Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Etude de biocapteurs par spectroscopie optique non linéaire

Sartenaer, Yannick

Award date:
2009

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

FUNDP
NAMUR

Faculté des Sciences
Centre de recherche en Physique de la
Matière et du Rayonnement (PMR)

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur
Tél. +32 (0)81 724490
Fax +32 (0)81 724464

Etude de biocapteurs par spectroscopie optique non linéaire

Dissertation présentée par
Yannick Sartenaer
en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Composition du Jury :

Dr. Francesca Cecchet
Prof. Laurent Dreesen
Prof. Laurent Houssiau
Prof. Paul Thiry (promoteur)
Dr. Gérard Tourillon

Août 2009

© Presses universitaires de Namur & Yannick Sartenaer
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.
Imprimé en Belgique
ISBN : 978-2-87037-645-4
Dépôt légal: D / 2009 / 1881 / 33

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
Centre de recherche en Physique de la Matière et du Rayonnement
Rue de Bruxelles, 61 – 5000 Namur, Belgique

Etude de biocapteurs par spectroscopie optique non linéaire

par Yannick Sartenaer

Résumé :

L'objectif principal de ce travail est d'appliquer une technique émergente, basée sur un effet optique non linéaire, à la détection du processus de reconnaissance moléculaire au sein de dispositifs tels que les biocapteurs. Dans ce but, nous mettons en œuvre la spectroscopie de génération de fréquence-somme (SFG) qui présente l'avantage de révéler une signature vibrationnelle spécifique de l'interface étudiée.

La démarche expérimentale débute avec une étude des mécanismes d'adsorption moléculaire qui constituent un prérequis indispensable à l'élaboration de biocapteurs performants. Les propriétés d'adsorption de deux molécules (décanethiol et décyl thiocyanate) qui diffèrent uniquement par leur groupement d'ancrage sont investiguées. Des techniques complémentaires de caractérisation de surface telles que l'XPS et le STM complètent l'information spectroscopique SFG. Nous montrons que l'utilisation de groupements thiocyanates permet la formation de monocouches auto-assemblées sur substrat de platine, même si la persistance d'ions cyanures en perturbe l'organisation.

Notre étude se poursuit par l'analyse d'un biocapteur modèle basé sur le système biotine/avidine. La SFG confirme la formation d'une monocouche organisée de molécules sondes (biotine) sur substrats d'Au, Ag, Pt et CaF_2. La reconnaissance moléculaire avec la molécule cible (avidine) est observée sur le substrat de CaF_2 dans le domaine des vibrations d'élongation CH et NH. L'utilisation de molécules cibles alternatives (BSA, avidine saturée) démontre que la détection par SFG s'effectue de manière sélective.

Dans une étape suivante, nous identifions une méthode de préparation de capteurs ADN adaptés à la détection par SFG. La qualité du processus d'hybridation de quatre méthodes différentes est investiguée par résonance de plasmon de surface (SPR). Cette dernière montre que l'architecture chimique la plus performante consiste à adsorber des molécules de mercaptohexanol (MCH) intercalées entre les brins d'ADN préalablement auto-assemblés sur le substrat.

Dans une étape ultime, la SFG est appliquée à des capteurs ADN construits sur base de la méthode sélectionnée par SPR. Les spectres obtenus exhibent une grande désorganisation des molécules sondes, ce qui limite les possibilités de détection par SFG du processus d'hybridation. Par ailleurs, l'information spectroscopique de la SFG révèle la présence, sur la surface, de résidus issus de la solution tampon utilisée.

Dissertation doctorale en Sciences physiques
Le 24 août 2009
Centre de recherche en Physique de la Matière et du Rayonnement
Promoteur : Prof. Paul A. Thiry

University of Namur (FUNDP)
Faculty of Sciences
Research Centre in Physics of Matter and Radiation
Rue de Bruxelles, 61 – 5000 Namur, Belgium

Study of biosensors by means of nonlinear optical spectroscopy[1]

by Yannick Sartenaer

Abstract:

The main goal of this work is to apply a emergent technique, based on nonlinear optics, to the detection of the molecular recognition process in biosensing devices. For this purpose, we implement the sum-frequency generation (SFG) spectroscopy, which is able to extract a vibrational fingerprint from the studied interface. Our experimental route begins with a study of molecular adsorption mechanisms that constitute an essential prerequisite to the biosensor technology. The adsorption properties of two molecules (decanethiol and decyl thiocyanate) that differ only through their anchoring groups are investigated. Complementary techniques such as XPS or STM complete the SFG spectroscopic information. We show that the use of thiocyanate groups allows the formation of self-assembled monolayers on platinum substrate, even if the persistence of cyanate ions disturbs the organization of the layers. Our study continues with the analysis of a model biosensor based on the biotin/avidin system. The SFG confirms the formation of a organized monolayer of probe molecules (biotin) on Au, Ag, Pt and CaF_2 substrates. The molecular recognition with the target molecule (avidin) is observed on CaF_2 substrates in the spectral range of the CH and NH stretching vibrations. The use of alternative target molecules (BSA, saturated avidin) demonstrates that the SFG detection occurs in a specific way. In a next step, we identify a preparation method leading to the formation of DNA based sensors that are suitable for the SFG investigations. The quality of the hybridization process of four different methods is investigated by surface plasmon resonance (SPR). That one shows that the best chemical architecture consists to adsorb mercaptohexanol (MCH) molecules in between the DNA strands, which are previously assembled on the substrate. In a final step, the SFG is applied to DNA based sensors formed with the method selected by SPR. The obtained spectra exhibit a poor organization of the probe molecules, which prevents us to detect the hybridization process by SFG. Besides, the spectroscopic information reveals the presence at the interface of residues from the buffer solution.

Ph.D. thesis in physical Sciences
August 24th 2009
Research Centre in Physics of Matter and Radiation
Advisor: Prof. Paul A. Thiry

---

[1] An English version of the results discussed in the thesis can be found in the articles listed in appendix C.

Remerciements

J'ai lu un jour que les remerciements étaient sans aucun doute les pages les plus lues d'une thèse de doctorat. J'ignore si cette affirmation repose sur une étude scientifique rigoureuse mais je pense toutefois qu'elle est vraie. Malgré cela, j'invite le lecteur intéressé à également porter son attention sur les quelques 150 pages suivantes qui sont le fruit d'un travail bien plus conséquent que l'écriture de ces quelques lignes. Par ailleurs, il est bien entendu qu'un tel travail ne pourrait être mené à son terme sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je voudrais remercier ici en guise de préambule. Des remerciements exhaustifs nécessiteraient à eux seuls un chapitre entier de cette thèse. Je vais donc tenter de résumer en quelques mots bien peu représentatifs toute la reconnaissance que je leur porte.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté de lire ce manuscrit ainsi que pour leurs commentaires et suggestions visant à l'améliorer.

Tout naturellement, je voudrais ensuite exprimer ma sincère reconnaissance au professeur Paul Thiry (même si de son propre aveu, il n'apprécie pas trop les remerciements) pour le soutien et la confiance qu'il m'a accordés depuis le jour où j'ai poussé sa porte afin d'entamer mon mémoire de licence sous sa direction. Il a toujours trouvé un peu de temps à me consacrer à chaque fois que je le sollicitais, que ce soit pour un motif scientifique, pédagogique, comptable ou autre.

Durant ces nombreuses années passées au laboratoire LASMOS, puis LLS, puis PMR, j'ai eu l'occasion de croiser la route de nombreux chercheurs, enseignants, etc., qui m'ont aidé par leurs conseils, leurs encouragements, leur professionnalisme ou tout simplement leur convivialité. Dans le désordre, merci à Laurent pour m'avoir initié au monde passionnant de la recherche scientifique et pour m'avoir fait partager sa compétence, sa pédagogie et sa bonne humeur durant mes premières années de thèse, à Gérard pour le temps de manip passé ensemble dans une ambiance conviviale et pour son expertise en sciences des surfaces, à Francesca pour son point de vue de chimiste dans un monde de physiciens et pour sa touche d'humanité féminine dans un laboratoire exclusivement masculin, à Dan pour son enthousiasme scientifique et son amitié, à Cédric pour m'avoir accompagné depuis le début de mes études dans la bonne humeur et pour son réseau d'informations, à

Laurent et Ernest pour notre cohabitation réussie dans le « nouveau » paysager (qui tenait plus de l'aquarium que du bureau), à Chantal pour son engagement pédagogique et son soutien en période de rédaction (en particulier les petites pauses mails), à Yves pour ses conseils théoriques et sa relecture attentive et éclairée de mon manuscrit, à André pour son sens aigu de la physique expérimentale, à Alaa Addin pour sa connaissance des lasers, à Vincent pour m'avoir entraîné du côté Mac, à Christophe (Chum), Christophe (Xi), Jean-Jacques et Priscilla pour avoir fait de « l'ancien » paysager un lieu où il faisait bon vivre, à Laurent Tchik pour son support technique et sa science des ordinateurs, à Nouri pour nos discussions enrichissantes sur la culture du Sud, à Jacques pour être toujours resté un membre « de cœur » du LASMOS et à tous les autres membres du département et des facultés avec lesquels j'ai pu interagir à un moment ou à un autre.

Je souhaiterais aussi exprimer ma reconnaissance au professeur Haruma Kawaguchi pour m'avoir accueilli dans son laboratoire après une unique et brève rencontre. Ces trois mois passés au Japon ont été pour moi extrêmement enrichissant aussi bien au niveau scientifique qu'au niveau humain. Merci tout particulier à Hara, Asakawa, Horie, Arisa, Ugajin, Ken, Anan, Suton, Yoichi, Harami, Abeyuri, Azusa, Adachi et à toute la famille Fujimoto. Merci également au professeur Claire-Marie Pradier de m'avoir permis d'effectuer plusieurs séjours dans son unité de recherche à Paris. Merci à Christophe et Vincent pour leur aide lors de nos manips.

Mais ce travail représente aussi un investissement personnel important que je n'aurais pu consentir sans les encouragements constants de mon entourage et de mes proches. Tout d'abord, ma reconnaissance va bien entendu à Marjorie qui subit mes élucubrations de physicien depuis plus de 10 ans maintenant et qui m'a toujours apporté un soutien inconditionnel dans tout ce que j'ai entrepris. Plus que quiconque, elle a su me supporter dans les moments de découragement. J'adresse également des remerciements tout particuliers à mes parents, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci aussi à mes frères, Fred et Livegoule, à mes belles-soeurs de part et d'autre (et à mes beaux-parents et beaux-beaux-frères) ainsi qu'à toute ma famille au sens large (très large même). Je tiens encore à adresser mes remerciements les plus sincères à tous mes amis, en particulier Alice, Christophe, Damien, Estelle, Jérémy, Nicolas et Valérie. Ils m'ont maintes fois prouvé que la vie ne se résume pas à un modèle physique, aussi précis soit-il.

Je terminerai en remerciant (encore une fois) mes deux correctrices officielles qui me suivent depuis mon mémoire de licence. De nouveau, elles ont permis de préserver le secret de mon orthographe déplorable.

Finalement, merci au lecteur qui, ayant achevé ces deux premières pages, continuera la lecture de ce manuscrit. J'espère qu'il en retirera autant de satisfaction que j'en ai eu à l'écrire.

Table des matières

Introduction générale **5**

I Considérations théoriques et techniques **9**

1 L'optique non linéaire **11**
1.1 Introduction 11
1.2 Polarisation linéaire des matériaux 12
1.3 Polarisation des matériaux en optique non linéaire 14
1.3.1 Susceptibilité du second ordre $\chi^{(2)}$ 14
1.3.2 Propriétés de symétrie du tenseur $\chi^{(2)}$ 16
1.3.3 Phénomènes optiques non linéaires du second ordre . . 18
1.4 Origine de la non-linéarité 21

2 Spectroscopies optiques non linéaires **23**
2.1 Introduction 23
2.2 Propagation des ondes électromagnétiques à l'interface 24
2.2.1 Equation de propagation appliquée à la SFG 26
2.2.2 Intensité du faisceau SFG réfléchi 27
2.2.3 Direction du faisceau SFG réfléchi 29
2.3 Modélisation des interfaces en spectroscopie SFG 31

3 Dispositif expérimental **35**
3.1 Introduction 35
3.2 Le dispositif laser 35
3.2.1 L'oscillateur 36
3.2.2 L'amplificateur 39
3.2.3 L'OPO infrarouge 40
3.2.4 L'OPO visible 41
3.3 Configurations expérimentales 41
3.4 Chaîne de détection 43
3.5 Importance du substrat 45
3.5.1 Substrats métalliques 45
3.5.2 Substrats isolants 48

II Résultats expérimentaux **49**

4 Etude de cas : DT vs DTCN **51**
4.1 Introduction . . . 51
4.2 Présentation du système . . . 51
4.2.1 Les monocouches auto-assemblées . . . 51
4.2.2 La problématique DT-DTCN . . . 53
4.3 Préparation des échantillons . . . 54
4.4 Résultats expérimentaux . . . 54
4.4.1 Spectres SFG . . . 54
4.4.2 Comparaison avec la spectroscopie infrarouge . . . 57
4.4.3 Modélisation expérimentale des spectres SFG . . . 59
4.4.4 Interprétation et discussion . . . 61
4.5 Conclusions . . . 67

5 Les biocapteurs **69**
5.1 Introduction . . . 69
5.2 La reconnaissance moléculaire . . . 70
5.3 Mais qu'est-ce qu'un biocapteur ? . . . 70
5.4 Etat de l'art . . . 73

6 Un biocapteur modèle : le système Biotine/Avidine **77**
6.1 Introduction . . . 77
6.2 Présentation du système . . . 78
6.2.1 La biotine . . . 78
6.2.2 La biocytine . . . 79
6.2.3 L'avidine . . . 80
6.3 Méthodologie . . . 81
6.4 Préparation des échantillons . . . 82
6.5 Résultats expérimentaux . . . 82
6.5.1 Spectres SFG sur substrats métalliques . . . 82
6.5.2 Spectres SFG sur CaF_2 . . . 85
6.5.3 Sélectivité du capteur . . . 88
6.5.4 Comparaison avec les spectres infrarouges . . . 90
6.5.5 Le point sur les différentes techniques de détection . . . 91
6.6 Conclusions . . . 93

7 Caractérisation de capteurs ADN par SPR **95**
7.1 Introduction . . . 95
7.2 Présentation du système . . . 96
7.3 Méthodologie . . . 97
7.4 Préparation des échantillons . . . 99
7.4.1 Méthode 1 . . . 101
7.4.2 Méthode 2 . . . 101

7.4.3 Méthode 3 . . . 101
7.4.4 Méthode 4 . . . 102
7.5 Résultats expérimentaux . . . 102
7.6 Conclusions . . . 107

8 Caractérisation de capteurs ADN par SFG **109**
8.1 Introduction . . . 109
8.2 Présentation du système . . . 109
8.3 Méthodologie . . . 111
8.4 Préparation des échantillons . . . 112
8.5 Résultats expérimentaux . . . 113
8.5.1 Monocouches d'ADN . . . 113
8.5.2 Hybridation . . . 117
8.5.3 Importance de la solution tampon . . . 118
8.5.4 Et la suite ? . . . 120
8.6 Conclusions . . . 121

Conclusion générale **123**

Annexes **128**

A Autres techniques utilisées **129**
A.1 La résonance de plasmon de surface . . . 129
A.2 La spectroscopie infrarouge . . . 133
A.3 L'XPS . . . 135
A.4 Le STM . . . 137

B Analyse de spectres SFG : le Fit-O-Matic **139**

C Publications issues de ce travail **145**

Bibliographie **147**

Introduction générale

Qu'est-ce qu'une thèse de doctorat ? Arrivé au processus final de rédaction du manuscrit, il est temps de se poser la question ! Historiquement, les premiers « docteurs » apparaissent en Europe médiévale dans le domaine de la théologie. Le titulaire de ce titre (PhD - *Philosophiae Doctor*, où philosophie désigne l'étude des connaissances en général) est alors une personne habilitée à produire des idées et à les répandre autour de lui. Aujourd'hui, si on en croit la définition littérale, le doctorat est « le grade le plus élevé conféré par une université. Il sanctionne l'aptitude à mener à bien un travail de recherche. La thèse se présente sous la forme d'un manuscrit qui décrit une opinion ou une position dont on s'attache à démontrer la véracité ». La thèse de doctorat doit donc, au terme d'une recherche et d'une analyse approfondie dans une discipline particulière, apporter une contribution à l'avancement des connaissances et à la réflexion sur le sujet. En science, elle doit, en plus, faire la preuve d'une méthode de travail scientifique et comporter une recherche bibliographique analysée de façon critique et rigoureuse. Nous ajouterons que, de notre point de vue, la préparation d'une thèse de doctorat représente aussi une étape cruciale dans la carrière d'un jeune chercheur, celle des premiers contacts avec le monde passionnant de la recherche scientifique.

Mais une thèse de doctorat, c'est avant tout une démarche originale. Et original, le cheminement que nous avons entrepris dans ces pages l'est certainement puisque nous avons parié sur le curieux mariage entre un système biologique et une méthode physique. En effet, nous avons appliqué une méthode inédite, basée sur l'optique non linéaire, à la détection du phénomène de reconnaissance moléculaire dans les biocapteurs. Il est vrai que la communauté scientifique prise de plus en plus l'analyse du point de vue physique de problèmes relevant d'autres disciplines. Ainsi, après être longtemps demeurées cloisonnées, les sciences voient aujourd'hui émerger des disciplines nouvelles telles que la *chimie-physique* ou la *bio-physique*. C'est dans ce cadre que nous situons ce travail, puisque les biocapteurs sont des dispositifs couramment utilisés dans la biologie moderne pour déceler la présence d'entités moléculaires particulières à l'aide de techniques qui relèvent généralement des sciences physiques.

Le choix d'utiliser une spectroscopie basée sur les phénomènes optiques non linéaires n'est pas anodin. En effet, la problématique étudiée est intimement liée aux surfaces puisque notre objectif vise à détecter un processus de reconnaissance qui se produit à l'interface entre deux milieux. Malheureusement, les surfaces restent des systèmes physiques qui sont difficiles à caractériser étant donné le faible rapport de matière qui existe entre le volume d'un matériau et ses interfaces. A cet égard, l'optique non linéaire se révèle déterminante car elle permet de s'affranchir presque totalement de certaines contraintes imposées par le volume. C'est une des raisons pour laquelle le principal outil que nous avons utilisé ici est la spectroscopie de génération de fréquence-somme (SFG). Celle-ci fait partie des techniques optiques du second ordre, qui ne sont pas sensibles à une éventuelle réponse de volume dans le cas d'un matériau centrosymétrique. De plus, le tenseur de susceptibilité observé par la SFG et caractérisant la réponse de la matière recèle quantité d'informations sur la structure spatiale, électronique et vibrationnelle.

Au cours de ce travail, nous nous proposons donc d'exploiter ces informations lorsqu'elles sont extraites d'interfaces constitutives de biocapteurs. Notre motivation est alors double puisqu'il s'agit de caractériser ces systèmes biologiques d'un point de vue fondamental mais aussi de « lire » nos capteurs, c'est-à-dire d'attester de l'occurrence de la reconnaissance moléculaire entre les espèces biologiques impliquées lorsqu'elle a effectivement lieu.

Concrètement, au niveau de sa structure, ce manuscrit se divise en deux parties principales. La première traite des considérations théoriques et techniques nécessaires à l'appréhension de la spectroscopie de génération de fréquence-somme alors que la seconde discute les résultats expérimentaux que nous avons obtenus par l'étude de divers systèmes.

Dans la première partie, le chapitre d'ouverture pose naturellement les bases de l'optique non linéaire. Nous y discutons ses origines mais aussi les grandeurs physiques que nous voulons observer et les différents phénomènes optiques du second ordre qui peuvent être générés. Nous présentons également de manière qualitative les origines réelles de la non-linéarité optique.

Par la suite, dans un deuxième chapitre, nous nous attachons à développer les techniques spectroscopiques qui découlent des phénomènes d'ordre deux en général et de la génération de fréquence-somme en particulier. Nous établissons ainsi le formalisme nécessaire à la détermination de l'onde SFG produite par l'interface. Une dernière section est alors consacrée à la modélisation d'un adsorbat organique déposé à la surface d'un matériau.

Une fois les bases théoriques explicitées, l'aspect expérimental et technique de ce travail est ensuite détaillé dans le chapitre trois. Nous y trouvons un descriptif complet du dispositif laser utilisé pour générer les effets non linéaires mais aussi des considérations sur la mise en œuvre pratique de la spectroscopie SFG. Dans cette section sont expliqués tous les éléments

situés entre l'échantillon analysé et l'expérimentateur. Nous développons également certains aspects pratiques relatifs aux expériences, en particulier le rôle du substrat et les méthodes de traitement utilisées pour le préparer.

La seconde partie traite des résultats à proprement parler. Elle débute par un chapitre quatre dont le rôle est double. D'une part, nous y décrivons les mécanismes d'interprétation des spectres SFG et d'autre part, nous présentons une étude comparative des propriétés d'adsorption de deux molécules qui diffèrent seulement par leur groupement d'ancrage utilisé pour leur immobilisation sur la surface. En effet, la compréhension des processus d'immobilisation moléculaire aux interfaces se pose comme un prérequis indispensable à la technologie des biocapteurs. A cet égard, d'autres techniques de caractérisation de surface sont employées afin de compléter l'information SFG.

Le chapitre cinq nous introduit alors à la problématique des biocapteurs proprement dite. Il propose une description de leur principe de fonctionnement, de même qu'un état de la question des capteurs dans notre société actuelle. Par ailleurs, nous insistons sur l'importance du mécanisme de reconnaissance moléculaire au sein de ces dispositifs.

Dans le chapitre six, nous révélons les résultats obtenus lors de la première confrontation de la spectroscopie SFG avec un biocapteur modèle. Pour concevoir celui-ci, nous avons utilisé un système bien connu des biologistes, à savoir le système biotine-avidine. Celui-ci est alors décrit ainsi que les molécules utilisées en pratique dans nos expériences. Les spectres SFG sont ensuite discutés et interprétés afin de pouvoir en extraire l'information recherchée. Pour finir, nous la comparons à celle obtenue à partir d'autres techniques employées dans le chef des biocapteurs.

Avant de passer à l'étape suivante, qui concerne l'analyse de systèmes plus complexes, le chapitre sept présente une investigation préliminaire de différentes méthodes de préparation de capteurs ADN. Cette étude a pour but d'identifier une architecture interfaciale menant à l'élaboration de capteurs performants en se basant sur des résultats fournis par une technique de référence, à savoir la résonance de plasmon de surface. Par ailleurs, nous y discutons certaines stratégies visant à réduire les adsorptions non spécifiques.

Le huitième et dernier chapitre présente les résultats produits lorsque la spectroscopie SFG est appliquée aux systèmes ADN préalablement identifiés. Les spectres obtenus sont alors interprétés et discutés au regard de la bibliographie récente sur le sujet. Nous évoquons également l'importance de la solution tampon dans la préparation des échantillons.

Finalement, nous exposons nos conclusions et nous suggérons quelques perspectives qui pourraient s'inscrire dans la continuité de ce travail.

Première partie

Considérations théoriques et techniques

Chapitre 1

L'optique non linéaire

1.1 Introduction

L'histoire de l'optique non linéaire est intimement liée à celle du laser. Bien qu'il existe, depuis des millénaires, des lasers CO_2 émettant autour de 10 μm dans l'atmosphère de Mars ou de Vénus [1], il a fallu attendre le début du vingtième siècle pour que cette technologie soit à portée de l'homme.

L'histoire du laser a débuté avec Albert Einstein qui, en 1917, présenta la théorie de l'émission stimulée selon laquelle un matériau pouvait émettre de la lumière s'il était correctement excité. Les bases théoriques du fonctionnement du laser étaient jetées mais de nombreux chercheurs pensaient alors qu'il était techniquement impossible de construire un dispositif produisant de la lumière par émission stimulée. La suite de l'histoire nous démontre à quel point les préjugés des scientifiques peuvent entraver les progrès technologiques. Il a fallu attendre près de 35 ans après la publication de la théorie d'Einstein pour que des scientifiques s'intéressent à nouveau au phénomène de l'émission stimulée.

En 1953, Charles Townes fabriqua le premier maser en collaboration avec quelques étudiants. Ce maser utilisait de l'ammoniac et produisait un rayonnement monochromatique à une longueur d'onde de 1,25 cm. Au cours des années qui suivirent, de nombreux autres masers furent fabriqués. Tous fonctionnaient dans le domaine des micro-ondes, le pas vers le domaine de la lumière visible et de ses courtes longueurs d'onde semblant infranchissable. Si les expérimentateurs de l'époque entrevoyaient déjà les possibilités d'un maser optique, ils concevaient difficilement les moyens de le construire.

En 1957, Townes commença à considérer les problèmes reliés à la fabrication d'un dispositif semblable au maser mais émettant du rayonnement infrarouge ou de la lumière visible. En collaboration avec Arthur Schawlow, il publia les premières propositions détaillées de masers optiques [2]. Ils envisagèrent alors l'utilisation d'une cavité résonante pour amplifier la lumière. En 1960, ils obtinrent le premier brevet de laser, sans pour autant

le construire. Le premier laser fonctionnel fut fabriqué par Theodore Maiman en 1960 [3]. Il découvrit que les ions de chrome d'un rubis artificiel émettaient de la lumière rouge lorsqu'ils étaient irradiés par la lumière verte d'une lampe au xénon. En déposant une couche d'aluminium à chaque extrémité de la tige de rubis, Maiman réussit à produire le premier laser optique. L'année suivante, le laser à hélium-néon, l'un des plus couramment utilisés aujourd'hui, fut inventé.

Grâce à cette nouvelle technologie permettant, entre autres choses, de générer un champ électrique suffisamment intense, le groupe de Franken de l'Université de Michigan met en évidence dès 1961, un phénomène optique inédit en générant le second harmonique à 347 nm d'un laser pulsé à rubis d'une longueur d'onde de 694 nm à travers un cristal de quartz [4]. L'optique non linéaire était née.

1.2 Polarisation linéaire des matériaux

Comme chacun sait, la lumière est une onde électromagnétique et à ce titre, elle est composée d'un champ électrique et d'un champ magnétique de polarisations transverses. Illuminer la matière revient donc à la soumettre à un champ électrique extérieur. Dans le cadre de l'optique linéaire, nous nous intéressons au comportement d'un matériau auquel nous appliquons un champ électrique de faible intensité comme celui fourni par une source lumineuse classique.

Si nous considérons la matière à l'échelle atomique, nous pouvons modéliser un atome diélectrique comme un noyau positif ponctuel $(+Q)$ entouré d'une charge sphérique négative $(-Q)$ dont le centre coïncide avec le noyau. Si nous appliquons un champ électrique extérieur à ce système, nous observons que les centroïdes de charge se déplacent et ne coïncident plus. L'équilibre est atteint quand le champ électrique induit entre les charges positives et négatives compense le champ extérieur (voir figure 1.1).

Dès lors, l'atome polarisé devient un petit dipôle électrique de moment dipolaire $\vec{p}$ qui peut s'exprimer de manière tout à fait générale, en ne tenant compte que de l'action du champ électrique extérieur, par l'expression vectorielle suivante :

$$\vec{p} = \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\alpha} \vec{E}, \tag{1.1}$$

où ε_0 est la permittivité du vide $(8,86\ 10^{-12}\ C^2 J^{-1} m^{-1})$ et $\overleftrightarrow{\alpha}$ est défini comme la *polarisabilité* électrique de l'atome [5]. Cette dernière est un tenseur de rang 2 car le moment dipolaire induit n'est pas forcément orienté dans la direction du champ électrique appliqué.

A ce stade, une précision s'impose. Ce qui va être présenté dans ces pages tient compte uniquement des phénomènes physiques qui ont lieu dans

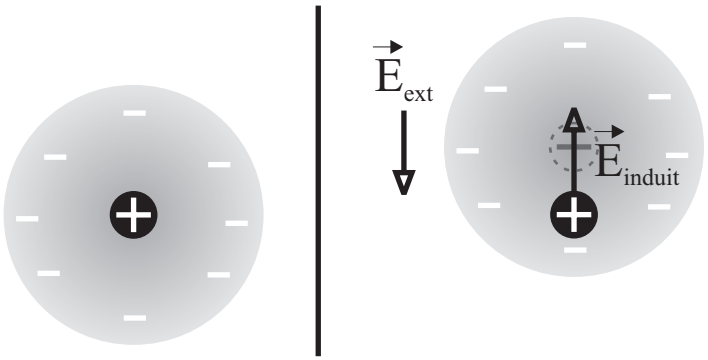


FIGURE 1.1 – *Atome diélectrique non perturbé (à gauche) et soumis à un champ électrique extérieur (à droite).*

le cadre de l'*approximation dipolaire électrique*. Tous les développements de la polarisation en termes multipolaires seront donc limités aux effets liés aux moments dipolaires électriques induits par le champ électrique extérieur. Nous ne considérons donc pas les effets liés aux moments dipolaires magnétiques, quadrupolaires électriques, *etc.* Cette approximation reste parfaitement satisfaisante dans la majorité des cas pratiques rencontrés en optique non linéaire puisque ces termes additionnels sont presque toujours très faibles par rapport à la contribution du dipôle électrique. Néanmoins, la littérature fait état de quelques cas particuliers pour lesquels ces effets doivent être considérés [6][7] mais nous ne les détaillerons pas ici.

S'il n'y a aucune interaction entre les atomes d'un système comprenant N atomes par unité de volume, nous pouvons généraliser ce qui précède et exprimer $\vec{P}$, le moment dipolaire par unité de volume ou *polarisation* :

$$\vec{P} = N\vec{p} = N\varepsilon_0\overleftrightarrow{\alpha}\vec{E} = \varepsilon_0\overleftrightarrow{\chi}\vec{E}, \tag{1.2}$$

où $\overleftrightarrow{\chi}$ est défini comme la *susceptibilité* électrique du matériau considéré. Tout comme la polarisabilité $\overleftrightarrow{\alpha}$, il s'agit également d'un tenseur de rang 2.

De là, nous pouvons définir des grandeurs comme la *constante diélectrique* $\overleftrightarrow{\varepsilon_r}$ et la *permittivité* $\overleftrightarrow{\varepsilon}$ de la manière suivante :

$$\overleftrightarrow{\varepsilon_r} = \overleftrightarrow{1} + \overleftrightarrow{\chi}, \tag{1.3}$$

$$\overleftrightarrow{\varepsilon} = \varepsilon_0\overleftrightarrow{\varepsilon_r}. \tag{1.4}$$

Notons que nous pouvons relier ε_r à une grandeur physique mesurable, l'indice de réfraction n du matériau :

$$n(\omega) = \sqrt{\varepsilon_r(\omega)}, \tag{1.5}$$

où ω est la pulsation du champ électrique généré par l'onde électromagnétique.

Sachant cela, nous pouvons exprimer le vecteur déplacement électrique $\vec{D}$ pour un milieu diélectrique neutre soumis à un champ électrique $\vec{E}$. Il est défini à partir du champ électrique total agissant dans le matériau $\vec{E}$ et de la polarisation $\vec{P}$:

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \varepsilon_0 \vec{E} + \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\chi} \vec{E} = \varepsilon_0 \left(1 + \overleftrightarrow{\chi}\right) \vec{E} = \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\varepsilon_r} \vec{E} = \overleftrightarrow{\varepsilon} \vec{E}. \tag{1.6}$$

Remarquons deux formes intéressantes de l'expression de $\vec{D}$:

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \overleftrightarrow{\varepsilon} \vec{E}. \tag{1.7}$$

Dans la première forme, $\vec{D}$ est exprimé comme étant une contribution du champ $\vec{E}$ et une contribution de la matière $\vec{P}$ alors que la seconde suppose que la contribution de la matière est directement proportionnelle au champ. Notons également qu'il est nécessaire que $\overleftrightarrow{\varepsilon}$ soit un tenseur de rang deux puisque $\vec{D}$ et $\vec{E}$ ne sont pas toujours parallèles, comme c'est le cas dans les milieux anisotropes.

1.3 Polarisation des matériaux en optique non linéaire

1.3.1 Susceptibilité du second ordre $\chi^{(2)}$

Nous nous intéressons maintenant au cas d'un matériau soumis à un champ électrique extérieur intense, comme celui qui est fourni par un faisceau laser. Par intense, nous entendons un champ électrique dont l'intensité n'est plus négligeable par rapport au champ régnant au sein de l'atome. Afin de mieux s'en rendre compte, nous pouvons évaluer le champ électrique agissant sur un électron présent au sein de l'atome d'hydrogène dans le formalisme de Bohr (rayon de Bohr $= a_0 = 5,29\ 10^{-11} m$) :

$$E = \frac{F}{e} \ \Rightarrow \ E = \frac{e}{4\pi\varepsilon_0 a_0^2} = \frac{9\ 10^9 \times 1,6\ 10^{-19}}{(5,3\ 10^{-11})^2} = 5,1\ 10^{11}\ V/m \text{ [8]}. \tag{1.8}$$

Nous pouvons maintenant calculer l'intensité du champ électrique induit par un faisceau laser dont la puissance crête est de l'ordre de 1 MW (un faisceau pulsé de 25 mW composé de trains de 100 impulsions de 10 ps et dont le taux de répétition est de 25 Hz) lorsque nous le focalisons sur une surface de 100 $\mu m \times 100\ \mu m$. Notons que nous avons choisi ces valeurs car elles sont assez proches de celles réellement utilisées dans nos expériences. L'intensité du champ est décrite par la relation suivante [9] :

$$I = n\sqrt{\frac{\varepsilon_0}{\mu_0}}\frac{E^2}{2} \iff E = \sqrt{\frac{2I}{n\varepsilon_0 c}}, \tag{1.9}$$

où nous nous sommes servis de $c = 1/\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}$ et où I est la puissance moyenne par unité de surface et n, l'indice de réfraction du milieu. En se plaçant dans l'air ($n \sim 1$), le calcul nous donne alors :

$$E = \sqrt{\frac{2 \times (10^6/10^{-8})}{8,85\ 10^{-12} \times 3\ 10^8}} = 2,7\ 10^8\ V/m. \tag{1.10}$$

Nous obtenons donc un champ électrique de l'ordre de $10^8\ V/m$, ce qui n'est plus négligeable par rapport à la valeur calculée pour l'atome d'hydrogène.

Dans ce cas, les relations 1.2 et 1.7 ne sont plus valables car la polarisation contient des termes d'ordre supérieur en $\vec{E}$. En effet, de manière analogue à la loi de Hooke pour le ressort $F = -kx$, cette équation n'est rien d'autre que le premier terme d'un développement en série tronqué au premier ordre. En ce sens, l'optique linéaire telle que nous l'avons décrite précédemment constitue une approximation. Lorsque le champ électrique devient intense, nous ne pouvons plus négliger les termes d'ordres supérieurs du développement en série et nous avons :

$$\vec{D} = \overleftrightarrow{\varepsilon}\vec{E} + \vec{P}_{NL} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P}\,, \tag{1.11}$$

avec cette fois, la polarisation totale valant :

$$\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL} = \underbrace{\vec{P}^{(1)}(\vec{E})}_{\vec{P}_L} + \vec{P}^{(2)}(\vec{E}^2) + \vec{P}^{(3)}(\vec{E}^3) + \dots\,, \tag{1.12}$$

ou encore :

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\chi}^{(1)}\vec{E} + \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\chi}^{(2)}\vec{E}^2 + \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\chi}^{(3)}\vec{E}^3 + \dots\,, \tag{1.13}$$

où $\chi^{(n)}$ est la *susceptibilité* d'ordre n, c'est-à-dire un tenseur de rang $(n+1)$ avec 3^{n+1} composantes.

Afin de mieux nous rendre compte de la validité de cette approximation pour différentes valeurs de champ électrique, nous nous proposons de comparer grossièrement les ordres de grandeur des différentes contributions à la polarisation totale. En effet, en sachant que les susceptibilités impliquées dans l'équation 1.13 sont typiquement de l'ordre de $\chi^{(1)} \sim 1$, $\chi^{(2)} \sim 10^{-11}\ m/V$ et $\chi^{(3)} \sim 10^{-23}\ m^2/V^2$ [9] et que nous considérons $\varepsilon_0 \sim 10^{-11}\ C^2 J^{-1} m^{-1}$, il nous reste à inclure l'intensité du champ électrique pour pouvoir évaluer les différents termes du développement en série. Dans un premier temps, nous considérerons une valeur de l'ordre de $10^2\ V/m$, ce qui correspond au champ généré par un faisceau laser continu de 10 mW de puissance focalisé sur une surface de 1 mm^2 (un laser hélium-néon par exemple). Nous obtenons alors :

$$
\begin{aligned}
P &= P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots \\
&= \underbrace{10^{-11} \times 1 \times 10^{2}}_{10^{-9}} + \underbrace{10^{-11} \times 10^{-11} \times (10^{2})^{2}}_{10^{-18}} + \underbrace{10^{-11} \times 10^{-23} \times (10^{2})^{3}}_{10^{-28}} + \dots
\end{aligned}
\tag{1.14}
$$

Comme nous pouvons le voir, les premiers effets non linéaires se produisent avec une intensité inférieure de près de dix ordres de grandeur à celle des phénomènes linéaires, ce qui valide pleinement l'approximation de l'optique linéaire pour des champs de faibles intensités.

