(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
23 janvier 2014 (23.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/012985 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 21/45 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 21/55 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2013/065118

(22) Date de dépôt international :
17 juillet 2013 (17.07.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1256911 17 juillet 2012 (17.07.2012) FR

(71) Déposants : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)** [FR/FR]; 4 place Jussieu, F-75005 Paris (FR).

(72) Inventeurs : **KANOUFI, Frédéric**; 56 rue de l'Amiral Mouchez, F-75014 Paris (FR). **ROGER, Jean-Paul**; 10 rue François Villon, F-94230 Cachan (FR). **TESSIER, Gilles**; 37 rue de la Grange aux Belles, F-75010 Paris (FR). **COMBELLAS, Catherine**; 18 rue Flatters, F-75005 Paris (FR). **MUNTEANU, Sorin**; 34-36 avenue de la Division Leclerc, F-94230 Cachan (FR). **GAM, Sarra**; 3 allée des bosquets, F-94800 Villejuif (FR). **AMIOT, Fabien**; 101 grande rue, F-25000 Besançon (FR).

(74) Mandataire : **TEXIER, Christian**; Cabinet Regimbeau, 20 rue de Chazelles, F-75847 Paris cedex 17 (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, 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.

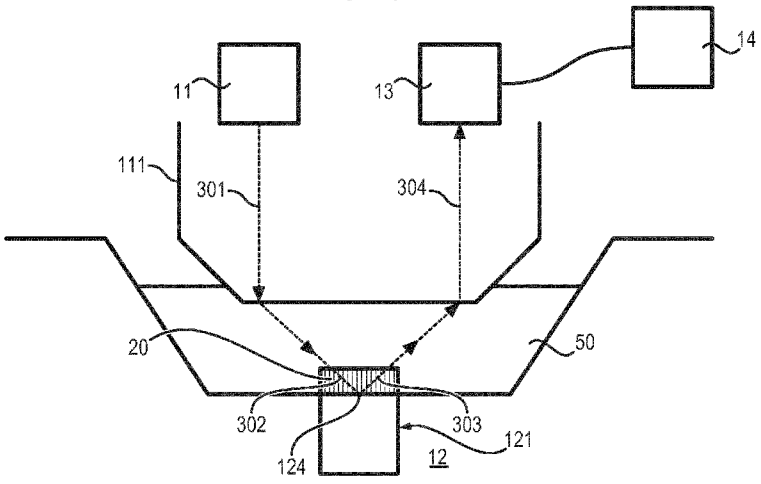
(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD AND DEVICE FOR MEASURING A MEDIUM OF INTEREST

(54) Titre : PROCÉDÉ ET DISPOSITIF DE MESURE D'UN MILIEU D'INTÉRÊT

FIG. 1a



(57) Abstract : The invention relates to a method for measuring a medium of interest (20), which includes: arranging (701) the medium of interest between a light source (11) and a substrate (12) including a reflecting layer (121); illuminating (702) the substrate (12) by incident electromagnetic radiation (302) derived from the light source (11), the reflecting layer (121) producing a reflected radiation (303) from the incident electromagnetic radiation (302); measuring (703) an intensity of the reflected radiation by means of a sensor (13); detecting (704), from measurements carried out under constant illumination and measurement conditions, a change in the reflective properties of the assembly (40) including the medium of interest and the reflecting layer (121). The electromagnetic radiation emitted (301) is included within a spectral band of 350 nm to 1,000 nm, and the reflecting layer (121) has a reflectivity between 0.2 and 0.7 and a sensitivity greater than 1 x 10^{-3} nm^{-1} in the band.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2014/012985 A1

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*

Publiée :

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

Procédé de mesure d'un milieu d'intérêt (20), comprenant : disposer (701) le milieu d'intérêt entre une source lumineuse (11) et un substrat (12) comprenant une couche (121) réfléchissante, éclairer (702) le substrat (12) par un rayonnement électromagnétique incident (302) issu de la source lumineuse (11), la couche réfléchissante (121) produisant un rayonnement réfléchi (303) à partir du rayonnement électromagnétique incident (302), mesurer (703) par un capteur (13) une intensité du rayonnement réfléchi, détecter (704) à partir de mesures effectuées dans des conditions d'illumination et de mesure constantes, un changement des propriétés réfléchissantes de l'ensemble (40) comprenant le milieu d'intérêt et la couche réfléchissante (121), le rayonnement électromagnétique émis (301) est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm, et la couche réfléchissante (121) présente une réflectivité entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande.

Procédé et dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt

Domaine de l'invention

L'invention concerne un procédé et un système de mesure d'un milieu d'intérêt par rayonnement électromagnétique.

Etat de l'art

Les biocapteurs présentent de nombreux domaines d'application. Il existe des procédés et des systèmes de mesure d'un milieu d'intérêt par biocapteurs. Les biocapteurs sont ainsi utilisés pour la quantification de biomolécules. De tels biocapteurs reposent sur des techniques de lecture optique.

Les techniques par biocapteurs fluorescents présentent une grande sensibilité de mesure mais nécessitent un marquage préalable des molécules à analyser. Il en résulte un surcoût associé important et un temps de préparation considérable.

Il existe également des procédés et des systèmes de mesure d'un milieu d'intérêt par résonance de plasmon de surface.

Le plasmon de surface (SP) est un mode d'oscillation d'électrons de conduction d'un métal à l'interface avec un diélectrique. Il se manifeste sous la forme d'une onde qui se propage le long de l'interface, l'onde étant associée à un champ électromagnétique évanescent, c'est-à-dire qu'il confiné à la surface.

Dans une configuration de mesure d'un milieu d'intérêt dite de résonance de plasmon de surface (SPR), une première surface d'une couche métallique est éclairée par une lumière incidente, par exemple une onde plane monochromatique. Un SP se propage à l'interface entre la couche métallique et un milieu aqueux ambiant testé, au niveau du milieu

d'intérêt, c'est-à-dire au niveau d'une couche superficielle d'une deuxième surface de la couche métallique opposée à la première surface. La deuxième surface est fonctionnalisée ; elle peut ainsi présenter des biomolécules fixées formant le milieu d'intérêt, les biomolécules pouvant s'associer sélectivement dans le milieu d'intérêt avec une molécule d'intérêt dont on veut mesurer la présence dans le milieu ambiant testé.

Au couplage entre la lumière incidente et le SP est associé un angle d'incidence de résonance θSP. A cet angle de résonance θSP correspond une baisse abrupte et un minimum de l'intensité du faisceau réfléchi par la première surface issu de la lumière incidente. Cette valeur θSP dépend fortement de l'indice optique du milieu d'intérêt, n_C, au voisinage de la deuxième surface, et donc de la concentration en molécules au niveau de la deuxième surface, et donc l'association entre les biomolécules fixées et des molécules d'intérêt. Il est alors possible de mesurer la présence de molécules d'intérêt dans le milieu d'intérêt, et donc dans le milieu ambiant testé, sans réaliser de marquage préalable.

Cependant, les systèmes par imagerie SPR sont relativement coûteux et complexe à mettre en œuvre. De plus, la mise en parallèle des mesures implique une forte diminution de la sensibilité du biocapteur, alors qu'une grande qualité de mesure est nécessaire pour ce type d'imagerie. Par ailleurs, la prise de mesure pour ces systèmes est longue ce qui limite les possibilités de suivi en temps réel.

Présentation générale de l'invention

Un but de l'invention est de fournir un procédé et un dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt ne présentant pas ces inconvénients.

A cet effet, il est prévu un procédé de mesure d'un milieu d'intérêt, le procédé comprenant des étapes consistant à :

- disposer le milieu d'intérêt entre une source lumineuse adaptée pour émettre un rayonnement électromagnétique et un substrat comprenant une couche présentant des propriétés réfléchissantes,
- éclairer le substrat par un rayonnement électromagnétique incident issu de la source lumineuse, la couche réfléchissante produisant un rayonnement électromagnétique réfléchi à partir du rayonnement électromagnétique incident, et
- mesurer par un capteur une intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt,
- détecter à partir de mesures effectuées par le capteur dans des conditions d'illumination et de mesure constantes, un changement des propriétés réfléchissantes de l'ensemble comprenant le milieu d'intérêt et la couche réfléchissante et déterminer une modification d'une épaisseur optique (n_C x d) du milieu d'intérêt correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt,

dans lequel le rayonnement électromagnétique émis est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm, et la couche réfléchissante présente une réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale.

L'invention est avantageusement complétée par les caractéristiques suivantes, prises seules ou en une quelconque de leurs combinaisons techniquement possibles :

- l'étape de détection comprend une détermination par un abaque de l'épaisseur optique du milieu d'intérêt directement à partir du suivi de l'intensité du rayonnement électromagnétique mesurée dans les conditions d'illumination et de mesure constantes,
- les conditions d'illumination et de mesure constantes pour l'ensemble des mesures comprennent un positionnement relatif

fixe de la source lumineuse, de la couche réfléchissante et du capteur, et un même rayonnement électromagnétique émis par la source lumineuse pour toutes les mesures,

- le milieu d'intérêt comprend une pluralité de molécules sondes immobilisées sur une surface de la couche réfléchissante, les molécules sondes étant adaptées pour interagir avec des molécules cibles, l'interaction des molécules sondes avec les molécules cibles changeant l'épaisseur optique du milieu d'intérêt dans la bande spectrale,
- le milieu d'intérêt est soumis à un écoulement microfluidique, et l'étape de mesure est répétée avec une fréquence supérieure à 1 Hz,
- la couche réfléchissante comprend une sous-couche opaque présentant une surface opaque lisse tournée vers le milieu d'intérêt,
- la couche opaque est une couche d'or, de cuivre ou d'acier inoxydable, le rayonnement électromagnétique émis étant compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 500 nm,
- dans lequel la couche réfléchissante comprend en outre une sous-couche transparente, la sous-couche transparente étant disposée entre le milieu d'intérêt et la sous-couche opaque,
- la couche transparente présente une épaisseur inférieure à 1600 nm,
- la sous-couche opaque est une couche de silicium et la couche transparente est une couche d'oxyde de silicium ou de nitrure de silicium.

L'invention concerne en outre un dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt, le dispositif comprenant :

- un substrat comprenant une couche présentant des propriétés réfléchissantes,
- une source lumineuse, le milieu d'intérêt étant disposé entre la source lumineuse et le substrat, la source lumineuse étant adaptée pour émettre un rayonnement électromagnétique et éclairer le substrat par un rayonnement électromagnétique incident issu de source lumineuse, la couche réfléchissante produisant un rayonnement électromagnétique réfléchi à partir du rayonnement électromagnétique incident, et
- un capteur adapté pour mesurer une intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt,
- des moyens de calcul adaptés pour détecter à partir de mesures effectuées par le capteur dans des conditions d'illumination et de mesure constantes, un changement de propriétés réfléchissantes de l'ensemble comprenant le milieu d'intérêt et la couche réfléchissante et déterminer une modification d'une épaisseur optique (n_C x d) du milieu d'intérêt correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt,

dans lequel le rayonnement électromagnétique émis est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm, et la couche réfléchissante du substrat présente une réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale.

Présentation des figures

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaitront lors de la description ci-après d'un mode de réalisation. Aux dessins annexés :

- les figures 1a et 1b représentent des détails de dispositifs selon deux modes de réalisation de l'invention,
- la figure 2 représente schématiquement un procédé selon un mode de réalisation de l'invention,
- la figure 3 est un graphe représentant les variations relatives de réflectivité en fonction de l'épaisseur du milieu d'intérêt sur un substrat d'un dispositif selon l'invention,
- la figure 4 est un graphe représentant les variations de sensibilité de détection sur différents substrats et dans différents milieux ambiants en fonction de la longueur d'onde d'un rayonnement électromagnétique émis,
- la figure 5a représente un schéma de principe d'une interaction mesurée dans un exemple de mode de réalisation selon l'invention,
- la figure 5b est un graphe représentant une réponse de la mesure d'une interaction dans l'exemple de mode de réalisation selon l'invention illustré de la figure 5a,
- la figure 5c est un graphe représentant une exploitation de réponse de la mesure d'une interaction dans l'exemple de mode de réalisation selon l'invention illustré des figures 5a et 5b,
- la figures 6b, respectivement 6d, est un graphe représentant une réponse de la mesure d'une interaction représentée schématiquement figure 6a, respectivement 6c, dans un autre exemple de mode de réalisation selon l'invention,
- les figures 7a et 7b illustrent un électrogreffage sur une microélectrode d'or pour réaliser un dispositif selon un mode de réalisation de l'invention,
- les figures 8a à 8e illustrent un immunoessai en cellule microfluidique selon un mode de réalisation de l'invention.

Description de l'invention

Exemples illustrant des modes de réalisation du dispositif

En référence aux figures 1a et 1b, il est décrit un dispositif 10 de mesure d'un milieu d'intérêt 20.

Source lumineuse

Le dispositif 10 comprend une source lumineuse 11. Dans une configuration expérimentale, le milieu d'intérêt 20 est disposé entre la source lumineuse 11 et un substrat 12. Le substrat 12 comprend une couche 121 présentant des propriétés réfléchissantes.

La source lumineuse 11 est adaptée pour émettre un rayonnement électromagnétique 301 et éclairer le substrat 12 par un rayonnement électromagnétique incident 302 issu de la source lumineuse 11. La source lumineuse 11 peut par exemple éclairer verticalement une surface 124 de la couche réfléchissante 121 tournée vers le milieu d'intérêt 20. La source lumineuse 11 peut ainsi émettre un rayonnement électromagnétique sous la forme d'un faisceau lumineux d'ouverture numérique donnée et sous une incidence moyenne de zéro degré par rapport à la surface 124. La source lumineuse 11 peut être polychromatique, ou monochromatique. La source lumineuse 11 peut comprendre un filtre spectral filtrant une lumière blanche, par exemple une lumière produite par une lampe halogène. Alternativement, la source lumineuse 11 peut comprendre une diode électroluminescente.

