

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 mai 2013 (02.05.2013)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/060988 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
G01N 21/55 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/052451
- (22) Date de dépôt international :
25 octobre 2012 (25.10.2012)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
11 59716 26 octobre 2011 (26.10.2011) FR
- (72) Inventeur; et
- (71) Déposant : MERCEY, Thibaut [FR/FR]; 123, rue du
Faubourg Saint-Antoine, F-75011 Paris (FR).
- (74) Mandataires : PERIN, Georges et al.; Cabinet Plasse-
raud, 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : MICROSTRUCTURED CHIP FOR SURFACE PLASMON RESONANCE ANALYSIS, ANALYSIS DEVICE CONTAINING SAID MICROSTRUCTURED CHIP AND USE OF SAID DEVICE

(54) Titre : PUCE MICROSTRUCTURÉE POUR ANALYSE PAR RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE, DISPOSITIF D'ANALYSE COMPRENANT LADITE PUCE MICROSTRUCTURÉE ET UTILISATION DUDIT DISPOSITIF

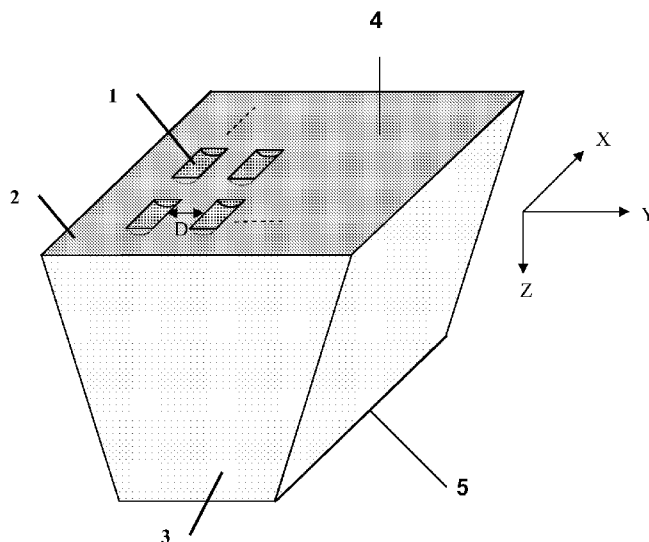


Figure 3

(57) Abstract : The present invention relates to a microstructured chip for surface plasmon resonance (SPR) analysis, taking the form of a solid formed by: a base; an upper surface, at least part of which is covered with a metal layer; and at least one side surface. The chip is characterised in that: the aforementioned upper surface (4; 44) is provided with at least two micrometric zones intended to receive species to be analysed, from among at least one cavity and/or at least one protrusion (1; 11; 41; 51; 61), said zones being separated from one another by planar surfaces; and at least one of said zones is different from the others.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une puce microstructurée pour analyse par résonance des plasmons de surface (SPR) se présentant sous la forme d'un solide constitué d'une base, d'une face supérieure dont au moins une partie est recouverte d'une couche métallique, et d'au moins une face latérale, caractérisée en ce que : la dite face supérieure (4; 44) est dotée d'au moins deux zones de taille micrométrique

[Suite sur la page suivante]

WO 2013/060988 A1

Puce microstructurée pour analyse par Résonance des Plasmons de Surface, dispositif d'analyse comprenant ladite puce microstructurée et utilisation dudit dispositif

5 **[Domaine de l'invention]**

La présente invention concerne une puce microstructurée pour analyse par Résonance des Plasmons de Surface, un dispositif d'analyse comprenant ladite puce microstructurée, un procédé d'analyse et les utilisations
10 dudit dispositif.

[Art antérieur]

La Résonance des Plasmons de surface (ou SPR pour « Surface Plasmon Resonance » en anglais) est une technique optique qui permet de détecter de fines variations de
15 propriétés physiques au voisinage immédiat d'une surface. Cette technique est surtout connue pour permettre de suivre en temps réel, et sans marqueur (de type fluorescent ou radioactif par exemple), des interactions biomoléculaires. Elle permet notamment de qualifier et quantifier des
20 interactions entre des ligands immobilisés sur une surface et des analytes en solution dans un échantillon.

La SPR est un phénomène physique d'excitation collective des électrons d'un métal sur une interface métal-milieu diélectrique (ledit milieu diélectrique étant
25 typiquement un milieu liquide ou un gaz). Pour une polarisation particulière de la lumière (polarisation Transverse Magnétique, ou « TM ») incidente sur cette interface (également dénommée « surface » dans la suite du texte) et pour un angle appelé « angle de résonance
30 plasmon », il se produit un phénomène de résonance se traduisant par le couplage de l'énergie lumineuse incidente à une onde de surface (dénommée « plasmon de surface ») se propageant parallèlement à l'interface. Ce phénomène physique se traduit par une chute de l'intensité de la

lumière réfléchiée par la surface. Cette excitation n'a lieu que pour des angles d'incidence sur la surface au-delà de l'angle critique de réflexion totale (qui ne peut exister que lorsqu'un rayonnement passe d'un milieu plus réfringent d'indice optique n_1 à un milieu moins réfringent d'indice optique n_2 , avec $n_1 > n_2$). Dans ce cas, le plasmon de surface va venir « sonder » l'épaisseur optique à la surface du métal, du côté du milieu diélectrique, l'épaisseur optique étant définie comme le produit de l'indice de réfraction par l'épaisseur. Quand ces conditions sont réunies, on peut alors dire que la surface est sensible à l'effet plasmon.

Typiquement un rayonnement incident arrive selon un angle d'incidence donné sur une des faces latérales d'une puce (en général un prisme dans l'état de l'art, car il s'agit de la méthode de couplage de la lumière sur la surface sensible la plus simple à utiliser) dont une des faces est recouverte d'une couche métallique, ledit rayonnement incident est réfracté lorsqu'il entre dans le prisme (du fait de la différence d'indice optique entre le milieu constituant le prisme et le milieu optique précédent, en général de l'air) et vient se réfléchir sur ladite surface métallique. Cette configuration est bien connue de l'homme de l'art sous le nom de configuration de Kretschmann (*E. Kretschmann, The determination of the Optical Constants of Metals by Excitation of Surface Plasmons, Z Physik 241:313-324 (1971)*). Des configurations équivalentes existent également en remplaçant le prisme par un réseau de diffraction pour coupler la lumière (configuration de Raether : *H. Raether in "Surface Polaritons", Eds. Agranovich and Mills, North Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1982*).

Le phénomène de SPR peut permettre en outre d'étudier des interactions biomoléculaires. Dans ce cas, des ligands sont préalablement immobilisés sur la surface métallique du

prisme dans des zones définies. Ainsi, tout accrochage ultérieur d'autres molécules avec ces ligands va modifier localement l'épaisseur optique au niveau desdites zones définies, et va donc provoquer des variations des conditions de résonance et donc un déplacement de l'angle de résonance. Ce déplacement est, en première approximation, proportionnel à la quantité de matière biologique qui est venue interagir avec les ligands. Ainsi, des petites molécules vont provoquer un faible déplacement de l'angle d'incidence tandis que des molécules plus grosses vont induire un décalage angulaire bien plus important. C'est l'étude des variations de réflectivité optique liées au phénomène de résonance qui va permettre de détecter et mesurer des interactions biomoléculaires et leur évolution temporelle au niveau des zones définies.

En outre, d'autres méthodes optiques permettent également de réaliser de tels phénomènes physiques sans marqueur (miroir résonnant, interférométrie, ondes acoustiques de surface, microbalance à quartz), mais ces techniques nécessitent des appareillages coûteux et inadaptés à des applications industrielles concrètes.

[Problème technique]

Les systèmes actuels de SPR sont encombrants, coûteux et difficiles à mettre en œuvre et ne permettent donc pas de réaliser des analyses à de faibles coûts. En effet, la plupart des systèmes actuellement commercialisés nécessitent des stratégies de mesure compliquées et ne permettent des mesures que sur une zone bien précise (quasi-ponctuelle) de la surface. Les dispositifs qui permettent des analyses de plusieurs zones en parallèle sont très complexes et présentent des pièces mécaniques en mouvement, rendant ainsi le système encombrant et difficile à utiliser.

C'est pourquoi, depuis plusieurs années, de nombreuses recherches scientifiques sont dédiées au développement de dispositifs optiques SPR performants, économiques et faciles à mettre en œuvre.

5 Le document US5313264 (Ivarsson et al) décrit un dispositif SPR utilisant une interrogation dite « angulaire » dans lequel la surface à étudier est excitée avec un faisceau convergent et l'intensité du faisceau réfléchi est observée sur un détecteur. Cette technique ne
10 permet cependant pas de réaliser l'étude de plusieurs zones en parallèle, à moins de juxtaposer plusieurs détecteurs (on parle d'analyse essentiellement « mono-point »).

Le document "Designing a curved surface SPR device, J Rooney et E.A.H.Hall, Sensors and Actuators B 114 (2006)
15 804-811" décrit un dispositif qui permet de détecter une interaction biomoléculaire sur un substrat sphérique courbe concave. Bien que ce document suggère de juxtaposer 8 fois ledit dispositif, les éléments de détection du dispositif sont également multipliés 8 fois, ce qui rend le dispositif
20 final onéreux et encombrant.

Les documents US6862094 (Johansen et al) et US7576863 (Weibel et al) décrivent un dispositif SPR qui utilise non pas une interrogation angulaire mais une interrogation en longueur d'onde à l'aide d'un monochromateur ou d'une
25 source de lumière blanche. Ces dispositifs permettent d'étudier plusieurs interactions biomoléculaires en parallèle mais comportent des pièces en mouvement, ce qui augmente les opérations de maintenance sur le système, et donc le coût global pour l'utilisateur.

30 Il existe également des dispositifs SPR permettant de réaliser de l'imagerie et de suivre à angle d'incidence et longueur d'onde fixés, l'évolution des interactions biomoléculaires dans des zones définies sur une puce. Les documents US 7678584 (Guédon et al), US 7576863 (Weibel et

al), US 7551286 (Tani et al) présentent de tels dispositifs SPR. Bien que ces dispositifs permettent une analyse de plusieurs interactions en parallèle, ils présentent des pièces en mouvement ou ne permettent pas une analyse fine
5 de l'interaction lorsqu'aucune pièce ne bouge.

De plus, dans tous les dispositifs décrits précédemment, il est pratiquement impossible d'étudier en même temps, sur une même puce, des espèces biologiques de tailles différentes puisque la sensibilité de détection
10 dépend de la taille de l'objet recherché, et un même angle d'analyse ne peut être optimisé pour détecter à la fois des petites molécules (diamètre de l'ordre de quelques nm à quelques dizaines de nm) et des éléments plus volumineux, comme par exemple des bactéries (diamètre de l'ordre de
15 quelques centaines de nm à quelques μm). A cela s'ajoute le fait que la dynamique de mesure angulaire, fixée par conception pour les systèmes actuellement disponibles, ne permet pas une flexibilité suffisante pour étudier des espèces biologiques de natures ou en concentrations très
20 différentes. En effet, la position angulaire optimale pour étudier les interactions biomoléculaires sur chaque zone définie d'une puce peut être différente et est liée à (au moins) trois paramètres différents que sont (i) le type de chimie de surface utilisée pour l'immobilisation des
25 espèces biologiques de capture, (ii) l'épaisseur (optique) des zones définies à l'analyse ainsi constituées et (iii) le type de cible qui va potentiellement interagir avec les espèces immobilisées (par exemple des ligands).

Ainsi, l'optimum de sensibilité du plasmon, ainsi que
30 sa dynamique de mesure angulaire, vont demeurer inaccessibles pour certains dispositifs de l'état de l'art, ou alors il faudra mettre en place des stratégies d'analyse beaucoup plus sophistiquées et coûteuses : pièces mobiles en mouvement, ou encore système d'imagerie plus complexe,

ce qui nécessite des réglages récurrents et rend les dispositifs compliqués à contrôler et à utiliser.

De plus, tous les dispositifs décrits précédemment utilisent des puces qui sont onéreuses de par leur procédé
5 de fabrication. Par ailleurs, comme la majorité des dispositifs sont des dispositifs « mono-point », le prix par point d'analyse est important.

Par ailleurs, on peut également citer dans l'état de l'art le document WO2009/021964A2 (Macraith and al) qui
10 décrit une plate-forme optique destinée à détecter des analytes par fluorescence. Dans ce document, la surface plane supérieure d'un réseau de protubérances de forme parabololoïde est métallisée puis fonctionnalisée par des espèces biologiques. Puis, un signal de fluorescence est
15 excité grâce à un effet plasmonique généré par la géométrie parabololoïde des protubérances, qui permet d'obtenir un faisceau incident sur ladite surface plane métallisée au-delà de l'angle critique.

Cependant, dans ce document, aucune information ne
20 peut être déduite directement des caractéristiques de l'onde plasmon elle-même car elle ne sert qu'à l'émission indirecte de lumière par luminescence. De plus, la surface utile de détection est une surface plane métallisée, et ne permet que de réaliser une analyse à un angle θ précis.

Enfin, il existe également dans l'état de l'art de
25 nombreux documents décrivant des puces présentant des nanostructures à leur surface, qui pour certaines d'entre elles, utilisent le phénomène physique des plasmons de surface localisés (LSPR). A titre d'exemple, le document
30 "*Grating coupler integrated photodiodes for plasmon resonance based sensing, B. Turker and al., Conference on lasers and Electro-Optics 2011*" décrit des biopuces disposant à leur surface de nanostructures agencées selon

un réseau périodique. Ce réseau de nanostructures est utilisé pour coupler une lumière incidente à l'onde plasmon de l'interface métal/diélectrique du réseau. Le document "Localised plasmons in gold photonic nanocavities, S. Coyle and al., Quantum Electronics and Laser Science Conference 2002" présente quant à lui une surface nanostructurée avec des nanocavités d'or. Ces nanocavités d'or mettent en jeu le phénomène physique des plasmons de surface localisés (LSPR) qui diffère du phénomène SPR et qui mène à une amplification des signaux plasmoniques.

Ainsi, dans les deux documents précités, non seulement la réalisation de réseaux et de cavités à une échelle nanométrique est difficile, mais aussi il est nécessaire de faire appel à des pièces mobiles pour évaluer la variation de réflectivité de la couche métallique en fonction de l'angle d'incidence du faisceau lumineux.