Considérons maintenant l'intensité du champ électrique générée par un faisceau laser semblable à ceux utilisés dans les expériences d'optique non linéaire. Nous avons montré précédemment que le champ atteint alors des valeurs de l'ordre de $10^{8}\ V/m$ (voir équation 1.10). Notre calcul devient :

$$
P = \underbrace{10^{-11} \times 1 \times 10^{8}}_{10^{-3}} + \underbrace{10^{-11} \times 10^{-11} \times (10^{8})^{2}}_{10^{-6}} + \underbrace{10^{-11} \times 10^{-23} \times (10^{8})^{3}}_{10^{-10}} + \dots
\tag{1.15}
$$

Dans ces conditions, la différence entre les deux premiers termes s'atténue drastiquement puisque $P^{(2)}$ n'est plus que mille fois inférieur à $P^{(1)}$. Ces contributions non linéaires deviennent dès lors tout à fait détectables, ce qui nous contraint à ne plus négliger le second terme du développement en série et donc à considérer les effets optiques du second ordre. En ce qui concerne les phénomènes du troisième ordre, bien qu'ils commencent également à devenir détectables, leur impact reste toujours assez faible puisqu'ils se produisent avec sept ordres de grandeur de moins que les effets linéaires. Un champ électrique d'intensité supérieure aurait bien sûr tendance à les renforcer comparativement aux autres contributions. Quoi qu'il en soit, il est clair que l'approximation de l'optique linéaire n'est plus valable quand le champ électrique croît en intensité et qu'il nous faut commencer à considérer les termes non linéaires de la polarisation pour des valeurs de champ telles que celles que nous avons considérées ici.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes limités aux phénomènes d'optique non linéaire d'ordre deux, ce qui signifie que la grandeur physique qui nous intéresse particulièrement est la susceptibilité du second ordre $\vec{\vec{\chi}}^{(2)}$. Il s'agit d'un tenseur de rang $(2+1) = 3$ comprenant 27 composantes.

1.3.2 Propriétés de symétrie du tenseur $\chi^{(2)}$

Comme nous nous en rendrons compte plus loin, une des caractéristiques intéressantes des spectroscopies optiques non linéaires du second ordre provient du fait qu'elles sont intrinsèquement sensibles aux interfaces de milieux

centrosymétriques. Ce fait découle d'une propriété toute simple du tenseur de susceptibilité d'ordre deux.

En effet, supposons que nous soumettions à un champ électrique $\vec{E}$ un matériau centrosymétrique, c'est-à-dire un matériau qui présente un centre d'inversion. Nous pouvons écrire l'expression de la polarisation non linéaire en nous limitant, comme mentionné ci-dessus, au second ordre. Nous obtenons alors :

$$\vec{P}_{NL} = \varepsilon_0 \vec{\vec{\chi}}^{(2)} \vec{E}^2. \tag{1.16}$$

Si nous soumettons maintenant ce même matériau à un autre champ électrique $\vec{E}'$ de sens opposé au premier, tel que $\vec{E}' = -\vec{E}$, l'expression devient :

$$\vec{P'}_{NL} = \varepsilon_0 \vec{\vec{\chi}}^{(2)} \vec{E'}^2. \tag{1.17}$$

Étant donné que le système présente un centre de symétrie, il faut tenir compte de la condition suivante :

$$\vec{P'}_{NL} = -\vec{P}_{NL}. \tag{1.18}$$

Et finalement, la combinaison de toutes ces expressions permet d'obtenir :

$$\varepsilon_0 \vec{\vec{\chi}}^{(2)} \vec{E'}^2 = -\varepsilon_0 \vec{\vec{\chi}}^{(2)} \vec{E}^2, \tag{1.19}$$

$$\vec{\vec{\chi}}^{(2)} (-\vec{E})^2 = -\vec{\vec{\chi}}^{(2)} \vec{E}^2, \tag{1.20}$$

$$\vec{\vec{\chi}}^{(2)} = -\vec{\vec{\chi}}^{(2)}, \tag{1.21}$$

$$\vec{\vec{\chi}}^{(2)} = \vec{\vec{0}}. \tag{1.22}$$

La seule solution est la solution triviale. Il apparaît donc que, dans le cadre de l'approximation dipolaire, les matériaux centrosymétriques ne présentent pas de réponse non linéaire du second ordre. Une analyse plus détaillée des équations présentées ci-dessus nous montre que cette condition peut se généraliser aux susceptibilités d'ordre pair.

Il est à présent possible d'expliquer cette fameuse sensibilité aux interfaces propre aux spectroscopies optiques non linéaires du second ordre. En effet, la plupart des matériaux usuels présentent un centre d'inversion et ne donnent donc pas de signal non linéaire *de volume*. Par contre, l'interface entre ces matériaux apparaît comme une rupture de symétrie générant une importante source de polarisation non linéaire *de surface*. Le signal recueilli avec ce type de technique est donc directement issu de l'interface sans contribution provenant du volume du matériau lui-même.

En ce qui concerne les matériaux non centrosymétriques, beaucoup moins nombreux, ils sont également appelés *cristaux non linéaires* et sont les seuls à pouvoir générer en volume des effets non linéaires du second ordre. Comme nous le verrons plus loin dans la description du dispositif expérimental, ces derniers peuvent servir pour des applications particulières parfois bien utiles.

1.3.3 Phénomènes optiques non linéaires du second ordre

Envisageons à présent une onde électromagnétique se propageant selon OX et polarisée perpendiculairement dans la direction OZ. En vertu des approximations explicitées ci-dessus, nous ne tenons compte que du champ électrique oscillant de celle-ci. L'équation de l'onde peut s'écrire [10] :

$$E_z(t) = E_{0Z} \cos\left(\frac{2\pi x}{\lambda} - \omega t\right). \tag{1.23}$$

Dans l'argument du cosinus, nous pouvons négliger la partie spatiale de la phase $\frac{2\pi x}{\lambda}$. En effet, cette dernière reste très faible en regard de la partie temporelle pour les longueurs d'onde optiques considérées et les dimensions typiques des atomes ($\sim 10^{-3}$ car $x \sim 10^{-10}$ m et $\lambda \sim 10^{-7}$ m). Nous obtenons alors :

$$E_z(t) = E_{0Z} \cos(\omega t). \tag{1.24}$$

Notre but est d'évaluer les composantes de la polarisation à partir de l'expression ci-dessus en nous limitant aux susceptibilités du premier et du second ordre. En injectant cette expression dans l'équation 1.13 selon OX, OY et OZ :

$$P_x = \varepsilon_0 \chi^{(1)}_{xz} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{xzz} E^2_{0Z} \cos^2(\omega t), \tag{1.25}$$

$$P_y = \varepsilon_0 \chi^{(1)}_{yz} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{yzz} E^2_{0Z} \cos^2(\omega t), \tag{1.26}$$

$$P_z = \varepsilon_0 \chi^{(1)}_{zz} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{zzz} E^2_{0Z} \cos^2(\omega t). \tag{1.27}$$

En se souvenant de la formule trigonométrique de Carnot :

$$1 + \cos 2x = 2\cos^2 x. \tag{1.28}$$

Nous obtenons finalement pour la polarisation :

$$P_x = \varepsilon_0 \chi^{(1)}_{xz} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{xzz} \frac{E^2_{0Z}}{2} + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{xzz} \frac{E^2_{0Z}}{2} \cos(2\omega t), \tag{1.29}$$

$$P_y = \varepsilon_0 \chi^{(1)}_{yz} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{yzz} \frac{E^2_{0Z}}{2} + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{yzz} \frac{E^2_{0Z}}{2} \cos(2\omega t), \tag{1.30}$$

$$P_z = \varepsilon_0 \chi^{(1)}_{zz} E_{0Z} \cos(\omega t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{zzz} \frac{E^2_{0Z}}{2} + \varepsilon_0 \chi^{(2)}_{zzz} \frac{E^2_{0Z}}{2} \cos(2\omega t). \tag{1.31}$$

Le premier terme du membre de droite est relatif à l'optique linéaire qui prédit une polarisation oscillant à la pulsation ω du champ électrique. Quant au terme non linéaire, il contient à présent une composante à pulsation nulle et une composante à la pulsation 2ω :

$$\vec{P} = \vec{P}_L(\omega) + \vec{P}_{NL}(0, 2\omega). \tag{1.32}$$

Ces deux phénomènes sont respectivement appelés *rectification optique* et *génération du second harmonique*. Le premier consiste en l'apparition d'une

différence de potentiel aux bornes du matériau considéré tandis que le second double la fréquence du rayonnement incident et en modifie ainsi la couleur.

Considérons maintenant le cas de deux ondes électromagnétiques se propageant toutes deux selon OX et polarisées perpendiculairement dans la même direction OZ mais possédant des pulsations différentes ω_1 et ω_2. Nous obtenons après simplification de la partie spatiale de la phase :

$$E_1(t) = E_{1Z}\cos(\omega_1 t)\,, \tag{1.33}$$

$$E_2(t) = E_{2Z}\cos(\omega_2 t)\,. \tag{1.34}$$

Déterminons la composante de la polarisation selon OX en nous limitant au second ordre :

$$\begin{aligned} P_x &= P_{Lx} + P_{NLx} \\ &= \varepsilon_0\chi^{(1)}_{xz}(E_1+E_2) + \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}(E_1+E_2)^2 \\ &= \varepsilon_0\chi^{(1)}_{xz}E_1 + \varepsilon_0\chi^{(1)}_{xz}E_2 + \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_1^2 + \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_2^2 + 2\varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_1E_2 \\ &= \left\{\varepsilon_0\chi^{(1)}_{xz}E_{1Z}\cos(\omega_1 t) + \varepsilon_0\chi^{(1)}_{xz}E_{2Z}\cos(\omega_2 t)\right\} \\ &\quad + \left\{ \begin{array}{l} \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_{1Z}^2\cos^2(\omega_1 t) + \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_{2Z}^2\cos^2(\omega_2 t) \\ +2\varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_{1Z}E_{2Z}\cos(\omega_1 t)\cos(\omega_2 t) \end{array} \right\}. \end{aligned} \tag{1.35}$$

Nous obtenons à nouveau une équation du type :

$$P = P_L + P_{NL}. \tag{1.36}$$

Comme nous pouvions nous y attendre, la partie linéaire nous livre deux contributions à la polarisation, qui oscillent aux pulsations ω_1 et ω_2 des champs incidents. Quant au terme non linéaire, nous pouvons y appliquer les formules de trigonométrie suivantes :

$$2\cos a\cos b = \cos(a+b) + \cos(a-b), \tag{1.37}$$

$$1 + \cos 2x = 2\cos^2 x\,. \tag{1.38}$$

Nous obtenons alors :

$$\begin{aligned} P_{NLx} =& \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}\frac{E_{1z}^2}{2} + \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}\frac{E_{2z}^2}{2} \\ &+ \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}\frac{E_{1z}^2}{2}\cos(2\omega_1 t) + \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}\frac{E_{2z}^2}{2}\cos(2\omega_2 t) \\ &+ \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_{1z}E_{2z}\cos\left[(\omega_1+\omega_2)t\right] \\ &+ \varepsilon_0\chi^{(2)}_{xzz}E_{1z}E_{2z}\cos\left[(\omega_1-\omega_2)t\right]. \end{aligned} \tag{1.39}$$

La réponse en termes de polarisation de la susceptibilité du second ordre face à deux champs électriques extérieurs de pulsations ω_1 et ω_2 contient donc quatre familles de termes (voir figure 1.2) :

– Deux termes à pulsation nulle associés à la *rectification optique*.
– Un terme à la pulsation $2\omega_1$ et un terme à la pulsation $2\omega_2$ qui représentent la *génération du second harmonique* pour chacune des fréquences excitatrices.
– Un terme à la pulsation $[\omega_1+\omega_2]$ qui constitue la *génération de fréquence-somme* (SFG).
– Un terme à la pulsation $[\omega_1-\omega_2]$ qui constitue la *génération de fréquence-différence* (DFG).

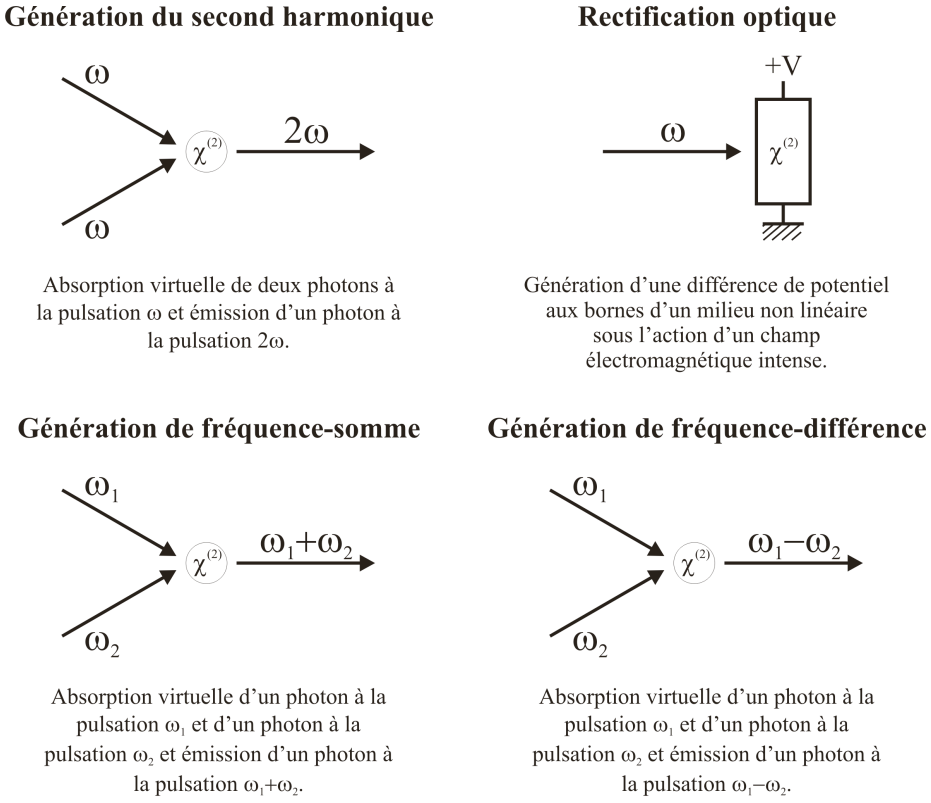


FIGURE 1.2 – *Les principaux phénomènes optiques du second ordre.*

Comme nous pouvons nous en rendre compte, même en se limitant au second ordre, l'optique non linéaire permet de manipuler à volonté la fréquence de la lumière. Le chapitre suivant présente les principales spectroscopies optiques du second ordre qui relèvent des phénomènes physiques présentés ci-dessus.

1.4 Origine de la non-linéarité

A ce stade de nos développements, il semble important de préciser les origines physiques de la non-linéarité. L'objectif de ce paragraphe est de comprendre clairement d'où proviennent les phénomènes non linéaires en optique, c'est pourquoi celui-ci se veut qualitatif. Une description quantitative reprenant la résolution in extenso des équations peut se trouver ailleurs [8].

En réalité, la non-linéarité apparaît dans le modèle élémentaire de « l'électron élastiquement lié » qui est utilisé pour prédire la réponse électronique par rapport à un champ électrique excitateur. En effet, un matériau peut être essentiellement considéré comme un ensemble de particules chargées. Soumises à un champ électrique, les charges tendent à se déplacer. Dans le cas d'un conducteur, les électrons peuvent se déplacer à travers le matériau, donnant lieu à un courant électrique. Dans le cas d'un diélectrique, d'usage beaucoup plus courant en optique, les particules chargées sont fortement liées les unes aux autres. Les charges ont alors un mouvement transitoire et s'éloignent légèrement de leur position d'équilibre. Ce sont ces petits déplacements élémentaires qui se traduisent par l'apparition du moment dipolaire induit dont nous avons parlé précédemment. En outre, en raison du fait que les ions positifs ont souvent une masse considérablement supérieure à celle des électrons, il est possible de considérer en bonne approximation que seuls ces derniers sont animés d'un mouvement. Une telle situation peut être décrite à l'aide d'un modèle simple où l'électron de masse m et de charge $-e$ est lié au noyau par l'intermédiaire d'un ressort. Nous considérons alors les atomes comme un ensemble d'oscillateurs harmoniques amortis, avec une constante d'amortissement γ et une pulsation résonante $\omega_0 = \sqrt{k/m}$. En présence d'un champ électrique extérieur, l'équation du mouvement d'un électron s'écrit comme le prédit Newton :

$$m\frac{d^2x}{dt^2} = -\gamma m\frac{dx}{dt} - kx - eE(t), \tag{1.40}$$

où nous reconnaissons dans le membre de droite, le terme d'amortissement, la force de rappel et la force excitatrice. En résolvant cette équation par l'utilisation de champs monochromatiques de type $E_0e^{-i\omega t}$, nous pouvons déduire l'expression du moment dipolaire de l'atome et de là, sa polarisabilité. Ceci nous amène finalement à l'expression de la susceptibilité et de la polarisation d'ordre un en multipliant par le nombre d'électrons par unité de volume. Dans un tel cas de figure, nous comprenons que cette polarisation ne peut qu'évoluer linéairement par rapport au champ électrique extérieur puisque l'amplitude d'oscillation des électrons est proportionnelle au champ.

En physique, la dépendance linéaire d'une quantité en fonction d'une autre est presque toujours une approximation, valable uniquement à l'intérieur d'un domaine particulier de l'espace des paramètres. Dans le cas

présent, l'amplitude du mouvement des électrons au sein du matériau ne peut être considérée comme linéaire par rapport au champ électrique qu'à la limite où leur déplacement est petit. Pour des écarts plus importants par rapport à l'équilibre, la force de rappel devient significativement non linéaire en x de manière à contenir le mouvement des électrons au voisinage du noyau. Ceci arrive lorsque le champ électrique excitateur devient trop intense. Les électrons n'évoluent donc plus dans un potentiel harmonique et il faut introduire des termes supplémentaires dans l'expression de la force de rappel. Nous nous trouvons alors dans le cadre de l'oscillateur anharmonique amorti et l'équation précédente s'écrit alors, en nous limitant à l'ordre deux :

$$m\frac{d^2x}{dt^2} = -\gamma m\frac{dx}{dt} - kx - \alpha x^2 - eE(t), \tag{1.41}$$

où $-\alpha x^2$ est le terme qui introduit le potentiel anharmonique. Lorsque les termes non harmoniques sont pris en compte, il n'existe plus de solution générale à notre équation. Toutefois, dans la limite où ces termes sont suffisamment petits devant la composante harmonique, il est possible de procéder à une résolution par perturbations en effectuant un développement de la solution x en puissance de l'amplitude du champ électrique. Ceci conduit à l'expression de la polarisation du milieu admettant également un développement en puissance de E, comme elle est présentée à l'équation 1.13 et qui fait apparaître la susceptibilité du second ordre. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est cette dernière qui est responsable des phénomènes non linéaires dont il est question dans ce travail.

Ces précisions nous mènent à constater que, aux énergies qui nous occupent, la non-linéarité n'est pas intrinsèque à un champ électrique trop intense comme cela est parfois mal compris. En réalité, elle trouve ses origines au cœur même de la réponse du matériau. C'est donc la matière au sens strict qui donne naissance aux phénomènes non linéaires présentés précédemment.

Pour terminer ce paragraphe, notons que le modèle de l'oscillateur anharmonique développé ici présente des limites. Ainsi, nous avons uniquement considéré le cas où la fréquence optique était proche du domaine visible, de sorte que le mouvement des électrons était la composante dominante de la réponse du milieu. Aux fréquences infrarouges, le mouvement des ions devient plus important et peut également jouer un rôle dans la réponse non linéaire du milieu.

Chapitre 2

Spectroscopies optiques non linéaires

2.1 Introduction

Après Franken en 1961 et la découverte expérimentale du deuxième phénomène optique du second ordre, la SFG, par Bass *et al.* en 1962 [11], quelques travaux mirent au point la spectroscopie SHG [12] mais il fallut attendre la fin des années 1980 pour assister au développement des spectroscopies optiques non linéaires.

En 1987, Y. R. Shen fut le premier à mettre en évidence la *spectroscopie par génération de fréquence-somme* sur des monocouches auto-assemblées [13] [14]. En effet, de par leur nature non linéaire de second ordre, les spectroscopies SHG, SFG et DFG sont des phénomènes fortement spécifiques aux surfaces et elles peuvent être utilisées pour caractériser tout type d'interface entre deux milieux centrosymétriques en volume qu'ils soient liquides, gazeux ou solides. Mais là où la spectroscopie de génération du second harmonique fournit des informations sur les propriétés électroniques ou l'anisotropie des matériaux, la SFG et la DFG peuvent révéler la signature vibrationnelle d'un adsorbat. Ces deux dernières apportent essentiellement la même information physique. Cependant, la DFG reste moins aisée à mettre en œuvre expérimentalement ; c'est pourquoi la littérature est beaucoup plus riche à propos de la SFG.

Plus récemment, une nouvelle application de la spectroscopie SFG est apparue, la *SFG deux couleurs* ou *doublement résonante*. Celle-ci permet de mettre en évidence non seulement les propriétés vibrationnelles mais également les propriétés électroniques et les couplages vibroniques des interfaces étudiées. Dans le cadre de ce travail, nous avons exclusivement utilisé la spectroscopie SFG simplement résonante. Les pages qui suivent vont dès lors détailler les fondements théoriques relatifs à la génération de fréquence-somme à l'interface entre deux milieux ainsi que la modélisation de cette

même interface procurée par cette spectroscopie. Les développements que nous présentons s'inspirent de différents ouvrages que nous ne saurions que trop conseiller au lecteur intéressé [15][16][17][18][19][20].

2.2 Propagation des ondes électromagnétiques à l'interface

Comme nous l'avons déjà mentionné, il est possible d'évaluer la réponse d'un milieu à une excitation d'origine électromagnétique. Cette réponse, la polarisation, constitue une source qui, à son tour, va rayonner un champ électromagnétique. L'équation d'onde, qui régit la propagation de tous ces champs dans un milieu, peut être établie à partir des équations de Maxwell qui gouvernent tous les phénomènes électromagnétiques. Ces dernières s'écrivent dans le système MKS :

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \tag{2.1}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J}, \tag{2.2}$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho, \tag{2.3}$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0, \tag{2.4}$$

où $\vec{J}(r,t)$ et $\rho(r,t)$ représentent les densités de courant et de charge ; $\vec{E}(r,t)$, le champ électrique ; $\vec{D}(r,t)$, le champ de déplacement électrique ; $\vec{B}(r,t)$, le champ d'induction magnétique et $\vec{H}(r,t)$, le champ magnétique. Ces grandeurs sont reliées entre elles par les produits de convolution suivants :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \overleftrightarrow{\varepsilon_r} \vec{E}, \tag{2.5}$$

$$\vec{B} = \mu_0 \overleftrightarrow{\mu_r} \vec{H}, \tag{2.6}$$

où ε_0 et μ_0 sont respectivement la permittivité et la perméabilité magnétique du vide. Celles-ci sont des grandeurs scalaires, par opposition à $\overleftrightarrow{\varepsilon_r}$ et $\overleftrightarrow{\mu_r}$, la permittivité et la perméabilité magnétique du milieu, qui sont des grandeurs tensorielles dépendantes de la fréquence des champs excitateurs.

Pour simplifier, nous optons pour l'hypothèse d'un milieu non magnétique pour lequel $\mu_r = 1$ et dépourvu de densité nette de charge et de densité de courant. Nous avons alors :

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \tag{2.7}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}, \tag{2.8}$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = 0, \tag{2.9}$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0. \tag{2.10}$$

En prenant le rotationnel de l'équation 2.7, nous avons :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = \vec{\nabla} \times \left(-\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) = -\frac{\partial (\vec{\nabla} \times \vec{B})}{\partial t}. \tag{2.11}$$

En y injectant l'équation 2.8 :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{D}}{\partial t^2}. \tag{2.12}$$

D'autre part, la relation de constitution, précédemment définie, est :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P}\,. \tag{2.13}$$

Nous obtenons alors :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) + \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2}. \tag{2.14}$$

Sachant que :

$$\varepsilon_0 \mu_0 = \frac{1}{c^2}\,, \tag{2.15}$$

nous avons finalement :

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2}, \tag{2.16}$$

qui est l'équation de propagation pour le champ électrique. Dans cette équation, nous remarquons que le membre de droite est relatif à la réponse du milieu par rapport au champ électrique. En annulant ce second membre, nous retombons bien sur l'équation de Helmholtz qui prédit l'existence d'ondes électromagnétiques dans le vide à savoir un milieu de réponse nulle. Comme pour l'équation de Helmholtz, nous pouvons résoudre cette équation différentielle en supposant que le champ électrique prend la forme d'une superposition d'ondes (planes) monochromatiques :

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \sum_{j=1}^{N} \vec{E}_j(\vec{r}, \omega_j) e^{-i\omega_j t}, \tag{2.17}$$

où la somme s'étend non seulement aux ondes incidentes mais également à l'ensemble des ondes générées dans le milieu par la polarisation.

Comme nous l'avons vu précédemment, la polarisation induite dans le milieu contient une partie linéaire et une partie non linéaire :

$$\vec{P} = \vec{P}_L + \vec{P}_{NL}. \tag{2.18}$$

De manière similaire au champ électrique, cette polarisation peut se représenter comme une somme d'ondes (planes) monochromatiques :

$$\vec{P}_L(\vec{r},t) = \sum_{j=1}^{N} \vec{P}_j^{(1)}(\vec{r},\omega_j)e^{-i\omega_j t} = \varepsilon_0 \sum_{j=1}^{N} \overleftrightarrow{\chi}^{(1)}(\omega_j)\vec{E}_j(\vec{r},\omega_j)e^{-i\omega_j t}, \tag{2.19}$$

$$\vec{P}_{NL}(\vec{r},t) = \sum_{n>1} \vec{P}^{(n)}(\vec{r},t) = \sum_{j'=1}^{N'} \vec{P}_{j'}^{NL}(\vec{r},\omega_{j'})e^{-i\omega_{j'} t}. \tag{2.20}$$

Sachant cela, l'équation de propagation du champ devient :

$$\sum_{j=1}^{N} \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}_j) - \frac{\omega_j^2}{c^2}\vec{E}_j - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\omega_j^2 \vec{P}_j^{(1)} - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\omega_j^2 \vec{P}_j^{NL} \right] e^{-i\omega_j t} = 0, \tag{2.21}$$

avec $\vec{E}_j = \vec{E}_j(\vec{r},\omega_j)$ et $\vec{P}_j = \vec{P}_j(\vec{r},\omega_j)$. Et donc :

$$\sum_{j=1}^{N} \left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}_j) - \frac{\omega_j^2}{c^2}\left[1 + \overleftrightarrow{\chi}^{(1)}(\omega_j)\right]\vec{E}_j - \frac{1}{\varepsilon_0 c^2}\omega_j^2 \vec{P}_j^{NL} \right] e^{-i\omega_j t} = 0. \tag{2.22}$$

Cette équation doit être valable $\forall t$ et donc chacun des termes de la somme doit être nul quel que soit ω. En nous rappelant la définition de μ_0 (2.15) et de $\overleftrightarrow{\varepsilon}_r$ (1.3), nous obtenons alors une équation pour chaque fréquence présente dans le milieu :

$$\left[\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times) - \frac{\omega^2}{c^2}\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega) \right] \vec{E}(\vec{r},\omega) = \mu_0 \omega^2 \vec{P}_{NL}(\vec{r},\omega). \tag{2.23}$$

2.2.1 Equation de propagation appliquée à la SFG

Examinons maintenant le cas de la génération de fréquence-somme et appliquons-lui l'équation de propagation que nous venons d'établir. Pour ce faire, considérons l'interface entre deux milieux semi-infinis ayant pour équation $y = 0$. Le premier, d'indice n_1 est un milieu linéaire et le second, d'indice n_2, un milieu non linéaire. Par milieu linéaire, nous entendons un milieu centrosymétrique dans lequel la susceptibilité d'ordre deux est nulle. Par opposition, un milieu non linéaire est un milieu dans lequel peuvent prendre place des phénomènes optiques non linéaires du second ordre. Considérons également deux ondes planes électromagnétiques, incidentes et monochromatiques se propageant à travers l'interface dans le même plan d'incidence. Le problème est de caractériser les champs électriques générés à la fréquence-somme, tant pour les ondes transmises (k_1^T, k_2^T, k_3^T) que réfléchies (k_3^R), tout cela en partant des ondes incidentes connues (k_1^I, k_2^I), (Fig. 2.1).

Il y a donc trois ondes de pulsations différentes qui parcourent le milieu : ω_1, ω_2 et $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ et chacune doit vérifier l'équation 2.23. Nous obtenons alors trois équations couplées par l'intermédiaire de la polarisation

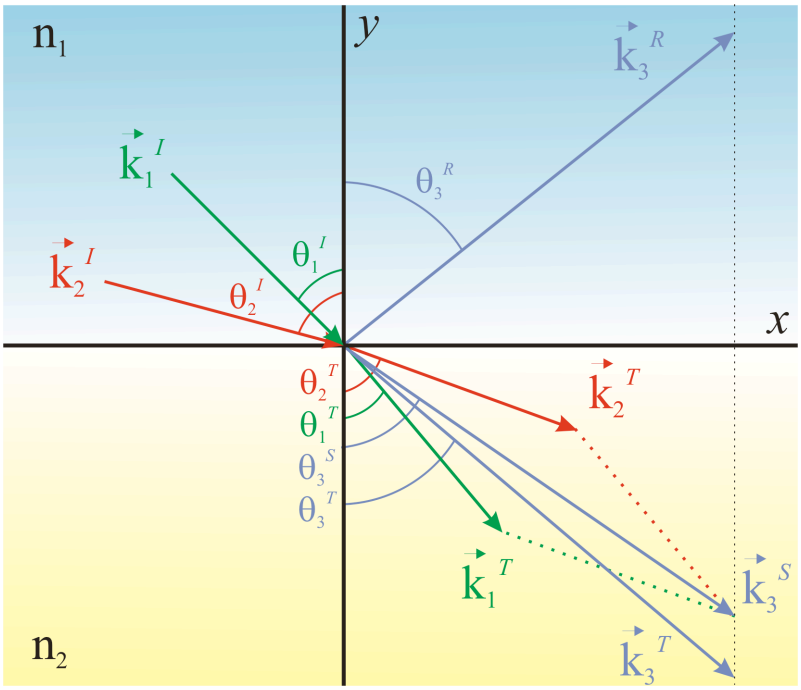


FIGURE 2.1 – *Les différents vecteurs d'onde impliqués dans la génération de fréquence-somme dans un milieu non linéaire semi-infini limité par le plan d'équation* $y = 0$.

non linéaire. La différence par rapport au cas linéaire vient du fait que ce couplage peut mener à des échanges d'énergie entre ces trois ondes :

$$\begin{cases} \left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_1^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_1)\right]\vec{E}_1(\omega_1) = \mu_0\omega_1^2\vec{P}^{(2)}(\omega_1) \\ \left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_2^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_2)\right]\vec{E}_2(\omega_2) = \mu_0\omega_2^2\vec{P}^{(2)}(\omega_2) \\ \left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_3^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_3)\right]\vec{E}_3(\omega_3) = \mu_0\omega_3^2\vec{P}^{(2)}(\omega_3) \end{cases} . \tag{2.24}$$

2.2.2 Intensité du faisceau SFG réfléchi

La résolution de ce système d'équations n'est pas chose aisée et nécessite d'utiliser des approximations. En effet, il peut s'écrire de manière équivalente en nous souvenant de l'expression de la polarisation d'ordre deux établie à l'équation 1.13 avec toujours $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$:

$$\begin{cases} \left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_1^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_1)\right]\vec{E}_1(\omega_1) = \mu_0\varepsilon_0\omega_1^2\overleftrightarrow{\chi}^{(2)}(-\omega_1;-\omega_2,\omega_3)\vec{E}_2^*\vec{E}_3 \\ \left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_2^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_2)\right]\vec{E}_2(\omega_2) = \mu_0\varepsilon_0\omega_2^2\overleftrightarrow{\chi}^{(2)}(-\omega_2;-\omega_1,\omega_3)\vec{E}_1^*\vec{E}_3 \\ \left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_3^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_3)\right]\vec{E}_3(\omega_3) = \mu_0\varepsilon_0\omega_3^2\overleftrightarrow{\chi}^{(2)}(-\omega_3;\omega_1,\omega_2)\vec{E}_1\vec{E}_2 \end{cases} . \tag{2.25}$$

Sous cette formulation, nous pouvons facilement nous rendre compte que la troisième équation est la seule que nous avons à considérer pour les effets non linéaires. En effet, l'intensité du faisceau SFG est négligeable par rapport à l'intensité des faisceaux incidents. Or, ces deux derniers n'interviennent ensemble que dans la dernière équation, associée à l'onde de pulsation ω_3. Nous négligeons donc les polarisations non linéaires générées par chacune des ondes incidentes avec le faisceau SFG. Il nous reste donc à résoudre l'équation :

$$\left[\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) - \frac{\omega_3^2}{c^2}\,\overleftrightarrow{\varepsilon}_r(\omega_3)\right]\vec{E}_3(\omega_3) = \mu_0\varepsilon_0\omega_3^2\overrightarrow{\overrightarrow{\chi}}^{(2)}(-\omega_3;\omega_1,\omega_2)\vec{E}_1\vec{E}_2. \quad (2.26)$$

Cette équation différentielle inhomogène exprime le champ électrique total dans le milieu non linéaire. Sa solution générale est la somme d'une solution particulière de celle-ci (tenant compte du terme de source) et de la solution générale de l'équation différentielle homogène qui lui est associée (obtenue en annulant la polarisation non linéaire). La solution particulière est une onde plane de vecteur d'onde k_3^S, de pulsation ω_3 et de polarisation définies en fonction de la source non linéaire. Elle constitue la contribution de la polarisation au champ électrique et donc, l'origine physique des ondes oscillant à la fréquence-somme. La solution générale de l'équation rendue homogène est, quant à elle, une onde plane de vecteur d'onde k_3^T se propageant dans le milieu non linéaire. Les conditions de raccord des champs à l'interface imposent en outre l'existence d'un champ électrique de pulsation ω_3 dans le milieu d'incidence. Dans ce milieu linéaire, le champ électrique obéit également à l'équation homogène associée à l'équation 2.26, dont la solution est alors une onde plane de vecteur d'onde k_3^R et de pulsation ω_3. Ces deux solutions homogènes (de vecteurs d'onde k_3^T et k_3^R) se comportent comme les ondes réfléchies et réfractées que nous pourrions observer en envoyant sur l'interface un hypothétique faisceau incident de vecteur d'onde k_3^I et de pulsation ω_3 pour lequel nous ne considérerions que les effets linéaires. Ceci nous permet d'expliciter quelque peu la figure 2.1. En effet, étant donné qu'elles respectent les lois de la réflexion et de la réfraction, les ondes incidentes (I) sont en partie réfléchies et en partie transmises. De ces dernières est alors générée la polarisation non linéaire de vecteur d'onde k_3^S qui donne lieu aux ondes qui oscillent à la pulsation ω_3. Celle-ci permet l'apparition de deux ondes à la fréquence-somme dont la première est transmise (T) et la seconde réfléchie (R).

Cette équation peut être solutionnée en nous souvenant que $\vec{\nabla}\times(\vec{\nabla}\times) = \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\cdot) - \vec{\nabla}^2$ et en utilisant les propriétés relatives à l'utilisation de champs électriques sous forme d'ondes planes. Sa résolution complète nous amène à l'expression de $\vec{E}_3$ qui nous donne accès à l'intensité du faisceau SFG puisqu'en toute généralité nous avons :

$$I_{SFG} = \left|\vec{E}_3(\omega_3)\right|^2. \quad (2.27)$$

De cette expression du champ électrique, nous obtenons alors, sans entrer dans les détails, les contributions principales à considérer dans le calcul de l'intensité SFG. Il s'agit bien sûr, de la fréquence SFG et de la susceptibilité du second ordre mais aussi de ce que nous appellerons les facteurs de Fresnel (notés F). Ceux-ci définissent l'intensité du champ électrique total à l'interface engendré par un champ électrique incident. Ils dépendent principalement de la composante normale à l'interface des vecteurs d'onde associés à chaque champ électrique présent et de la constante diélectrique du milieu incident.

Nous obtenons finalement une expression complète de l'intensité du faisceau qui nous intéresse le plus, le faisceau SFG réfléchi. Cette expression vaut pour un film infiniment mince et pour une seule composante active de $\chi^{(2)}$. Elle tient compte, non seulement, des contributions mentionnées ci-dessus, mais également de l'intensité des faisceaux incidents, le visible et l'infrarouge :

$$I^R_{SFG} = \frac{\omega^2_{SFG}}{c^2} \left| \frac{F_{\omega_{SFG}} F_{\omega_{IR}} F_{\omega_{vis}}}{2\sqrt{\varepsilon^R_3} \cos\theta^R_3} \right|^2 \left| \chi^{(2)}(-\omega_{SFG}; \omega_{IR}, \omega_{vis}) \right|^2 I(\omega_{IR}) I(\omega_{vis}). \tag{2.28}$$

Un élément remarquable de cette expression est bien entendu sa dépendance en $\chi^{(2)}$. En effet, nous verrons par la suite que, sous certaines conditions, cette quantité se trouve grandement modifiée lorsque la fréquence du faisceau infrarouge correspond à une vibration du milieu considéré. Étant donné que les autres contributions varient peu avec la fréquence infrarouge, nous comprenons déjà que la représentation de l'intensité SFG en fonction de la longueur d'onde IR fournira une image de la susceptibilité du second ordre.

