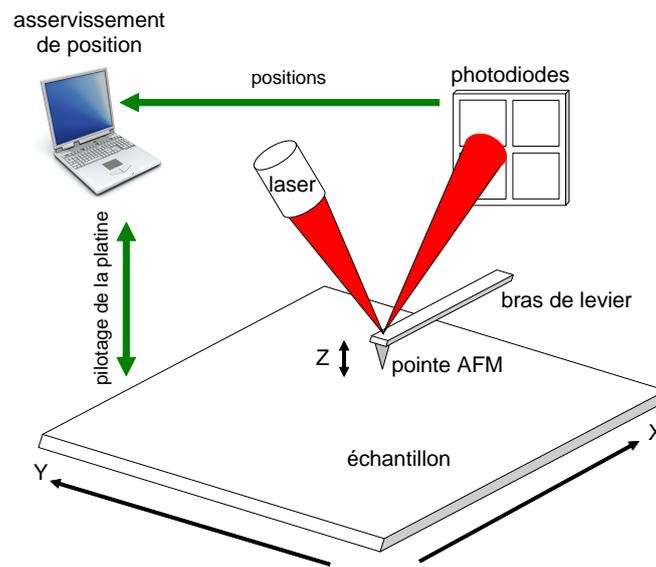
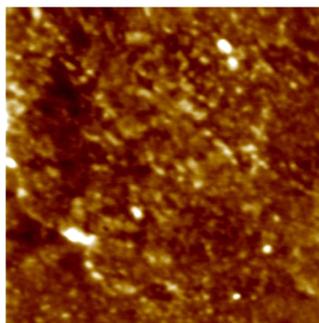
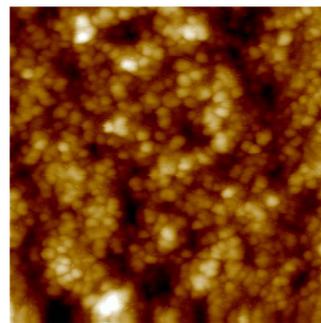


Figure 7.11: Schéma de principe décrivant le fonctionnement de la microscopie à force atomique.



(a)



(b)

Figure 7.12: Images AFM de $1 \mu\text{m}^2$ des surfaces (a) d'une fibre fonctionnalisée par une multicouche de poly-électrolytes se terminant par une couche de PEI (échelle en hauteur de 10 nm) et (b) d'une fibre fonctionnalisée de la même façon et biofonctionnalisée ensuite avec la BSA (échelle en hauteur de 20 nm).

sans agitation, l'adsorption de BSA en surface de la fibre provoque une diminution locale de la concentration en BSA au voisinage de cette surface. Il en résulte alors une moins bonne adsorption des protéines. La figure 7.13 illustre bien ce phénomène : dans le cas où le réseau est plongé dans une solution de BSA à 10 g/L agitée en permanence, le palier est obtenu au bout de 30 minutes et la variation d'indice est de 0,00327. Par contre, sans agitation, le palier n'est toujours pas atteint au bout de 30 minutes et la variation d'indice, fortement ralentie, est plus faible. La quantité de BSA fixée est donc moins importante. En revanche, si l'agitation est remise en route, les gradients de concentration sont détruits et la BSA recommence à se fixer sur la surface, jusqu'à atteindre la valeur obtenue dans le cas d'une agitation permanente.

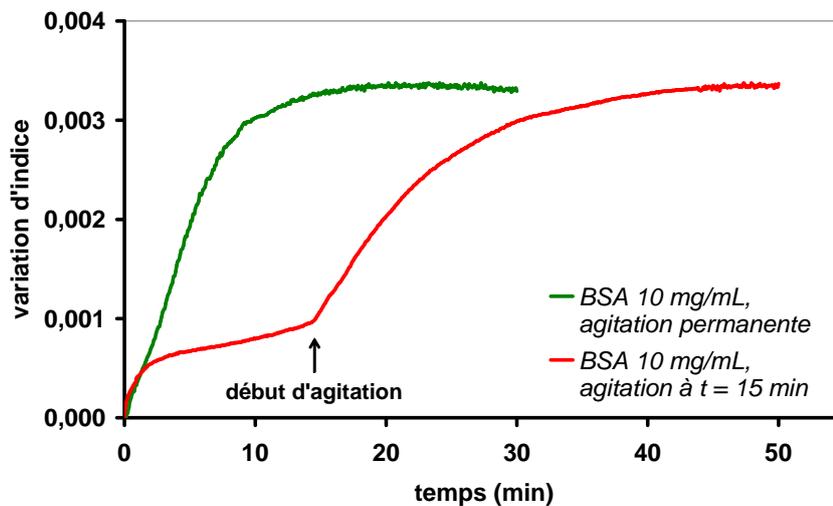


Figure 7.13: Cinétiques d'adsorption de la BSA mettant en évidence l'importance de l'agitation.

Finalement, les premiers essais de biofonctionnalisation reposant sur l'exploitation des interactions électrostatiques ont permis de :

- (i) démontrer la capacité d'un réfractomètre reposant sur la technologie des réseaux de Bragg à traits inclinés à suivre en temps réel les étapes successives d'accrochage en surface de polyélectrolytes,
- (ii) déterminer le nombre de couches et les temps de dépôt correspondant à une optimisation des performances du futur capteur,
- (iii) démontré la capacité d'un réfractomètre à détecter l'accrochage d'une protéine comme la BSA.

Ces résultats ont été obtenus dans le cadre de concentrations relativement élevées. Cependant, les fortes variations observées sur la réponse du capteur ont permis d'envisager la détection d'anticorps à de plus faibles concentrations. Cette étude fait l'objet du chapitre suivant qui propose également une amélioration du protocole de biofonctionnalisation fondée sur la médiation d'une protéine de liaison : l'extravidine.

Chapitre 8

Performances et limites du biocapteur « tout électrostatique » : introduction de l'extravidine

Le lecteur l'aura compris, les travaux présentés visent à concevoir un Capteur à Fibres Optiques biosélectif fondé sur la technologie des réseaux de Bragg à traits inclinés, composants « tout fibre » sensibles aux variations d'indice de réfraction du milieu environnant. Ce type de réfractomètre devient potentiellement sensible vis-à-vis d'une unique molécule cible dès lors que la surface du substrat de silice que constitue la fibre optique est biofonctionnalisée, ce qui consiste à greffer, en surface du capteur, un biofilm conçu pour réagir de manière sélective. L'accrochage de la molécule cible sur le biofilm se traduit alors par des variations d'épaisseur et/ou d'indice du film qui se répercutent sur la réponse spectrale en transmission du réseau. La partie sensible d'un tel réfractomètre intègre donc deux fonctions transductrices complémentaires : d'une part le biofilm sélectif permettant la détection de la molécule cible en codant l'évènement sous forme d'une variation physique de la couche sensible, et d'autre part le réseau à traits inclinés transformant cette variation d'épaisseur / indice de réfraction « moyen » en une modification du spectre qu'il transmet.

Dans le cas du biocapteur « tout électrostatique », la construction du biofilm sélectif repose sur la formation d'une multicouche de polyélectrolytes et l'adsorption d'une protéine sonde par interactions électrostatiques. Les premiers résultats obtenus avec de la BSA, récepteur spécifique de l'anti-BSA, ont permis de valider le principe d'une détection de la fixation de biomolécules cibles en surface d'une fibre optique contenant un réseau de Bragg à traits inclinés. Cependant, précisons qu'il s'agissait à cette étape de l'étude, de prouver la faisabilité d'une biofonctionnalisation et rien de plus, dans la mesure où le couple BSA / anti-BSA ne présente pas d'intérêt particulier d'un point de vue applicatif. Aussi avons-nous également essayé de réaliser le même type d'expériences avec la β -lactoglobuline (BLG), protéine allergisante du lait de vache et récepteur spécifique de l'anti- β -lactoglobuline, protéine produite

par les sujets qui y sont allergiques¹. Dans ce cas, la protéine présente un intérêt d'un point de vue immunologique, mais nos différentes tentatives ont montré que si la fixation de la protéine sur la multicouche de polyélectrolytes par interactions électrostatiques avait bien lieu, elle n'était en revanche pas stable à long terme. Ainsi, afin de s'affranchir de la spécificité en termes de protéine, il a été nécessaire d'envisager une technique de biofonctionnalisation plus stable, à savoir l'utilisation de l'affinité avidine-biotine.

8.1 Performances du biocapteur « tout électrostatique »

Afin de réaliser un biocapteur « tout électrostatique » de sensibilité optimale sur une large plage de mesures, quatre bicouches PEI/DSS ont été déposées. Une dernière couche de PEI sert à l'adsorption de la BSA, récepteur spécifique de l'anti-BSA (anticorps correspondant), chargée négativement à pH 7,4. À ce stade, dix couches ont été déposées en surface de la fibre, ce qui permet ensuite d'observer la fixation spécifique de la protéine à détecter (l'anti-BSA).

8.1.1 Reconnaissance anticorps-antigène

Les cinétiques de réaction par interactions électrostatiques étant assez rapides, la formation de chaque couche de polyélectrolyte et de la couche de protéine sonde ne nécessitent que quelques minutes de trempage dans la solution correspondante. En revanche, la reconnaissance anticorps-antigène (cf. fig. 8.1.a) faisant intervenir des interactions de type reconnaissance spécifique, les cinétiques de réactions sont beaucoup plus lentes que dans le cas de l'adsorption de molécules par interactions électrostatiques. À faibles concentrations, la réaction peut durer plusieurs heures et elle est d'autant plus lente que la solution est peu concentrée [Chung 2006].

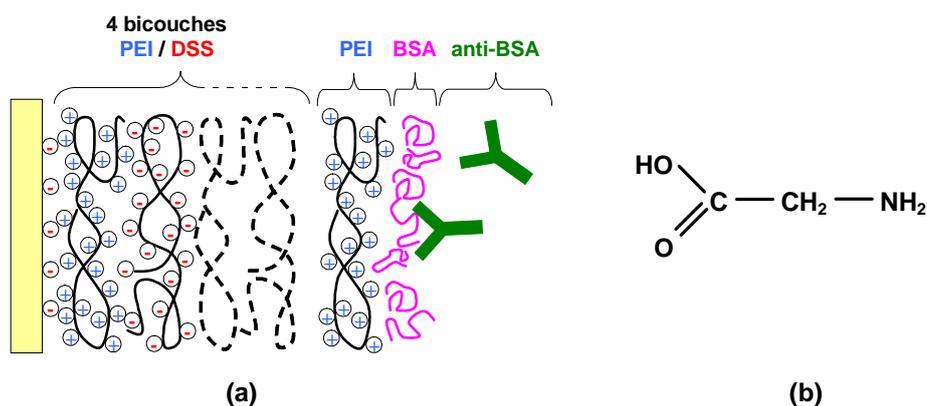


Figure 8.1: (a) Représentation schématique de la détection d'anti-BSA sur une fibre biofonctionnalisée selon le protocole « tout électrostatique ». (b) Formule chimique de la glycine, le plus simple des acides aminés, utilisée pour la régénération des biocapteurs.

¹L'allergie aux protéines du lait de vache est la plus fréquente des allergies alimentaires. Elle toucherait 2 à 3 % des enfants de moins d'un an, mais reste sous-diagnostiquée, car parfois difficile à diagnostiquer.

Les premiers tests de reconnaissance effectués avec un biocapteur « tout électrostatique » ont été réalisés avec des solutions d'anticorps de concentration relativement élevée, typiquement 0,2 g/L. La fixation de l'anti-BSA sur la fibre biofonctionnalisée avec la BSA a ainsi pu être observée en temps réel par réfractométrie à réseau de Bragg (cf. fig. 8.2). Le temps d'incubation a été fixé à 1h30.

Ces premiers essais ont également servi à effectuer des tests sur la régénération du capteur, ce qui consiste à immerger la fibre dans une solution de glycine à 0,1 mol/L dont le pH est ajusté à 2,1 par ajout d'acide chlorhydrique concentré. La glycine est un acide aminé (cf. fig. 8.1.b) qui, à pH acide, agit comme un inhibiteur de la liaison spécifique antigène-anticorps [Anderson 1997, Storri 1998, Pei 2000, Backmann 2005]. La figure 8.2 montre que lorsque la fibre optique biofonctionnalisée ayant servi à la détection d'anti-BSA est replongée dans une solution de PBS après régénération à la glycine, le signal revient au niveau observé avant détection de l'anticorps. Ce résultat semble donc indiquer que l'anti-BSA a été éliminée lors du traitement à la glycine. Un second test de reconnaissance de l'anti-BSA permet de confirmer l'hypothèse d'une rupture de la liaison anticorps-antigène par la glycine en milieu acide.

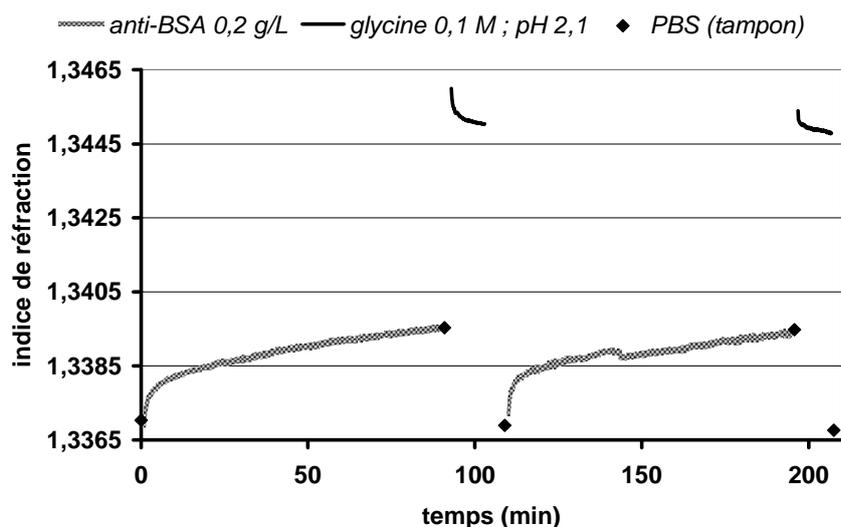


Figure 8.2: Cinétique des tests de reconnaissance de l'anti-BSA (cible) en solution à 0,2 g/L par la BSA (sonde) adsorbée par interactions électrostatiques sur une multicouche de polyélectrolytes PEI-DSS. Deux cycles (reconnaissance + régénération de la « couche sonde de BSA » à la glycine) sont représentés.

Ces observations sont également le signe que la couche de BSA recouvre l'intégralité de la surface du film multicouche de polyélectrolytes. En plus de son rôle de biorécepteur, elle vient écranter la charge de la dernière couche de polyélectrolytes (ici la charge positive du PEI) susceptible d'interagir de manière non-spécifique avec l'anti-BSA. Ce phénomène a pu être mis en évidence en mettant la multicouche de polyélectrolytes non biofonctionnalisée par la BSA en contact avec l'anti-BSA. Dans ce cas, l'anti-BSA se fixe sur la multicouche de polyélectrolytes (la charge nette de l'anti-BSA est la même que celle de la BSA à pH 7,4, c'est-à-dire négative) mais le traitement à la glycine utilisé pour la régénération est sans effet

sur l'anti-BSA fixée de cette façon (cf. fig. 8.3), c'est-à-dire par interactions électrostatiques (réaction non-spécifique).

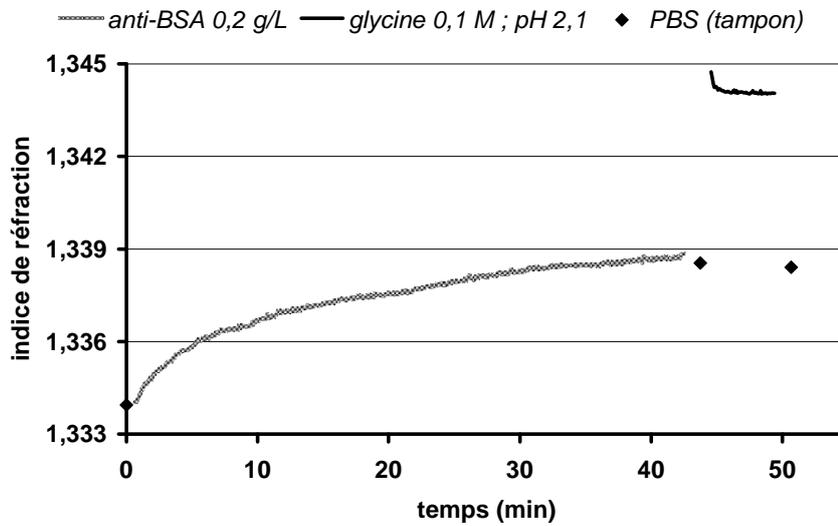


Figure 8.3: Cinétique d'adsorption non-spécifique de l'anti-BSA sur la multicouche de polyélectrolytes non-biofonctionnalisée par la BSA. Test de l'action de la glycine sur l'anti-BSA fixée par interactions non-spécifiques.

L'inconvénient de cette méthode de régénération par la glycine se situe précisément au niveau de l'acidité de la solution utilisée. Les molécules biologiques sont extrêmement sensibles aux fortes variations de pH et un traitement prolongé à la glycine à pH 2,1 risque de dénaturer la BSA (protéine sonde). La durée du traitement ne doit donc pas excéder 5 à 10 minutes. Cependant, même en prenant ces précautions, il semble qu'après deux cycles (reconnaissance + régénération de la « couche sonde de BSA » à la glycine), l'activité biologique de la protéine sonde (la BSA) soit affectée. Ce phénomène se manifeste par une absence de reconnaissance de l'anticorps à faibles concentrations en anti-BSA.

8.1.2 Détection quantitative d'anti-BSA

Afin d'évaluer les performances du biocapteur « tout électrostatique », sa réponse est mesurée pour des solutions de concentrations croissantes en anti-BSA dans le PBS. La figure 8.4 illustre la réponse de la fibre à réseau de Bragg à trait inclinés en termes de variations d'indice de réfraction engendrée par la fixation d'anti-BSA sur la fibre à ces différentes concentrations. La variation d'indice engendrée par la fixation d'anti-BSA est mesurée après un temps d'incubation de 60 minutes.

Cette étude des variations d'indice de réfraction en fonction de la concentration des échantillons en anti-BSA est complétée par une modélisation du couple BSA / anti-BSA selon l'équation de Langmuir :

$$\Delta n = \Delta n_{\max} \cdot \frac{K \cdot C}{1 + K \cdot C} \quad (8.1)$$

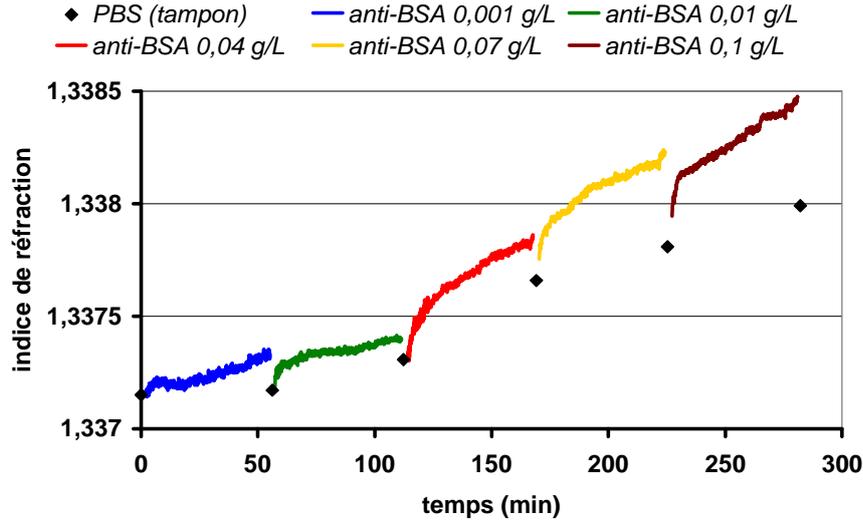


Figure 8.4: Cinétiques de détection de l'anti-BSA contenue dans des solutions de concentration croissante en anticorps.

La figure 8.5 rassemble les variations finales d'indice de réfraction mesurées pour des concentrations C en anticorps allant de 0,001 g/L à 0,1 g/L. Cette variation d'indice Δn correspond à la différence des indices de réfraction mesurés avant et après détection de l'anti-BSA, toujours dans le PBS, milieu de référence également utilisé pour la préparation des solutions et le rinçage de la fibre. Le tracé de $\frac{C}{\Delta n}$ en fonction de C (cf. fig. 8.6) permet d'obtenir l'expression du modèle de Langmuir sous sa forme linéaire :

$$\frac{C}{\Delta n} = \frac{1}{\Delta n_{\max}} \cdot C + \frac{1}{K \cdot \Delta n_{\max}} \quad (8.2)$$

où Δn est la variation d'indice mesurée avec une solution de concentration C en anti-BSA, Δn_{\max} la variation d'indice correspondant à l'adsorption maximale (monocouche d'anti-BSA) et K la constante d'affinité anticorps-antigène.

La figure 8.6 montre la forme linéaire du modèle de Langmuir est une droite de coefficient de corrélation proche de 1 (0,99). Le modèle de Langmuir est donc adapté pour décrire la détection d'anti-BSA sur une surface biofonctionnalisée par la BSA. Après avoir déterminé l'équation de cette droite de Langmuir, les valeurs des paramètres Δn_{\max} et K obtenues sont les suivantes :

$$\Delta n_{\max} = 0,00142 \text{ et } K = 13,5 \text{ L/g}$$

8.1.3 Analyse des performances du biocapteur « tout électrostatique »

La courbe isotherme de Langmuir correspondant aux points expérimentaux est représentée en trait plein sur la figure 8.5. Le bon accord entre ce modèle et l'expérience indique que la réaction spécifique de l'anti-BSA sur la BSA coïncide avec une occupation progressive des sites disponibles jusqu'à formation d'une monocouche d'anticorps à l'interface entre la

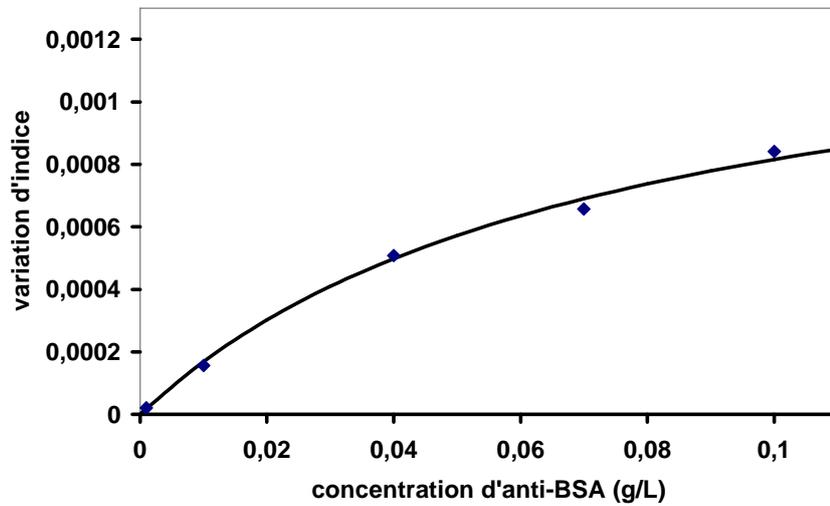


Figure 8.5: Variation de l'indice de réfraction mesuré pour différentes concentrations en anti-BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.

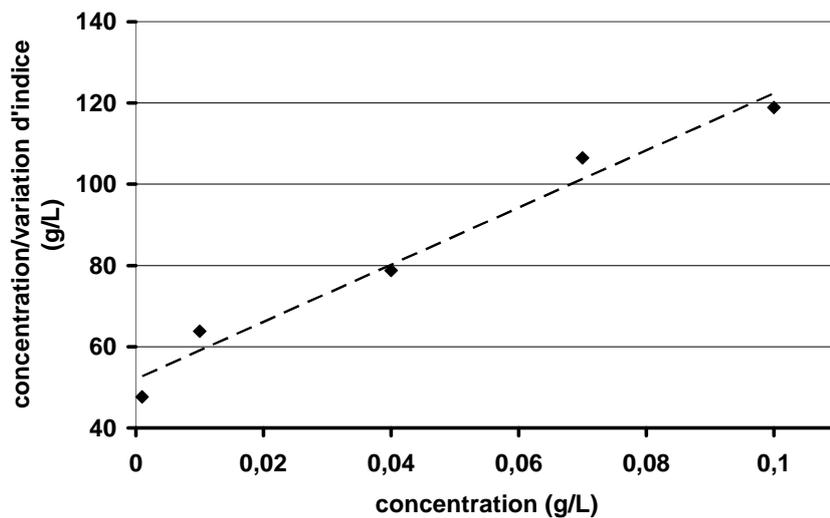


Figure 8.6: Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.

surface biofonctionnalisée et le milieu dans lequel plonge la fibre [Brunauer 1940]. Partant de cette hypothèse, il est possible de convertir les variations d'indice de réfraction mesurées en concentrations surfaciques d'anti-BSA ayant réagi sur la surface. Cette conversion passe par le calcul de la sensibilité du biocapteur.