Le rayonnement électromagnétique émis 301 par la source lumineuse est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm.

La source lumineuse 11 peut comprendre un objectif 111 de microscope ou plus généralement un système optique comprenant une association de lentilles.

Substrat

La couche réfléchissante 121 du substrat 12 présente une réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7. La couche réfléchissante 121 présente en outre une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale du rayonnement électromagnétique émis 301.

La couche réfléchissante 121 peut comprendre une sous-couche opaque 122 présentant une surface opaque lisse tournée vers le milieu d'intérêt 20. Cette sous-couche opaque 122 peut être métallique. La sous-couche opaque 122 est par exemple une couche d'or, de cuivre, ou d'acier inoxydable, le rayonnement électromagnétique émis 301 étant alors compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 500 nm.

Selon un mode de réalisation, la sous-couche métallique 122 constitue la couche réfléchissante 121, la surface opaque lisse étant la surface 124 tournée vers la milieu d'intérêt 20 et en contact avec le milieu d'intérêt 20.

Selon un autre mode de réalisation, la couche réfléchissante 121 comprend, en sus de la sous-couche opaque 122, une sous-couche transparente 123, la sous-couche transparente 123 étant disposée entre le milieu d'intérêt 20 et la sous-couche opaque 122. La sous-couche transparente 123 présente par exemple une épaisseur inférieure à 1600 nm. La sous-couche opaque 122 est une couche de silicium et la sous-couche transparente 123 est une couche d'oxyde de silicium ou de nitrure de silicium. Par oxyde de silicium on entend un élément de la forme SiO_x.

Milieu d'intérêt

Le milieu d'intérêt 20 comprend par exemple une pluralité de molécules sondes 201 immobilisées sur la surface 124 de la couche réfléchissante 121. Les molécules sondes sont adaptées pour interagir avec des molécules cibles 202, l'interaction des molécules sondes 201 avec les molécules cibles 202 changeant l'épaisseur optique du milieu d'intérêt 20 dans la bande spectrale.

Par interaction on entend une interaction stabilisante entre une région spécifique (ou atome) d'une entité moléculaire et une autre entité

moléculaire. Il peut s'agir d'une intéraction entre un ligand et un récepteur au sens large. Des formes typiques d'interactions sont par exemple obtenues par liaison hydrogène, coordination, formation de paires d'ions, ou interaction hydrophobe.

Capteur

Le dispositif 13 comprend un capteur 13 lumineux.

La couche réfléchissante 121 produit un rayonnement électromagnétique réfléchi 303 à partir du rayonnement électromagnétique incident 302. Le capteur 13 est adapté pour mesurer une intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt 30.

L'objectif 111 du microscope peut par exemple collecter une partie située dans les limites de son ouverture numérique du flux lumineux réfléchi et diffusé par la couche réfléchissante 121 et le milieu d'intérêt 30. La partie du flux collectée correspond à un rayonnement électromagnétique 304 mesuré par le capteur 13. Le capteur 13 peut comprendre un détecteur optique placé dans le plan conjugué, par rapport au système optique de l'objectif 111, d'une surface de l'ensemble comprenant la couche réfléchissante 121 et le milieu d'intérêt 20.

Le capteur 13 peut être un détecteur matriciel comprenant une pluralité de pixels, tel qu'une caméra CCD ou CMOS. Le capteur 13 peut alors permettre de réaliser une cartographie d'un rayonnement électromagnétique capté pour chaque pixel. Une image nette du rayonnement électromagnétique 304 mesuré issu de la surface à étudier peut ainsi être formée au niveau d'un système de lecture associé tel qu'un terminal utilisateur.

Un unique objectif 111 peut être utilisé pour transmettre le rayonnement électromagnétique émis par la source lumineuse 11 et le rayonnement électromagnétique après réflexion par la couche réfléchissante 121. La séparation des faisceaux correspondant à chaque rayonnement électromagnétique peut être obtenue par l'intermédiaire d'un

séparateur de faisceaux. Ce séparateur est par exemple une lame ou un cube.

Moyens de calcul

Le dispositif comprend des moyens de calcul 14. Les moyens de calcul 14 comprennent par exemple un calculateur.

Les moyens de calcul 14 sont adaptés pour détecter un changement de propriétés réfléchissantes de l'ensemble 40 comprenant le milieu d'intérêt 20 et la couche réfléchissante 121. Ce changement est détecté à partir de mesures 703 effectuées par le capteur 13 dans des conditions d'illumination et de mesure constantes. Ce changement de propriétés réfléchissantes caractérise une modification d'une épaisseur optique (n_C x d) du milieu d'intérêt 20 correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt 20. En particulier, ce changement de propriétés réfléchissantes peut être une variation de propriétés réfléchissantes, et peut caractériser une variation d'une épaisseur optique du milieu d'intérêt 20 qui est représentative d'une modification, par exemple d'une variation d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt 20.

Les moyens de calcul 14 peuvent être directement connectés au capteur 13, comme représenté aux figures 1a et 1b afin de détecter le changement de propriétés réfléchissantes en temps réel ou directement après une acquisition de données par le capteur 13. Les moyens de calcul 14 peuvent alternativement être adaptés pour détecter le changement de propriétés réfléchissantes à partir de données issues du capteur 13 et stockées sur des moyens de stockage tels qu'une mémoire.

Les moyens de calcul 14 peuvent comprendre des moyens de détermination 705 par un abaque de l'épaisseur optique du milieu d'intérêt 20 directement à partir du suivi de l'intensité du rayonnement électromagnétique mesuré dans les conditions d'illumination et de mesure constantes.

Exemple illustrant un mode de réalisation du dispositif en système ouvert

La figure 1a illustre un exemple de mode de réalisation du dispositif en système ouvert. L'objectif 111 est plongé directement dans la solution constituant le milieu ambiant 50 à tester, permettant ainsi de réaliser une mesure en immersion.

Exemple illustrant un mode de réalisation du dispositif en système fermé

La figure 1b illustre un exemple de mode de réalisation du dispositif en système fermé. Le milieu ambiant à tester 50 et le substrat 12 sont inclus dans une cellule microfluidique fermée par un capot 501. L'objectif 111 peut présenter une bague de correction optique pour corriger le passage du rayonnement électromagnétique issu de la couche réfléchissante 121 à travers le capot 501.

Exemples illustrant des modes de réalisation du procédé

La figure 2 décrit un procédé de mesure du milieu d'intérêt 20.

Première étape

Le procédé comprend une première étape 701 consistant à disposer le milieu d'intérêt 20 entre la source lumineuse 11 adaptée pour émettre un rayonnement électromagnétique 301 et le substrat 12 comprenant la couche 121 présentant des propriétés réfléchissantes,

Deuxième étape

Le procédé comprend une deuxième étape 702 consistant à éclairer le substrat 12 par un rayonnement électromagnétique incident 302 issu de la source lumineuse 11. Le rayonnement électromagnétique incident est issu du rayonnement électromagnétique émis 301 après

traversée du milieu séparant la source lumineuse 11 de la surface 124 de la couche réfléchissante du substrat 12. Le rayonnement électromagnétique émis 301 est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm.

La couche réfléchissante 121 éclairée produit alors un rayonnement électromagnétique réfléchi 303 à partir du rayonnement électromagnétique incident 302. La couche réfléchissante 121 présente une réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale.

Troisième étape

Le procédé comprend une troisième étape 703 consistant à mesurer par le capteur 13 une intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt 20. Le rayonnement électromagnétique mesuré 304 est issu du rayonnement électromagnétique réfléchi 303 après traversée du milieu séparant la surface 124 de la couche réfléchissante et le capteur 13.

Les mesures sont effectuées par le capteur 13 dans des conditions d'illumination et de mesure constantes. Par conditions d'illumination et de mesure constantes pour l'ensemble des mesures 703, on entend un positionnement relatif fixe de la source lumineuse, de la couche réfléchissante et du capteur 13, et un même rayonnement électromagnétique émis 701 par la source lumineuse 11 pour toutes les mesures 703.

Quatrième étape

Le procédé comprend une quatrième étape 704 consistant à détecter à partir de mesures effectuées par le capteur 13, un changement des propriétés réfléchissantes de l'ensemble 40 comprenant le milieu d'intérêt 20 et la couche réfléchissante 121. Le changement de propriété réfléchissante permet de déterminer une modification d'une épaisseur optique ($n_C \times d$) du milieu d'intérêt 20 correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt 20.

La quatrième étape de détection 704 peut comprendre une détermination 705 de l'épaisseur optique du milieu d'intérêt 20. Cette détermination est par exemple réalisée par le calculateur 14 à l'aide d'un abaque stocké dans une mémoire, directement à partir du suivi de l'intensité du rayonnement électromagnétique mesuré dans les conditions d'illumination et de mesure constantes.

Par rapport à la SPR, le dispositif décrit est peu coûteux et simple à réaliser. En particulier, aucun prisme n'est nécessaire. Par ailleurs un tel dispositif et une telle méthode sont aisément adaptables à différents substrats et à différentes réactions.

Une telle méthode permet un suivi in-situ et en temps réel de croissance d'un milieu d'intérêt 20 constitué d'une couche biochimique. En particulier, en milieu aqueux et sous illumination à 490 nm, une couche mince peut induire un changement de réflectivité $\Delta R/R$ 15% sur or, 12% sur cuivre ou acier inoxydable ou 25% sur silicium.

En particulier, le milieu d'intérêt 20 peut être soumis à un écoulement microfluidique. Un tel suivi est possible car contrairement à la SPR, l'étape de mesure 704 peut être répétée avec une fréquence supérieure à 1 Hz.

Principe du dispositif et du procédé

Détecter un changement de réflectivité par mesure de l'intensité du rayonnement

Une réaction biochimique mesurée concerne typiquement une interaction entre une molécule cible 202 présente en solution et une molécule sonde 201 immobilisée sur la surface 124 de la couche réfléchissante 121. La réaction biochimique consiste, du point de vue optique, en la formation ou l'évolution d'une couche mince au niveau du milieu d'intérêt 20, d'indice de réfraction différent (généralement supérieur) de celui du milieu ambiant dans lequel se propage l'onde lumineuse. La

molécule cible 202 est par exemple un anticorps et la molécule sonde 201 un antigène.

Ceci se traduit donc par un changement de l'indice de réfraction au voisinage de la surface 124 de la couche réfléchissante, au niveau du milieu d'intérêt 20. La traversée du milieu d'intérêt 20 par le faisceau lumineux 301 issu de la source lumineuse 11 modifie les caractéristiques du faisceau lumineux réfléchi 303, notamment son intensité lumineuse.

Par réflectance on entend le rapport de l'intensité du faisceau réfléchi 303, $I_{reflected}$, par celle du faisceau indicent 302, $I_{incident}$. La réfléctance est notée $R = I_{reflected}/I_{incident}$.

Pour une incidence et une polarisation données du rayonnement magnétique 301 émis, la réflectance peut être calculée à partir d'une part des caractéristiques optiques, typiquement les indices optiques du milieu ambiant dans laquelle l'onde se propage. On note pour un milieu ambiant a, son indice réel n_A. Le calcul de la réflectance fait appel d'autre part aux caractéristiques de la couche réfléchissante 121 au niveau de laquelle le rayonnement électromagnétique incident 302 est réfléchi. On note pour une couche réfléchissante 121 correspondant à un milieu s, un indice de réfraction complexe $\tilde{n}_s = n_s + i\,k_s$, dont n_s est la partie réelle de l'indice de réfraction complexe et k_s, la partie imaginaire de l'indice de réfraction complexe, est son coefficient d'extinction.

La réflectance R_{AS} est alors définie comme le carré du module du coefficient de réflexion $\tilde{r}_{AS}$ de l'onde électromagnétique. Le coefficient de réflexion est un nombre complexe qui s'exprime selon les relations de Fresnel et se réduit, en incidence normale comme proposé dans l'invention, à :

$$R_{AS} = |\tilde{r}_{AS}|^2 = \left|\frac{n_A - \tilde{n}_S}{n_A + \tilde{n}_S}\right|^2$$

Dans le cas d'une interaction biochimique, le milieu d'intérêt 20 constitue une couche biochimique mince. Un milieu d'intérêt 20 d'une épaisseur d présente par exemple un indice de réfraction $n_c \sim 1{,}47$. Lors

de la traversée du milieu d'intérêt 20, le coefficient de réflexion global $\tilde{r}$ est donné par une expression comparable rendant compte des réflexions multiples sur chacune des interfaces et du retard de phase introduit par la traversée du milieu d'intérêt 20 d'épaisseur d. On note $\tilde{r}_{AC}$ le coefficient de réflexion entre le milieu ambiant 50 et le milieu d'intérêt 20. On note $\tilde{r}_{CS}$ le coefficient de réflexion entre le milieu d'intérêt 20 et la couche réfléchissante 121. On obtient alors pour la réflectance globale:

$$R = |\tilde{r}|^2 = \left| \frac{\tilde{r}_{AC} - \tilde{n}_S e^{2i\frac{2\pi}{\lambda} n_C d}}{1 + \tilde{r}_{AC}\tilde{r}_{CS} e^{2i\frac{2\pi}{\lambda} n_C d}} \right|^2$$

Lorsque le flux du rayonnement incident 302 est constant, le capteur 13 et le calculateur associé 14 permettent de mesurer l'évolution du flux du rayonnement réfléchi collecté 304 à l'instant t par rapport à une mesure de référence, par exemple l'intensité du flux mesuré à l'instant initial : $I_{reflected}(t) / I_{reflected}(0) = 1+ \Delta R/R$.

