

IMAGERIE PAR RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE: application en microbiologie

Marine BOULADE¹,
Julien MOREAU²,
Thierry LIVACHE¹

¹CEA, CNRS, Univ. Grenoble Alpes,
INAC-SPRAM,
38000 Grenoble, France

²Laboratoire Charles Fabry, Institut
d'Optique Graduate School,
Université Paris Saclay,
91227 Palaiseau, France

julien.moreau@institutoptique.fr

Les plasmons de surface sont une oscillation collective des électrons libres à la surface d'un métal due à un couplage avec des photons incidents. La première observation remonte au tout début du 20^e siècle, par le physicien et inventeur américain R.W. Wood, alors qu'il étudiait la lumière diffractée par un réseau métallique. R.W. Wood observa de très fines bandes d'absorption dans le spectre de diffraction qui ne seront expliquées qu'en 1941 par U. Fano, qui démontra que ces bandes d'absorption étaient associées à des ondes de surfaces, appelées plasmons de surface. C'est un phénomène similaire qui explique la couleur des vitraux des cathédrales, dont les verres contiennent des nanoparticules métalliques présentant des bandes d'absorption plasmonique dans le visible.

Plusieurs conditions sont à respecter pour que ce couplage puisse avoir lieu [1]. D'une part, la partie réelle de la permittivité du métal à la longueur d'onde d'excitation doit être négative. C'est le cas pour l'or, l'argent ou l'aluminium dans le visible et le proche infrarouge. D'autre part, il doit y avoir égalité du vecteur d'onde de la lumière incidente et celui du plasmon de surface :

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_{inc} \sin \theta = \frac{2\pi}{\lambda} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\}$$

avec θ l'angle d'incidence, λ la longueur d'onde incidente, n_{inc} l'indice du milieu incident (le prisme de la figure 1) et ϵ_m et ϵ_d les permittivités du métal et du diélectrique (l'eau de la figure 1). Les plasmons de surface ne sont en fait qu'un cas particulier des classiques ondes guidées en réflexion totale, mais dans le cas d'une interface entre un diélectrique et une couche métallique.

La condition de couplage est généralement obtenue en utilisant une configuration optique mise au point

par E. Kretschmann et H. Raether en 1968 [2], dans laquelle la lumière incidente, polarisée TM (transverse magnétique), traverse un prisme recouvert d'une fine couche métallique (figure 1). Le couplage entre les photons et les électrons du métal va alors se manifester par une chute brutale de la réflectivité pour un angle d'incidence précis qui dépend de la longueur d'onde incidente.

À la résonance, le plasmon de surface ainsi créé est une onde évanescente,

de part et d'autre de l'interface métal/diélectrique, avec une profondeur de pénétration typique de quelques centaines de nanomètres et une longueur de propagation le long de l'interface de plusieurs microns. La finesse de la résonance et le caractère évanescent des plasmons de surface sont les deux propriétés clés pour l'utilisation de la SPR dans le domaine des capteurs, avec la mise sur le marché des premiers appareils commerciaux au début des années 80.

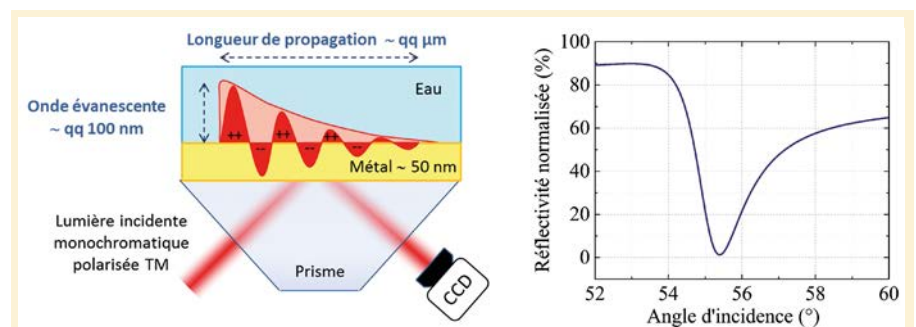


Figure 1. Schéma de principe d'un système SPR : une lumière quasi-monochromatique, polarisée TM et collimatée, éclaire une fine couche métallique déposée sur un prisme. Une onde évanescente de type plasmon est générée à l'interface métal/eau, ce qui se traduit par une résonance d'absorption très étroite angulairement (moins de 1°).