8.1.3.1 Sensibilité et limite de détection

La sensibilité S d'un biocapteur est définie comme étant le coefficient de proportionnalité entre la grandeur mesurée par le biocapteur (ici la variation d'indice de réfraction Δn) et la densité surfacique σ de molécules ayant réagi.

$$S = \frac{\Delta n}{\sigma} \quad (8.3)$$

Partant de l'hypothèse que la variation d'indice de réfraction maximale Δn_{max} déterminée grâce au modèle de Langmuir correspond à la formation d'une monocouche d'anti-BSA, il suffit de calculer la densité surfacique σ_{max} d'une monocouche d'anticorps pour en déduire la sensibilité du biocapteur [Barrios 2008]. La densité surfacique d'une monocouche d'anti-BSA dépend de sa masse molaire M et de la dimension moyenne $d = 12$ nm [Yang 2004] d'une molécule.

$$\sigma_{max} = \frac{M}{N_A} \cdot \frac{1}{d^2} = 1700 \text{ pg/mm}^2 \quad (8.4)$$

où $M = 147000$ g/mol est la masse molaire de l'anti-BSA et $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ le nombre d'Avogadro. La sensibilité du biocapteur s'en déduit directement :

$$S = \frac{\Delta n_{max}}{\sigma_{max}} = 0,835 \cdot 10^{-6} \text{ u.i.r.} \cdot \text{mm}^2/\text{pg} \quad (8.5)$$

La figure 8.7 correspond à la conversion des valeurs de variation d'indice de réfraction mesurée en densité surfacique. Connaissant la sensibilité du biocapteur, il est désormais possible d'en déduire sa limite de détection σ_{lim} . Cette dernière est définie comme la concentration surfacique correspondant à la résolution $R = 10^{-5}$ du capteur d'indice de réfraction à réseau de Bragg à traits inclinés.

$$\sigma_{lim} = \frac{R}{S} = 120 \text{ pg/mm}^2 \quad (8.6)$$

Cette valeur de limite de détection est comparable à celles obtenues avec d'autres types de biocapteurs photoniques [Barrios 2008], ce qui légitime l'utilisation de réseaux de Bragg en angle pour la détection de petites modifications de surface, comme l'accrochage de molécules.

8.1.3.2 Affinité et concentration limite

La constante d'affinité K déterminée grâce au modèle de Langmuir est représentative de l'activité biologique des protéines immobilisées en surface de la gaine optique. Elle est d'autant plus faible que la protéine sonde (BSA) subit des dénaturations avant l'étape de

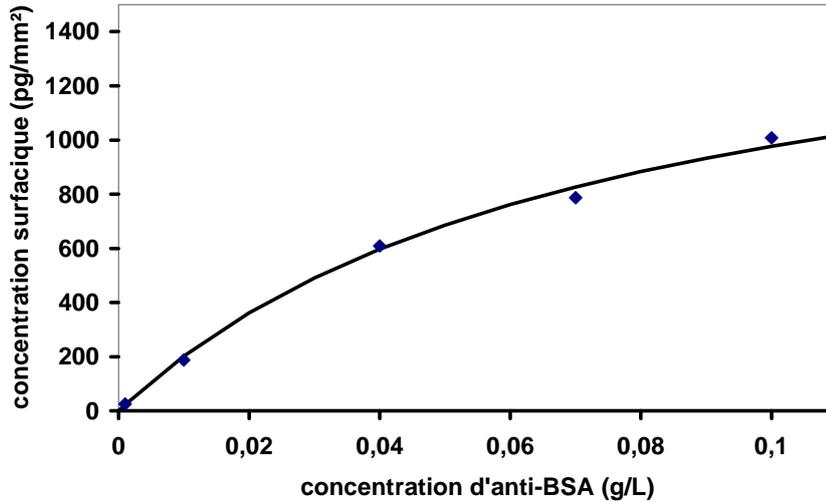


Figure 8.7: Concentration surfacique d'anticorps ayant réagi pour différentes concentrations d'anti-BSA en solution. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.

détection de l'anticorps. Étant donné qu'une faible activité des sondes adsorbées se traduit par une diminution de la reconnaissance anticorps-antigène, ce paramètre constitue un élément clef de l'efficacité du biocapteur.

La concentration limite d'anti-BSA présente en solution C_{lim} est définie comme étant la valeur minimale détectable avec un réfractomètre à réseau de Bragg à traits inclinés. Elle est donc directement liée à la résolution $R = 10^{-5}$ du capteur d'indice. La concentration limite en anti-BSA se déduit directement de l'équation 8.1 donnant la relation entre variations d'indice Δn et concentration C .

$$C_{lim} = \frac{1}{K} \cdot \frac{R}{\Delta n_{max} - R} = 525 \mu\text{g/L} \sim 0,5 \text{ mg/L} \quad (8.7)$$

Cette relation montre l'intérêt d'une constante d'affinité élevée, gage de grande sensibilité à l'anti-BSA pour des échantillons de très faible concentration. Le biocapteur « tout électrostatique » basé sur la reconnaissance de l'anti-BSA par la BSA peut détecter la présence de l'anticorps lorsque sa concentration en solution est supérieure à 0,5 mg/L. Cette dernière correspond à la concentration surfacique limite $\sigma_{lim} = 120 \text{ pg/mm}^2$ calculée précédemment.

8.2 Limites du « tout électrostatique » et utilisation de l'affinité avidine-biotine

8.2.1 Dépendance vis-à-vis de la biomolécule sonde

Suite aux résultats de biofonctionnalisation encourageants obtenus avec la BSA, d'autres tentatives ont été réalisées en remplaçant cette dernière par de la β -lactoglobuline (BLG). La

BLG est une protéine du lait de vache allergisante pour l'être humain. Elle est le récepteur spécifique de l'anti- β -lactoglobuline (anti-BLG), anticorps produit par les sujets allergiques à la BLG. D'un point de vue immunologique, ce couple anticorps-antigène présente donc un intérêt plus important que le couple BSA/anti-BSA, néanmoins très utile pour des essais de faisabilité. De la même façon que pour la BSA, la méthode de biofonctionnalisation consiste à adsorber l'antigène (la BLG) par interactions électrostatiques sur une multicouche de polyélectrolytes. La BLG (point isoélectrique de 5,2) étant chargée négativement à pH 7,4 (pH du tampon PBS), la multicouche se termine par une couche de PEI. Cependant, les différentes tentatives ont montré que si la fixation de la protéine sur la multicouche de polyélectrolytes par interactions électrostatiques avait bien lieu, elle n'était en revanche pas stable, même à court terme. Après adsorption de la BLG et retour en tampon PBS, une désorption d'abord rapide (quelques minutes) puis relativement lente (plusieurs heures) des protéines fixées est observée (cf. fig. 8.8).

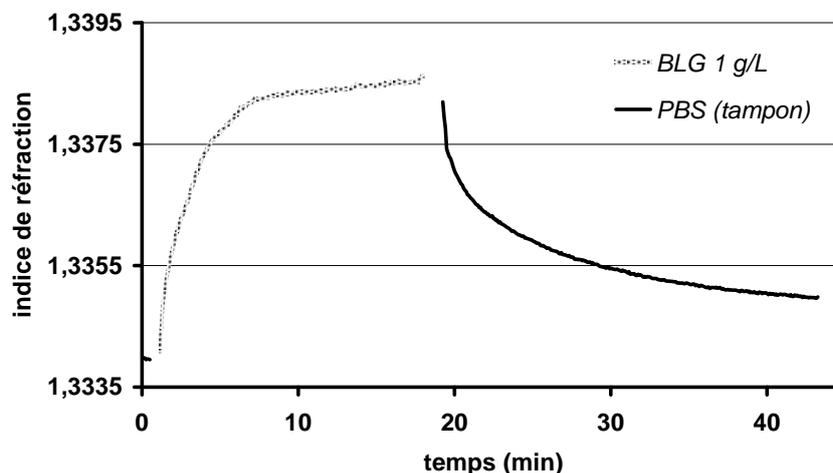


Figure 8.8: Cinétiques d'adsorption et de désorption de la BLG sur une multicouche de polyélectrolytes se terminant par du PEI.

Comme l'étape de détection repose sur la reconnaissance de l'anti-BLG (anticorps à détecter dans le cadre d'une application immunologique) par la BLG et que la cinétique des réactions anticorps-antigène est assez lente (de l'ordre de l'heure), ce phénomène de désorption pose un réel problème. D'une part, il n'est pas possible d'envisager la fabrication de capteurs stables dans le temps, pouvant être stockés après leur production puis utilisés après une longue période. D'autre part, même en utilisant un réfractomètre à réseau de Bragg biofonctionnalisé par la BLG juste après sa fabrication, les variations d'indice dues à la réaction de reconnaissance d'anti-BLG dans l'échantillon testé risquent d'être couplées à celles résultant de la désorption de la BLG, protéine de biofonctionnalisation.

Enfin, l'adsorption de BLG par interactions électrostatiques correspond à une réaction non spécifique, contrairement aux réactions anticorps-antigènes, par exemple. Aussi la spécificité de la mesure n'est-elle pas assurée si la BLG ne recouvre pas l'intégralité de la surface de PEI

chargé positivement. N'importe quelle protéine de charge opposée présente dans le milieu à analyser peut en effet se fixer sur la surface par interactions électrostatiques, en particulier l'anti-BLG. C'est d'ailleurs ce qui a été prouvé en mettant la multicouche de polyélectrolytes directement en contact avec une solution d'anti-BLG (cf. fig. 8.9). Il faut donc être sûr qu'il ne reste aucun site chargé positivement en surface du PEI formant la dernière couche de polyélectrolytes pour assurer la sélectivité des mesures.

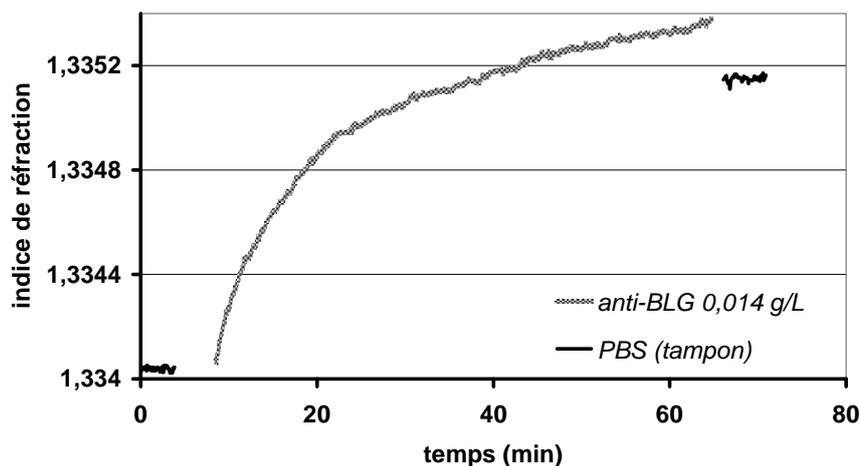


Figure 8.9: Cinétique d'adsorption non-spécifique de l'anti-BLG sur la multicouche de polyélectrolytes non-biofonctionnalisée par la BLG.

8.2.2 Spécificité de la mesure assurée par l'affinité avidine-biotine

Pour résoudre ce problème de dépendance en termes de protéine bioréceptrice et assurer la spécificité de la mesure, la solution retenue consiste utiliser une protéine intermédiaire, l'extravidine. Comme la BSA, cette dernière s'adsorbe bien sur la multicouche de polyélectrolytes [Bassil 2003]. Son point isoélectrique étant de 6,5, le film doit se terminer par une couche de PEI. L'extravidine tapisse alors la multicouche et vient ainsi bloquer les sites chargés positivement restés libres en surface polycationique. Ce « tapis » d'extravidine sert ensuite à immobiliser une protéine sonde biotinylée (cf. fig. 8.10).

La biotinylation de la protéine sonde présente au moins deux avantages. D'une part, elle permet l'immobilisation de la protéine sonde indépendamment de sa nature puisque cette dernière vient se fixer sur l'extravidine par l'intermédiaire de son motif biotine qui présente une très forte affinité pour l'avidine. D'autre part, ce type de médiation assure une orientation optimale des biomolécules sondes et une répartition plus homogène sur la surface. Dans le cas d'une adsorption du biorécepteur par interactions électrostatiques, la distribution des charges sur toute la longueur de la protéine rend aléatoire le choix des points de fixation de cette dernière sur la surface de charge opposée. En revanche, dans le cas d'une protéine biotinylée, le point de fixation est déterminé par la position du motif biotine et l'immobilisation est orientée.

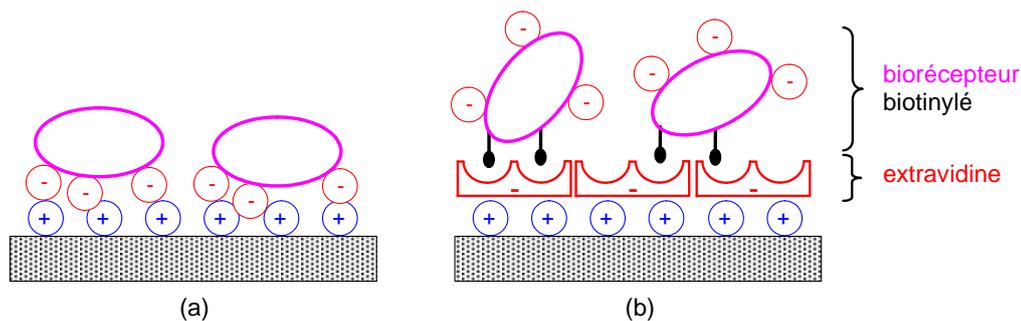


Figure 8.10: Schémas d'une biofonctionnalisation directe par interactions électrostatiques (a) et d'un protocole fondé sur l'utilisation d'une couche intermédiaire d'extravidine (b).

8.2.3 Biofonctionnalisation de la multicouche de polyélectrolytes

Des travaux de recherche [Bassil 2003] ont montré que l'utilisation d'une solution d'extravidine à 0,2 g/L suffit à l'obtention d'une monocouche de protéine dense et stable. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont donc été réalisés avec une solution d'extravidine à 1 g/L afin de se placer dans des conditions de saturation de la couche de PEI optimales. L'affinité avidine-biotine étant beaucoup plus forte que de simples interactions électrostatiques, la BSA utilisée pour la biofonctionnalisation n'est plus aussi concentrée que la BSA servant à la réalisation du biocapteur « tout électrostatique ». Une solution de BSA biotinylée à 1 g/L suffit à assurer la formation d'une monocouche de protéines sondes (cf. fig. 8.11).

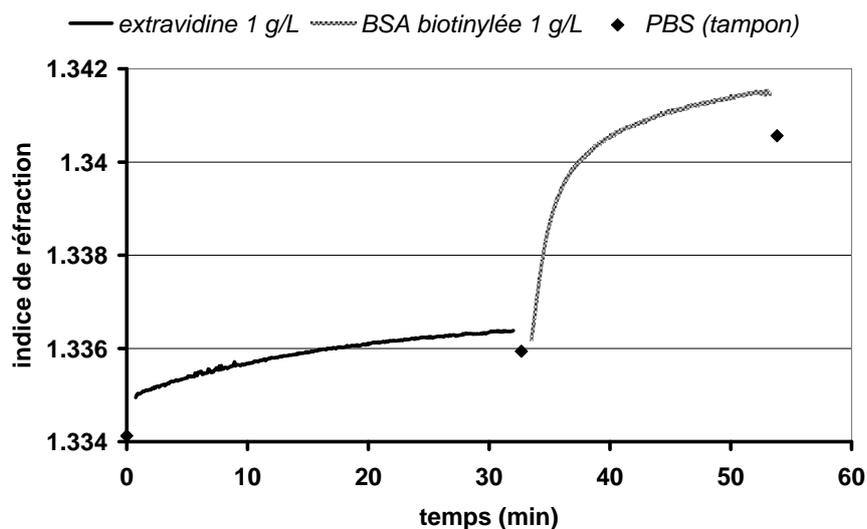


Figure 8.11: Cinétique d'adsorption non-spécifique de l'extravidine et réaction spécifique de la BSA biotinylée par affinité avidine-biotine.

8.2.4 Détection quantitative d'anti-BSA

Afin d'évaluer les performances du biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine » (cf. fig. 8.12), issu du couplage de l'affinité extravidine-biotine avec une multicouche de polyélectrolytes, sa réponse est mesurée pour des solutions de concentrations croissantes en anti-BSA dans le PBS. La figure 8.13 montre la réponse de la fibre à réseau de Bragg à traits inclinés en termes de variation d'indice de réfraction engendrée par la fixation d'anti-BSA sur la fibre à ces différentes concentrations. La variation d'indice engendrée par la fixation d'anti-BSA est mesurée après un temps d'incubation de 45 minutes.

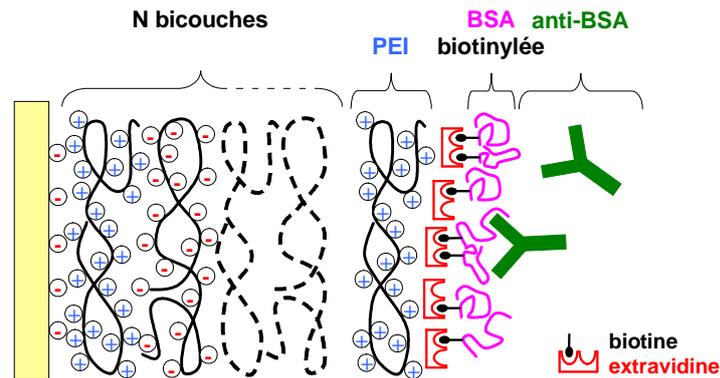


Figure 8.12: Représentation schématique de la détection d'anti-BSA sur une fibre biofonctionnalisée selon le protocole « électrostatique-extravidine-biotine ».

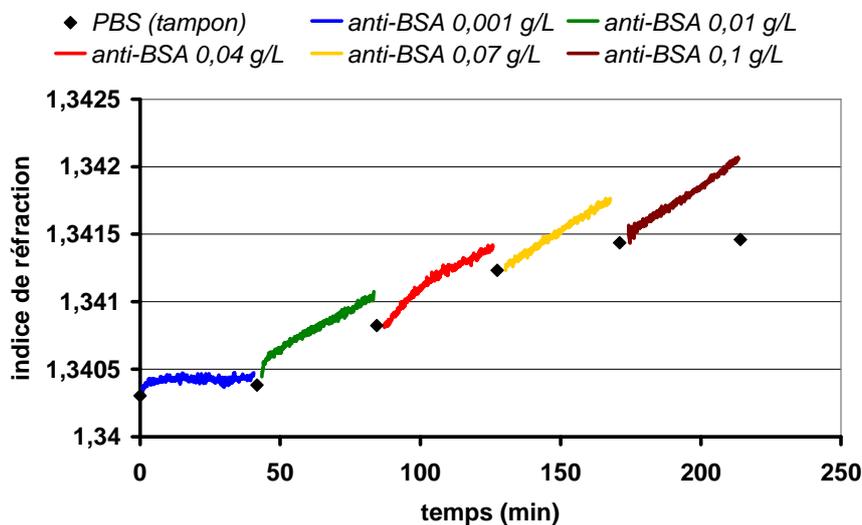


Figure 8.13: Cinétiques de détection de l'anti-BSA contenue dans des solutions de concentration croissante en anticorps.

Comme dans le cas du biocapteur « tout électrostatique », cette étude des variations d'indice de réfraction en fonction de la concentration des échantillons en anti-BSA est complétée par une modélisation du couple BSA-anti-BSA selon l'équation de Langmuir (cf. eq. 8.1). La figure 8.14 rassemble les variations finales d'indice de réfraction mesurées pour des concen-

tration C en anticorps allant de 0,001 g/L à 0,1 g/L. Cette variation d'indice Δn correspond à la différence des indices de réfraction mesurés avant et après détection de l'anti-BSA, toujours dans le PBS, milieu de référence également utilisé pour la préparation des solutions et le rinçage de la fibre. Le tracé de $\frac{C}{\Delta n}$ en fonction de C permet d'obtenir l'expression du modèle de Langmuir sous sa forme linéaire (cf. éq. 8.2). La figure 8.15 correspondant à la forme linéaire du modèle de Langmuir est une droite de coefficient de corrélation proche de 1 (0,99). Le modèle de Langmuir est donc adapté pour décrire la détection d'anti-BSA sur une surface biofonctionnalisée par la BSA biotinylée. Après avoir déterminé l'équation de cette droite de Langmuir, les valeurs des paramètres Δn_{\max} et K obtenues sont les suivantes :

$$\Delta n_{\max} = 0,00136 \text{ et } K = 61,5 \text{ L/g}$$

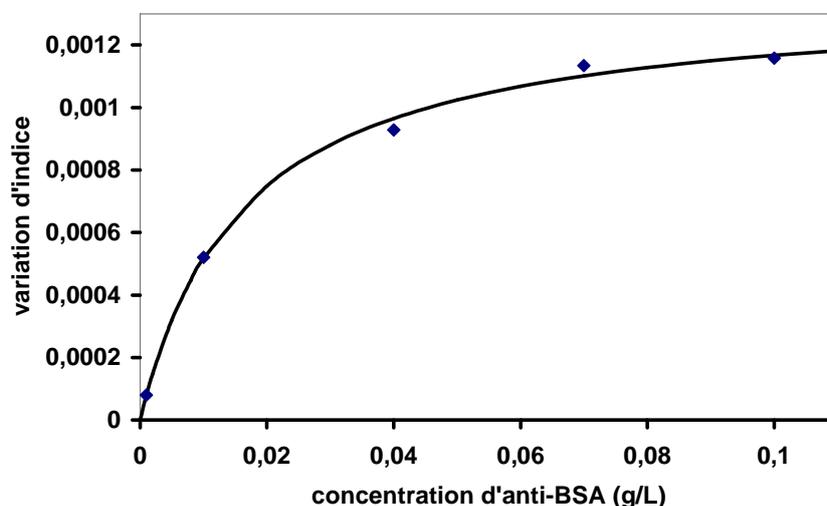


Figure 8.14: Variation de l'indice de réfraction mesuré pour différentes concentrations en anti-BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.

8.2.5 Performances du biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine »

Comme dans le cas du biocapteur « tout électrostatique », le bon accord entre ce modèle et l'expérience (cf. fig. 8.14) indique que la réaction spécifique de l'anti-BSA sur la BSA biotinylée coïncide avec une occupation progressive des sites disponibles jusqu'à formation d'une monocouche d'anticorps à l'interface entre la surface biofonctionnalisée et le milieu dans lequel plonge la fibre. Partant de cette hypothèse, il est possible de calculer la sensibilité (cf. eq. 8.3) du biocapteur (la pente de sa réponse) afin de convertir les variations d'indice de réfraction mesurées en concentrations surfaciques d'anti-BSA ayant réagi sur la surface.