Il existe donc un réel besoin en un dispositif SPR compact, économique, ne présentant pas de pièce en mouvement, simple à mettre en œuvre et permettant d'analyser avec une sensibilité de mesure adaptée et optimisée plusieurs interactions en parallèle.

[Description de l'invention]

Le présent inventeur a trouvé qu'un dispositif d'analyse par SPR comprenant une puce microstructurée présentant une architecture particulière permettait de répondre à ces exigences.

On utilisera indifféremment le terme « puce » ou « puce microstructurée » dans la suite du texte.

On utilisera indifféremment le terme, « rayonnement » ou « faisceau » dans la suite du texte.

La figure 1 représente en coupe des cavités selon différents modes de réalisation de l'invention.

La figure 2 représente en coupe des protubérances selon différents modes de réalisation de l'invention.

La figure 3 représente une puce microstructurée selon l'invention dotée de cavités disposées sous forme de matrice.

La figure 4 représente la face supérieure d'une puce
5 microstructurée selon l'invention dotée de cavités disposées sous forme de goulottes le long de l'axe X.

La figure 5 représente en coupe une cavité sans tilt irradiée par un rayonnement incident monochromatique collimaté et polarisé.

10 La figure 6 représente en coupe une cavité présentant un tilt d'un angle β , irradiée par un rayonnement incident monochromatique collimaté et polarisé.

La figure 7 représente une puce selon un mode de réalisation de l'invention qui présente des distances
15 séparant les surfaces planes entre les protubérances et la base différentes.

La figure 8 représente un dispositif comprenant une puce microstructurée présentant des distances entre les surfaces inter-cavités et la base identiques.

20 La figure 9 représente un dispositif comprenant une puce microstructurée présentant des distances entre les surfaces inter-cavités et la base différentes.

La figure 10 montre une courbe plasmon représentative de différentes plages angulaires étudiées (sans tilt).

25 La figure 11 montre une courbe plasmon représentative de différentes plages angulaires étudiées (avec tilt).

La figure 12 représente un exemple d'image sur une caméra de 3 cavités d'une puce microstructurée selon l'invention.

30 La figure 13 représente une puce selon l'invention comprenant 16 cavités dont au moins une est différente des autres.

La figure 14 représente le pourcentage de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence θ .

La figure 15 représente les courbes plasmons avant et après accrochage de la bactérie *Escherichia coli* sur les protubérances fonctionnalisées avec des ligands spécifiques de la bactérie.

5 La figure 16 représente les courbes plasmons avant et après accrochage des shigatoxines sur les protubérances fonctionnalisées avec des ligands spécifiques des shigatoxines.

10 La figure 17 représente en coupe une puce selon un mode de réalisation dans lequel la puce est accolée à un prisme.

Puce microstructurée

Un premier objet de l'invention est une puce microstructurée pour analyse par résonance des plasmons de surface (SPR) se présentant sous la forme d'un solide
15 constitué d'une base, d'une face supérieure dont au moins une partie est recouverte d'une couche métallique, et d'au moins une face latérale, caractérisée en ce que :

- ladite face supérieure est dotée d'au moins deux
20 zones de taille micrométrique choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance destinées à recevoir des espèces à analyser ; lesdites zones étant séparées les unes des autres par des surfaces planes; et

- au moins une desdites zones est différente des
25 autres.

Par « puce microstructurée », on entend une puce présentant des zones de taille micrométrique destinées à recevoir des espèces à analyser. Ainsi, la puce n'est pas nécessairement de taille micrométrique mais comprend des
30 zones qui sont de taille micrométrique.

Par « zones de taille micrométrique », on entend des zones qui présentent au moins deux dimensions sur trois de taille micrométrique, lesdites dimensions micrométriques

allant de $1\mu\text{m}$ à $1000\mu\text{m}$, et préférentiellement de $10\mu\text{m}$ à $500\mu\text{m}$.

La troisième dimension de la zone n'est donc pas nécessairement micrométrique et peut présenter des distances comprise par exemple entre 1mm et 20mm, de préférence entre 1mm et 10mm.

Les zones selon l'invention présentent des géométries particulières sous la forme de cavités et/ou de protubérances qui seront décrites par la suite. Ce sont au niveau de ces zones recouvertes d'une couche métallique que l'effet plasmon sera observé.

Selon l'invention, la puce comprend un nombre de zones compris entre 2 et 500000, de préférence entre 10 et 10000 et plus préférentiellement entre 25 et 400.

Selon l'invention, au moins une partie de la face supérieure est revêtue de la couche métallique. Elle représente la surface utile de détection (appelée également surface sensible par la suite). Selon l'invention, au moins deux zones de taille micrométrique choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance sont revêtues de la couche métallique.

Selon un mode de réalisation particulier, la face supérieure de la puce est entièrement recouverte par la couche métallique.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier combiné au précédent, non seulement les zones mais également les surfaces planes séparant lesdites zones sont destinées à recevoir des espèces à analyser.

Pour faciliter la description qui suit, le référentiel orthonormé direct (XYZ) est utilisé dans lequel les surfaces planes séparant les zones sont parallèles au plan (XY) et dans lequel l'axe Z est orienté vers le bas.

Par « surfaces planes », on entend des surfaces planes ou sensiblement planes pouvant présenter quelques défauts.

La surface plane séparant deux zones destinées à recevoir des espèces à analyser est appelée surface inter-zones. Ainsi, on utilisera indifféremment les termes suivants : surfaces planes ou surfaces inter-zones ou encore surfaces planes inter-zones. Plus spécifiquement :

- lorsque la surface plane sépare deux zones qui sont des cavités, on parle de surface inter-cavité;
- lorsque la surface plane sépare deux zones qui sont des protubérances, on parle de surface inter-protubérances;
- et
- lorsque la surface plane sépare une zone qui est une cavité et une autre zone qui est une protubérance, on parle de surface inter-cavité-protubérance.

Selon un mode de réalisation, les zones sont disposées sous la forme d'une matrice sur la face supérieure de la puce. Ainsi, les surfaces planes séparent les zones à la fois selon l'axe X et l'axe Y.

Selon un autre mode de réalisation, les zones sont disposées sous forme de goulottes continues le long de la face supérieure de la puce. Ainsi, selon ce mode de réalisation, les surfaces planes séparent les zones selon l'axe X ou selon l'axe Y.

Selon un mode de réalisation, les zones sont séparées d'une distance D selon l'axe Y et d'une distance D' selon l'axe X par les surfaces planes (ou surfaces inter-zones); D et D'étant compris entre 0 μ m (dans le cas d'une goulotte continue selon l'un des axes X ou Y) et 5mm, de préférence entre 50 μ m et 5mm, de préférence entre 200 et 1000 μ m et de manière particulièrement préférée entre 300 et 700 μ m.

Selon un mode de réalisation, les zones sont séparées d'une distance centre à centre CTC comprise entre 10 μ m et 25000 μ m, de préférence entre 50 μ m et 5000 μ m et plus préférentiellement entre 100 μ m et 1000 μ m.

Selon un mode de réalisation, les surfaces planes appartiennent à des plans parallèles au plan (XY); la face supérieure se présente alors sous la forme de marches d'escalier.

5 Selon un autre mode de réalisation, les surfaces planes appartiennent à un même plan (XY) (c'est à dire Z est constant).

Par « au moins une desdites zones est différente des autres », on entend :

- 10 - au moins une zone présentant une nature différente par rapport aux autres zones de la puce; et/ou
- au moins une zone présentant une dimension différente par rapport aux autres zones de la puce; et/ou
- au moins une zone présentant une orientation différente
- 15 par rapport aux autres zones de la puce; et/ou
- au moins une distance entre une surface inter-zone et la base de la puce est différente des autres distances inter-zones et base de la puce. Par « distances entre une surface inter-zones et la base de la puce », il est
- 20 fait référence aux hauteurs de la puce, c'est-à-dire la longueur de la perpendiculaire reliant la surface inter-zones et la base ou une prolongation de la base.

Par « nature différente », on entend soit une zone se présentant sous la forme d'une cavité, soit une zone se

25 présentant sous la forme d'une protubérance.

Par « dimension différente », on entend une zone présentant, par exemple, une longueur L différente et/ou une largeur l différente et/ou un diamètre d différent et/ou un rayon de courbure moyen R différent des autres

30 zones.

Il est à noter ainsi, qu'une zone Z1 présentant la même géométrie qu'une autre zone Z2 (par exemple Z1 et Z2 étant de forme rectangulaire avec Z1 présentant une largeur l1 et une longueur L2 et Z2 une largeur l2 et une longueur

L2) mais qui présenterait des dimensions différentes (par exemple $l_1=l_2$ et $L_1<L_2$) serait considérée, au sens de l'invention, comme différente de la zone Z2.

Par « orientation différente », on entend une zone Z1' présentant un tilt (ou basculement) d'un angle β_1' par rapport à une surface plane adjacente différent de celui d'une autre zone de la puce Z2' présentant un tilt d'un angle β_2' avec $\beta_1' \neq \beta_2'$.

Ainsi, selon un mode de réalisation, la puce est dotée uniquement de zones qui sont des cavités. Dans ce cas, puisque les zones sont de même nature, nécessairement au moins une des cavités présente une dimension différente des autres et/ou une orientation différente des autres et/ou au moins une des distances entre les surfaces inter-cavités et la base de la puce est différente.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la puce est dotée uniquement de zones qui sont des protubérances. Dans ce cas, puisque les zones sont de même nature, nécessairement au moins une des protubérances présente une dimension différente des autres et/ou une orientation différente des autres et/ou au moins une des distances entre les surfaces inter-protubérances et la base de la puce est différente.

Enfin, selon encore un autre mode de réalisation particulier, la puce est dotée de zones dont au moins une est une cavité et une autre est une protubérance. Dans ce mode de réalisation particulier, une zone diffère de l'autre seulement par sa nature.

Selon un mode de réalisation, lorsque la puce comporte au moins une cavité et au moins une protubérance, alors, au moins une des cavités et/ou protubérances présente une dimension différente des autres et/ou une orientation différente des autres et/ou au moins une des distances entre les surfaces inter-protubérances et/ou inter-cavité

et/ou inter-cavité-protubérance et la base de la puce est différente.

Par « cavité », on entend un creux dans la face supérieure de la puce, le dit creux se trouvant entre deux surfaces planes (appelées également surface inter-zones).

La cavité peut être définie soit en 3 dimensions (repère XYZ) soit en 2 dimensions (coupe dans un plan).

Ainsi, on appelle cavité, un volume dont toutes les coordonnées se trouvent sous un plan fictif reliant les deux surfaces planes inter-zones adjacentes à ladite cavité.

Par la suite, la cavité sera décrite dans le plan (YZ).

Ainsi, une cavité selon l'invention, décrite dans le plan (YZ), est définie par au moins une courbe de rayon de courbure R moyen et/ou au moins une droite.

Lorsque la cavité est définie uniquement par une courbe, alors la courbe est nécessairement concave (c'est-à-dire rayon de courbure selon l'axe -Z).

Lorsque la cavité est définie par au moins une courbe et au moins une droite, alors la courbe peut être soit concave, soit convexe (c'est-à-dire rayon de courbure selon l'axe +Z).

Selon un mode de réalisation particulier, la cavité est définie par deux droites séparées par une courbe.

Selon un mode de réalisation particulier combiné au précédent, les deux droites sont parallèles.

Selon un autre mode de réalisation pouvant être combiné au précédent, les deux droites présentent des dimensions différentes.

Par « protubérance », on entend une excroissance sur la face supérieure de la puce, ladite excroissance se trouvant entre deux surfaces planes (appelées également surface inter-zones).

La protubérance peut être définie soit en 3 dimensions (repère XYZ) soit en 2 dimensions (coupe dans un plan).

Ainsi, on appelle protubérance, un volume dont toutes les coordonnées se trouvent au-dessus d'un plan fictif
5 reliant les deux surfaces planes inter-zones adjacentes à ladite protubérance.

Par la suite, la protubérance sera décrite dans le plan (YZ).

Ainsi, une protubérance selon l'invention, décrite
10 dans le plan (YZ), est définie par au moins une courbe de rayon de courbure R moyen et/ou au moins une droite.

Lorsque la protubérance est définie uniquement par une courbe, alors la courbe est nécessairement convexe (c'est-à-dire rayon de courbure selon l'axe +Z).

Lorsque la protubérance est définie par au moins une
15 courbe et au moins une droite, alors la courbe peut être soit concave (c'est-à-dire rayon de courbure selon l'axe -Z), soit convexe.

Selon un mode de réalisation particulier, la
20 protubérance est définie par deux droites séparées par une courbe.

Selon un mode de réalisation particulier combiné au précédent, les deux droites sont parallèles.

Selon un autre mode de réalisation pouvant être
25 combiné au précédent, les deux droites présentent des dimensions différentes.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulièrement préféré, les zones de la puce (cavités et/ou protubérances), décrites dans le plan (YZ), sont définies
30 uniquement par une courbe de rayon de courbure moyen R (concave pour une cavité et convexe pour une protubérance); le rayon de courbure R étant compris entre 0,1mm et 600mm, de préférence entre 0,3mm et 300mm.

A titre d'exemple, on peut citer des cavités et/ou des protubérances de forme semi-sphérique, semi-elliptique ou semi-cylindrique (repère (XYZ)).

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention,
5 les cavités et/ou les protubérances présentent une forme semi-cylindrique dans le repère (XYZ).

Selon un mode de réalisation particulier, le rayon de courbure des zones (i.e. des cavités et/ou des protubérances) est perpendiculaire au plan (XY), c'est-à-dire selon l'axe Z.
10

Selon un autre mode de réalisation, le rayon de courbure des zones n'est pas perpendiculaire au plan (XY) (c'est-à-dire, les cavités et/ou protubérances présentent un basculement).

15 Selon l'invention, la base de la puce peut être une surface plane ou courbe, ou une arête, ou un point.

Selon un mode de réalisation préféré, la base de la puce est une surface plane qui, de manière préférée, est parallèle aux surfaces planes (appelées aussi surfaces
20 inter-zones).