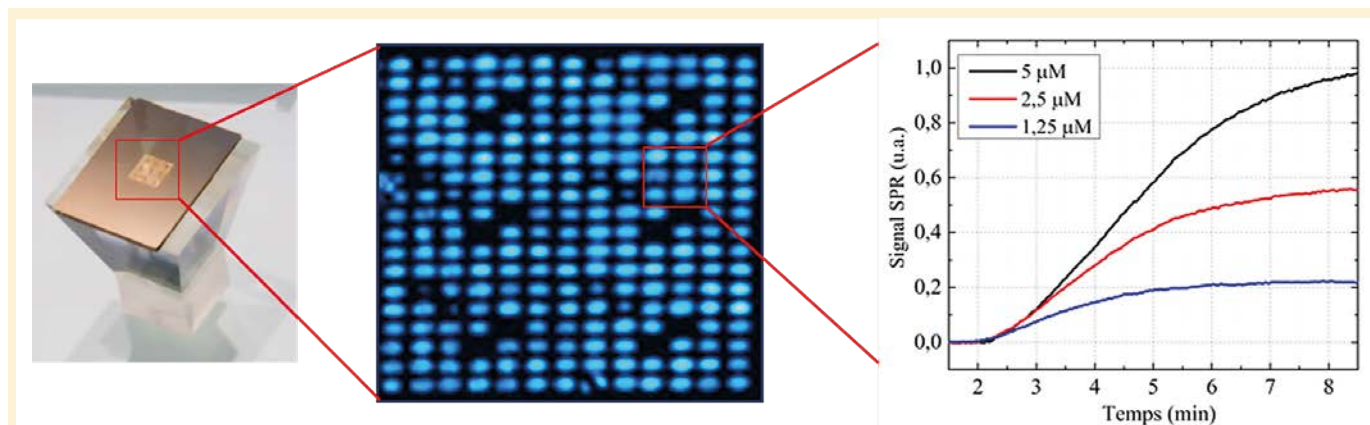


Figure 2. Photo d'une lame d'or fonctionnalisée, on distingue la matrice de sondes déposée sur la puce. Image de variation de réflectivité en SPRI (fausses couleurs) après une interaction ADN-ADN. Exemple de cinétiques mesurées sur trois familles de sondes de concentrations surfaciques différentes.

Principe de l'imagerie SPR

La plupart des systèmes SPR commerciaux ou de recherche fonctionnent sur un schéma identique: un faisceau collimaté et quasi monochromatique, dans le rouge généralement pour une meilleure sensibilité, est réfléchi à travers un prisme sur une fine couche d'or de 50 nm d'épaisseur, déposée sur une lame de verre ou directement sur le prisme. Le principe de la détection apparaît directement dans la condition de couplage ci-dessus: la résonance dépend de la permittivité et donc de l'indice optique du diélectrique situé au-dessus de la couche d'or. Combiné au caractère évanescent des plasmons, on obtient de fait un transducteur qui va traduire une variation locale de l'indice optique au voisinage du métal en un signal optique important dû à la modification d'efficacité du couplage entre la lumière incidente et les plasmons. Cette variation d'indice étant proportionnelle à la densité massique, les capteurs SPR peuvent être vus comme des microbalances optiques avec une sensibilité qui descend à quelques picogrammes par mm^2 .