La variation d'indice de réfraction maximale Δn_{\max} déterminée grâce au modèle de Langmuir correspondant à la formation d'une monocouche d'anti-BSA de densité surfacique $\sigma_{\max} = 1700 \text{ pg/mm}^2$ (cf. eq. 8.4), la sensibilité du biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine »

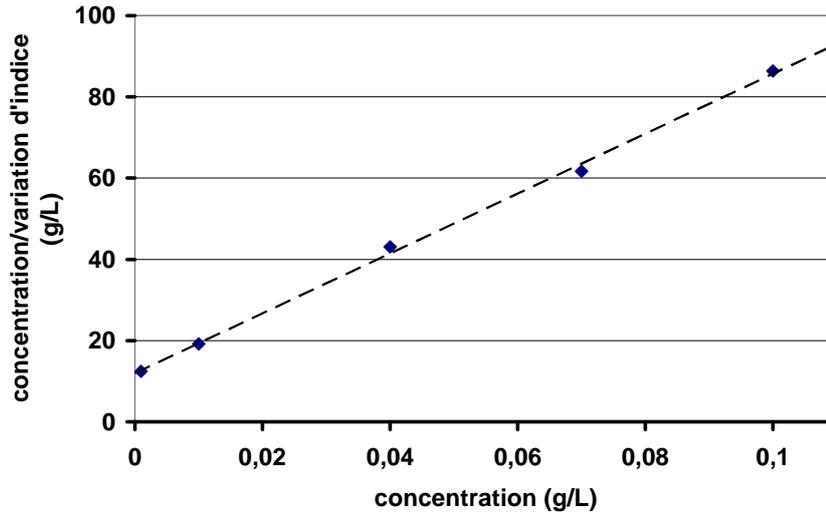


Figure 8.15: Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.

s'en déduit directement :

$$S = \frac{\Delta n_{\max}}{\sigma_{\max}} = 0,800 \cdot 10^{-6} \text{ u.i.r.} \cdot \text{mm}^2/\text{pg} \quad (8.8)$$

La figure 8.16 correspond à la conversion des valeurs de variation d'indice de réfraction mesurée en densité surfacique. Connaissant la sensibilité du biocapteur, il est désormais possible d'en déduire sa limite de détection σ_{lim} correspondant à la résolution $R = 10^{-5}$ du réfractomètre à réseau de Bragg à traits inclinés.

$$\sigma_{lim} = \frac{R}{S} = 125 \text{ pg/mm}^2 \quad (8.9)$$

Il est intéressant de noter que les valeurs de Δn_{max} déterminées grâce au modèle de Langmuir dans les configurations « tout électrostatique » et « électrostatique-extravidine-biotine » sont très proches (respectivement 0,00142 et 0,00136). Ce constat tend à prouver que la densité de sites de reconnaissance disponibles pour l'anti-BSA est la même dans les deux cas, ce qui se traduit par des valeurs de sensibilité et de limite de détection équivalentes. L'utilisation d'extravidine et de BSA biotinylée n'a donc pas d'effet sur la sensibilité du capteur.

En revanche, la constante d'affinité K , représentative de l'activité biologique des protéines immobilisées en surface de la gaine optique, passe de 13,5 L/g dans la configuration « tout électrostatique » à 61,5 L/g pour le biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine ». Cette progression indique que la protéine sonde (BSA) subit moins de dénaturations lorsqu'elle est fixée par l'intermédiaire du fragment biotine que par simples interactions électrostatiques. La concentration limite d'anti-BSA présente en solution C_{lim} étant inversement proportionnelle à la constante d'affinité K (cf. eq. 8.7), cette activité accrue des sondes adsorbées se traduit par une augmentation de la reconnaissance anticorps-antigène à faible concentration.

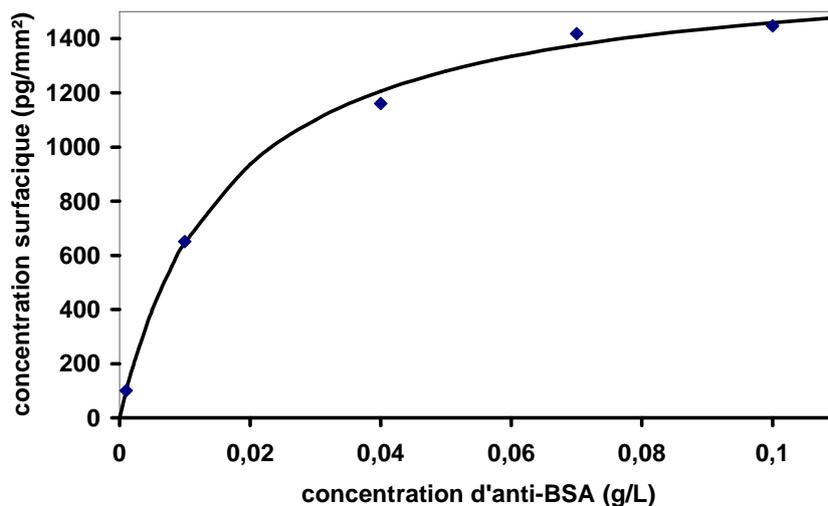


Figure 8.16: Concentration surfacique d'anticorps ayant réagi pour différentes concentrations d'anti-BSA en solution. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.

$$C_{lim} = 120 \mu\text{g/L} \quad (8.10)$$

Finalement, pour des concentrations surfaciques limites σ_{lim} équivalentes, le biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine » est donc potentiellement capable de détecter la biomolécule cible (l'anti-BSA) présente en solution à des concentrations quatre fois inférieures à ce qui est réalisable dans la configuration « tout électrostatique ». L'introduction de l'extravidine constitue donc une amélioration majeure apportée au protocole de biofonctionnalisation reposant sur l'exploitation des interactions électrostatiques.

Chapitre 9

Biocapteur issu d'une fonctionnalisation du substrat de silice faisant intervenir des liaisons covalentes

Les premiers biocapteurs réalisés aux cours de ces travaux reposent sur une fonctionnalisation du substrat de silice basée sur l'exploitation des interactions électrostatiques qui existent entre une surface et des molécules en solution de charges opposées. Ces méthodes sont relativement simples et rapides à mettre en œuvre. De plus, elles autorisent la régénération rapide et complète du substrat de silice. Une même fibre à réseau de Bragg en angle peut être réutilisée un très grand nombre de fois, par simple nettoyage de la surface de silice à la soude à 1 mol/L. Néanmoins, cette facilité de décapage révèle également la « fragilité » des biofilms obtenus par ce type de protocoles de biofonctionnalisation. Afin d'accroître la stabilité des biofilms conçus pour réagir de façon spécifique avec une biomolécule cible, la multicouche de polyélectrolytes peut être remplacée par un polymère greffé sur la surface de la fibre optique par l'intermédiaire de liaisons covalentes.

9.1 Fonctionnalisation covalente du substrat de silice

La stratégie choisie pour la fonctionnalisation du substrat par liaisons covalentes repose sur la croissance *in situ* d'un polymère à partir de la surface : cette méthode porte le nom de polymérisation *grafting from*. Un grand nombre de protocoles *grafting from* sont décrits dans la littérature et proposent de réaliser la polymérisation en milieu organique. Or, l'indice de réfraction de ces milieux est trop élevé ($\sim 1,45$) pour le suivi en temps réel de la réaction de polymérisation par réfractométrie à réseau de Bragg en angle. Aussi l'une des premières difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre de ces méthodes se situe-elle au niveau du contrôle de la longueur des chaînes polymères. Si ces dernières sont trop courtes, les polymères

ne jouent pas leur rôle d'espaceur qui isole les protéines de la surface du substrat de silice. Les molécules biologiques risquent alors d'être dénaturées et de perdre une partie voire la totalité de leur activité biologique. Inversement, si les chaînes polymères sont trop longues, le réfractomètre à réseau de Bragg en angle est saturé car l'indice de réfraction moyen autour de la fibre est devenu trop élevé. Dans ce cas, le capteur devient « aveugle ».

Les premières tentatives de fonctionnalisation covalente selon un protocole *grafting from* en milieu organique ont montré la faisabilité d'une croissance *in situ* de chaînes polymères. Cependant, l'impossibilité du contrôle de l'épaisseur de la couche de fonctionnalisation posait problème. Par la suite, un second protocole de polymérisation *grafting from* a été mis au point, de manière à ce que « l'étape clé » de polymérisation *in situ* puisse être réalisée en milieu aqueux. Ainsi, la croissance de la couche de polymères peut être contrôlée en temps réel et stoppée dès lors que son épaisseur atteint une valeur permettant d'optimiser les performances du futur biocapteur.

9.1.1 Préparation du substrat de silice

9.1.1.1 Activation de la silice, silanisation et séchage

L'activation à l'acide nitrique à 10 % dans l'eau est une étape nécessaire à la création de groupes silanols SiOH en surface de la fibre. Ces derniers peuvent ensuite être utilisés lors de l'étape de silanisation pour réagir avec les groupements méthoxy du 3-aminopropyl-triméthoxysilane (APTS) à 10 % dans l'eau. L'étape de silanisation donne lieu à des variations d'indice de réfraction très faibles, difficilement observables par réfractométrie à réseau de Bragg en angle. Les molécules de silane greffées lors de cette étape sont relativement petites par comparaison avec un polymère ou une protéine. D'autre part, même après l'étape d'activation, la densité de groupes silanols reste faible, bien que suffisante pour assurer la polymérisation *in situ* de l'acide polyacrylique. Ainsi, l'étape de silanisation donne lieu à des variations d'indice de réfraction très faibles, difficilement observables par réfractométrie à réseau de Bragg en angle ou par toute autre technique.

Après rinçage à l'eau puis à l'éthanol, la surface de silice silanisée doit être longuement séchée afin d'assurer le greffage de l'amorceur dans des conditions optimales. Elle est chauffée à 80°C (bain marie) et placée sous atmosphère inerte (azote) pendant une nuit.

9.1.1.2 Préparation et greffage de l'amorceur

L'amorceur chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) (ACVC) se présente sous forme de poudre qui doit être conservée sous atmosphère inerte (azote ou argon) pour éviter que le produit ne s'hydrolyse (cf. fig. 9.1). Il est utilisé en solution dans un solvant organique anhydre (Diméthylformamide, DMF) pour éviter que les fonctions chlorures d'acides s'hydrolysent avant d'avoir pu réagir avec les fonctions amines primaires (NH₂) présentes sur la surface silanisée du substrat.

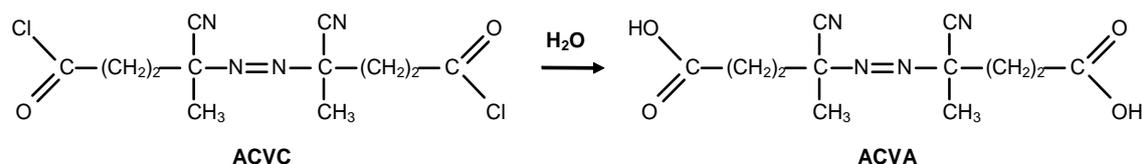


Figure 9.1: Mécanisme d'hydrolyse des fonctions chlorures d'acide de l'amorceur chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) (ACVC) pour donner l'acide 4,4'-Azobis(4-cyanovalérique) (ACVA).

La qualité de l'amorceur peut être contrôlée par spectroscopie infra-rouge (IR). La présence de fonctions chlorures d'acides se manifeste alors sur le spectre IR par la présence d'un pic important aux alentours de 1787 cm^{-1} . Lorsque certaines de ces fonctions s'hydrolysent, un second pic de fréquence un peu plus faible (aux alentours de 1714 cm^{-1}) correspondant à la fonction carboxyle apparaît (cf. fig. 9.2). L'amorceur n'est plus efficace dès l'instant que la taille relative de ce second pic devient significative vis-à-vis de celui correspondant aux chlorures d'acides.

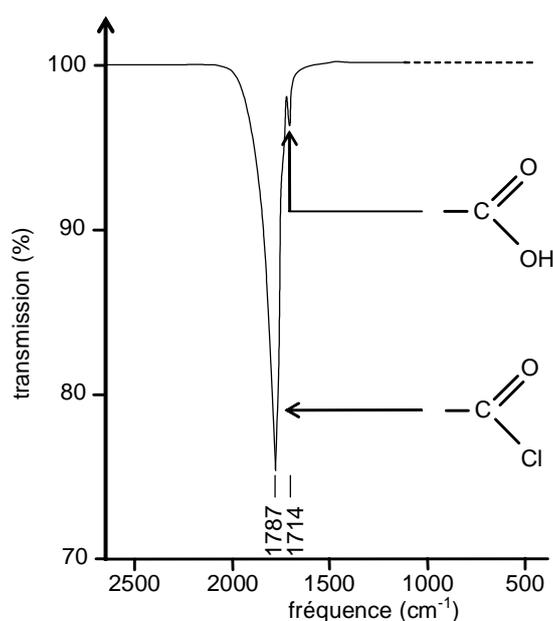


Figure 9.2: Fraction du spectre IR d'un amorceur chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) très faiblement hydrolysé.

L'ACVC utilisé dans les travaux présentés dans ce manuscrit est préparé au laboratoire, à partir d'un mélange de pentachlorure de phosphore (PCl_5) et de l'acide 4,4'-Azobis(4-cyanovalérique) (ACVA) [Schmidt 2002].

- (i) Le PCl_5 (8 g) en suspension dans 40 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2) est versé dans un ballon, lui-même plongé dans un bain marie maintenu à 0°C (eau + glace).
- (ii) Une second mélange composé de 2 g d'ACVA en suspension dans 55 mL de dichlorométhane est ajouté goutte-à-goutte dans le ballon à l'aide d'une seringue (cf. fig. 9.3).

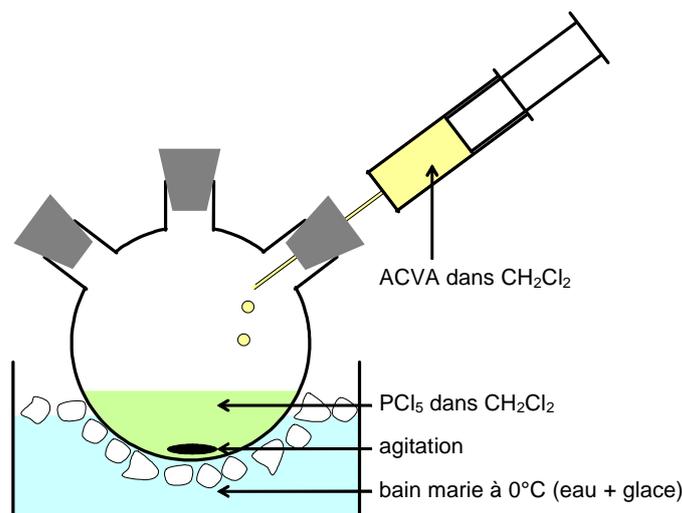


Figure 9.3: Schéma du montage utilisé pour la synthèse du chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) (ACVC) à partir de l'acide 4,4'-Azobis(4-cyanovalérique) (ACVA) et du pentachlorure de phosphore (PCl₅) en suspension dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂).

Cette incorporation lente et une agitation en continu sont nécessaires à l'obtention d'une suspension finale homogène. Cette étape dure une heure. La réaction se poursuit ensuite à température ambiante, pendant environ six heures.

(iii) Au terme de la réaction, le mélange est filtré et la solution obtenue concentrée par passage dans un évaporateur rotatif jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 20 mL de solution.

(iv) Le mélange est de nouveau filtré et la solution obtenue ajoutée à 20 mL d'hexane. L'ensemble est conservé à 4°C et sous atmosphère inerte (azote ou argon) pendant 12 h pour que l'ACVC précipite.

(v) Le précipité d'ACVC est filtré sous atmosphère inerte puis séché sous vide. Typiquement, la quantité d'amorceur obtenue est de l'ordre de 1,8 g, ce qui correspond à un rendement de 77 %.

L'étape de greffage de l'amorceur se déroule en milieu organique. L'indice de réfraction de ce milieu étant trop élevé, il est impossible de suivre la réaction en temps réel par réfractométrie à réseau de Bragg en angle.

9.1.2 Polymérisation *in situ*

La polymérisation de l'acide polyacrylique depuis la surface est la première étape véritablement observable en temps réel. La réaction s'opère sous l'action d'un rayonnement ultraviolet (365 nm). Les différents essais réalisés ont montré que des temps de polymérisation compris entre 20 et 25 minutes suffisent à obtenir l'épaisseur de polymère souhaitée. La réaction est donc relativement rapide, contrairement aux réactions de polymérisations thermiques qui nécessitent généralement plusieurs heures. D'autre part, il n'y a pas de phénomène d'inertie

et la polymérisation s'arrête dès lors que l'irradiation cesse (cf. fig. 9.4). De cette façon, il est aisé d'ajuster l'épaisseur de la couche de polymères puisqu'il suffit d'interrompre le rayonnement ultraviolet lorsque la couche de fonctionnalisation semble optimale.

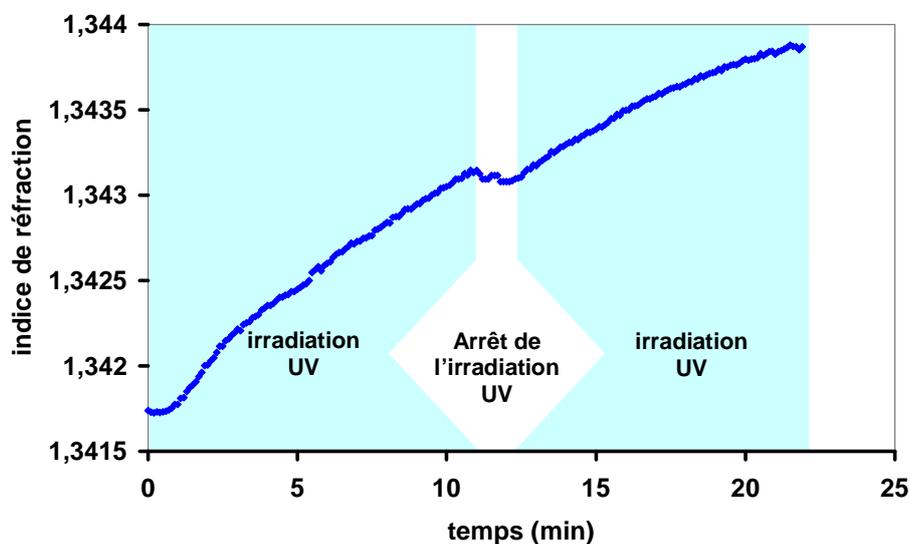


Figure 9.4: Suivi en temps réel de la croissance des chaînes d'acide polyacrylique depuis la surface d'une fibre à réseau de Bragg en angle sous irradiation ultraviolette (UV), $\lambda = 365$ nm.

En plus de l'augmentation d'indice de réfraction observée par réfractométrie à réseau de Bragg en angle, la réaction de polymérisation se manifeste par la formation d'acide polyacrylique en solution. Lors de l'amorçage de la réaction de polymérisation, la rupture homolytique de l'amorceur conduit à la formation d'autant de chaînes polymères en solution qu'il y a de sites disponibles pour la croissance de polymères depuis la surface. Or, la présence d'acide polyacrylique rend la solution de monomère visqueuse. Aussi l'apparition de ce phénomène témoigne-t-il de la présence d'amorceur en surface de la fibre et il est d'autant plus rapide que la densité de molécules d'amorceur est importante. Afin d'éviter que la solution ne prenne en masse et forme un gel autour de la fibre, il est nécessaire d'utiliser un volume de solution de monomère relativement important, assurant la dissolution du polymère formé. Inversement, lorsque la polymérisation est très lente, la solution de monomère ne devient pas visqueuse. La faible densité de sites d'amorçage n'autorise pas la formation d'un grand nombre de chaînes en solution et la croissance des polymères depuis la surface ne permet d'obtenir une épaisseur suffisante qu'au bout de plusieurs heures d'irradiation : il y a peu de chaînes polymères greffées sur la surface de la fibre à réseau de Bragg en angle mais elles sont plus longues et donc plus mobiles.

La mobilité des chaînes polymères en surface de la fibre est un problème majeur qu'il est nécessaire de limiter car il risque de masquer d'autres phénomènes tels que la reconnaissance spécifique de biomolécules présentes en solutions à de très faibles concentrations. Aussi est-il préférable d'obtenir une couche de polymères de forte densité. Beaucoup moins mobiles que de longues chaînes dispersées sur la surface, cette couche de fonctionnalisation forme également une « barrière » qui isole les molécules biologiques de la surface de la fibre.

9.1.3 Couplage covalent de l'extravidine

La surface de silice fonctionnalisée par l'acide polyacrylique présente des groupements carboxyles COOH. Après activation avec un mélange N-hydroxysuccinimide (NHS) à 0,05 mol/L et 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) à 0,2 mol/L fraîchement préparé, ces dernières peuvent être utilisées pour le greffage covalent d'une protéine. La solution *a priori* la plus simple consiste à greffer directement une protéine sonde (biorécepteur) telle que la BSA en surface de la couche de polymère.

Dans le cas électrostatique, les résultats présentés dans le chapitre précédent montrent que la BSA conserve une partie de son activité biologique lorsqu'elle est directement adsorbée par interactions électrostatiques sur une multicouche de polyélectrolytes. Cependant, l'utilisation d'une couche d'extravidine intermédiaire couplée à une BSA biotinylée permet d'augmenter la constante d'affinité de la BSA pour l'anti-BSA. Ce phénomène témoigne d'une activité biologique accrue de la BSA lorsqu'elle est fixée sur la surface par l'intermédiaire d'un fragment de biotine.

Dans le cas covalent, le couplage direct de la BSA sur la couche d'acide polyacrylique activée par le mélange NHS/EDC aboutit à l'annihilation de l'activité biologique de la protéine sonde. Même à très forte concentration en anti-BSA, aucune variation d'indice de réfraction, qui pourrait traduire l'existence d'une réaction de reconnaissance anticorps-antigène, n'est observée. En fait, comme dans le cas électrostatique, la mauvaise orientation de certaines protéines sondes est certainement en partie responsable de ce phénomène. Il faut également souligner que les liaisons covalentes diminuent considérablement la mobilité des protéines car elles sont de plus forte énergie que les liaisons d'origine électrostatique. De cette façon, certains sites de reconnaissance anticorps-antigènes sont rendus inefficaces, dénaturés par des déformations dues à la rigidité des multiples liaisons covalentes qui lient chaque protéine à la surface.

Pour préserver les propriétés de reconnaissance de la protéine sonde, il est donc nécessaire d'utiliser la médiation d'une couche intermédiaire d'extravidine. La grande affinité de cette dernière pour la biotine garantit une bonne orientation des protéines sondes et la préservation de leurs propriétés de reconnaissance. Aussi les groupes carboxyles activés sont-ils utilisés pour le couplage covalent de l'extravidine sur la couche d'acide polyacrylique. La réaction de couplage covalent se déroule en milieu aqueux (tampon PBS) et peut ainsi être observée en temps réel par réfractométrie à réseau de Bragg en angle. Comme elle est assez lente, le temps d'incubation nécessaire à l'obtention d'une couche saturée est de l'ordre d'une à deux heures.

9.2 Greffage de la protéine sonde et détection d'anticorps

9.2.1 Greffage de la protéine sonde

Afin de s'assurer qu'il ne reste aucun groupe carboxyle activé en surface après couplage covalent de l'extravidine, la fibre est mise en attente pendant une nuit à pH 7,4, le temps que s'opère l'hydrolyse naturelle des groupements résiduels. Ainsi, comme dans le cas du biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine », la BSA est immobilisée sur la couche d'extravidine par l'intermédiaire de ses motifs de biotine. Elle ne risque pas de se greffer directement sur les groupements carboxyles par couplage covalent.

9.2.2 Détection quantitative d'anti-BSA

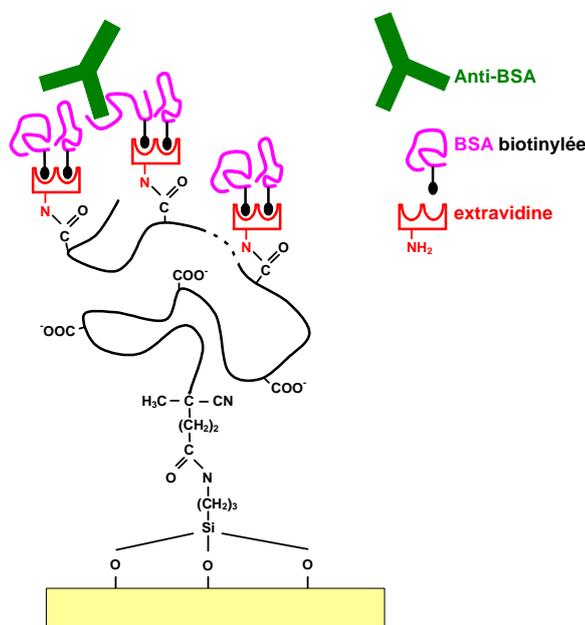


Figure 9.5: Représentation schématique de la détection d'anti-BSA sur une fibre biofonctionnalisée selon le protocole « covalent-extravidine-biotine ».