Le dispositif 10 et le procédé décrits mesurent ainsi la variation relative du flux correspondant au rayonnement réfléchi collecté 304 $[I_{reflected}(t) - I_{reflected}(0)] / I_{reflected}(0)$ égale à la variation relative de la réflectivité $\Delta R/R$.

La sensibilité du procédé est liée aux propriétés optiques de la couche réfléchissante 121, par exemple sa réflectivité ou ses indices optiques.

Déterminer une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt

Il a été remarqué que, dans le cadre des procédés et des dispositifs décrits, le suivi de l'intensité du rayonnement réfléchi mesuré 304 permettait de suivre l'évolution de l'épaisseur optique du milieu d'intérêt et de mesurer ainsi une interaction entre les molécules sonde 201 du milieu d'intérêt 20 et des molécules cibles 202.

Cet effet est obtenu en particulier et de façon optimale pour un rayonnement émis 301 compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm, et une couche réfléchissante 121 présentant une

réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale.

Ainsi, les mesures par le capteur 13 de l'intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt 20 dans des conditions d'illumination et de mesure constantes, permettent de détecter un changement des propriétés réfléchissantes de l'ensemble 40 comprenant le milieu d'intérêt 20 et la couche réfléchissante 121 et de déterminer une modification d'une épaisseur optique ($n_C \times d$) du milieu d'intérêt 20 correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt 30.

Choix d'une mesure de référence

Comme décrit ci-avant, la méthode proposée nécessite de disposer d'une mesure de référence à laquelle comparer l'intensité réfléchie. La mesure de référence peut être, comme décrit ci-avant, la mesure réalisée à l'état initial. Alternativement la mesure peut être réalisée sur une surface dédiée de même nature que la surface 124 étudiée mais qui ne subit pas de transformation.

Modes de réalisations de la couche réfléchissante

Des matériaux prometteurs pour la couche réfléchissante 121 du dispositif sont le silicium et l'or, mais également le cuivre ou l'acier inoxydable.

Couche réfléchissante comprenant du silicium

Le silicium présente un indice de réfraction complexe dont la partie réelle est très élevée ($n \sim 4$ et $k<0.1$ dans toute la bande spectrale comprise entre 350 nm et 1000 nm) comparativement à l'indice de toute couche biochimique ou inorganique (son oxyde natif par exemple) ce qui permet un suivi avec une très grande sensibilité (<0.1nm) du dépôt de couches minces à sa surface.

Les figures 3 et 4 montrent l'évolution théorique de la variation relative de réflectivité lors du dépôt de couches minces organiques d'épaisseur croissante sur Si. La courbe 803 représente l'évolution de la variation de réflectivité dans le cas d'une couche réfléchissante 121 de silicium éclairée par un rayonnement ayant une longueur d'onde de 490 nm, le milieu ambiant 50 étant constitué d'eau. La courbe 804 représente l'évolution de la variation de réflectivité dans le cas d'une couche réfléchissante 121 de silicium éclairée par un rayonnement ayant une longueur d'onde de 634 nm, le milieu ambiant 50 étant constitué d'eau. On remarque que le changement de réflectivité est périodique avec l'épaisseur d du milieu d'intérêt 20. Ceci est dû au terme exponentiel complexe dans l'expression de la réflectance globale R.

La figure 3 permet également d'apprécier la sensibilité $dR/d(n_C \times d)$ du dispositif de détection et du procédé décrits.

La figure 4 montre l'évolution théorique de la sensibilité par rapport à l'épaisseur $dR/d(d)$, qui a un comportement similaire à la sensibilité $dR/d(n_C \times d)$ par rapport à l'épaisseur optique, en fonction de la longueur d'onde du rayonnement émis 301. Dans le cas du silicium, le dépôt d'une sous-couche transparente 123 permet de modifier R de manière à contrôler la sensibilité, $dR/d(n_C \times d)$. La couche transparente 123 est par exemple réalisée en oxyde de silicium et générée par traitement thermique. La couche transparente 123 peut également être réalisée en nitrure de silicium.

Couche transparente

La courbe 806 représente l'évolution de la sensibilité en fonction de la longueur d'onde dans le cas d'une couche réfléchissante constituée uniquement de silicium. La courbe 807 représente l'évolution de la sensibilité dans le cas d'une couche réfléchissante constituée d'une sous-couche opaque 122 de silicium et d'une sous-couche transparente 123 d'oxyde de silicium de 40 nm d'épaisseur. La courbe 808 représente l'évolution de la sensibilité dans le cas d'une couche réfléchissante

constituée d'une sous-couche opaque 122 de silicium et d'une sous-couche transparente 123 d'oxyde de silicium de 120 nm d'épaisseur. Ainsi la comparaison de ces courbes montre que la présence d'une sous-couche transparente 123 mince d'oxyde de silicium, d'au moins 10 nm, sur la sous-couche opaque 122 de silicium permet d'optimiser la sensibilité de la détection. Mais on peut aussi utiliser des couches plus épaisses d'oxydes afin de former des substrats présentant une variation de sensibilité dans la gamme spectrale. Pour une sous-couche transparente 123 d'oxyde de silicium de 120 nm d'épaisseur, on remarque que la sensibilité est maximale dans le bleu.

Par ailleurs, la source lumineuse 11 est caractérisée par une longueur d'onde moyenne λ et une largeur spectrale $\Delta\lambda$ ou $\Delta\sigma$, avec $\sigma=1/\lambda$. A partir de l'expression de la réfléctance en fonction de la longueur d'onde λ, on voit que, pour une source monochromatique, les conditions sur R et dR/de, sensibilité par rapport à l'épaisseur e de la sous-couche transparente 123 et du milieu d'intérêt 20, peuvent imposer des conditions sur la longueur d'onde λ de travail à sélectionner en fonction de la surface de substrat choisie.

Dans le cas d'une couche transparente d'indice optique de partie réelle n et de partie imaginaire k=0, R et donc la sensibilité, dR/de, sont des fonctions périodiques de l'épaisseur e, de période $\lambda/2n_C$.

Pour une source de largeur spectrale $\Delta\lambda$, la sensibilité dR/de est conservée aux faibles épaisseurs, typiquement inférieures à 100 nm, et amortie pour les grandes épaisseurs. Le facteur d'amortissement est supérieur à 0.5 lorsque l'épaisseur optique $n_C \times e \leq 1/(4 \times \Delta\sigma)$.

Une détection sensible impose donc un critère supplémentaire sur l'épaisseur e de la sous-couche transparente qui peut recouvrir le substrat en fonction de la largeur spectrale de la source utilisée.

Typiquement, un filtre interférentiel placé devant une lampe halogène permet de réaliser une source de longueur d'onde moyenne 500 nm avec une largeur spectrale d'environ 20 nm. De même, les LEDs

puissantes ont typiquement des largeurs à mi-hauteur allant de 20 à 50 nm sur le domaine spectral 350 – 1000 nm.

Si $\Delta\sigma = 1000cm^{-1}$, c'est à dire $\Delta\lambda$=25 nm à λ = 500 nm, ou $\Delta\lambda$ = 100 nm à λ = 1000nm, le critère supplémentaire sur l'épaisseur d' de l'ensemble (d'=d+e, avec e épaisseur de la sous-couche et d épaisseur du milieu d'intérêt) se traduit par : $n_C \times d' \leq 1/(4 \times \Delta\sigma) = 2.5$ µm, soit $d' \leq 1.6$ µm pour $n_C = 1.5$.

Si $\Delta\sigma = 2000\ cm^{-1}$, c'est-à-dire $\Delta\lambda$ = 50 nm à λ = 500 nm, ou $\Delta\lambda$ = 200 nm à lambda = 1000 nm, le critère supplémentaire sur l'épaisseur d' de l'ensemble se traduit par : $n_C \times d' \leq 1/(4 \times \Delta\sigma) = 1.25$ µm, soit $d' \leq 0.8$ µm pour $n_C = 1.5$.

Ainsi, la sous-couche transparente 123 présente préférentiellement une épaisseur inférieure à 1600 nm.

Couche réfléchissante comprenant de l'or

L'or présente également des propriétés optiques remarquables. Contrairement au silicium, le dépôt d'un milieu d'intérêt 20 comprenant une couche biochimique sur une couche réfléchissante 121 d'or induit des variations relatives de réflectivité dépendant fortement de la longueur d'onde du rayonnement lumineux émis 301.

La figure 3 présente l'évolution de la variation relative de réflectivité d'une couche réfléchissante 121 d'or, dans le cas d'un milieu d'intérêt 20 constitué d'un couche mince homogène et isotrope présentant un indice de réfraction n_C=1,47, le milieu ambiant étant un milieu aqueux d'indice n_A=1,33. La courbe 802 représente une telle évolution pour un rayonnement émis 301 à une longueur d'onde de 490 nm. La courbe 801 représente une telle évolution pour un rayonnement émis 301 à une longueur d'onde de 634 nm. Les variations de réflectivité sont donc quatorze fois plus fortes dans le bleu que dans le rouge. Une détection optique basée sur la réflectométrie dans le bleu permet ainsi de caractériser la croissance de couches organiques sur une surface d'or.

La courbe 805 de la figure 4 représente l'évolution de la sensibilité en fonction de la longueur d'onde dans le cas d'une couche réfléchissante constituée uniquement d'or. Une sensibilité optimale ainsi peut être obtenue dans le cas d'une couche réfléchissante 121 en or, lorsque le rayonnement émis 301 est compris entre 350 nm et 500 nm.

La méthode et le dispositif décrits permettent, par une acquisition d'images par un capteur 13, de quantifier l'évolution de la distribution locale d'un milieu d'intérêt 20 formant couche mince sur la surface 122 d'une couche réfléchissante 121.

Par exemple, la courbe 802 de la figure 3 montre que pour un milieu d'intérêt 20 d'une épaisseur inférieure à 30nm et d'une couche réfléchissante d'or éclairée par un rayonnement émis 301 de 490 nm, la réflectivité décroît avec l'épaisseur du milieu d'intérêt. Typiquement, en milieu aqueux un milieu d'intérêt 20 mince d'indice n_C=1.47 induit une variation de réflectivité de 0.38% par nm. Pour un milieu d'intérêt 20 de densité 1.35 g/cm3, valeur typique pour les films minces organiques ou les biomolécules, une variation de réflectivité de 0.38% correspond au dépôt sur la surface de 1.35ng/mm2.

La détection de l'immobilisation d'une protéine de 5 nm d'épaisseur dans les mêmes conditions de la courbe 802 se traduit par une diminution de l'intensité lumineuse réfléchie de ~2%, c'est-à-dire par une surface 2% moins lumineuse qu'avant l'immobilisation de la protéine.

L'analyse d'une réaction biochimique sur un substrat 12 nécessite l'utilisation d'une source lumineuse 11 stable. Par stable, on entend qui présente une variation d'intensité inférieure à 0.2% pendant la réaction. Le capteur 13, tel qu'une caméra optique, doit également dans ces conditions pouvoir détecter une variation d'intensité lumineuse inférieure à 0,2%.

Exemples d'applications

Immunoessais

L'élaboration d'un immunoessai consiste à immobiliser sur une couche réfléchissante 121 d'une molécule d'intérêt biologique, par exemple un antigène 201 sur une couche réfléchissante 121 d'or. La détection de l'interaction entre l'antigène 201 immobilisé et un anticorps 202 associé est obtenue par comparaison de l'image obtenue par le capteur 13 comprenant plusieurs pixels, avant et après interaction potentielle avec l'anticorps 202.

La détermination quantitative 704 de la variation relative de réflectance est alors obtenue par comparaison entre une intensité mesurée sur la première image, $I_0(i,j)$ en chaque pixel de coordonnées (i,j) avec une intensité mesurée sur le même pixel sur l'image obtenue au temps t, $I_t(i,j)$ et $1+\Delta R(t,i,j)/R = I_t(i,j)/I_0(i,j)$. La détection en temps réel est simplement réalisée par le suivi *in situ*, en solution aqueuse, par exemple une solution d'un sérum, d'une intensité lumineuse du rayonnement réfléchi 303 par la couche réfléchissante 121. La détermination quantitative de la quantité de matière immobilisée est directement obtenue à partir de la mesure de $1+\Delta R/R$ et de sa corrélation présentée par un abaque telle que représentée en figure 3. Cette évolution est obtenue, avec un capteur 13 tel qu'une caméra CCD, par enregistrement successif d'images du rayonnement réfléchi 301. Une analyse cinétique peut être obtenue par le suivi de $1+\Delta R(t,i,j)/R$ en chaque pixel du capteur 13.

Exemple d'une interaction antigène-anticorps Ag-Ac

La figure 5a représente une interaction entre la β-lactoglobuline 201 et son anticorps associé 202 présent dans un sérum de lapin. La figure 5b représente l'évolution 809 de la réflectivité en une zone de 5x5 μm^2 d'une couche réfléchissante 121 d'or. La figure 5c représente la variation de réflectivité à t=0 en fonction du facteur de dilution du sérum. Ainsi la figure 5c représente la gamme dynamique de l'immunoessai obtenue par la

pente (en s^{-1}) aux temps courts ; l'origine à t=40s correspond à l'injection de la cible.