Selon un autre mode de réalisation pouvant être combiné au précédent, les surfaces planes appartiennent au même plan (XY). Autrement dit, si la base est parallèle aux dites surfaces planes, les distances entre les surfaces
25 planes et la base de la puce sont identiques. Dans ce cas, on dit que la face supérieure est parallèle à la base.

Selon un autre mode de réalisation, les surfaces planes appartiennent à de multiples plans parallèles au plan (XY). Autrement dit, si la base est parallèle aux
30 dites surfaces planes, les distances entre les surfaces planes et la base de la puce sont différentes (face supérieure en forme de marche d'escalier).

Selon l'invention, la (ou les) face(s) latérale(s) de la puce peut (peuvent) être plane(s) (perpendiculaire(s) ou

non à la base et/ou à la face supérieure de la puce) ou courbe(s).

Selon un mode de réalisation préféré, la (ou les) face(s) latérale(s) de la puce est (sont) plane(s).

5 Selon un autre mode de réalisation préféré, au moins une face latérale de la puce est perpendiculaire à la base et/ou à la face supérieure.

10 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la puce est accolée à un prisme bien connu de l'état de l'art.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, la puce se présente sous la forme d'un parallélépipède (c'est-à-dire une puce présentant des surfaces planes appartenant à un même plan (XY) et une base parallèle aux dites surfaces planes). Selon ce mode de réalisation, les hauteurs des surfaces latérales sont de faibles dimensions de l'ordre de 0,1mm à 20mm, de préférence de 1mm à 10mm).

15 Par espèces à analyser, on entend par exemple des matériaux, des gaz ou des espèces biologiques telles que de l'ADN simple ou double-brin, des protéines, des bactéries, des toxines, des virus, des mycoplasmes, des agents chimiques ou toute autre espèce biologique ou chimique susceptible d'interagir avec d'autres espèces biologiques ou chimiques.

25 Selon un mode de réalisation préféré, les espèces à analyser sont des espèces biologiques, telles que des bactéries pathogènes comme *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, ou encore *Campylobacter spp.*

30 Le présent inventeur a démontré qu'il était possible en utilisant la puce selon l'invention d'étudier avantageusement des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (STEC), car elle permet l'analyse

simultanée de grosses molécules (bactéries elles-mêmes), mais également de petites toxines qu'elles produisent.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cavités et/ou protubérances sont fonctionnalisées avec différents anticorps monoclonaux
5 spécifiques de biomarqueurs.

La figure 1 représente une coupe selon le plan (ZY) d'une cavité selon différents modes de réalisation. Sur chacune de ces figures, la cavité est représentée par une surface dans le plan (XY) (ou par un volume dans le repère
10 XYZ) dont tous les points se situent au-dessous (Z positif) d'une droite fictive représentée en pointillée (ou plan fictif dans le repère XYZ pour un volume) reliant les deux surfaces planes adjacentes à la cavité

- 15 - dans le cas a) : la cavité est définie uniquement par une courbe de forme concave de rayon de courbure R; (c'est-à-dire présentant un rayon de courbure selon l'axe -Z);
- dans le cas b) : la cavité est définie par deux droites
20 parallèles séparées par une courbe de forme concave de rayon de courbure R;
- dans le cas c) : la cavité est définie par deux droites parallèles séparées par une courbe de rayon de courbure R de forme convexe (c'est-à-dire présentant un rayon de
25 courbure selon l'axe +Z).

La figure 2 représente une coupe selon le plan (ZY) d'une protubérance selon différents modes de réalisation. Sur chacune de ces figures, la protubérance est représentée par une surface dans le plan (XY) (ou par un
30 volume dans le repère XYZ) dont tous les points se situent au-dessus (Z négatif) d'une droite fictive représentée en pointillée (ou plan fictif dans le repère XYZ pour un volume) reliant les deux surfaces planes adjacentes à la protubérance :

- dans le cas a) : la protubérance est définie uniquement par une courbe de forme convexe de rayon de courbure R (c'est-à-dire présentant un rayon de courbure selon l'axe $+Z$);
- 5 - dans le cas b) : la protubérance est définie par deux droites parallèles séparées par une courbe de rayon de courbure R de forme convexe;
- dans le cas c) : la protubérance est définie par deux droites parallèles séparées par une courbe de rayon de courbure R de forme concave (c'est-à-dire présentant un
10 rayon de courbure selon l'axe $-Z$).

La figure 3 représente une puce microstructurée 3 dont la face supérieure 4 comprenant les surfaces planes inter-cavités est parallèle à la base 5 de la puce 3. La face
15 supérieure 4 est recouverte d'une couche métallique 2 et est dotée de cavités 1 sensibles à l'effet plasmon, destinées à recevoir des espèces à analyser.

Sur la figure 3, les cavités 1 sont séparées les unes des autres d'une distance D selon l'axe Y et d'une distance
20 D' selon l'axe X par des surfaces planes (appelées également surfaces inter-cavités).

La puce microstructurée 3 peut être réalisée en tout type de matériaux permettant la propagation de la lumière. On peut citer par exemple, du verre, un cristal ou des
25 matières plastiques.

Selon un mode de réalisation préféré, pour des raisons de coût, la puce 3 est réalisée en matière(s) plastique(s) comme par exemple le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), le PC (Polycarbonate), le PS (Polystyrène), le SU-8 (résine
30 photosensible négative à base d'époxy) ou le PDMS (Polydiméthylsiloxane).

Selon un mode de réalisation particulier, lorsque la puce est accolée à un prisme, elle peut être réalisée dans un matériau différent de celui du prisme.

La couche métallique 2 qui recouvre la couche supérieure 4 de la puce 3 (et en particulier les cavités 1) peut être réalisée avec divers métaux tels que l'or, l'argent, le platine ou l'aluminium.

5 Selon un mode de réalisation préféré, en raison de ses très bonnes propriétés anti-corrosives, la couche métallique 2 est en or.

L'épaisseur de la couche métallique 2 est comprise entre 10 et 200nm, de préférence entre 30 et 100 nm et plus
10 préférentiellement encore entre 40nm et 50nm.

Selon un autre mode de réalisation combiné aux précédents, une fine couche de chrome est utilisée comme couche de pré-accrochage de l'or sur la face supérieure 4 de la puce 3.

15 La figure 4 représente la face supérieure d'une puce microstructurée selon l'invention entièrement recouverte d'une couche métallique 2, ladite puce microstructurée est dotée de cavités qui sont disposées sous forme de goulottes le long de l'axe X formant ainsi 4 colonnes C_1 - C_4 . Dans la
20 figure 4, d représente le diamètre de la goulottes et CTC représente la distance centre à centre entre deux goulottes successives.

La puce selon l'invention permet d'adapter la sensibilité de chaque zone (c'est-à-dire de chaque cavité
25 et/ou protubérance) afin d'étudier des espèces biologiques très différentes.

Selon un mode de réalisation, au moins une desdites zones présente un rayon de courbure différent des autres. La figure 5 représente un agrandissement en coupe de la
30 figure 3 de la cavité de surface courbe 1 de la puce 3 (recouverte de la couche métallique 2) qui est irradiée par un faisceau monochromatique collimaté d'angle d'incidence θ et polarisé linéairement suivant la polarisation TM.

La cavité, de forme semi-cylindrique (dans le repère XYZ), présentant une surface définie par une unique courbe (dans le plan ZY) sur les figures 3 et 5, est caractérisée par son rayon de courbure R et par les deux demi-angles α (définissant ainsi un angle total de 2α).

Le rayon de courbure R et le demi-angle α vont ainsi définir la longueur de la corde d, ou encore le diamètre de ladite cavité.

Du fait de la réflexion sur la surface sensible (ou cavité 1), l'angle d'incidence sur les deux extrémités A et C vont être respectivement, pour un angle d'incidence moyen du faisceau collimaté de θ , de $\theta_1 = \theta + 2\alpha$, $\theta_2 = \theta$ et $\theta_3 = \theta - 2\alpha$. Ainsi, le faisceau réfléchi (θ_1 pour le point A, θ_2 pour le point B, θ_3 pour le point C) par ladite cavité 1 présente une largeur angulaire $\Delta\theta$ ($\Delta\theta = \theta_1 - \theta_3$) égale à 4α , centrée autour de l'angle θ_{moyen} (correspondant à l'angle θ_2 sur la figure 5).

Le choix du rayon de courbure R de chaque cavité et/ou protubérance de la puce selon l'invention est très important car il va déterminer, en fonction des paramètres physiques essentiels (indice optique de la puce n_p , indice optique du milieu diélectrique extérieur n_e , angle d'incidence moyen du faisceau collimaté θ et la taille des espèces biologiques que l'on souhaite analyser), la sensibilité et la dynamique angulaire de la mesure pour chaque cavité et/ou protubérance.

Par « dynamique angulaire de la mesure », on entend la plage angulaire qui va pouvoir être visualisée lors des analyses.

Par « sensibilité », on entend la plus petite variation d'épaisseur optique qu'on va pouvoir mesurer sur la surface sensible.

En effet, si le rayon de courbure est très grand, on va se rapprocher d'un plan, donc les angles θ_1 et θ_3 seront

très proches (la plage angulaire d'analyse $\Delta\theta$ sera donc très petite) rendant cette configuration particulièrement adaptée à l'analyse de petites molécules (c'est-à-dire une bonne sensibilité). A l'opposé, un rayon de courbure très
5 petit permettra d'observer la courbe plasmon dans son ensemble, avec certes une sensibilité de mesure plus faible mais plus adaptée à l'analyse de grosses molécules.

Selon un autre mode de réalisation pouvant être combiné au précédent, au moins une desdites zones présente
10 un tilt (ou basculement) d'un angle β .

Selon ce mode de réalisation, le rayon de courbure est dévié par rapport à l'axe Z.

La figure 6 représente un agrandissement en coupe d'une cavité de surface courbe 41 d'une puce 43 (dont la
15 face supérieure est recouverte d'une couche métallique 42) qui présente un tilt d'un angle β et qui est irradiée par un faisceau collimaté avec un angle d'incidence moyen θ monochromatique et polarisé linéairement suivant la direction Transverse Magnétique TM.

Dans le cas d'un tilt β de la surface sensible (ici de
20 la cavité) par rapport à la perpendiculaire au plan moyen de la surface sensible, le plan moyen étant défini comme le plan parallèle aux surfaces planes inter-cavités, le faisceau réfléchi présente encore une largeur angulaire $\Delta\theta$
25 égale à 4α , mais cette fois-ci centrée autour de l'angle moyen γ'_{moyen} (représenté par θ'_2 sur la figure 6) tel que $\gamma'_{\text{moyen}} = \theta - 2\beta$ pour une surface concave.

Selon un mode de réalisation, l'angle β est défini de la façon suivante : $0^\circ < \beta \leq 80^\circ$, de préférence $15^\circ \leq \beta \leq 45^\circ$.

Il est ainsi possible selon l'invention d'ajuster,
30 pour chacune des zones, à la fois la largeur angulaire étudiée (grâce au choix du rayon de courbure), mais aussi l'angle moyen (c'est-à-dire θ_2 ou θ'_2 représenté sur les figures 5 et 6 selon que la cavité soit tiltée ou pas) de

cette plage angulaire, permettant ainsi d'adapter la sensibilité de mesure pour différentes espèces au sein d'une même puce, lors d'une même expérience.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, au moins une des zones présente à la fois un rayon de courbure différent et une orientation différente par rapport aux autres zones de la puce.

Selon un autre mode de réalisation, pouvant être combiné aux précédents, au moins une distance entre la base et les surfaces inter-zones est différente des autres.

La figure 7 représente une puce 33 dont la face supérieure 44 qui est recouverte d'une couche métallique 22 est dotée de protubérances de forme courbe 11. Les faces latérales (55,66) de la puce 33 sont perpendiculaires à la base 77 et aux surfaces planes. Les distances séparant les surfaces planes entre les protubérances (c'est-à-dire surfaces inter-protubérances) 11 et la base 77 sont toutes différentes les unes des autres avec $d_4 < d_3 < d_2 < d_1$. Dans la figure 7, les surfaces inter-zones appartiennent à de multiples plans parallèles au plan (XY) (5 plans représentés).

Selon un autre mode de réalisation particulier, dans le cas où au moins une des zones présente une nature différente des autres et/ou présente un tilt (ou basculement) d'un angle β différent des autres et/ou au moins une distance séparant la base des surfaces planes entre les zones est différente des autres, les zones peuvent être de dimension identique et présenter, par exemple, un rayon de courbure R identique.

En effet, selon l'invention, il suffit qu'un seul paramètre diffère d'une zone à une autre (nature, dimension, orientation, distance entre base et surfaces planes inter-zones). La puce selon l'invention peut être réalisée par différentes méthodes qui comportent

nécessairement une étape de fabrication de la puce suivie d'une étape de dépôt d'au moins une couche mince métallique.

Parmi les méthodes de fabrication, on peut citer l'injection haute pression, l'usinage mécanique direct, l'emboutissage à chaud, la gravure au plasma, la photolithographie ou l'ablation par laser.

Parmi les méthodes de dépôt de couches minces métalliques, on peut citer la pulvérisation cathodique, des techniques d'évaporation sous vide, ou des techniques de dépôt à froid.

Les techniques de dépôt à froid sont utiles notamment dans le cas d'un support en plastique car le plastique ne supporte pas des montées en températures importantes.

15 **Dispositif d'analyse**

Les figures 8 et 9 représentent différents modes de réalisation de dispositifs de mesure comprenant la puce microstructurée décrite précédemment.

Ainsi, un autre objet de la présente invention est un dispositif d'analyse par SPR comprenant:

- une source lumineuse 7 destinée à générer un faisceau incident;
- éventuellement un système optique de collimation 8;
- 25 - un système polarisant 6;
- une puce microstructurée (3;33;43; 53; 63) telle que décrite précédemment disposée dans le trajet optique dudit faisceau incident;
- éventuellement un système optique d'imagerie (9; 30 69);
- un détecteur (10; 70).

Selon un mode de réalisation, le couplage entre l'énergie du faisceau incident et l'onde de surface de la

surface métallique de la puce est réalisé par la puce elle-même.

Selon un autre mode de réalisation, le moyen de couplage est un prisme, un guide d'onde ou un réseau de
5 diffraction.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, lorsque le couplage est réalisé par un prisme, la puce selon l'invention est accolée audit prisme de telle façon que la base de la puce est mise en contact avec la face
10 supérieure du prisme ne présentant pas de surface métallique à l'aide d'une huile de couplage d'indice qui est une méthode bien connue de l'homme de l'art.