Afin d'évaluer les performances du biocapteur « covalent-extravidine-biotine » (cf. fig. 9.5), issu du couplage de l'affinité extravidine-biotine avec une fonctionnalisation covalente du substrat de silice par l'acide polyacrylique, sa réponse est mesurée pour des solutions de concentrations croissantes en anti-BSA dans le PBS. La figure 9.6 montre la réponse de la fibre à réseau de Bragg à traits inclinés en terme de variation d'indice de réfraction engendrée par la fixation d'anti-BSA sur la fibre à ces différentes concentrations. La variation d'indice engendrée par la fixation d'anti-BSA est mesurée après un temps d'incubation de 90 minutes.

Comme dans le cas des biocapteurs « tout électrostatique » et « électrostatique-extravidine-biotine », cette étude des variations d'indice de réfraction en fonction de la concentration des échantillons en anti-BSA est complétée par une modélisation du couple BSA-anti-BSA selon

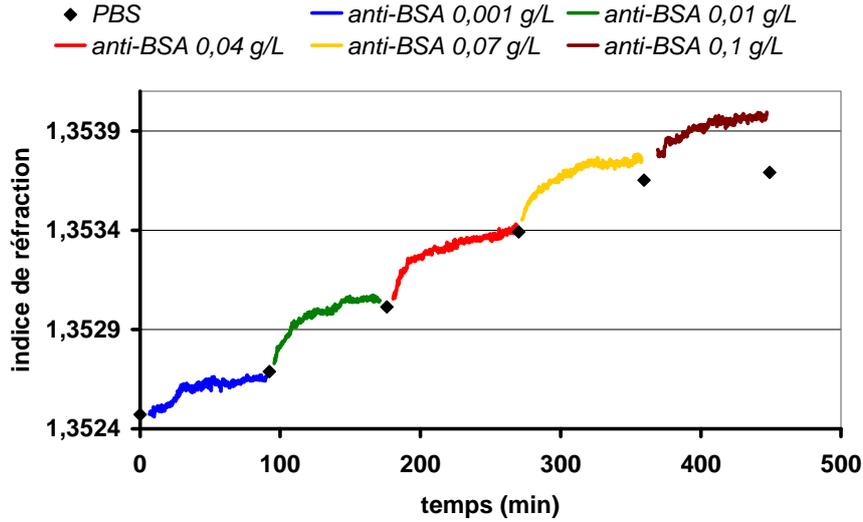


Figure 9.6: Cinétiques de détection de l'anti-BSA contenue dans des solutions de concentration croissante en anticorps.

l'équation de Langmuir.

$$\Delta n = \Delta n_{\max} \cdot \frac{K \cdot C}{1 + K \cdot C} \quad (9.1)$$

où K est la constante d'affinité, C la concentration d'anti-BSA en solution, Δn_{\max} la variation d'indice de réfraction correspondant à la monocouche et Δn la variation d'indice de réfraction mesurée.

La figure 9.7 rassemble les variations finales d'indice de réfraction mesurées pour des concentrations C en anticorps allant de 0,001 g/L à 0,1 g/L. Cette variation d'indice Δn correspond à la différence des indices de réfraction mesurés avant et après détection de l'anti-BSA, toujours dans le PBS, milieu de référence également utilisé pour la préparation des solutions et le rinçage de la fibre. Le tracé de $\frac{C}{\Delta n}$ en fonction de C permet d'obtenir l'expression du modèle de Langmuir sous sa forme linéaire.

$$\frac{C}{\Delta n} = \frac{1}{\Delta n_{\max}} \cdot C + \frac{1}{K \cdot \Delta n_{\max}} \quad (9.2)$$

La figure 9.8 correspondant à la forme linéaire du modèle de Langmuir est une droite de coefficient de corrélation proche de 1 (0,985). À nouveau, le modèle de Langmuir est donc adapté pour décrire la détection d'anti-BSA sur une surface biofonctionnalisée par la BSA biotinylée. Après avoir déterminé l'équation de cette droite de Langmuir, les valeurs des paramètres Δn_{\max} et K obtenues sont les suivantes :

$$\Delta n_{\max} = 0,00134 \text{ et } K = 86,4 \text{ L/g}$$

9.2.3 Performances du biocapteur « covalent-extravidine-biotine »

Comme dans le cas des biocapteurs « tout électrostatique » et « électrostatique-extravidine-biotine », le bon accord entre le modèle de Langmuir et l'expérience (cf. fig. 9.7) indique

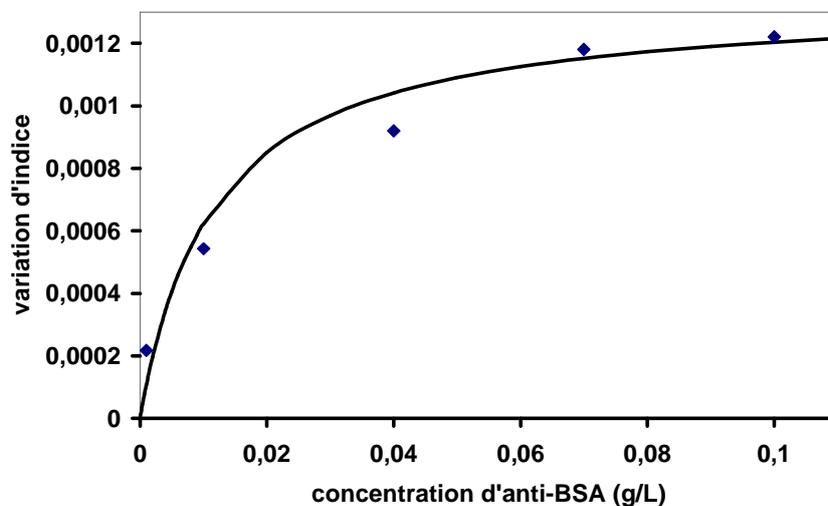


Figure 9.7: Variation de l'indice de réfraction mesuré pour différentes concentrations en anti-BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.

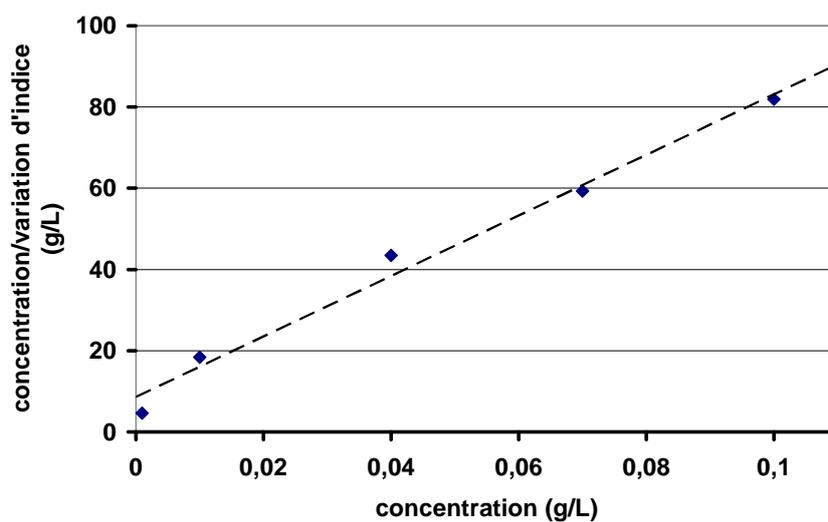


Figure 9.8: Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.

que la réaction spécifique de l'anti-BSA sur la BSA biotinylée coïncide avec une occupation progressive des sites disponibles jusqu'à formation d'une monocouche d'anticorps à l'interface entre la surface biofonctionnalisée et le milieu dans lequel plonge la fibre. Partant de cette hypothèse, il est possible de calculer la sensibilité du biocapteur afin de convertir les variations d'indice de réfraction mesurées en concentrations surfaciques d'anti-BSA ayant réagi sur la surface.

La variation d'indice de réfraction maximale Δn_{max} déterminée grâce au modèle de Langmuir correspondant à la formation d'une monocouche d'anti-BSA de densité surfacique $\sigma_{max} = 1700 \text{ pg/mm}^2$, la sensibilité du biocapteur « covalent-extravidine-biotine » s'en déduit directement :

$$S = \frac{\Delta n_{max}}{\sigma_{max}} = 0,788 \cdot 10^{-6} \text{ u.i.r.} \cdot \text{mm}^2/\text{pg} \quad (9.3)$$

La figure 9.9 correspond à la conversion des valeurs de variation d'indice de réfraction mesurée en densité surfacique. Connaissant la sensibilité du biocapteur, il est désormais possible d'en déduire sa limite de détection σ_{lim} correspondant à la résolution $R = 10^{-5}$ du réfractomètre à réseau de Bragg à traits inclinés.

$$\sigma_{lim} = \frac{R}{S} = 130 \text{ pg/mm}^2 \quad (9.4)$$

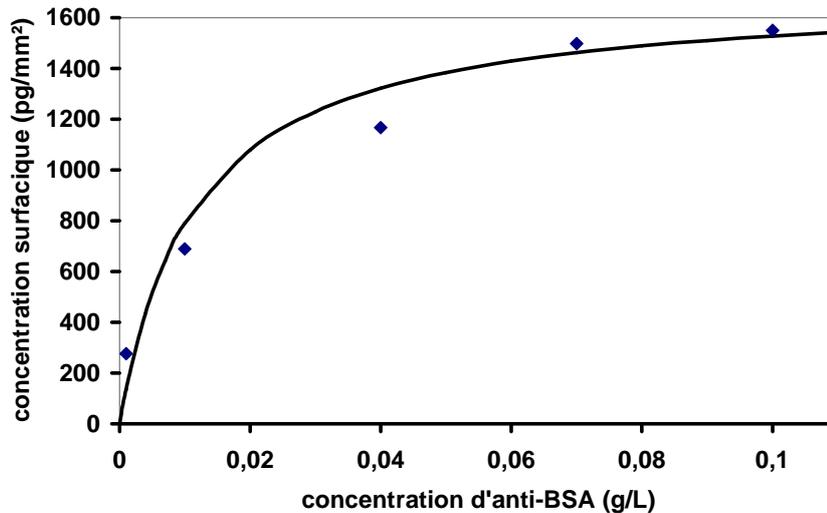


Figure 9.9: Concentration surfacique d'anticorps ayant réagi pour différentes concentrations d'anti-BSA en solution. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.

9.2.4 Comparaison des biocapteurs « tout électrostatique », « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine »

Afin de faciliter leur comparaison et de donner une vue d'ensemble, le tableau récapitulatif 9.1 rassemble les valeurs des paramètres caractéristiques des biocapteurs « tout électrosta-

biocapteurs	tout électrostatique	électrostatique-extravidine-biotine	covalent-extravidine-biotine
Δn_{max}	0,00142	0,00136	0,00134
S (10^{-6} u.r.i. \cdot mm ² /pg)	0,835	0,800	0,788
σ_{lim} (pg/mm ²)	120	125	130
K (L/g)	13,5	61,5	86,4
C_{lim} (μ g/L)	525	120	87

Tableau 9.1: Récapitulatif des paramètres résultant du modèle de Langmuir appliqué aux biocapteurs « tout électrostatique », « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine ».

tique », « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine ». Une fois encore, la valeur de Δn_{max} déterminée grâce au modèle de Langmuir dans le cas du biocapteur « covalent-extravidine-biotine » est très proche de celles obtenues dans les configurations « tout électrostatique » et « électrostatique-extravidine-biotine ». Ce constat tend à confirmer l'hypothèse d'une densité de sites de reconnaissance disponibles pour l'anti-BSA équivalente dans les trois cas, ce qui se traduit par des valeurs de sensibilité et de limite de détection équivalentes : la sensibilité est stable d'un biocapteur à l'autre.

La constante d'affinité K , représentative de l'activité biologique des protéines immobilisées en surface de la gaine optique, est proche de la valeur obtenue dans le cas du biocapteur « électrostatique-extravidine-biotine ». Cela étant, la répétition des protocoles de biofonctionnalisation « tout électrostatique » et « électrostatique-extravidine-biotine » a permis de montrer que la variabilité du facteur K d'une expérience à l'autre peut être très importante : nous avons calculé un écart type de l'ordre de 20 sur la valeur du paramètre K . En effet, outre l'influence de la méthode d'immobilisation de la BSA sur la surface de la gaine optique d'un réseau de Bragg en angle, l'activité biologique de la protéine sonde peut être affectée par un grand nombre de paramètres telles que la température (les protéines sont conservées au réfrigérateur ou au congélateur), l'âge de la protéine (plus le flacon est ancien, plus les risques de dénaturation sont importants) ou des contaminations (lors du prélèvement dans le flacon, verrerie mal nettoyée, etc.) qui peuvent varier d'une expérience à l'autre. Les molécules biologiques sont en effet très sensibles.

Ces expériences répétées ont permis de montrer que la différence entre les protocoles avec et sans médiation de l'extravidine était significative. L'éventuelle mise en évidence de différences entre les protocoles « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine » demanderait de répéter les expériences un très grand nombre de fois pour être confirmée, ce qui n'était pas l'objet des travaux présentés dans ce manuscrit. Néanmoins, les résultats obtenus sur la valeur de la constante d'affinité K permettent de confirmer l'hypothèse de départ selon laquelle la protéine sonde (BSA) est mieux orientée et/ou son intégrité mieux conservée lorsqu'elle est greffée sur la surface par l'intermédiaire de l'affinité avidine-biotine. La concentration limite d'anti-BSA présente en solution C_{lim} étant inversement proportionnelle à la constante d'affinité K , cette activité accrue des sondes adsorbées par l'intermédiaire d'une

fragment de biotine se traduit par une augmentation de la reconnaissance anticorps-antigène à faible concentration.

$$C_{lim} = \frac{1}{K} \cdot \frac{R}{\Delta n_{max} - R} = 87 \mu\text{g/L} \quad (9.5)$$

Finalement, pour des concentrations surfaciques limites σ_{lim} équivalentes, les biocapteurs « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine » basés sur la médiation de l'affinité avidine-biotine sont potentiellement capables de détecter la biomolécule cible (l'anti-BSA) présente en solution à des concentrations plus faibles que dans la configuration « tout électrostatique ». En outre, le biocapteur « covalent-extravidine-biotine » présente un avantage supplémentaire : l'utilisation de liaisons covalentes garantit une plus grande stabilité du biofilm qui est à la base de la conception d'un capteur biospécifique.

9.2.5 Mesure expérimentale de la concentration limite

Des expériences visant à démontrer que la concentration limite théorique pouvait être dépassée en utilisant le système de mesure BraggLight développé au laboratoire ont été menées sur un biocapteur élaboré à partir du protocole de fonctionnalisation « électrostatique-extravidine-biotine ». Rappelons que la concentration limite prédite par la théorie est de l'ordre de 100 microgrammes d'anticorps par litre de solution, ce qui correspond à 10^{-4} g/L. Avec le système BraggLight, des anticorps en solution à 10^{-5} g/L ont pu être détectés à plusieurs reprises et un essai concluant 10^{-6} g/L a été réalisé. Il reste encore à optimiser les temps d'incubation qui jouent un rôle très important dans le cas de réaction à très faible concentration car les cinétiques de réaction sont très lentes. Néanmoins, ces résultats ont permis de confirmer la grande sensibilité de notre système BraggLight qui présente de plus les avantages de la simplicité d'utilisation et de la portabilité. Ces qualités intrinsèques du système sont par ailleurs non négligeables dans le cas d'un système destiné à la réalisation de mesures de terrain par un personnel éventuellement peu qualifié.

Les résultats en termes de concentration limite sont prometteurs et n'auraient certainement pas pu être obtenus sans la mise au point de la méthode de mesure basée sur l'exploitation du premier harmonique de la transformée de Fourier de la réponse spectrale du réseau de Bragg en angle. Il est désormais possible d'atteindre la cadence de mesure maximale du système, soit 200 Hz. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que ce système fonctionne en réflexion, ce qui ne pose aucun problème dans le cas de réseaux de Bragg en angle puisque ces derniers peuvent aussi bien être utilisés en transmission (c'est le cas du dispositif de mesure utilisé pour toutes les autres expérimentations) qu'avec un miroir réflecteur en extrémité de fibre. En revanche, précisons en complément que dans le cas de réseaux de Bragg à pas long (*Long Period Grating*, LPG) qui ne peuvent être utilisés qu'en transmission, cette dernière configuration risque de poser problème. En effet, un réseau à pas long étant uniforme, il risque de former, avec le miroir réflecteur en bout de fibre, une cavité résonante. Aussi ce phénomène interdit-il l'utilisation du système BraggLight avec de tels réseaux, pourtant déjà utilisés dans certains travaux pour des applications de biodétection.

9.3 Limitations, discussion et perspectives

Le protocole de biofonctionnalisation reposant sur le couplage d'une fonctionnalisation covalente du substrat de silice à l'affinité extravidine-biotine a permis d'obtenir des résultats très encourageants en terme de détection de molécules biologiques tels que des anticorps. La faisabilité d'un capteur biosélectif basé sur la technologie des réseaux de Bragg à traits inclinés est désormais établie. Néanmoins, un certain nombre d'améliorations restent encore à apporter avant que ce type de biocapteur devienne vraiment intéressant d'un point de vue applicatif.

9.3.1 Sensibilité de l'acide polyacrylique vis-à-vis des variations de pH

L'acide polyacrylique a été choisi pour la fonctionnalisation covalente du substrat de silice car il présente au moins deux avantages :

- (i) il est soluble dans l'eau ;
- (ii) il possède des groupes fonctionnels carboxyles COOH qui peuvent être utilisés pour le couplage covalent d'une protéine.

D'autre part, sa nature de polyélectrolytes faibles lui confère des propriétés de sensibilité vis-à-vis des variations de pH. Cette sensibilité se manifeste par des variations de conformation des molécules d'acide polyacrylique en fonction du pH. À pH faible, les sites carboxyles sont majoritairement sous leur forme COOH. Les molécules d'acide polyacrylique sont alors très peu chargées et se présentent sous la forme de « pelotes ». Lorsque le pH augmente, le nombre de groupes carboxyles protonnés diminue et les charges négatives des sites COO⁻ qui apparaissent tendent à « déplier » les chaînes polymères car les charges de même signe se repoussent. Or, l'indice de réfraction mesuré par le réfractomètre à réseau de Bragg en angle dépend à la fois de la densité et de l'épaisseur de couches. Le phénomène de contraction-dilatation des chaînes polymère en fonction du pH de la solution dans laquelle est plongée la fibre se manifeste donc par des variations de l'indice de réfraction mesuré en fonction du pH. La figure 9.10 montre que cette variation est linéaire. Cette courbe de sensibilité est établie en trempant la fibre dans de l'eau-ultra pure dont le pH est ajusté par adjonction d'acide chlorhydrique ou de soude. Aussi un réfractomètre à réseau de Bragg en angle fonctionnalisé par l'acide polyacrylique constitue-t-il un bon capteur de pH. Néanmoins, lorsque l'application recherchée est la mise au point d'un biocapteur, cette propriété peut devenir gênante, notamment lorsque la régénération de la couche de protéine sonde doit être réalisée en milieu acide.

L'affinité liée à la reconnaissance antigène-anticorps est forte mais cette liaison spécifique peut être rompue sous l'action d'une solution de glycine à 0,1 mol/L dont le pH est ajusté à 2,1 par ajout d'acide chlorhydrique concentré. Cette méthode de régénération avait bien fonctionné dans le cas du biocapteur « tout électrostatique ». Malheureusement, le phénomène de contraction des chaînes polymères semble être à l'origine d'un « emprisonnement »

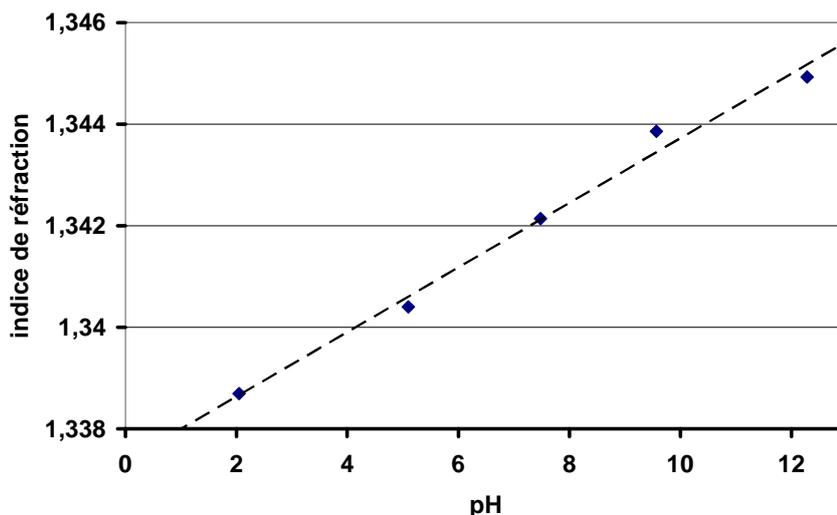


Figure 9.10: Courbe de sensibilité de la couche d'acide polyacrylique vis-à-vis des variations de pH. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et les pointillés à la droite de régression linéaire.

des molécules biologiques. Très peu d'anticorps sont alors susceptibles d'être libérés sous l'effet de la solution de glycine. Le biocapteur n'est donc pas régénérable.

9.3.2 Choix d'un domaine d'application

Les résultats prometteurs obtenus dans le cadre de l'étude menée sur le couple BSA / anti-BSA permettent de valider le concept de biocapteur mettant en œuvre la technologie des réfractomètres à réseaux de Bragg en angle. Ils ouvrent également la voie à de nouveaux champs d'investigation et d'exploitation. Ce type de capteur biospécifique pourrait notamment être modifié et mis à profit pour satisfaire la demande des professionnels du contrôle phytosanitaire des eaux concernant le développement de techniques peu coûteuses d'analyse rapides et en temps réel également faciles à mettre en œuvre sur les sites. Par exemple, ces applications pourraient avoir pour but de répondre aux objectifs fixés par la nouvelle réglementation européenne (directive cadre sur l'eau : adoptée en 2000, applicable dès 2015) qui impose de faire un état des lieux de tous les milieux aquatiques et vise à assurer la préservation des écosystèmes aquatiques.

Les produits phytosanitaires, utilisés pour combattre toutes espèces nuisibles ou concurrençant les cultures, sont apportés dans l'environnement par les grandes cultures, le maraîchage agricole, les traitements en zone urbaine (espaces verts, jardins, trottoirs, rues), etc. L'eau est le principal vecteur de migration de ces produits. Si le principe de la dose juste au bon moment n'est pas respecté et si les sols n'ont pas une capacité de rétention suffisante, ces derniers peuvent être entraînés par les eaux pluviales vers les cours d'eau et les nappes d'eau souterraines. Les herbicides font partie des contaminants les plus fréquemment détectés dans les eaux souterraines et superficielles contaminées, parmi lesquels l'atrazine (cf. fig. 9.11) est souvent retrouvée. L'atrazine, introduit en France au début des années 60 en raison de son

faible coût, est un herbicide utilisé pour la culture du maïs. Son utilisation excessive est à l'origine de cette contamination dans la plupart des eaux naturelles des régions présentant une forte activité agricole. Ses possibles effets toxicologiques sur l'environnement et la santé humaine (effet cancérigène) font de la détection de cet herbicide un enjeu de santé publique. Actuellement, le moyen le plus sûr de garder un contrôle sur cette pollution est de procéder à de multiples analyses afin d'isoler les endroits contaminés.

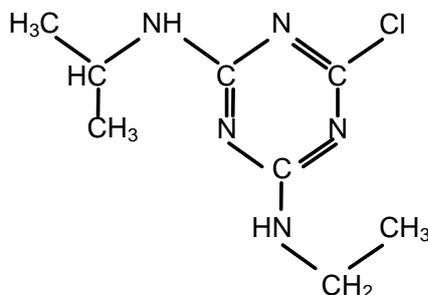


Figure 9.11: Formule chimique de l'atrazine.