2.2.3 Direction du faisceau SFG réfléchi

Dans ce processus du second ordre, nous avons donc deux champs électriques incidents qui vont générer une polarisation non linéaire dans le milieu. Cette polarisation va créer un champ à la fréquence-somme de vecteur d'onde k^S_3. En toute généralité, k^S_3 et k^T_3 sont différents mais pour que le phénomène reste efficace au cours de la propagation dans le matériau, il doit vérifier l'*accord de phase*. Ce dernier peut être accompli sous certaines conditions (notamment en utilisant des cristaux biréfringents) et s'exprime alors :

$$k^S_3 = k^T_3. \tag{2.29}$$

Cette relation s'assortit également de deux autres équations qui sont fondamentales dans toute la physique, à savoir la *conservation de la quantité de mouvement* et la *conservation de l'énergie* :

$$\hbar\vec{k}^S_3 = \hbar\vec{k}^T_1 + \hbar\vec{k}^T_2, \tag{2.30}$$

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2. \tag{2.31}$$

Grâce à ces trois équations et en gardant à l'esprit les conditions de raccord à l'interface, nous pouvons aisément trouver la direction de propagation du faisceau SFG réfléchi.

En effet, la relation de conservation de la quantité de mouvement étant une relation vectorielle, elle vaut également selon chacune de ses composantes scalaires, ce qui signifie que les composantes des vecteurs d'onde parallèles à la surface (selon x) doivent être égales. Nous avons alors :

$$\hbar k_{3x}^S = \hbar k_{1x}^T + \hbar k_{2x}^T. \tag{2.32}$$

En nous servant des conditions de raccord à l'interface, nous pouvons écrire :

$$\hbar k_{3x}^S = \hbar k_{3x}^T = \hbar k_{3x}^R = \hbar k_{1x}^T + \hbar k_{2x}^T = \hbar k_{1x}^I + \hbar k_{2x}^I. \tag{2.33}$$

En développant les composantes selon x comme étant la norme du vecteur projetée sur l'axe, nous avons :

$$k_3^T \sin\theta_3^T = k_3^R \sin\theta_3^R = k_1^T \sin\theta_1^T + k_2^T \sin\theta_2^T = k_1^I \sin\theta_1^I + k_2^I \sin\theta_2^I. \tag{2.34}$$

Nous obtenons alors (en éliminant les termes en k_1^T et k_2^T) :

$$\frac{\omega_3}{c}\sqrt{\varepsilon_3^T}\sin\theta_3^T = \frac{\omega_3}{c}\sqrt{\varepsilon_3^R}\sin\theta_3^R = \frac{\omega_1}{c}\sqrt{\varepsilon_1^I}\sin\theta_1^I + \frac{\omega_2}{c}\sqrt{\varepsilon_2^I}\sin\theta_2^I, \tag{2.35}$$

où nous avons utilisé la relation de dispersion des ondes planes :

$$\omega = \frac{c}{\sqrt{\varepsilon}}k \;\Rightarrow\; k = \frac{\omega}{c}\sqrt{\varepsilon}. \tag{2.36}$$

Après simplifications, nous obtenons un système de deux équations :

$$\omega_3\sqrt{\varepsilon_3^R}\sin\theta_3^R = \omega_1\sqrt{\varepsilon_1^I}\sin\theta_1^I + \omega_2\sqrt{\varepsilon_2^I}\sin\theta_2^I, \tag{2.37}$$

$$\omega_3\sqrt{\varepsilon_3^T}\sin\theta_3^T = \omega_3\sqrt{\varepsilon_3^R}\sin\theta_3^R. \tag{2.38}$$

La première peut encore se simplifier étant donné que les trois ondes considérées se propagent dans le même milieu non dispersif et nous obtenons alors pour nos deux équations :

$$\omega_3\sin\theta_3^R = \omega_1\sin\theta_1^I + \omega_2\sin\theta_2^I, \tag{2.39}$$

$$\omega_3\sqrt{\varepsilon_3^T}\sin\theta_3^T = \omega_3\sqrt{\varepsilon_3^R}\sin\theta_3^R. \tag{2.40}$$

La première, couplée à l'équation de conservation de l'énergie, nous permet de déterminer facilement la direction de propagation du faisceau SFG réfléchi en se basant sur notre configuration expérimentale connue, à savoir les fréquences et les angles des faisceaux incidents. Quant à la seconde, elle n'est autre que la loi de la réfraction pour l'onde SFG.

2.3 Modélisation des interfaces en spectroscopie SFG

Dans cette section, nous allons développer plus en détail la modélisation théorique d'un adsorbat moléculaire déposé sur une surface en spectroscopie SFG. En effet, si nous en croyons l'équation 2.28, il nous suffit de montrer que la susceptibilité du second ordre de l'adsorbat rend compte de sa nature vibrationnelle pour confirmer que la SFG peut s'utiliser comme une spectroscopie (vibrationnelle en l'occurrence) au sens strict du terme.

Dans un premier temps, nous considérerons que la contribution du substrat à la réponse non linéaire globale est négligeable. Ceci n'est pas systématique, en particulier lors de l'utilisation de substrats métalliques ainsi qu'il en sera fait mention ultérieurement. Notons également que nous ne parlerons pas ici d'effets doublement résonants qui mettent en jeu des transitions électroniques en plus des transitions vibrationnelles. Le lecteur intéressé peut en trouver une description complète ailleurs [20].

La susceptibilité du second ordre, $\chi^{(2)}$, d'un ensemble de molécules identiques peut être décrite de manière rigoureuse à l'aide du formalisme statistique de la matrice densité issu de la mécanique quantique, auquel nous appliquons la méthode des perturbations. Considérons maintenant que chaque molécule est caractérisée par différents niveaux réels l d'énergie $\hbar\omega_{lo}$, qui peuvent donc être excités à partir du niveau fondamental o par les pulsations ω_{lo}. Une transition d'énergie $\hbar\omega_{nm}$ d'un niveau m à un niveau n est alors caractérisée par la pulsation $\omega_{nm} = \omega_{no} - \omega_{mo}$ et la largeur à mi-hauteur Γ_{nm}. A l'équilibre thermique, les populations stationnaires des différents niveaux sont incohérentes et, selon la description de Boyd [9] et de Shen [15] de l'état stationnaire, nous pouvons écrire dans ces conditions :

$$\begin{aligned}\chi^{(2)}_{ijk} =& \frac{N}{\varepsilon^0\hbar^2}\sum_{lmn}\rho^{(0)}_{ll}\Bigg[\\ &\frac{1}{\omega_{ml}-\omega_{SFG}-i\Gamma_{ml}}\left(\frac{\mu^i_{lm}\mu^j_{mn}\mu^k_{nl}}{\omega_{nl}-\omega_{IR}-i\Gamma_{nl}}+\frac{\mu^i_{lm}\mu^k_{mn}\mu^j_{nl}}{\omega_{nl}-\omega_{vis}-i\Gamma_{nl}}\right) \\ +&\frac{1}{\omega_{nm}-\omega_{SFG}-i\Gamma_{nm}}\left(\frac{\mu^k_{lm}\mu^i_{mn}\mu^j_{nl}}{\omega_{ml}+\omega_{IR}+i\Gamma_{ml}}+\frac{\mu^j_{lm}\mu^i_{mn}\mu^k_{nl}}{\omega_{ml}+\omega_{vis}+i\Gamma_{ml}}\right) \\ +&\frac{1}{\omega_{mn}+\omega_{SFG}+i\Gamma_{mn}}\left(\frac{\mu^j_{lm}\mu^i_{mn}\mu^k_{nl}}{\omega_{nl}-\omega_{IR}-i\Gamma_{nl}}+\frac{\mu^k_{lm}\mu^i_{mn}\mu^j_{nl}}{\omega_{nl}-\omega_{vis}-i\Gamma_{nl}}\right) \\ +&\frac{1}{\omega_{nl}+\omega_{SFG}+i\Gamma_{nl}}\left(\frac{\mu^k_{lm}\mu^j_{mn}\mu^i_{nl}}{\omega_{ml}+\omega_{IR}+i\Gamma_{ml}}+\frac{\mu^j_{lm}\mu^k_{mn}\mu^i_{nl}}{\omega_{ml}+\omega_{vis}+i\Gamma_{ml}}\right)\Bigg],\end{aligned} \tag{2.41}$$

où ω_{SFG} est la pulsation SFG ; ω_{vis}, celle du faisceau visible ; ω_{IR}, celle du faisceau infrarouge et N, le nombre de molécules par unité de volume.

$\rho_{ll}^{(0)}$ est la population moyenne d'équilibre thermique (non perturbée) du niveau énergétique l de l'adsorbat. Les μ_{mn}^{i} sont les projections sur x, y ou z des éléments de matrice de transition dipolaire entre les niveaux m et n, dans l'expression du hamiltonien d'interaction d'une molécule avec un champ électrique. Les dénominateurs qui dépendent des pulsations visible et infrarouge apparaissent dès le premier ordre de la perturbation de la matrice densité tandis que ceux fonction de la pulsation SFG ne surviennent qu'à partir du second ordre de perturbation. Après distribution, l'équation devient :

$$\chi_{ijk}^{(2)} = \frac{N}{\varepsilon^0 \hbar^2} \sum_{lmn} \rho_{ll}^{(0)} \Bigg[\frac{\mu_{lm}^{i}\mu_{mn}^{j}\mu_{nl}^{k}}{(\omega_{ml} - \omega_{SFG} - i\Gamma_{ml})(\omega_{nl} - \omega_{IR} - i\Gamma_{nl})} \tag{2.42}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{i}\mu_{mn}^{k}\mu_{nl}^{j}}{(\omega_{ml} - \omega_{SFG} - i\Gamma_{ml})(\omega_{nl} - \omega_{vis} - i\Gamma_{nl})} \tag{2.43}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{k}\mu_{mn}^{i}\mu_{nl}^{j}}{(\omega_{nm} - \omega_{SFG} - i\Gamma_{nm})(\omega_{ml} + \omega_{IR} + i\Gamma_{ml})} \tag{2.44}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{j}\mu_{mn}^{i}\mu_{nl}^{k}}{(\omega_{nm} - \omega_{SFG} - i\Gamma_{nm})(\omega_{ml} + \omega_{vis} + i\Gamma_{ml})} \tag{2.45}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{j}\mu_{mn}^{i}\mu_{nl}^{k}}{(\omega_{mn} + \omega_{SFG} + i\Gamma_{mn})(\omega_{nl} - \omega_{IR} - i\Gamma_{nl})} \tag{2.46}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{k}\mu_{mn}^{i}\mu_{nl}^{j}}{(\omega_{mn} + \omega_{SFG} + i\Gamma_{mn})(\omega_{nl} - \omega_{vis} - i\Gamma_{nl})} \tag{2.47}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{k}\mu_{mn}^{j}\mu_{nl}^{i}}{(\omega_{nl} + \omega_{SFG} + i\Gamma_{nl})(\omega_{ml} + \omega_{IR} + i\Gamma_{ml})} \tag{2.48}$$

$$+ \frac{\mu_{lm}^{j}\mu_{mn}^{k}\mu_{nl}^{i}}{(\omega_{nl} + \omega_{SFG} + i\Gamma_{nl})(\omega_{ml} + \omega_{vis} + i\Gamma_{ml})} \Bigg]. \tag{2.49}$$

Dans cette formulation, le lecteur attentif remarquera que les huit termes correspondent à toutes les combinaisons possibles des processus résonants d'absorption (signes négatifs) ou d'émission stimulée (signes positifs) pour le faisceau SFG et l'un des faisceaux de pompe. Nous en déduisons que le processus SFG ne peut pas entrer simultanément en résonance avec les énergies des photons visible et infrarouge.

A basse température et aux intensités de champ électrique ne modifiant pas substantiellement les populations et les cohérences, nous pouvons identifier le niveau l au fondamental o, le seul état occupé ($\rho_{ll}^{(0)} \sim \delta_{lo}$ et la somme sur l disparaît). Par ailleurs, en spectroscopie SFG classique, seul le laser infrarouge est accordable en fréquence, ce qui nous permet de négliger les termes 2.43, 2.45, 2.47 et 2.49. En effet, ces derniers ne varient que très peu en fonction de la pulsation infrarouge car, en pratique, ils ne peuvent résonner qu'avec des transitions électroniques dans le visible ou l'ultraviolet. Enfin, comme il n'y a que l'état fondamental qui est occupé, les seules ré-

sonances observables en fonction de la pulsation infrarouge sont celles dues aux termes 2.42 et 2.46 qui deviennent donc prépondérants. Nous pouvons dès lors identifier les niveaux n aux états vibrationnels de l'état électronique fondamental de la molécule. Si nous considérons l'excitation résonante d'un niveau vibrationnel unique v par le faisceau infrarouge (la somme sur n disparaît), nous retrouvons alors pour l'expression précédente :

$$\chi^{(2)}_{ijk} = \frac{N\rho^{(0)}_{oo}}{\varepsilon^0\hbar^2} \underbrace{\frac{\mu^k_{vo}}{\omega_{vo} - \omega_{IR} - i\Gamma_{vo}}}_{\star} \underbrace{\sum_m \left[\frac{\mu^i_{om}\mu^j_{mv}}{\omega_{mo} - \omega_{SFG} - i\Gamma_{mo}} - \frac{\mu^j_{om}\mu^i_{mv}}{\omega_{mv} + \omega_{SFG} + i\Gamma_{mv}} \right]}_{\star\star}. \tag{2.50}$$

Dans l'approximation de Born-Oppenheimer et en considérant que les énergies vibrationnelles sont négligeables par rapport aux énergies électroniques ($\omega_{mo} \sim \omega_{mv}$), le terme marqué $\star$ donne la section efficace d'un processus vibrationnel d'absorption d'un photon infrarouge tandis que le facteur marqué $\star\star$ donne la section efficace d'un processus vibrationnel moléculaire de diffusion Raman (anti-Stokes dans ce cas-ci) à deux photons :

$$\chi^{(2)}_{ijk} = \frac{N\rho^{(0)}_{oo}}{\varepsilon^0\hbar^2} \underbrace{\left.\frac{\partial\mu^k_{oo}}{\partial Q_v}\right|_0 \frac{1}{\omega_{vo} - \omega_{IR} - i\Gamma_{vo}}}_{\star} \underbrace{\left.\frac{\partial\alpha^{ij}_{oo}}{\partial Q_v}\right|_0}_{\star\star}. \tag{2.51}$$

Nous pouvons tirer une conclusion importante de cette relation. En effet, les modes vibrationnels ne sont actifs en SFG que si les modes de la molécule sont simultanément actifs en Raman et infrarouge, c'est-à-dire si les dérivées par rapport à la coordonnée normale de vibration du moment dipolaire de la molécule et de sa polarisabilité sont différentes de zéro.

Nous obtenons finalement l'expression de la susceptibilité totale d'ordre deux de l'adsorbat qui, comme nous pouvons le constater, dépend principalement de la fréquence du faisceau infrarouge et des caractéristiques des vibrations moléculaires. La susceptibilité est dès lors le paramètre physique qui recèle toute l'information vibrationnelle apportée par les variations du moment dipolaire moléculaire associée à l'absorption infrarouge et de la polarisabilité moléculaire provoquant la diffusion Raman. Il est donc tout à fait justifié de présenter les spectres expérimentaux en traçant l'intensité SFG en fonction de la longueur d'onde infrarouge comme ce sera le cas dans la suite de ce travail. Sous cette présentation, nous obtenons alors des spectres *vibrationnels* de l'interface étudiée.

Par ailleurs, remarquons qu'une autre manière de décrire la susceptibilité du second ordre est d'exprimer $\chi^{(2)}$, grandeur macroscopique, à partir de

son équivalent microscopique, l'hyperpolarisabilité moléculaire d'ordre deux $\alpha^{(2)}$. Ils sont reliés entre eux par une transformation de coordonnées (notée T), moyennée sur l'orientation des molécules, qui nous permet de passer du repère de la molécule isolée (indices lmn) au repère du laboratoire (indices ijk). De plus, pour obtenir la susceptibilité totale, nous devons multiplier la polarisabilité par la densité de molécules N en considérant que l'élargissement des raies SFG est homogène et que les molécules n'interagissent pas entre elles. Nous obtenons finalement :

$$\chi^{(2)}_{ijk} = N \sum_{lmn} \left\langle T^{lmn}_{ijk} \alpha^{(2)}_{lmn} \right\rangle . \tag{2.52}$$

Chapitre 3

Dispositif expérimental

3.1 Introduction

Comme les chapitres précédents l'ont montré, la spectroscopie SFG nécessite des faisceaux lasers intenses. Dans cette optique, notre laboratoire et plus particulièrement les docteurs A. A. Mani et A. Peremans, ont mis au point un laser de table pulsé « tout solide » dont les spécifications sont parfaitement adaptées aux besoins de la spectroscopie optique non linéaire. Signalons que ce montage a si bien tenu ses promesses qu'il a été récompensé par le *Prix Economique de la Province de Namur 1999* [21]. Ce dispositif nous fournit deux faisceaux lasers pulsés de puissance crête suffisamment intense. Le premier est un faisceau accordable dans le domaine de l'infrarouge sur une gamme spectrale allant de $2,5$ à 10 μm et le second, un faisceau visible également accordable de 410 à 750 nm.

Dans les pages qui suivent, nous nous proposons de décrire succinctement ce dispositif afin de comprendre les conditions et contraintes expérimentales liées à la spectroscopie SFG. Toutefois, une description plus approfondie de ce système peut être trouvée ailleurs [22][23][24][25].

3.2 Le dispositif laser

Le schéma de principe du dispositif laser, tel qu'il est présenté à la figure 3.1, nous indique qu'il est composé de quatre parties principales. Ces différents « étages » sont :

- L'oscillateur (I)
- L'amplificateur (II)
- L'oscillateur paramétrique optique (OPO) infrarouge (III)
- L'OPO visible (IV)

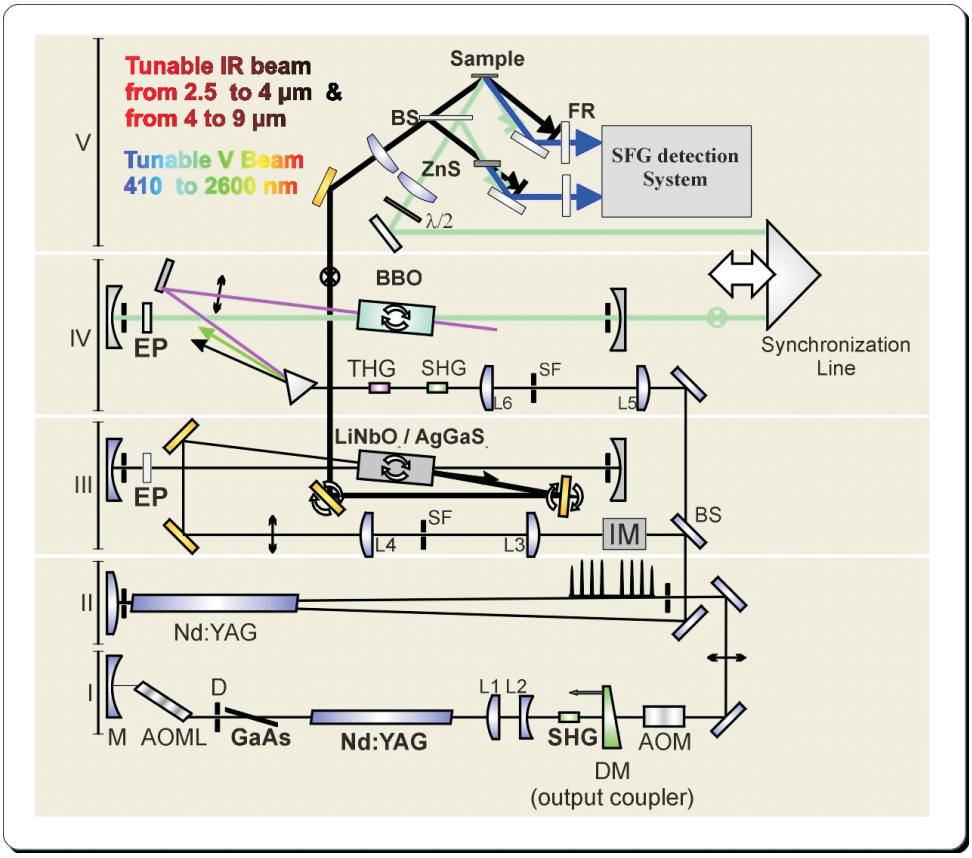


FIGURE 3.1 – *Dispositif laser développé au laboratoire et utilisé pour la spectroscopie SFG.*

3.2.1 L'oscillateur

La première partie est un laser Nd:YAG fonctionnant en mode bloqué. Comme nous le savons, tout laser est composé de trois parties essentielles, à savoir une cavité, un milieu actif et un dispositif de pompage. L'oscillateur reprend en réalité ces éléments constitutifs.

Le milieu actif est un barreau de Nd:YAG (*Quantel*) dont les faces sont inclinées d'un angle de 2° afin d'éviter des oscillations parasites au sein même du milieu actif. Le Néodyme:Yttrium Aluminium Garnet est un grenat artificiel de composition $Y_3Al_5O_{12}$ dopé par des ions néodymes. Environ 1% des ions Y^{3+} sont remplacés par des ions Nd^{3+} qui sont responsables de l'effet laser. Pour obtenir un tel effet, il faut réaliser une inversion de population du milieu optique. Réaliser cette inversion consiste à modifier l'occupation des niveaux énergétiques du milieu : il s'agit de dépeupler l'un

des niveaux énergétiques inférieurs au profit de l'un des niveaux supérieurs jusqu'à ce que la population de ce dernier soit supérieure à celle du premier. L'inversion une fois obtenue, le retour à l'équilibre se produit grâce à des transitions de relaxation radiatives qui, si elles s'effectuent par émission stimulée, peuvent donner lieu à une émission laser.

Le dépeuplement d'un niveau inférieur au profit d'un niveau supérieur peut être obtenu en soumettant le système à un rayonnement lumineux via des lampes à éclairs (taux de répétition de 25 Hz). Ces dernières sont disposées parallèlement au barreau et leur longueur d'onde d'émission est accordée à l'intervalle d'énergie séparant les deux niveaux considérés. Ce rayonnement induit alors des transitions du niveau fondamental vers un niveau supérieur dit de pompage. Un mécanisme qui ne met en œuvre que deux niveaux n'est cependant pas suffisant ; en effet, dans un tel cas, les phénomènes de relaxation empêchent d'atteindre l'inversion de population. En d'autres termes, il est possible de déplacer l'équilibre mais pas de se placer « hors équilibre » au sens de la statistique de Boltzmann. Pour obtenir l'inversion, il faut que le système se comporte de façon « dissymétrique » vis-à-vis des transitions grâce à la présence de niveaux intermédiaires servant de relais. Dans le cas du laser Nd:YAG, le milieu actif (les ions Nd^{3+} dispersés dans la matrice YAG) est un système qui met en jeu quatre niveaux comme le montre la figure 3.2.

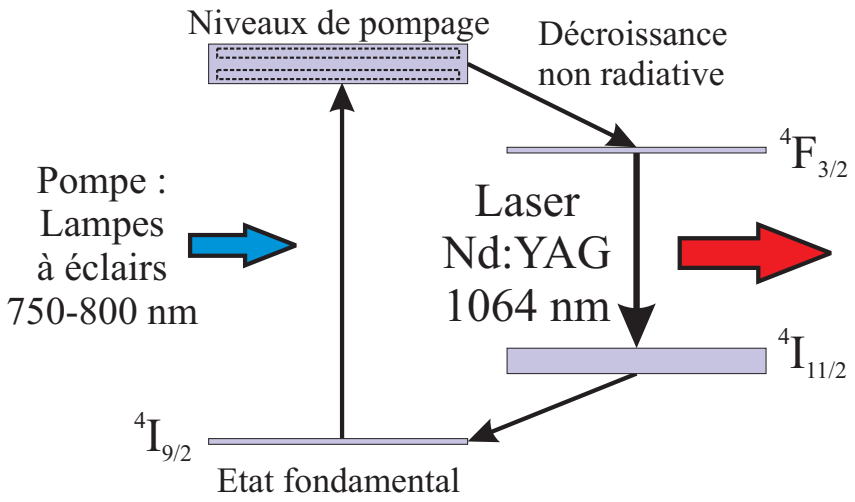


FIGURE 3.2 – *Schéma des niveaux d'énergie du Nd:YAG.*

Le pompage du système est obtenu grâce au rayonnement lumineux des lampes à éclairs qui induit des transitions du niveau fondamental $^4I_{9/2}$ vers le niveau de pompage. En réalité, ce niveau n'est pas discret mais est constitué de plusieurs bandes ; deux parmi les plus importantes peuvent être excitées à partir du niveau fondamental au moyen de longueurs d'onde voisines de

0.80 et 0.75 micromètres. Le pompage du néodyme doit donc être effectué à partir d'une source dont le spectre recouvre ces bandes.

Les atomes excités présents au niveau de pompage relaxent très rapidement vers le niveau ${}^4F_{3/2}$ en cédant leur énergie au réseau cristallin. Cette décroissance transforme une partie de l'énergie de pompe en chaleur, ce qui nécessite un refroidissement des barreaux par circulation d'eau. Ce niveau présentant la particularité d'être métastable, les électrons excités viennent s'y accumuler, réalisant l'inversion de population entre les niveaux ${}^4I_{11/2}$ et ${}^4F_{3/2}$. Elle est évidemment d'autant plus facile à obtenir que l'occupation du niveau ${}^4I_{11/2}$ est faible. En effet, ce dernier est suffisamment éloigné du niveau fondamental pour être pratiquement vide. De surcroît, il s'agit d'un niveau de courte durée de vie. Le passage ${}^4F_{3/2}$ vers ${}^4I_{11/2}$ correspond à la transition laser, qui s'effectue par émission d'un photon à 1064 nm. Le barreau, associé aux lampes, constitue ainsi un amplificateur optique à cette longueur d'onde.

Afin d'obtenir en sortie du laser un faisceau dont les propriétés sont bien définies, il est indispensable d'ajouter à l'amplificateur une rétroaction sélective qui définira les caractéristiques spectrales, directionnelles et spatiales du rayonnement. C'est le rôle de la cavité (résonateur optique) constituée de deux miroirs qui se font face en encadrant le milieu actif. Un tel résonateur agit comme un filtre : seuls les photons dont la direction de propagation est parallèle à l'axe de la cavité résonante et dont la longueur d'onde est accordée à la distance séparant les deux miroirs, seront susceptibles d'osciller et, en conséquence, d'être amplifiés par émission stimulée à chacun de leurs passages dans le milieu actif. En d'autres termes, il existe un nombre déterminé de modes d'oscillation dans la cavité. Cependant, dans le cas du laser Nd:YAG, ces modes sont trop nombreux et nous avons donc recours à un modulateur acousto-optique (AOML) placé dans la cavité. Celui-ci est en fait un cristal piézo-électrique que nous faisons osciller en ajustant sa fréquence, il permet de limiter le nombre de modes possibles dans la cavité. Notons qu'un second modulateur (AOM), qui ne sert qu'à couper le début du train, se situe juste après la cavité.

Pratiquement, la cavité est constituée de deux miroirs adaptés à la longueur d'onde mise en jeu. Compte-tenu des fortes densités spatiales de puissance dans la cavité, ces miroirs sont de type diélectrique pour éviter l'absorption du rayonnement par la couche réfléchissante. Évidemment, il est nécessaire que l'un des miroirs soit partiellement transparent afin que le faisceau laser ainsi créé puisse s'échapper du résonateur.

Comme nous le verrons par après, le faisceau YAG devra parvenir à provoquer des effets non linéaires dans certains cristaux. Pour ce faire, la puissance incidente doit être suffisamment élevée, ce qui peut être obtenu par compression des impulsions laser. La compression temporelle des impulsions consiste à empêcher momentanément l'émission laser, le temps d'accumuler

par pompage optique une énergie maximale dans la cavité, afin de pouvoir ensuite la libérer « en bloc ». C'est également le rôle du modulateur acousto-optique (AOML). Cependant, la compression obtenue n'est pas suffisante et il est nécessaire de raccourcir encore la durée de l'impulsion jusqu'à la dizaine de picosecondes pour augmenter sa puissance crête. La méthode utilisée pour réaliser ceci est la technique dite du *miroir non linéaire*, mise au point par Stankov [26]. Cette procédure est mise en place grâce à un cristal non linéaire (BBO) et un télescope (T) qui, couplés à un miroir dichroïque (DM) en sortie de cavité, permettent de diminuer la largeur temporelle des impulsions laser ainsi que de les stabiliser. Le dernier élément constitutif de la cavité est une lame d'AsGa utilisée comme mécanisme de contre-réaction passive, ce qui permet d'améliorer encore le rendement du miroir non linéaire.

Tout ce dispositif génère un faisceau composé de trains comprenant environ cent impulsions. Chaque train a une durée de l'ordre de la microseconde alors que les impulsions durent environ 10 ps. La puissance moyenne délivrée à la sortie de l'oscillateur est d'une quinzaine de mW.

3.2.2 L'amplificateur

Afin d'obtenir une puissance suffisante pour alimenter les OPO, le faisceau produit par l'oscillateur doit être amplifié. Cette procédure est réalisée en faisant effectuer au faisceau un double passage dans un autre barreau de Nd:YAG de diamètre plus grand et également pompé par lampes à éclairs à des temps bien choisis afin de renforcer celui-ci par des photons supplémentaires. Cet étage amplificateur ne possède pas de cavité et ne peut donc pas être considéré comme un laser à proprement parler. La puissance de sortie de l'amplificateur à 1064 nm est de l'ordre du Watt, ce qui correspond, étant donné les caractéristiques de notre faisceau, à une énergie de 430 μJ par impulsion. En convertissant ceci en puissance, nous voyons aisément que cela suffit pour générer des effets non linéaires, condition indispensable au bon fonctionnement des oscillateurs paramétriques optiques.

Après cette étape, le faisceau pompe est envoyé dans une lame séparatrice 40/60 (BS) qui le divise en deux parties. La première est envoyée dans l'OPO infrarouge et la seconde, après triplage de fréquence, vers l'OPO visible. Avant d'arriver à chacun des OPO, le faisceau subit un filtrage spatial grâce à une mince plaque de cuivre (SF) disposée au foyer d'une lentille. Une seconde lentille dont le foyer coïncide également avec cette plaquette récupère le faisceau, le rendant à nouveau parallèle. Les deux lentilles constituent alors un télescope. Ce filtrage permet d'ajuster le profil spatial de la pompe ce qui optimise la conversion de fréquence des étapes à venir.

3.2.3 L'OPO infrarouge

Les oscillateurs paramétriques optiques (OPO) permettent de générer de la lumière cohérente et accordable sur une grande plage de longueurs d'onde. Ces oscillateurs reposent sur le phénomène appelé amplification paramétrique qui est pratiquement l'inverse de la génération de fréquence-somme. Si on irradie un matériau non centrosymétrique avec un intense rayon lumineux d'une fréquence donnée, ce matériau non linéaire génère alors spontanément deux nouvelles fréquences dont la somme est la première.

Pratiquement, un cristal non linéaire de $LiNbO_3$ ou d'$AgGaS_2$ de susceptibilité non linéaire importante est placé dans une cavité laser entre deux miroirs en or. Il est pompé par le train d'impulsions du YAG. Lors de ce passage à travers le cristal, un photon YAG peut interagir avec un photon issu du bruit quantique et en générer un troisième à la fréquence-différence. Ce phénomène, de par la nature du bruit quantique, se produit avec toutes les fréquences mais seules celles qui satisfont à l'accord de phase au sein du milieu vont pouvoir subsister. Ceci se réalise également dans une direction préférentielle, celle de la cavité. En effet, les photons qui se déplacent selon cet axe privilégié vont passer à nouveau dans le cristal et amplifier le phénomène. Deux faisceaux additionnels sont alors générés : l'*idler* à la pulsation ω_2 et le *signal* à la pulsation ω_3 tels que la somme de leur pulsation est égale à celle du faisceau pompe $\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$. Dans le cas de l'OPO infrarouge monté au laboratoire, c'est l'*idler* accordable en fréquence qui servira pour la spectroscopie SFG.

L'oscillation du faisceau signal dans la cavité optique est maintenue grâce à la technique du pompage synchrone. Celle-ci implique que le cristal soit pompé par un train d'impulsions brèves et que la période séparant les impulsions dans le train corresponde au temps de circulation d'un aller-retour d'une impulsion *signal* dans la cavité OPO. Ce faisceau est ainsi amplifié dans le cristal non linéaire par l'impulsion pompe suivante. Dans notre cas, le faisceau YAG génère un train d'impulsions de 1 μs comprenant une centaine d'impulsions séparées par 10 ns. La condition de pompage synchrone est vérifiée lorsque la longueur optique de la cavité de l'OPO est ajustée à $1,50\ m$.

La fréquence du faisceau signal est par conséquent la fréquence complémentaire du faisceau *idler*. Ces fréquences sont déterminées par les conditions d'accord de phase correspondant à la génération de fréquence-différence dans le cristal. Dans un cristal isotrope, où l'indice de réfraction ne dépend pas de la direction de propagation des faisceaux, il n'est en général pas possible de trouver une solution à l'accord de phase. Par contre, ce dernier peut être vérifié dans les cristaux biréfringents.

Une fois réalisé, le dispositif OPO doit être étalonné afin de déterminer la longueur d'onde du faisceau *idler* émise pour chaque position du cristal

et afin d'obtenir, grâce à des miroirs pivotants, un faisceau dont la direction de propagation ne dépend plus de la position du cristal. L'OPO infrarouge permet un balayage en fréquence du faisceau avec une puissance suffisante de $2,5$ à 4 μm en utilisant le $LiNbO_3$ et de 4 à 9 μm en utilisant l'$AgGaS_2$.

Notons également la présence d'une lame étalon (EP) placée au sein même de la cavité. Son rôle est d'améliorer la résolution spectrale du dispositif ($\sim$ 2 cm^{-1}) en agissant comme un interféromètre de Fabry-Perot. En fonction de son orientation et de celle du cristal non linéaire dans la cavité, elle n'autorise à osciller dans la cavité dans les conditions du pompage synchrone que certaines fréquences du faisceau *signal*.

3.2.4 L'OPO visible

La dernière partie du dispositif est sensiblement semblable à la précédente à une petite différence près : le faisceau récupéré doit être un faisceau visible. Pour y parvenir, il est nécessaire que le faisceau pompe émis par le laser YAG passe d'abord dans deux cristaux non linéaires. Le premier, de type BBO va doubler la fréquence du faisceau par SHG de manière à obtenir un faisceau vert à 532 nm. Le second de type LBO va, quant à lui, permettre le triplage de fréquence en faisant intervenir un phénomène de SFG de volume entre les deux faisceaux colinéaires en présence (à 532 nm et 1064 nm). Nous obtenons alors un faisceau ultraviolet à 355 nm qui va nous servir de pompe pour l'OPO visible.

Une fois ces trois fréquences différentes obtenues, elles sont séparées par un prisme et seul l'UV est conservé. Le dispositif reste le même que précédemment si ce n'est que nous collectons cette fois-ci le *signal* grâce à un miroir semi-transparent en fin de cavité. Nous obtenons finalement un faisceau visible accordable en fréquence permettant un balayage de 410 à 750 nm. Il est à signaler que, puisque l'obtention du faisceau UV nécessite plus d'énergie, la lame séparatrice distribuant le faisceau YAG aux deux OPO le fait dans des proportions différentes ($\sim$ 40/60%).

3.3 Configurations expérimentales

Dans la configuration « classique » utilisée en spectroscopie SFG et présentée à la figure 3.3(a), les deux faisceaux, le visible et l'infrarouge, sont focalisés en un point de l'échantillon sur lequel a été déposé l'adsorbat. Afin d'obtenir un rendement optimal de génération de fréquence-somme, ces deux faisceaux doivent être synchronisés aussi bien spatialement que temporellement. Les angles d'incidence utilisés sont respectivement de 55° pour le faisceau visible et de 65° pour l'infrarouge. Ces derniers sont choisis car ils sont les plus favorables au niveau des facteurs de Fresnel qui interviennent dans la détermination du champ électrique à la fréquence-somme pour les

métaux. Le signal SFG est alors recueilli en réflexion suivant un angle déterminé comme précédemment et traité comme nous le décrivons ci-dessous. Sauf mention contraire, tous les faisceaux sont polarisés p et la longueur d'onde visible utilisée est 532 nm.