La sensibilité et la gamme dynamique de cet immunoessai sont obtenus préférentiellement par la pente à l'origine de la variation de la réflectivité avec le temps de réaction. Dans le cas de la β-lactoglobuline et pour une surface d'or de 4 µm2, la sensibilité correspond à une dilution de 1/50000 du sérum du patient, une sensibilité comparable à celle obtenue en SPR, soit environ 1/30000. La gamme dynamique linéaire de notre détection s'étend de dilutions de sérum allant de 1/50000 à plus de 1/1000.

Le dispositif et le procédé décrits permettent également une analyse quantitative de la réaction biochimique sonde-cible. Il est ainsi possible de mesurer à partir du changement relatif de réflectivité la quantité de molécules cibles immobilisées sur la surface. Par exemple sur la figure 5b, la réflectivité mesurée aux temps longs sur une région de 5 x 5 μm^2 correspond à l'adsorption de 4.5 ng/mm^2 d'anticorps soit une concentration surfacique de 3 x 10^{-14} mol/mm^2. L'image de toute la surface permet de cartographier l'homogénéité de couverture de la surface par l'anticorps dans tout le champ imagé, par exemple 400 x 400 μm^2 avec une résolution de 0.4 µm.

Il est également possible de déterminer à partir du suivi *in situ* et en temps réel de l'interaction antigène-anticorps la cinétique et la thermodynamique de ce processus de reconnaissance. La cinétique détectée sur la figure 5b comme une décroissance de réflectivité peut être analysée, comme cela est fait dans de nombreux biocapteurs par exemple en SPR, par un processus d'adsorption/désorption du premier ordre. Les variations de réflectivité expérimentale sont comparées à une évolution exponentielle de type Langmuir représentée par la courbe 810 sur la figure 5b.

On extrait de la comparaison expérience/modèle la vitesse apparente du couplage anticorps-antigène. De nombreux modèles sont

connus de l'homme du métier pour rendre compte notamment du transport de matière souvent limitant. Dans la version la plus simplifiée du modèle cinétique, la constante apparente est décrite par $k_{app} = k_a C_0 + k_d$ où k_a est la constante cinétique du phénomène d'association exprimée en $M^{-1}s^{-1}$, k_d est la constante de dissociation du complexe immun en s^{-1} et C_0 correspond à la concentration de l'espèce cible présente en solution, à savoir l'anticorps sur la figure 5a. On obtient k_a et k_d et donc la constante thermodynamique d'association du complexe immun $K_A=k_a/k_d$ par observation de processus d'adsorption/désorption à plusieurs concentrations de cible en solution. Dans l'exemple présenté sur les figures 5a à 5c, on estime à partir des cinétiques de reconnaissance pour des dilutions de sérum allant de 1/1000 à 1/10000 $k_d = 8 \times 10^{-4}$ s^{-1}, la pente de la variation de k_{app} avec le facteur de dilution est de $8.2/C^*$ $M^{-1}s^{-1}$ où C* est la concentration de l'anticorps cible dans le sérum. La constante thermodynamique de la réaction de couplage est obtenue par $K_A=k_a/k_d$, ici $K_A = 10^4/C^*$ M^{-1}.

Interaction anticorps/anti-anticorps (IgG/Anti-IgG) – détection de sandwiches immunologiques complets

Contrairement à la SPR, la mesure 703 de réflectivité n'est pas associée à la création d'une onde électromagnétique évanescente, dite plasmon de surface, se propageant au voisinage de la surface 124 de la couche réfléchissante 121. Alors que la SPR repose sur la détection des perturbations de ce champ évanescent induit par la couche réfléchissante 121, la détection par la mesure 703 de réflectivité n'est pas limitée à des milieu d'intérêt 20 minces d'épaisseurs inférieures à la longueur de pénétration de l'onde évanescente, par exemple inférieures à 150 nanomètres avec une sensibilité diminuant quand l'épaisseur du milieu d'intérêt 20 augmente.

La figure 3 montre que la mesure de réflectivité ne présente pas cette limitation. On observe des oscillations pour de tels milieux d'intérêts 20 d'épaisseurs croissantes. Il est donc possible d'observer par le procédé

et le dispositif décrits pour des assemblages biomoléculaires plus complexes qu'avec la SPR comprenant par exemple plusieurs empilements biochimiques ou même d'utiliser le procédé et le dispositif décrits pour suivre des couplages d'objets plus gros tels des assemblages ou agglutination de nanoparticules ou nano-objets sur une couche réfléchissante 121 d'or. La variation oscillante du signal de réflectivité montre qu'une mesure quantitative de milieu d'intérêt épais, par exemple d'épaisseur supérieure à 50 nm, requiert le suivi de l'évolution en temps réel du signal capté par le capteur 13.

On met en évidence la présence d'un anticorps 201 immobilisé sur une surface 124 d'une couche réfléchissante par interaction avec son antigène associé 202 présent en solution (Figures 6a et 6b) mais également par l'interaction ultérieure de l'anticorps immobilisé 201 avec son anti-IgG associé (Figures 6c et 6d). Un tel exemple est illustré sur les figures 6a à 6d qui présentent le suivi en temps réel et *in situ* de l'interaction Ag-Ac de l'α-lactalbumine (Ag) en une solution avec son anticorps, Ac ou anti-α-lactalbumine, immobilisé sur or (figure 6b) ou le suivi de l'interaction de Ac avec l'anti-IgG (anti-anti-α-lactalbumine) (Figure 6d). Les mesures sont effectuées avec 0,2 µmol/L d'α-lactalbumine ou un sérum contenant l'anti-IgG dilué à 1/1000. La limite de détection de l'α-lactalbumine est estimée à 0,1 nmol/L et celle de l'anti-IgG à une dilution inférieure à 1/30000.

Cet exemple montre que le procédé et le dispositif décrits permettent, sans perte de sensibilité, de détecter des sandwiches immunologiques complets (séquence Ag/Ac/anti-Ac), plus délicats à mettre en évidence par SPR. Le procédé et le dispositif décrits permettent également de détecter des assemblages avec des objets plus volumineux utilisant par exemple des nanoparticules.

Enfin tous ces assemblages peuvent être dissociés par mise en contact avec une solution de glycine ou de force ionique élevée. Cette

dissociation rapide peut également être suivie par imagerie *in situ* et en temps réel de l'augmentation de réflectivité de la surface 124 de la couche réfléchissante 121.

Les exemples présentés ici sont illustrés sur une surface 124 d'or plane obtenue par dépôt d'une couche réfléchissante 121 d'or de 100 nm sur un wafer de silicium. Ils peuvent aisément s'adapter au suivi de réactions biochimiques similaires sur une surface de silicium (un wafer de silicium avec un oxyde ou un nitrure associé) ou sur des surfaces de cuivre ou d'acier inoxydable par exemple recouvertes d'une couche mince transparente les protégeant de la corrosion.

Formats

Immunoessai en format miniaturisé

Par microfabrication il est aisé de déposer des microstructures telles des microdomaines d'or, sur tout type de substrat (verre, polymère,...) et de les adresser électriquement individuellement (réseau de microélectrodes d'or). La préparation d'un immunoessai à haut débit de type puce immunologique, consiste à immobiliser un grand nombre de protéines ligands (différents antigènes par exemple) sur ces microélectrodes. L'immobilisation sélective d'un antigène sur une microélectrode donnée est rendu possible par l'utilisation d'un processus électrochimique: on peut activer sélectivement et indépendamment une électrode, par application d'un potentiel ou d'un courant électrique, afin d'en modifier sa chimie de surface. Plusieurs procédés d'électrogreffage ou de fonctionnalisation de surface électrochimique ont été décrits dans la littérature. On peut citer différentes voies utilisant l'électrochimie des diazoniums ou des thiols.

L'électrochimie des diazoniums permet de greffer sur une électrode: (1) un groupement carboxyphényl ($^{-}C_6H_5COOH$) à partir de

carboxyphenyldiazonium ($^{+}N_2C_6H_5COOH$) ou (2) un antigène à partir du diazonium correspondant de l'antigène qui peut être préparé par couplage peptidique entre l'antigène et le même carboxyphényldiazonium (B. P. Corgier, C. A. Marquette, L. J. Blum *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (51), 18328-18332.). La voie (2) permet de greffer directement et sélectivement un antigène sur toute électrode polarisée à un potentiel inférieur à -0.4 V par rapport à l'électrode au calomel saturée. La voie (1) introduit de même le groupement carboxyphényl sélectivement sur toute électrode polarisée. L'ancrage de l'antigène se fait ensuite par couplage peptidique, par exemple par utilisation de réactifs de type EDC/NHS entre le groupement COOH de surface et un antigène présent dans la solution recouvrant la plateforme.

Dans le cas de l'utilisation de thiols, des voies électrochimiques permettent également l'immobilisation sélective d'antigène sur une électrode. Si l'adsorption de thiol sur une surface 124 d'or n'est pas sélective, on peut désorber sélectivement le thiol d'électrodes d'or par application d'un potentiel fortement réducteur ou oxydant aux électrodes que l'on désire ainsi nettoyer ou renouveler. Un couplage peptidique entre un antigène et le thiol restant sur les électrodes non sollicitées électrochimiquement permet une immobilisation sélective de l'antigène. On peut également accélérer le dépôt de thiol sur une électrode par induction électrochimique (par réduction et donc application d'un potentiel cathodique) et ainsi rendre le dépôt d'antigène (après couplage peptidique) sélectif.

Toutes ces étapes peuvent, être suivies en temps réel et in situ par imagerie des variations relatives de la réflectivité des surfaces activées. Par exemple les figures 7a et 7b présentent l'électrogreffage sélectif d'une couche organique de diazonium sur une microélectrode d'or présente dans un canal microfluidique. Une couche organique croît seulement sur la microélectrode activée électrochimiquement, ce qui est attesté par la

diminution de la réflectivité de cette seule microélectrode au cours du greffage.

La figure 7a représente le suivi temps réel de la cinétique de la croissance d'un film mince d'épaisseur finale 10 nm obtenu par électrogreffage d'un sel de diazonium. La figure 7b représente une image de réflectivité montrant le dépôt d'un film mince, de 30 nm d'épaisseur, sélectivement sur l'électrode d'or activée.

Ce type de dispositif reposant sur une mesure de la variation de réflectivité en temps réel permet de détecter *in situ* et en temps réel une réaction biochimique conduisant à un accroissement de la couche mince constituant le milieu d'intérêt 20 et permet de définir un immunoessai miniaturisé en cellule microfluidique fermée selon les étapes schématisées sur les figure 8a à 8e. L'imagerie de la réflectivité permet de rendre compte simplement de la sélectivité de chacune des étapes : fonctionnalisation de surface par fonction terminale COOH représentée figure 8a par une solution de $^{+}N_2$-Ar-CO_2H, ancrage sélectif de ligand représentées figures 8b par ajout d'une solution d'EDC/NHS et 8c par ajout de ligand, détection sélective de la cible sur l'électrode fonctionnalisée avec l'antigène correspondant, mais aussi et en même temps détection de la spécificité de la réaction par mesure sur l'électrode fonctionnalisée avec un autre antigène représentées figures 8d et 8e.

Cette approche est développable en système microfluidique fermé ou ouvert comme indiqué ci-avant. Elle n'est pas non plus limitée aux plateformes simples décrites ici constituées de réseaux de microélectrodes implantées dans le fond d'un canal mirofluidique. Elle est également adaptable à des plateformes constituées de microleviers (« microcantilevers » en terminologie anglo-saxonne) adressés individuellement. Dans ce cas, on peut utiliser, dans une formulation dérivée de celle proposée dans Optics Lett. 2011 (Amiot et al.), un éclairage à 2 longueurs d'onde pour découpler les contributions optiques liées à la déformation du levier et à la réaction biochimique en identifiant

les contributions dépendantes et indépendantes de la longueur d'onde. Un éclairage bicolore est obtenu aisément et à moindre coût par utilisation de LED. L'activation sélective de différents leviers est également rendue possible par activation électrochimique et par les méthodes d'électrogreffage proposées précédemment.

L'utilisation de ces plateformes activables électrochimiquement permet aussi de multiplier le nombre de détection (optique et électrochimique, voire mécanique dans le cas de microleviers). Cette redondance de mesures d'interactions permet d'augmenter la fiabilité des immunoessais proposés.

Immunoessais grands formats

Le dispositif 10 proposé n'est pas contraint par la dimension du substrat 12 à analyser. En effet la détection de la présence d'une protéine d'intérêt est obtenue par comparaison point-par-point d'une image du substrat avant et après, ou au cours de l'immobilisation de cette protéine sur le substrat. L'analyse d'un substrat de grande dimension, de surface supérieure à 5 x 5 cm^2 par exemple, est possible par reconstruction à partir d'images de différentes régions et constituant une succession d'images ou de prises de vues photographiques et de déplacements de la surface par rapport à l'objectif. Ceci requiert d'imager au préalable tout ou partie de la surface du substrat avant immobilisation ou avant l'étape d'immobilisation que l'on souhaite étudier. Dans cette configuration, cette acquisition préalable est prise comme image de référence. Par exemple on peut prendre comme région de référence, dans chaque image élémentaire, les parties de l'image qui présentent les valeurs d'intensité les plus grandes. Les images du substrat obtenues après immobilisation seront comparées à celles de références et permettront de rendre compte de l'étape d'immobilisation. Ainsi, chaque région correspondant à la présence d'une protéine ou d'une interaction sur la surface est détectée par une diminution locale de la réflectivité de la surface.