Les techniques traditionnelles telles que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide et l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse sont déjà utilisées pour l'identification et la détection de ces substances. Relativement sensibles, ces techniques présentent néanmoins certains inconvénients. Non seulement elles requièrent un équipement volumineux mais nécessitent également une main d'œuvre qualifiée. Dans un souci de contrôles fréquents, la mise en place d'un suivi par réflectométrie à réseau de Bragg en angle pourrait permettre d'améliorer la gestion des ressources en eau.

Cependant, il existe une différence fondamentale entre l'atrazine et un anticorps qui se situe au niveau de la taille de la molécule. Les anticorps ont une masse molaire élevée, de l'ordre de 150000 g/mol. Celle de l'atrazine (215 g/L) est sept cents fois inférieure. Or, la variation d'indice engendrée par la détection d'une grosse molécule est beaucoup plus significative que celle résultant de la fixation d'une plus petite car elle est *a priori* proportionnelle à la masse des molécules. Afin d'être capable de détecter l'atrazine à de très faibles concentrations et ainsi satisfaire les normes européennes en vigueur qui placent le seuil d'alerte à 0,1 $\mu\text{g/L}$, il semble indispensable de mettre au point de nouvelles stratégies de biofonctionnalisation.

9.3.3 Exemple de stratégie adaptée à la détection de très petites molécules : détection par voie indirecte.

La voie directe de détection d'un antigène (par exemple l'atrazine) consiste à immobiliser l'anticorps correspondant (dans ce cas l'anti-atrazine) à la surface du capteur pour détecter, *via* les mécanismes de reconnaissance spécifique, la présence de la molécule cible. La voie indirecte exploite aussi ces mécanismes de reconnaissance spécifique. Elle repose sur l'inhibition, en présence de molécules cibles en solution, de la réaction immunologique entre un complexe molécule cible – protéine de liaison, immobilisé en surface par l'intermédiaire

de la protéine de liaison, et la biomolécule sonde injecté en solution à concentration connue (cf. fig. 9.12). En d'autres termes, les anticorps sont injectés en concentration connue et constante dans l'échantillon à analyser. Ils réagissent alors préférentiellement avec l'atrazine libre et seul les anticorps qui n'ont pas pu réagir avec cette dernière peuvent venir se fixer sur la surface biofonctionnalisée par le complexe atrazine-BSA. Cet évènement se traduit alors par des variations d'indice de réfraction mesurables par réfractométrie à réseau de Bragg en angle [Příbyl 2003]. Le signal détecté est donc inversement proportionnel à la quantité d'atrazine présente dans l'échantillon à analyser.

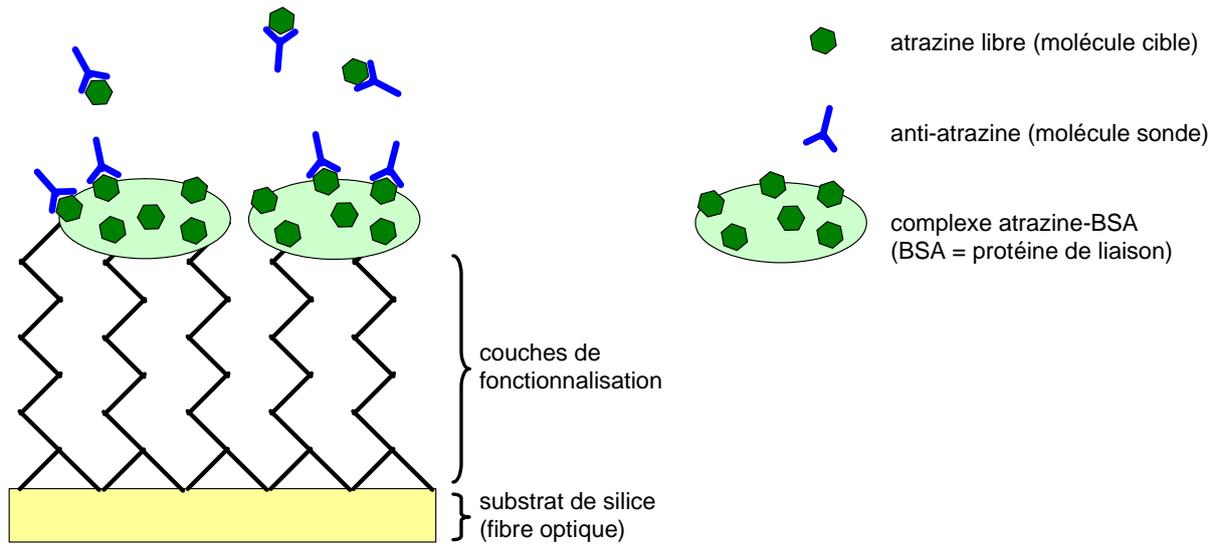


Figure 9.12: Schéma d'un biocapteur permettant la détection d'atrazine en solution par voie indirecte. L'anti-atrazine immobilisée sur le complexe atrazine-BSA se détache dès lors que de l'atrazine libre est présente en solution.

La configuration de biocapteur basé sur l'exploitation de deux réactions compétitives (réaction de l'anti-atrazine avec le complexe atrazine-BSA ou l'atrazine libre) permet de se placer dans des conditions de détection équivalentes à celles étudiées dans ce manuscrit puisque l'évènement détecté correspond à l'accrochage (ou l'absence d'accrochage) d'une grosse molécule, l'anti-atrazine (tous les anticorps ont sensiblement la même masse molaire, soit environ 150 000 g/mol). Par ailleurs, sachant que la masse molaire de l'atrazine est sept cents fois moins importante que celle d'un anticorps, il est aisé de calculer par une simple règle de trois la concentration d'anticorps correspondant au seuil d'alerte de 0,1 $\mu\text{g/L}$. En effet, si l'anti-atrazine est ajouté dans l'échantillon à analyser à hauteur de 70 $\mu\text{g/L}$, aucun anticorps ne sera détecté dès lors que le seuil d'alerte est atteint ou dépassé car ils auront tous réagi avec l'atrazine libre en solution. Enfin, pour des concentrations en atrazine inférieures au seuil d'alerte, les résultats obtenus avec le système BraggLight illustrent la capacité des biocapteurs réalisés à détecter quantitativement la présence d'anticorps dans la gamme 1 $\mu\text{g/L}$ à 70 $\mu\text{g/L}$, ce qui rend plausible l'hypothèse d'une détection quantitative d'atrazine libre en solution. Cette méthode de détection indirecte semble donc adaptée au problème de l'atrazine puisqu'elle permet d'utiliser les biocapteurs développés au cours de ces travaux sur une partie de leur plage de sensibilité.

Chapitre 10

Conclusion et Perspectives

Avant d'introduire des perspectives pour les travaux futurs, nous ferons un résumé des principaux points traités et des résultats acquis pendant cette thèse.

10.1 Conclusion générale

La préservation des milieux aquatiques et des ressources en eau de la planète nécessite de disposer d'outils de mesure permettant leur surveillance *in situ* et en continu. À vocation majoritairement expérimentale, ce travail présente notre contribution aux recherches sur le développement de biocapteurs potentiellement capables de mettre en évidence la présence d'espèces chimiques recherchées dans ces milieux telles que des résidus de pesticides comme l'atrazine. Par leur caractère pluridisciplinaire, ces recherches suscitent une collaboration entre chercheurs venus de divers horizons et ont pour but l'étude des interactions biomoléculaires. C'est dans ce cadre que se situe cette thèse, à la charnière entre l'optique, la chimie et la biologie.

Le principe de ce nouveau type de capteur repose sur la détection des variations d'indices de réfraction de la couche contenant l'espèce de reconnaissance. Il s'agit donc d'établir une relation entre les signaux optiques mesurés et les réactions biologiques de surface afin de concevoir un biocapteur adapté à la détection de molécules en milieux aqueux.

L'utilisation de fibres optiques à réseaux de Bragg en angle comme transducteur offre ainsi de nombreux avantages. Tout d'abord, les biocapteurs basés sur cette technologie font appel à un équipement simple d'utilisation qui ne nécessite pas l'intervention de personnes qualifiées. De plus, à la différence des appareils de tests classiques, les biocapteurs reposant sur la technologie des réseaux de Bragg en angle fibrés permettent d'offrir un moyen de détection rapide et sans marqueur. Enfin, l'équipement associé déjà compact est miniaturisable et donc aisément transportable.

10.1.1 Développement des biocapteurs à réseaux de Bragg en angle

L'étape de développement a permis de mettre au point un biocapteur fibré à réseau de Bragg en angle utilisant le modèle de détection fondé sur l'interaction spécifique anticorps-antigène. La biofonctionnalisation est une étape clé pour la réalisation d'un biocapteur et l'obtention de bonnes performances analytiques. Trois procédures de biofonctionnalisation de la surface de silice d'une fibre optique ont été étudiées par réflectométrie à réseau de Bragg en angle.

Les premiers résultats ont été obtenus par formation d'une multicouche de polyélectrolytes sur la gaine optique d'une fibre à réseau de Bragg en angle. Cette étape permet d'isoler l'antigène (biomolécule sonde) de la silice. L'immobilisation des sondes sur la multicouche résulte des interactions électrostatiques qui existent entre une surface (la multicouche) et des molécules (l'antigène) en solution de charges opposées. L'établissement de ce premier protocole nous a permis d'optimiser les paramètres physiques tels que la masse molaire des polyélectrolytes utilisés et l'épaisseur de la multicouche qui détermine le point de fonctionnement du biocapteur. Par la suite, ces résultats ont été utilisés pour se placer dans la zone de réponse linéaire du biocapteur et à un point de fonctionnement auquel la dynamique de mesure et la sensibilité en termes de variations d'indice de réfraction sont optimales.

Motivés par le besoin de proposer un protocole facilement adaptable à n'importe quel type de biorécepteur, nous avons mis au point un second protocole de biofonctionnalisation. Dans ce cas, l'immobilisation de la biomolécule sonde est assurée par une couche intermédiaire d'extravidine adsorbée par interactions électrostatiques sur la multicouche de polyélectrolytes précédemment décrite. La très grande affinité de l'extravidine pour la biotine permet alors de relier n'importe quel biorécepteur à condition que ce dernier soit biotinylé.

Enfin, un dernier protocole de biofonctionnalisation a été développé, avec pour fondement les résultats obtenus avec le second. L'objectif visé était l'augmentation de la stabilité à moyen et long termes des biofilms déposés sur la surface de la gaine optique des fibres optiques à réseaux de Bragg en angle : ce protocole repose donc sur la formation de liaisons de forte énergie telles que le couplage covalent et l'affinité avidine-biotine.

10.1.2 Détection de biomolécules cibles

Après avoir optimisé les différents protocoles de biofonctionnalisation, des essais de détection ont été réalisés afin d'étudier la réponse du biocapteur en présence de biomolécules cibles. Les premiers résultats ont montré que non seulement nos biocapteurs à réseaux de Bragg en angle étaient capables de détecter la présence de biomolécules cibles en solution mais également que cette réponse était proportionnelle à leur concentration.

Une analyse basée sur le modèle de Langmuir a permis d'établir l'équation de la courbe donnant la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en biomolécules cibles. Les paramètres des courbes établies pour chacun des trois protocoles nous ont amené à tirer les conclusions suivantes :

- (i) le seuil de saturation des biocapteurs ne dépend pas de la méthode de biofonctionnalisation employée, ce qui signifie que la densité de sites pouvant assurer la détection des biomolécules cibles est équivalente dans les trois configurations testées,
- (ii) les capteurs d'indice à réseaux de Bragg en angle sont suffisamment sensibles pour démontrer l'intérêt de la médiation de l'affinité avidine-biotine sur le gain d'activité biologique des biorécepteurs,
- (iii) le point de fonctionnement, déterminé par l'épaisseur de l'ensemble des couches de biofonctionnalisation, est un des points clés de la réalisation d'un biocapteur fondé sur la technologie des réseaux de Bragg en angle. La démarche permettant d'optimiser ce point de fonctionnement a été établie.

Ces travaux sont également à l'origine de la mise au point d'une nouvelle méthode de mesure des variations d'indice de réfraction, basée sur l'évaluation du maximum de fréquence associé au premier harmonique de la transformée de Fourier du spectre de transmission des réseaux de Bragg en angle. Plus rapide, ce nouveau traitement du signal des variations spectrales a permis de développer un système de mesure capable de réaliser les acquisitions avec une cadence pouvant atteindre 200 hertz. Il a ainsi été possible d'augmenter la résolution en termes de variations d'indice de réfraction d'un facteur 10. C'est avec ce tout nouveau système optoélectronique que les limites de détection déterminées de manière théorique ont pu être vérifiées expérimentalement.

10.2 Perspectives de recherches

Suite aux conclusions énoncées ci-dessus, de nouvelles perspectives de recherches sont apparues.

10.2.1 Etude de nouveaux biorécepteurs et adaptation du mode de détection

L'immobilisation d'un antigène (la BSA) et l'utilisation du couple BSA / anti-BSA comme modèle de reconnaissance spécifique de type anticorps-antigène a permis d'obtenir de premiers résultats encourageants. Cette technique nécessite néanmoins de nouvelles optimisations afin, par exemple, d'adapter le modèle de biocapteur à réseau de Bragg en angle à la détection de pesticides dans les milieux aquatiques.

La différence majeure entre le modèle étudié et l'application visée réside dans la masse des molécules : les pesticides tels que l'atrazine ont généralement une masse beaucoup plus faible que celle des anticorps, utilisés dans ce modèle comme biomolécule cible. Aussi les modifications d'indice de réfraction de la couche contenant l'espèce de reconnaissance par détection directe de la fixation d'une biomolécule cible de masse faible risque-t-elle d'être insuffisante pour atteindre les seuils de détection fixés par la nouvelle législation (directive

cadre sur l'eau : adoptée en 2000, applicable dès 2015). Une adaptation du mode de détection est donc nécessaire.

Une solution consiste à remplacer la détection directe de l'accrochage d'une petite molécule cible par une détection indirecte, fondée sur des réactions compétitives mettant en jeu la petite molécule cible et une grosse molécule sonde, ajoutée en concentration connue dans l'échantillon à analyser. L'absence d'accrochage des sondes résulte alors de la présence de molécules cibles en solution. Comme les anticorps sont des biorécepteurs particulièrement adaptés pour la détection spécifique de pesticides tels que l'atrazine, ils constituent des candidats idéaux pour l'application de ce nouveau type de protocole de biofonctionnalisation. Tous les anticorps ayant à peu près la même masse molaire, la dynamique de mesure et la sensibilité des biocapteurs conçus de cette façon devraient être du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le modèle BSA / anti-BSA développé dans ces travaux.

Enfin, les biocapteurs développés pour la détection de pesticides dans les milieux aquatiques pourraient être utilisés comme outils d'alarme précoce car la concentration d'anticorps correspondant au seuil d'alerte de $0,1 \mu\text{g/L}$ est suffisamment élevée ($70 \mu\text{g/L}$) pour permettre de donner une information rapide et sans ambiguïté. La surveillance de ces milieux en continu nécessite tout de même la mise au point d'un prototype associant un système de prélèvement d'échantillons, une série de biocapteurs à réseaux de Bragg en angle ainsi qu'un système informatique de collecte et d'envoi des données. Toutefois, l'utilisation sur site des biocapteurs nécessite encore un certain nombre de travaux car la présence d'espèces toxiques pour les anticorps de détection dans les milieux naturels pourrait poser certains problèmes (activité biologique des anticorps réduite). Il est donc nécessaire d'étudier l'influence du temps d'incubation d'un biocapteur dans des échantillons issus de milieux aquatiques naturels sur le niveau d'activité des anticorps.

10.2.2 Evolution vers l'utilisation de fibre microstructurées

Au-delà, la mise au point de techniques de biofonctionnalisation satisfaisantes dans le cadre de fibres optiques classiques à réseaux de Bragg en angle est destinée à être appliquée à un autre type de fibres optiques, les fibres optiques à cristal photonique ou microstructurées. En effet, dans ce nouveau type de fibres optiques, la gaine est parcourue longitudinalement par des canaux continus pouvant mesurer jusqu'à quelques dizaines de microns de diamètre et au sein desquels peuvent circuler des fluides. De plus, si un réseau de Bragg est inscrit dans le cœur de la fibre, ce composant devient sensible aux variations d'indice du fluide qui circule à l'intérieur de ses canaux. Dans le cas de la fibre à trois trous développée précédemment au laboratoire en collaboration avec le CNRS, cette sensibilité est même supérieure d'un ordre de grandeur à celle obtenue dans des fibres classiques, même avec des réseaux de Bragg en angle [Phan Huy 2007]. Ainsi, la biofonctionnalisation des canaux d'une fibre microstructurée, dans le cœur de laquelle serait inscrit un réseau de Bragg, permettrait la détection d'une molécule spécifique dans un échantillon de volume très faible, typiquement quelques microlitres.

Le verrou technologique que constitue la mise en place d'un système de microfluidique permettant à la fois d'injecter et de retirer des fluides dans des canaux ne dépassant pas $50\ \mu\text{m}$ de diamètre n'a pas encore été complètement levé. Des travaux dans ce sens ont été menés au cours de la présente thèse. Les systèmes de microfluidique mis en place permettent de faire circuler des fluides d'un bout à l'autre d'un tronçon de fibre, comme dans un microcapillaire. En revanche, il n'est pas possible de suivre les évolutions en temps réel : ses deux extrémités étant utilisées pour la circulation des fluides, la fibre optique ne peut pas être connectée à nos systèmes de mesure spectrale, ce qui interdit le suivi en temps réel. Des travaux restent donc à réaliser dans ce domaine pour rendre effective l'utilisation de fibres microstructurées à réseau de Bragg en angle pour la réalisation de biocapteurs. Naturellement, la biofonctionnalisation de la paroi des microcanaux est également un enjeu technologique à relever pour parvenir à cet objectif. Des essais réalisés sur une fibre capillaire, dont le trou central fait seulement $10\ \mu\text{m}$ de diamètre, avec de la BSA fluorescente et un protocole de biofonctionnalisation en trois étapes (greffages covalents successifs d'un silane, du glutaraldéhyde et enfin de la protéine) ont néanmoins permis de montrer la faisabilité d'une biofonctionnalisation des microcanaux. En effet, comme le montre la figure 10.1, seule la paroi du microcanal central fluoresce, ce qui témoigne de la présence de BSA fluorescente sur sa surface.

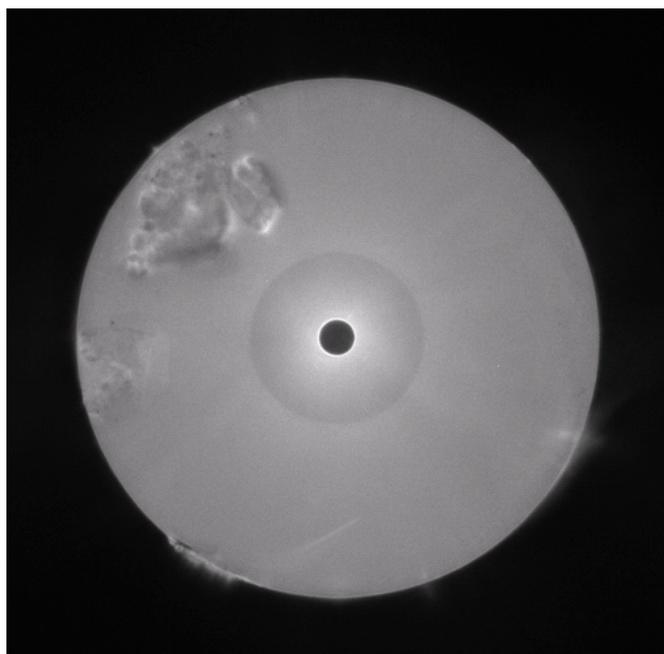


Figure 10.1: Image en coupe d'une fibre capillaire dont le microcanal central ($10\ \mu\text{m}$ de diamètre) est biofonctionnalisé par de la BSA fluorescente.

Autrefois, l'apanage de groupes écologistes extrémistes, les préoccupations environnementales sont aujourd'hui devenues l'affaire de tous. Notre travail s'est inscrit dans cette vision de l'avenir, visant à démontrer comment les fibres optiques à réseaux de Bragg en angle pouvaient contribuer à répondre aux exigences réglementaires relatives à la qualité des ressources en eau de la planète. Des pistes de recherche qui paraissent importantes pour la suite ont également été identifiées. Enfin, les études entreprises dans le cadre de cette thèse ont permis

d'acquérir les connaissances nécessaires et une vision d'ensemble du domaine extrêmement pluridisciplinaire qu'est celui des biocapteurs pour mener à bien la poursuite de ces travaux de recherche. Au delà, il nous semble de plus en plus évident que c'est de travaux vraiment innovants et se démarquant de ce que mènent les autres équipes que peuvent émerger de telles synergies disciplinaires. Aussi une telle utilisation croisée des connaissances ne peut-elle être que profitable aux équipes, à l'innovation et à ses retombées applicatives.