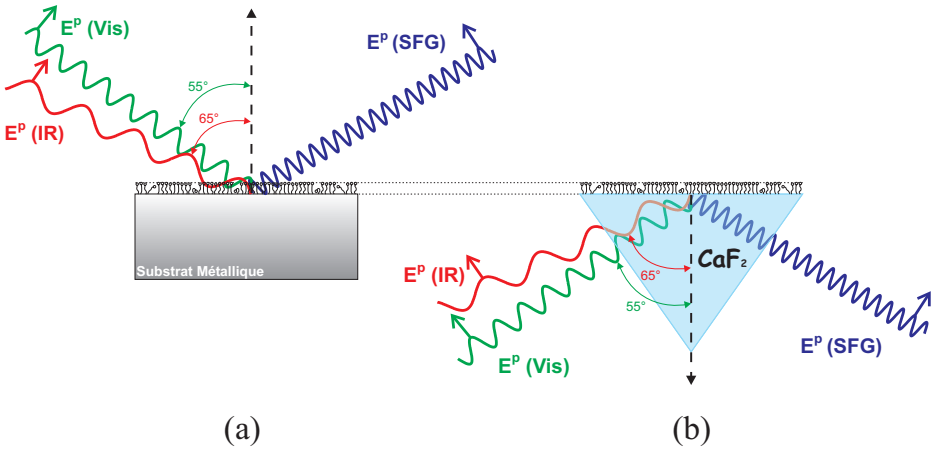


FIGURE 3.3 – *Différentes configurations expérimentales utilisées : (a) configuration classique ; (b) configuration en réflexion totale.*

Comme nous le verrons ultérieurement, nous avons utilisé différents types de substrats au cours de nos expériences. Pour les substrats métalliques, nous avons eu recours à la configuration classique utilisée en SFG. Pour les substrats isolants, par contre, nous avons employé du CaF_2 qui présente l'avantage d'être transparent aussi bien dans le visible que dans l'infrarouge de la gamme spectrale étudiée. Tirant parti de cet avantage, il est possible de ne plus utiliser un échantillon plan, mais un prisme équilatéral. Le dépôt de molécules s'effectuant alors sur la base du prisme, les rayons incidents traversent le prisme et se réfléchissent sur la face analysée en conditions de réflexion totale. Par chance, nous n'avons pas à changer les angles utilisés habituellement. En effet, un rapide calcul basé sur les lois de Snell montre que les deux faisceaux, visible et infrarouge, arrivent sur la base du prisme à des angles supérieurs aux angles limites lorsque celui-ci est dans l'air.

Dans cette configuration dite de « réflexion totale interne » (TIR - *Total Internal Reflection*) présentée à la figure 3.3(b), l'interface est sondée par l'onde évanescente résultant du phénomène de réflexion totale. Un des avantages d'une telle configuration provient du fait que le CaF_2 n'a aucune contribution au signal SFG (contrairement aux métaux). Cette particularité facilite l'interprétation des spectres puisque ces derniers rendent alors uniquement compte des résonances de l'adsorbat.

3.4 Chaîne de détection

Ce que nous appelons « chaîne de détection » désigne en réalité, tous les éléments se situant entre l'échantillon, où prend place la génération du signal SFG, et l'expérimentateur. Ces différents éléments sont présentés à la figure 3.4.

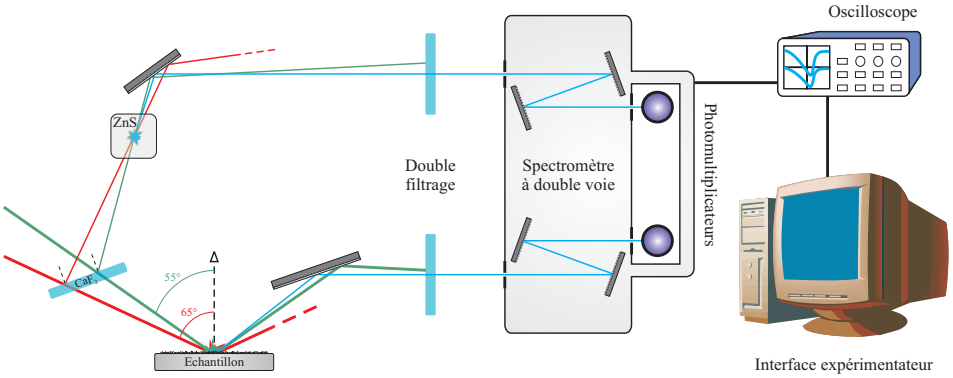


FIGURE 3.4 – *Chaîne de détection utilisée en spectroscopie SFG.*

Remarquons tout d'abord qu'avant même d'atteindre l'échantillon, une partie (environ 5%) des faisceaux incidents est prélevée par une lame séparatrice en CaF_2 pour être ensuite focalisée dans un cristal non linéaire de ZnS, ne présentant pas de caractéristiques vibrationnelles dans la gamme considérée, afin de générer une polarisation intense de volume qui servira de référence pour normaliser le signal. En effet, l'intensité de cette référence est uniquement dépendante des fluctuations éventuelles de puissance des faisceaux infrarouge et visible. Ces dernières peuvent avoir des causes diverses liées à la configuration du laser ou à l'absorption par le milieu ambiant et ce à tout moment, même pendant les acquisitions ! Comme l'intensité du signal proprement dit est également dépendante de ces fluctuations mais aussi des résonances que nous souhaitons mettre en évidence, cela peut créer des artefacts ou masquer certaines bandes dans nos spectres. Normaliser le signal de cette manière permet de lever cette dépendance aux fluctuations et de ne conserver ainsi que la contribution issue des résonances. En théorie, nous avons :

$$I_{signal} \propto \left|\chi^{(2)}_{interface}\right|^2 I_{IR} I_{vis}, \tag{3.1}$$

$$I_{reference} \propto \left|\chi^{(2)}_{ZnS}\right|^2 I_{IR} I_{vis}. \tag{3.2}$$

Après normalisation, nous obtenons :

$$R_{SFG} = \frac{I_{signal}}{I_{reference}} \propto \frac{\left|\chi^{(2)}_{interface}\right|^2}{\left|\chi^{(2)}_{ZnS}\right|^2}. \tag{3.3}$$

Nous obtenons finalement un rendement SFG (R_{SFG}) relatif qui ne dépend plus des puissances des faisceaux incidents.

Nous comprenons alors que, du fait de cette normalisation, nous n'avons plus une mais deux lignes SFG dans la chaîne de détection et que toutes les descriptions qui vont suivre sont présentes en double dans le dispositif expérimental.

Conceptuellement, la chaîne de détection est un dispositif très sommaire. Il s'agit d'un photomultiplicateur qui transforme en électrons les quelques photons générés par le phénomène du second ordre et amplifie alors le courant qui en résulte. Dans la pratique, les choses sont malheureusement plus compliquées. En effet, si nous nous référons à la relation 2.37 qui exprime l'angle d'émission du faisceau SFG, nous pouvons nous rendre compte que ce dernier est très proche de l'angle de réflexion du faisceau visible. Pour des raisons évidentes, ce dernier est beaucoup plus intense et risque donc de noyer le signal. Il nous faut donc ajouter un dispositif qui a pour but d'isoler le signal SFG de tous les photons parasites avant de l'amplifier à l'aide des photomultiplicateurs fonctionnant à leur tension maximale, à savoir 1200 V.

Pour parvenir à cette fin, nous procédons dans un premier temps à un double filtrage. Le premier, spatial, consiste simplement à faire passer le faisceau SFG à travers des diaphragmes afin de couper tout ce qui n'est pas parfaitement dans l'axe considéré. Le second, spectral, utilise des filtres holographiques $NOTCH$ à couches interférentielles qui sont opaques pour une longueur d'onde de 532 nm, en d'autres mots, qui bloquent le faisceau visible tout en laissant passer la SFG.

Dans une seconde étape, le signal est envoyé dans un spectromètre à double voie développé au laboratoire en collaboration avec la *WOW Company* afin de réaliser un nouveau filtrage spectral de haute performance grâce à deux réseaux blazés. En effet, il permet de ne sélectionner en sortie que les photons à la fréquence-somme à l'exclusion de toutes les autres longueurs d'onde. Ces derniers parviennent alors sur les photomultiplicateurs qui génèrent un courant électrique mesurable par un oscilloscope synchronisé avec le signal de déclenchement de l'oscillateur. Le tout est bien entendu relié via un connecteur RS232 à un ordinateur qui acquiert les données et les présente à l'utilisateur via une interface *LabVIEW*.

3.5 Importance du substrat

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé différents types de substrats pour la préparation de nos échantillons. Ces derniers peuvent se diviser en deux catégories principales si nous considérons d'une part, les substrats métalliques et d'autre part, les substrats isolants. Dans tous les cas, il va sans dire que, particulièrement en science des interfaces, la propreté et la qualité de la surface utilisée seront déterminantes de la pertinence des résultats obtenus. Un soin tout particulier est donc apporté à la préparation des substrats. Les procédures utilisées dans ce but sont décrites ci-après.

3.5.1 Substrats métalliques

Bon nombre de nos mesures ont été réalisées sur différents métaux, en particulier l'or, le platine et l'argent car ils sont relativement faciles à manipuler et à traiter. De plus, l'utilisation de tels substrats permet la formation aisée de couches moléculaires à l'aide de groupements thiols et constitue une sorte de « standard » (en particulier pour l'or) dans le domaine des biocapteurs.

Les échantillons d'or que nous avons utilisés pour nos expériences SFG sont, pour la plupart, produits par la société *Arrandee* par évaporation sous vide. Ils sont en réalité composés d'un dépôt d'or sur une plaquette de verre. Cette dernière a une épaisseur de $1,1\ mm$ pour une couche d'or d'environ $250\ nm$. Entre les deux, le fabriquant applique une mince couche de chrome d'environ $2,5\ nm$ qui garantit une meilleure adhérence de la couche d'or. Dans le cas du platine et de l'argent, il s'agit de monocristaux (111) préalablement polis à l'aide de différentes pâtes diamantées de grains de tailles dégressives afin d'éliminer toutes traces des précédents dépôts et de redonner à la surface une qualité « miroir » améliorant la réflexion des faisceaux. Entre chaque étape de polissage, nous effectuons plusieurs rinçages successifs dans un bain à ultrasons avec de l'acétone, de l'éthanol et de l'eau milliQ (~$18\ M\Omega\ cm$) afin d'évacuer les résidus diamantés. Un rinçage est également réalisé en fin de procédure.

Les substrats en platine et en or sont, en plus, systématiquement décapés chimiquement dans un bain de solution piranha (H_2SO_4 : H_2O_2 - 3 : 1) avant utilisation. Il s'ensuit une procédure de rinçage à l'eau milliQ. Finalement, un recuit est effectué au chalumeau propane/butane afin d'améliorer la qualité de la surface par réorganisation thermique selon la procédure dite « de Clavilier » [27]. L'échantillon est alors exposé à la flamme jusqu'à ce qu'il rougisse. Ensuite, il est retiré pour refroidir quelques instants. Cette procédure est répétée deux à trois fois et terminée en déposant une goutte d'eau milliQ sur la surface pour la protéger d'éventuels contaminants et assurer le refroidissement final. Le substrat est alors propre et prêt à être utilisé pour un dépôt organique par exemple.

L'inconvénient des substrats métalliques réside dans le fait que leur polarisation non linéaire de surface n'est pas nulle et qu'ils ajoutent donc une contribution aux spectres SFG. En outre, la contribution d'un métal dépend de la nature de ce dernier. Ceci a pour conséquence que même si les spectres SFG peuvent apparaître comme très différents, cela peut être dû à la contribution dite « non résonante » des différents métaux utilisés. En effet, rappelons-nous que le signal SFG est proportionnel au carré du module de la polarisation à l'interface, c'est-à-dire au carré du module de la susceptibilité. Cette dernière est en réalité la somme de plusieurs contributions qui proviennent aussi bien de l'adsorbat que du substrat proprement dit. La contribution métallique est définie par le terme de susceptibilité non résonant (d'origine électronique) par opposition au terme résonant (d'origine vibrationnelle) de l'adsorbat. Nous avons alors pour la susceptibilité totale d'ordre deux de l'interface :

$$\chi^{(2)} = \chi^{(2)}_{NR} + \chi^{(2)}_{R}. \tag{3.4}$$

Dans le cas des métaux, nous pouvons séparer leur contribution en deux composantes, à savoir la contribution des électrons libres du métal, responsables des transitions intrabandes, et celle de ses électrons liés, responsables des transitions interbandes [28][29].

En ce qui concerne les premiers, nous pouvons nous référer à la théorie du jellium. Dans ce cas, la susceptibilité intrabande se résume à deux contributions, l'une fonction du potentiel appliqué à la surface et négligeable dans nos conditions expérimentales classiques et l'autre, qui sera la seule que nous considérerons, fonction de facteurs géométriques.

Quant à la contribution interbande, il n'existe pas, à proprement parler, de théorie qui modélise la contribution des électrons liés. Cependant, il est observé expérimentalement que les électrons de la bande de valence peuvent adopter le comportement des électrons libres en passant dans la bande de conduction suite à leur excitation par un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde adéquate. Ce phénomène se traduit par un brusque changement dans les propriétés non linéaires du métal considéré [30]. Remarquons que l'importance de ces transitions dépend des propriétés électroniques du métal que nous utilisons. Ainsi, pour les métaux nobles comme l'or et l'argent, il existe une barrière énergétique à franchir qui nécessite un rayonnement visible ou ultraviolet. Dans ce cas, comme le dispositif expérimental que nous utilisons excite ces transitions par l'intermédiaire du faisceau visible ou SFG, la susceptibilité interbande domine les propriétés non linéaires car il y a beaucoup plus d'électrons liés que de libres. Pour les métaux de transition comme le platine, les transitions ne pourraient se produire que dans l'infrarouge lointain, inaccessible à notre dispositif, et c'est alors la susceptibilité intrabande qui domine.

Suite à ces constatations, nous remarquons que la partie non résonante de la réponse non linéaire varie lentement avec la fréquence infrarouge, au contraire de la partie résonante qui peut varier rapidement, comme nous l'avons montré dans la section 2.3. Dans les spectres que nous avons réalisés, nous avons donc considéré que la contribution non résonante est constante ou dépendante de façon polynomiale simple vis-à-vis de la fréquence infrarouge. Remarquons que cette approximation est valable dans le cas de mesures ex situ comme celles que nous avons effectuées. Dans le cas de mesures in situ, d'autres paramètres entrent en compte et introduisent des problèmes plus complexes [31].

Une autre conséquence de la contribution non résonante des métaux est ce que nous appelons le *facteur d'interférence*. En effet, en sachant que l'intensité SFG est proportionnelle au carré du module de la susceptibilité non linéaire totale de l'interface analysée et en sachant que $\chi^{(2)}_{NR}$ et $\chi^{(2)}_{R}$ sont des variables complexes, nous avons :

$$I_{SFG}(\omega_{IR}) \propto \left|\chi^{(2)}_{SFG}(\omega_{IR})\right|^2 \tag{3.5}$$

$$\propto \left|\chi^{(2)}_{NR} + \chi^{(2)}_{R}\right|^2 \tag{3.6}$$

$$\propto \left|\chi^{(2)}_{NR}\right|^2 + \left|\chi^{(2)}_{R}\right|^2 + \chi^{(2)}_{NR}\chi^{(2)*}_{R} + \chi^{(2)*}_{NR}\chi^{(2)}_{R} \tag{3.7}$$

$$\propto \left|\chi^{(2)}_{NR}\right|^2 + \left|\chi^{(2)}_{R}\right|^2 + 2\left|\chi^{(2)}_{NR}\right| \cdot \left|\chi^{(2)}_{R}\right| \cos\left[\arg(\chi^{(2)}_{NR}) - \arg(\chi^{(2)}_{R})\right]. \tag{3.8}$$

Nous observons que cette expression, loin d'être une simple somme scalaire, comporte des termes d'interférence, semblables à ceux observés en optique ondulatoire, entre les contributions résonante et non résonante. L'interférence peut être constructive, destructive ou nulle en fonction du comportement du cosinus, c'est-à-dire en fonction du déphasage existant entre les deux arguments. La phase est déterminée par plusieurs paramètres, comme le type de métal en présence, la nature et l'orientation de la molécule étudiée, la configuration expérimentale, *etc.*

Il n'est dès lors pas étonnant d'observer des spectres SFG de formes différentes en fonction du substrat utilisé. En effet, il nous faut tenir compte du facteur d'interférence qui dépend bien sûr de la phase mais aussi des intensités relatives des résonances en présence. Ce facteur est généralement constructif sur le platine, ce qui conduit à des résonances qui apparaissent sous forme de pics. Tandis que pour l'or, l'interférence est généralement destructive et amène à des creux. L'argent présente un cas intermédiaire où les résonances sont souvent représentées sous forme de pics « papillons » asymétriques [30]. Il est évident que ce type de considérations est à garder à l'esprit lors de l'interprétation des spectres réalisés sur des métaux.

3.5.2 Substrats isolants

Comme mentionné précédemment, nous avons utilisé des prismes $\lambda/10$ en fluorure de calcium (Casix). Le CaF_2 est un cristal qui possède une très bonne transparence de 200 nm à 7 μm comme montré à la figure 3.5. Son indice de réfraction est de $1,43$ à $0,88$ μm. Ce matériau est couramment utilisé pour la fabrication de composants optiques comme les fenêtres, les lentilles et les prismes. Ces derniers, en plus de nous permettre d'utiliser une configuration TIR, présentent l'avantage, grâce à leur transparence aux longueurs d'onde utilisées, de n'apporter aucune contribution au signal SFG, ce qui favorise grandement l'interprétation des spectres. La préparation de ce type de substrat nécessite également une procédure chimique de type solution piranha identique à celle décrite précédemment.

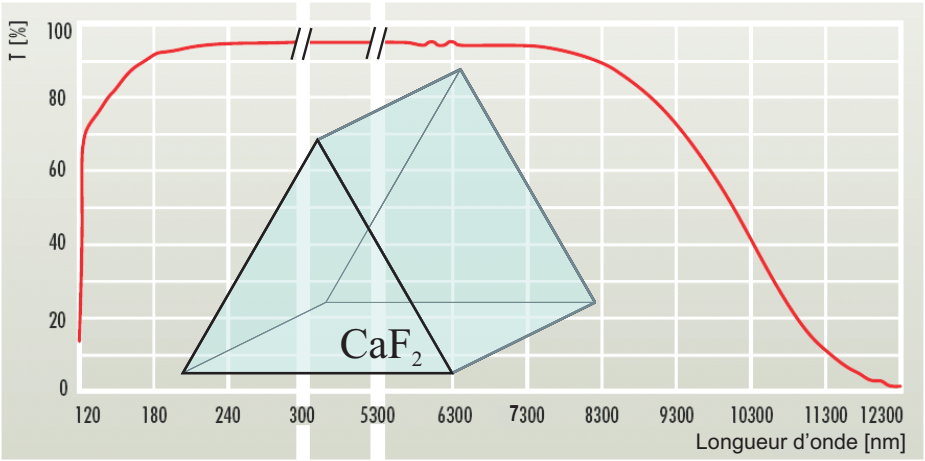


FIGURE 3.5 – *Courbe de transmission du CaF_2.*

Deuxième partie

Résultats expérimentaux

Chapitre 4

Etude de cas : DT vs DTCN

4.1 Introduction

Pour commencer cette partie expérimentale, nous nous proposons de présenter une étude de cas réalisée à l'aide de la spectroscopie de génération de fréquence-somme. Ceci nous permettra d'abord de mettre en évidence les différentes particularités de cette technique appliquée à un système simple. Le présent chapitre nous aidera alors à nous familiariser avec le processus d'interprétation des spectres SFG mais aussi avec la manière dont on peut compléter cette information à l'aide d'autres techniques d'analyse de surface. A cette fin, nous avons réalisé une étude comparative des propriétés d'adsorption de molécules de décanethiol (DT) et de molécules de décyl thiocyanate (DTCN) sur substrats métalliques.

Outre l'aspect « didactique » développé dans ce chapitre, ce système présente également un réel intérêt sur le plan scientifique. En effet, la compréhension des mécanismes d'adsorption moléculaire est cruciale pour la fabrication de monocouches auto-assemblées hautement organisées et stables, qui sont aujourd'hui utilisées dans bon nombre d'applications. Elles interviennent en particulier, comme nous le verrons par la suite, dans le processus de réalisation de certains biocapteurs. De notre point de vue, cette problématique constitue donc un préliminaire à l'analyse de ces dispositifs telle qu'elle sera abordée dans les chapitres suivants.

4.2 Présentation du système

4.2.1 Les monocouches auto-assemblées

Une monocouche auto-assemblée (SAM - *Self-Assembled Monolayer*) résulte de l'assemblage spontané de molécules se liant sur une surface et de leur organisation en une seule couche moléculaire dense et ordonnée et ce, sans intervention externe. Ce processus peut être amorcé en exposant le sub-

strat à une solution de molécules adéquates en suspension dans un solvant. Il comprend deux étapes principales : la première, rapide (~secondes), est la phase de fixation et la seconde, plus lente (~heures), est celle d'organisation (voir figure 4.1). Généralement, la fixation sur le substrat est réalisée par liaison covalente entre les atomes de surface et un groupement fonctionnel particulier propre à la molécule. L'organisation de la couche est alors due aux interactions entre molécules voisines (typiquement des interactions de van der Waals).

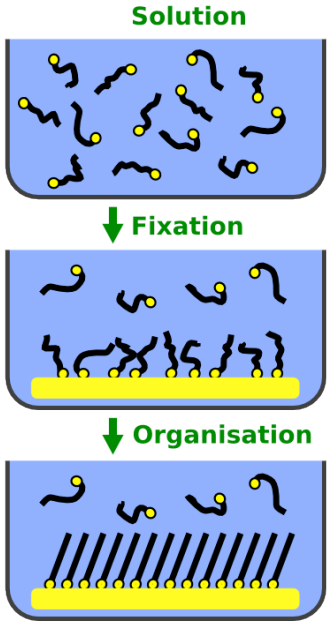


FIGURE 4.1 – *Principe de réalisation d'une monocouche auto-assemblée.*

L'auto-assemblage est un processus naturel qui est présent à toutes les échelles de notre univers, des nano-objets jusqu'aux galaxies, et qui mène à la formation de structures hautement organisées à partir de composants initialement désordonnés. Au niveau moléculaire, nous pouvons, à titre d'exemple, citer nos propres cellules dont la membrane est en réalité constituée d'une bicouche lipidique auto-assemblée [32]. Historiquement, le premier article décrivant le phénomène d'auto-assemblage moléculaire sur une surface a été publié par Zisman *et al.* en 1946 [33] mais à cette époque, le potentiel de ce type d'architecture chimique ne fut pas reconnu par la communauté scientifique. Il fallut attendre 1983 et la mise au point de la première couche thiolée sur substrat d'or par Allara et Nuzzo aux fameux laboratoires Bell [34] pour que l'on réalise l'intérêt de pouvoir construire de tels systèmes. Les SAM les plus largement étudiées actuellement sont basées sur des molécules de type alkylthiolate et alkylsilane. Ces dernières offrent des couches

hautement structurées présentant des propriétés physico-chimiques uniques et modulables puisque la nature de la fonctionnalisation terminale peut être modifiée facilement. De plus, ces dispositifs sont aisément réalisables et relativement résistants. A titre d'exemple, une couche de molécules thiolées construite sur une surface d'or peut rester stable plusieurs mois dans l'air, dans l'eau ou même dans un solvant [35]. Pour toutes ces raisons, les monocouches auto-assemblées ont connu un succès grandissant ces dernières décennies. Utilisées initialement comme systèmes modèles, elles trouvent maintenant des applications dans de nombreux domaines comme l'électronique [36] ou encore la biochimie [37][38].

4.2.2 La problématique DT-DTCN

L'objectif de ce chapitre est donc de comparer la qualité des monocouches auto-assemblées obtenues avec deux molécules différentes, le décanethiol $CH_3 - (CH_2)_9 - SH$ (DT) d'une part et le décyl thiocyanate $CH_3 - (CH_2)_9 - SCN$ (DTCN) d'autre part. Ces deux espèces chimiques ne diffèrent en réalité l'une de l'autre que par leur groupement d'ancrage (utilisé pour l'accrochage sur le substrat) comme illustré à la figure 4.2.

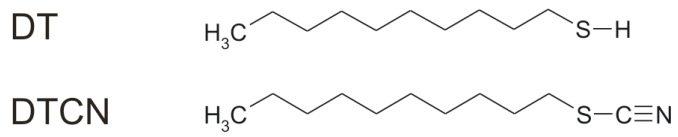


FIGURE 4.2 – *Représentation schématique des molécules de décanethiol (DT) et de décyl thiocyanate (DTCN)*

Les groupements thiols $-SH$ (comme dans la molécule de DT) représentent aujourd'hui une sorte de « standard » dans le domaine des SAM de par leur capacité à former des liaisons avec les métaux comme l'or ou le platine. Néanmoins, ces fonctions chimiques présentent aussi certaines limitations. Par exemple, dans le cas de groupements thiols protégés, le processus de déprotection peut générer un apport indésirable de matière organique, ce qui peut perturber l'assemblage de la couche [39]. Un autre de leurs désavantages est leur tendance à s'oxyder et la propension des dithiols à former des multicouches [40]. Récemment, certains groupes de recherche ont montré que les fonctions thiocyanates $-SCN$ (comme dans la molécule de DTCN) semblent être une alternative intéressante aux groupements thiols en ce qui concerne la formation de SAM sur des surfaces métalliques [41][42]. En effet, la synthèse de telles molécules est plus aisée et elles peuvent être assemblées directement sur la surface. De plus, elles sont chimiquement stables, ne forment pas de multicouches et ne sont pas sujettes à la formation de disulfures.

Cependant, il existe relativement peu d'informations disponibles sur les propriétés physico-chimiques de ces molécules lorsqu'elles s'adsorbent aux interfaces. Le but de ce chapitre est donc de comparer la qualité de SAM de DTCN sur substrats de platine à celles, mieux connues, obtenues avec des molécules de DT. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé principalement la spectroscopie SFG. En effet, de par sa sensibilité à la symétrie, cette technique se présente comme un excellent outil pour étudier l'organisation de films organiques, en particulier en ce qui concerne la conformation des chaînes aliphatiques [43][44][45][46]. Par ailleurs, nous avons également recouru à d'autres techniques d'analyse de surface ; l'XPS et le STM (voir annexes A.3 et A.4), afin de compléter nos données vibrationnelles et donc d'affiner notre compréhension des mécanismes d'adsorption de ces molécules. Notons par ailleurs que cette étude a également été réalisée en utilisant des substrats d'or mais les conclusions étant similaires, nous souhaitons, par analogie avec des résultats présentés plus tard dans ce travail, nous restreindre ici à présenter les mesures obtenues sur platine.

4.3 Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés dans ce chapitre consistent en des monocouches auto-assemblées de DT et de DTCN réalisées sur des surfaces métalliques. Ces dernières sont en réalité des monocristaux de platine (111) préalablement préparés comme décrit à la section 3.5.1.

Les dépôts moléculaires sont alors obtenus en immergeant les substrats propres dans une solution d'éthanol additionnée de 2 mM de DT ou de DTCN selon le cas, pendant une durée d'environ 16 h. Avant analyse, les échantillons sont abondamment rincés au solvant afin d'éviter la formation de multicouches et sont finalement séchés sous un flux d'azote.

4.4 Résultats expérimentaux

4.4.1 Spectres SFG

La figure 4.3 présente les spectres SFG des monocouches auto-assemblées de décanethiol (en haut) et de décyl thiocyanate (en bas) obtenues sur substrats de Pt(111) dans la gamme spectrale s'étendant de 2775 à 3025 cm^{-1}.

Comme il s'agit des premiers spectres SFG que nous présentons, il est peut-être opportun d'en décrire brièvement la structure. Ces courbes expriment l'intensité du faisceau SFG collectée au photomultiplicateur en fonction de la longueur d'onde du faisceau infrarouge. Ainsi que mentionné précédemment, à chaque fois que l'énergie des photons infrarouges coïncide avec celle d'un mode de vibration de l'interface vérifiant les règles de sélection, nous observons une augmentation du signal SFG (sans tenir compte ici

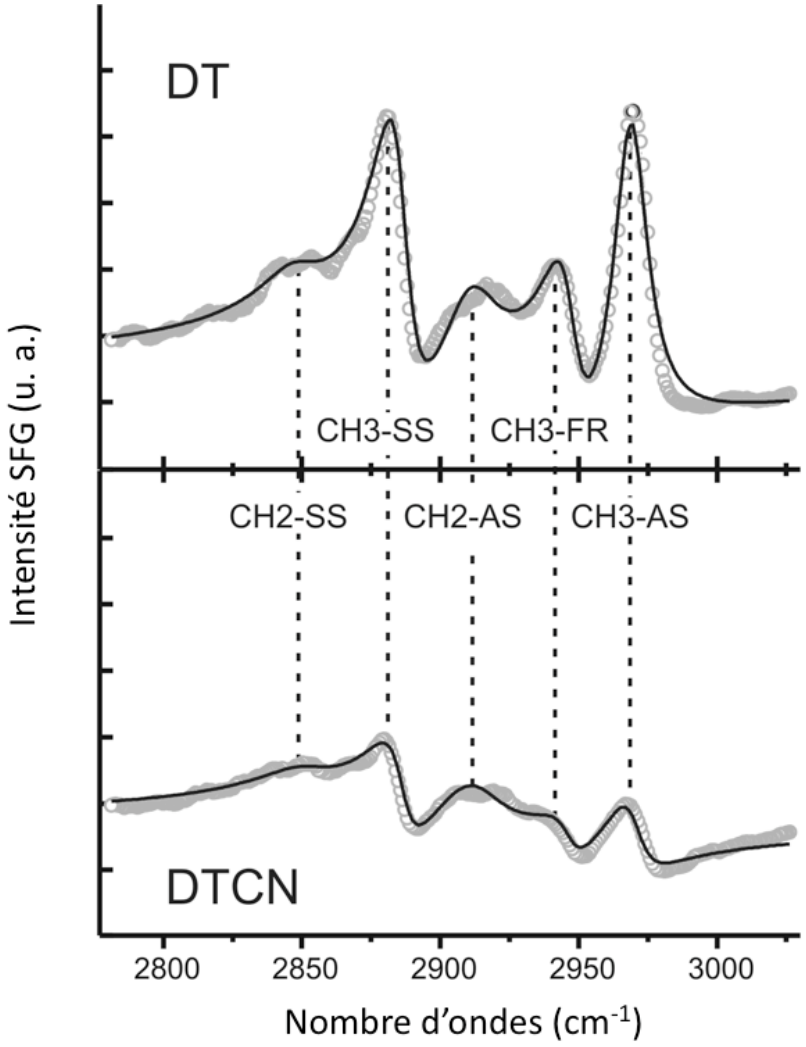


FIGURE 4.3 – *Spectres SFG de DT et de DTCN adsorbés sur Pt(111). Les unités arbitraires (u. a.) sont normalisées par rapport au fond non résonant pour les deux spectres. Les cercles représentent les données expérimentales alors que les lignes continues représentent les meilleurs ajustements.*

du facteur d'interférence). Les échelles des abscisses sont traditionnellement exprimées en nombre d'ondes $[cm^{-1}]$ ($n\ cm^{-1}$ est en réalité le nombre de longueurs d'onde contenues dans un cm dans le vide) et non en longueur d'onde $[\mu m]$ comme nous aurions pu le penser suite à la lecture du chapitre 3. En effet, laseristes et spectroscopistes ne semblent pas s'entendre à ce sujet. Quoi qu'il en soit, la conversion est aisée puisqu'il suffit de diviser 10.000 par une des deux valeurs pour obtenir l'autre. En ce qui concerne les

échelles des ordonnées, elles sont exprimées en unités arbitraires (u. a.), ce qui est inévitable de par la nature de la chaîne de détection et du processus de normalisation du signal. Cela ne pose pas de problème en soi mais il nous faut tout de même rester prudent et veiller à utiliser les mêmes unités arbitraires lors de la comparaison directe de différents spectres. La fenêtre spectrale présentée ici est la gamme des vibrations $C-H$. Il s'agit de la région la plus investiguée en SFG car elle est la plus accessible techniquement parlant. Elle n'est bien sûr pas du tout dénuée d'intérêt puisque la plupart des molécules organiques présentent ce type de groupements chimiques. Au besoin, les mesures obtenues dans cette partie du spectre infrarouge pourront être complétées par d'autres obtenues dans une autre gamme spectrale, ce qui n'est pas utile ici de par la nature des molécules étudiées.

Pour en revenir aux spectres de la figure 4.3, la présence de résonances dans le signal SFG nous permet de déduire que, dans les deux cas, un dépôt organique s'est effectivement formé sur le substrat de platine. Chaque spectre est en effet caractérisé par cinq pics situés à 2969, 2947, 2913, 2886 et 2850 cm^{-1}. Par comparaison avec des mesures effectuées par FTIR sur un système similaire et en accord avec de précédents travaux réalisés par spectroscopie SFG [30], nous pouvons assigner trois d'entre eux aux modes de vibration du groupement terminal méthyle (CH_3) tandis que les deux autres sont associés aux modes de vibration des groupements méthylènes (CH_2) de la chaîne aliphatique. Plus précisément, les bandes situées à 2886 et 2969 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongations (*stretching*) symétrique (CH_3-SS) et anti-symétrique (CH_3-AS) des entités méthyles terminales. Le mode situé à 2947 cm^{-1} est quant à lui assigné à une résonance de Fermi (CH_3-FR) entre le mode d'élongation symétrique du méthyle et un harmonique d'un mode de déformation (*bending*) méthyle [47]. Finalement, les deux bandes situées à 2850 et 2913 cm^{-1} sont associées aux vibrations d'élongations symétrique (CH_2-SS) et anti-symétrique (CH_2-AS) des groupements méthylènes. L'observation de ces deux derniers modes est indicative de la présence de *défauts gauches* qui sont communément observés dans les SAM d'alcanethiols adsorbées sur platine [48][49]. En effet, dans une monocouche hautement ordonnée, toutes les molécules adoptent une configuration *all-trans*. Les groupements méthylènes sont alors distribués de manière symétrique le long du squelette moléculaire et leurs modes de vibration ne peuvent pas être actifs en SFG pour raison de symétrie. Rappelons que les phénomènes du second ordre sont interdits dans les milieux centrosymétriques, ce qui est le cas de chaînes alcanes parfaitement alignées. Quand les interactions de van der Waals entre molécules voisines deviennent trop faibles, un repliement de la chaîne aliphatique appelé *défaut gauche* peut avoir lieu, rompant la symétrie et rendant actifs les groupements considérés (voir figure 4.4). Dès lors, l'observation de telles vibrations est une indication claire d'un certain nombre de défauts dans la monocouche.

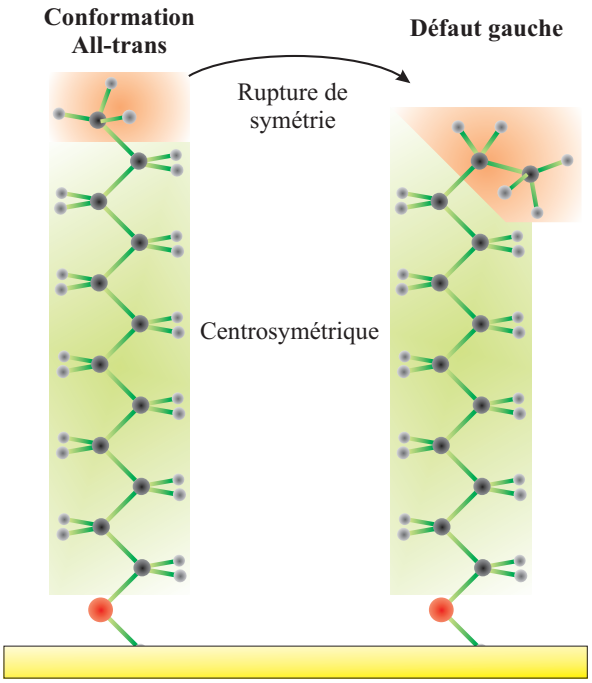


FIGURE 4.4 – *Défaut gauche et rupture de symétrie dans une molécule simple (ici le dodécanethiol).*

Nous mettons ici en évidence un autre avantage de la spectroscopie SFG qui, par ce type de déduction, permet une estimation de l'organisation moléculaire régnant à l'interface étudiée. En effet, si un alignement trop parfait peut nuire au signal SFG pour raison de symétrie, il en va de même pour un désordre absolu qui est, en moyenne, globalement centrosymétrique et donc inactif vis-à-vis des phénomènes d'ordre deux. Tout ceci fait donc de la spectroscopie SFG une technique sensible à l'ordre. La simple observation de résonances sur nos spectres peut déjà nous permettre de déduire qu'une monocouche est effectivement formée et qu'il y règne une certaine structure. Ceci n'est pas anodin car, en science des surfaces, il existe assez peu de techniques capables d'apporter ce type d'information. En effet, l'organisation reste un concept difficile à appréhender (voire à quantifier) de manière expérimentale.

4.4.2 Comparaison avec la spectroscopie infrarouge

Afin de mieux se rendre compte de la particularité des informations extraites des spectres SFG, nous nous proposons de les comparer brièvement aux spectres que nous obtenons sur un système similaire à l'aide de la spectroscopie infrarouge classique. Une description sommaire de cette technique

bien connue peut être trouvée à l'annexe A.2. La figure 4.5 présente d'une part le spectre SFG d'une monocouche de DT adsorbée sur substrat de platine (comme présenté à la figure 4.3) et d'autre part, le spectre PM-IRRAS du même système. Ces derniers étant identiques, les modes de vibration observés sont les mêmes d'un système à l'autre. Malgré cela, nous remarquons que les deux spectres montrent des allures différentes. Ceci est bien sûr dû à la nature des phénomènes qui entrent en jeu dans chacune de ces techniques.