De nombreuses configurations de détection ont été proposées pour mesurer ce décalage de la résonance. La plus simple instrumentalement et la plus utilisée est de mesurer la variation de réflectivité du faisceau incident en se plaçant initialement au maximum de la pente de la résonance plasmon. L'utilisation d'une caméra permet de

suivre ces variations de réflectivité sur toute la surface de l'or et de faire ainsi de l'imagerie plasmonique (SPRI). Un système de micro-fluidique est en général placé sur la surface métallique pour pouvoir injecter séquentiellement les produits à analyser. À titre d'exemple, l'adsorption d'une monocouche de molécules organiques d'épaisseur nanométrique, entraîne typiquement une variation de réflectivité du faisceau incident de près de 2%. La même adsorption moléculaire sur une simple lame de verre sans couche d'or produirait une variation de réflectivité de seulement 0,00002%. La couche métallique et les plasmons de surface amplifient ainsi la sensibilité de cinq ordres de grandeur.

Comme pour d'autres biocapteurs, la spécificité des biopuces est conférée par une fonctionnalisation de surface adéquate. La principale force des capteurs SPRI est le fait qu'il n'est besoin d'aucun marqueur secondaire sur la molécule cible que l'on souhaite détecter (technique dite *label free*). C'est la variation d'indice optique, au voisinage de la couche d'or et due à l'arrivée des molécules, que l'on détecte. Cela évite donc les contraintes liées à tout marquage comme l'impact du marqueur sur l'interaction étudiée, les phénomènes de photo blanchiment pour les marqueurs fluorescents et les lectures en point final. Tous les systèmes SPRI utilisent donc une chimie de surface qui va permettre de fixer des molécules sondes à la surface de l'or, spécifiques aux molécules cibles que l'on souhaite

détecter. De très nombreuses chimies de surface ont été développées et permettent de fixer presque toutes les grandes classes de biomolécules: oligonucléotides, anticorps, protéines, peptides, etc. Plusieurs dizaines à plusieurs centaines de sondes peuvent ainsi être déposées sous forme de spots sur la surface d'une seule puce, permettant l'étude simultanée de l'interaction d'une molécule cible avec un grand nombre de sondes [3]. L'autre avantage des systèmes SPRI est le caractère temps-réel de la mesure (*real time*): la réflectivité est directement obtenue dans l'image, en tout point de la puce et à cadence vidéo (figure 2). Cela permet d'obtenir les cinétiques des interactions sonde-cible et de déterminer les constantes d'association et de dissociation.

Application en microbiologie

Lorsqu'un très petit nombre de bactéries doit être détecté, une à quelques centaines typiquement, les méthodes standard mises en œuvre dans le domaine médical ou agroalimentaire reposent sur les propriétés de croissance des bactéries, qui nécessitent une période d'incubation d'au moins 18 h avant de réaliser une analyse. En général, un délai d'au moins 36 h est nécessaire pour identifier un agent pathogène [4]. Or, ces délais sont extrêmement contraignants dans un contexte où l'identification des



Figure 3. Plasmochip et MonoPresto commercialisés par la société Prestodiag.

organismes pathogènes est urgente. Dans le domaine agroalimentaire, les produits frais se périssent rapidement, ils peuvent parfois être mis sur le marché avant l'obtention des résultats des tests bactériens. Cela présente un risque sanitaire pour le client et économique pour l'industriel dans le cas de la commercialisation d'un produit contaminé qui doit être ensuite retiré du marché. De la même manière, dans le domaine médical, une identification précoce de l'agent pathogène infectieux permet une mise en place d'un traitement adapté plus efficace pour le patient. Il y a donc un besoin fort de mettre en œuvre des nouveaux outils d'identification bactérienne efficaces et capables d'identifier plusieurs pathogènes le plus rapidement possible.

En cela, les systèmes de SPR offrent la possibilité d'effectuer la détection bactérienne en temps réel, sans marqueur, tout en restant simples d'utilisation. C'est l'interaction de la bactérie avec des ligands spécifiques fixés sur la puce qui va produire un changement local de l'indice de

réfraction au voisinage de la surface et donc un signal de résonance plasmonique [5]. L'utilisation de systèmes SPR en mode imagerie va de plus permettre de fixer de nombreuses sondes différentes sur la surface de la puce et offre ainsi la possibilité d'identifier simultanément de nombreux pathogènes en un seul test. En utilisant des protéines et/ou des anticorps comme molécules de biorecognition, il est ainsi possible d'effectuer la détection spécifique d'un à plusieurs centaines de pathogènes en une période de quelques heures seulement. Cette technique de détection SPR en bactériologie est aujourd'hui utilisée pour la détection de pathogènes microbiologiques alimentaires.