Table des figures

2.1	Fibre optique composée d'un cœur d'indice de réfraction n_c entouré d'une gaine optique d'indice n_g , puis d'une gaine mécanique protectrice.	8
2.2	Schéma d'une fibre optique à saut d'indice. Pour que les rayons lumineux subissent une réflexion totale à l'interface cœur-gaine, l'indice de cœur n_c doit être supérieur à celui de la gaine n_g	9
2.3	Représentation schématique d'une section de fibre microstructurée.	12
2.4	Schéma-bloc de fonctionnement d'un capteur à fibre optique.	14
2.5	Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un réseau de Bragg à pas uniforme Λ inscrit dans le cœur d'une fibre optique ainsi que ses réponses en transmission et en réflexion.	17
2.6	Inscription d'un réseau par la méthode interférométrique transverse. Le pas du réseau Λ est égal à l'interfrange de la figure d'interférences, réglée en changeant l'angle θ entre les deux demis faisceaux.	19
2.7	Inscription d'un réseau par la méthode du masque de phase. Le pas du réseau Λ est égal à l'interfrange de la figure d'interférences, soit la moitié du pas d du masque de phase.	20
2.8	Diffraction de la lumière par un réseau à pas Λ court (a) ou long (b).	22
2.9	Couplage du mode fondamental co-propagatif avec le mode fondamental contra-propagatif, induit par un réseau de Bragg à traits droits inscrit dans une fibre monomode.	22
2.10	Couplage induit par un réseau de Bragg uniforme à pas long entre un mode guidé et un mode de gaine co-propagatif.	23
2.11	Couplage induit par un réseau de Bragg à pas court et à traits inclinés entre le mode fondamental guidé et un mode de gaine contra-propagatif.	24
2.12	Photographie d'une fibre microstructurée développée au Laboratoire de mesures optiques constituée d'une couronne de trois trous.	27

2.13	Spectres de transmission d'un réseau blazé pour deux valeurs d'indice de réfraction du milieu extérieur, dans l'air et dans l'eau.	28
3.1	Schéma de la structure d'un anticorps	33
3.2	Réactions enzymatiques en cascade conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène dans un détecteur ampérométrique de créatinine.	37
3.3	Schéma d'un détecteur acoustique à microbalance piézoélectrique.	40
3.4	Schéma d'une cellule de mesure pour ellipsométrie en milieu liquide.	42
3.5	L'onde incidente (Σ_i), totalement réfléchie (Σ_r) à l'interface des deux milieux, donne naissance à une onde évanescente, confinée sur une profondeur ΔZ_c	43
3.6	Propagation d'une onde lumineuse dans un guide d'onde d'épaisseur e . Le milieu couvrant est biofonctionnalisé.	44
3.7	Biocapteur à miroir résonant. Le faisceau incident polarisé à 45 degrés du plan d'incidence est couplé à un guide d'onde par l'intermédiaire d'un prisme. Si l'angle d'incidence ne correspond pas à l'angle de résonance TE ou TM, le faisceau est totalement réfléchi sur le prisme (rayon en pointillés). Dans le cas contraire, une des deux composantes se propage dans le guide avant d'être réfléchie (rayons en traits pleins), ce qui se traduit par un retard de phase de cette composante.	45
3.8	Excitation des plasmons de surface par un prisme de verre recouvert d'une couche mince métallique (configuration de Kretschmann). La résonance d'un plasmon de surface a lieu à l'interface métal / milieu biologique (diélectrique), pour un certain angle d'incidence Φ du faisceau incident.	46
3.9	Exemples de biocapteurs fibrés à ondes évanescentes. Fibres dénudés sur une certaine longueur (a) ou en extrémité (b), fibre effilée (c) et fibre polie (d) pour dégager une zone sensible à proximité du cœur.	49
3.10	Photographies de la section d'une fibre microstructurée constituée d'une couronne de six trous.	52
4.1	Schéma de principe de la biofonctionnalisation indirecte du substrat.	56
4.2	Schéma simplifié du principe de construction d'une multicouche de polyelectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions et par répétition cyclique des deux étapes représentées.	57
4.3	Représentation schématique du modèle des trois zones d'un film à croissance linéaire.	58
4.4	Pont siloxane (a) et groupe silanol (b), présents sur les surfaces de silice.	62

4.5	Schéma d'une réaction de silanisation. Les silanols en surface réagissent avec un organosilane trifonctionnel où EtO est le groupement fonctionnel pouvant réagir avec les silanol et R le groupement organique à fixer.	62
4.6	Polymérisation d'un organosilane trifonctionnel en présence de molécules d'eau. .	63
4.7	Réaction d'hydrolyse de l'organosilane et sa fixation à la surface de silice.	63
4.8	Réactions successives de l'EDC et du NHS permettant la création d'un groupement ester de NHS.	66
4.9	Réaction de l'ester de NHS permettant la création d'une liaison covalente entre un acide carboxylique et une fonction amine primaire présente sur le biorécepteur.	66
4.10	Réaction du groupe fonctionnel aldéhyde (R = H) ou cétone (R = chaîne carbonée) avec une fonction amine primaire présente sur le biorécepteur.	67
5.1	Schéma de principe du système d'analyse spectrale en transmission.	72
5.2	Schéma de principe de la cavité laser d'une source accordable spectralement (configuration Littman-Metcalf).	73
5.3	Schéma de principe du montage interférométrique à miroir de Lloyd utilisé pour l'inscription de réseaux de Bragg à traits inclinés.	75
5.4	Schéma représentant l'influence de la réfraction air-gaine optique sur l'inscription d'un réseau de Bragg à traits inclinés avec un interféromètre à miroir de Lloyd. .	76
5.5	Exemple de spectres de transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés ($\theta_{ext} = 20$ degrés) pour trois valeurs de l'indice de réfraction extérieur n_{ext}	78
5.6	Une augmentation de l'indice de réfraction extérieur s'accompagne d'un décalage vers les grandes longueurs d'onde de chaque résonance spectrale (a) ainsi que de la décroissance brutale de son minimum de transmission quand l'indice de réfraction extérieur est proche de l'indice effectif du mode associé (b).	79
5.7	Distance spectrale entre deux résonances spectrales consécutives en fonction de la longueur d'onde de résonance associée au mode de gaine correspondant.	79
5.8	Exemple de calcul d'aire associée au spectre en transmission d'un réseau de Bragg à traits inclinés.	81
5.9	Spectres de transmission d'un réseau blazé dans l'air (A1) et dans l'eau (B1). Continuum de fréquences obtenus par transformée de Fourier des spectres de transmission dans l'air (A2) et dans l'eau (B2).	83
5.10	Courbe d'étalonnage d'un réseau de Bragg à traits inclinés.	84
5.11	Schéma décrivant le principe de fonctionnement du système BraggLight.	85

6.1	Schéma de la cuve de fonctionnalisation.	88
6.2	Structure du polyéthylène imine.	89
6.3	Structure du dextrane sulfaté (sel de sodium).	89
6.4	Structure de la surface biofonctionnalisée par la méthode « tout électrostatique ».	92
6.5	Structure du dextran carboxyméthylé.	93
6.6	Structure de l'acide polyacrylique.	94
6.7	Structure du glutaraldéhyde.	95
6.8	Structure de la surface biofonctionnalisée obtenue en couplant un film multicouche à l'affinité extravidine-biotine.	96
6.9	Schéma du ballon tricol utilisé dans le protocole de fonctionnalisation covalente.	97
6.10	Silanisation de la silice activée par l'APTS (3-aminopropyl-triméthoxysilane).	98
6.11	Greffage covalent de l'amorceur (ACVC) sur la surface silanisée.	99
6.12	Réaction de dissociation de l'amorceur conduisant à la formation de radicaux libres.	99
6.13	Transfert du site actif sur une molécule d'acide acrylique (monomère).	100
6.14	Croissance des chaînes polymères par transfert de radicaux libres.	100
6.15	Réaction de combinaison au cours de laquelle deux radicaux polymères se neutralisent par recombinaison ou dismutation. La recombinaison conduit au couplage de deux radicaux polymères. Ils s'additionnent en formant une liaison covalente pour produire une chaîne plus longue. Lors de la dismutation, deux radicaux polymères réagissent ensemble. Le premier forme une double liaison (extrémité insaturée) en captant l'électron célibataire (radical libre) du second en lui transférant un atome d'hydrogène.	101
6.16	Fonctionnalisation <i>in situ</i> de la surface par l'acide polyacrylique (méthode <i>grafting from</i>).	102
6.17	Structure de la surface biofonctionnalisée par la méthode covalente.	103
7.1	Schéma de deux films de morphologies (a) fine et dense ou (b) épaisse et lâche, pouvant donner une réponse optique similaire.	109
7.2	Comparaison des variations d'indice de réfraction mesurées lors d'une étape d'activation de la silice réalisée avec des solutions de soude à 1 mol/L et 5 mol/L.	110
7.3	Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et DSS sont à 10 g/L dans l'eau. Le temps d'incubation est de 40 minutes par couche.	111

7.4	Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et DSS sont à 1 g/L dans l'eau. Le temps d'incubation est de 15 minutes par couche.	112
7.5	Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et DSS sont à 1 g/L dans le PBS. Le temps d'incubation est de 7 minutes par couche.	113
7.6	Cinétiques des étapes de construction de la multicouche de polyélectrolytes. Les solutions de PEI et PAA sont à respectivement 1 g/L et 10 g/L dans le PBS. Le temps d'incubation est de 7 minutes par couche.	116
7.7	Courbe de sensibilité d'un réseau à trais inclinés.	117
7.8	Cinétiques d'adsorption de la BSA contenue dans des solutions à 0,1 g/L, 1 g/L et 10 g/L.	120
7.9	Variation de l'indice de réfraction mesurée pour différentes concentrations en BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.	121
7.10	Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.	121
7.11	Schéma de principe décrivant le fonctionnement de la microscopie à force atomique.	123
7.12	Images AFM de $1 \mu\text{m}^2$ des surfaces (a) d'une fibre fonctionnalisée par une multicouche de polyélectrolytes se terminant par une couche de PEI (échelle en hauteur de 10 nm) et (b) d'une fibre fonctionnalisée de la même façon et biofonctionnalisée ensuite avec la BSA (échelle en hauteur de 20 nm).	123
7.13	Cinétiques d'adsorption de la BSA mettant en évidence l'importance de l'agitation.	124
8.1	(a) Représentation schématique de la détection d'anti-BSA sur une fibre biofonctionnalisée selon le protocole « tout électrostatique ». (b) Formule chimique de la glycine, le plus simple des acides aminés, utilisée pour la régénération des biocapteurs.	126
8.2	Cinétique des tests de reconnaissance de l'anti-BSA (cible) en solution à 0,2 g/L par la BSA (sonde) adsorbée par interactions électrostatiques sur une multicouche de polyélectrolytes PEI-DSS. Deux cycles (reconnaissance + régénération de la « couche sonde de BSA » à la glycine) sont représentés.	127
8.3	Cinétique d'adsorption non-spécifique de l'anti-BSA sur la multicouche de polyélectrolytes non-biofonctionnalisée par la BSA. Test de l'action de la glycine sur l'anti-BSA fixée par interactions non-spécifiques.	128
8.4	Cinétiques de détection de l'anti-BSA contenue dans des solutions de concentration croissante en anticorps.	129

8.5	Variation de l'indice de réfraction mesuré pour différentes concentrations en anti-BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.	130
8.6	Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.	130
8.7	Concentration surfacique d'anticorps ayant réagi pour différentes concentrations d'anti-BSA en solution. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.	132
8.8	Cinétiques d'adsorption et de désorption de la BLG sur une multicouche de poly-électrolytes se terminant par du PEI.	133
8.9	Cinétique d'adsorption non-spécifique de l'anti-BLG sur la multicouche de poly-électrolytes non-biofonctionnalisée par la BLG.	134
8.10	Schémas d'une biofonctionnalisation directe par interactions électrostatiques (a) et d'un protocole fondé sur l'utilisation d'une couche intermédiaire d'extravidine (b).	135
8.11	Cinétique d'adsorption non-spécifique de l'extravidine et réaction spécifique de la BSA biotinylée par affinité avidine-biotine.	135
8.12	Représentation schématique de la détection d'anti-BSA sur une fibre biofonctionnalisée selon le protocole « électrostatique-extravidine-biotine ».	136
8.13	Cinétiques de détection de l'anti-BSA contenue dans des solutions de concentration croissante en anticorps.	136
8.14	Variation de l'indice de réfraction mesuré pour différentes concentrations en anti-BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.	137
8.15	Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.	138
8.16	Concentration surfacique d'anticorps ayant réagi pour différentes concentrations d'anti-BSA en solution. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.	139
9.1	Mécanisme d'hydrolyse des fonctions chlorures d'acide de l'amorceur chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) (ACVC) pour donner l'acide 4,4'-Azobis(4-cyanovalérique) (ACVA).	143
9.2	Fraction du spectre IR d'un amorceur chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) très faiblement hydrolysé.	143

9.3	Schéma du montage utilisé pour la synthèse du chlorure de 4,4'-Azobis(4-cyanovaléryle) (ACVC) à partir de l'acide 4,4'-Azobis(4-cyanovalérique) (ACVA) et du pentachlorure de phosphore (PCl_5) en suspension dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2).	144
9.4	Suivi en temps réel de la croissance des chaînes d'acide polyacrylique depuis la surface d'une fibre à réseau de Bragg en angle sous irradiation ultraviolette (UV), $\lambda = 365 \text{ nm}$	145
9.5	Représentation schématique de la détection d'anti-BSA sur une fibre biofonctionnalisée selon le protocole « covalent-extravidine-biotine ».	147
9.6	Cinétiques de détection de l'anti-BSA contenue dans des solutions de concentration croissante en anticorps.	148
9.7	Variation de l'indice de réfraction mesuré pour différentes concentrations en anti-BSA. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.	149
9.8	Modèle de Langmuir sous sa forme linéaire. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la droite en pointillés à l'isotherme de Langmuir correspondant.	149
9.9	Concentration surfacique d'anticorps ayant réagi pour différentes concentrations d'anti-BSA en solution. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et la courbe à l'isotherme de Langmuir correspondant.	150
9.10	Courbe de sensibilité de la couche d'acide polyacrylique vis-à-vis des variations de pH. Les losanges correspondent aux points expérimentaux et les pointillés à la droite de régression linéaire.	154
9.11	Formule chimique de l'atrazine.	155
9.12	Schéma d'un biocapteur permettant la détection d'atrazine en solution par voie indirecte. L'anti-atrazine immobilisée sur le complexe atrazine-BSA se détache dès lors que de l'atrazine libre est présente en solution.	156
10.1	Image en coupe d'une fibre capillaire dont le microcanal central ($10 \mu\text{m}$ de diamètre) est biofonctionnalisé par de la BSA fluorescente.	161

Liste des tableaux

6.1	Masses molaires et points isoélectriques de la BLG et de la BSA.	90
7.1	Valeurs des indices de réfraction des solutions de PBS, de PEI et de DSS à 1 g/L dans le PBS et de PEI et de DSS à 10 g/L dans le PBS, mesurées au réfractomètre d'Abbe.	109
9.1	Récapitulatif des paramètres résultant du modèle de Langmuir appliqué aux biocapteurs « tout électrostatique », « électrostatique-extravidine-biotine » et « covalent-extravidine-biotine ».	151

Bibliographie

- [Albareda-Sirvent 2000] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi et S. Alegret. *Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 69, no. 1-2, pages 153–163, 2000.
- [Ali 2007] M.B. Ali, F. Bessueille, J.M. Chovelon, A. Abdelghani, N. Jaffrezic-Renault, M.A. Maaref et C. Martelet. *Use of ultra-thin organic silane films for the improvement of gold adhesion to the silicon dioxide wafers for (bio) sensor applications*. Materials Science & Engineering C, 2007.
- [Anderson 1994] G.P. Anderson, J.P. Golden, L.K. Cao, D. Wijesuriya, L.C. Shriver-Lake et F.S. Ligler. *Development of an evanescent wave fiber optic biosensor*. Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE, vol. 13, no. 3, pages 358–363, 1994.
- [Anderson 1997] G.P. Anderson, M.A. Jacoby, F.S. Ligler et K.D. King. *Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 12, no. 4, pages 329–336, 1997.
- [Aoki 2002] K. Aoki, H. Uchida, T. Katsube, Y. Ishimaru et T. Iida. *Integration of bienzymatic disaccharide sensors for simultaneous determination of disaccharides by means of light addressable potentiometric sensor*. Analytica Chimica Acta, vol. 471, no. 1, pages 3–12, 2002.
- [Arkhypova 2003] V.N. Arkhypova, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet et N. Jaffrezic-Renault. *Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 18, no. 8, pages 1047–1053, 2003.
- [Arslan 2006] G. Arslan, M. Özmen, B. Gündüz, X. Zhang et M. Ersöz. *Surface modification of glass beads with an aminosilane monolayer*. Turkish Journal of Chemistry, vol. 30, no. 2, pages 203–210, 2006.

- [Arwin 1998] H. Arwin. *Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges*. Thin Solid Films, vol. 313, pages 764–774, 1998.
- [Backmann 2005] N. Backmann, C. Zahnd, F. Huber, A. Bietsch, A. Plückthun, H.P. Lang, H.J. Güntherodt, M. Hegner et C. Gerber. *A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 102, no. 41, pages 14587–14592, 2005.
- [Barrias 2005] C.C. Barrias, M.C.L. Martins, M.C.S. Miranda et M.A. Barbosa. *Adsorption of a therapeutic enzyme to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and solution pH on the amount and activity of adsorbed enzyme*. Biomaterials, vol. 26, no. 15, pages 2695–2704, 2005.
- [Barrios 2008] C.A. Barrios, M.J. Bañuls, V. González-Pedro, K.B. Gylfason, B. Sánchez, A. Griol, A. Maquieira, H. Sohlström, M. Holgado et R. Casquel. *Label-free optical biosensing with slot-waveguides*. Optics Letters, vol. 33, no. 7, pages 708–710, 2008.
- [Bassil 2003] N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Lévy, M.C. Millot, S. Pissard, R. Narwa et M. Goossens. *One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 94, no. 3, pages 313–323, 2003.
- [Bendoula 2005] R. Bendoula. *Biocapteur Optique: Sonde fibrée à cavité Fabry-Pérot intrinsèque et à couplage évanescent*. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, 2005.
- [Bhatia 1996] V. Bhatia et A.M. Vengsarkar. *Optical fiber long-period grating sensors*. Optics Letters, vol. 21, pages 692–694, 1996.
- [Biran 2003] I. Biran, D.M. Rissin, E.Z. Ron et D.R. Walt. *Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor*. Analytical Biochemistry, vol. 315, no. 1, pages 106–113, 2003.
- [Birkert 2000] O. Birkert, H.M. Haake, A. Schütz, J. Mack, A. Brecht, G. Jung et G. Gauglitz. *A Streptavidin Surface on Planar Glass Substrates for the Detection of Biomolecular Interaction*. Analytical Biochemistry, vol. 282, no. 2, pages 200–208, 2000.
- [Birks 1995] T.A. Birks, P.J. Roberts, P.S.J. Russell, D.M. Atkin et T.J. Shepherd. *Full 2-D photonic bandgaps in silica/air structures*. Electronics Letters, vol. 31, no. 22, pages 1941–1943, 1995.
- [Boisde 1990] G. Boisde. *Les capteurs chimiques à fibres optiques. Réalités et perspectives*. Entropie (Paris), vol. 26, no. 155, pages 28–42, 1990.

- [Brechet 2000] F. Brechet, J. Marcou, D. Pagnoux et P. Roy. *Complete Analysis of the Characteristics of Propagation into Photonic Crystal Fibers, by the Finite Element Method*. Optical Fiber Technology, vol. 6, no. 2, pages 181–191, 2000.
- [Brorson 1988] S.D. Brorson et H.A. Haus. *Diffraction gratings and geometrical optics*. J. Opt. Soc. Am. B, vol. 5, pages 247–248, 1988.
- [Brown 1999] P.O. Brown et D. Botstein. *Exploring the new world of the genome with DNA microarrays*. Nature Genetics, vol. 21, no. 1 Suppl, pages 33–37, 1999.
- [Brunauer 1940] S. Brunauer, L.S. Deming, W.E. Deming et E. Teller. *On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases*. Journal of the American Chemical Society, vol. 62, no. 7, pages 1723–1732, 1940.
- [Busse 2002] S. Busse, V. Scheumann, B. Menges et S. Mittler. *Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 17, no. 8, pages 704–710, 2002.
- [Canning 2000] J. Canning. *M. slund, and P. Hu, " Ultraviolet-induced absorption losses in hydrogen-loaded optical fibers and in presensitized optical fibers,"*. Opt. Lett, vol. 25, pages 1621–1623, 2000.
- [Canning 2006] J. Canning. *Fibre lasers and related technologies*. Optics and Lasers in Engineering, vol. 44, no. 7, pages 647–676, 2006.
- [Caruso 1997] F. Caruso, K. Niikura, D.N. Furlong et Y. Okahata. *1. Ultrathin multilayer polyelectrolyte films on gold: construction and thickness determination*. Langmuir, vol. 13, no. 13, pages 3422–3426, 1997.
- [Cattani 2006] G. Cattani. *Technological pre-adaptation, speciation, and emergence of new technologies: how Corning invented and developed fiber optics*. Industrial and Corporate Change, vol. 15, no. 2, pages 285–318, 2006.
- [Chaki 2001] N.K. Chaki, M. Aslam, J. Sharma et K. Vijayamohanan. *Applications of self-assembled monolayers in materials chemistry*. The Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Chemical Science), vol. 113, pages 659–670, 2001.
- [Chang 2005] E. Chang, J.S. Miller, J. Sun, W.W. Yu, V.L. Colvin, R. Drezek et J.L. West. *Protease-activated quantum dot probes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 334, no. 4, pages 1317–1321, 2005.

- [Chegel 1998] V.I. Chegel, Y.M. Shirshov, E.V. Piletskaya et S.A. Piletsky. *Surface plasmon resonance sensor for pesticide detection*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 48, no. 1-3, pages 456–460, 1998.
- [Chen 1982] T.M. Chen. *Solvent effects on bonding organo-silane to silica surfaces*. Journal of Dental Research, vol. 61, no. 12, pages 1439–1443, 1982.
- [Chen 2007] H.W. Chen, C.L. Tien, W.F. Liu et S.W. Lin. *The Measurement of Liquid Refractive Index by D-shaped Fiber Bragg Grating*. Optical MEMS and Nanophotonics, 2007 IEEE/LEOS International Conference on, pages 119–120, 2007.
- [Chouteau 2005] C. Chouteau, S. Dzyadevych, C. Durrieu et J.M. Chovelon. *A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 21, no. 2, pages 273–281, 2005.
- [Chung 2006] J.W. Chung, S.D. Kim, R. Bernhardt et J.C. Pyun. *Additive assay for the repeated measurements of immunosensor without regeneration step*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 114, no. 2, pages 1007–1012, 2006.
- [Clark Jr 1962] L.C. Clark Jr et C. Lyons. *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Ann NY Acad Sci, vol. 102, pages 29–45, 1962.
- [Cohen 1957] A.J. Cohen. *Neutron Specific Color Center in Fused Silica and an Impurity Band of Identical Wavelength*. Physical Review, vol. 105, no. 4, pages 1151–1155, 1957.
- [Cregan 1999] R.F. Cregan, B.J. Mangan, J.C. Knight, T.A. Birks, P.S.J. Russell, P.J. Roberts et D.C. Allan. *Single-Mode Photonic Band Gap Guidance of Light in Air*. Science, vol. 285, no. 5433, page 1537, 1999.
- [Cubillas 2007] A.M. Cubillas, M. Silva-Lopez, J.M. Lazaro, O.M. Conde, M.N. Petrovich et J.M. Lopez-Higuera. *Methane detection at 1670-nm band using a hollow-core photonic bandgap fiber and a multiline algorithm*. Optics Express, vol. 15, no. 26, pages 17570–17576, 2007.
- [Cusano 2005] A. Cusano, P. Pilla, L. Contessa, A. Iadicicco, S. Campopiano, A. Cutolo, M. Giordano et G. Guerra. *High-sensitivity optical chemosensor based on coated long-period gratings for sub-ppm chemical detection in water*. Applied Physics Letters, vol. 87, page 234105, 2005.
- [Decher 1997] G. Decher. *Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*. Science, vol. 277, no. 5330, page 1232, 1997.

- [Dostálek 2001] J. Dostálek, J. Čtyroký, J. Homola, E. Brynda, M. Skalský, P. Něk-vindová, J. Špírková, J. Škvor et J. Schröfel. *Surface plasmon resonance biosensor based on integrated optical waveguide*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 76, no. 1-3, pages 8–12, 2001.
- [D'Souza 2001] S.F. D'Souza. *Microbial biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 16, no. 6, pages 337–353, 2001.
- [Dubas 1999] S.T. Dubas et J.B. Schlenoff. *Factors controlling the growth of poly-electrolyte multilayers*. Macromolecules, vol. 32, no. 24, pages 8153–8160, 1999.
- [Dutta 2003] P. Dutta, C.A. Tipple, N.V. Lavrik, P.G. Datskos, H. Hofstetter, O. Hofstetter et M.J. Sepaniak. *Enantioselective sensors based on antibody-mediated nanomechanics*. Anal. Chem, vol. 75, no. 10, pages 2342–2348, 2003.
- [Dzyadevych 2003] S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, Y.I. Korpan, V.N. Arkhypova, A.V. El'skaya, J.M. Chovelon, C. Martelet et N. Jaffrezic-Renault. *Biosensors based on enzyme field-effect transistors for determination of some substrates and inhibitors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 377, no. 3, pages 496–506, 2003.
- [Emiliyanov 1987] G. Emiliyanov, J.B. Jensen, P.E. Hoiby, O. Bang, L.H. Pedersen et A. Bjarklev. *A microstructured Polymer Optical Fiber biosensor*. Appl. Opt, vol. 26, pages 2181–2187, 1987.
- [Erdogan 1996] T. Erdogan et J.E. Sipe. *Tilted fiber phase gratings*. J. Opt. Soc. Am. A, vol. 13, no. 2, pages 296–313, 1996.
- [Erdogan 1997] T. Erdogan. *Fiber grating spectra*. Lightwave Technology, Journal of, vol. 15, no. 8, pages 1277–1294, 1997.
- [Falciai 2001] R. Falciai, A.G. Mignani et A. Vannini. *Long period gratings as solution concentration sensors*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 74, no. 1-3, pages 74–77, 2001.
- [Ferdinand 1992] P. Ferdinand. *Capteurs à fibres optiques et réseaux associés*, 1992.
- [Ferdinand 1999] P. Ferdinand. *Capteurs à fibres optiques à réseaux de Bragg*. Mesures et contrôle, no. R 6735, pages 6735–6735, 1999.
- [Ferdinand 2008] P. Ferdinand. *Réseaux de Capteurs à Fibres Optique*. Mesures et Multiplexages, no. R 460v2, 2008.
- [Ferraro 2002] P. Ferraro et G. De Natale. *On the possible use of optical fiber Bragg gratings as strain sensors for geodynamical monitoring*. Optics and Lasers in Engineering, vol. 37, no. 2-3, pages 115–130, 2002.