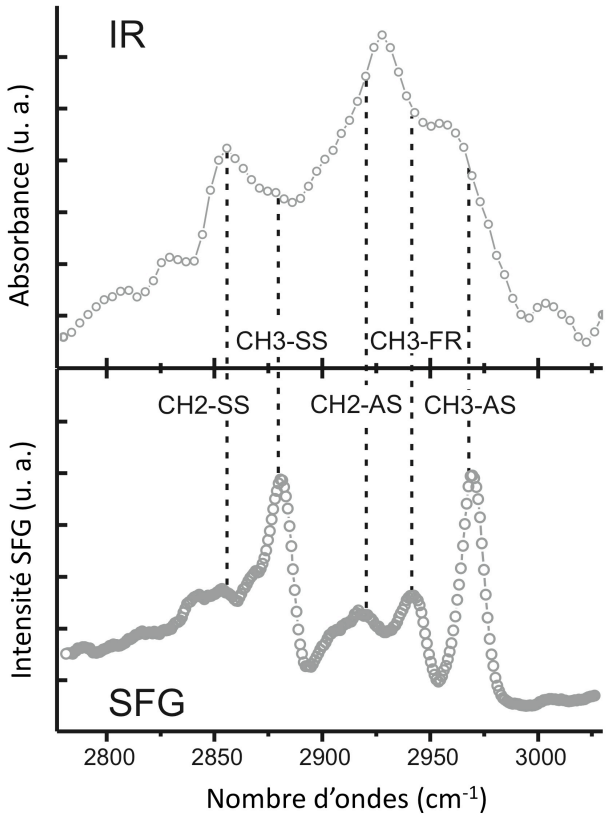


FIGURE 4.5 – *Spectre infrarouge de surface (en haut) et spectre SFG (en bas) d'une monocouche de DT adsorbée sur Pt(111).*

Sur le spectre infrarouge, les modes de vibration relatifs aux groupements méthylènes apportent la plus grande contribution. En effet, en spectroscopie IR, l'intensité d'un pic est, entre autres, proportionnelle au nombre d'entités moléculaires en présence. Dans le type de molécules que nous étudions ici, nous avons 9 groupements CH_2 pour une seule fonction terminale CH_3, ce qui explique l'allure du graphe présenté. En spectroscopie SFG par contre, le signal mesuré est directement corrélé à l'ordre et à l'orientation des molécules. Les chaînes alcanes s'arrangeant de manière globalement centrosymétrique, leur contribution au spectre s'en voit fortement diminuée.

Les modes associés au groupement méthyle dominent donc la signature vibrationnelle. Loin d'être anecdotique, cette particularité peut être perçue comme un atout. En effet, dans ce type de système, la fonction terminale est sans aucun doute le groupement le plus important. C'est elle qui donnera à l'interface fonctionnalisée les propriétés particulières souhaitées. Les chaînes moléculaires ne servent réellement que lors de la phase d'organisation du processus d'auto-assemblage. Notons par ailleurs que nous travaillons ici avec des chaînes relativement courtes mais que, si nous augmentions le nombre de CH_2, leurs modes de vibration pourraient alors occulter complètement les bandes spectrales associées aux CH_3. De plus, le spectre infrarouge présenté ici est en réalité un spectre PM-IRRAS. Cette variante de la spectroscopie infrarouge classique étant beaucoup plus sensible aux interfaces (en particulier à la composante perpendiculaire du moment dipolaire), il en résulte que les vibrations méthyles apparaissent exaltées comparativement à celles des groupements méthylènes.

Pour terminer, précisons que la petite comparaison menée ici ne porte que sur l'aspect visuel des spectres présentés. En réalité, l'intensité infrarouge est principalement proportionnelle à la variation du moment dipolaire du groupement considéré. Il s'agit d'un vecteur (tenseur de rang 1) et l'expérimentateur sonde la projection du champ électrique sur le dipôle. Dans le cas de la SFG, les spectres rendent principalement compte du $\chi^{(2)}$ de l'interface. Il s'agit alors d'un tenseur de rang 3 et nous sondons les projections de 3 champs sur 3 dipôles interdépendants. Sans aller plus loin, nous pouvons qualitativement nous rendre compte qu'une analyse plus poussée des signaux SFG par rapport à la polarisation des faisceaux impliqués peut fournir une information beaucoup plus riche en termes d'organisation moléculaire que dans le cas des spectres infrarouges.

4.4.3 Modélisation expérimentale des spectres SFG

Comme nous pouvions nous y attendre, les deux spectres SFG présentés à la figure 4.3 ne diffèrent pas au niveau de l'occurrence des bandes spectrales observées. La principale dissemblance entre ces deux signatures vibrationnelles provient plutôt de l'intensité du signal SFG relatif à chacun de ces modes, ainsi que l'observation des spectres le montre clairement. Afin de pouvoir discuter cette problématique sans ambiguïté, il nous est nécessaire de réaliser un ajustement paramétrique sur les données expérimentales. De cette manière, nous pourrons extraire une valeur d'intensité SFG absolue pour chacun des modes de vibration, ce qui en facilitera grandement la comparaison objective. Pour ce faire, reprenons une version simplifiée de l'équation 2.28 présentée précédemment qui décrit l'intensité du faisceau SFG réfléchi :

$$I_{SFG} \propto \left|\chi^{(2)}\right|^2 I_{IR} I_{vis}. \tag{4.1}$$

Pour une couche organique adsorbée sur un substrat métallique, nous pouvons appliquer la transformation dictée par l'équation 3.4, ce qui nous donne :

$$I_{SFG} \propto \left|\chi^{(2)}_{NR} + \chi^{(2)}_{R}\right|^2 I_{IR} I_{vis}, \tag{4.2}$$

avec $\chi^{(2)}_{NR}$ qui représente la contribution non résonante du platine et $\chi^{(2)}_{R}$, la contribution résonante du dépôt moléculaire ; I_{IR} et I_{vis} se réfèrent aux intensités des faisceaux infrarouge et visible incidents.

La modélisation expérimentale du signal SFG peut alors être obtenue en adoptant une forme lorentzienne pour la contribution résonante puisque nous considérons ici un élargissement homogène. Nous avons alors pour N modes de vibration :

$$I_{SFG} \propto \left|\chi^{(2)}_{NR} + \sum_{q=1}^{N} \frac{A_q}{(\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q)}\right|^2 I_{IR} I_{vis}. \tag{4.3}$$

A_q, ω_q et Γ_q représentent respectivement la force d'oscillateur, la pulsation de résonance et la constante d'amortissement du $q^{\text{ème}}$ mode normal de vibration. Notons que la notion de force d'oscillateur est fondamentalement différente de celle de force telle que nous l'entendons dans le langage courant. Il s'agit ici d'une variable caractéristique de la transition entre deux états [50]. Chacun des paramètres A_q peut s'écrire comme le produit d'un module ($|A_q|$) et d'un facteur de phase (φ_q), soit $A_q = |A_q|\, e^{i\varphi_q}$. En effet, il s'agit en réalité de tenseurs complexes dont les composantes dépendent des moments de transition infrarouge et Raman (voir équation 2.50). De la même manière, la contribution non résonante $\chi^{(2)}_{NR}$ peut être exprimée comme étant égale à $|A_{NR}|\, e^{i\varphi_{NR}}$. Après normalisation par les intensités des faisceaux incidents (voir section 3.4), nous obtenons finalement l'équation paramétrique suivante qui est ajustée aux données expérimentales :

$$I_{SFG} \propto \left||A_{NR}|\, e^{i\varphi_{NR}} + \sum_{q=1}^{N} \frac{|A_q|\, e^{i\varphi_q}}{(\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q)}\right|^2. \tag{4.4}$$

Cette équation fait donc office pour nous de modélisation expérimentale de l'intensité SFG obtenue d'un dépôt organique adsorbé sur substrat métallique. Comme nous le verrons, elle sera ajustée sur des spectres SFG à plusieurs reprises au cours de ce travail lorsque nous aurons à effectuer des comparaisons entre des intensités de modes de vibration provenant de spectres différents. Pratiquement, ces ajustements ont été réalisés en utilisant un petit programme *LabVIEW* écrit à cet effet. Son fonctionnement est décrit de manière succincte dans l'annexe B.

Dans le cas qui nous concerne ici, les spectres montrés précédemment présentent cinq modes de vibration chacun. Cela représente dans notre modèle 22 paramètres d'ajustement pour chaque spectre, à savoir les variables $|A_q|$, φ_q, ω_q et Γ_q associées à chacune des résonances, à quoi s'ajoutent $|A_{NR}|$ et φ_{NR} associés à la réponse du substrat. Afin de réduire le nombre de degrés de liberté de ce système complexe, nous pouvons émettre quelques hypothèses physiques pour diminuer le nombre de variables indépendantes. Premièrement, nous pouvons postuler que les constantes d'amortissement (Γ_q) associées à des vibrations provenant de mêmes groupements moléculaires sont identiques. Ensuite, nous permettons aux pulsations de résonance (ω_q) de ne varier que de manière limitée autour des valeurs de référence extraites de la littérature. La gamme autorisée est d'environ 3 cm^{-1}, ce qui correspond à la résolution spectrale de notre dispositif laser. Les facteurs de phase φ_q sont par contre gardés libres lors de l'ajustement effectué sur le spectre de la monocouche de DT (φ_{NR} est cependant arbitrairement fixé à une valeur de référence nulle) et sont réutilisés tels quels lors de l'ajustement du spectre de DTCN (φ_{NR} est cette fois-ci laissé libre mais n'a pas varié de manière significative). Pour terminer, nous normalisons tous les modules des forces d'oscillateur ($|A_q|$) par celui de la contribution non résonante ($|A_{NR}|$) qui est indépendante de la nature de l'adsorbat lorsque les molécules considérées sont dépourvues d'activité électronique (comme c'est le cas ici). Cette quantité $|A_q| \,/\, |A_{NR}|$ est représentative de l'intensité du mode de vibration considéré. Une fois tout ceci pris en compte, nous pouvons ajuster l'équation 4.4 à nos données expérimentales.

La table 4.1 résume les jeux de paramètres menant aux meilleurs ajustements obtenus pour les spectres des monocouches auto-assemblées de DT et de DTCN sur surfaces de platine. Ceux-ci sont représentés par les lignes continues de la figure 4.3.

4.4.4 Interprétation et discussion

Une fois ces ajustements réalisés, nous pouvons interpréter plus sereinement nos résultats en discutant à partir des valeurs des paramètres présentés dans la table 4.1. En ce qui concerne les modes de vibration des groupements méthyles, nous remarquons que pour chacune d'entre elles, le rapport $|A_q| \,/\, |A_{NR}|$ est clairement plus faible dans le cas du DTCN que dans celui du DT (en moyenne d'un facteur 3,5). Un tel comportement est indicatif d'une organisation et/ou d'une densité plus faible dans la monocouche. En effet, la SFG étant un processus cohérent, l'intensité d'une résonance dans de tels spectres est proportionnelle au carré du nombre de fonctions chimiques identiques orientées dans la même direction et arrangées de manière non centrosymétrique. Une organisation de mauvaise qualité donne lieu à des groupements pointant dans des directions différentes alors qu'une densité plus faible diminue le nombre de groupements présents à l'interface.

DT	$\lvert A_q \rvert / \lvert A_{NR} \rvert$	ω_q (cm^{-1})	Γ_q (cm^{-1})	φ_q (rad)
$CH_3 - SS$	17,6	2886	7,5	-2,8
$CH_3 - FR$	13,8	2947	7,5	-2,3
$CH_3 - AS$	24,6	2969	7,5	-3,1
$CH_2 - SS$	5,0	2849	14,0	2,4
$CH_2 - AS$	15,7	2912	14,0	2,6
Pt(111)	1,0	-	-	0,0
DTCN	$\lvert A_q \rvert / \lvert A_{NR} \rvert$	ω_q (cm^{-1})	Γ_q (cm^{-1})	φ_q (rad)
$CH_3 - SS$	5,9	2886	7,5	-2,8
$CH_3 - FR$	3,7	2947	7,5	-2,3
$CH_3 - AS$	6,4	2970	7,5	-3,1
$CH_2 - SS$	2,8	2852	17,0	2,4
$CH_2 - AS$	9,5	2914	17,0	2,6
Pt(111)	1,0	-	-	-0,1

TABLE 4.1 – *Jeux de paramètres donnant lieu aux meilleurs ajustements des spectres SFG présentés à la figure 4.3.*

En plus de cela, nous observons, relativement aux résonances CH_3, que les modes de vibration $CH_2 - SS$ et $CH_2 - AS$ sont plus intenses dans le cas d'une SAM de DTCN que dans celui d'une SAM de DT. Pour les mêmes raisons que celles mentionnées précédemment, cela signifie que la monocouche auto-assemblée à l'aide de molécules de décyl thiocyanate présente un plus grand nombre de défauts gauches. Comme ces derniers apparaissent quand les interactions entre chaînes alkyles adjacentes deviennent trop faibles, nous pouvons en déduire que la densité moléculaire des monocouches de DTCN est globalement plus faible.

Les spectres SFG tendent donc à montrer que les monocouches de décyl thiocyanate sont globalement moins denses que celles de décanethiol. Cette densité plus faible augmente la distance moyenne entre deux molécules voisines, ce qui réduit les interactions de van der Waals responsables de l'organisation dans la monocouche auto-assemblée. Il en résulte un désordre plus important dans la structure moléculaire.

Afin de comprendre clairement les origines de ces différences d'organisation entre les couches de DT et de DTCN, nous avons utilisé d'autres techniques de caractérisation de surface. Dans un premier temps, nous avons réalisé des mesures XPS sur nos deux systèmes dans les gammes d'énergie de liaison des $N1s$, $C1s$ et $S2p$, comme présenté à la figure 4.6. Notons que des ajustements paramétriques ont également été réalisés sur les différents pics de photoémission observés dans ces spectres afin d'en dégager les différentes composantes. Ceux-ci ont été effectués à l'aide de fonctions

mixtes mélangeant gaussiennes et lorentziennes grâce à *Winspec*, un programme d'ajustement développé au LISE (*Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Electronique*) se basant sur la méthode des moindres carrés.

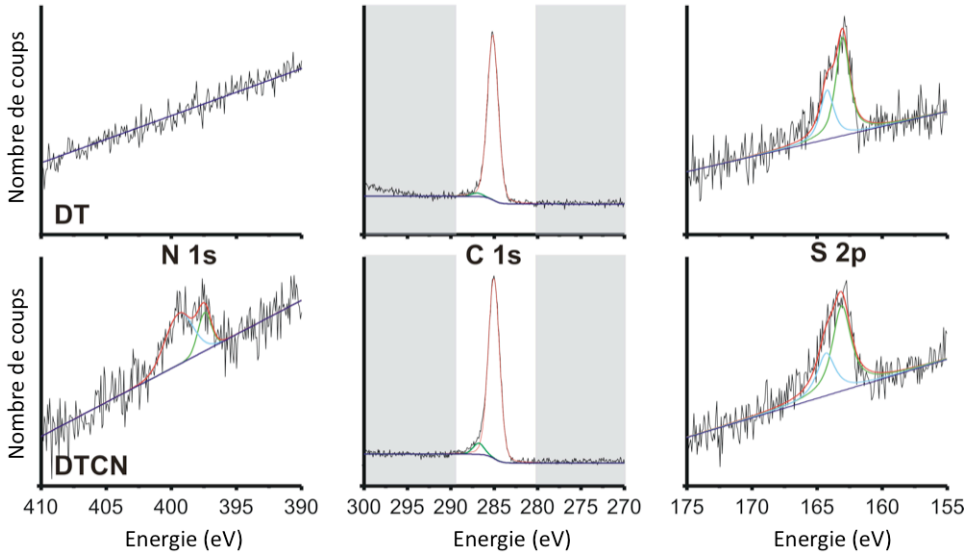


FIGURE 4.6 – *Spectres XPS des gammes $N1s$, $C1s$ et $S2p$. Les panneaux supérieurs et inférieurs présentent respectivement les données relatives au DT et au DTCN. Les lignes continues en couleur représentent les ajustements. Dans la gamme $C1s$, ceux-ci ont été réalisés en considérant uniquement les données situées hors des zones grisées.*

Deux conclusions importantes peuvent être déduites de ces spectres. La première concerne la formation effective d'un assemblage thiolate du DTCN dont l'occurrence est confirmée par la présence d'un seul doublet du soufre autour de 163 eV (région $S2p$), tout comme dans le cas des SAM à base de DT. En effet, des espèces SCN^- devraient donner lieu à un second doublet autour de 165 eV qui n'est pas observé ici [51]. Cette observation est également indicative de la formation d'une monocouche et non de multicouches sur notre substrat. En ce qui concerne la seconde conclusion, les mesures XPS révèlent la présence d'espèces cyanures (CN) adsorbées sur la surface de platine dans le cas de la monocouche de DTCN. En effet, le pic de l'azote, observé uniquement sur les spectres relatifs au DTCN, peut être décomposé en deux contributions localisées à 399,2 et 397,4 eV. Ces dernières correspondent respectivement à des entités cyanures physisorbées sur le métal et à des espèces intermédiaires $Pt(CN)_2^{2-}$ [42]. De plus, nous remarquons que le pic $C1s$ issu des SAM de DTCN présente également deux composantes distinctes à 285,0 et 286,8 eV provenant des liaisons $C-C$ de la chaîne aliphatique et de groupements CN, respectivement [51]. Dans le cas du DT,

le pic du carbone est quant à lui caractérisé par la seule contribution à 285,0 eV (liaisons $C-C$). Ces observations mènent bien à penser que des espèces CN demeurent effectivement sur la surface. Nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse que ces groupements cyanures adsorbés perturbent le processus d'auto-assemblage des SAM de DTCN, ce qui donne lieu à des couches moins denses et donc moins ordonnées.

Cette théorie semble être confirmée par les images STM que nous avons obtenues des monocouches auto-assemblées de DT et de DTCN sur platine. Celles-ci sont présentées à la figure 4.7. Les valeurs de tensions et de courants utilisés pour la réalisation de ces images sont respectivement de 950 mV et 10 pA dans le cas du DT et de 1000 mV et 2 pA dans celui du DTCN.

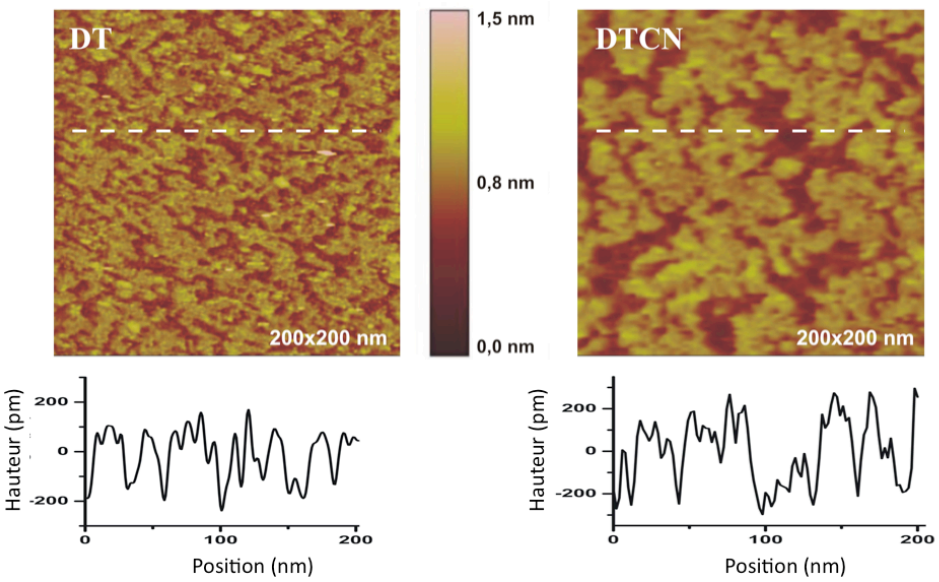


FIGURE 4.7 – *Images STM des monocouches auto-assemblées de DT et de DTCN adsorbées sur substrats de Pt(111). Les graphes du panneau inférieur représentent des coupes réalisées le long des lignes pointillées.*

Comme nous le voyons, ces deux images sont assez similaires. Dans les deux cas, la présence d'un dépôt est clairement visible sur le substrat. Malheureusement, nous n'avons pas pu atteindre une résolution moléculaire malgré un nombre considérable de tentatives. Malgré cela, ces images STM sont caractérisées par un contraste marqué entre deux couleurs, l'une claire, l'autre foncée. A partir de là, nous pouvons établir un taux de recouvrement moléculaire pour chaque système en utilisant un algorithme numérique simple (développé en *Matlab*). Pour ce faire, nous réalisons un histogramme de hauteur reprenant chaque pixel de l'image considérée (voir figure 4.8).

Plus précisément, l'échelle de hauteur des images STM est constituée de 256 niveaux de gris, chacun d'entre eux correspondant à une hauteur donnée. En comptant, pour chaque niveau, le nombre de points lui étant associés, nous obtenons alors l'histogramme de hauteur de l'image. Dans celui-ci, deux distributions gaussiennes peuvent être identifiées. Nous déterminons alors un seuil de hauteur à l'intersection de ces deux gaussiennes afin de réaliser une image à deux couleurs (noir et blanc). Le blanc est attribué aux pixels dont la hauteur est supérieure à ce seuil et il est représentatif des teintes claires observées dans l'image STM originale. Le noir quant à lui est associé aux valeurs de hauteur inférieures au seuil (teintes foncées). Ensuite, il nous suffit d'effectuer un comptage du nombre de pixels blancs et du nombre de pixels noirs. Le rapport de la première valeur par la seconde nous donne une estimation du taux de recouvrement observé sur les images. Celui-ci est alors estimé à 62% à partir de l'image de la monocouche de DTCN alors qu'il atteint 70% dans le cas du DT.

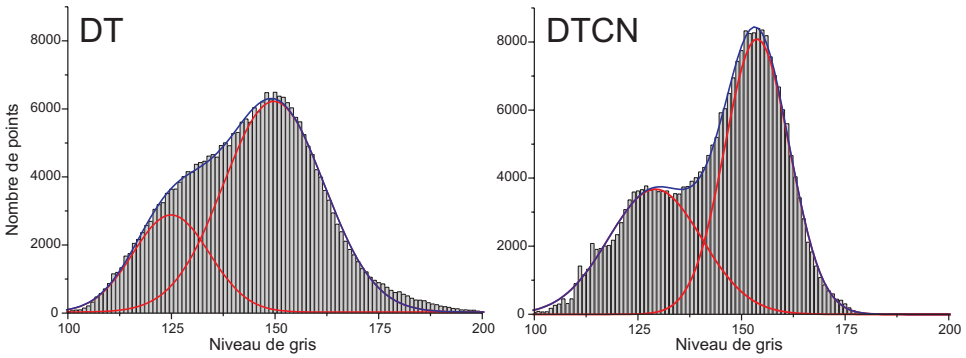


FIGURE 4.8 – *Histogrammes de hauteur calculés à partir des images présentées à la figure 4.7. Les lignes rouges représentent les contributions gaussiennes déduites des courbes bleues ajustées sur les histogrammes. Les valeurs de seuil utilisées pour le calcul du taux de recouvrement sont données par l'intersection entre les gaussiennes.*

A ce stade, il est nécessaire d'émettre quelques réserves par rapport à la nature réelle de ces pourcentages car les valeurs calculées semblent trop petites par rapport à celles que nous pouvons trouver dans la littérature pour des systèmes similaires, à savoir des alcanethiols adsorbés sur surfaces d'or [52][53] ou de platine [54][55][56]. De prime abord, nous pourrions penser que ces deux teintes représentent d'une part les molécules adsorbées de manière transversale et d'autre part, le substrat nu. Dans ce cas simple, les pourcentages calculés correspondraient alors directement aux taux réels de recouvrement moléculaire. Cependant, les coupes réalisées le long des lignes pointillées de la figure 4.7 suggèrent que la différence de hauteur entre les contrastes clair et foncé est de l'ordre de 5 Å dans les deux cas. Celle-ci

étant beaucoup plus faible que la longueur réelle de la molécule (environ 16 Å), nous devons écarter cette hypothèse. Ce grand écart de taille apparente est toutefois à relativiser car certains travaux ont montré que les hauteurs déduites à partir de mesures STM sont généralement différentes des dimensions physiques de l'adsorbat moléculaire. En effet, une image STM représente une convolution entre les structures topographique et électronique du système étudié [57]. Dans notre cas, les différences entre les constantes de décroissance du courant tunnel de l'air et de la monocouche affectent les dimensions mesurées, comme cela a été décrit par Bumm *et al.* [58]. Malgré cela, les variations de tailles observées ici restent supérieures à ce que nous pouvions attendre. Nous devons donc considérer l'hypothèse de la coexistence de phases de hauteurs différentes sur nos échantillons. Dans ce postulat, les contrastes apparaissant sur les images sont tous deux induits par les molécules mais ces dernières sont adsorbées de manière différente. En particulier, nous pouvons imaginer une phase où les chaînes carbonées se tiennent transversalement au substrat alors que l'autre phase impliquerait des molécules plutôt couchées, comme cela est fréquemment observé par STM ou AFM sur des systèmes similaires [59][60]. Quoi qu'il en soit, les images STM présentées ici confirment la présence d'une couche moléculaire sur la surface de platine pour les deux systèmes investigués. Elles montrent également que, dans le cas du DT, une plus grande proportion de molécules adopte une configuration transversale par comparaison avec le DTCN.

Sur base de toutes ces informations, nous pouvons maintenant tenter de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage qui entrent en jeu lors de la formation des monocouches de DTCN. Ciszek *et al.* ont montré que l'adsorption de ces molécules sur une surface d'or se produit via une réduction des thiocyanates induite par la surface et permettant au soufre de se lier de manière covalente [41]. Dans une seconde étape, des fonctions cyanures sont relâchées sous la forme d'espèces $[Au(CN)_2]^-$. Nous proposons donc un mécanisme similaire pour la formation de monocouches auto-assemblées de DTCN sur substrat de platine. Cependant, dans notre cas, les mesures XPS nous indiquent que ces couches sont partiellement composées d'ions cyanures. La présence de telles espèces n'est pas observée quand des surfaces d'or sont utilisées, comme confirmé par d'autres mesures XPS et infrarouge [61]. Du fait de l'importance des espèces cyanures adsorbées dans la synthèse de l'acide cyanhydrique (HCN) par le procédé d'Andrussow [62], il existe dans la littérature bon nombre de travaux qui démontrent l'existence d'une affinité particulière de ce type de groupement pour les interfaces de platine [63][64][65]. Nous pouvons dès lors conclure que ceux-ci restent piégés sur la surface du métal. Ils agissent alors comme contaminants et perturbent le processus normal d'assemblage des molécules de DTCN, ce qui donne lieu à un taux de recouvrement moléculaire plus faible comme confirmé par les images STM. Il en résulte que la distance moyenne entre deux chaînes carbonées

adjacentes est plus grande, ce qui signifie une diminution des interactions de van der Waals inter-moléculaires. Tout ceci mène à une organisation de moindre qualité induisant plus de défauts gauches dans la structure de la couche comme nous avons pu l'observer sur les spectres SFG. La figure 4.9 présente une illustration schématique du mécanisme d'adsorption et d'assemblage des molécules de DTCN discuté ci-dessus.

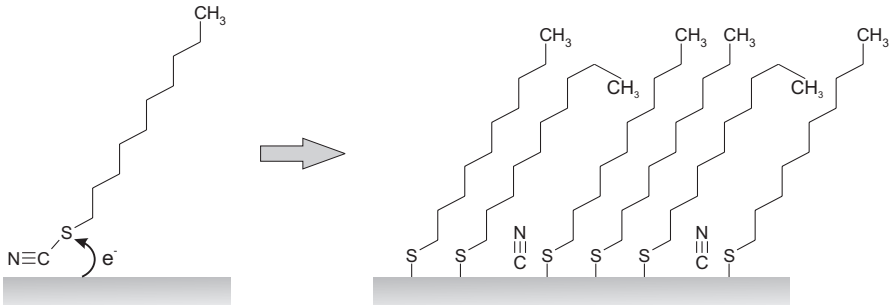


FIGURE 4.9 – *Illustration schématique du mécanisme d'adsorption et d'assemblage des molécules de DTCN sur platine.*

4.5 Conclusions

Pour conclure, nous pouvons dire que tous les résultats présentés ici confirment la formation d'une monocouche auto-assemblée lorsque la surface de platine est exposée à des molécules de décanethiol ou de décyl thiocyanate. Par ailleurs, la comparaison des intensités des résonances observées sur les spectres SFG indique que les SAM de DT sont plus ordonnées que celles de DTCN. Les images STM confirment cette hypothèse en mettant en évidence un taux de recouvrement plus faible dans le second cas. Pour finir, les mesures XPS montrent que des espèces cyanures restent sur la surface de l'échantillon lors de l'utilisation de molécules de DTCN. Celles-ci agissent alors comme un agent perturbateur dans le processus d'auto-assemblage, ce qui se traduit par une structure moins organisée dans la monocouche. Néanmoins, l'assemblage par fonctions thiocyanates reste une bonne alternative aux groupements thiols pour les applications pour lesquelles l'ordre de la monocouche n'est pas essentiel, comme par exemple l'immobilisation de grandes molécules, ou encore pour lesquelles la synthèse du groupement thiol sur les molécules utilisées est problématique. Par ailleurs, des études futures pourront éventuellement s'attacher à améliorer la qualité des monocouches de DTCN en jouant sur certains paramètres expérimentaux. Contrôler la température de la solution pendant la chimisorption est, par exemple, une piste à suivre.

Quoi qu'il en soit, le travail présenté dans ce chapitre nous montre l'apport potentiel de la spectroscopie de génération de fréquence-somme dans l'étude de monocouches organiques. En plus des informations vibrationnelles obtenues, nous avons pu voir comment une approche qualitative de l'organisation moléculaire a été menée. Cette étude souligne également la complémentarité des différentes techniques d'analyse de surface à notre disposition qui permettent une approche plus globale de la problématique investiguée.

Chapitre 5

Les biocapteurs

5.1 Introduction

Tout comme les canaris utilisés autrefois dans les mines afin de détecter les poches de gaz mortel, un *capteur* est un dispositif qui répond à la présence d'une substance particulière avec une sensibilité bien supérieure à la nôtre. Aujourd'hui, ce type d'équipement est largement utilisé dans notre technologie moderne et peut être conçu pour la détection d'agents chimiques, tels que des gaz ou des polluants, mais aussi pour celle d'espèces biologiques données. On parle alors de *biocapteurs*.

Historiquement, le premier biocapteur répertorié a été mis au point par Leland C. Clark dans les années 1950. Ce dernier est d'ailleurs considéré comme le « père des biocapteurs » pour son article sur les électrodes oxygénées publié en 1956 qui décrivait un dispositif permettant la mesure du taux d'oxygène dans le sang, l'eau ou d'autres liquides [66]. Quelques années plus tard, il détourna légèrement le principe de ses électrodes pour permettre la mesure du taux de glucose à la place de celui d'oxygène [67]. Ce principe est aujourd'hui mis en application quotidiennement par des millions de diabétiques à travers le monde lors de leurs tests de glycémie.

Ces dernières années, les biocapteurs ont connu un essor considérable. En effet, ils permettent des analyses rapides et fiables à faibles coûts et sont maintenant utilisés de manière routinière dans bon nombre de domaines d'utilité publique comme la santé, l'agro-alimentaire ou encore le contrôle de l'environnement. Toujours plus complexe et plus miniaturisée, cette technologie se présente par ailleurs comme interdisciplinaire par essence puisqu'elle nécessite l'intervention de disciplines scientifiques variées telles que la biologie moléculaire, la microélectronique, l'optique ou encore l'informatique. Actuellement, si les biocapteurs modernes peuvent prendre des formes très différentes, ils reposent toujours sur un principe commun : transformer l'événement de reconnaissance moléculaire en un signal mesurable par un expérimentateur.

5.2 La reconnaissance moléculaire

La reconnaissance moléculaire est un mécanisme par lequel deux espèces chimiques ou biologiques peuvent s'associer de manière sélective. Ce phénomène repose sur deux caractères essentiels : *l'affinité* et *la spécificité*. L'affinité d'une interaction biologique correspond à la force de liaison entre les deux partenaires. La spécificité quant à elle est la capacité d'un des éléments à reconnaître uniquement son partenaire de prédilection parmi des espèces chimiques proches. Il s'agit d'une caractéristique radicalement différente et indépendante de l'affinité. En effet, une bonne spécificité n'implique pas forcément une forte affinité. La reconnaissance moléculaire joue un grand rôle dans bon nombre de phénomènes naturels depuis la nuit des temps. En particulier, ces interactions occupent une place majeure dans les processus biologiques. La transmission des signaux cellulaires, la régulation de la transcription, la formation de complexes macromoléculaires fonctionnels comme les ribosomes et les réactions de défense de l'organisme (reconnaissance immunitaire) sont quelques exemples qui mettent en évidence l'importance de ce phénomène.

Par ailleurs, ce mécanisme est aujourd'hui de plus en plus exploité dans notre technologie moderne, en particulier comme nous l'avons vu, dans le développement des biocapteurs. Dans ce cadre, la reconnaissance spécifique est utilisée pour détecter sélectivement une espèce moléculaire donnée. Dans ce type de système, si la nature s'occupe elle-même de réaliser cette reconnaissance, c'est au monde scientifique qu'il revient de concevoir un outil technique expérimental permettant d'en détecter l'occurrence. De nos jours, beaucoup de techniques analytiques sont capables de déceler l'événement de reconnaissance moléculaire. Elles peuvent être utilisées pour l'analyse du phénomène de reconnaissance en lui-même (savoir si telle molécule interagit avec telle autre) ou pour la mesure de la concentration d'une molécule cible particulière.

5.3 Mais qu'est-ce qu'un biocapteur ?

De manière générale un biocapteur est un dispositif permettant la détection d'une espèce biologique donnée (l'analyte) par l'intermédiaire du phénomène de reconnaissance moléculaire. Il en existe de nombreuses formes mais tous reprennent systématiquement deux éléments communs dans leur conception. D'une part, le coeur du capteur est constitué d'un *récepteur* qui est un élément biologique sensible au composé que nous souhaitons déceler. D'autre part, il est nécessaire de coupler ce récepteur avec un *transducteur* physique qui transforme la réponse biologique en un autre type de signal qui peut être mesuré voire quantifié. Si certains biocapteurs réalisent ce processus dans le volume d'une solution, la plupart impliquent une interface

solide/gaz ou solide/liquide. On parle alors de biocapteurs *hétérogènes* ou *interfaciaux*. Il s'agit donc bien ici de contrôler des phénomènes de surface.

Pratiquement, un biocapteur hétérogène ou interfacial est, au sens où nous l'entendons, composé d'une monocouche de molécules biologiques « sondes » adsorbées de manière covalente sur une surface et obligatoirement dotées d'une certaine affinité pour une autre espèce biologique bien particulière. En présence d'une solution de molécules « cibles », ce dispositif réagit ou non en fonction de la présence ou de l'absence de reconnaissance moléculaire entre les deux espèces (voir figure 5.1). Pour que le dispositif soit efficace, il semble évident qu'il ne doit pas réagir lorsque la molécule cible n'est pas celle pour laquelle le système a été conçu. Cette propriété, véritable clé de voûte du processus, est appelée la *sélectivité* du biocapteur. Cette caractéristique dépend bien sûr de la spécificité de l'interaction entre les deux partenaires moléculaires mais est également fonction de la capacité de la technique de détection à ne pas fournir des *faux-positifs* (un résultat déclaré positif à tort). Comme nous le constaterons plus tard, nous avons, au cours de nos expériences, ménagé une procédure particulière pour tester la sélectivité de nos capteurs.

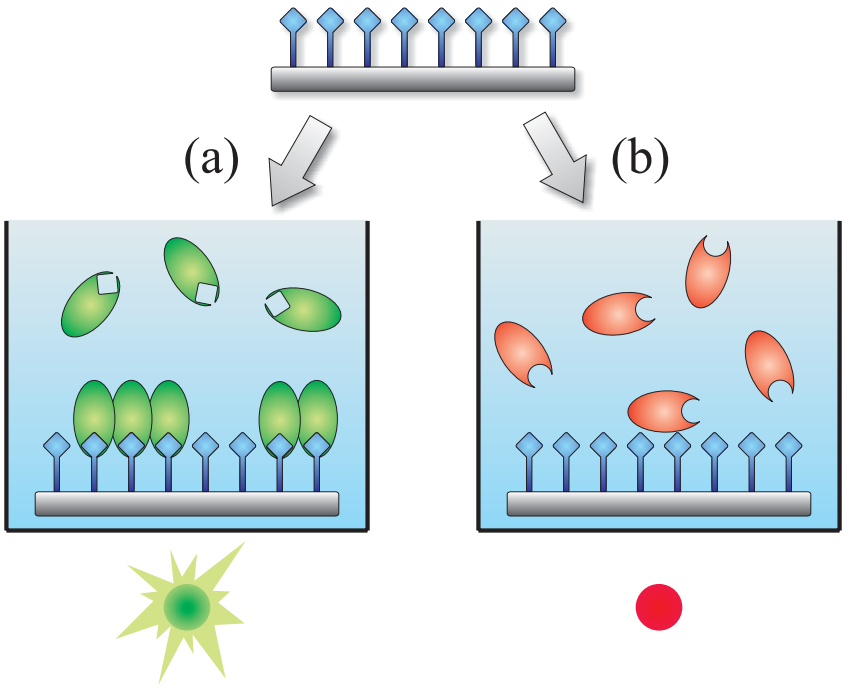


FIGURE 5.1 – *Représentation schématique d'un biocapteur (a) en présence d'une solution de molécules cibles présentant une affinité pour les sondes ; (b) en présence d'une solution de molécules cibles ne présentant pas d'affinité.*

Une autre propriété importante des biocapteurs est leur *sensibilité*, c'est-à-dire leur capacité à détecter une molécule cible dans une solution de basse concentration. Il va sans dire que plus la reconnaissance entre les deux molécules en présence se fait à concentration faible, plus la sensibilité du capteur est grande. Remarquons que ces deux caractéristiques des biocapteurs, la sensibilité et la sélectivité sont principalement déterminées par le choix des molécules sondes en fonction des molécules cibles que nous souhaitons détecter (de par l'affinité et la spécificité existant entre les deux partenaires).