Ainsi, la biopuce Plasmochip (figure 3), sur laquelle peuvent être déposés de multiples spots de ligands (jusqu'à 70 par cuve) permet une détection multiplexée des agents pathogènes. Selon la spécificité du ligand utilisé, allant du peptide à l'anticorps monoclonal, il est possible de détecter avec plus ou moins de finesse les bactéries en présence,

allant d'un genre entier à un sérovar spécifique, avec un seuil de détection d'environ 10^5 bactéries par mL.

La figure 4 présente un exemple de détection d'une souche bactérienne pathogène : *Cronobacter sakazaki*. En l'espace d'une dizaine de minutes, il y a reconnaissance spécifique des anticorps et variation significative du signal au niveau des spots d'anticorps C5a et C5b spécifiques de cette souche bactérienne, ce qui démontre la présence de la bactérie en croissance dans la solution étudiée.

L'intérêt majeur des systèmes SPR pour la détection bactérienne est la possibilité de travailler en milieux complexes. En effet, la configuration du système en réflexion (du côté opposé à la solution analysée) fait que la lecture est peu affectée par la turbidité ou plutôt l'opacité ou le caractère absorbant du milieu. Enfin, comme le champ plasmon n'est sensible que sur une profondeur de quelques centaines de nanomètres, il est également peu influencé par la présence potentielle de composés plus volumineux en solution dans le mélange testé (fragments alimentaires divers). Cela est un avantage considérable par rapport à d'autres techniques spectroscopiques ou colorimétriques qui intrinsèquement ne peuvent fonctionner que dans un milieu « propre ». C'est cette compatibilité avec les milieux complexes qui rend l'utilisation des systèmes SPR si pertinente dans le domaine agroalimentaire, où les tests doivent s'effectuer

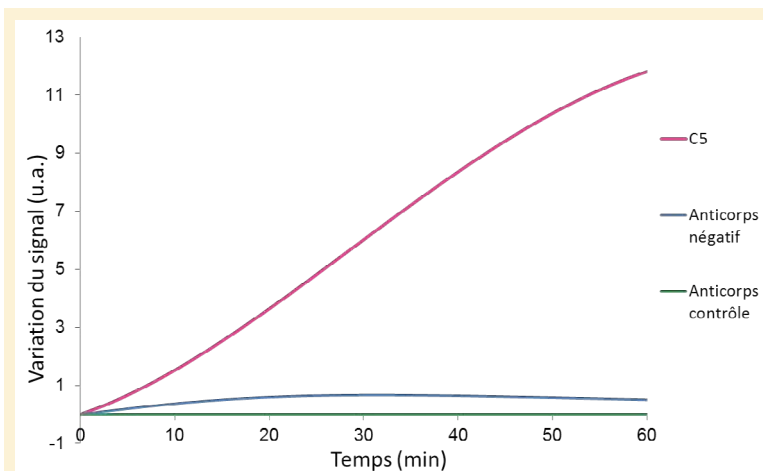


Figure 4. Cinétiques des différents ligands mesurés lors de la détection d'une bactérie pathogène *Cronobacter sakazaki*.

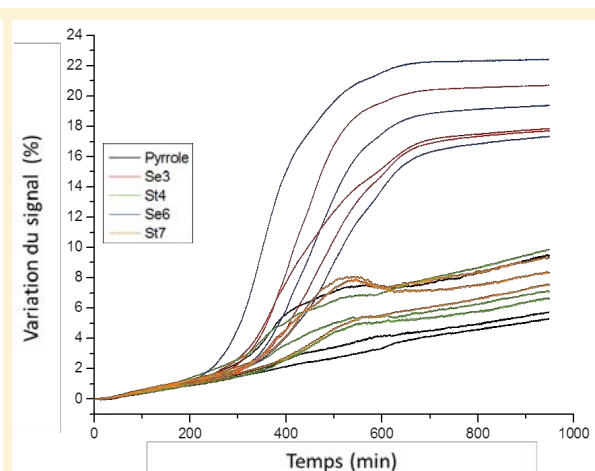


Figure 5. Détection de ~10 *Salmonella Enteritidis* dans du lait cru de vache.

rapidement, sur des boissons non transperantes (lait...) ou sur des mélanges troubles d'aliments mis en suspension.