- [Fokine 2004] M. Fokine. *Thermal stability of oxygen-modulated chemical-composition gratings in standard telecommunication fiber*. Optics Letters, vol. 29, no. 11, pages 1185–1187, 2004.
- [Fung 2001] Y.S. Fung et Y.Y. Wong. *Self-Assembled Monolayers as the Coating in a Quartz Piezoelectric Crystal Immunosensor To Detect Salmonella in Aqueous Solution*. Analytical chemistry, Washington DC, vol. 73, no. 21, pages 5302–5309, 2001.
- [Gallardo 2004] J. Gallardo, S. Alegret et M. del Valle. *A flow-injection electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of nitrate in the presence of chloride*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 101, no. 1-2, pages 72–80, 2004.
- [George 1995] A.J.T. George, R.R. French et M.J. Glennie. *Measurement of kinetic binding constants of a panel of anti-saporin antibodies using a resonant mirror biosensor*. Journal of Immunological Methods, vol. 183, no. 1, pages 51–63, 1995.
- [Ghoul 2003] M. Ghoul, M. Bacquet, G. Crini et M. Morcellet. *Novel sorbents based on silica coated with polyethylenimine and crosslinked with poly(carboxylic acid): Preparation and characterization*. Journal of Applied Polymer Science, vol. 90, no. 3, pages 799–805, 2003.
- [González-García 2000] M.B. González-García, C. Fernández-Sánchez et A. Costa-García. *Colloidal gold as an electrochemical label of streptavidin–biotin interaction*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 15, no. 5-6, pages 315–321, 2000.
- [Grabarek 1990] Z. Grabarek et J. Gergely. *Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters*. Analytical Biochemistry, vol. 185, no. 1, pages 131–135, 1990.
- [Grant 2001] S.A. Grant, K. Bettencourt, P. Krulevitch, J. Hamilton et R. Glass. *In vitro and in vivo measurements of fiber optic and electrochemical sensors to monitor brain tissue pH*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 72, no. 2, pages 174–179, 2001.
- [Green 1963] N.M. Green. *Avidin. 3. The nature of the biotin-binding site*. Biochemical Journal, vol. 89, no. 3, page 599, 1963.
- [Green 1975] N.M. Green. *Avidin*. Adv Protein Chem, vol. 29, pages 85–133, 1975.
- [Gu 2006] Z. Gu, Y. Xu et K. Gao. *Optical fiber long-period grating with solgel coating for gas sensor*. Optics Letters, vol. 31, no. 16, pages 2405–2407, 2006.

- [Guan 2000] B.O. Guan, H.Y. Tam, X.M. Tao et X.Y. Dong. *Highly stable fiber Bragg gratings written in hydrogen-loaded fiber*. Photonics Technology Letters, IEEE, vol. 12, no. 10, pages 1349–1351, 2000.
- [Guedon 2000] P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan et Y. Levy. *Characterization and Optimization of a Real-Time, Parallel, Label-Free, Polypyrrole-Based DNA Sensor by Surface Plasmon Resonance Imaging*. Analytical chemistry, Washington DC, vol. 72, no. 24, pages 6003–6009, 2000.
- [Guo 2003] W. Guo et E. Ruckenstein. *Modified glass fiber membrane and its application to membrane affinity chromatography*. Journal of Membrane Science, vol. 215, no. 1-2, pages 141–155, 2003.
- [Gupta 1996] S. Gupta, T. Mizunami, T. Yamao et T. Shimomura. *Fiber Bragg grating cryogenic temperature sensors*. Appl. Opt, vol. 35, no. 25, pages 5202–5205, 1996.
- [Hand 1990] D.P. Hand et P.S.J. Russell. *Photoinduced refractive-index changes in germanosilicate fibers*. Opt. Lett, vol. 15, no. 2, pages 102–104, 1990.
- [Harborn 1997] U. Harborn, B. Xie, R. Venkatesh et B. Danielsson. *Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood*. Clinica Chimica Acta, vol. 267, no. 2, pages 225–237, 1997.
- [Haupt 2000] K. Haupt et K. Mosbach. *Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors*. Chem Rev, vol. 100, no. 7, pages 2495–504, 2000.
- [Hengsakul 1997] M. Hengsakul et A.E.G. Cass. *Alkaline Phosphatase-Strep tag fusion protein binding to streptavidin: resonant mirror studies*. Journal of Molecular Biology, vol. 266, no. 3, pages 621–632, 1997.
- [Hill 1978] K.O. Hill, Y. Fujii, D.C. Johnson et B.S. Kawasaki. *Photosensitivity in optical fiber waveguides: Application to reflection filter fabrication*. Applied Physics Letters, vol. 32, page 647, 1978.
- [Hill 1993a] K.O. Hill, B. Malo, F. Bilodeau, D.C. Johnson et J. Albert. *Bragg gratings fabricated in monomode photosensitive optical fiber by UV exposure through a phase mask*. Applied Physics Letters, vol. 62, page 1035, 1993.
- [Hill 1993b] K.O. Hill, B. Malo, F. Bilodeau, D.C. Johnson et J. Albert. *Erratum: Bragg gratings fabricated in monomode photosensitive optical fiber by UV exposure through a phase mask*. Applied Physics Letters, vol. 63, page 424, 1993.

- [Hirmo 1998] S. Hirmo, E. Artursson, G. Puu, T. Wadström et B. Nilsson. *Characterization of Helicobacter pylori Interactions with Sialylglycoconjugates Using a Resonant Mirror Biosensor*. Analytical Biochemistry, vol. 257, no. 1, pages 63–66, 1998.
- [Hocker 1979] G.B. Hocker. *Fiber-optic sensing of pressure and temperature*. Appl. Opt, vol. 18, no. 9, pages 1445–1448, 1979.
- [Homola 1998] J. Homola et S.S. Yee. *Novel polarization control scheme for spectral surface plasmon resonance sensors*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 51, no. 1-3, pages 331–339, 1998.
- [Homola 1999] J. Homola, S.S. Yee et G. Gauglitz. *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 54, no. 1-2, pages 3–15, 1999.
- [Hoogeveen 1996] N.G. Hoogeveen, M.A.C. Stuart, G. Fleer et M. Bohmer. *Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes*. Langmuir, vol. 12, no. 15, pages 3675–3681, 1996.
- [Hosono 1992] H. Hosono, Y. Abe, D.L. Kinser, R.A. Weeks, K. Muta et H. Kawazoe. *Nature and origin of the 5-eV band in SiO₂: GeO₂ glasses*. Physical Review B, vol. 46, no. 18, pages 11445–11451, 1992.
- [Iadicicco 2004] A. Iadicicco, A. Cusano, A. Cutolo et M. Giordano. *High-resolution refractive index sensor by using thinned fiber Bragg gratings*. Proceedings of SPIE, vol. 5502, page 251, 2004.
- [Izquierdo 2005] A. Izquierdo, S.S. Ono, J.C. Voegel, P. Schaaf et G. Decher. *Dipping versus spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly*. Langmuir, vol. 21, no. 16, pages 7558–7567, 2005.
- [Janeway 2003] C.A. Janeway et P. Travers. Immunobiologie. De Boeck Université, 2003.
- [Jensen 2004] J.B. Jensen, L.H. Pedersen, P.E. Hoiby, L.B. Nielsen, TP Hansen, JR Folkenberg, J. Riishede, D. Noordegraaf, K. Nielsen, A. Carlsson et al. *Photonic crystal fiber based evanescent-wave sensor for detection of biomolecules in aqueous solutions*. Optics Letters, vol. 29, no. 17, pages 1974–1976, 2004.
- [John 2002] M.S. John, A. Kishen, L.C. Sing et A. Asundi. *Determination of bacterial activity by use of an evanescent-wave fiber-optic sensor*. Appl. Opt, vol. 41, no. 34, pages 7334–7338, 2002.

- [Johnsson 1991] B. Johnsson, S. Lofas et G. Lindquist. *Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors*. *Anal Biochem*, vol. 198, no. 2, pages 268–77, 1991.
- [Kallury 1994] K.M.R. Kallury, P.M. Macdonald et M. Thompson. *Effect of Surface Water and Base Catalysis on the Silanization of Silica by (Amino-propyl) alkoxy-silanes Studied by X-ray Photoelectron Spectroscopy and ^{13}C Cross-Polarization/Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*. *Langmuir*, vol. 10, no. 2, pages 492–499, 1994.
- [Kawasaki 1978] B.S. Kawasaki, K.O. Hill, D.C. Johnson et Y. Fujii. *Narrow-band Bragg reflectors in optical fibers*. *Opt. Lett.*, vol. 3, pages 66–68, 1978.
- [Kersey 1997] A.D. Kersey, M.A. Davis, H.J. Patrick, M. LeBlanc, K.P. Koo, C.G. Askins, M.A. Putnam et E.J. Friebele. *Fiber grating sensors*. *Light-wave Technology, Journal of*, vol. 15, no. 8, pages 1442–1463, 1997.
- [Khaliq 2002] S. Khaliq, S.W. James et R.P. Tatam. *Enhanced sensitivity fibre optic long period grating temperature sensor*. *Measurement Science and Technology*, vol. 13, no. 5, pages 792–795, 2002.
- [Killard 2000] A.J. Killard et M.R. Smyth. *Creatinine biosensors: principles and designs*. *Trends in Biotechnology*, vol. 18, no. 10, pages 433–437, 2000.
- [Kim 1999] D.K. Kim, S.W. Han, C.H. Kim, J.D. Hong et K. Kim. *Morphology of multilayers assembled by electrostatic attraction of oppositely charged model polyelectrolytes*. *Thin Solid Films*, vol. 350, no. 1-2, pages 153–160, 1999.
- [Kinniburgh 1986] D.G. Kinniburgh. *General purpose adsorption isotherms*. *Environmental Science & Technology*, vol. 20, no. 9, pages 895–904, 1986.
- [Knight 1996] J.C. Knight, T.A. Birks, P.S.J. Russell et D.M. Atkin. *All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding*. *Opt. Lett.*, vol. 21, no. 19, pages 1547–1549, 1996.
- [Kolasińska 2007] M. Kolasińska, R. Krastev et P. Warszyński. *Characteristics of polyelectrolyte multilayers: Effect of PEI anchoring layer and post-treatment after deposition*. *Journal of Colloid And Interface Science*, vol. 305, no. 1, pages 46–56, 2007.
- [Kruchinin 1996] A.A. Kruchinin et Y.G. Vlasov. *Surface plasmon resonance monitoring by means of polarization state measurement in reflected light as the basis of a DNA-probe biosensor*. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, vol. 30, no. 1, pages 77–80, 1996.

- [Kudo 2008] H. Kudo, K. Suga et M. Fujihira. *Fabrication of substrates with various wettabilities for DNA molecular combing*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 313, pages 651–654, 2008.
- [Ladam 2000a] G. Ladam, P. Schaad, J.C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher et F. Cuisinier. *In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers*. Langmuir, vol. 16, no. 3, pages 1249–1255, 2000.
- [Ladam 2000b] G. Ladam, P. Schaad, J.C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher et F. Cuisinier. *In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers*. Langmuir, vol. 16, no. 3, pages 1249–1255, 2000.
- [Ladam 2002] G. Ladam, P. Schaaf, G. Decher, J.C. Voegel et F.J.G. Cuisinier. *Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films*. Biomolecular Engineering, vol. 19, no. 2-6, pages 273–280, 2002.
- [Laffont 2001a] G. Laffont. *Étude et développement de transducteurs et systèmes de mesure à réseaux de Bragg à traits inclinés photoinscrits dans des fibres optiques monomodes*. Thèse de doctorat, Université de Lille, 2001.
- [Laffont 2001b] G. Laffont et P. Ferdinand. *Sensitivity of slanted fibre Bragg gratings to external refractive index higher than that of silica*. Electronics Letters, vol. 37, no. 5, pages 289–290, 2001.
- [Laffont 2001c] G. Laffont et P. Ferdinand. *Tilted short-period fibre-Bragg-grating-induced coupling to cladding modes for accurate refractometry*. Meas. Sci. Technol, vol. 12, no. 7, pages 765–770, 2001.
- [Lagakos 1987] N. Lagakos, J.H. Cole et J.A. Bucaro. *Microbend fiber-optic sensor*. Applied Optics, vol. 26, no. 11, pages 2171–2180, 1987.
- [Lam 1981] D.K.W. Lam et B.K. Garside. *Characterization of single-mode optical fiber filters*. Applied Optics, vol. 20, no. 3, pages 440–445, 1981.
- [Langmuir 1918] I. Langmuir. *The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum*. Journal of the American Chemical Society, vol. 40, no. 9, pages 1361–1403, 1918.
- [Laurent 1997] D. Laurent et J.B. Schlenoff. *Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes*. Langmuir, vol. 13, no. 6, pages 1552–1557, 1997.
- [Lawrence 1996] C.R. Lawrence, N.J. Geddes, D.N. Furlong et J.R. Sambles. *Surface plasmon resonance studies of immunoreactions utilizing disposable diffraction gratings*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 11, no. 4, pages 389–400, 1996.

- [Layton 1979] M.R. Layton et J.A. Bucaro. *Optical fiber acoustic sensor utilizing mode-mode interference*. Appl. Opt, vol. 18, no. 5, page 666, 1979.
- [Lec 1998] R.M. Lec et P.A. Lewin. *Acoustic wave biosensors*. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE, vol. 6, 1998.
- [Lee 1989] C.E. Lee, H.F. Taylor, A.M. Markus et E. Udd. *Optical-fiber Fabry-Perot embedded sensor*. Opt. Lett, vol. 14, no. 21, pages 1225–1227, 1989.
- [Lee 2001] S.S. Lee, J.D. Hong, C.H. Kim, K. Kim, J.P. Koo et K.B. Lee. *Layer-by-Layer Deposited Multilayer Assemblies of Ionene-Type Polyelectrolytes Based on the Spin-Coating Method*. Macromolecules, vol. 34, no. 16, pages 5358–5360, 2001.
- [Lee 2004] J.H. Lee, K.H. Yoon, K.S. Hwang, J. Park, S. Ahn et T.S. Kim. *Label free novel electrical detection using micromachined PZT monolithic thin film cantilever for the detection of C-reactive protein*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 20, no. 2, pages 269–275, 2004.
- [Lemaire 1993] P.J. Lemaire, R.M. Atkins, V. Mizrahi et W.A. Reed. *High pressure H₂ loading as a technique for achieving ultrahigh UV photosensitivity and thermal sensitivity in GeO₂ doped optical fibres*. Electronics Letters, vol. 29, no. 13, pages 1191–1193, 1993.
- [Li 2007] S.G. Li, S.Y. Liu, Z.Y. Song, Y. Han, T.L. Cheng, G.Y. Zhou et L.T. Hou. *Study of the sensitivity of gas sensing by use of index-guiding photonic crystal fibers*. Applied Optics, vol. 46, no. 22, pages 5183–5188, 2007.
- [Lim 2003] D.V. Lim. *Detection of microorganisms and toxins with evanescent wave fiber-optic biosensors*. Proceedings of the IEEE, vol. 91, no. 6, pages 902–907, 2003.
- [Liu 1997] Y. Liu, A. Wang et R.O. Claus. *Layer-by-layer electrostatic self-assembly of nanoscale FeO particles and polyimide precursor on silicon and silica surfaces*. Applied Physics Letters, vol. 71, page 2265, 1997.
- [Liu 2000] X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster et W. Tan. *Molecular Beacons for DNA Biosensors with Micrometer to Submicrometer Dimensions*. Analytical Biochemistry, vol. 283, no. 1, pages 56–63, 2000.
- [Lösche 1998] M. Lösche, J. Schmitt, G. Decher, W.G. Bouwman et K. Kjaer. *Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry*. Macromolecules, vol. 31, no. 25, pages 8893–8906, 1998.

- [Lvov 1993] Y. Lvov, G. Decher et H. Moehwald. *Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly (vinyl sulfate) and poly (allylamine)*. *Langmuir*, vol. 9, no. 2, pages 481–486, 1993.
- [Lvov 1997] Y. Lvov, S. Yamada et T. Kunitake. *Non-linear optical effects in layer-by-layer alternate films of polycations and an azobenzene-containing polyanion*. *Thin Solid Films*, vol. 300, no. 1-2, pages 107–112, 1997.
- [Maillart 2004] E. Maillart. *Imagerie par résonance des plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel*. Thèse de doctorat, Université Paris XI, 2004.
- [Mancier 1995] N. Mancier, A. Chakari, P. Meyrueis et M. Clement. *Angular displacement fiber-optic sensor: theoretical and experimental study*. *Appl. Opt*, vol. 34, page 6489, 1995.
- [Mannelli 2006] I. Mannelli, V. Courtois, P. Lecaruyer, G. Roger, M.C. Millot, M. Goossens et M. Canva. *Surface plasmon resonance imaging (SPRI) system and real-time monitoring of DNA biochip for human genetic mutation diagnosis of DNA amplified samples*. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, vol. 119, no. 2, pages 583–591, 2006.
- [Marttila 2000] A.T. Marttila, O.H. Laitinen, K.J. Airene, T. Kulik, E.A. Bayer, M. Wilchek et M.S. Kulomaa. *Recombinant Neutralite avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties*. *FEBS Lett.*, vol. 467, no. 1, pages 31–6, 2000.
- [McGovern 1994] M.E. McGovern, K.M.R. Kallury et M. Thompson. *Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane*. *Langmuir*, vol. 10, no. 10, pages 3607–3614, 1994.
- [Meltz 1989] G. Meltz, W.W. Morey, W.H. Glenn et al. *Formation of Bragg gratings in optical fibers by a transverse holographic method*. *Opt. Lett.*, vol. 14, no. 15, pages 823–825, 1989.
- [Mendelsohn 2000] J.D. Mendelsohn, C.J. Barrett, V.V. Chan, A.J. Pal, A.M. Mayes et M.F. Rubner. *Fabrication of microporous thin films from poly-electrolyte multilayers*. *Langmuir*, vol. 16, no. 11, pages 5017–5023, 2000.
- [Meyer-Plath 2003] A.A. Meyer-Plath, K. Schröder, B. Finke et A. Ohl. *Current trends in biomaterial surface functionalization nitrogen containing plasma assisted processes with enhanced selectivity*. *Vacuum*, vol. 71, no. 3, pages 391–406, 2003.

- [Mezö 2000] G. Mezö, J. Reményi, J. Kajtár, K. Barna, D. Gaál et F. Hudecz. *Synthesis and conformational studies of poly (l-lysine) based branched polypeptides with Ser and Glu/Leu in the side chains*. Journal of Controlled Release, vol. 63, no. 1-2, pages 81–95, 2000.
- [Mitchell 1999] G.P. Mitchell, C.A. Mirkin et R.L. Letsinger. *Programmed Assembly of DNA Functionalized Quantum Dots*. Appl. Phys. Lett, vol. 66, page 1316, 1999.
- [Mizunami 2001] T. Mizunami, H. Tatehata et H. Kawashima. *High-sensitivity cryogenic fibre-Bragg-grating temperature sensors using Teflon substrates*. Meas. Sci. Technol, vol. 12, no. 7, pages 914–917, 2001.
- [Morey 1989] WW Morey, G. Meltz et WH Glenn. *Bragg-Grating Temperature and Strain Sensors*. Optical Fiber Sensors: Proceedings of the 6th International Conference, OFS'89, Paris, France, September 18-20, 1989, 1989.
- [Mosiello 2003] L. Mosiello, C. Laconi, M. Del Gallo, C. Ercole et A. Lepidi. *Development of a monoclonal antibody based potentiometric biosensor for terbuthylazine detection*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 95, no. 1-3, pages 315–320, 2003.
- [Nakanishi 2001] K. Nakanishi, T. Sakiyama et K. Imamura. *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 91, no. 3, pages 233–244, 2001.
- [Nelson 1996] S.G. Nelson, K.S. Johnston et S.S. Yee. *High sensitivity surface plasmon resonance sensor based on phase detection*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 35, no. 1-3, pages 187–191, 1996.
- [Parikh 1994] A.N. Parikh, D.L. Allara, I.B. Azouz et F. Rondelez. *An Intrinsic Relationship between Molecular Structure in Self-Assembled n-Alkylsiloxane Monolayers and Deposition Temperature*. The Journal of Physical Chemistry, vol. 98, no. 31, pages 7577–7590, 1994.
- [Patrick 1998] H.J. Patrick, A.D. Kersey et F. Bucholtz. *Analysis of the response of long period fiber gratings to external index of refraction*. Lightwave Technology, Journal of, vol. 16, no. 9, pages 1606–1612, 1998.
- [Pedrini 2003] G. Pedrini, M. Gusev, S. Schedin et H.J. Tiziani. *Pulsed digital holographic interferometry by using a flexible fiber endoscope*. Optics and Lasers in Engineering, vol. 40, no. 5-6, pages 487–499, 2003.
- [Pei 2000] R. Pei, X. Cui, X. Yang et E. Wang. *Real-time immunoassay of antibody activity in serum by surface plasmon resonance biosensor*. Talanta, vol. 53, no. 3, pages 481–488, 2000.

- [Percival 2002] C.J. Percival, S. Stanley, A. Braithwaite, M.I. Newton et G. McHale. *Molecular imprinted polymer coated QCM for the detection of nan-drolone*. The Analyst, vol. 127, no. 8, pages 1024–1026, 2002.
- [Péré 2005] E. Péré, H. Cardy, V. Latour et S. Lacombe. *Low-temperature reaction of trialkoxysilanes on silica gel: a mild and controlled method for modifying silica surfaces*. Journal of Colloid And Interface Science, vol. 281, no. 2, pages 410–416, 2005.
- [Phan Huy 2006a] M.C. Phan Huy. *Développement de composants transducteurs et de dispositifs aux fonctionnalités innovantes fondés sur la technologie des fibres microstructurées et des réseaux de Bragg*. Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2006.
- [Phan Huy 2006b] M.C. Phan Huy, G. Laffont, Y. Frignac, V. Dewynter-Marty, P. Ferdinand, P. Roy et J. Blondy. *Fibre Bragg grating photowriting in microstructured optical fibres for refractive index measurement*. Measurement Science and Technology, vol. 17, no. 5, pages 992–997, 2006.
- [Phan Huy 2007] M.C. Phan Huy, G. Laffont, V. Dewynter, P. Ferdinand, P. Roy, J.L. Auguste, D. Pagnoux, W. Blanc et B. Dussardier. *Three-hole microstructured optical fiber for efficient fiber Bragg grating refractometer*. Optics Letters, vol. 32, no. 16, pages 2390–2392, 2007.
- [Piehler 1996] J. Piehler, A. Brecht, K.E. Geckeler et G. Gauglitz. *Surface modification for direct immunoprobes*. Biosensors and Bioelectronics, vol. 11, no. 6-7, pages 579–590, 1996.
- [Pilla 2005] P. Pilla, A. Iadicicco, L. Contessa, S. Campopiano, A. Cutolo, M. Giordano, G. Guerra et A. Cusano. *Optical chemo-sensor based on long period gratings coated with/spl delta/form syndiotactic polystyrene*. Photonics Technology Letters, IEEE, vol. 17, no. 8, pages 1713–1715, 2005.
- [Poumellec 1996] B. Poumellec, P. Niay, M. Douay et J.F. Bayon. *The UV-induced refractive index grating in Ge: SiO₂ preforms: additional CW experiments and the macroscopic origin of the change in index*. Journal of Physics D. Applied Physics, vol. 29, no. 7, pages 1842–56, 1996.
- [Příbyl 2003] J. Příbyl, M. Hepel, J. Halánek et P. Skládal. *Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 91, no. 1-3, pages 333–341, 2003.
- [Qu 1999] F. Qu, Z.H. Qi, K.N. Liu et S.F. Mou. *Determination of aspartame by ion chromatography with electrochemical integrated amperometric detection*. Journal of Chromatography A, vol. 850, no. 1-2, pages 277–281, 1999.