Selon un autre mode de réalisation, la puce est accolée à un guide d'onde.

15 Selon encore un autre mode de réalisation particulier, la puce est accolée à un réseau de diffraction.

Selon l'invention, la source 7 peut être par exemple une lampe à vapeur de mercure, une lampe à incandescence, une diode laser, un laser, une diode électroluminescente
20 (LED) ou une diode électroluminescente organique (OLED).

Selon un mode de réalisation préféré, la source 7 est une LED monochromatique. Par monochromatique, on entend une LED dont la largeur à mi-hauteur n'excède pas 40nm.

Selon l'invention, différentes gammes de longueur
25 d'onde peuvent être utilisées telles que le visible ou le proche infrarouge (IR).

Selon un mode de réalisation préféré, une longueur d'onde comprise entre 790 et 825nm (proche IR) est utilisée.

30 Selon l'invention le faisceau peut être collimaté. Pour ce faire, différentes techniques bien connues de l'homme de l'art pourront être utilisées.

A titre d'exemple, on peut utiliser comme système optique de collimation 8 une première lentille convergente

qui permet de focaliser la lumière émise par la source 7 sur un trou de diamètre Φ , ledit trou étant dans le plan focal d'une lentille convergente ce qui permet de générer le faisceau collimaté.

5 Selon un mode de réalisation, le système optique de collimation 8 est intégré à la source 7.

Selon l'invention, le système polarisant 6 permet de travailler en mode Transverse Magnétique (ou TM, ou polarisation-p).

10 A titre d'exemple, on peut citer un polariseur linéaire ou un cube séparateur polarisant.

Selon un mode de réalisation préféré, le système polarisant 6 permet de basculer facilement d'une polarisation TM à une polarisation TE (Transverse
15 Électrique), et inversement.

Afin d'éviter tout mouvement de pièce, ceci peut être réalisé à l'aide d'une lame à cristaux liquides, pilotée par des courants et tensions électriques.

Selon l'invention, le détecteur (10; 70) peut être une
20 caméra CCD, CMOS ou être une matrice de photodétecteurs.

Selon un mode de réalisation préféré, les caméras fonctionnent sur 8, 10, 12 ou 16 bits et de préférence sur 10 ou 12 bits.

Selon un mode de réalisation, le dispositif comprend
25 en outre un système optique d'imagerie (9; 69) qui permet de réaliser l'image de la puce microstructurée (3; 33;43; 53; 63) sur le détecteur (10; 70).

Le système optique d'imagerie (9; 69) doit être
suffisamment ouvert pour accepter tous les rayonnements
30 issus de la puce microstructurée. De plus, le système optique d'imagerie (9; 69) est choisi pour que l'image de 2 cavités ou protubérances de la puce microstructurée correspondent à 2 positions différentes sur le détecteur (10; 70).

Enfin de manière avantageuse, le système optique présente un grandissement qui maximise le nombre de pixels utiles sur le détecteur (10; 70).

A titre d'exemple comme système optique d'imagerie (9; 5 69), on peut citer 2 lentilles plan-convexe montées en afocal.

Selon l'invention, on appelle face d'entrée la face par laquelle rentre un rayonnement incident dans la puce et face de sortie la face par laquelle sort le rayonnement 10 réfléchi par la surface sensible.

Sur la figure 8, la source 7 émet un rayonnement incident monochromatique, qui est collimaté à l'aide du système de collimation 8 et polarisé à l'aide du polariseur 6 avant d'arriver sur la face d'entrée 54 de la puce 53 15 (recouverte d'une couche métallique 52) sous une incidence donnée. Le rayonnement est réfracté à son entrée dans la puce 53 et vient se réfléchir sur les cavités 51.

Le système d'imagerie 9, situé après la face de sortie 57 de ladite puce 53, permet de collecter l'intensité des rayonnements réfléchis et de réaliser l'image des 20 protubérances irradiées 51 sur le détecteur 10.

Le dispositif représenté sur la figure 9 comprend une puce 61 (recouverte d'une couche métallique 62) dont les faces latérales sont perpendiculaires à la base et dont les 25 distances entre les surfaces séparant les cavités 61 de la base sont différentes les unes des autres.

La figure 9 représente un mode de réalisation dans lequel le rayonnement incident émis par la source (non représentée sur la figure 9) qui arrive perpendiculairement 30 sur la face d'entrée 64 (correspondant à la face latérale), n'est pas dévié lorsqu'il traverse la puce 63, et irradie l'ensemble des différentes cavités 61.

Le système d'imagerie 69 et le détecteur 70 sont situés après la face de sortie 67, qui dans ce mode de

réalisation correspond à la base de ladite puce 63, permettant ainsi de collecter l'intensité des rayonnements réfléchis et de réaliser l'image des cavités irradiées 61.

Selon un mode de réalisation, le système optique d'imagerie (9;69) peut être intégré directement dans la face de sortie (57; 67) de la puce (53; 63) sous la forme d'une matrice de microlentilles.

Selon un mode de réalisation préféré, le système de collimation 8 et éventuellement le polariseur 6 sont rendus solidaires de la face d'entrée (54; 64) et/ou le système optique d'imagerie (9;69) et le détecteur (10; 70) sont rendus solidaires de la face de sortie (57; 67).

Procédé de mesure

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mesure par SPR qui comporte les étapes suivantes :

- détecter un état initial (i) en irradiant la surface sensible d'au moins deux zones choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance par la face d'entrée de la puce microstructurée à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé, et éventuellement collimaté; et (ii) en détectant simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface sensible d'au moins deux desdites zones, sortant par la face de sortie;
- mettre en contact au moins un fluide avec la surface sensible d'au moins deux desdites zones;
- irradier la surface sensible d'au moins deux desdites zones, contenant ledit fluide par la face d'entrée de la puce microstructurée à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé, et éventuellement collimaté; et détecter simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface sensible d'au moins deux desdites zones, sortant par la face de sortie pour

suivre en temps réel et en continu des modifications d'épaisseur optique dans au moins deux desdites zones.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mesure par SPR qui comporte les étapes suivantes :

- 5 - immobiliser des ligands sur la face supérieure recouverte d'une couche métallique d'une puce microstructurée telle que définie précédemment;
- détecter un état initial (i) en irradiant la surface sensible d'au moins deux zones choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance par la
10 face d'entrée de la puce microstructurée à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé, et éventuellement collimaté; et (ii) en détectant simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la
15 surface sensible d'au moins deux desdites zones, sortant par la face de sortie;
- mettre en contact au moins un fluide avec la surface sensible d'au moins deux desdites zones de ladite puce microstructurée;
- 20 - irradier la surface sensible d'au moins deux desdites zones contenant ledit fluide par la face d'entrée de la puce microstructurée à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé, et éventuellement collimaté; et détecter simultanément l'intensité des
25 rayonnements réfléchis par la surface sensible d'au moins deux desdites zones, sortant par la face de sortie pour suivre en temps réel et en continu des modifications d'épaisseur optique dans au moins deux desdites zones.

Selon l'invention, l'immobilisation des ligands sur la
30 surface supérieure peut être réalisée avec diverses techniques bien connues de l'homme de l'art comme par exemple l'immobilisation par liaison chimique covalente ou par électro-copolymérisation de pyrrole sur la surface métallique.

Par fluide on entend un gaz ou un liquide.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le fluide comprend au moins une espèce biologique.

Ces procédés de mesure sont adaptés pour mesurer, de
5 manière non limitative, des variations de conformation de
molécules immobilisées sur une surface, des interactions
moléculaires, des indices optiques de fluides (gaz ou
liquides), la qualité d'une surface (parallélisme, rugosité
microscopique, qualité d'un dépôt de couches minces) ou
10 encore la présence de nanobilles métalliques à proximité de
la surface.

Ces procédés de mesure permettent également de mesurer
des paramètres extérieurs tels que l'indice optique du
milieu extérieur qui permet de remonter à la valeur de
15 l'angle de réfraction limite.

Selon un mode de réalisation, le faisceau incident
entre perpendiculairement par la face d'entrée 64 de la
puce 63.

La détection de l'intensité des rayonnements réfléchis
20 dans la plage angulaire $\Delta\theta$ (ou $\Delta\theta'$) par le détecteur (10;
70) permet de générer toute ou une partie de la courbe
plasmon dont les principales zones d'intérêt sont les
suivantes :

- le minimum de sensibilité plasmon;
- 25 - la plage angulaire dans laquelle la sensibilité
est la plus forte (c'est-à-dire là où la dérivée du plasmon
est la plus importante) appelée également « flanc du
plasmon »;
- la zone aux alentours de l'angle de réfraction
30 limite (où on passe d'un régime de réfraction à un régime
de réflexion totale).

Les figures 10 et 11 représentent une courbe plasmon
de 3 cavités et/ou protubérances présentant des plages
angulaires d'études différentes (1^{ère} cavité et/ou

protubérance ayant une plage angulaire $\Delta\theta_1$ pour la figure 10 et $\Delta\theta_1'$ pour la figure 11, 2^{ème} cavité et/ou protubérance ayant une plage angulaire $\Delta\theta_2$ pour la figure 10 et $\Delta\theta_2'$ pour la figure 11 et 3^{ème} cavité et/ou protubérance ayant une
5 plage angulaire $\Delta\theta_3$ pour la figure 10 et $\Delta\theta_3'$ pour la figure 11).

La figure 10 représente les plages angulaires de 3 cavités et/ou protubérances lorsque $\beta=0$ (sans tilt) alors que la figure 11 représente les plages angulaires de 3
10 cavités et/ou protubérances lorsque $\beta\neq 0$ (avec tilt).

Dans la figure 10, c'est-à-dire lorsque $\beta=0$ (sans tilt), les 3 plages angulaires étudiées sont centrées sur l'angle θ . La largeur de chacune des plages est définie par l'angle au sommet 2α et le rayon de courbure R de chacune
15 des cavités et/ou protubérances. Le choix de l'angle θ est donc primordial pour observer au mieux toutes les zones d'intérêt. Il est ainsi possible, en fonction du rayon de courbure de la zone étudiée, d'explorer une plage angulaire de la courbe plasmon plus ou moins grande. Dans le cas où
20 les zones ne présentent pas de tilt β (c'est le cas pour la figure 10) cette plage angulaire sera toujours centrée sur la même valeur θ .

Dans la figure 11, c'est-à-dire lorsque $\beta\neq 0$ (avec tilt), les trois plages angulaires $\Delta\theta'_1$, $\Delta\theta'_2$ et $\Delta\theta'_3$ sont
25 centrées respectivement sur les angles γ'_1 , γ'_2 et γ'_3 , lesdits angles γ'_1 , γ'_2 et γ'_3 étant chacun définis par des angles β différents. Dans ce cas de figure (avec tilt), les plages angulaires ne sont pas centrées sur la même valeur.

Il est ainsi possible d'explorer une plage angulaire
30 variable de la courbe plasmon tout en ayant un faisceau incident à un angle unique, permettant ainsi de ne pas avoir besoin des pièces mobiles habituellement utilisées pour effectuer une rotation angulaire du faisceau incident.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de mesure comprend en outre une étape dans laquelle une image des cavités et/ou protubérances de la puce est réalisée.

La figure 12 représente l'image des 3 cavités et/ou protubérances (courbe plasmon de la figure 11) sur un détecteur matriciel dans laquelle la bande noire entre les bandes lumineuses (gris clair) représente les surfaces inter-zones (c'est-à-dire inter-cavités et/ou inter-protubérances et/ou inter-cavité-protubérance) qui ont une réflectivité constante car ce sont des surfaces planes.

Selon l'invention, on peut ainsi, connaissant l'angle incident θ constant et fixé par l'architecture du système optique (puisque aucune pièce mécanique n'est en mouvement), choisir la plage angulaire $\Delta\theta$ qui sera éventuellement imagée sur le détecteur (en choisissant le rayon de courbure R et l'angle α , ou le rayon de courbure R et le diamètre d , car α et d se déduisent l'un de l'autre grâce au rayon de courbure R) et l'angle moyen γ'_{moyen} (avec le choix du tilt β) de la microstructure en fonction des différentes espèces à analyser avec $\gamma'_{\text{moyen}} = \theta + 2\beta$ (pour une surface convexe). Ce choix peut être fait pour chacune des cavités et/ou protubérances, ce qui permet de s'adapter à plusieurs types d'espèces immobilisées sur la même puce.

De même, le choix peut être fait en fonction du type d'espèces qui vont venir interagir avec les espèces préalablement immobilisées sur la puce : on peut ainsi « adapter » chacune des cavités et/ou protubérance à l'espèce recherchée.

Ainsi, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation du dispositif selon l'invention pour mesurer des interactions biomoléculaires.

L'invention est illustrée à l'aide des exemples qui sont donnés à titre d'illustration uniquement et ne sont pas limitatifs.

Exemple 1 : Puce à protéines - suivi et correction de l'indice du milieu extérieur en temps réel dans des cinétiques d'interactions

Une puce microstructurée réalisée en polycarbonate (PC) comprenant 16 cavités est représentée sur la figure 13.

Une couche d'or d'une épaisseur de 48nm a été déposée par pulvérisation cathodique sur la face supérieure de ladite puce afin d'obtenir un effet plasmon.

En polarisation TM, le minimum de réflectivité est obtenu aux alentours de l'angle $\theta = 28^\circ$.

Les 16 cavités sont réparties suivant une matrice régulière de 4x4 surfaces semi-cylindriques de diamètre $d=500\mu\text{m}$ et de longueur $L=500\mu\text{m}$, chacune espacée d'une distance centre-à-centre (CTC) de 1mm.

Quatre espèces différentes ont été immobilisées de manière covalente grâce à une électro-polymérisation d'un film de polypyrrole fonctionnalisé avec les ligands d'intérêt.

Ainsi, les espèces suivantes présentes dans les cavités sont :

- sur la ligne L_1 : anticorps monoclonaux anti-souris
- sur la ligne L_2 : anticorps monoclonaux dirigés contre l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG, impliquée en tant que biomarqueur dans plusieurs pathologies cancéreuses)
- sur la ligne L_3 : anticorps monoclonaux dirigés contre la bactérie *Listeria monocytogenes*
- sur la ligne L_4 : de la BSA (« bovin serum albumine »).