Afin de mieux comprendre le principe et la puissance d'un tel dispositif, nous nous proposons d'expliquer sommairement le fonctionnement d'un des biocapteurs les plus célèbres, le capteur ADN. Comme chacun sait, l'ADN ou acide désoxyribonucléique est le support de l'information génétique au sein du vivant. C'est une macromolécule qui adopte une structure particulière : deux brins se faisant face et formant une double hélice. Chacun de ces brins est composé d'une séquence de nucléotides eux-mêmes composés d'un groupement phosphate, d'un sucre (désoxyribose) et d'une base azotée. Il existe quatre bases azotées différentes : l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine et chacune d'entre elles peut s'apparier avec une autre par formation de liaisons hydrogène. On dit alors qu'elles sont *complémentaires*. En particulier, l'adénine reconnaît la thymine et la cytosine s'apparie avec la guanine. Il en résulte que deux brins d'ADN dont les séquences respectives sont tout à fait complémentaires possèdent une certaine affinité l'un pour l'autre. Ils sont alors capables de s'hybrider afin de former la structure en double hélice caractéristique de la molécule complète.

Un capteur ADN fonctionnel est composé d'une multitude de petits biocapteurs répartis sur une surface sous forme de plots. Chacun de ces plots porte des ADN simples brins sondes dont la séquence est connue par l'expérimentateur. On parle alors de *damier ADN*. Ce dispositif est alors placé en présence d'une solution contenant des séquences cibles d'ADN simples brins, cette fois-ci inconnues de l'expérimentateur. Comme le veut la reconnaissance moléculaire, les ADN cibles vont venir s'hybrider aux ADN sondes si et seulement si ces derniers sont complémentaires. En examinant quels plots ont effectivement réagi, l'expérimentateur peut alors déterminer quelles étaient les séquences d'ADN inconnues dans la solution exposée au biocapteur. En simplifiant énormément la réalité biologique, nous pouvons par exemple prendre le cas concret d'un capteur portant des gènes (ou parties de gènes) connus de certaines maladies. En l'exposant alors au sang d'un patient, nous pouvons, en fonction de la réaction de certains plots, déterminer quels sont les gènes présents et de cette manière, dépister les pathologies dont le patient est atteint (voir figure 5.2).

L'utilisation des capteurs ADN est devenue incontournable vers la fin des années 1990 avec la mise en œuvre du *Human Genome Project* (HGP) qui visait à décrypter l'ensemble du génome humain à l'aide de tels dispositifs. Aujourd'hui, il en existe une multitude d'utilisations pratiques au sein

de notre vie quotidienne. Ils permettent par exemple de réaliser un profil génétique, des tests sanguins ou de paternité mais aussi de détecter l'origine de denrées alimentaires.

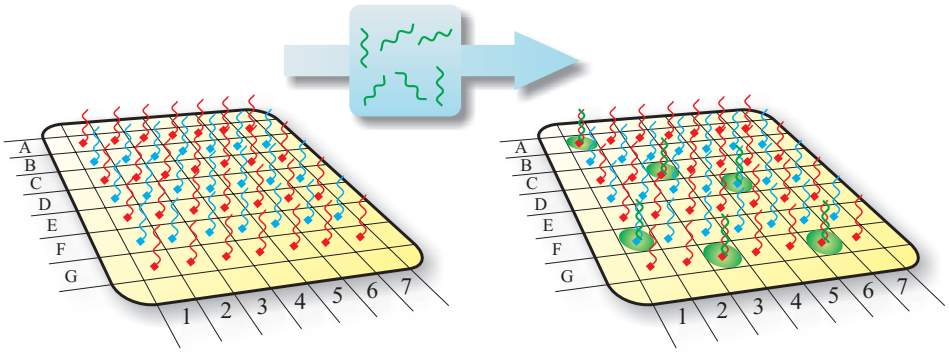


FIGURE 5.2 – *Représentation schématique d'un damier ADN avant et après interaction avec une solution d'ADN cibles. Dans ce cas, le biochip détecte la présence des gènes* $A1$*,* $C3$*,* $D5$*,* $F1$*,* $G3$ *et* $G6$*.*

5.4 Etat de l'art

Comme nous en avons déjà parlé brièvement, ces dernières années ont connu l'explosion du domaine des biocapteurs. Pour le grand public, cet essor se traduit d'abord au niveau industriel avec un marché mondial effectif de 6,1 milliards de dollars en 2004. Il serait estimé à 8,2 milliards de dollars pour l'année 2009 dont environ 97% seraient consacrés aux applications biomédicales des sciences de la vie [68]. Le monde scientifique n'est pas en reste puisque, de 1998 à 2004, on dénombre plus de 6000 publications et environ 1100 brevets relatifs aux biocapteurs [69]. Nous assistons même à la création de revues scientifiques exclusivement dédiées à la discipline telle que *Biosensors & Bioelectronics* dont le facteur d'impact a presque doublé au cours de ces cinq dernières années [70].

A l'heure actuelle, la grande majorité de l'effort scientifique réalisé dans la recherche et le développement de nouveaux biocapteurs peut être divisée en deux axes principaux. Tout d'abord, la mise au point de nouveaux récepteurs d'intérêt est investiguée, ce qui passe par la conception et la synthèse de nouvelles molécules sondes présentant de plus grandes affinités et de meilleures spécificités pour un analyte donné mais aussi par l'élaboration de nouvelles stratégies d'immobilisation de ces molécules sur la surface qui favorisent le processus de reconnaissance. Par ailleurs, des travaux considérables sont effectués sur le développement et l'amélioration des techniques analytiques qui jouent le rôle de transducteur en permettant la détection de

l'événement de reconnaissance moléculaire. En effet, il va sans dire qu'un biocapteur n'est rien sans un système de lecture efficace qui permet de déterminer si la reconnaissance a eu lieu. Si la première partie est plutôt du ressort des biologistes et des chimistes, la seconde incombe naturellement aux physiciens et aux ingénieurs.

Au vu de la grande variété de techniques de transduction actuellement utilisées dans le chef des biocapteurs, il est difficile d'en dresser une liste exhaustive. Nous pouvons toutefois regrouper la plupart d'entre elles en trois grandes familles distinctes : les méthodes électrochimiques, piézo-électriques et optiques. Ces trois groupes réunissent à eux seuls l'immense majorité des méthodes de détection décrites dans la littérature. Pour le reste, nous trouvons quelques techniques d'usage plus marginal qui sont basées sur d'autres phénomènes physiques comme la radioactivité ou le magnétisme par exemple.

Dans les capteurs de type électrochimique, la détection de la reconnaissance se réalise par la mesure des propriétés électriques à la surface d'une électrode sur laquelle est déposé le récepteur biologique. Cette mesure peut alors être basée sur une variation de tension entre les électrodes ou sur l'intensité du courant apparaissant à une tension donnée. Les biocapteurs basés sur ce principe sont largement utilisés au niveau appliqué de par leur simplicité et leur faible coût. Ils sont également faciles à miniaturiser ce qui facilite leur utilisation *in vivo*.

En ce qui concerne les dispositifs piézo-électriques, nous pouvons citer par exemple l'utilisation de la microbalance à quartz comme technique de détection. Cette dernière est composée principalement d'un matériau piézo-électrique (un cristal de quartz) sur lequel est adsorbé l'élément de reconnaissance. Une tension oscillante y est alors appliquée, ce qui induit une onde acoustique se propageant dans le cristal à la fréquence de résonance. L'interaction entre sonde et cible est détectée en mesurant les variations de cette fréquence induites par l'analyte qui se fixe à la surface du capteur en modifiant de ce fait l'épaisseur vue par l'onde acoustique. L'usage de ce type de dispositifs est assez répandu dans les laboratoires mais, nécessitant des instruments plus sophistiqués pour suivre le signal, ils sont plus difficilement miniaturisables en vue d'une application dans la vie quotidienne.

La dernière grande famille des méthodes de détection est celle des techniques à sondes optiques. Dans celles-ci, la nature du signal optique mesuré peut prendre bien des formes en fonction de l'outil mis en œuvre. L'absorbance, la fluorescence ou la variation locale de l'indice de réfraction en sont quelques exemples. Dans tous les cas, l'avantage majeur de ces méthodes réside dans le fait qu'elles peuvent permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons simultanément. Malheureusement, elles sont également peu adaptées à la miniaturisation, ce qui les confinent dans les laboratoires. A titre d'exemple, nous pouvons souligner quelques techniques optiques qui ont

été appliquées à la lecture de biocapteurs interfaciaux, avec plus ou moins de succès. Les plus courantes et les plus maîtrisées actuellement sont sans aucun doute la fluorescence [71][72] et la résonance de plasmon de surface [73][74]. Mentionnons également les méthodes basées sur la chimiluminescence [75] et la spectroscopie d'absorption visible - ultraviolette [76][77]. Plus récemment, des techniques comme la spectroscopie Raman [78][79] et la spectroscopie infrarouge [80][81] ont été appliquées à ce problème, avec l'avantage de procurer une information vibrationnelle supplémentaire. Ceci permet, outre la détection de la reconnaissance, d'identifier les espèces chimiques impliquées dans le processus.

Face à cette abondance de littérature et de techniques appliquées aux biocapteurs, nous pourrions penser que le tour de la question a été fait. Malgré cela, force est de constater qu'il reste toujours des défis à relever en matière de détection du processus de reconnaissance moléculaire. En effet, la plupart des méthodes mentionnées ci-dessus nécessitent l'utilisation de marqueurs moléculaires pour différencier la sonde de la cible, ce qui peut occasionner une perturbation du système biologique original. Par ailleurs, elles ne permettent pas de déduire d'informations sur la conformation moléculaire à la surface du capteur, ce qui peut s'avérer crucial pour discriminer les interactions spécifiques (que nous souhaitons détecter) des physisorptions indésirables mettant en jeu des liaisons faibles. Dans ce contexte, nous pouvons penser que les spectroscopies optiques non linéaires ont une carte à jouer au vu de leurs caractéristiques particulières introduites dans le chapitre précédent. L'objectif principal de ce travail consiste donc à appliquer une technique expérimentale inédite, la spectroscopie SFG, à la détection du phénomène de reconnaissance moléculaire dans des biocapteurs hétérogènes. Ces derniers s'inspirent de la structure classique employée dans la conception des capteurs de type interfaciaux qui sont les plus utilisés actuellement.

Chapitre 6

Un biocapteur modèle : le système Biotine/Avidine

6.1 Introduction

Pour effectuer nos premiers pas dans le monde des biocapteurs, il a semblé logique de débuter par l'étude d'un système modèle afin d'éprouver notre technique, la spectroscopie SFG, face à un premier « biocapteur-test ». Dans ce but, nous avons choisi de commencer par la caractérisation du complexe biotine-avidine. Ce système, très bien connu, a été énormément étudié et décrit dans la littérature [82][83][84] car l'avidine se lie à la biotine avec une des plus fortes affinités connues en biologie (constante de dissociation $K_d \sim 10^{-15}\ M$) [85]. Il constitue donc une sorte de standard en matière de reconnaissance moléculaire. Signalons par ailleurs que si le complexe biotine-avidine est dépendant de la force ionique du milieu, il est relativement stable sur une large gamme de pH et de température, ce qui en facilite grandement la manipulation expérimentale.

L'objectif de ce chapitre sera donc de montrer que la spectroscopie par génération de fréquence-somme est capable, en plus de fournir une information vibrationnelle de l'interface, de lire notre biocapteur modèle, c'est-à-dire de déterminer quand la reconnaissance moléculaire a effectivement eu lieu entre les deux partenaires. Dans le cas du système biotine-avidine, nous partons avec la certitude de la sélectivité et de la sensibilité du capteur au niveau des molécules en présence. Il nous reste à montrer que notre technique est capable d'en rendre compte sans nous fournir de résultats erronés. Pour la construction concrète de notre capteur-test, une monocouche de biotine sera utilisée comme récepteur afin de détecter la présence de molécules d'avidine destinées à jouer le rôle de cibles.

6.2 Présentation du système

6.2.1 La biotine

La biotine (vitamine H ou B8) est une vitamine hydrosoluble constituée d'un noyau imidazoline et d'un cycle tétrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de carbone (voir figure 6.1). Elle est stable à la chaleur et en solution aqueuse. De plus, elle est peu sensible à l'oxydation.

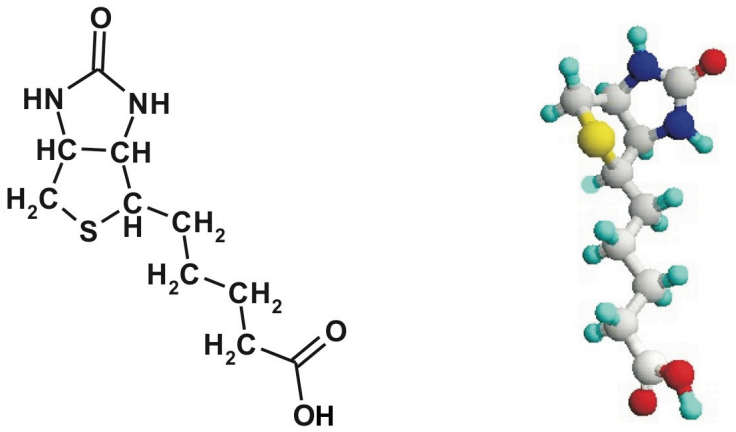


FIGURE 6.1 – *Représentations schématiques de la molécule de biotine* ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$).

Par définition, une molécule organique n'est pas une vitamine si l'organisme peut l'élaborer. Les vitamines font partie des nutriments essentiels bien qu'elles soient requises en très faibles quantités en comparaison des quantités nécessaires relativement grandes d'acides aminés essentiels et d'acides gras. Des doses infimes de vitamines suffisent car la majorité de ces molécules servent de coenzymes et ont par conséquent des fonctions catalytiques. Bien que nos besoins en vitamines s'avèrent modestes, ces molécules sont absolument essentielles. En effet, des carences peuvent causer des syndrômes graves. Ainsi, la première vitamine, la thiamine, fut découverte à la suite de recherches sur les causes d'une maladie mystérieuse, appelée *béribéri*, qui s'est avérée être la conséquence d'un manque de thiamine.

Jusqu'à présent, 13 vitamines essentielles pour les humains ont été dénombrées. Elles sont divisées en deux catégories : les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles. Les vitamines hydrosolubles comprennent les vitamines du complexe B, qui consistent en plusieurs composés servant généralement de coenzymes dans des processus métaboliques importants.

La biotine est entièrement apportée par l'alimentation. L'apport journalier moyen est de 3 à 6 microgrammes. Elle est présente dans de nombreux aliments : les fruits, les viandes (en particulier le foie). Les mécanismes

d'absorption de la biotine sont mal connus : il s'agirait sans doute d'un processus actif, dépendant du sodium et saturable. Le rôle de la biotine dans l'organisme est multiple ; elle intervient par exemple dans la synthèse des acides gras, comme coenzyme spécialisé dans le transport des radicaux CO_2 et dans la production d'énergie à partir du glucose et des acides aminés branchés, constituants majeurs du muscle. Les carences en biotine sont très rares chez l'adulte. Elles se voient seulement au cours d'une alimentation riche en avidine (blanc d'œuf cru). Cette vitamine est également utilisée en pharmacie pour traiter certaines alopécies (chute de cheveux). L'utilisation de la biotine à des fins thérapeutiques ne semble pas avoir provoqué d'effets indésirables [86].

6.2.2 La biocytine

Dans la nature, la biotine existe sous trois formes : la biotine libre, la biocytine de levure et la biotoprotéine (combinaison biotine-protéine). La biocytine, ou biotinyl L lysine, est la molécule que nous avons utilisée principalement dans nos expériences. Il s'agit simplement d'une biotine en liaison covalente avec un acide aminé essentiel : la lysine ou acide diaminocaproïque (voir figure 6.2).

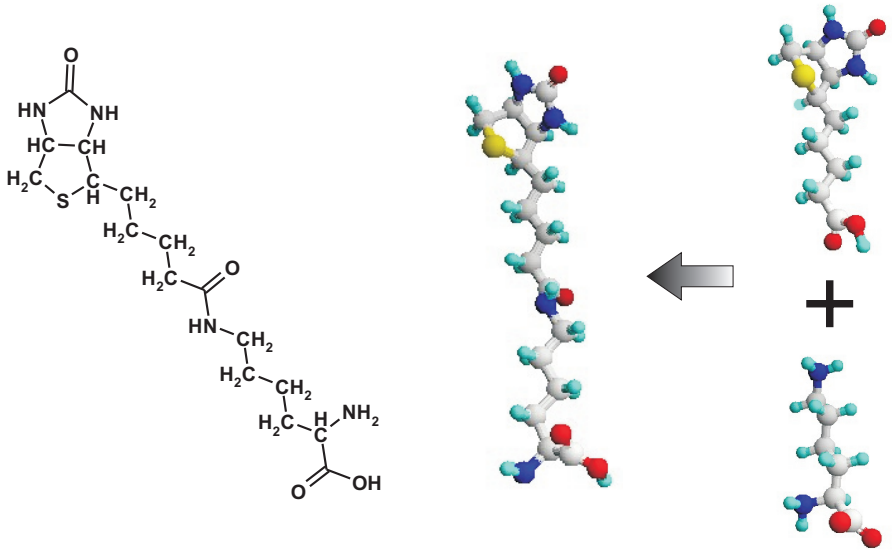


FIGURE 6.2 – *Représentations schématiques de la biocytine ($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) composée d'une biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) et d'une lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$).*

Dans la pratique, cette molécule possède les mêmes affinités que la biotine mais est plus favorable à la formation de monocouches auto-assemblées

car elle possède une chaîne carbonée plus longue rattachée à son cycle, ce qui favorise une meilleure organisation par interactions de van der Waals [81].

Comme nous le verrons par la suite, nous avons utilisé différents types de substrats pour former notre biocapteur modèle au cours de nos expériences. Si la biocytine avec son groupement terminal carboxylique peut directement être utilisée pour la formation de monocouches auto-assemblées sur des surfaces de type CaF_2 ou Ag [52][87], il n'en va pas de même pour les substrats métalliques comme l'Au ou le Pt. En effet, comme nous l'a montré le chapitre 4, il est plus favorable dans ce cas de figure d'utiliser un groupement terminal thiol. Afin d'utiliser la biocytine dans les meilleures conditions sur ce type de substrats, nous avons donc procédé à une modification chimique de notre molécule dans le but d'en changer le groupement terminal. Cette manipulation consiste simplement à faire réagir la biocytine avec une quantité équimolaire d'hydrochlorure de 2-iminothiolane pendant deux heures en présence de triéthylamine [88]. Nous obtenons alors un « thiol biotiné » que nous pouvons utiliser directement sur l'or et le platine pour la formation de monocouches auto-assemblées. Dans la suite de ce travail, nous l'écrirons « biotSH ».

6.2.3 L'avidine

Sur le plan de la structure, les protéines sont les molécules les plus complexes que nous connaissons. Tout comme leurs fonctions, leur structure varie considérablement. Mais bien qu'elles soient très diversifiées, les protéines sont toutes des polymères élaborés à partir des mêmes constituants, les acides aminés. L'avidine est une glycoprotéine que nous pouvons trouver dans le blanc d'œuf [84]. Elle fut découverte en 1940 par Esmond E. Snell qui constata des carences en biotine chez des individus dont le régime était constitué d'œuf cru et ce, malgré l'apport de cette vitamine dans leur alimentation [89]. Il en déduit donc la présence d'une espèce biologique capable de séquestrer la biotine.

L'avidine est constituée de quatre poches positionnées par paires sur les faces opposées de la protéine, ce qui lui confère une structure tétramérique (voir figure 6.3). Chacun de ces monomères est constitué d'une chaîne de 128 acides aminés (15.800 Da par monomère) et peut se lier à une molécule de biotine avec un très haut degré de spécificité. Comme nous l'avons déjà signalé ci-dessus, elle possède également une affinité particulièrement forte pour la biotine, pour laquelle la constante de dissociation est de trois ordres de grandeur supérieure aux constantes rencontrées habituellement en reconnaissance moléculaire, ce qui la classe parmi les interactions non covalentes les plus fortes connues à ce jour. De par ces particularités, l'avidine et ses dérivés, la streptavidine et la neutravidine, sont aujourd'hui largement employées en tandem avec la biotine dans la biotechnologie moderne, principalement comme agent de liaison entre différents composants biologiques.

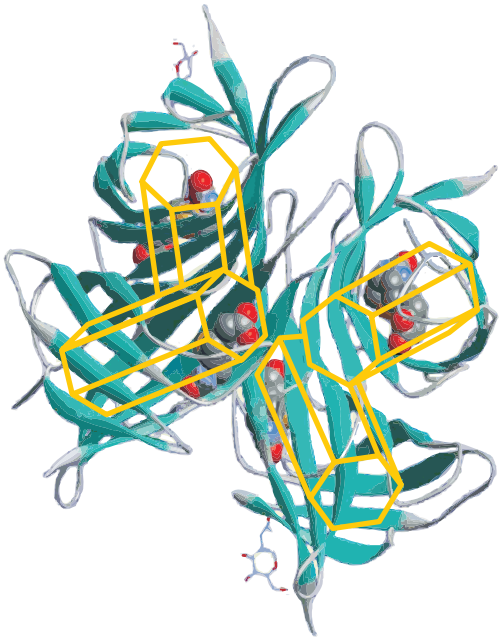


FIGURE 6.3 – *Structure tétramérique de l'avidine et représentation schématique des quatre monomères sous forme de prismes hexagonaux. Quatre molécules de biotine occupent les sites de liaison.*

6.3 Méthodologie

La démarche que nous avons suivie au cours de nos expériences comprend deux étapes. La première consiste à former des monocouches de molécules sondes (la biotine) sur divers substrats. Ces substrats sont ensuite étudiés par spectroscopie SFG, afin de déterminer si la couche est effectivement formée et organisée. La seconde étape vise à exposer ces différentes couches à différentes solutions de molécules cibles et à mettre en évidence la reconnaissance moléculaire s'il y a lieu. Dans le cas contraire, notre dispositif ne doit pas réagir afin de conserver la sélectivité du capteur.

Dans un premier temps, nous avons investigué les gammes spectrales les plus facilement accessibles à notre dispositif laser. Il s'agit de la gamme spectrale des $C-H$ s'étendant de 2800 à 3000 cm^{-1} et de la gamme spectrale des $N-H$ qui s'étend de 3000 à 3500 cm^{-1}. Afin d'obtenir un faisceau infrarouge accordable dans ces gammes de fréquences, nous avons utilisé le cristal non linéaire de $LiNbO_3$ qui est le plus aisé à mettre en œuvre expérimentalement. Une étude complémentaire dans d'autres gammes spectrales a été effectuée postérieurement dans le cadre d'un mémoire de licence par Damien Duvivier [90]. Signalons que toutes nos expériences ont été réalisées ex situ. Nous avons essayé de les reproduire in situ lors du contact avec la

solution de protéine mais sans parvenir à obtenir des résultats significatifs. En particulier lors de l'utilisation du prisme en configuration TIR, l'ajout d'une solution modifie l'indice de réfraction du milieu se trouvant derrière la surface, ce qui entraîne la perte des conditions de réflexion totale. Le champ électrique interfacial est donc réduit, donnant lieu à un signal SFG trop faible pour être détecté par notre dispositif.

6.4 Préparation des échantillons

En vue de préparer les échantillons, tous les substrats sont préalablement passés dans un bain à ultrasons avec de l'acétone, de l'éthanol et ensuite de l'eau milliQ pendant une dizaine de minutes. Pour les substrats en Ag(111) et en CaF_2, les films de biocytine sont réalisés par immersion dans une solution 10 mM de biocytine pendant deux heures. Le solvant utilisé est du trifluoroéthanol. Comme expliqué précédemment, les liaisons de la biocytine sur ce type de substrat interviennent via le groupement carboxylique. Pour l'Au(111) et le Pt(111), la BiotSH est utilisée à la place de la biocytine afin de tirer parti de son groupement thiol terminal. Un traitement chimique plus complexe est donc nécessaire. Nous utilisons la même solution de biocytine que nous mélangeons avec un volume équivalent de solution 10 mM d'hydrochlorure de 2-iminothiolane dans le même solvant. Nous terminons la réaction en ajoutant $1,4$ μl de triéthylamine par ml de solution totale. Notons que tous les échantillons sont abondamment rincés avec le solvant et séchés sous un flux d'azote pour éviter la formation de multicouches.

Après analyse de la monocouche de biocytine, les échantillons sont immergés dans une solution 10^{-5} M d'avidine dans une solution tampon de type HEPES (10^{-2} M, $pH \sim 7,4$) pendant 16 heures avant d'être, à leur tour, rincés et séchés. L'utilisation d'une solution tampon est souvent nécessaire lorsque nous travaillons avec des biomolécules afin de garantir qu'elles ne se dénatureront pas en raison d'un milieu trop acide ou salin par exemple.

6.5 Résultats expérimentaux

6.5.1 Spectres SFG sur substrats métalliques

La monocouche de biocytine

Avant de parler de reconnaissance moléculaire avec l'avidine, nous devons vérifier que la biocytine s'est effectivement déposée sur le substrat et qu'elle a bien formé une monocouche auto-assemblée organisée. Les spectres SFG de la biocytine adsorbée sur substrats métalliques (Pt, Au, Ag) sont présentés à la figure 6.4 qui nous montre la gamme spectrale des $C-H$ s'étendant de 2800 à 3000 cm^{-1}.

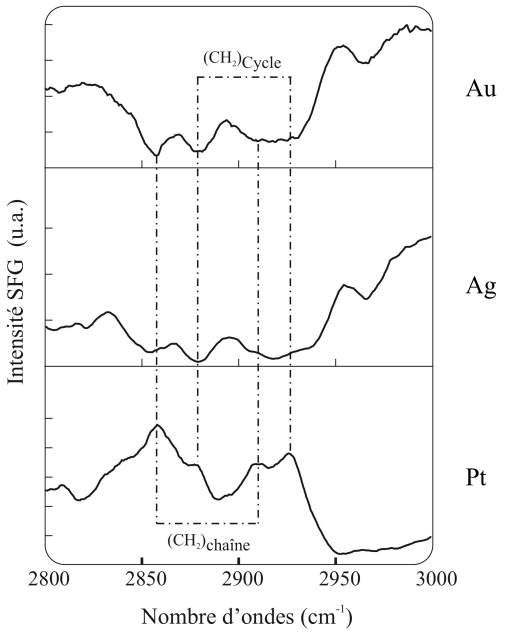


FIGURE 6.4 – *Spectres SFG de l'interface biocytine/métal.*

Le spectre de la biocytine sur le platine nous révèle quatre résonances à 2860, 2875, 2915 et 2930 cm^{-1}. Par comparaison avec le chapitre 4, nous assignons les deux pics à 2860 et 2915 cm^{-1} aux vibrations d'élongations symétrique et antisymétrique des groupements méthylènes disséminés sur la chaîne alcane de la molécule. Bien que l'observation de ces modes est significative de la présence de défauts gauches dans l'adsorbat moléculaire, nous pouvons également en déduire la formation d'une monocouche relativement organisée en surface de l'échantillon. Les deux résonances à 2875 et 2930 cm^{-1} sont, quant à elles, attribuées aux vibrations d'élongations symétrique et antisymétrique du groupement méthylène du cycle tétrahydrothiophène. L'augmentation de la fréquence de vibration de ce groupement CH_2 par rapport à ceux de la chaîne alcane vient du fait que ce dernier est lié à un atome de soufre. En effet, l'énergie de liaison $C-S$ est plus faible que celle d'une liaison $C-C$, ce qui entraîne plus de contraintes sur le groupement considéré. L'observation de ces résonances indique que tous les CH_2 de cycle pointent globalement dans la même direction. Comme ces derniers font partie intégrante de ce cycle situé à l'apex de la molécule, nous obtenons une confirmation supplémentaire quant à l'ordre de la monocouche. Notons également que dans la gamme des $N-H$, aucune résonance n'a été observée au cours de nos analyses (données non présentées).

En ce qui concerne les substrats d'or et d'argent, nous pouvons globalement observer les mêmes structures et donc tirer les mêmes conclu-

sions. Nous remarquons cependant quelques petites différences. Premièrement, nous observons un léger déplacement en fréquence de certaines vibrations CH_2. Ceci est dû aux interactions de van der Waals entre les chaînes qui varient en fonction du substrat. Deuxièmement, nous observons clairement la différence de fond non résonant et l'influence du terme d'interférence dont nous avons parlé précédemment. En effet, les résonances deviennent des creux suite aux interférences avec la réponse non linéaire du métal. Remarquons également qu'il existe une autre petite différence avec le cas du platine. En effet, nous observons l'apparition d'une nouvelle structure spectrale à 2965 cm^{-1} qui est sans doute induite par une différence d'ordre dans le film.

Interaction avec l'avidine

Les monocouches de biocytine adsorbées sur substrats métalliques sont ensuite exposées à la solution d'avidine. Les spectres réalisés sur de tels systèmes sont présentés à la figure 6.5.

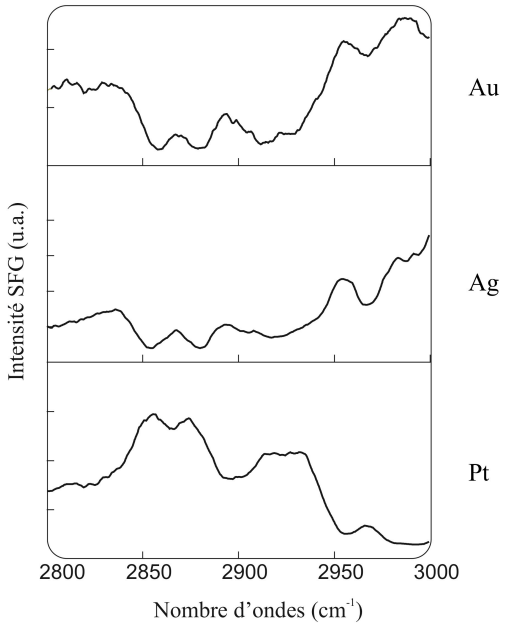


FIGURE 6.5 – *Spectres SFG de l'interface biocytine/métal après immersion dans une solution d'avidine.*

La première chose que nous remarquons est que les spectres réalisés sur l'or et l'argent ne sont pas modifiés. Ce qui signifie qu'il n'y a pas de reconnaissance moléculaire ou du moins, qu'elle n'est pas détectée. Dans le cas du platine, nous observons de légères modifications qui peuvent être interprétées comme une interaction entre cible et sonde ou comme une ré-

organisation dans la couche de biocytine. Malheureusement, les effets sont trop faibles pour pouvoir affirmer que la reconnaissance moléculaire a bien eu lieu entre la cible et la sonde. La raison la plus probable de cette absence de changement dans les spectres est sans doute la dénaturation de la protéine par les faisceaux lasers utilisés pour générer la SFG. Dans cet ordre d'idées, la configuration TIR semble prometteuse puisque dans ce cas, l'interface n'est plus sondée directement par les faisceaux lasers incidents mais par l'onde évanescente résultant de la réflexion totale.

6.5.2 Spectres SFG sur CaF_2

La monocouche de biocytine

Nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment mais en utilisant des prismes en CaF_2 comme substrats. Après immersion dans la solution de biocytine, nous obtenons le spectre présenté à la figure 6.6. Comme nous pouvons rapidement nous en rendre compte, nous observons les mêmes résonances que celles mises en évidence sur les substrats métalliques. Encore une fois, la gamme spectrale des $N-H$ est dépouillée de toute résonance. Nous pouvons donc en tirer les mêmes conclusions et en déduire qu'une monocouche orientée de biocytine, comportant toutefois un certain nombre de défauts gauches, s'est effectivement formée sur la base du prisme.

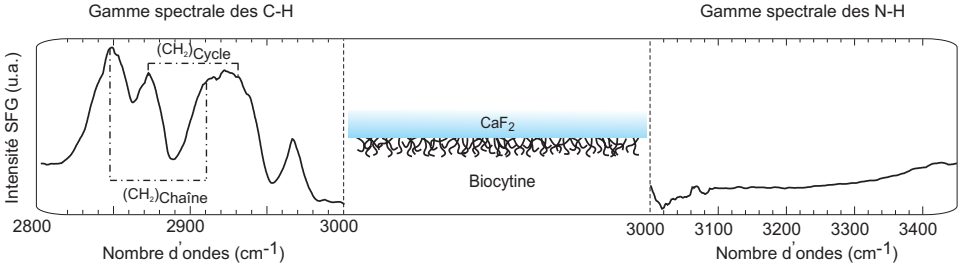


FIGURE 6.6 – *Spectres SFG de l'interface biocytine/CaF_2.*

Interaction avec l'avidine

Après interaction avec la solution d'avidine, nous observons des modifications significatives dans le spectre SFG qui attestent de la reconnaissance moléculaire entre les deux espèces biologiques en présence (voir figure 6.7).

Tout d'abord, nous remarquons, dans la gamme des vibrations $C-H$, l'atténuation drastique des résonances précédemment associées aux vibrations des CH_2 de chaîne à 2850 et 2915 cm^{-1}, ce qui indique une réorganisation de la couche de biocytine. En effet, ceci traduit la disparition des

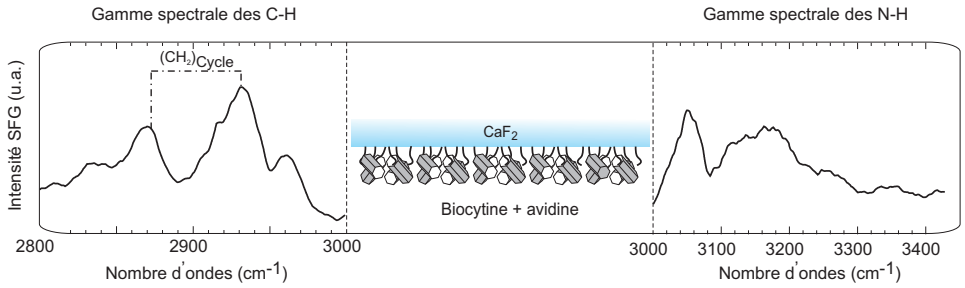


FIGURE 6.7 – *Spectres SFG de l'interface biocytine/CaF_2 après immersion dans une solution d'avidine.*

défauts gauches responsables de l'activation de ces vibrations. Plus précisément, dans le but de concorder avec la poche de liaison de l'avidine, la chaîne alcane de la biocytine doit passer en conformation *all-trans*. Dans ce cas, tous les CH_2 de chaîne s'alignent parfaitement de manière symétrique le long de l'axe de la molécule et constituent un milieu centrosymétrique et donc inactif en SFG. Par contre, les résonances associées aux CH_2 de cycle ne sont pas affectées par cette réorganisation comme le montrent les résultats expérimentaux.

Par ailleurs, la modification la plus révélatrice est l'apparition dans la gamme des $N-H$ de deux nouvelles résonances à 3050 et 3150 cm^{-1}. Au regard de la grande complexité d'un système comportant une vitamine imbriquée dans une protéine, il est difficile de trouver une interprétation à ces pics qui ne présente aucune ambiguïté. Nous pouvons cependant émettre des hypothèses quant à l'assignation de ces résonances en considérant plus en détail la poche de liaison de l'avidine lorsqu'une biocytine vient s'y fixer (voir figure 6.8).

La fréquence du pic apparaissant à 3050 cm^{-1} est caractéristique d'une vibration CH de cycle et peut donc être attribuée aux groupements de ce type en présence. Ils sont au nombre de deux, à savoir d'une part, les CH que possède la biocytine dans son cycle et d'autre part, un groupement CH aromatique présent dans l'acide aminé $Tyr33$ de l'avidine. La première hypothèse semblerait la plus convaincante si nous en croyons les spectres infrarouges réalisés sur de la biocytine en phase condensée qui présentent également cette résonance. Dans les deux cas, l'activation en SFG d'un tel groupement réside sûrement dans un changement de conformation généré par l'interaction entre la sonde et la cible. Celui-ci confère une orientation particulière au groupement incriminé, ce qui contribue à un gain de cohérence qui se traduit par un signal SFG démultiplié.