Dans les faits, lorsqu'un aliment est contaminé par un élément pathogène, celui-ci est présent en concentration bien inférieure au seuil de détection des systèmes d'analyse disponibles sur le marché, et il faut avoir recours à une culture bactérienne préalable pour augmenter les concentrations des différentes populations. L'utilisation des systèmes SPR en mode « culture/capture/mesure » est donc plus longue dans l'absolu (plusieurs heures), mais demeure une technique plus rapide en comparaison des techniques standards [6]. L'analyse d'une solution de lait cru de vache contaminée par une dizaine de bactéries *Salmonella* Enteritidis est présentée figure 5. Dans ce cas, le lait cru possédait une flore bactérienne naturelle très développée, de l'ordre de 10^6 bactéries par mL. Il s'agissait donc ici de détecter uniquement la/les souches pathogènes de manière hautement spécifique, et parmi une large majorité de bactéries non ciblées.

Les anticorps Se3 et Se6, spécifiques de la souche *Salmonella* Enteritidis, étaient les seuls à présenter une augmentation exponentielle de signal SPR, reflétant la croissance des bactéries. La détection en culture de quelques individus pathogènes est donc effectuée de manière spécifique en moins de 10 h.

La SPR et la SPRI s'avèrent donc particulièrement adaptées à l'analyse microbiologique d'échantillons complexes car il s'agit de techniques sans marquage, en temps réel et

multiplexables. L'utilisation de biopuces permet une grande flexibilité et une haute spécificité des ligands déposés pour les bactéries adressées dans la détection. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes d'accroche bactérienne aux anticorps, des phénomènes de croissance en proximité d'une surface grâce à une observation plus précise au niveau de la cellule unique pourrait permettre de détecter plus finement et ainsi plus rapidement, la présence de bactéries pathogènes.

RÉFÉRENCES

- [1] J. Homola, *Surface plasmon resonance based sensors*, Springer Series in Chemical sensors and biosensors, vol. 4
- [2] E. Kretschmann, H. Raether, Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch. A* **23**, 2135 (1968)
- [3] L. Leroy, E. Maillart, T. Livache. *Biological Applications of Surface Plasmon Resonance Imaging*, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors (2012)
- [4] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnology advances* **28**, 232 (2010)
- [5] V. Templier, A. Roux, Y. Roupioz, T. Livache, Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review, *Trends in Analytical Chemistry* (2015)
- [6] S. Bouguelia, Y. Roupioz, S. Slimani, L. Mondani, M.G. Casabona, C. Dumort, T. Livache, On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria, *Lab on a Chip* **13**, 4024 (2013)

Les premiers du genre



Le premier plastique à base de polymères synthétiques a été fabriqué à partir du phénol et du formaldéhyde grâce aux toutes premières méthodes de synthèses inventées en 1907 par le chimiste Belgo-Américain Leo Hendrick Baekeland

Question :
Quel était le nom du premier plastique synthétique?

Bakélite

Gamme complète de mesureurs de puissance et d'énergie

Sondes thermiques

- 8 μ W – 100kW & 15 μ J – 600J
- Puissance & énergie en mono-impulsion
- Haute résistance au flux

Sondes pyroélectriques

- 50nJ - 40J
- Pulse à pulse jusqu'à 25kHz
- Jusqu'à plusieurs J/cm²

Photodiodes

- 10pW - 3W
- Haute sensibilité, haute précision de mesure
- Existent version radiométrique, photométrique et avec sphère intégrante



Toll Free 00800 67447678 • Regular + 49 6151 708-0
www.ophiropt.com/photronics



The True Measure of Laser Performance™