La puce est irradiée avec un rayonnement incident polarisé, collimaté et monochromatique et l'intensité des

rayonnements réfléchis par les cavités est détectée par un détecteur de type CMOS.

Le rayon de courbure des surfaces semi-cylindriques des cavités des colonnes C_1 , C_2 et C_3 , est de 9,5mm
5 (équivalent à une zone angulaire d'étude $\Delta\theta_a$ sur la courbe plasmon d'environ 3°) et les cavités de la colonne C_4 présentent un rayon de courbure de 1,9mm (équivalent à une zone angulaire d'étude $\Delta\theta_b$ d'environ 15°). Les plages angulaires $\Delta\theta_a$ et $\Delta\theta_b$ correspondent respectivement aux
10 plages angulaires $\Delta\theta_1$ et $\Delta\theta_3$ sur la figure 10.

Un liquide d'un indice optique inconnu contenant des protéines hCG est mis en contact avec la puce dans les cavités. Une variation caractéristique du signal est observée en fonction du temps sur les cavités de la ligne L_2
15 mais pas sur les autres car une interaction spécifique a lieu sur les anticorps monoclonaux anti hCG et pas sur les autres protéines immobilisées.

De plus, puisque la cavité située en (L_2, C_4) présente un rayon de courbure tel que toute la courbe plasmon peut
20 être visualisée sur le détecteur, la valeur angulaire de l'angle de réfraction limite peut être aisément déterminée et il est ainsi possible de déduire l'indice du milieu liquide inconnu.

Ainsi, connaissant cet indice, il est possible de
25 déterminer avec précision la variation du signal sur les cavités situées en (L_2, C_1) , (L_2, C_2) et (L_2, C_3) , en décorrélant la variation de signal liée au milieu extérieur de la variation de signal liée à l'accrochage de protéines hCG sur les anticorps monoclonaux anti-hCG.

Exemple 2 : puce pour l'étude de bactéries *Escherichia coli* émettrices de shigatoxines

Dans cet exemple, la présence de bactéries *Escherichia coli* émettrices de shigatoxine (STEC) dans un échantillon
5 issu de l'industrie agro-alimentaire a été étudiée.

Des exemples de bactéries de cette catégorie sont les souches O157:H7, O26:H11 ou encore O103:H2. Les bactéries de ce type et les shigatoxines qu'elles produisent sont à l'origine de troubles intestinaux sévères, pour lesquels le
10 pronostic vital peut être engagé. La taille et le poids moléculaire de ces shigatoxines (quelques nanomètres de diamètre et un poids moléculaire d'environ 68kDa) est très différent de celui d'une bactérie *Escherichia coli* (environ 10 millions de fois plus lourde). Par conséquent, les
15 signaux plasmon pour l'accrochage de ces 2 types de familles sont très différents. Avec des appareils SPR classiques, on ne peut donc pas étudier à la fois ces bactéries et ces toxines lors d'une même expérience et en temps réel. En effet, dans le cas d'accrochage de
20 bactéries, la courbe va se décaler angulairement de près de $0,1^\circ$ tandis qu'elle ne va bouger que de moins de $0,01^\circ$ dans le cas de toxines (ce qui n'est pas facilement détectable par des méthodes SPR classiques).

Cet exemple démontre qu'en utilisant une puce
25 microstructurée selon l'invention qui présente une architecture particulière, il est possible d'étudier ces 2 espèces biologiques de tailles différentes au cours d'une seule expérience.

Une puce réalisée en polycarbonate comprenant deux
30 protubérances semi-cylindriques, de diamètre $600\mu\text{m}$ et de longueur $800\mu\text{m}$ est réalisée.

La face supérieure de ladite puce est recouverte par une couche de chrome d'une épaisseur de 2nm et d'une couche

d'or d'une épaisseur de 48nm toutes les deux déposées par pulvérisation cathodique afin d'obtenir un effet plasmon.

La première protubérance présente un tilt nul ($\beta=0$) et la seconde protubérance présente un tilt de valeur $\beta=0,5^\circ$.

5 La puce est irradiée avec un rayonnement incident polarisé, collimaté et monochromatique et l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface sensible des protubérances est détectée par un détecteur de type CCD.

L'angle moyen d'incidence du système optique est fixé
10 mécaniquement par l'architecture du système et est égal à $26,5^\circ$.

Le rayon de courbure des deux protubérances est également différent : 11,5mm pour la première protubérance (correspondant à une plage angulaire d'étude $\Delta\theta$ de 3°) et
15 100mm pour la deuxième (ce qui correspond à une plage angulaire d'analyse $\Delta\theta'$ de $0,3^\circ$) (figure 14).

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la bactérie O157:H7 sont immobilisés de manière covalente et de manière uniforme sur la première protubérance et des anticorps
20 monoclonaux dirigés spécifiquement contre les shigatoxines que la bactérie sécrète sont immobilisés sur la deuxième protubérance.

Les deux courbes plasmons générées à partir de ces 2 protubérances présentent le même angle de résonance plasmon
25 (environ $26,7^\circ$), avant réaction.

Lorsqu'un mélange contenant une grande quantité (c'est-à-dire des concentrations supérieures à 10^5 bactéries par mL) de bactéries O157:H7 est mis en contact avec la surface sensible de la puce (autrement dit sur les
30 protubérances), certaines d'entre elles interagissent spécifiquement avec les anticorps de la première protubérance. Comme les bactéries sont des molécules bien détectées par la SPR (du fait de leur poids important), la courbe plasmon se décale suffisamment pour que ce décalage

soit très bien perçu par le détecteur imageant la première protubérance. Par ailleurs, cette bactérie sécrète également des shigatoxines au cours de la même expérience.

La deuxième protubérance présente un léger tilt
5 ($\beta=0,5^\circ$) et une largeur angulaire étudiée beaucoup plus faible ($\Delta\theta'=0,3^\circ$). Ainsi, la sensibilité de mesure de la seconde protubérance est plus importante et il est possible de détecter des shigatoxines venant se fixer sur les anticorps de la deuxième protubérance. Les figures 15 et 16
10 représentent les signaux obtenus sur le détecteur pour les deux protubérances respectivement sans tilt et avec tilt avant et après interaction des anticorps immobilisés sur chacune des protubérances avec respectivement les bactéries et les toxines.

15 Ainsi, cet exemple démontre que la puce selon l'invention permet d'adapter la dynamique et la sensibilité de mesure aux espèces à mesurer au cours d'une seule expérience.

20 **Exemple 3 : Configuration particulière d'une puce microstructurée accolée à un prisme**

Une coupe selon le plan (YZ) d'une puce microstructurée comprenant 2 cavités est représentée sur la figure 17. Les deux cavités sont réalisées sous forme de
25 goulottes sur toute la longueur de la puce (voir figure 4).

La puce (représentée par des hachures sur la figure 17) est réalisée directement sur un prisme en polystyrène (PS). Pour se faire, une couche de résine photosensible de type AZ4562 de la société Clariant et d'épaisseur de $10\mu\text{m}$ a
30 préalablement été déposée sur un prisme en PS par enduction centrifuge. Cette couche a ensuite été insolée dans la direction +X par de la lumière pour reproduire les cavités la figure 17. Une couche d'or d'une épaisseur de 47nm a

ensuite été déposée par évaporation sous vide sur la face supérieure de la résine préalablement insolée.

Les 2 cavités sont décrites dans le plan (YZ) et définies par deux droites parallèles séparées par une courbe; ladite courbe présentant un rayon de courbure R de forme convexe (autrement dit rayon de courbure selon l'axe +Z). Selon cet exemple, les cavités présentent un rayon de courbure différent ($R_1 \neq R_2$) afin de pouvoir observer 2 plages angulaires différentes de la courbe plasmon.

REVENDICATIONS

1. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) pour analyse par résonance des plasmons de surface (SPR) se
5 présentant sous la forme d'un solide constitué d'une base (5; 77), d'une face supérieure (4; 44) dont au moins une partie est recouverte d'une couche métallique (2; 22; 42; 52; 62), et d'au moins une face latérale (55; 66), caractérisée en ce que :
- 10 - la dite face supérieure (4;44) est dotée d'au moins deux zones de taille micrométrique destinées à recevoir des espèces à analyser, choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance (1; 11; 41; 51; 61); lesdites zones étant séparées les unes des autres par
15 des surfaces planes; et
- au moins une desdites zones est différente des autres.
2. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'au moins deux
20 zones choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance sont recouvertes par la couche métallique.
3. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la base (5; 77) est une surface plane.
- 25 4. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la face supérieure (4;44) est parallèle à la base (5; 77).
5. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'au
30 moins une face latérale (55; 66) est plane.
6. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'au moins une face latérale (55; 66) est perpendiculaire à la base (5; 77) et/ou à la face supérieure(4;44).

7. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les zones (1; 11; 41; 51; 61) présentent une surface courbe de rayon de courbure R, de préférence compris entre 0,1 et 5 600mm.

8. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon la revendication 7, caractérisée en ce que au moins une desdites zones (1; 11; 41; 51; 61) présente un rayon de courbure R différent des autres.

10 9. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'au moins une desdites zones (1; 11; 41; 51; 61) présente un tilt d'un angle β , tel que $0^\circ < \beta \leq 80^\circ$.

15 10. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'au moins une des distances séparant les surfaces planes entre les zones (1; 11; 41; 51; 61) et la base (5; 77) est différente des autres.

20 11. Puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que les zones (1; 11; 41; 51; 61) présentent un rayon de courbure R identique.

12. Dispositif d'analyse par SPR comprenant:

25 - une source lumineuse (7) destinée à générer un faisceau incident;

- éventuellement un système optique de collimation (8);

- un système polarisant (6);

30 - une puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) telle que définie dans l'une des revendications 1 à 11, disposée dans le trajet optique dudit faisceau incident;

- éventuellement un système optique d'imagerie (9; 69);

- un détecteur (10; 70).

13. Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que le système de collimation (8) et éventuellement le polariseur (6) sont rendus solidaires de la face d'entrée (54; 64) et/ou le système optique d'imagerie (9; 69) et le détecteur (10; 70) sont rendus solidaires de la face de sortie (57; 67).

14. Procédé de mesure par SPR qui comporte les étapes suivantes :

10 - détecter un état initial (i) en irradiant la surface sensible d'au moins deux zones choisies parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance (1; 11; 41; 51; 61) par la face d'entrée (54; 64) de la puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) telle que définie selon l'une des revendications 1 à 11 à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé, et éventuellement collimaté et (ii) en détectant simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61), sortant par la face de sortie (57; 67);

20 - mettre en contact au moins un fluide avec la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61);

25 - irradier la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61) contenant ledit fluide par la face d'entrée (54; 64) de la puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé et éventuellement collimaté et détecter simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61), sortant par la face de sortie (57; 67) pour suivre en temps réel et en continu des modifications d'épaisseur optique dans au moins deux desdites zones.

15. Procédé de mesure par SPR qui comporte les étapes suivantes :

- immobiliser des ligands sur la face supérieure (44; 4) recouverte d'une couche métallique (2; 22; 42; 52; 5 62) d'une puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) telle que définie selon l'une des revendications 1 à 11;
- détecter un état initial (i) en irradiant la surface sensible d'au moins de deux zones parmi au moins une cavité et/ou au moins une protubérance (1; 11; 41; 51; 10 61) par la face d'entrée (54; 64) de la puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé et éventuellement collimaté et (ii) en détectant simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface 15 sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61), sortant par la face de sortie (57; 67);
- mettre en contact au moins un fluide avec la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61) de ladite puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63);
- 20 - irradier la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61) contenant ledit fluide par la face d'entrée (54; 64) de la puce microstructurée (3; 33; 43; 53; 63) à l'aide d'un faisceau incident monochromatique préalablement polarisé et éventuellement 25 collimaté et détecter simultanément l'intensité des rayonnements réfléchis par la surface sensible d'au moins deux desdites zones (1; 11; 41; 51; 61), sortant par la face de sortie (57; 67) pour suivre en temps réel et en continu des modifications d'épaisseur optique dans au moins 30 deux desdites zones.

16. Procédé selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape finale dans laquelle une image des zones (1; 11; 41; 51; 61) de la puce est réalisée.

17. Utilisation du dispositif tel que défini selon l'une des revendications 12 ou 13 pour mesurer des interactions biomoléculaires.