En ce qui concerne la large résonance apparaissant à 3150 cm^{-1}, nous pouvons élaborer le même type de déduction. En effet, cette vibration se situant dans le domaine caractéristique des vibrations des groupements $N-H$,

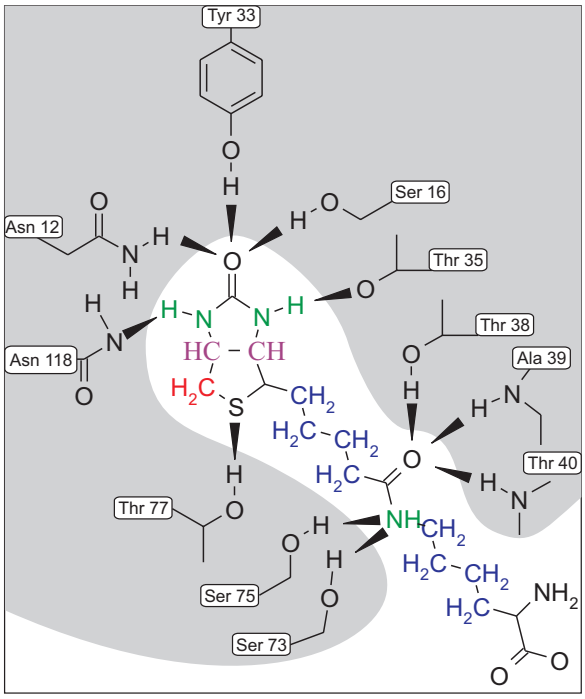


FIGURE 6.8 – *Schéma de principe de la poche de liaison de l'avidine en interaction avec une biocytine montrant les acides aminés intervenant dans les liaisons par ponts hydrogène [91].*

il nous reste à identifier les atomes d'azote en présence. En procédant par élimination, nous pouvons déjà exclure le groupement amine situé au pied de la molécule de biocytine car celui-ci ne prend pas part au processus d'interaction avec la protéine. Nous pouvons également rejeter tous les $N-H$ de l'avidine qui n'y sont pas non plus impliqués. En effet, ces derniers sont observés en FT-IRRAS autour de 3300 cm^{-1} mais pas en SFG puisqu'ils sont distribués aléatoirement dans la protéine, ce qui les rend presque centrosymétriques. Par contre, tous les acides aminés impliqués dans la liaison avec la biocytine sont à considérer car ils possèdent un tel groupement et peuvent être orientés suite au processus de reconnaissance. De plus, leurs groupements $N-H$ sont pour la plupart engagés dans des ponts hydrogène avec la biocytine, ce qui peut expliquer ce déplacement en fréquence de la vibration. Les derniers atomes d'azote à considérer sont ceux de la biocytine elle-même. Ceux-ci sont impliqués dans la liaison avec l'avidine. Nous avons d'une part, les deux $N-H$ présents dans le cycle terminal et d'autre part, l'amide secondaire présente sur le squelette de la molécule. Comme précédemment, nous pouvons dire que ces derniers n'apparaissaient pas dans les spectres SFG de la monocouche de biocytine à cause d'un manque d'organi-

sation mais que, suite à la réorientation de la couche et à l'interaction avec la protéine, ils deviennent actifs pour un processus du second ordre. Remarquons que ces derniers sont également impliqués dans des ponts hydrogène avec les acides aminés de la protéine. Notons également que, étant donné la largeur de la résonance, il est fort probable que cette dernière soit constituée de plusieurs contributions relatives aux différentes hypothèses émises ci-dessus.

Même si nous ne pouvons pas réellement établir avec certitude ni l'origine de ces deux résonances, ni leur provenance de la biocytine et/ou de l'avidine, nous pouvons par contre affirmer qu'elles résultent de l'interaction entre les deux espèces biologiques. Ceci nous convient parfaitement puisque c'est précisément cette interaction que nous voulons mettre en évidence à l'aide de notre technique et non la présence de telle ou telle molécule qui est évidente puisque nous avons préparé les échantillons dans cette optique. La spectroscopie SFG est donc capable de détecter le processus de reconnaissance moléculaire. Il nous reste à montrer qu'elle est également capable de rendre compte de la sélectivité de cette interaction.

6.5.3 Sélectivité du capteur

Comme nous l'avons déjà précisé précédemment, nous savons que le système biotine-avidine interagit de manière spécifique. Nous devons cependant montrer que la spectroscopie SFG est sensible à cette sélectivité. Pour ce faire, nous avons utilisé d'autres molécules cibles qui ne présentent pas d'affinité particulière pour la biocytine ou qui ne peuvent interagir avec celle-ci. Le résultat escompté pour cette expérience est paradoxalement une absence de résultat puisque nous ne souhaitons pas que notre dispositif détecte une reconnaissance qui n'a pas lieu.

Dans un premier temps, nous avons donc reconduit nos expériences en utilisant à nouveau l'avidine comme molécule cible. Cependant, afin d'empêcher cette dernière d'interagir avec la monocouche de biocytine, nous l'avons préalablement saturée, c'est-à-dire que nous avons bloqué ses quatre poches de liaisons avec quatre molécules de biotine afin de la rendre inactive, faute de site de liaisons disponibles. Pour réaliser cette procédure, nous avons préparé une solution d'avidine selon la méthode décrite précédemment. Nous y avons ensuite ajouté des molécules de biotine en excès, c'est-à-dire plus de quatre équimolaires, afin d'être certains que tous les sites actifs de la protéine soient effectivement occupés.

En second lieu, nous avons utilisé comme molécule cible une autre protéine proche de l'avidine. Il s'agit de la bovidine (BSA - *Bovine Serum Albumin*) qui est une protéine jouant un rôle important dans le maintien du pH du sang. Elle possède un poids moléculaire et un point isoélectrique (pH pour lequel la charge globale de la protéine est nulle) proches de ceux de l'avidine mais ne possède aucune affinité particulière pour la biocytine.

La BSA possède une réputation de protéine « collante », c'est-à-dire qu'elle se dépose sur tout type de surface par le biais de physisorptions non spécifiques. Il ne fait donc aucun doute qu'il en subsistera sur notre surface après exposition de la monocouche de biocytine à notre solution de BSA. Malgré cela, il est à espérer que, même dans ces conditions extrêmes, la spectroscopie SFG ne détectera pas une reconnaissance erronée. Pratiquement, la BSA nécessite les mêmes conditions environnementales que l'avidine et nous pouvons donc utiliser la même procédure que pour cette dernière en ce qui concerne la préparation de la solution cible.

Les spectres SFG obtenus après immersion de la monocouche de biocytine dans ces deux nouvelles solutions de molécules cibles sont présentés dans le tableau récapitulatif de la figure 6.9.

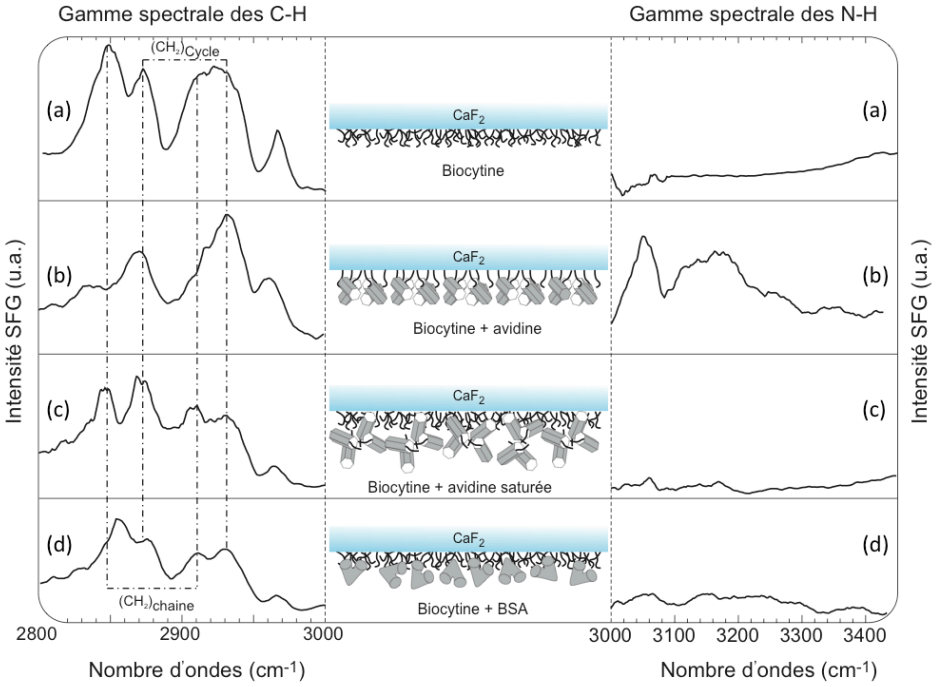


FIGURE 6.9 – *Tableau récapitulatif des spectres SFG obtenus sur substrat de CaF_2 (a) après formation de la monocouche de biocytine et après immersion de cette couche (b) dans une solution d'avidine ; (c) dans une solution d'avidine saturée ; (d) dans une solution de BSA.*

Comme nous pouvons le constater, nous y observons les mêmes structures que celles apparaissant sur les spectres de la monocouche seule. De plus, les résonances mises en évidence dans la gamme des vibrations $N-H$ après utilisation de l'avidine n'apparaissent pas. Ceci signifie que même si certaines molécules cibles se sont déposées sur la surface, elles ne donnent

pas de signal SFG, faute d'interaction cohérente avec la monocouche auto-assemblée de molécules sondes. En réalité, il subsiste sans doute un tel dépôt, en particulier dans le cas de la bovidine, mais celui-ci est complètement désordonné et donc globalement centrosymétrique. Cette constatation fait de la spectroscopie SFG une technique, non seulement sensible au processus de reconnaissance moléculaire, mais aussi capable de rendre compte de la sélectivité d'un tel processus, ce qui est capital dans le chef des biocapteurs.

6.5.4 Comparaison avec les spectres infrarouges

Au vu de l'interprétation des spectres SFG développée précédemment, nous estimons que l'analyse complémentaire des spectres infrarouges peut s'avérer très intéressante. Dans cette optique, nous avons réalisé la même série d'expériences que celle décrite ci-dessus en utilisant la technique FT-IRRAS (voir annexe A.2) à l'exception de la série de mesures impliquant la bovidine qui n'a pas été reproduite. Nous présentons dans ce paragraphe quelques observations supplémentaires déduites de l'analyse de tels spectres. Notons par ailleurs que les spectres infrarouges présentés ici ont été réalisés au *Laboratoire de Réactivité de Surface* de Jussieu (Paris).

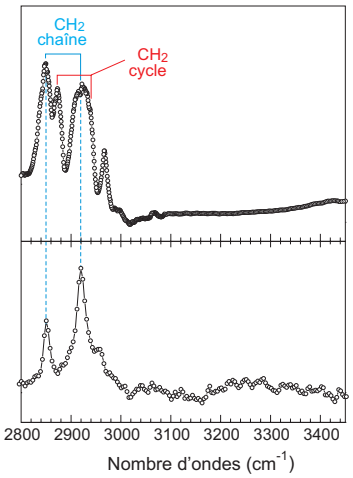


FIGURE 6.10 – *Comparaison entre les spectres SFG (en haut) et FT-IRRAS (en bas) d'une monocouche de biocytine adsorbée sur* CaF_2.

En ce qui concerne les spectres mesurés sur la monocouche de biocytine, nous n'observons pas les résonances à 2875 et 2930 cm^{-1} du groupement méthylène du cycle tétrahydrothiophène (voir figure 6.10). En effet, ces vibrations ne sont pas remarquées parce que la spectroscopie infrarouge donne un signal principalement proportionnel au nombre d'entités moléculaires en présence. Leur signal est donc noyé dans celui des groupements méthylènes de la chaîne alcane, beaucoup plus nombreux.

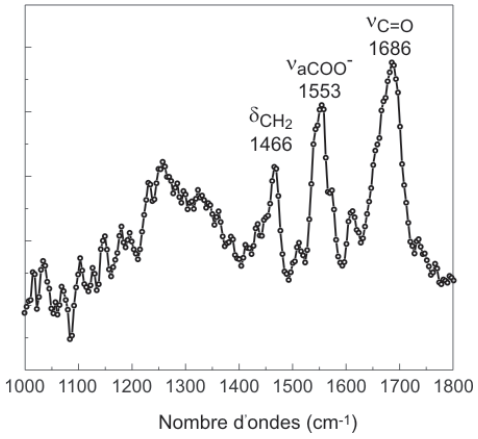


FIGURE 6.11 – *Spectre FT-IRRAS d'une monocouche de biocytine adsorbée sur* CaF_2.

En toute rigueur, la fixation de la biocytine sur les substrats en CaF_2 est confirmée par l'étude des spectres FT-IRRAS dans la gamme spectrale de la vibration CO (voir figure 6.11). En effet, nous pouvons y observer l'absence de vibration $C = O$ du groupement carboxylique de la molécule (attendu à 1720 cm^{-1}) et l'apparition d'une vibration $\nu_a COO^-$ à 1553 cm^{-1} qui indique la présence de molécules déprotonées [92]. La biocytine est donc liée au substrat par les deux atomes d'oxygène de l'ion carboxylate.

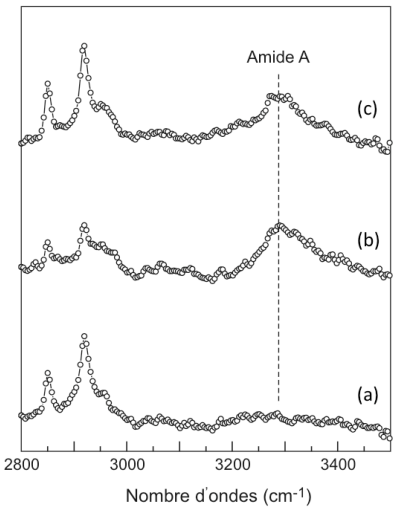


FIGURE 6.12 – *Spectres FT-IRRAS de l'interface biocytine/*CaF_2 *(a) après formation de la monocouche de biocytine et après immersion de cette couche (b) dans une solution d'avidine ; (c) dans une solution d'avidine saturée.*

En ce qui concerne l'interaction de la monocouche de biocytine avec l'avidine, nous pouvons également observer la présence de cette dernière par l'apparition d'une résonance caractéristique des protéines, l'amide A, située autour de 3300 cm^{-1} (voir figure 6.12). Malheureusement, cette vibration est également observée lors de l'utilisation d'avidine saturée. La spectroscopie infrarouge est donc bien capable de détecter la présence ou non de molécules cibles mais elle n'est pas sensible au processus sélectif de la reconnaissance moléculaire.

6.5.5 Le point sur les différentes techniques de détection

A ce stade, il nous semble judicieux de réaliser une petite étude comparative sur les performances potentielles que peut offrir la spectroscopie SFG en termes de détection du processus de reconnaissance moléculaire dans les biocapteurs. Pour ce faire, nous avons compilé dans un tableau à double entrée, quelques-unes des principales techniques utilisées actuellement dans un tel contexte vis-à-vis des caractéristiques observées pour la spectroscopie SFG dans le cadre du système biocytine/avidine (voir table 6.1). L'élaboration de ce tableau s'appuie sur les résultats présentés dans ces pages et sur la littérature relative aux différentes techniques comparées, en particulier les références [73][81][93].

Technique / **Propriété**	Fluorescence	Résonance de plasmon de surface	FT-IRRAS	Spectroscopie SFG
Détection reconnaissance	✓	✓	✓	✓
Absence de marqueurs		✓		✓
Information spectroscopique			✓	✓
Détection sélective		✓		✓

TABLE 6.1 – *Comparaison des performances de quelques-unes des principales techniques de détection utilisées pour le système biotine/avidine.*

Comme nous l'avons déjà expliqué, toutes ces techniques sont capables de détecter la reconnaissance de la biocytine par l'avidine. Néanmoins, deux d'entre elles nécessitent l'utilisation de marqueurs, qu'ils soient fluorescents

ou infrarouges, pour y parvenir. Comme nous pouvions nous y attendre, seules les techniques spectroscopiques nous livrent une information vibrationnelle permettant l'analyse détaillée de l'interface. Notons que même si nous n'en avons pas parlé dans ce travail, seule la spectroscopie SFG serait à même de fournir une information spectroscopique dans le domaine du visible.

Une petite remarque est à formuler quant à la propriété de détection de la sélectivité. Cette propriété a été confirmée pour la SFG et infirmée pour l'infrarouge dans le cas de l'étude du système biocytine-avidine. Il est difficile de se prononcer en ce qui concerne la fluorescence et la résonance de plasmon de surface faute de données expérimentales réalisées sur un tel système. Cependant, au vu des spectres FT-IRRAS présentés, il semble logique de penser qu'un dépôt d'avidine saturée se forme sur la monocouche de biocytine. Ceci laisse à penser que ce dernier serait effectivement détecté par ces deux techniques pour des raisons évidentes. Malgré cela, si nous en croyons la littérature, la résonance de plasmon de surface serait quand même capable de mettre en évidence cette sélectivité [73]. Ceci peut être réalisé par une interprétation plus poussée des résultats comme, par exemple, l'analyse des cinétiques d'interaction.

Sur le tableau de la figure 6.1, nous pouvons observer que la spectroscopie SFG remplit toutes ses promesses et présente donc une bonne alternative aux autres techniques de détection de biocapteurs. Néanmoins, signalons que ce qui fait la richesse de cette technique fait également sa complexité. En effet, outre un dispositif expérimental lourd, l'interprétation de spectres SFG n'est pas immédiate et nécessite une étude approfondie du système considéré. Ce n'est qu'une fois ce travail réalisé que nous pouvons accéder, non seulement à la détection de la reconnaissance mais aussi à toute une série d'informations comme la conformation des molécules sondes, les groupements orientés, *etc.*, rendues accessibles par la dimension spectroscopique de notre technique.

6.6 Conclusions

Arrivés au terme de cet important chapitre, nous pouvons faire le point sur ce que nous avons réalisé. Tout d'abord, nous avons montré que nous pouvions former une monocouche de biocytine aussi bien sur des substrats métalliques, comme le platine, l'or ou l'argent, que sur des substrats isolants comme le fluorure de calcium. La spectroscopie SFG nous a permis de caractériser cette couche et de déterminer qu'elle comporte un certain nombre de défauts gauches. Même si nous n'avons pas pu détecter la reconnaissance avec l'avidine sur les métaux, sans doute en raison de la dénaturation de cette dernière, une modification significative des spectres SFG se produit dans le cas des substrats en CaF_2. Suite à l'interprétation des différentes résonances

en présence, nous avons démontré que ces changements sont révélateurs du processus de reconnaissance entre molécules cibles et molécules sondes. Nous avons également mis en évidence une réorganisation de la monocouche de biocytine suite à cette interaction avec la protéine. Ces constatations nous permettent de réaliser notre premier objectif, à savoir montrer que la spectroscopie SFG est une technique adaptée à la lecture de biocapteurs.

Dans une seconde étape, nous avons exposé la monocouche de vitamines à d'autres molécules cibles ne présentant pas d'affinité particulière pour les molécules sondes. Ce faisant, nous avons montré que non seulement la spectroscopie SFG est capable de détecter le processus de reconnaissance moléculaire mais qu'elle est également sensible à la sélectivité d'un tel mécanisme. Nous avons alors pu comparer notre technique aux autres habituellement employées dans ce type d'expériences et montrer qu'elle présente toutes les qualités requises pour être utilisée dans ce but.

L'étude de ce biocapteur modèle par spectroscopie SFG remplit donc toutes ses promesses puisque les objectifs initiaux proposés pour ce système-test se voient tous remplis au terme de nos expériences. Il nous reste maintenant à quitter le cadre du système modèle pour nous tourner vers une autre forme de biocapteurs, plus complexe certes, mais également plus intéressante quant à ses applications potentielles : les capteurs ADN.

Chapitre 7

Caractérisation de capteurs ADN par SPR

7.1 Introduction

Avant d'aborder notre étude proprement dite de biocapteurs ADN par spectroscopie de génération de fréquence-somme, il nous semble important d'effectuer un petit détour préalable mais nécessaire. En effet, deux éléments-clés sont requis pour mener à bien un tel projet. D'une part, une maîtrise de l'outil, à savoir la spectroscopie SFG et d'autre part, une compréhension approfondie du système, de sa préparation et de ses mécanismes. Une approche scientifique rigoureuse nous impose bien entendu de maîtriser ces deux aspects indépendamment avant de pouvoir les mettre en commun de manière contrôlée. Si notre laboratoire n'a plus à prouver son expertise dans le domaine des spectroscopies optiques non linéaires, il en est autrement concernant la préparation de surfaces d'ADN, d'autant plus qu'il en existe une quantité considérable de variantes.

L'objectif de ce chapitre est donc d'identifier et de mettre en application une architecture chimique conforme à la mise en œuvre de capteurs ADN performants. Pour ce faire, nous avons sélectionné dans la littérature quatre méthodes de préparation chimique menant à la construction de capteurs ADN simples brins sur substrats d'or [94][95][96]. Nous les avons ensuite caractérisées dans le but de déterminer celle qui serait potentiellement la plus adaptée à notre étude. Nos critères sont, bien sûr, la sélectivité et la sensibilité du capteur d'une part, mais aussi la simplicité de la chimie interfaciale employée afin de faciliter l'application ultérieure d'une technique spectroscopique.

Pour remplir cet objectif, nous avons utilisé une technique reconnue dans le domaine des biocapteurs, à savoir la Résonance de Plasmon de Surface (SPR - *Surface Plasmon Resonance*). Cette dernière, dont une description sommaire peut se trouver à l'annexe A.1, permet de suivre in situ et en

temps réel l'événement de reconnaissance moléculaire dans les biocapteurs. De ce fait, elle s'est rapidement imposée comme un outil incontournable dans la discipline. En particulier, elle a été largement utilisée pour caractériser l'hybridation de l'ADN dans de tels systèmes [97][98] et se pose donc comme une technique de référence à nos yeux. Mentionnons par ailleurs que les résultats discutés dans ce chapitre ont tous été obtenus au *Laboratory of Polymer Chemistry* de l'Université Keio (Japon).

7.2 Présentation du système

Comme nous l'avons expliqué de manière très simplifiée dans la section 5.3, la séquence spécifique d'un nucléotide peut être détectée à partir d'une solution par l'hybridation des brins d'ADN cibles avec leurs complémentaires fixés sur une surface. Ces séquences sondes d'ADN simples brins (ssDNA - *Single Stranded DNA*) couplés à l'interface constituent alors un *capteur ADN*. Au cours de ces dernières années, ces dispositifs sont rapidement apparus comme des outils précieux dans bon nombre d'applications biomédicales telles que le diagnostic de maladies génétiques, le séquençage du génome ou encore l'analyse des gènes [99][100][101][102]. Du fait de cette popularité, des efforts considérables ont été consacrés à la compréhension des mécanismes fondamentaux régissant l'immobilisation des sondes sur la surface [103][104][105] et de nombreuses méthodes d'ancrage ont été investiguées [106][107]. En effet, le contrôle des propriétés physico-chimiques aux interfaces est un prérequis capital à la technologie des biocapteurs.

A ce stade, il peut être important d'apporter une précision supplémentaire. Lorsqu'on s'éloigne du système modèle comme nous le faisons ici, certains problèmes que nous avions précédemment négligés peuvent surgir. Il est alors particulièrement important d'optimiser la conception du biocapteur afin d'y remédier. Comme nous en avons déjà parlé, une propriété cruciale de ces dispositifs est la sélectivité. Ceci est d'autant plus vrai lorsque nous pensons à l'application pratique du capteur qui sera dès lors exposé simultanément à plusieurs molécules cibles présentant des affinités différentes pour les sondes. En particulier dans le cas de l'ADN pour lequel la molécule cible d'intérêt n'est pas très différente de celles que nous ne souhaitons pas détecter (différents brins de séquences différentes), il convient d'apporter un soin particulier à l'éradication des adsorptions non spécifiques, c'est-à-dire toutes les adsorptions moléculaires ne résultant pas de la reconnaissance spécifique souhaitée par l'expérimentateur. Ces dernières peuvent résulter de physisorptions indésirables, comme dans le cas déjà rencontré de la bovidine, mais peuvent également découler d'interactions incomplètes entre la sonde et la cible.

Ceci étant dit, il n'est pas étonnant de constater que l'objectif de la plupart des études mentionnées précédemment visait l'amélioration de la

sensibilité et de la sélectivité des capteurs ADN afin de permettre une détection de séquences cibles impliquant un minimum de modifications de l'échantillon original [108]. Dans ce but, il est crucial de concevoir le capteur dans l'optique de maximiser l'hybridation des cibles complémentaires tout en minimisant les adsorptions non spécifiques provenant des brins non complémentaires. De nombreux paramètres peuvent influencer ces mécanismes, comme par exemples la densité de surface des molécules sondes [109], l'accessibilité des sites d'interaction [110], la nature et la complexité du milieu environnant [111] et bien sûr, la structure physico-chimique du capteur lui-même. Il est donc critique d'utiliser une chimie interfaciale adaptée au processus d'interaction que nous souhaitons étudier, dans notre cas l'hybridation de l'ADN. De nos jours, il existe une grande variété d'architectures chimiques adaptées à la construction de tels capteurs qui sont décrites dans la littérature. Sur substrats d'or en particulier, la fixation des brins d'ADN sondes est le plus souvent réalisée à l'aide d'un processus d'auto-assemblage des oligo-nucléotides fonctionnalisés avec des groupements thiols [94][112]. Cependant, d'autres stratégies d'ancrage impliquant des architectures chimiques plus complexes et/ou de plus grandes molécules sont également utilisées [113][114][115].

7.3 Méthodologie

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la résonance de plasmon de surface afin de réaliser une étude systématique de différentes architectures chimiques de capteurs ADN sur substrats d'or. L'objectif est d'évaluer, pour chaque système, la qualité du processus d'hybridation. Dans ce but, nous avons mesuré la quantité de molécules adsorbées sur le biocapteur quand il est exposé à différentes solutions de ssDNA cible. L'efficacité de la reconnaissance est alors estimée en comparant les dépôts moléculaires obtenus quand nous utilisons des brins complètement complémentaires (ssDNA-comp) ou complètement non complémentaires (ssDNA-neg) comme cibles. Comme la technique SPR est capable de suivre l'adsorption de molécules via un changement local de l'indice de réfraction, nous sommes susceptibles d'observer aussi bien les contributions spécifiques que les non spécifiques sans pour autant utiliser de marqueurs. Dans la pratique, le dépôt des cibles sur le capteur est contrôlé par le dispositif SPR en mesurant la variation de l'angle plasmonique en fonction du temps dans un *sensorgramme* (voir annexe A.1). Cette variation est habituellement exprimée en unités de résonance (*RU* - *Resonance Units*), 10^4 *RU* représentant une variation angulaire de 1°.

Afin de permettre une meilleure comparaison entre les différentes méthodes de préparation, nous avons gardé tous les paramètres expérimentaux constants durant les mesures. Dans cette optique, les différentes molécules cibles auxquelles sont exposées les capteurs sont toutes dispersées dans une

solution tampon de PBS (voir section 7.4) à une concentration de 5 μM durant 5 minutes et sous un flux constant de 5 $\mu l/min$. Après chaque dépôt, le substrat est régénéré en étant mis en contact pendant trois périodes consécutives de 1 minute avec une solution basique de NaOH 50 mM utilisée pour dénaturer l'ADN hybridé.

La figure 7.1 montre un sensorgramme typique décrivant les différentes étapes d'une expérience individuelle. Dans celui-ci, quatre phases principales peuvent être identifiées. Premièrement, le capteur est exposé à la solution tampon pendant au moins 5 minutes, ce qui définit une ligne de base. Dans une seconde étape, les ssDNA cibles sont injectés ce qui entraîne un dépôt moléculaire sur la surface et donc une variation de l'angle plasmonique. La troisième phase est une phase de dissociation, l'injection précédente est interrompue et le système est exposé à nouveau à la solution tampon pendant au moins 7 minutes. A ce moment, la variation angulaire totale à partir de la ligne de base est significative de la quantité de molécules adsorbées sur le substrat. La dernière partie est une phase de régénération pendant laquelle les espèces ayant interagi avec les sondes sont enlevées en utilisant une solution dénaturante. Le sensorgramme est alors supposé rejoindre la ligne de base, ce qui signifie que le capteur est complètement régénéré et peut être à nouveau utilisé pour une autre expérience.

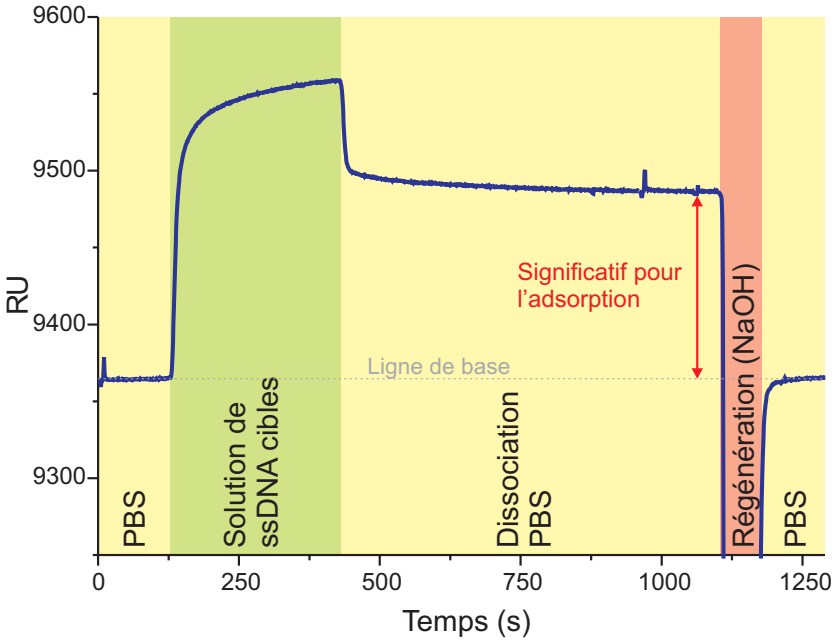


FIGURE 7.1 – *Sensorgramme typique décrivant les différentes étapes d'une expérience individuelle. Etape 1 : Ligne de base. Etape 2 : Exposition aux molécules cibles. Etape 3 : Dissociation. Etape 4 : Régénération.*

La méthodologie présentée ici a été suivie plusieurs fois pour chacune des molécules cibles et chacune des méthodes de préparation sélectionnées. Pour chaque expérience, la variation angulaire totale (ΔRU) atteinte à la fin de l'étape de dissociation a été consignée.

7.4 Préparation des échantillons

Nous avons sélectionné dans la littérature quatre architectures chimiques menant à la formation d'un capteur ADN sur surfaces d'or. Celles-ci sont représentées schématiquement à la figure 7.2.

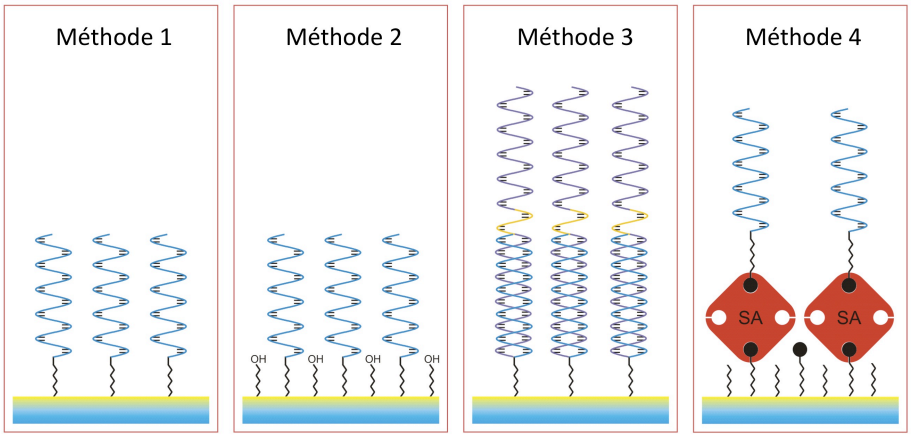


FIGURE 7.2 – *Illustration schématique des différentes architectures chimiques utilisées pour la formation de capteurs ADN sur substrats d'or.*

Pour chacune de ces méthodes de préparation, nous avons utilisé des substrats d'or fournis par la firme *Biacore*. Ceux-ci sont composés d'un film d'or d'environ 48 *nm* évaporé sur des lames de verre. Entre les deux, est déposée une couche de dioxyde de titane de quelques *nm* pour favoriser l'épitaxie. Comme pour les expériences SFG, les substrats sont décapés chimiquement dans une solution piranha pendant environ 15 minutes afin de retirer toute contamination organique. Ils sont ensuite abondamment rincés à l'éthanol et à l'eau milliQ, plusieurs fois. Après cette phase de nettoyage, la surface est prête à être conditionnée chimiquement selon l'une des méthodes choisies.

Les molécules d'ADN utilisées dans ce chapitre ont toutes été fournies par *Jbios* (Japon) et ont été purifiées par colonne HPLC avant utilisation. Les séquences de ces oligo-nucléotides ont été choisies en accord avec la littérature associée à chaque méthode. Elles sont sélectionnées de manière à éviter qu'une section du brin soit le complémentaire d'une autre partie, évitant ainsi que le brin considéré se replie en épingle à cheveux. Signalons pour le lecteur non initié que le formalisme généralement utilisé pour expliciter

les séquences prend une forme du type « $5' - CTG...ATG - 3'$ ». Dans cette notation abrégée, les lettres A, T, C et G font référence aux 4 bases azotées (l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine) tandis que les chiffres (5' et 3') renvoient au numéro du carbone terminant le dernier désoxyribose de la chaîne. Ils définissent alors un sens de lecture conventionnel des séquences. Elle sont habituellement présentées dans le sens 5' vers 3', mais pour que deux brins s'hybrident, il faut qu'ils soient complémentaires de manière antiparallèle, c'est-à-dire que l'extrémité 5' de l'un soit en contact avec l'extrémité 3' de l'autre et inversement. La table 7.1 reprend toutes les séquences que nous avons employées pour la préparation des échantillons. Les différentes solutions d'ADN (excepté pour la méthode 3) ont été obtenues en dispersant les molécules dans une solution tampon phosphate (PBS - *Phosphate Buffered Saline*) 10 mM contenant 150 mM de $NaCl$ et de pH 7,4. De plus, toutes les concentrations de ces solutions ont été vérifiées par des mesures d'absorption UV réalisées sur un dispositif BioSpec 1600 (*Shimadzu*). Pour terminer, signalons que les verreries, embouts de pipette, solutions et autres accessoires ont systématiquement été stérilisés dans une autoclave à 120 °C afin d'éviter toute contamination biologique.

Méthode 1	
ssDNA-SH	$5' - SH(CH_2)_6 - CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG - 3'$
ssDNA-comp	$5' - CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTG - 3'$
ssDNA-neg	$5' - GACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCAC - 3'$
Méthode 2	
ssDNA-SH	$5' - SH(CH_2)_6 - CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG - 3'$
ssDNA-comp	$5' - CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTG - 3'$
ssDNA-neg	$5' - GACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCAC - 3'$
Méthode 3	
ssDNA-SH	$5' - SH(CH_2)_6 - ATGCATGCATTAGCATGCTA - 3'$
ssDNA-ds	$5' - TGGAGAACTGATCGACACAG\mathbf{TTTTTTTTTT}TAGC$ $ATGCTAATGCATGCAT - 3'$
ssDNA-comp	$5' - CTGTGTCGATCAGTTCTCCA - 3'$
ssDNA-neg	$5' - TGGAGAACTGATCGACACAG - 3'$
Méthode 4	
ssDNA-biot	$5' - biotine - ACGCCACGAGCTCCAACTACCACAAGTTT$ $ATATTCAGTCATTTTCAGCAGGCCTCTCTCC - 3'$
ssDNA-comp	$5' - GGAGAGAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAAC$ $TTGTGGTAGTTGGAGCTCGTGGCGT - 3'$
ssDNA-neg	$5' - CCTCTCTCCGGACGACTTTTACTGACTTATATTTG$ $AACACCATCAACCTCGAGCACCGCA - 3'$

TABLE 7.1 – *Tableau récapitulatif des différentes séquences ADN utilisées dans les expériences SPR.*

7.4.1 Méthode 1

La première méthode de préparation sélectionnée est sans aucun doute la plus simple au niveau de la chimie interfaciale. Pour celle-ci, nous utilisons des simples brins d'ADN fonctionnalisés avec un groupement d'ancrage thiol (ssDNA-SH). La séquence employée comprend 25 bases azotées (25-mères). La fonctionnalisation thiol est réalisée par l'adjonction d'une chaîne alcane comprenant 6 atomes de carbone et un groupement SH du côté 5' de l'oligo-nucléotide. Ces sondes sont alors adsorbées directement sur le substrat d'or en y déposant une goutte de solution de ssDNA-SH à 2 μM dispersée dans du PBS pendant environ 16h à température ambiante. Ceci mène à la formation d'une monocouche auto-assemblée de molécules d'ADN se fixant par interaction soufre-or. Avant analyse, les échantillons ainsi obtenus sont rincés à l'eau milliQ et séchés sous flux d'azote.

7.4.2 Méthode 2

Cette méthode reprend la même procédure que celle décrite ci-dessus avec une étape supplémentaire qui vise à intercaler des molécules de mercaptohexanol (MCH) entre les brins d'ADN qui forment la monocouche. Cette molécule additionnelle est en réalité une petite chaîne alcane de 6 atomes de carbone dont les groupements terminaux sont un thiol d'une part et un hydroxyle (OH) de l'autre. De cette manière, nous remplissons les interstices présents entre les molécules sondes avec une sorte de « gazon » qui empêche tout contact entre le substrat et les brins d'ADN cibles.

Dans la pratique, nous pouvons contrôler le rapport de recouvrement entre les ssDNA-SH et les MCH en variant les concentrations des solutions et/ou la durée d'immersion du substrat. Dans notre cas, nous avons exposé la surface d'or à une solution de ssDNA-SH à 2 μM dissoute dans du PBS pour 90 minutes, comme proposé dans la littérature [110]. Les séquences utilisées sont les mêmes que pour la méthode 1. Après rinçage à l'eau milliQ et séchage à l'azote, l'échantillon est exposé à une solution de MCH 1 mM dispersée dans de l'eau milliQ pendant 5 minutes. De nouveau, le substrat est rincé à l'eau milliQ et finalement séché sous flux d'azote.