L'analyse peut se faire *ex situ* afin d'augmenter la sensibilité de détection, mais peut également avoir lieu *in situ*. Le champ observé dépend du dispositif utilisé, avec un dispositif comprenant un microscope optique, il dépend de l'objectif utilisé. Par exemple le champ peut être de 0,5 x 0,5 mm^2 avec un objectif x 20, mais peut également être augmenté dans une configuration utilisant un système comprenant des lentilles et une caméra ou un appareil photographique par exemple.

Cette configuration est particulièrement adaptée à la détection dans des puces à protéines de grandes dimensions. Dans ces puces, différentes protéines ligands sont immobilisées individuellement en différentes positions d'un substrat 12 afin, par exemple, de détecter l'interaction de chacune d'elles avec une ou plusieurs cible(s) présente(s) dans un milieu ambiant 50 liquide.

Ce type d'analyse existe en immunologie, la réponse immunologique de chacune des protéines ligands vis-à-vis de cibles présentes par exemple dans un sérum étant obtenue par mise en contact d'un support 2D de ligands avec un sérum puis par révélation par marquage secondaire des anticorps cibles ayant interagi avec les ligands (eux-mêmes marqués par des terminaisons fluorescences ou radioactives).

Le procédé et le dispositif proposés permettent de transposer cette stratégie sur une surface 124 d'or avec une détection *in situ* et sans label. Le procédé et le dispositif décrits permettent tout d'abord de mettre en évidence les différentes étapes de l'immobilisation des ligands mais également de révéler la présence et la position des ligands sur le substrat 12 d'analyse.

Il est également possible de suivre, par le dispositif et le procédé décrits, *in situ* et en temps réel l'interaction cible-ligand. Si on fait réagir la surface de la puce à protéine avec un sérum contenant une seule cible par exemple les anticorps de la β-lactoglobuline, d'un seul des ligands immobilisés sur la surface, par exemple la β-lactoglobuline, l'imagerie de

la réflectivité de la surface d'or après réaction avec le sérum doit présenter une diminution de réflectivité uniquement dans la seule région où le ligand a été préalablement immobilisé. Cette mesure peut se faire *in situ* et *en temps réel* si l'on connaît au préalable l'emplacement de la cible sur la surface. Ceci est par exemple le cas lorsque l'on cherche à dépister une cible connue dans un mélange complexe. Il est ainsi possible d'utiliser ce type de stratégie pour définir un immunoessai à haut débit sur surface réfléchissante.

Cet immunoessai haut-débit peut être également miniaturisé pour fonctionner en canal microfluidique. On assemble sur la surface d'or où ont été immobilisées les ligands un canal microfluidique dans lequel on fait circuler un mélange de molécules cibles formant un sérum. On peut utiliser par exemple la méthode utilisée pour assembler une cellule à flux proposée dans le brevet WO2006/047591, qui consiste à attacher à la surface d'or une couche de Mylar adhésive dans laquelle un canal a été préformé et à la surmonter d'un capot également en Mylar.

Couplage de mesures de types différents

Les étapes décrites et proposées peuvent être couplées à d'autres mesures physicochimiques dont les étapes peuvent être inclues au procédé proposé.

Le procédé peut ainsi comprendre en outre une étape consistant à mesurer par un deuxième capteur une grandeur électrique dont une modification, en particulier une variation, est représentative d' une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt, la grandeur électrique étant représentative de propriétés de transport de charges électriques entre la surface 121 et le milieu d'intérêt, phénomène physique distinct de la mesure du rayonnement électromagnétique réfléchi, l'étape de mesure étant réalisée simultanément à l'étape de mesure 703 de l'intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi.

Il est ainsi possible de réaliser, en parallèle et/ou à l'aide d'un dispositif commun, des mesures électriques permettant de rendre compte de ou de détecter des phénomènes magnétiques, électriques ou électrochimiques. Des mesures électriques correspondant à de tels phénomènes peuvent par exemple comprendre des mesures de conductimétrie, d'impédance, de potentiométrie et/ou d'ampérométrie, du même phénomène moléculaire ou biomoléculaire observé.

La configuration et la géométrie d'un dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt tel que décrit ci-avant est particulièrement adapté à un couplage avec d'autres types de mesures. En effet, le dispositif de mesure décrit permet une mesure d'un champ électromagnétique, typiquement une mesure optique, non destructrice vis-à-vis du milieu d'intérêt. Le procédé et le dispositif décrits permettent ainsi une implémentation aisée d'autres techniques d'analyses.

Le dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt proposé précédemment peut ainsi comprendre en outre au moins un deuxième capteur adapté pour mesurer une grandeur physique représentative de propriétés de transport de charges électriques entre la surface 121 et le milieu d'intérêt, typiquement pour réaliser une mesure de type différent telle que décrite ci-dessus, par exemple une mesure électrique.

De telles mesures électriques peuvent ainsi être réalisées par des deuxièmes capteurs dédiés. Les deuxièmes capteurs peuvent être connectés à un dispositif de mesure électrique. Le dispositif de mesure électrique peut être un dispositif de mesure électrique externe, ou être inclus au dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt tel que décrit précédemment. De telles mesures électriques peuvent être réalisées au moyen d'au moins 2 électrodes. Un capteur dédié peut former une électrode. L'une des électrodes peut être formée par l'une des surfaces indiquées précédemment, par exemple la surface 124 de la couche réfléchissante 121. Une deuxième électrode peut être introduite dans la solution ou le milieu ambiant.

Selon un exemple de mode de réalisation, une telle combinaison de mesures d'intensité de rayonnement électromagnétique d'une part et électrique d'autre part, peut être mise en œuvre par un capteur ou une pluralité de capteurs présentant une conductivité électronique correspondant à celle d'un métal, par exemple de l'or comme décrit précédemment, d'un alliage de métaux, ou encore de silicium, en particulier de silicium dopé. Un tel deuxième capteur formant une électrode peut être placé en contact direct avec le milieu d'intérêt ou la solution. La réponse électrique mesurée correspond à ou permet de détecter la présence ou l'absence d'une couche donnée, par exemple une couche de matériel biologique correspondant à ou responsable d'une réaction impliquant une modification d'épaisseur optique d'une couche, telle qu'une réaction d'immunodosage ou d'immunoessai donnée. En effet une telle réaction peut altérer la propriété électrique et/ou la pluralité de propriétés électriques, telles que la conductivité, l'impédance, un potentiel, et/ou un courant, mesurée par l'électrode et/ou une pluralité d'électrodes. Le deuxième capteur électrique formant l'électrode 121 peut également être enfoui sous une couche mince diélectrique, par exemple une couche isolante, par exemple transparente telle que la sous-couche transparente 123, par exemple un oxyde de silicium, par exemple du SiO_2, le deuxième capteur électrique pouvant ainsi être disposé sans contact direct avec la solution et/ou le milieu d'intérêt. Le dispositif peut être réalisé de telle sorte que les propriétés optiques d'une zone de mesure du capteur 13 d'intensité de rayonnement, par exemple une surface spécifique du capteur s'accommodent de la présence de la couche diélectrique pour donner une réponse de sensibilité optique suffisante, par exemple comme décrite par la courbe 807 sur la Figure 3. Il convient alors que le dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt et/ou le procédé de mesure décrit précédemment est réalisé de telle sorte que la mesure électrique, par le deuxième capteur électrique, des propriétés de transport de charges électriques entre la couche 121, la couche diélectrique 123 et le milieu

d'intérêt présentent une sensibilité électrique également suffisante, c'est-à-dire la sensibilité permettant la détection de la même réaction que mesurée par le capteur 13 d'intensité de rayonnement. Ceci peut être obtenu par exemple par une couche diélectrique suffisamment mince pour permettre une mesure électrique, par exemple une mesure d'impédance, c'est-à-dire une mesure de capacité à haute fréquence, sensible à la couche éventuellement en formation et résultant de la réaction que l'on cherche à détecter, par exemple un dépôt induit par l'immunoessai qui altère la capacité du deuxième capteur. On peut ainsi par exemple réaliser une mesure, dite « sans-contact », de capacité comme par exemple dans les capteurs capacitifs de type TouchChip™ fingerprint Sensors (TCS).

L'étape de détection 704 peut alors être réalisée à partir des mesures électriques effectuées par le deuxième capteur.

Les moyens de calcul 14 peuvent alors être adaptés pour réaliser la détection en fonction des mesures décrites précédemment et des mesures issues du deuxième capteur.

Quel que soit le mode de détection, la modification d'épaisseur optique dont le procédé et le dispositif visent à déterminer la présence, se traduit par une variation d'un signal : un rayonnement électromagnétique, en particulier un signal optique, en ce qui concerne la mesure par le capteur de rayonnement décrit précédemment, un signal électrique dans le cadre d'une mesure électrique, par exemple de résistance, d'impédance, c'est-à-dire de résistance et/ou de capacité, de potentiel ou de courant.

Le procédé peut ainsi comprendre une étape comparaison des différentes mesures, par exemple de la mesure de rayonnement électromagnétique et d'au moins une mesure électrique. Une telle étape de comparaison pourra être obtenue par des tests électroniques logiques standards, par exemple mis en œuvre par les moyens de calcul 14. Une telle étape peut comprendre une étape de corrélation des mesures. Une

telle étape de comparaison peut permettre d'augmenter la robustesse de la détection.

En complément ou en alternative, les moyens de calcul peuvent être adaptés pour filtrer les données issues de l'étape de détection à partir des données issues du deuxième capteur, par exemple à partir de données de détection calculées par les moyens de calcul 14 à partir de données issues du deuxième capteur.

Un tel couplage entre la mesure d'un rayonnement électromagnétique décrite précédemment et la mesure d'un autre phénomène, par exemple une mesure électrique, ou des données de détection issues de ces mesures, peut être mis en œuvre par un dispositif tel que le dispositif proposé, comprenant en outre un deuxième capteur électrique ou une pluralité de deuxièmes capteurs électriques.

La pluralité de types de mesures différents du même phénomène sur la même surface par exemple par une pluralité de capteurs, permet d'augmenter de manière significative la fiabilité des résultats d'un test ainsi mis en œuvre par le procédé ou le dispositif proposé.

Un tel couplage peut par exemple être mis en œuvre dans le cadre d'une étape de détection de faux positifs utilisant les résultats des différentes mesures. Une telle étape peut être mise en œuvre par les moyens de calcul décrits, les moyens de calcul fournissant en sortie une valeur corrigée, par exemple en supprimant les faux positifs détectés par les différents types de mesures.

Ainsi la modification détectée lors de l'étape de détection peut être corrigée lors d'une étape de correction à partir des données issues de capteurs et/ou de mesures distinctes et/ou de type différent.

Par exemple, en référence à la figure 7b, la microélectrode utilisée pour réaliser un électrogreffage peut permettre la réalisation d'une mesure électrochimique en parallèle des étapes décrites précédemment pour la mesure du milieu d'intérêt par un rayonnement électromagnétique. L'exemple d'électrogreffage présenté sur la figure 7b est produit par

connexion sélective de l'électrode activée. On peut alors suivre le courant qui traverse chacune de ces électrodes pendant cet électrogreffage. L'électrode inactivée présente un courant <1 pA tandis que l'électrode activée présente un courant >100 pA.

L'électrogreffage se traduit par une diminution de réflectivité mesurable (-4% sur Figure 7a) sur l'électrode active et par une variation de réflectivité inférieure à la sensibilité optique sur l'électrode active.

La comparaison des deux mesures peut ainsi permettre une détection plus robuste de la présence ou de l'absence d'un dépôt sur les deux électrodes, à l'aide du procédé décrit présentant les deux étapes de mesure et/ou du dispositif décrit présentant les deux capteurs. Les résultats divergents entre les deux types de mesure peuvent par exemple être considérés comme de faux positifs ou faux négatifs.

REVENDICATIONS

1. Procédé de mesure d'un milieu d'intérêt (20), le procédé comprenant des étapes consistant à :

- disposer (701) le milieu d'intérêt (20) entre une source lumineuse (11) adaptée pour émettre un rayonnement électromagnétique (301) et un substrat (12) comprenant une couche (121) présentant des propriétés réfléchissantes,
- éclairer (702) le substrat (12) par un rayonnement électromagnétique incident (302) issu de la source lumineuse (11), la couche réfléchissante (121) produisant un rayonnement électromagnétique réfléchi (303) à partir du rayonnement électromagnétique incident (302), et
- mesurer (703) par un capteur (13) une intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt (20),
- détecter (704) à partir de mesures effectuées par le capteur (13) dans des conditions d'illumination et de mesure constantes, un changement des propriétés réfléchissantes de l'ensemble (40) comprenant le milieu d'intérêt (20) et la couche réfléchissante (121) et déterminer une modification d'une épaisseur optique (n_C x d) du milieu d'intérêt (20) correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt (30),

dans lequel le rayonnement électromagnétique émis (301) est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm, et la couche réfléchissante (121) présente une réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'étape de détection (704) comprend une détermination (705) par un abaque de l'épaisseur

optique du milieu d'intérêt (20) directement à partir du suivi de l'intensité du rayonnement électromagnétique mesuré dans les conditions d'illumination et de mesure constantes.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans lequel les conditions d'illumination et de mesure constantes pour l'ensemble des mesures (703) comprennent un positionnement relatif fixe de la source lumineuse, de la couche réfléchissante et du capteur (13), et un même rayonnement électromagnétique émis (701) par la source lumineuse (11) pour toutes les mesures (703).