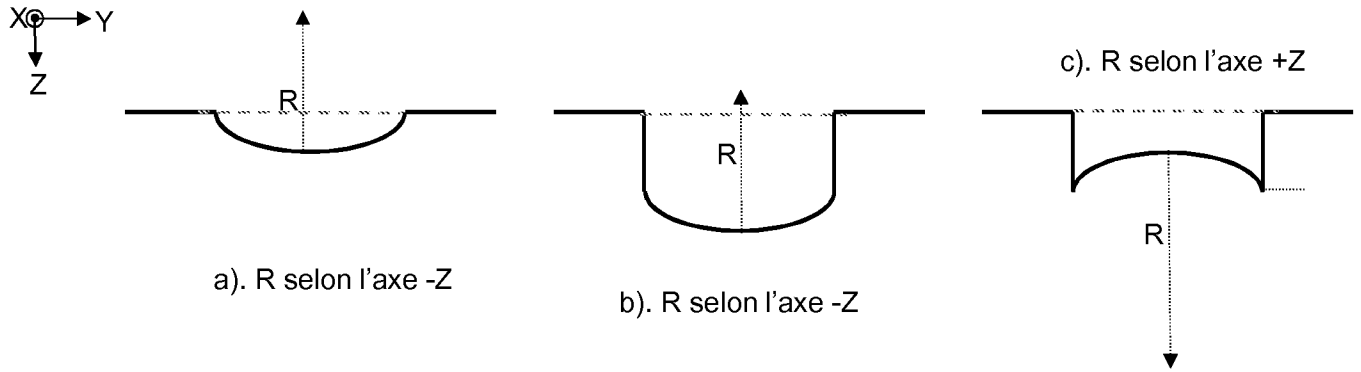


Figure 1

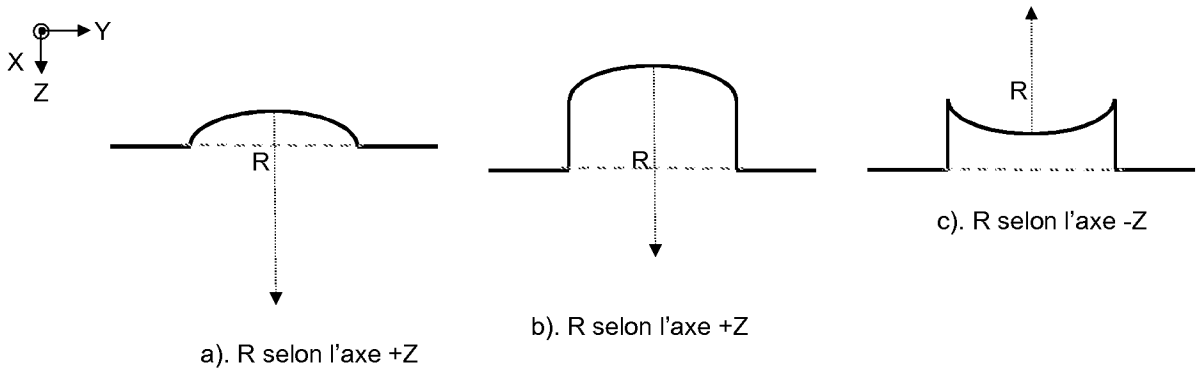


Figure 2

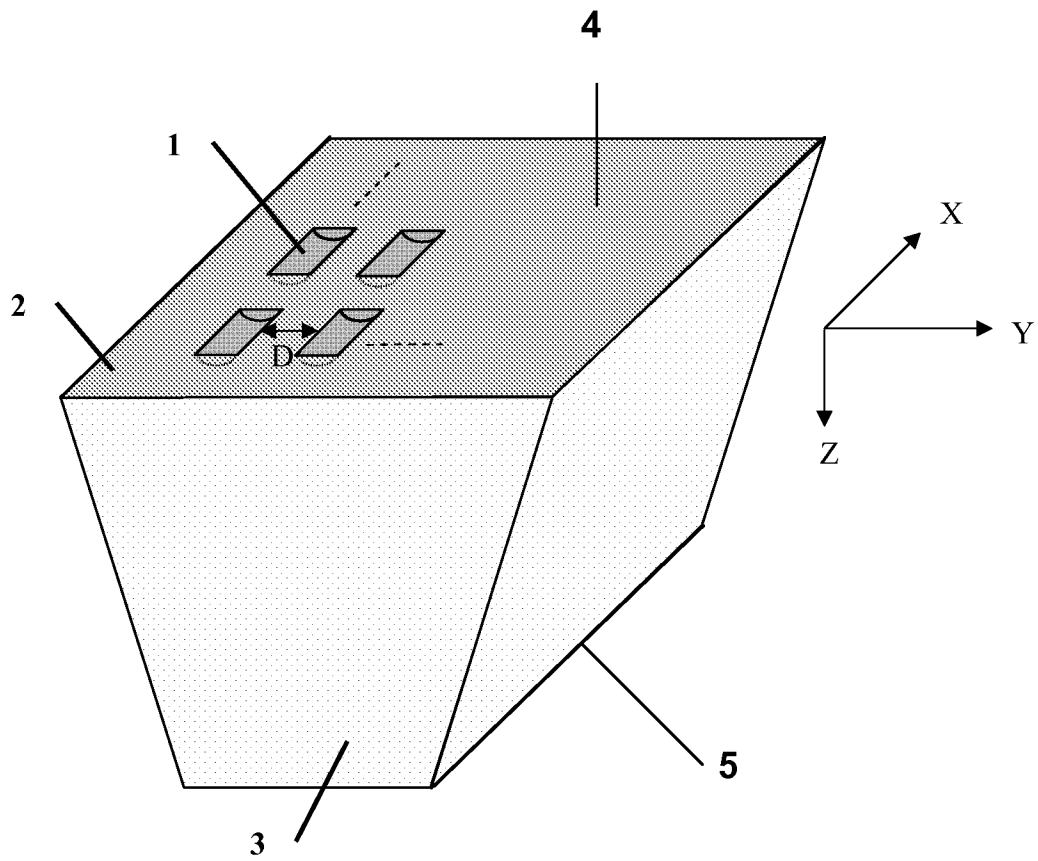


Figure 3

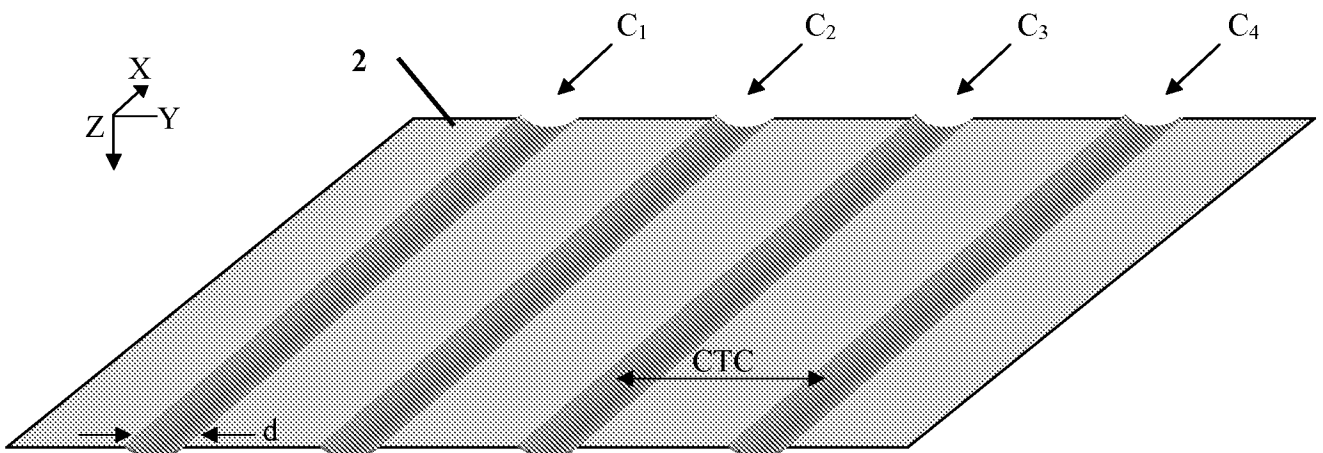


Figure 4

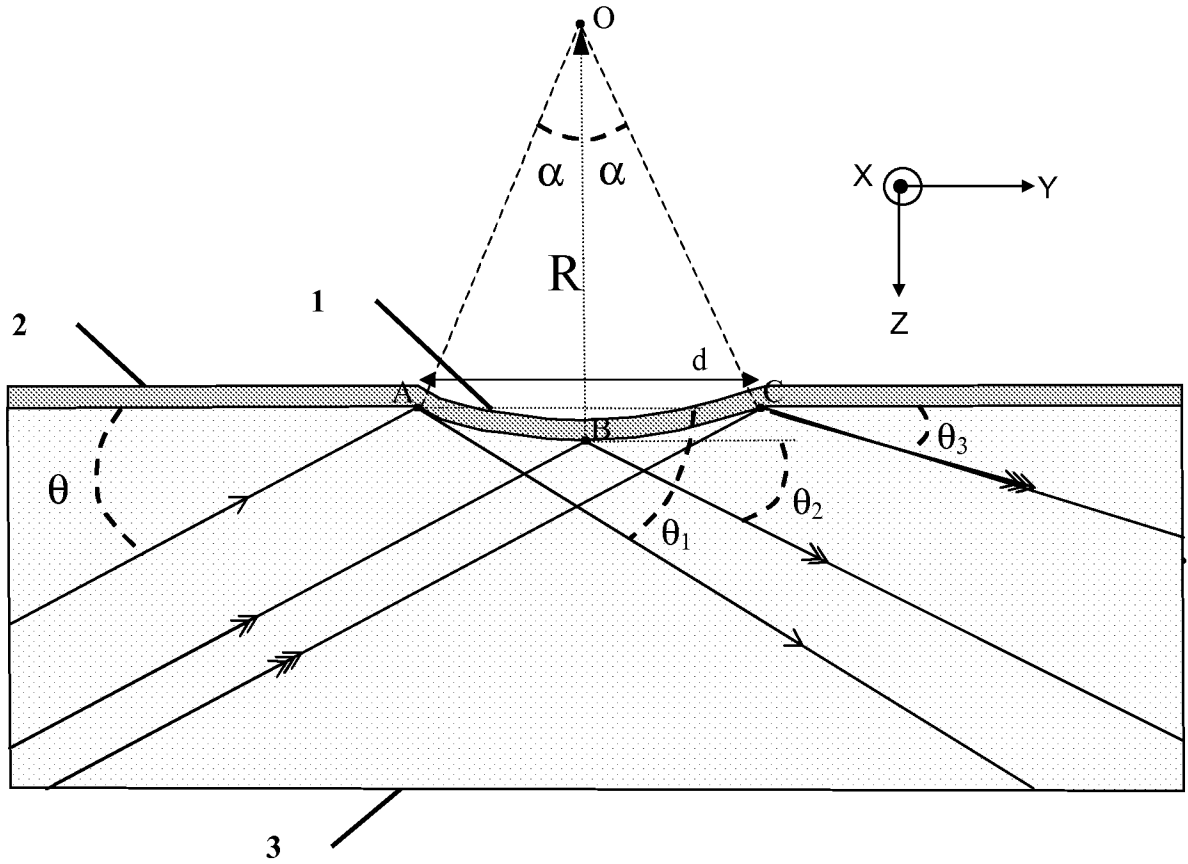
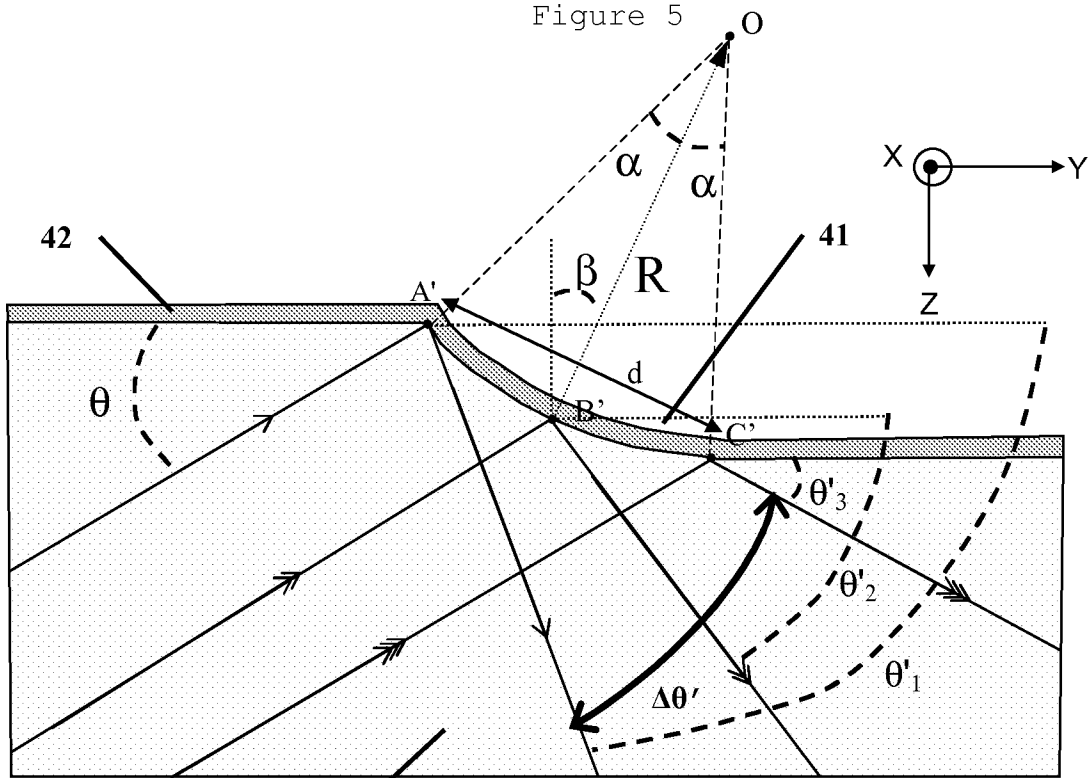