- [Raghavan 1999] V. Raghavan, K. Ramanathan, P.V. Sundaram et B. Danielsson. *An enzyme thermistor-based assay for total and free cholesterol*. *Clinica Chimica Acta*, vol. 289, no. 1-2, pages 145–158, 1999.
- [Rahman 2005] M.A. Rahman, M.S. Won et Y.B. Shim. *The potential use of hydrazine as an alternative to peroxidase in a biosensor: comparison between hydrazine and HRP-based glucose sensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 2, pages 257–265, 2005.
- [Ramanathan 2001a] K. Ramanathan et B. Danielsson. *Principles and applications of thermal biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, no. 6, pages 417–423, 2001.
- [Ramanathan 2001b] K. Ramanathan, B.R. Jönsson et B. Danielsson. *Sol-gel based thermal biosensor for glucose*. *Analytica Chimica Acta*, vol. 427, no. 1, pages 1–10, 2001.
- [Ramsden 1995] J.J. Ramsden, Y.M. Lvov et G. Decher. *Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption*. *Thin Solid Films*, vol. 254, no. 1-2, pages 246–251, 1995.
- [Rekha 2000] K. Rekha, M.D. Gouda, M.S. Thakur et N.G. Karanth. *Ascorbate oxidase based amperometric biosensor for organophosphorous pesticide monitoring*. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 15, no. 9-10, pages 499–502, 2000.
- [Richert 2004] L. Richert, P. Lavalley, E. Payan, X.Z. Shu, G.D. Prestwich, J.F. Stoltz, P. Schaaf, J.C. Voegel et C. Picart. *Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects*. *Langmuir*, vol. 20, no. 2, pages 448–458, 2004.
- [Rindorf 2008] L. Rindorf, P.E. Højby, J.B. Jensen, L.H. Pedersen, O. Bang et O. Geschke. *Towards biochips using microstructured optical fiber sensors*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 385, no. 8, pages 1370–1375, 2008.
- [Ritari 2004] T. Ritari, J. Tuominen, H. Ludvigsen, J. Petersen, T. Sørensen, T. Hansen et H. Simonsen. *Gas sensing using air-guiding photonic bandgap fibers*. *Optics Express*, vol. 12, no. 17, pages 4080–4087, 2004.
- [Roach 2005] P. Roach, D. Farrar et C.C. Perry. *Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes*. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 22, pages 8168–8173, 2005.
- [Rubtsova 1998] M.Y. Rubtsova, G.V. Kovba et A.M. Egorov. *Chemiluminescent biosensors based on porous supports with immobilized peroxidase*. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 13, no. 1, pages 75–85, 1998.

- [Rundlett 1996] K.L. Rundlett et D.W. Armstrong. *Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, vol. 721, no. 1, pages 173–186, 1996.
- [Salik 2000] E. Salik, D.S. Starodubov et J. Feinberg. *Increase of photosensitivity in Ge-doped fibers under strain*. Optics Letters, vol. 25, no. 16, pages 1147–1149, 2000.
- [Salloum 2004] D.S. Salloum et J.B. Schlenoff. *Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers*. Biomacromolecules, vol. 5, no. 3, pages 1089–96, 2004.
- [Schlenoff 2000] J.B. Schlenoff, S.T. Dubas et T. Farhat. *Sprayed Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, vol. 16, no. 26, pages 9968–9969, 2000.
- [Schlenoff 2001] J.B. Schlenoff et S.T. Dubas. *Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: charge overcompensation and distribution*. Macromolecules, vol. 34, no. 3, pages 592–598, 2001.
- [Schmidt 2002] R. Schmidt, T. Zhao, J.B. Green et D.J. Dyer. *Photoinitiated polymerization of styrene from self-assembled monolayers on gold*. Langmuir, vol. 18, no. 4, pages 1281–1287, 2002.
- [Schönhoff 2003] M. Schönhoff. *Self-assembled polyelectrolyte multilayers*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, vol. 8, no. 1, pages 86–95, 2003.
- [Schöning 2003] M.J. Schöning, M. Arzdorf, P. Mulchandani, W. Chen et A. Mulchandani. *A capacitive field-effect sensor for the direct determination of organophosphorus pesticides*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 91, no. 1-3, pages 92–97, 2003.
- [Schroeder 2001a] K. Schroeder, W. Ecke, R. Mueller, R. Willsch et A. Andreev. *A fibre Bragg grating refractometer*. Meas. Sci. Technol, vol. 12, no. 7, pages 757–764, 2001.
- [Schroeder 2001b] K. Schroeder, A. Meyer-Plath, D. Keller, W. Besch, G. Babucke et A. Ohl. *Plasma-Induced Surface Functionalization of Polymeric Biomaterials in Ammonia Plasma*. Contributions to Plasma Physics, vol. 41, no. 6, pages 562–572, 2001.
- [Seki 1998] A. Seki, S. Ikeda, I. Kubo et I. Karube. *Biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for urea, penicillin and glucose*. Analytica Chimica Acta, vol. 373, no. 1, pages 9–13, 1998.
- [Severinghaus 1958] J.W. Severinghaus et A.F. Bradley. *Electrodes for Blood pO₂ and pCO₂ Determination*. Journal of Applied Physiology, vol. 13, no. 3, pages 515–520, 1958.

- [Shiratori 2000] S.S. Shiratori et M.F. Rubner. *pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes*. *Macromolecules*, vol. 33, no. 11, pages 4213–4219, 2000.
- [Shriver-Lake 1995] L.C. Shriver-Lake, K.A. Breslin, P.T. Charles, D.W. Conrad, J.P. Golden et F.S. Ligler. *Detection of TNT in Water Using an Evanescent Wave Fiber-Optic Biosensor*. *Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 14, pages 2431–2435, 1995.
- [Slavik 2001] R. Slavik, J. Homola, J. Čtyroký et E. Brynda. *Novel spectral fiber optic sensor based on surface plasmon resonance*. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, vol. 74, no. 1-3, pages 106–111, 2001.
- [Smith 2004] A.M. Smith et S. Nie. *Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots*. *The Analyst*, vol. 129, no. 8, pages 672–677, 2004.
- [Splittgerber 1985] A.G. Splittgerber. *The Catalytic Function of Enzymes*. *Journal of Chemical Education*, vol. 62, no. 11, pages 1008–12, 1985.
- [Stetter 2003] J.R. Stetter, W.R. Penrose et S. Yao. *Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS*. *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 150, page S11, 2003.
- [Stone 1987] J. Stone. *Interactions of hydrogen and deuterium with silica optical fibers: A review*. *Lightwave Technology, Journal of*, vol. 5, no. 5, pages 712–733, 1987.
- [Storri 1998] S. Storri, T. Santoni, M. Minunni et M. Mascini. *Surface modifications for the development of piezoimmunosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 13, no. 3-4, pages 347–357, 1998.
- [Su 2003] M. Su, S. Li et V.P. Dravid. *Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes*. *Applied Physics Letters*, vol. 82, page 3562, 2003.
- [Subramanian 1999] A. Subramanian, S.J. Kennel, P.I. Oden, K.B. Jacobson, J. Woodward et M.J. Doktycz. *Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 24, no. 1-2, pages 26–34, 1999.
- [Tan 2005] K.M. Tan, C.M. Tay, S.C. Tjin, C.C. Chan et H. Rahardjo. *High relative humidity measurements using gelatin coated long-period grating sensors*. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, vol. 110, no. 2, pages 335–341, 2005.
- [Ternier 1998] E. Ternier, S. Magne, S. Rougeault, P. Ferdinand, B. Leconte, P. Bernage et P. Niay. *Caractérisation de réseaux de Bragg photo-inscrits*

- dans les fibres optiques dopées azote pour la mesure des hautes températures.* Actes Journées Nationales Optique Guidée, pages 355–357, 1998.
- [Tsuchida 1983] T. Tsuchida et K. Yoda. *Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum.* Clin Chem, vol. 29, no. 1, pages 51–5, 1983.
- [Vedam 1998] K. Vedam. *Spectroscopic ellipsometry: a historical overview.* Thin Solid Films, vol. 313, pages 1–9, 1998.
- [Vengsarkar 1996] A.M. Vengsarkar, P.J. Lemaire, J.B. Judkins, V. Bhatia, T. Erdogan et J.E. Sipe. *Long-period fiber gratings as band-rejection filters.* Lightwave Technology, Journal of, vol. 14, no. 1, pages 58–65, 1996.
- [Wade 2003] S.A. Wade, S.F. Collins et G.W. Baxter. *Fluorescence intensity ratio technique for optical fiber point temperature sensing.* Journal of Applied Physics, vol. 94, page 4743, 2003.
- [Wagner 1991] E. Wagner, M. Cotten, R. Foisner et M.L. Birnstiel. *Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells.* Proc Natl Acad Sci US A, vol. 88, no. 10, pages 4255–9, 1991.
- [Wang 2005a] Z. Wang, J.R. Heflin, R.H. Stolen et S. Ramachandran. *Highly sensitive optical response of optical fiber long period gratings to nanometer-thick ionic self-assembled multilayers.* Applied Physics Letters, vol. 86, page 223104, 2005.
- [Wang 2005b] Z. Wang, J.R. Heflin, K. Vancott, R.H. Stolen, S. Ramachandran et S. Ghalmi. *Ionic self-assembled multilayers adsorbed on long period fiber gratings for use as biosensors.* Lasers and Electro-Optics, 2005.(CLEO). Conference on, vol. 3, 2005.
- [Watson 1953] J.D. Watson et F.H.C. Crick. *Molecular structure of nucleic acids.* Nature, vol. 171, no. 4356, pages 737–738, 1953.
- [Weiller 2004] G.F. Weiller, G. Caraux et N. Sylvester. *The modal distribution of protein isoelectric points reflects amino acid properties rather than sequence evolution.* PROTEOMICS, vol. 4, no. 4, pages 943–949, 2004.
- [Wolfbeis 2004] O.S. Wolfbeis. *Fiber-optic chemical sensors and biosensors.* Anal. Chem, vol. 76, no. 12, pages 3269–3284, 2004.
- [Wong 2002] Y.Y. Wong, S.P. Ng, M.H. Ng, S.H. Si, S.Z. Yao et Y.S. Fung. *Immuno-sensor for the differentiation and detection of Salmonella species based on a quartz crystal microbalance.* Biosensors and Bioelectronics, vol. 17, no. 8, pages 676–684, 2002.

- [Wooler 2007] J.P.F. Wooler, B. Hodder et R.I. Crickmore. *Acoustic properties of a fibre-laser microphone*. Measurement Science and Technology, vol. 18, no. 3, pages 884–888, 2007.
- [Wu 1987] G.Y. Wu et C.H. Wu. *Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system*. J Biol Chem, vol. 262, no. 10, pages 4429–32, 1987.
- [Xiao 1996] S.J. Xiao, M. Textor, N.D. Spencer et H. Sigrist. *Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces*. Biomaterials, vol. 17, page 1101, 1996.
- [Xinglong 2003] Y. Xinglong, W. Dingxin et Y. Zibo. *Simulation and analysis of surface plasmon resonance biosensor based on phase detection*. Sensors & Actuators: B. Chemical, vol. 91, no. 1-3, pages 285–290, 2003.
- [Xu 1993] M.G. Xu, L. Reekie, Y.T. Chow et J.P. Dakin. *Optical in-fibre grating high pressure sensor*. Electronics Letters, vol. 29, no. 4, pages 398–399, 1993.
- [Yang 2004] J. Yang, M. Mayer, J.K. Kriebel, P. Garstecki et G.M. Whitesides. *Self-Assembled Aggregates of IgGs as Templates for the Growth of Clusters of Gold Nanoparticles*. Angew. Chem. Int. Ed, vol. 43, pages 1555–1558, 2004.
- [Yano 1999] K. Yano et I. Karube. *Molecularly imprinted polymers for biosensor applications*. Trends in Analytical Chemistry, vol. 18, no. 3, pages 199–204, 1999.
- [Ye 2004] L. Ye et K. Haupt. *Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 378, no. 8, pages 1887–1897, 2004.
- [Yelin 2006] D. Yelin, I. Rizvi, W.M. White, J.T. Motz, T. Hasan, B.E. Bouma et G.J. Tearney. *Three-dimensional miniature endoscopy*. Nature, vol. 443, no. 7113, page 765, 2006.
- [Zhao 2000] B. Zhao et W.J. Brittain. *Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules*. Progress in Polymer Science, vol. 25, no. 5, pages 677–710, 2000.
- [Zhou 2002] X. Zhou, L. Liu, M. Hu, L. Wang et J. Hu. *Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 27, no. 1-2, pages 341–345, 2002.
- [Zhou 2004] K. Zhou, X. Chen, L. Zhang et I. Bennion. *High-sensitivity optical chemsensor based on etched D-fibre Bragg gratings*. Electronics Letters, vol. 40, no. 4, pages 232–234, 2004.

[Ziegler 2004] C. Ziegler. *Cantilever-based biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 379, no. 7, pages 946–959, 2004.

Publications

Articles

S. Maguis, G. Laffont, P. Ferdinand, B. Carbonnier, K. Kham, T. Mekhalif et M.-C. Millot. *Biofunctionalized Tilted Fiber Bragg Gratings for label-free immunosensing*. Optics Express, vol. 16, no. 23, pages 19049-19062, 2008.

P. Ferdinand, S. Magne, G. Laffont, V. Dewynter, L. Maurin, C. Prudhomme, N. Roussel, M. Giuseffi et **S. Maguis**. *Application and trends at CEA LIST, OFS from Laboratory to field trials 2008*. Fiber and Integrated Optics, Special Issue: Fiber Optic Research in France, Part III of III, Guest Editor: Dominique Bosc and Monique Thual, vol. 28, no. 1, 2009.

Conférences

S. Maguis, G. Laffont, P. Ferdinand, M.-C. Millot et K. Kham. *Capteurs chimio-sélectifs à réseaux de Bragg*. OptDIAG 2007, 15-16 mai 2007, Abbaye du Val de Grâce, Paris, contribution poster.

S. Maguis, G. Laffont, P. Ferdinand, M.-C. Millot et K. Kham. *Capteurs biosélectifs à réseaux de Bragg*. 26èmes Journées Nationales d'Optique Guidée, JNOG 2007, 2-5 Juillet 2007, Saint-Martin d'Hères, contribution poster.

S. Maguis, G. Laffont, P. Ferdinand, M.-C. Millot et K. Kham. *Capteurs biosélectifs à réseaux de Bragg*. Colloque 2007 du Club « Contrôles et Mesures Optiques pour l'Industrie » de la Société Française d'Optique, 19-23 novembre 2007, Arcachon, contribution orale.

S. Maguis, G. Laffont, P. Ferdinand, M.-C. Millot, K. Kham et S. Péralta. *Tilted Fibre Bragg Gratings for the Specific Detection of Biological Species*. Optical Fibre Sensors 2008, 14-18 avril 2008, Perth, Australie, contribution poster.

S. Maguis, G. Laffont, B. Carbonnier, K. Kham, T. Mekhalif et P. Ferdinand. *Tilted Fiber Bragg Gratings for label-free biosensing*. The 21st Annual meeting of the IEEE Lasers & Electro-Optics Society, 9-13 novembre 2008, Californie, contribution orale.

Glossaire

Anticorps : un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les antigènes de manière spécifique. Exemples d'anticorps : l'anti-BSA détecte la BSA, l'anti-BLG détecte la BLG, l'anti-atrazine détecte l'atrazine.

Avidine : l'avidine et l'extravidine sont deux protéines qui présentent une très grande affinité pour leur substrat, la biotine. Il s'agit de l'interaction non covalente naturelle la plus forte connue à ce jour. Ces deux protéines sont également très robustes car relativement peu sensibles aux variations de pH et de température.

Antigène : un antigène est une macromolécule naturelle ou synthétique, reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire. Exemples d'antigènes naturels : la BSA, la BLG. Exemple d'antigène synthétique : l'atrazine.

Atrazine : l'atrazine, introduit en France au début des années 60 en raison de son faible coût, est un herbicide utilisé pour la culture du maïs. Son utilisation excessive est à l'origine de contaminations dans la plupart des eaux naturelles des régions présentant une forte activité agricole. Ses possibles effets toxicologiques sur l'environnement et la santé humaine (effet cancérigène) font de la détection de cet herbicide un enjeu de santé public.

Biotine : la biotine (ou vitamine H) est le substrat naturel de l'avidine et de ses protéines dérivées comme l'extravidine..

BLG : la BLG (β -lactoglobuline) est une protéine du lait. Elle est absente chez la femme (lait maternel), mais assez abondante chez la vache (de l'ordre de 2,5 à 3 g par litre de lait de vache), ce qui en fait une protéine très allergisante pour l'être humain, notamment chez les jeunes enfants. Elle peut entraîner des réactions très violentes chez les nouveau-nés âgés de moins d'un an.

BSA : la BSA (Albumine de Sérum Bovin) est l'une des protéines extraites du sérum de bovin et largement utilisée en laboratoire de biologie. Sa grande utilisation est due à sa stabilité et son faible coût : elle est disponible très facilement et en grande quantité étant donné qu'elle provient de sang de bovin purifié qui est un sous-produit de l'industrie bovine. C'est une protéine modèle qui ne présente a priori aucun intérêt d'un point de vue immunologique.

Complexe immun : Un complexe immun (ou complexe antigène-anticorps) résulte de la combinaison d'un antigène avec un anticorps dirigé spécifiquement contre lui. C'est la première étape de la réaction immunitaire.

DSS : dextrane sulfaté (sel de sodium), polyélectrolyte chargé négativement.

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide, utilisé en combinaison avec du N-hydroxysuccinimide (NHS) pour activer la fonction carboxyle (-COOH) lorsque celle-ci doit servir au greffage de molécules possédant la fonction amine primaire (-NH₂).

Extravidine : voir avidine.

Glycine : la glycine est un acide aminé qui, à pH acide, agit comme un inhibiteur de la liaison spécifique antigène-anticorps.

NHS : N-hydroxysuccinimide, utilisé en combinaison avec du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) pour activer la fonction carboxyle (-COOH) lorsque celle-ci doit servir au greffage de molécules possédant la fonction amine primaire (-NH₂).

PAA : poly(acide acrylique), polyélectrolyte chargé négativement.

PAH : poly(allylamine hydrochloride), polyélectrolyte chargé positivement.

PEI : poly(éthylèneimine), polyélectrolyte chargé positivement.

Surcompensation (des charges) : le moteur de la construction d'un film multicouche résulte de la surcompensation ou excès de charges qui accompagne chaque nouvelle addition de polyélectrolytes. Ainsi, le rajout d'un polyanion (respectivement polycation) sur un film se terminant par un polycation (respectivement polyanion) entraîne la neutralisation de l'excès de charges positives (respectivement négatives) et la création d'un nouvel excès de charges négatives (respectivement positives).

Résumé

Ces travaux s'inscrivent dans un projet de développement de solutions alternatives simples à mettre en œuvre destinées à la détection *in situ* de molécules dans les milieux aqueux. Aussi cette étude vise-t-elle à concevoir un modèle de Capteur à Fibres Optiques biosélectif fondé sur la technologie des réseaux de Bragg en angle, dits aussi réseaux blazés, composants « tout fibre » sensibles aux variations d'indice de réfraction du milieu qui les entoure. Ce type de réfractomètre devient potentiellement sensible vis-à-vis d'une unique molécule cible si la surface du substrat de silice que constitue la fibre optique est biofonctionnalisée, ce qui consiste à greffer, en surface du capteur, un biofilm conçu pour réagir de manière sélective. L'accrochage de la molécule cible sur le biofilm se traduit alors par des variations d'épaisseur et/ou d'indice du film qui se répercutent sur la réponse spectrale du réseau blazé. La partie sensible d'un tel réfractomètre intègre donc deux fonctions transductrices complémentaires : d'une part le biofilm permettant la détection sélective de la molécule cible en codant l'évènement sous forme d'une variation physique de la couche sensible, et d'autre part le réseau blazé transformant cette variation d'épaisseur / indice en une modification du spectre lumineux qu'il transmet.

Le couple BSA (albumine de sérum bovin) / anti-BSA a servi de modèle pour la mise au point de tels biocapteurs. L'implémentation d'une méthode de mesure de l'indice de réfraction rapide a contribué à l'amélioration des performances en termes de détection de molécules cibles à très faibles concentrations (10^{-5} voire 10^{-6} g/L). Aussi les résultats obtenus rendent-ils prometteur l'usage de la réfractométrie à réseau de Bragg en angle dans la réalisation de biocapteurs : ces travaux ont démontré que cette technique permet de suivre, en temps réel et sans usage de marqueurs, les interactions se déroulant en surface de la gaine optique. Leur poursuite pourrait permettre de mettre au point de nouvelles techniques de détection des polluants dans les milieux aquatiques.

Abstract

The purpose of this research work is to investigate the possibility of using tilted fiber Bragg grating technology to provide an alternative solution for molecular detection in aqueous solutions, suitable for *in situ* measurements and simpler to use than conventional monitoring instruments. As a tilted fiber Bragg grating is sensitive to any change in the refractive index of the medium surrounding the cladding, this refractometer can be used as a transducer for biosensing applications if the silica fiber surface is biofunctionalized. One of the great challenges to be met in the preparation of biosensors is the strategy for immobilization of the biospecific molecule onto the transducer. The binding of the target molecule to the immobilized probe results in changes in the thickness and/or the refractive index of the biofilm, which modulates the spectral response of the grating. The sensitive area of the refractometer combines two complementary functions: on the one hand, the biospecific biofilm enables one to detect the target molecule by converting binding events into physical changes of the sensitive layer; on the other hand, the tilted fiber Bragg grating translates this thickness / refractive index modification into a spectral modulation.

Bovine serum albumin (BSA) and anti-BSA are used to assess the performances of the tilted-fiber-Bragg-grating-based biosensors. The implementation of a fast measurement technique has contributed to improve the performances of the detection process for low concentrations of target molecules in solution (10^{-5} or 10^{-6} g/L). Therefore, the early results seem promising and could provide a conceptual basis for future research: it has been demonstrated that a label-free biosensor based on a tilted fiber Bragg grating is able to follow, in real time, biological interactions taking place at the surface of the sensitive biofilm. Therefore, this study provides a base for future work regarding, for instance, water pollution monitoring.

Titre : Biocapteurs à fibres optiques fondés sur les réseaux de Bragg en angle fonctionnalisés**Mots clés :** biocapteur ; fibre optique ; réseau de Bragg ; biofonctionnalisation**Title:** *Fiber optic biosensors based on functionalized tilted fiber Bragg gratings***Keywords:** *biosensor; optical fiber; Bragg grating; biofunctionalization***Résumé :**

Ces travaux s'inscrivent dans un projet de développement de solutions alternatives simples à mettre en œuvre destinées à la détection *in situ* de molécules dans les milieux aqueux. Aussi cette étude vise-t-elle à concevoir un modèle de Capteur à Fibres Optiques biosélectif fondé sur la technologie des réseaux de Bragg en angle, dits aussi réseaux blazés, composants « tout fibre » sensibles aux variations d'indice de réfraction du milieu qui les entoure. Ce type de réfractomètre devient potentiellement sensible vis-à-vis d'une unique molécule cible si la surface du substrat de silice que constitue la fibre optique est biofonctionnalisée, ce qui consiste à greffer, en surface du capteur, un biofilm conçu pour réagir de manière sélective. L'accrochage de la molécule cible sur le biofilm se traduit alors par des variations d'épaisseur et/ou d'indice du film qui se répercutent sur la réponse spectrale du réseau blazé. La partie sensible d'un tel réfractomètre intègre donc deux fonctions transductrices complémentaires : d'une part le biofilm permettant la détection sélective de la molécule cible en codant l'évènement sous forme d'une variation des propriétés physiques de la couche sensible, et d'autre part le réseau blazé transformant cette variation d'épaisseur / indice en une modification du spectre lumineux qu'il transmet. Le couple BSA (albumine de sérum bovin) / anti-BSA a servi de modèle pour la mise au point de tels biocapteurs. L'implémentation d'une méthode de mesure de l'indice de réfraction rapide a contribué à l'amélioration des performances en termes de détection de molécules cibles à très faibles concentrations (10^{-5} voire 10^{-6} g/L). Aussi les résultats obtenus rendent-ils prometteur l'usage de la réfractométrie à réseau de Bragg en angle dans la réalisation de biocapteurs : ces travaux ont démontré que cette technique permet de suivre, en temps réel et sans usage de marqueurs, les interactions se déroulant en surface de la gaine optique. Leur poursuite pourrait permettre de mettre au point de nouvelles techniques de détection des polluants dans les milieux aquatiques.

Direction de Recherche :

Directeur de Recherche CNRS, Jaffrezic-Renault Nicole

Nicole.Jaffrezic@univ-lyon1.fr

Laboratoire Ampère (CNRS UMR5005)<http://www.ampere-lab.fr>**Ecole Centrale de Lyon**36 avenue Guy de Collongue
69134 Ecully CEDEX (France)

Version électronique de cette thèse :

<http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00xxxxxxx>