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le milieu d'intérêt (20) comprend une pluralité de molécules sondes (201) immobilisées sur une surface de la couche réfléchissante (121), les molécules sondes étant adaptées pour interagir avec des molécules cibles (202), l'interaction des molécules sondes (201) avec les molécules cibles (202) changeant l'épaisseur optique du milieu d'intérêt (20) dans la bande spectrale.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le milieu d'intérêt (20) est soumis à un écoulement microfluidique, et l'étape de mesure (704) est répétée avec une fréquence supérieure à 1 Hz.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la couche réfléchissante (121) comprend une sous-couche opaque (122) présentant une surface opaque lisse tournée vers le milieu d'intérêt (20).

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la sous-couche opaque (122) est une couche d'or, de cuivre ou d'acier inoxydable, le

rayonnement électromagnétique émis (301) étant compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 500 nm.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 et 7, dans lequel la couche réfléchissante (121) comprend en outre une sous-couche transparente (123), la sous-couche transparente (123) étant disposée entre le milieu d'intérêt (20) et la sous-couche opaque (122).

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel la sous-couche transparente (123) présente une épaisseur inférieure à 1600 nm.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, dans lequel la sous-couche opaque (122) est une couche de silicium et la sous-couche transparente (123) est une couche d'oxyde de silicium ou de nitrure de silicium.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant en outre une étape consistant à mesurer par un deuxième capteur une grandeur électrique dont une variation est représentative d'une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt, la grandeur électrique étant représentative de propriétés de transport de charges électriques entre la surface 121 et le milieu d'intérêt, l'étape de mesure étant réalisée simultanément à l'étape de mesure (703) de l'intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel l'étape de détection (704) est réalisée en outre à partir des mesures effectuées par le deuxième capteur.

13. Dispositif de mesure d'un milieu d'intérêt (20), le dispositif (10) comprenant :

- un substrat (12) comprenant une couche (121) présentant des propriétés réfléchissantes,

- une source lumineuse (11), le milieu d'intérêt (20) étant disposé entre la source lumineuse (11) et le substrat (12), la source lumineuse (11) étant adaptée pour émettre un rayonnement électromagnétique (301) et éclairer le substrat (12) par un rayonnement électromagnétique incident (302) issu de la source lumineuse (11), la couche réfléchissante (121) produisant un rayonnement électromagnétique réfléchi (303) à partir du rayonnement électromagnétique incident (302), et
- un capteur (13) adapté pour mesurer une intensité du rayonnement électromagnétique réfléchi après traversée du milieu d'intérêt (30),
- des moyens de calcul (14) adaptés pour détecter à partir de mesures (703) effectuées par le capteur (13) dans des conditions d'illumination et de mesure constantes, un changement de propriétés réfléchissantes de l'ensemble (40) comprenant le milieu d'intérêt (20) et la couche réfléchissante (121) caractérisant une modification d'une épaisseur optique (n_C x d) du milieu d'intérêt (20) correspondant à une modification d'une quantité moléculaire dans le milieu d'intérêt (20),

dans lequel le rayonnement électromagnétique émis (301) est compris dans une bande spectrale incluse entre 350 nm et 1000 nm, et la couche réfléchissante (121) du substrat (12) présente une réflectivité R comprise entre 0,2 et 0,7 et une sensitivité $dR/d(n_C \times d)$ supérieure à 1×10^{-3} nm^{-1} dans la bande spectrale.

14. Dispositif selon la revendication 13, comprenant en outre un deuxième capteur adapté pour mesurer une grandeur électrique représentative de propriétés de transport de charges électriques entre la surface 121 et le milieu d'intérêt.

FIG. 1a

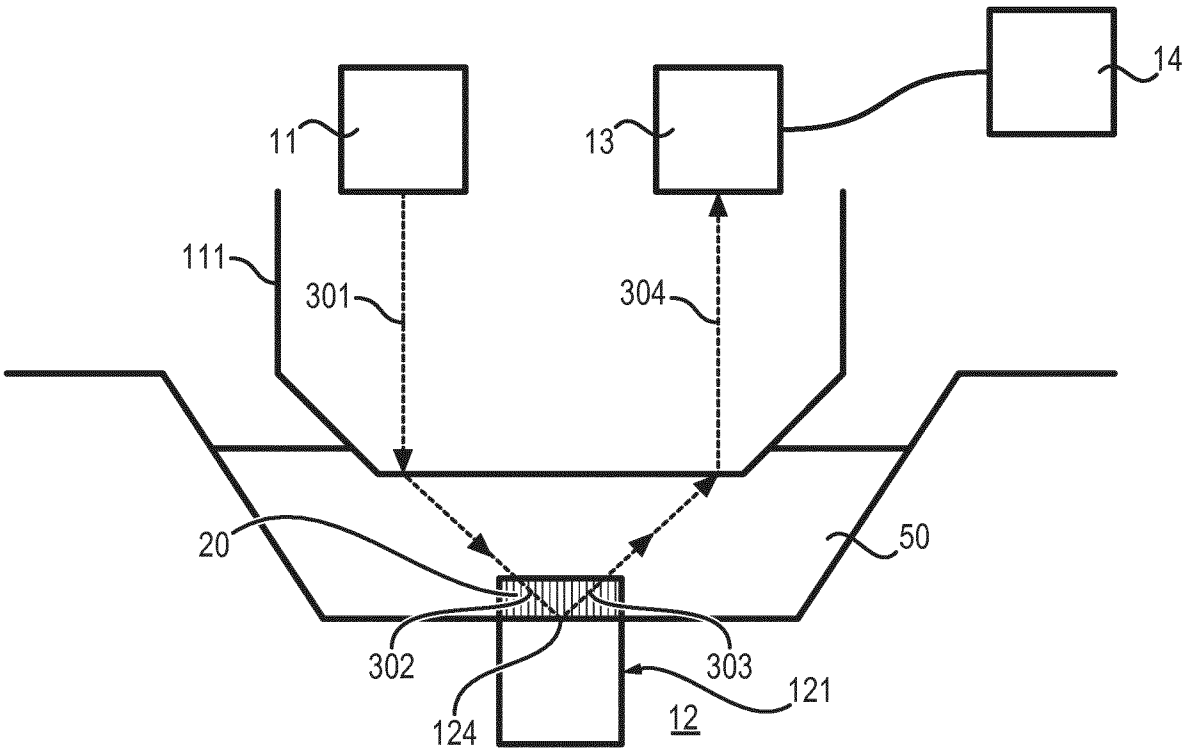

14
11
13
111
301
304
20
50
302
303
121
124
12

FIG. 1b

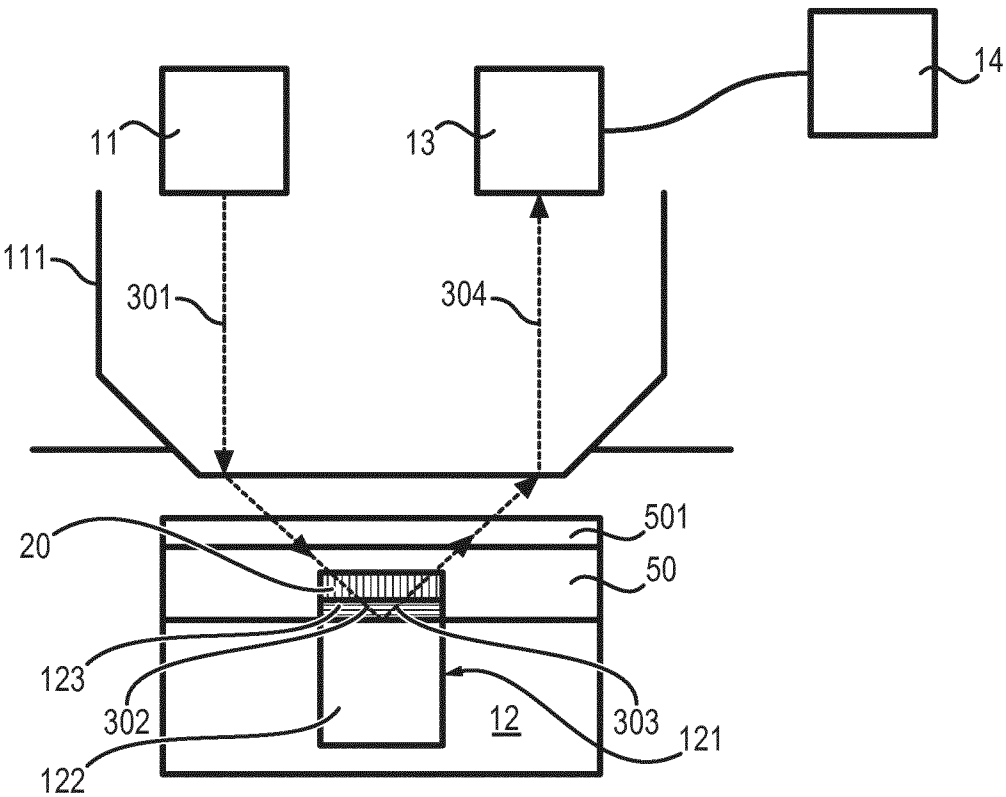

14
11
13
111
301
304
501
20
50
123
302
303
121
12
122

FIG. 2

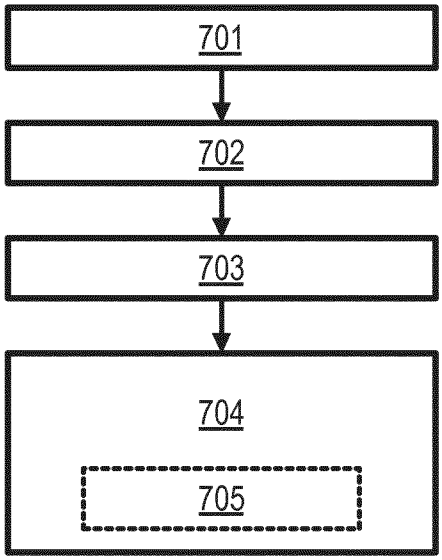

701
702
703
704
705

FIG. 3

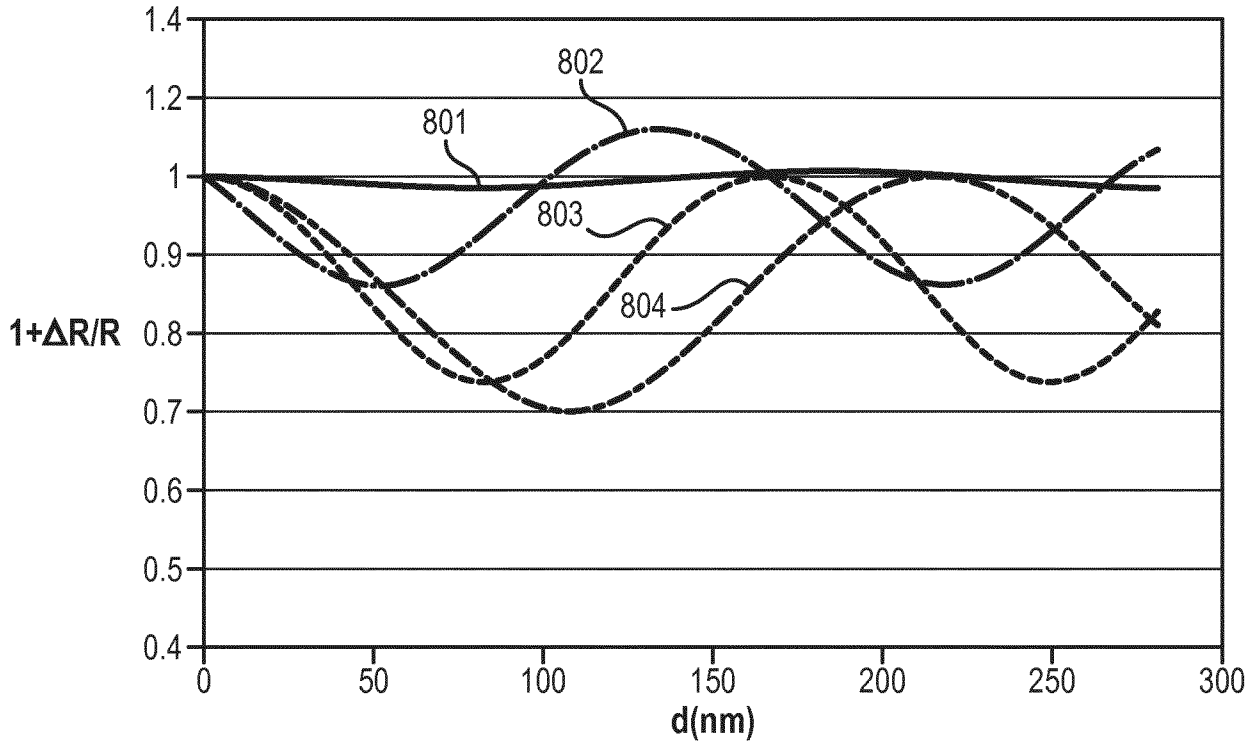

1.4
1.2
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
1+ΔR/R
0
50
100
150
200
250
300
d(nm)
801
802
803
804