Figure 5



43

Figure 6

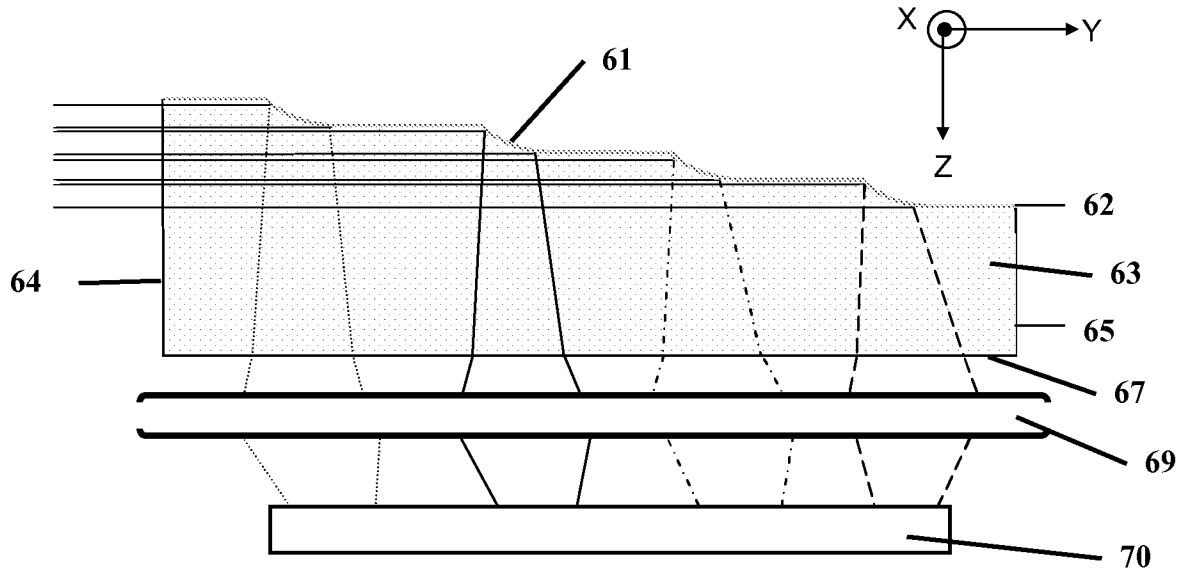


Figure 9

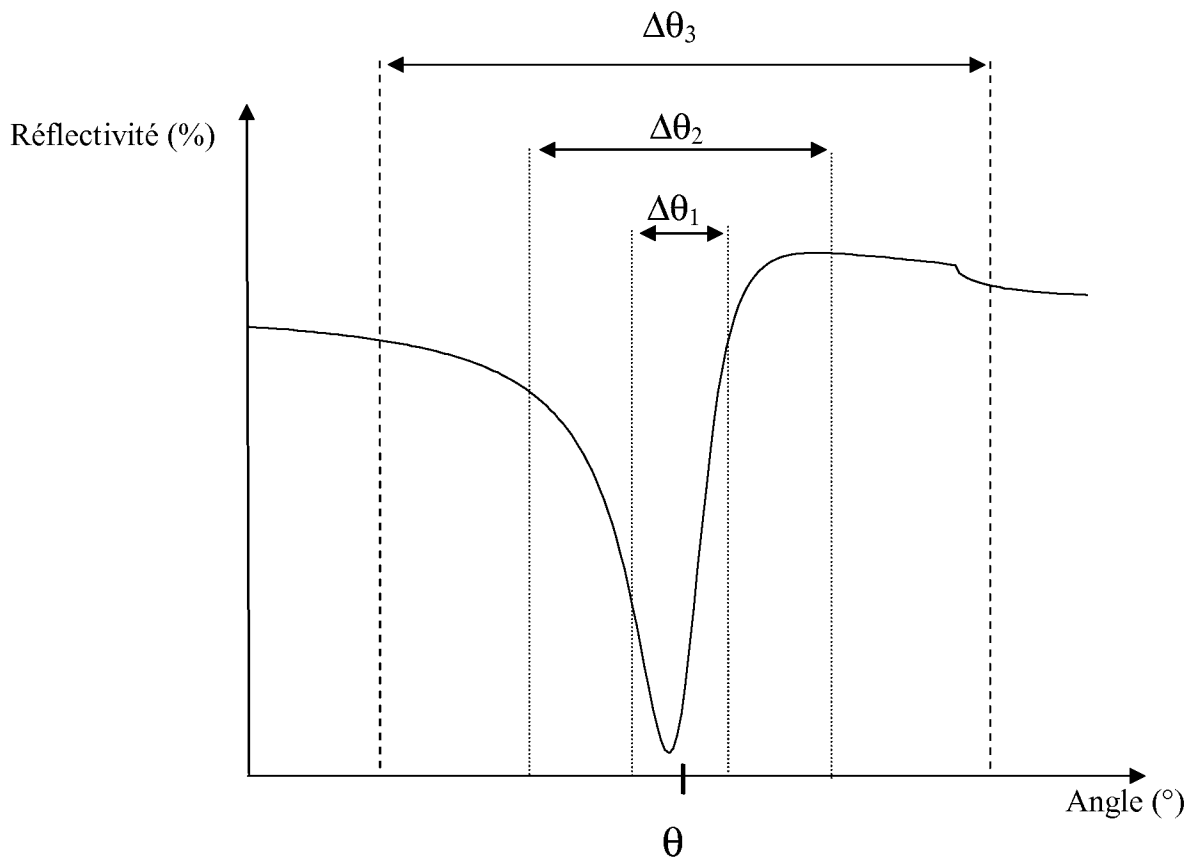


Figure 10

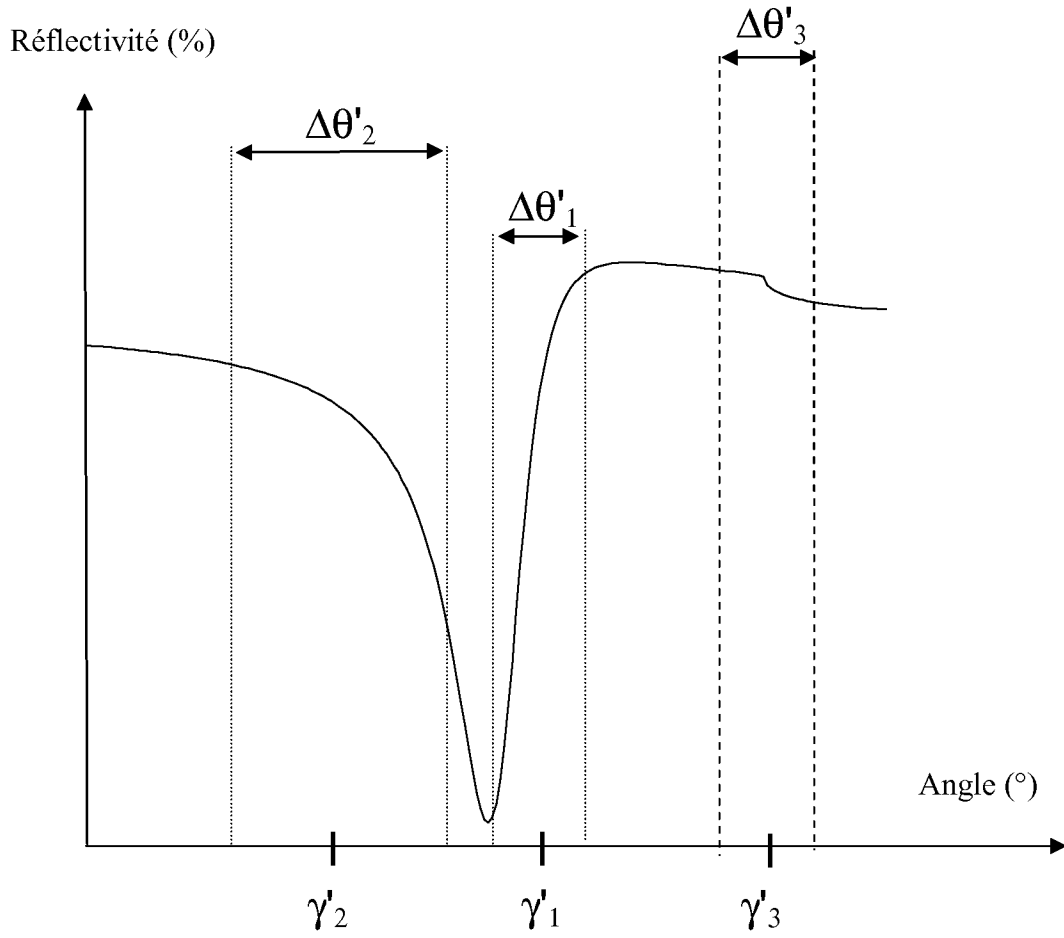


Figure 11

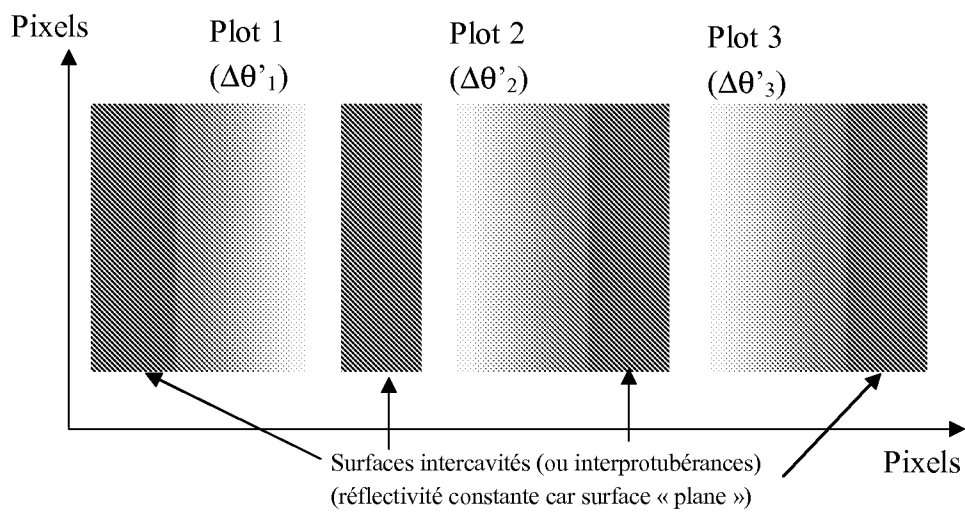


Figure 12

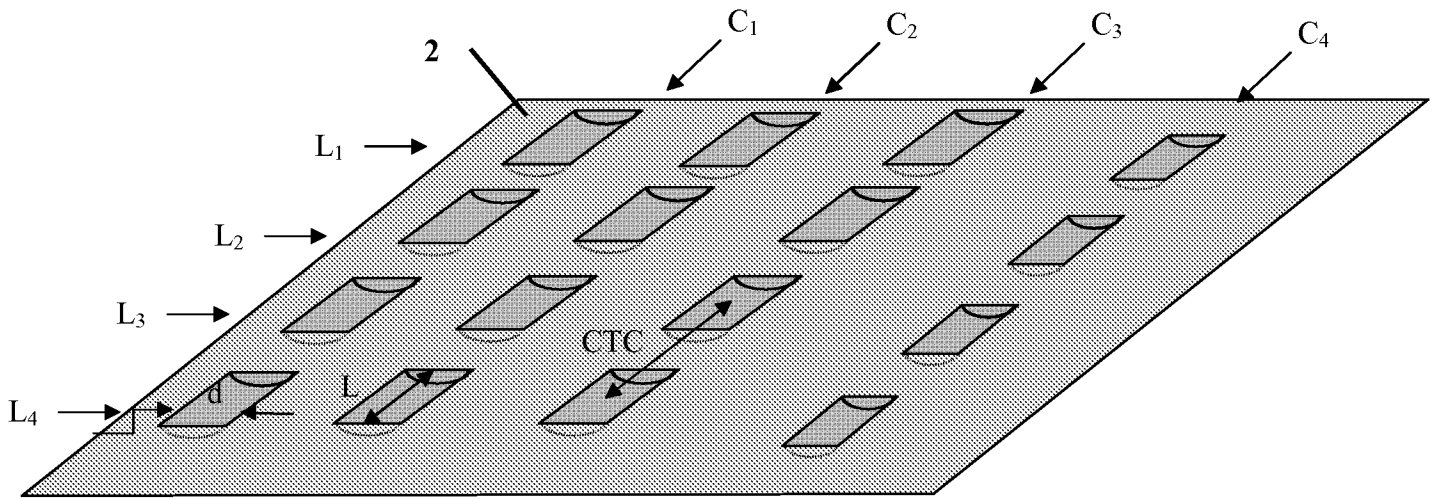


Figure 13

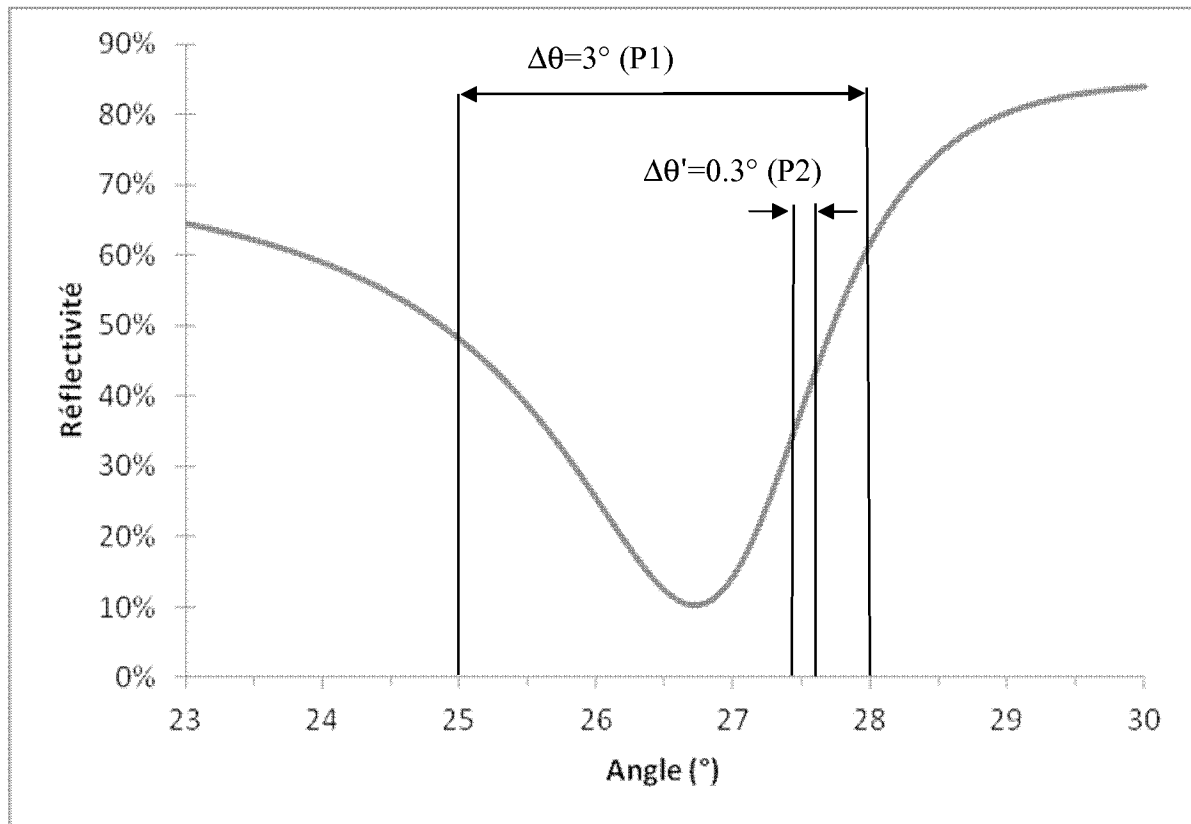


Figure 14

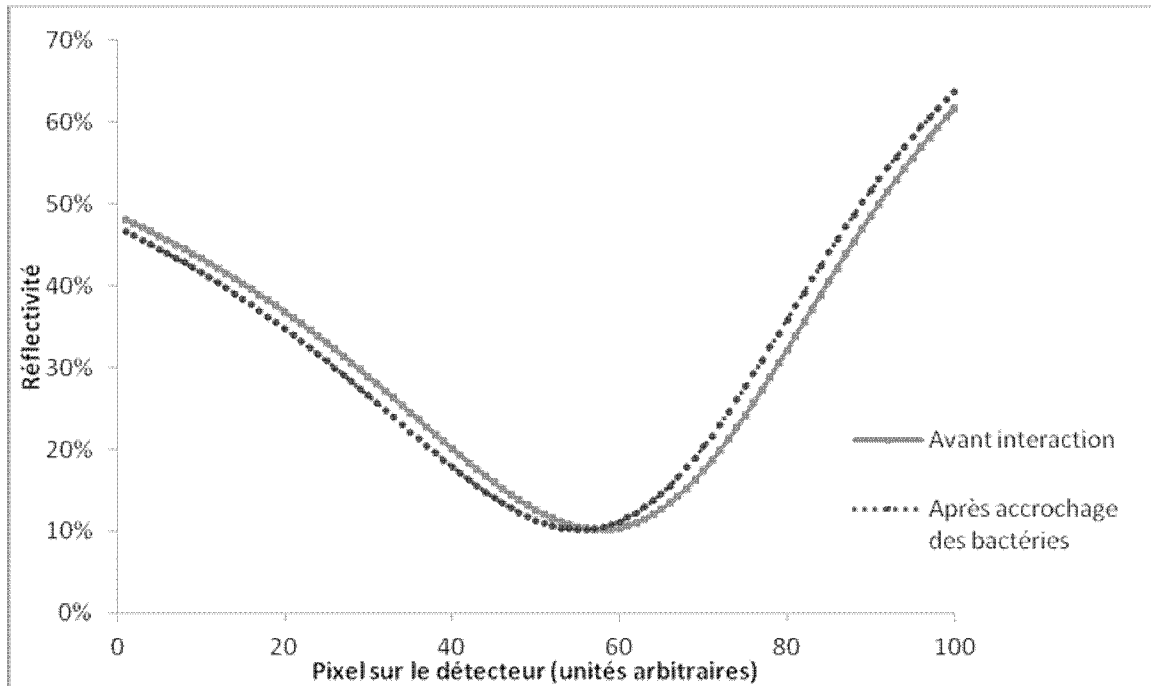


Figure 15

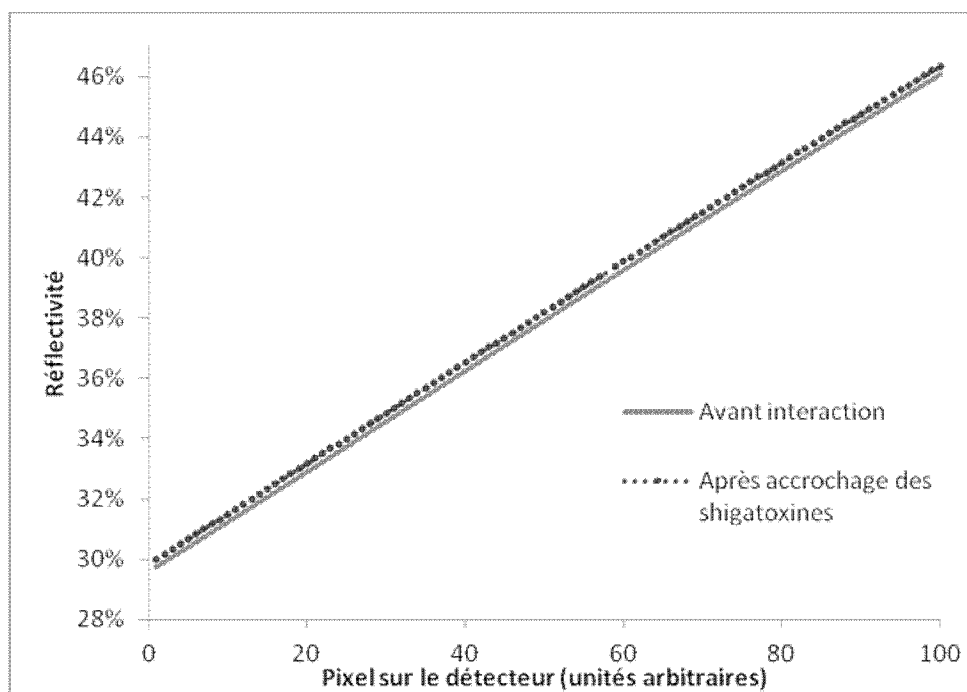


Figure 16

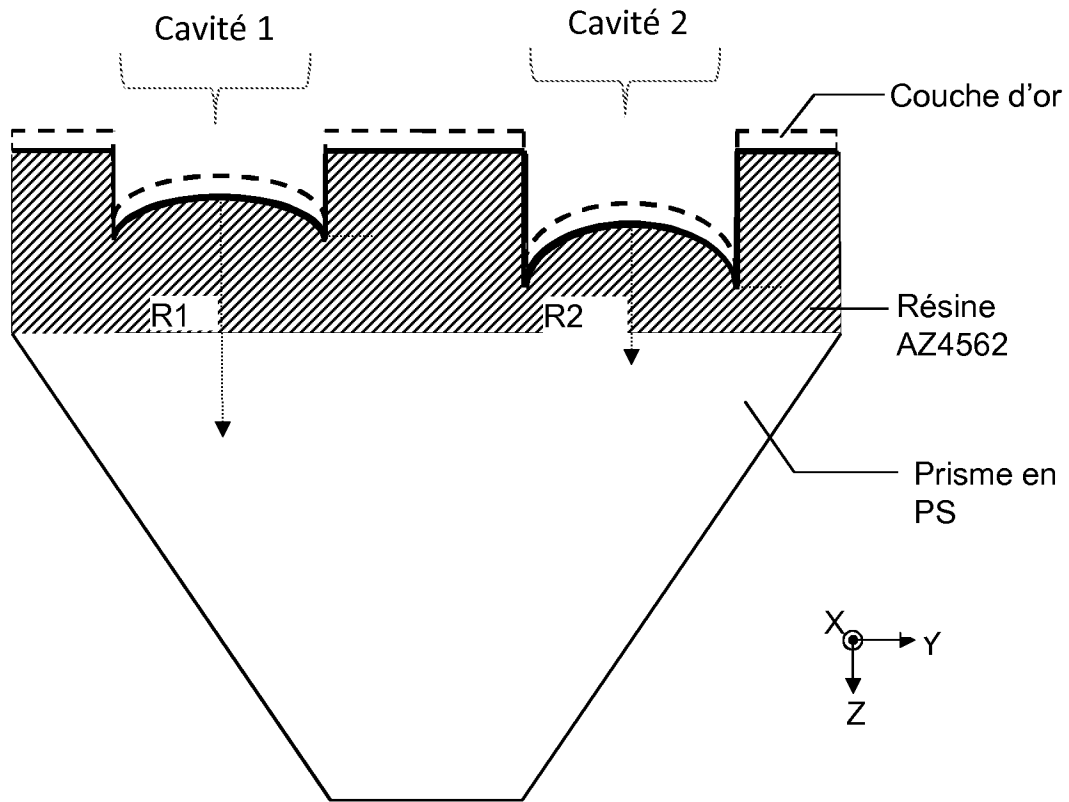


Figure 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/052451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/55 C12Q1/68 G01N33/543 G01N21/64
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C12Q
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GIUDICATTI S ET AL: "Plasmonic resonances in nanostructured gold/polymer surfaces by colloidal lithography", PHYSICA STATUS SOLIDI. A: APPLIED RESEARCH, WILEY - VCH VERLAG, BERLIN, DE, vol. 207, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 935-942, XP002665166, ISSN: 0031-8957, DOI: 10.1002/PSSA.200925579 [retrieved on 2010-03-01] page 936, column 1, line 28 - page 937, column 1, line 5; figures 1,2 page 941, column 2, last paragraph - page 942, column 1, line 9</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 16 January 2013	Date of mailing of the international search report 28/01/2013
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Consalvo, Daniela
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/052451

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 264 438 A1 (EUROP UNION REPRESENTED BY THE [BE]; UNIV PAVIA [IT]) 22 December 2010 (2010-12-22) paragraph [0060] - paragraph [0070]; figures 4,5 -----	17
Y	VALSESIA A: "Fabrication of nanostructured surfaces for the development of advanced biointerfaces", UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PAVIA. SCIENTIFICA ACTA, PAVIA UNIVERSITY PRESS, IT, vol. 1, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 153-157, XP002665167, ISSN: 1973-5219 paragraph [0002] - paragraph [0003]; figure 1 -----	3-6,16, 17
Y	MANNELLI I ET AL: "Bioadhesive nanoareas in antifouling matrix for highly efficient affinity sensors", PROCEEDINGS OF SPIE, SPIE, US, vol. 7035, 12 August 2008 (2008-08-12), pages 70350Y-1, XP002665168, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.796969 [retrieved on 2008-08-29] paragraph [02.1]; figure 1 paragraph [03.2]; figures 5,7 paragraph [03.3]; figure 8 -----	11
Y	BURAK TURKER ET AL: "Grating coupler integrated photodiodes for plasmon resonance based sensing", LAB ON A CHIP, vol. 11, no. 2, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 282-287, XP055011239, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c0lc00081g figures 1-3 -----	17
Y	JP 2005 33771 A (NAT INST FOR MATERIALS SCIENCE) 8 December 2005 (2005-12-08) abstract figures 1-4 -----	1-17
Y	WO 2009/021964 A2 (UNIV DUBLIN CITY [IE]; MACCRAITH BRIAN [IE]; TRNAVSKY MICHAL [IE]) 19 February 2009 (2009-02-19) page 7, line 15 - line 18 page 11, line 9 - line 22; figures 3,4 page 14, line 16 - line 25; figures 8,9 -----	12,15
Y	FR 2 860 872 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 15 April 2005 (2005-04-15) page 10, line 30 - page 11, line 23; figure 3 -----	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/052451

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2264438	A1	22-12-2010	
		AU 2010261777 A1	09-02-2012
		CA 2765972 A1	23-12-2010
		EP 2264438 A1	22-12-2010
		EP 2443438 A1	25-04-2012
		US 2012120401 A1	17-05-2012
		WO 2010146160 A1	23-12-2010

JP 2005337771	A	08-12-2005	NONE

WO 2009021964	A2	19-02-2009	NONE

FR 2860872	A1	15-04-2005	
		EP 1670951 A2	21-06-2006
		FR 2860872 A1	15-04-2005
		JP 5000300 B2	15-08-2012
		JP 2007508536 A	05-04-2007
		US 2007115474 A1	24-05-2007
		WO 2005033335 A2	14-04-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/052451

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N21/55 C12Q1/68 G01N33/543 G01N21/64 ADD.				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C12Q				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
Y	GIUDICATTI S ET AL: "Plasmonic resonances in nanostructured gold/polymer surfaces by colloidal lithography", PHYSICA STATUS SOLIDI. A: APPLIED RESEARCH, WILEY - VCH VERLAG, BERLIN, DE, vol. 207, 1 avril 2010 (2010-04-01), pages 935-942, XP002665166, ISSN: 0031-8957, DOI: 10.1002/PSSA.200925579 [extrait le 2010-03-01] page 936, colonne 1, ligne 28 - page 937, colonne 1, ligne 5; figures 1,2 page 941, colonne 2, dernier alinéa - page 942, colonne 1, ligne 9 ----- -/--	1-17		
<table border="0"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités:				
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 janvier 2013		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 28/01/2013		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Consalvo, Daniela		

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 2 264 438 A1 (EUROP UNION REPRESENTED BY THE [BE]; UNIV PAVIA [IT]) 22 décembre 2010 (2010-12-22) alinéa [0060] - alinéa [0070]; figures 4,5 -----	17
Y	VALSESIA A: "Fabrication of nanostructured surfaces for the development of advanced biointerfaces", UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PAVIA. SCIENTIFICA ACTA, PAVIA UNIVERSITY PRESS, IT, vol. 1, no. 1, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 153-157, XP002665167, ISSN: 1973-5219 alinéa [0002] - alinéa [0003]; figure 1 -----	3-6,16,17
Y	MANNELLI I ET AL: "Bioadhesive nanoareas in antifouling matrix for highly efficient affinity sensors", PROCEEDINGS OF SPIE, SPIE, US, vol. 7035, 12 août 2008 (2008-08-12), pages 70350Y-1, XP002665168, ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.796969 [extrait le 2008-08-29] alinéa [02.1]; figure 1 alinéa [03.2]; figures 5,7 alinéa [03.3]; figure 8 -----	11
Y	BURAK TURKER ET AL: "Grating coupler integrated photodiodes for plasmon resonance based sensing", LAB ON A CHIP, vol. 11, no. 2, 1 janvier 2011 (2011-01-01), pages 282-287, XP055011239, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c0lc00081g figures 1-3 -----	17
Y	JP 2005 337771 A (NAT INST FOR MATERIALS SCIENCE) 8 décembre 2005 (2005-12-08) abrégé figures 1-4 -----	1-17
Y	WO 2009/021964 A2 (UNIV DUBLIN CITY [IE]; MACCRAITH BRIAN [IE]; TRNAVSKY MICHAL [IE]) 19 février 2009 (2009-02-19) page 7, ligne 15 - ligne 18 page 11, ligne 9 - ligne 22; figures 3,4 page 14, ligne 16 - ligne 25; figures 8,9 -----	12,15
Y	FR 2 860 872 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 15 avril 2005 (2005-04-15) page 10, ligne 30 - page 11, ligne 23; figure 3 -----	2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/052451

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2264438	A1	22-12-2010	AU 2010261777 A1	09-02-2012
			CA 2765972 A1	23-12-2010
			EP 2264438 A1	22-12-2010
			EP 2443438 A1	25-04-2012
			US 2012120401 A1	17-05-2012
			WO 2010146160 A1	23-12-2010

JP 2005337771	A	08-12-2005	AUCUN	

WO 2009021964	A2	19-02-2009	AUCUN	

FR 2860872	A1	15-04-2005	EP 1670951 A2	21-06-2006
			FR 2860872 A1	15-04-2005
			JP 5000300 B2	15-08-2012
			JP 2007508536 A	05-04-2007
			US 2007115474 A1	24-05-2007
			WO 2005033335 A2	14-04-2005