FIG. 4

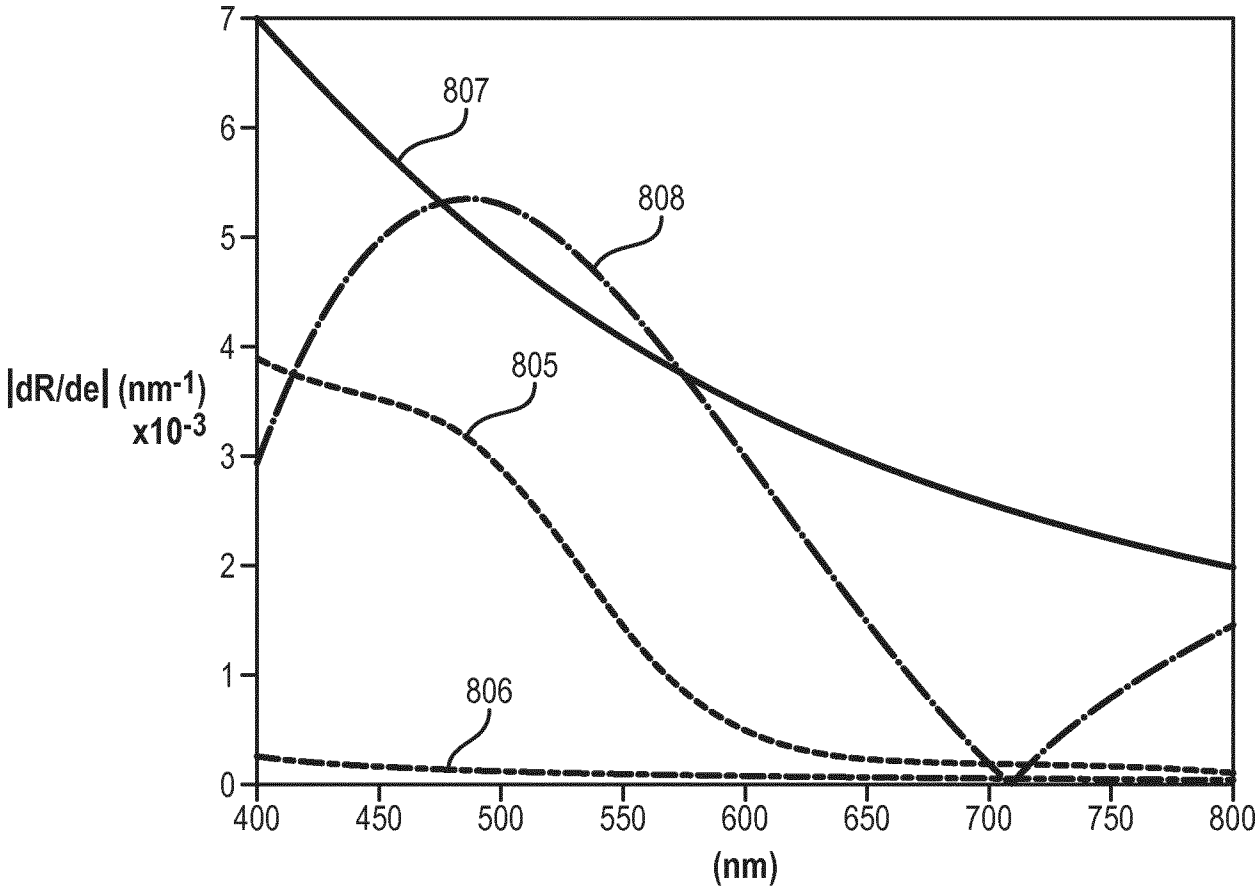

7
6
5
4
3
2
1
0
807
808
805
806
|dR/de| (nm-1)
x10-3
400
450
500
550
600
650
700
750
800
(nm)

FIG. 5a

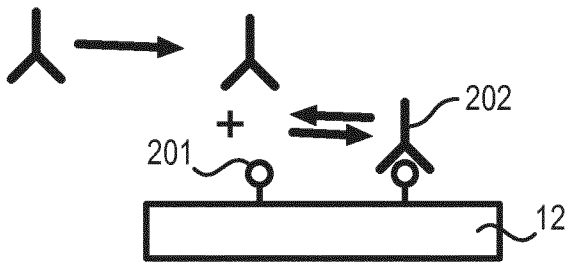

+
202
201
12

FIG. 5b

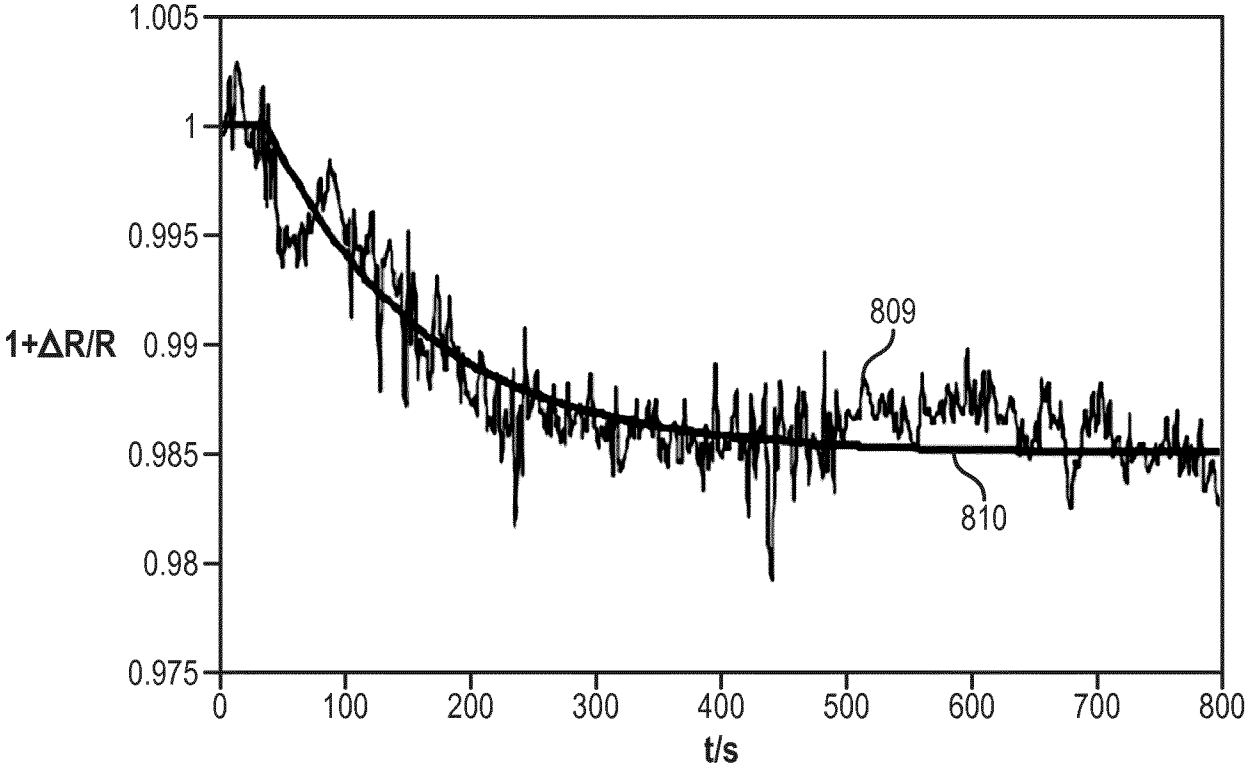

1.005
1
0.995
0.99
0.985
0.98
0.975
1+ΔR/R
809
810
0
100
200
300
400
500
600
700
800
t/s

FIG. 5c

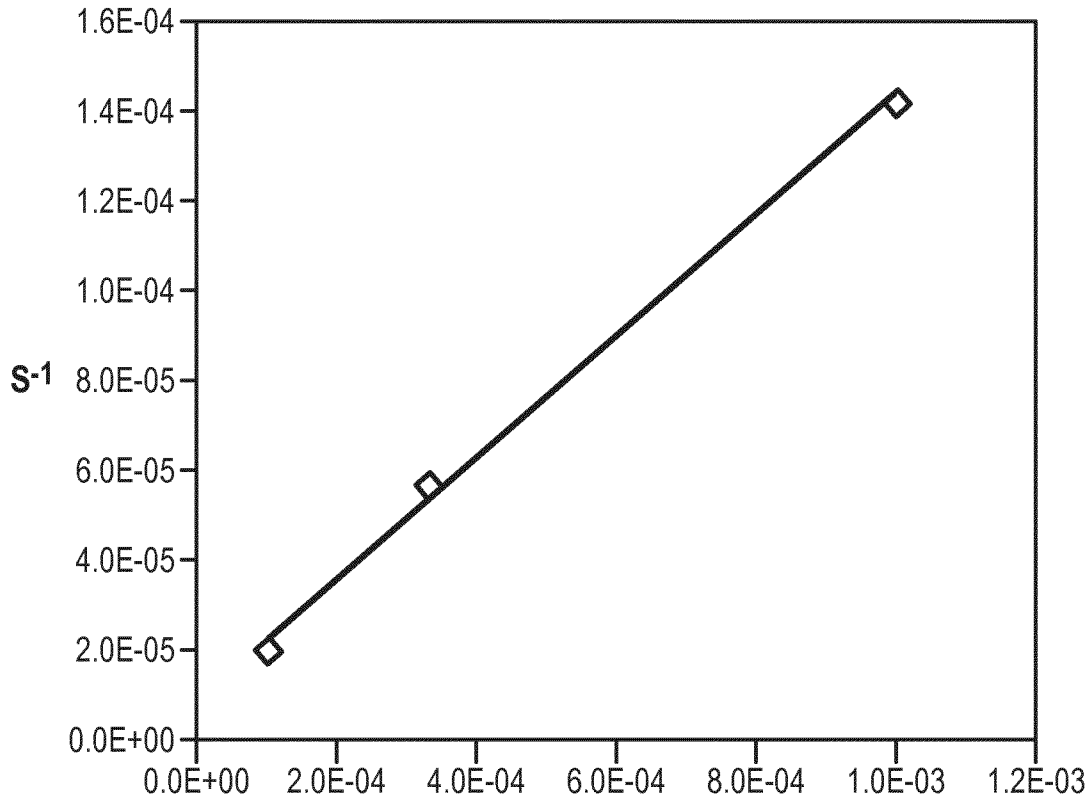

1.6E-04
1.4E-04
1.2E-04
1.0E-04
8.0E-05
6.0E-05
4.0E-05
2.0E-05
0.0E+00
S-1
0.0E+00
2.0E-04
4.0E-04
6.0E-04
8.0E-04
1.0E-03
1.2E-03

FIG. 6a

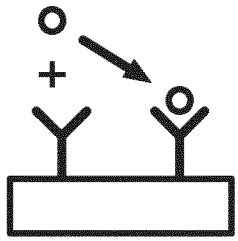


FIG. 6b

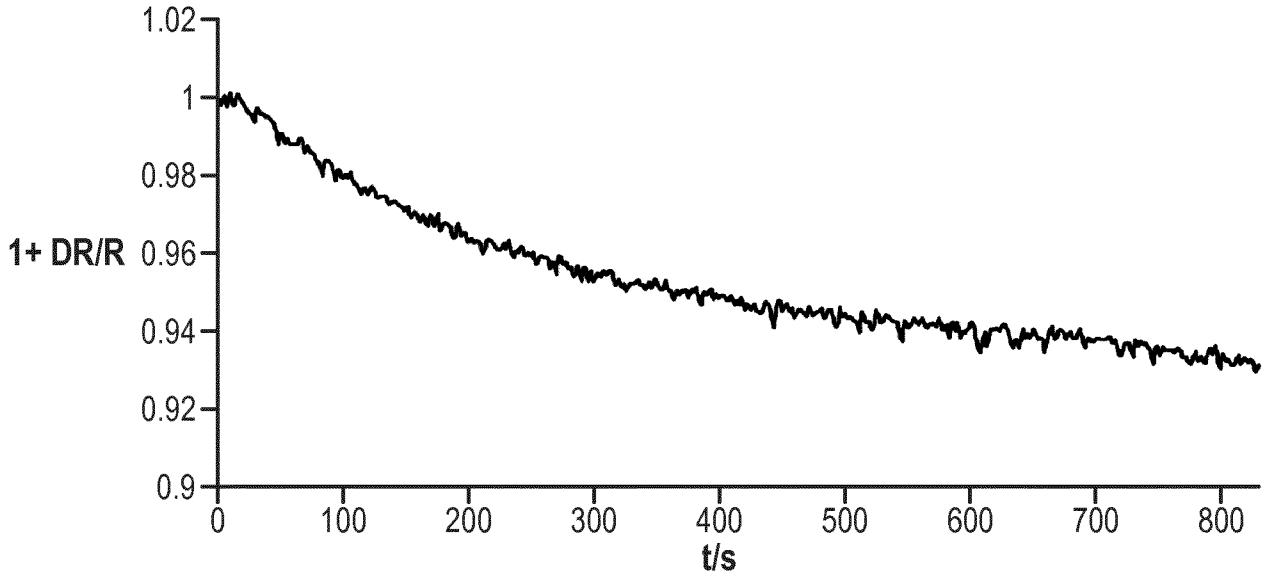


FIG. 6c

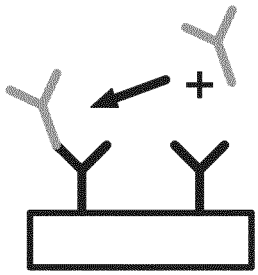

+

FIG. 6d

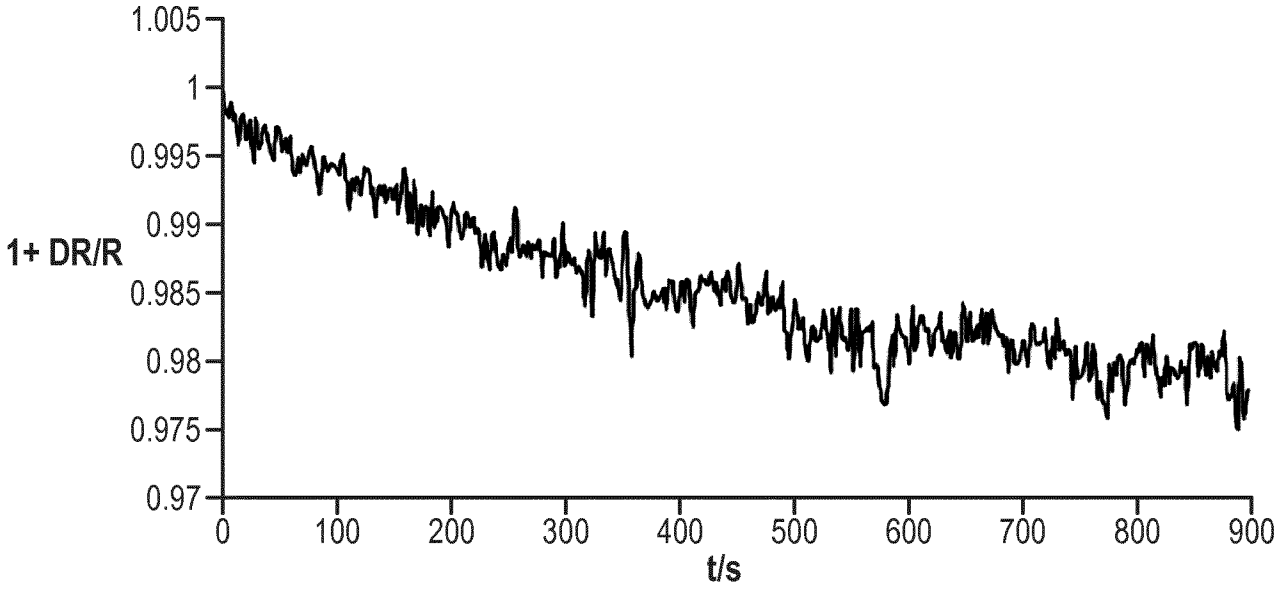

1.005
1
0.995
0.99
0.985
0.98
0.975
0.97
1+ DR/R
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
t/s

FIG. 7a

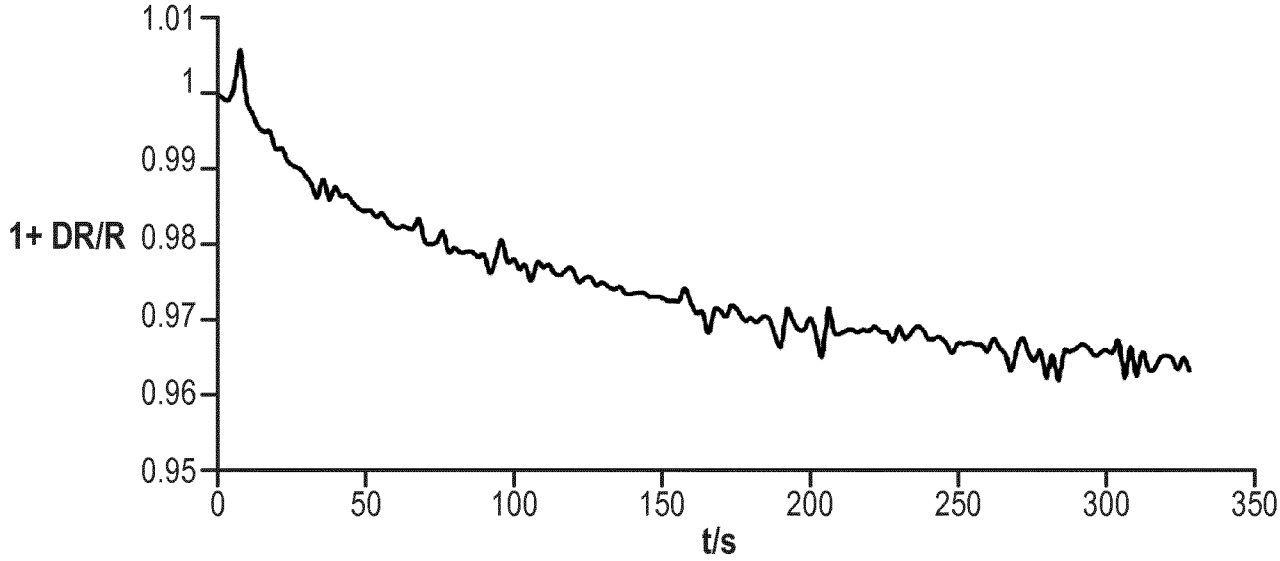

1.01
1
0.99
1+ DR/R 0.98
0.97
0.96
0.95
0
50
100
150
200
250
300
350
t/s

FIG. 7b

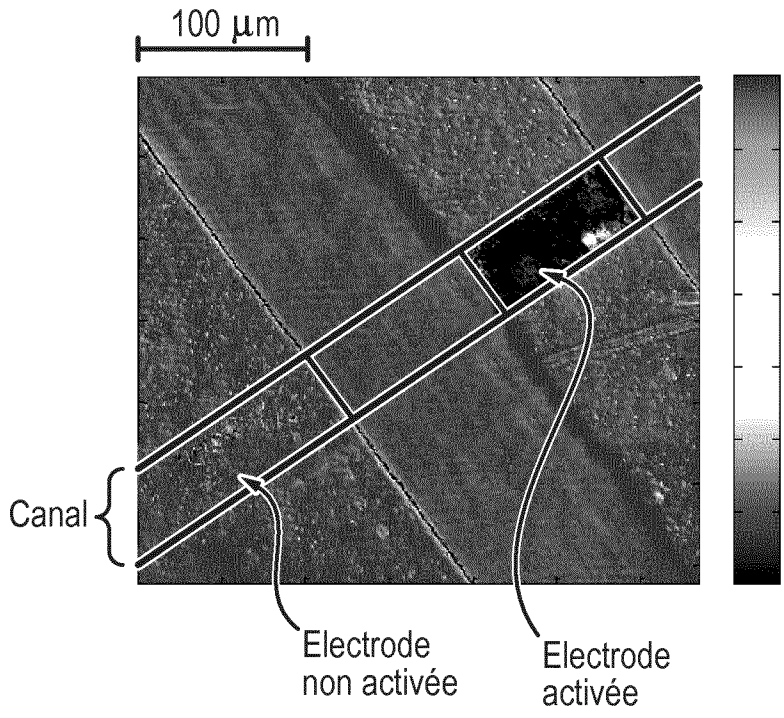

100 µm
Canal
Electrode non activée
Electrode activée

FIG. 8a

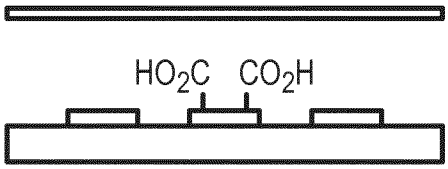


FIG. 8b

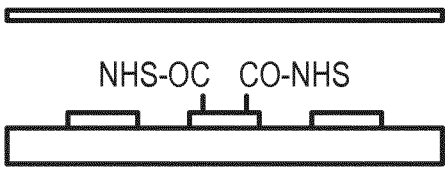


FIG. 8c

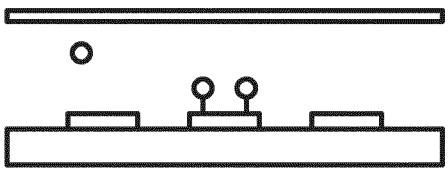


FIG. 8d

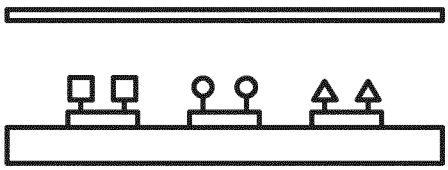
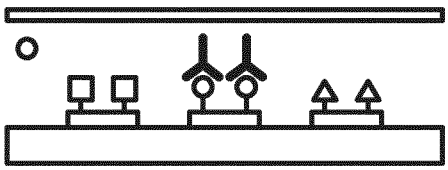


FIG. 8e



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/065118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/45 G01N21/55 G01N33/543
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

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, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2011/111466 A1 (KONICA MINOLTA OPTO INC [JP]; KASHIWAZAKI OSAMU [JP]; ATARASHI YUICHI) 15 September 2011 (2011-09-15) figures 1-2,6	1,3-6, 8-10,13 7,11,12, 14
X Y	DE 198 30 727 A1 (GAUGLITZ GUENTER PROF DR [DE]; BRECHT ANDREAS DR [DE]; REICHL DIETER D) 14 January 1999 (1999-01-14) figures 1-2	1-4,13 7,11,12, 14
Y	US 2004/070764 A1 (FUJIMURA TORU [JP] ET AL) 15 April 2004 (2004-04-15) paragraph [0050]; figure 3	7

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 August 2013	27/08/2013

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

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/065118

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 199 37 797 C1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 22 March 2001 (2001-03-22) figure 1	1-14
A	US 2009/011948 A1 (UNLU M SELIM [US] ET AL) 8 January 2009 (2009-01-08) figures 1-3	1-14
A	WO 2006/042746 A1 (UNIV TUEBINGEN [DE]; FRANK RUEDIGER [DE]; MOEHRLE BERND [DE]; GAUGLITZ) 27 April 2006 (2006-04-27) figures 2-4	1-14
Y	US 6 421 128 B1 (SALAMON ZDZISLAW [US] ET AL) 16 July 2002 (2002-07-16) [0053]-[0055]; figures 15-16	11,12,14
A	US 5 858 799 A (YEE SINCLAIR S [US] ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) figure 1	1-14

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/065118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011111466 A1	15-09-2011	CN 102792149 A	21-11-2012
		EP 2546632 A1	16-01-2013
		US 2012327418 A1	27-12-2012
		WO 2011111466 A1	15-09-2011
DE 19830727 A1	14-01-1999	NONE	
US 2004070764 A1	15-04-2004	JP 3786073 B2	14-06-2006
		JP 2004132799 A	30-04-2004
		US 2004070764 A1	15-04-2004
DE 19937797 C1	22-03-2001	NONE	
US 2009011948 A1	08-01-2009	US 2009011948 A1	08-01-2009
		WO 2006116362 A2	02-11-2006
WO 2006042746 A1	27-04-2006	DE 102005015030 A1	20-04-2006
		EP 1805502 A1	11-07-2007
		WO 2006042746 A1	27-04-2006
US 6421128 B1	16-07-2002	AU 7484401 A	26-11-2001
		CA 2409486 A1	22-11-2001
		EP 1299712 A1	09-04-2003
		JP 2003533691 A	11-11-2003
		US 6421128 B1	16-07-2002
		WO 0188509 A1	22-11-2001
US 5858799 A	12-01-1999	AU 7526496 A	15-05-1997
		US 5858799 A	12-01-1999
		WO 9715820 A1	01-05-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2013/065118

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N21/45 G01N21/55 G01N33/543
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

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, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2011/111466 A1 (KONICA MINOLTA OPTO INC [JP]; KASHIWAZAKI OSAMU [JP]; ATARASHI YUICHI) 15 septembre 2011 (2011-09-15)	1,3-6, 8-10,13
Y	figures 1-2,6	7,11,12, 14

X	DE 198 30 727 A1 (GAUGLITZ GUENTER PROF DR [DE]; BRECHT ANDREAS DR [DE]; REICHL DIETER D) 14 janvier 1999 (1999-01-14)	1-4,13
Y	figures 1-2	7,11,12, 14

Y	US 2004/070764 A1 (FUJIMURA TORU [JP] ET AL) 15 avril 2004 (2004-04-15) alinéa [0050]; figure 3	7

	-/--	

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] 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	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
16 août 2013	27/08/2013

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mason, William

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DE 199 37 797 C1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 22 mars 2001 (2001-03-22) figure 1	1-14
A	US 2009/011948 A1 (UNLU M SELIM [US] ET AL) 8 janvier 2009 (2009-01-08) figures 1-3	1-14
A	WO 2006/042746 A1 (UNIV TUEBINGEN [DE]; FRANK RUEDIGER [DE]; MOEHRLE BERND [DE]; GAUGLITZ) 27 avril 2006 (2006-04-27) figures 2-4	1-14
Y	US 6 421 128 B1 (SALAMON ZDZISLAW [US] ET AL) 16 juillet 2002 (2002-07-16) [0053]-[0055]; figures 15-16	11,12,14
A	US 5 858 799 A (YEE SINCLAIR S [US] ET AL) 12 janvier 1999 (1999-01-12) figure 1	1-14

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2013/065118

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2011111466 A1	15-09-2011	CN 102792149 A	21-11-2012
		EP 2546632 A1	16-01-2013
		US 2012327418 A1	27-12-2012
		WO 2011111466 A1	15-09-2011
DE 19830727 A1	14-01-1999	AUCUN	
US 2004070764 A1	15-04-2004	JP 3786073 B2	14-06-2006
		JP 2004132799 A	30-04-2004
		US 2004070764 A1	15-04-2004
DE 19937797 C1	22-03-2001	AUCUN	
US 2009011948 A1	08-01-2009	US 2009011948 A1	08-01-2009
		WO 2006116362 A2	02-11-2006
WO 2006042746 A1	27-04-2006	DE 102005015030 A1	20-04-2006
		EP 1805502 A1	11-07-2007
		WO 2006042746 A1	27-04-2006
US 6421128 B1	16-07-2002	AU 7484401 A	26-11-2001
		CA 2409486 A1	22-11-2001
		EP 1299712 A1	09-04-2003
		JP 2003533691 A	11-11-2003
		US 6421128 B1	16-07-2002
		WO 0188509 A1	22-11-2001
US 5858799 A	12-01-1999	AU 7526496 A	15-05-1997
		US 5858799 A	12-01-1999
		WO 9715820 A1	01-05-1997