7.4.3 Méthode 3

Cette méthode de préparation a été proposée par Sakao *et al.* [95]. Les molécules sondes sont ici composées de deux simples brins d'ADN différents : d'une part un oligo-nucléotide de 20-mères fonctionnalisé avec un groupement thiol dans le but de réaliser un processus d'auto-assemblage sur la surface d'or et d'autre part, un brin de 50-mères (ssDNA-ds) constitué de trois sections remarquables. La première est la séquence complémentaire du ssDNA-SH, ce qui permet la formation d'un complexe 50-mères/20-mères thiolé. La deuxième section est composée de 10 bases thymines consécutives

(présentées en gras dans la table 7.1). Elle ne joue pas réellement de rôle dans le mécanisme de reconnaissance moléculaire mais permet d'augmenter la mobilité de la troisième partie. Cette dernière constitue à proprement parler la sonde du capteur qui sera utilisée lors des expériences.

Pratiquement, la formation de ces complexes est réalisée en mélangeant les molécules ssDNA-SH 20-mères avec les ssDNA-ds 50-mères (avec un rapport de masse 1 pour 2) dans une solution tampon SPB (*Sodium Phosphate Buffer*) à 500 mM (pH 7,4) chauffée à 90 °C pendant 5 minutes. Après un refroidissement progressif, une étape de purification par hydroxy-apatite est exécutée afin de garder uniquement les complexes (dsDNA - *Double Stranded DNA*) réellement hybridés pour la suite. La phase d'adsorption est alors réalisée en immergeant la surface d'or dans une solution de dsDNA-SH à 2 μM dispersée dans une solution tampon $MgCl_2$ pendant 5 minutes avant d'être rincée et séchée comme il se doit. Notons que nous avons préféré utiliser ici un tampon $MgCl_2 - 6H_2O$ à 20 mM à la place du PBS car il permet aux complexes dsDNA d'être plus rigides, ce qui mène à la formation d'une monocouche plus dense sur le substrat (voir [95]).

7.4.4 Méthode 4

Pour cette dernière méthode, nous avons suivi la procédure décrite par Sato *et al.* [96]. Tout d'abord, une monocouche auto-assemblée est formée sur la surface d'or par immersion de celle-ci dans une solution à 5 mM de 1,6 hexanedithiol dispersée dans de l'éthanol pendant environ 16h à température ambiante. Après rinçage à l'éthanol et à l'eau milliQ, le substrat est immergé dans de l'éthylène-glycol-diglycidyl-éther (EGDE) pour 24h à une température de 37 °C. Ces molécules vont alors interagir avec la couche de dithiols et introduire à la surface des groupements époxydes (un oxygène ponté sur une liaison carbone-carbone) qui sont connus pour minimiser les adsorptions non spécifiques éventuelles. Ensuite, nous exposons l'échantillon à une solution à 10 mM de biotine-PEO-amine dispersée dans un tampon sodium phosphate (pH 9,4) pendant 24h à 37 °C. La surface est alors mise en contact avec une solution tampon PBS incorporée de 10 *ppm* de streptavidine (SA) pendant 5 minutes et finalement exposée à la solution contenant les molécules sondes à 1 μM dans du PBS pendant 5 minutes. Celles-ci sont en réalité des simples brins d'ADN 60-mères fonctionnalisés avec un groupement biotine du côté 5' (ssDNA-biot). Précisons qu'entre chacune de ces étapes, le substrat est abondamment rincé à l'eau milliQ ou à la solution tampon pour finalement être séché sous flux d'azote.

7.5 Résultats expérimentaux

Comme précisé à la section 7.3, nous nous intéressons ici aux variations angulaires totales observées pour chaque solution de ssDNA cible utilisée

dans le cadre de chaque méthode de préparation du capteur. La figure 7.3(a) résume les valeurs de ΔRU que nous avons obtenues dans les différents cas de figure. Bien sûr, il serait délicat de comparer directement les variations absolues obtenues d'une expérience particulière à une autre. En effet, les masses des différentes molécules cibles ne sont pas toutes égales d'un système à l'autre. De plus, de par la structure des différentes architectures chimiques, les sites d'hybridation ne sont pas à la même distance de la surface d'or. De ce fait, et à cause de la nature évanescente de l'onde plasmon, des quantités identiques de molécules déposées à l'interface peuvent contribuer de manière différente aux sensorgrammes. En théorie, une comparaison consistante pourrait être effectuée en convertissant les ΔRU en un taux de recouvrement moléculaire absolu. Ceci peut être effectué en ajustant un modèle optique de Fresnel à plusieurs couches sur les courbes de réflectance issues du dispositif SPR [116][117]. Cependant, l'objectif de notre étude étant d'évaluer pour chaque méthode l'efficacité relative du processus d'hybridation, il reste possible de réaliser une comparaison valable entre les interactions spécifiques et non spécifiques mesurées pour un système en particulier. En effet, les conditions expérimentales restent rigoureusement identiques quelle que soit la molécule cible utilisée tant que nous restons dans le cadre d'un même capteur. Afin d'obtenir un indicateur de la qualité de l'hybridation, nous avons donc décidé de normaliser les valeurs de ΔRU présentées précédemment par rapport aux valeurs obtenues pour le même système lorsque les brins complémentaires sont utilisés comme molécules cibles. Ces données normalisées sont présentées à la figure 7.3(b). Nous calculons alors un pourcentage représentant, pour chaque architecture chimique, le ratio entre les interactions spécifiques et non spécifiques. Cela signifie que nous ne considérons plus ici les quantités absolues de molécules adsorbées mais des rapports relatifs reflétant la qualité du processus d'hybridation. Ces rapports s'affranchissent alors des limitations mentionnées ci-dessus, ce qui permet une comparaison directe, mais relative, de l'efficacité de chacun des capteurs décrits.

Comme le montrent les résultats, les comportements des différents capteurs sont plutôt hétéroclites. A partir des données normalisées, nous relevons des pourcentages d'adsorptions non spécifiques de 62%, 8%, 49% et 15% quand nous considérons les méthodes 1, 2, 3 et 4, respectivement. Les systèmes basés sur les architectures 2 et 4 nous fournissent donc les meilleurs résultats puisqu'ils montrent les plus hautes spécificités, c'est-à-dire une plus faible adsorption des ssDNA non complémentaires par rapport à celle observée pour les brins complémentaires. En réalité, nous pouvions nous attendre à ce genre de résultats puisque les deux méthodes en question sont initialement conçues pour inclure dans leur structure une couche protectrice destinée à éviter les physisorptions moléculaires non désirées. Cet aspect est pris en charge par la couche de MCH pour les capteurs basés sur la méthode 2 alors que les groupements époxydes jouent ce rôle pour les systèmes dérivés de la méthode 4. En effet, de telles fonctions chimiques sont largement

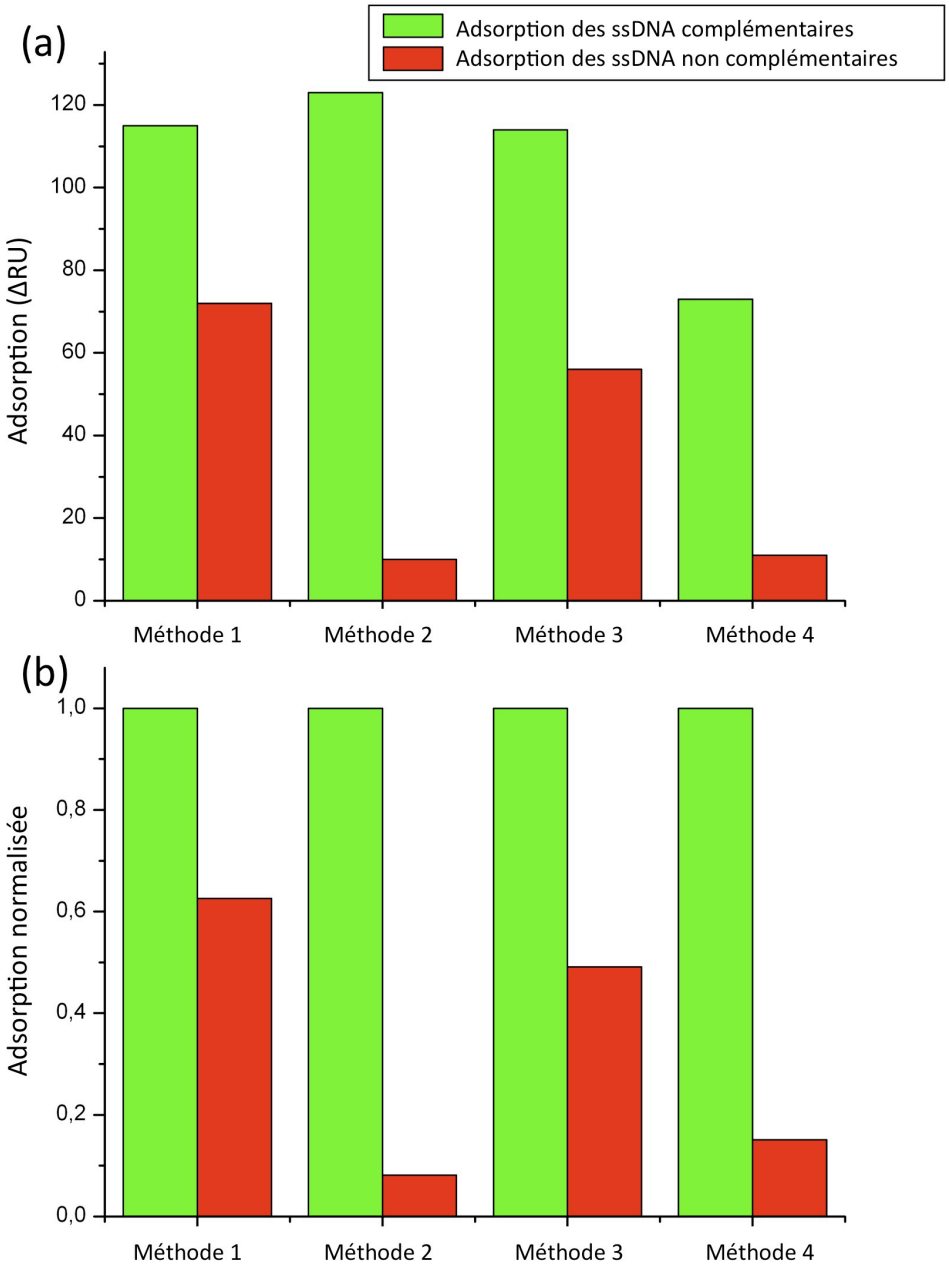


FIGURE 7.3 – *(a) ΔRU obtenus pour les différentes méthodes de préparations et molécules cibles. (b) Valeurs issues de (a) normalisées par rapport à l'adsorption des brins complémentaires. Les pourcentages représentent les rapports entre les adsorptions spécifiques et non spécifiques.*

utilisées dans le domaine des biocapteurs et sont connues pour leurs propriétés bio-résistantes [112][118]. Il n'est dès lors pas étonnant d'observer de meilleurs ratios pour ces méthodes en particulier. Par ailleurs, notons que le pourcentage observé pour la méthode 3 est probablement surestimé. En effet, du fait d'une exposition assez courte aux molécules sondes lors de la préparation du capteur, nous pouvons penser que celui-ci présente des défauts dans la monocouche sonde. Bien que l'efficacité de l'hybridation ne soit certainement pas proportionnelle à la densité des sondes en surface [109], ces défauts pourraient favoriser l'accès au substrat pour les molécules cibles et de ce fait, augmenter la contribution non spécifique. Si nous nous référons à la littérature, une densité superficielle plus élevée devrait mener à un pourcentage de l'ordre de 20% [95].

Afin de mieux comprendre ces mécanismes d'interactions non spécifiques et le rôle que peut jouer une couche protectrice à cet égard, nous nous proposons de comparer plus en détail les résultats obtenus pour les systèmes basés sur les méthodes 1 et 2 quand ils sont exposés à la solution de ssDNA complémentaires. En effet, ces deux capteurs sont identiques si ce n'est la présence de la couche de MCH et pourtant, ils fournissent des résultats drastiquement différents au regard de la spécificité. Si nous observons les sensorgrammes complets issus des expériences relatives à ces systèmes, nous pouvons notamment remarquer un comportement radicalement différent entre les deux expériences durant la phase de régénération. Comme nous le voyons sur la figure 7.4, dans le premier cas, le sensorgramme ne retrouve pas le niveau de la ligne de base après que la surface ait été exposée à la solution dénaturante de NaOH. En réalité, les expériences montrent que pour les capteurs basés sur la méthode 1, la ligne de base n'est toujours pas atteinte même après 6 expositions successives de 1 minute à une solution de NaOH concentrée à 100 mM (données non présentées). Rappelons que la procédure de régénération standard consiste à exposer l'interface à une solution NaOH 50 mM pour 3 périodes de 1 minute. Par contre, si nous observons le cas des surfaces préparées selon la méthode 2, nous remarquons que dès la première minute d'exposition le capteur est complètement régénéré puisque le niveau de la ligne de base est à nouveau atteint par le sensorgramme. De telles solutions régénérantes étant depuis longtemps connues pour leur capacité à dénaturer l'ADN hybridé [119][120], cela signifie que dans le premier cas de figure, la plupart des molécules adsorbées sont liées à la surface par un autre type d'interaction. Dans ce cas précis, il est relativement facile d'imaginer que, si les ssDNA cibles ne sont pas hybridés avec les sondes, ils sont en réalité physisorbés sur la surface d'or. En effet, pour la méthode 1, l'absence de couche protectrice offre une accessibilité accrue à l'interface métallique ce qui facilite les adsorptions non spécifiques. A l'opposé, les molécules de MCH utilisées dans le cadre de la méthode 2 inhibent cet effet, ce qui améliore grandement la spécificité du capteur. Cette déduction peut dès lors

être étendue aux autres méthodes investiguées ici, justifiant de ce fait les meilleures performances observées pour les systèmes incluant une couche protectrice dans leur architecture, à savoir les méthodes 2 et 4. Par ailleurs, un autre indice de cette tendance peut être trouvé dans l'analyse des cinétiques d'adsorption observées sur les sensorgrammes de la figure 7.4. Nous observons clairement que celles-ci sont dissemblables pour les deux systèmes considérés, ce qui signifie que des phénomènes différents sont impliqués dans le processus d'interaction avec la surface.

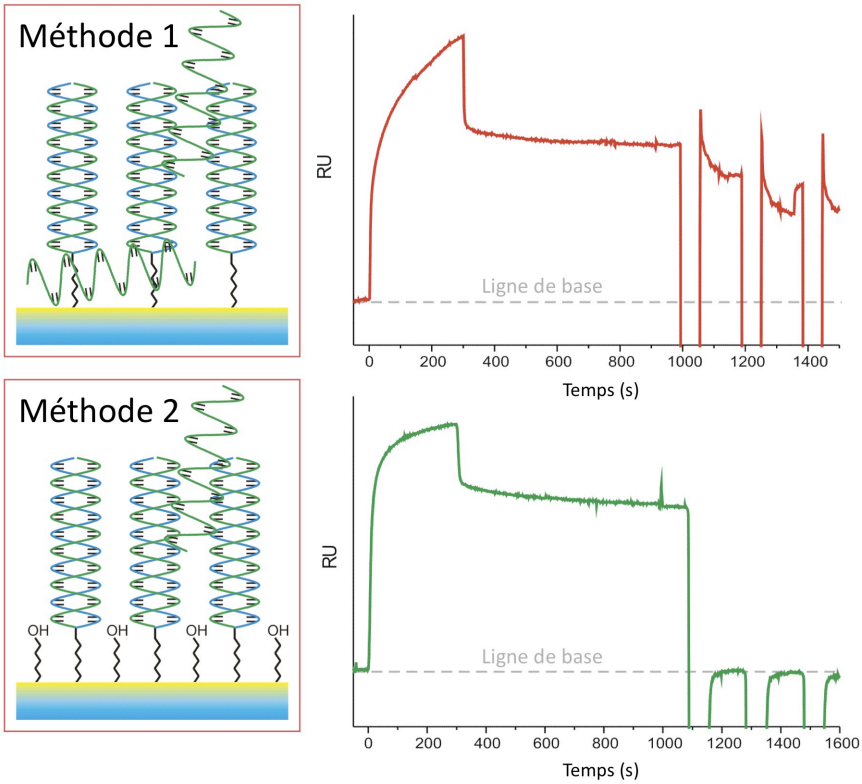


FIGURE 7.4 – *Sensorgrammes obtenus quand les capteurs basés sur les méthodes 1 et 2 sont exposés à une solution de ssDNA complémentaires, ensuite à la solution tampon (dissociation) et finalement à la solution de régénération.*

En réalisant une petite expérience supplémentaire, nous pouvons apporter une nouvelle preuve du dépôt des brins d'ADN à l'interface métallique. Dans ce but, nous avons exposé une surface d'or propre et non fonctionnalisée chimiquement à une solution de ssDNA cibles. Comme nous pouvons le voir sur la figure 7.5, un dépôt non trivial est observé même pour des temps d'exposition faibles, ce qui atteste de l'affinité particulière existant entre les

molécules de ssDNA et le substrat et de leur capacité à se physisorber sur ce type d'interface. Cette observation est en bon accord avec des travaux antérieurs ayant investigué les interactions entre l'or et l'ADN [121][122]. Pour finir, remarquons également que, si nous exposons le système à la solution régénérante, nous sommes confrontés au même comportement que celui observé pour les capteurs basés sur la méthode 1, à savoir que le niveau de la ligne de base n'est pas retrouvé. Ceci nous confirme bien l'incapacité de la solution de NaOH à neutraliser les interactions non spécifiques qui se produisent entre les molécules cibles et le substrat.

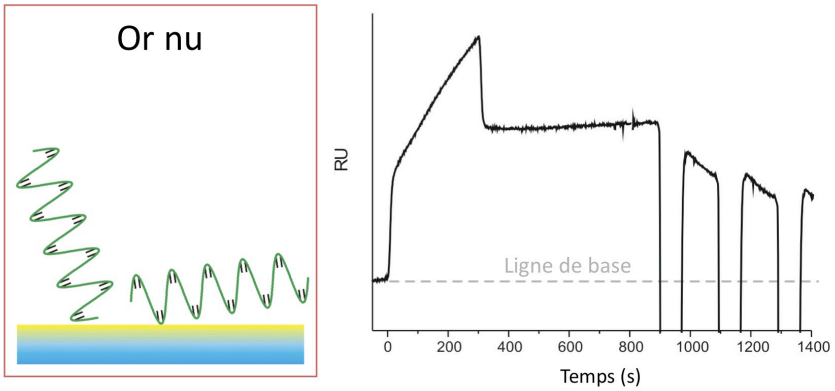


FIGURE 7.5 – *Sensorgramme obtenu quand une surface d'or propre et non fonctionnalisée chimiquement est exposée à une solution de ssDNA cibles.*

7.6 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une analyse systématique de différents capteurs ADN construits sur substrat d'or dans le but d'évaluer, pour chaque système, la qualité du processus d'hybridation. Pour ce faire, nous avons contrôlé par SPR le dépôt moléculaire sur la surface lorsque le capteur est exposé à des molécules cibles complémentaires ou non. De ces mesures, nous avons déduit un pourcentage d'adsorption non spécifique utilisé comme indicateur relatif qui nous permet de comparer directement l'efficacité de l'hybridation pour chaque méthode. Les résultats nous montrent que l'architecture chimique est cruciale par rapport à la sélectivité du capteur. En particulier, ce chapitre nous montre que l'ajout d'une couche bio-résistante améliore grandement la spécificité de l'interaction avec les molécules cibles. En examinant plus en détail les sensorgrammes et l'étape de régénération, nous avons souligné que ce type de couches protectrices restreint l'accès au substrat métallique, ce qui empêche les physisorptions non désirées.

Pour revenir à notre objectif final, à savoir identifier une architecture chimique adaptée à l'analyse de capteurs ADN par spectroscopie SFG, il semble évident que la méthode 2 représente la meilleure alternative. En effet, elle donne lieu aux performances les plus convaincantes observées (8%) malgré sa simplicité chimique. De plus, elle est très proche de la méthode 1 qui représente le cas fondamental pour une analyse spectroscopique. La méthode 4 présente également de bons résultats mais nous devons l'écarter en raison de la complexité de sa structure interfaciale impliquant notamment l'utilisation de grandes molécules. En effet, si nous menions une étude spectroscopique sur un tel système, il pourrait s'avérer difficile de déterminer la provenance moléculaire des bandes spectrales observées. Pour le chapitre suivant, nous avons donc décidé d'appliquer la spectroscopie SFG aux capteurs résultant des méthodes 1 et 2. Le premier système servira à poser les bases de la caractérisation de couches ADN par spectroscopie SFG et le second sera utilisé dans l'espoir de détecter le processus d'hybridation.

Chapitre 8

Caractérisation de capteurs ADN par SFG

8.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de la surface de capteurs ADN par spectroscopie de génération de fréquence-somme. Il vise à opérer une synthèse des différents acquis qui résultent des discussions abordées dans les sections précédentes. Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord montré que la SFG est capable d'attester du processus de reconnaissance moléculaire (Chapitre 6). Nous avons ensuite identifié des méthodes de préparation chimiques adaptées à la mise en œuvre de surfaces d'ADN sensibles à ce mécanisme (Chapitre 7). Dans cette partie, nous avons donc préparé nos échantillons en reprenant les deux premières procédures décrites dans le chapitre précédent (méthodes 1 et 2, voir section 7.4). De cette manière, la première procédure nous permet d'obtenir un système composé uniquement de molécules d'ADN afin de caractériser la monocouche de nucléotides en elle-même. Ensuite, en recourant à la seconde méthode, nous sommes à même d'étudier un système dont les performances en matière d'hybridation ont été validées. Les spectres SFG obtenus sont alors interprétés sur base des considérations abordées au chapitre 4.

Par ailleurs, en tirant avantage de la dimension spectroscopique fournie par notre technique, nous avons réalisé une petite étude complémentaire afin de mettre en évidence l'importance de la solution tampon utilisée pour la préparation de tels systèmes.

8.2 Présentation du système

La description du système étudié, à savoir les capteurs ADN, a déjà été détaillée à plusieurs reprises au long de ces pages (voir les sections 5.3 et 7.2). Nous ne reviendrons donc pas ici sur le principe de fonctionnement

de ce type de dispositifs et sur leur importance en recherche appliquée. Par contre, nous nous intéresserons plutôt aux détails de la structure de la molécule d'ADN afin de mieux l'appréhender sur base des informations spectroscopiques apportées par la technique SFG. Cette fameuse structure, si caractéristique, a été élucidée pour la première fois il y a une cinquantaine d'années par James D. Watson et Francis H. Crick [123], ce qui leur a valu le prix Nobel de Médecine en 1962 (Il existe toutefois une polémique quant à la participation de Rosalind Franklin qui aurait été évincée pour des motifs sexistes). Ils ont décrit une structure en double hélice composée de deux brins eux-mêmes constitués de chaînes sucre-phosphate se faisant face de manière anti-parallèle. Chacun des sucres porte une des quatre bases azotées (l'adénine, la thymine, la cytosine ou la guanine). L'association d'une base et d'un sucre est appelée nucléoside. L'ajout du groupement phosphate en fait un nucléotide. L'ADN est dès lors un polymère de nucléotides (oligo-nucléotide).

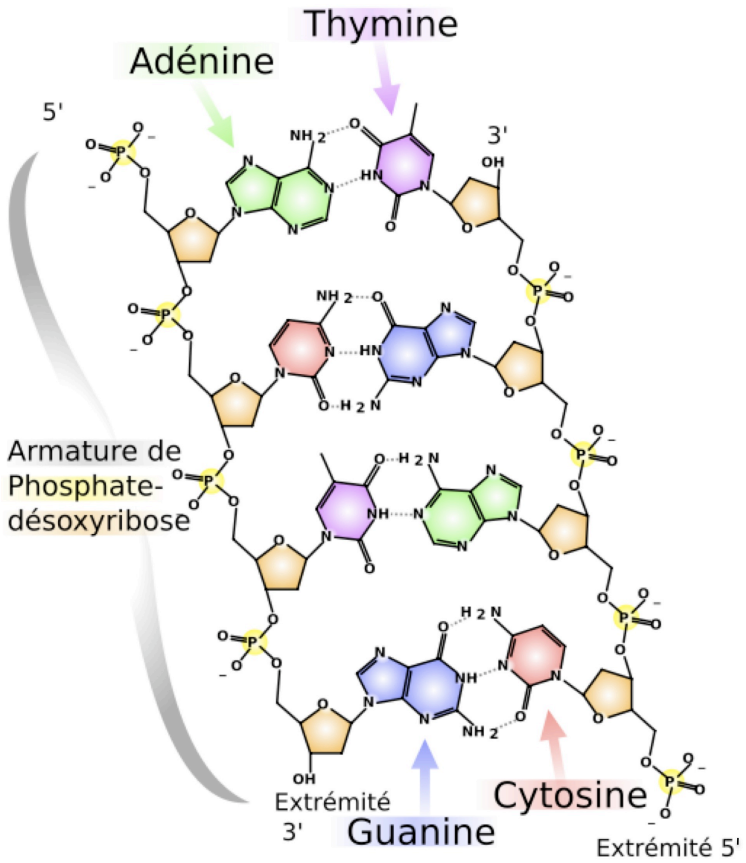


FIGURE 8.1 – *Structure chimique de l'ADN (Figure extraite de [124] sous couvert de la licence de documentation libre GNU).*

La figure 8.1 présente une illustration schématique de cette structure chimique mise à plat pour une séquence $5' - ACTG - 3'$ hybridée à son complémentaire $5' - CAGT - 3'$. Comme le montre déjà cette séquence très courte, l'ADN est une molécule complexe qui recèle quantité de fonctions chimiques différentes. Ceci a pour conséquence que de nombreuses transitions vibrationnelles peuvent être potentiellement actives dans les spectres infrarouges et Raman [125][126]. En particulier, les oligo-nucléotides recèlent bon nombre de fonctions méthylènes dans des environnements divers. Concernant les groupements méthyles, ils sont plus rares puisque seule la thymine en exhibe un dans sa structure. Par ailleurs, comme leur nom l'indique, les différentes bases azotées comprennent systématiquement des groupements amines. L'observation des modes de vibration de ces dernières pourrait s'avérer particulièrement intéressante car beaucoup d'entre elles sont impliquées dans des ponts hydrogène lors du processus d'hybridation. Cependant, il faut bien convenir que la plus grande partie de la signature vibrationnelle propre à la molécule se situe dans les plus grandes longueurs d'onde. Citons par exemple les vibrations amides I (amides C=O) dont les fréquences se situent autour des 1700 cm^{-1} et qui sont couramment utilisées pour la caractérisation de molécules biologiques.

8.3 Méthodologie

La méthodologie que nous avons suivie ici n'est pas très différente de celle que nous avons utilisée dans nos expériences SFG précédentes. Nous avons tout d'abord formé une monocouche de ssDNA-SH afin d'en caractériser la structure. Ensuite, nous avons comparé les spectres obtenus à ceux issus d'une monocouche de MCH. Cette molécule étant très similaire au bras d'ancrage utilisé pour fixer l'ADN sur la surface, il peut être intéressant de comparer leur signature vibrationnelle. A ce stade, nous avons confectionné des couches mixtes reprenant à la fois les molécules de ssDNA-SH et de MCH pour se placer dans le cadre de la méthode 2 discutée auparavant. Pour finir, nous avons exposé nos différents échantillons à des solutions de molécules cibles, en utilisant alternativement des séquences complémentaires ou non, afin de mettre en évidence le processus d'hybridation sélectif.

En ce qui concerne les gammes spectrales, nous avons débuté notre étude dans la région des vibrations $C - H$ pour des raisons déjà évoquées. Nous avons ensuite porté notre attention sur la gamme des vibrations $N - H$ mais aussi vers celles se situant à de plus grandes longueurs d'onde.

Pour finir, nous avons également reconduit nos mesures en utilisant une solution tampon alternative lors de la préparation des échantillons afin d'en déterminer l'influence. Plus précisément, à la place du tampon PBS employé initialement, nous avons recouru à un tampon Tris/EDTA (TE) stabilisé à même pH.

La plupart de nos séries de mesures ont initialement été réalisées sur des capteurs ADN construits sur substrats d'or. Néanmoins, comme nous le verrons par la suite, les signaux SFG issus de l'adsorbat étaient relativement faibles en intensité. Ce fait, conjugué au fond non résonant intense de l'or, nous a fourni des spectres difficilement interprétables. Pour cette raison, nous avons préféré effectuer nos analyses sur des surfaces de platine dont la contribution non résonante est presque nulle. En effet, ces deux métaux exhibent un comportement similaire vis-à-vis de la construction de monocouches auto-assemblées à l'aide de groupements thiols lorsque les durées d'immersion sont de l'ordre de plusieurs heures [127]. Pour des temps d'exposition plus courts, la dynamique d'adsorption est bien sûr différente à cause de l'oxydation plus importante de la surface du platine [128] mais, avec le temps, cet effet s'estompe car les groupements thiols exhibent un comportement réducteur [129].

Signalons également que les résultats présentés dans les pages suivantes ont été obtenus ex situ. Nous avons effectué plusieurs tentatives par la suite en vue de les reproduire à l'interface liquide/solide, notamment en utilisant une cellule liquide développée par nos soins, mais sans succès.

8.4 Préparation des échantillons

Les différents spectres SFG présentés dans ce chapitre ont donc été obtenus à partir de couches d'ADN assemblées sur des monocristaux de platine. Ceux-ci ont, suivant le procédé habituel, été préalablement traités selon la méthode décrite à la section 3.5.1. En ce qui concerne le dépôt des oligonucléotides, nous avons utilisé le même type de molécules que précédemment, à savoir des simples brins d'ADN de 25 bases fonctionnalisés du côté 5' avec un bras d'ancrage de 6 atomes de carbone terminé par un groupement thiol (ssDNA-SH). Les différentes séquences utilisées dans nos expériences SFG sont résumées à la table 8.1. A nouveau, celles-ci ont été choisies dans le but de minimiser l'auto-hybridation.

	Séquences
ssDNA-SH	$5' - SH(CH_2)_6 - AGATCAGTGCGTCTGTACTAGCACA - 3'$
ssDNA-comp	$5' - TGTGCTAGTACAGACGCACTGATCT - 3'$
ssDNA-neg	$5' - ACACGATCATGTCTGCGTGACTAGA - 3'$

TABLE 8.1 – *Tableau récapitulatif des différentes séquences ADN utilisées dans les expériences SFG.*

Pour la préparation des échantillons proprement dite, les molécules de ssDNA-SH ont été dispersées dans une solution de pH stabilisé à 7,4 avec une concentration de 10 μM. Pour ces solutions tampon, deux alternatives

ont été utilisées : d'une part, une solution tampon similaire à celle utilisée précédemment, à savoir une solution 10 mM de PBS additionnée de 50 mM de NaCl et d'autre part, une solution tampon de Tris (tris(hydroxyméthyle)-aminométhane - 10 mM) EDTA (acide éthylène diamine tetra acétique - 1 mM) connue sous le nom de tampon TE et également largement utilisée en chimie de l'ADN. Les couches d'ADN sont alors préparées en exposant le substrat à la solution choisie pendant environ 16 h. Les échantillons sont ensuite abondamment rincés à la solution tampon ou à l'eau milliQ et finalement séchés sous flux d'azote.

Remarquons que les conditions de préparation décrites ici sont légèrement différentes de celles qui ont été explicitées dans le chapitre précédent. En réalité, nos mesures ont été effectuées à l'aide des différentes variantes sans pour autant présenter de dissemblances notables. Nous avons donc préféré décrire les conditions de préparation réellement associées aux spectres présentés dans ces pages.

Les monocouches de mercaptohexanol sont préparées de manière similaire en immergeant les substrats de platine dans une solution aqueuse de MCH à 1 mM pendant environ 16 h avant d'être rincés et séchés. Les couches mixtes ssDNA-SH/MCH ont été confectionnées en construisant tout d'abord le dépôt d'oligo-nucléotides qui est ensuite immergé dans la solution de MCH pendant des durées variables (de 5 minutes à 24 heures). Il s'ensuit la procédure habituelle de rinçage et séchage. En ce qui concerne les solutions de molécules cibles, nous avons utilisé des brins de séquences complémentaires (ssDNA-comp) ou non (ssDNA-neg). Celles-ci sont détaillées à la table 8.1. Les oligo-nucléotides ont alors été suspendus dans une des deux solutions tampon à une concentration de 10 μM. Pour terminer, signalons que les embouts de pipette et les solutions tampon ont systématiquement été stérilisés dans une autoclave à 120 °C afin d'éviter toute contamination biologique.

8.5 Résultats expérimentaux

8.5.1 Monocouches d'ADN

Gamme des C-H

La figure 8.2 compare le spectre SFG obtenu à partir d'une monocouche de ssDNA-SH à celui issu d'un dépôt de MCH dans la gamme spectrale s'étendant de 2700 à 3100 cm^{-1}. Conformément à la méthode utilisée antérieurement, les données expérimentales sont comparées à la réponse théorique de l'interface établie sur base du modèle discuté à la section 4.4.3. Lors de l'ajustement paramétrique, nous avons posé que les constantes d'amortissement (Γ_q) et les facteurs de phase (φ_q) associés à des vibrations provenant de mêmes groupements moléculaires restent identiques. Par ailleurs, les intensités SFG étant exprimées en unités arbitraires, nous avons normalisé

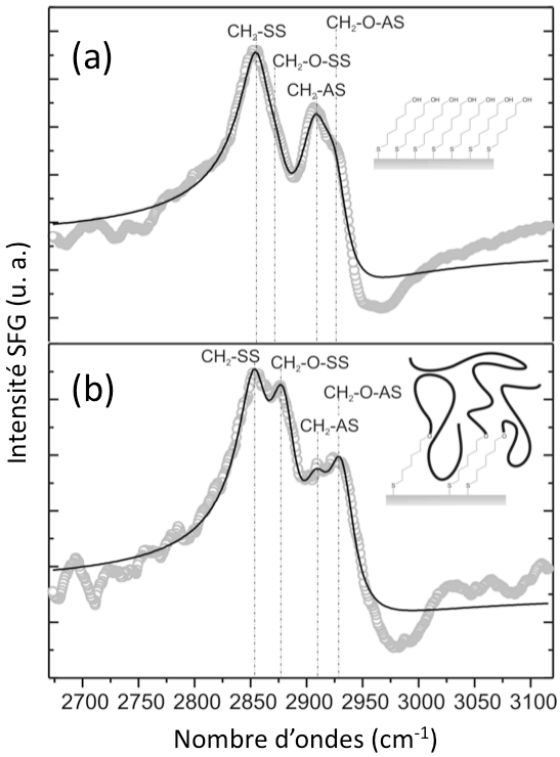


FIGURE 8.2 – *Spectres SFG de molécules de MCH (a) et de ssDNA-SH (b) adsorbées sur platine. Les cercles représentent les données expérimentales et les lignes continues, les meilleurs ajustements.*

MCH	$\lvert A_q \rvert / \lvert A_{NR} \rvert$	ω_q (cm^{-1})	Γ_q (cm^{-1})	φ_q (rad)
$CH_2 - SS$	8,6	2859	15,0	2,6
$CH_2 - AS$	7,8	2910	15,0	2,6
$CH_2 - O - SS$	5,6	2874	15,0	2,6
$CH_2 - O - AS$	9,6	2927	15,0	2,6
Pt(111)	1,0	-	-	0,0
ssDNA-SH	$\lvert A_q \rvert / \lvert A_{NR} \rvert$	ω_q (cm^{-1})	Γ_q (cm^{-1})	φ_q (rad)
$CH_2 - SS$	7,6	2856	15,0	2,3
$CH_2 - AS$	4,8	2910	15,0	2,3
$CH_2 - O - SS$	9,4	2881	15,0	2,3
$CH_2 - O - AS$	9,3	2932	15,0	2,3
Pt(111)	1,0	-	-	0,0

TABLE 8.2 – *Jeux de paramètres donnant lieu aux meilleurs ajustements des spectres SFG présentés à la figure 8.2.*

les modules des forces d'oscillateur ($|A_q|$) par celui de la contribution non résonante ($|A_{NR}|$). Cette quantité est alors employée comme indicateur de l'intensité du mode de vibration considéré. La table 8.2 résume les différents paramètres donnant lieu aux meilleurs ajustements.

Dans le cas du MCH (voir figure 8.2(a)), les deux principaux modes de vibration observés se situent à 2859 et 2910 cm^{-1}. Ils sont attribués, en accord avec les considérations du chapitre 4, aux modes d'élongations symétrique ($CH_2 - SS$) et asymétrique ($CH_2 - AS$) des groupements méthylènes de la chaîne alcane. Les épaulements apparaissant sur le côté droit de ces deux pics proviennent quant à eux des groupements CH_2 situés à l'extrémité des structures aliphatiques. Ceux-ci donnent lieu à l'apparition de deux modes de vibration additionnels localisés à 2874 et 2927 cm^{-1}. Ces derniers correspondent aux vibrations d'élongations symétrique ($CH_2 - O - SS$) et asymétrique ($CH_2 - O - AS$) des groupements méthylènes liés au groupement hydroxyle dont la fréquence est légèrement décalée vers le bleu ($\sim 16\ cm^{-1}$) comme observé sur les spectres infrarouges d'alcools [130]. En effet, il a été montré que les liaisons $C-H$ des fonctions CH_2-O possèdent des constantes de force supérieures à celles observées dans le cas des $CH_2 - C$, ce qui se traduit par des déplacements vers les grandes énergies [131][132].

Sur la figure 8.2(b) nous pouvons voir le spectre SFG d'une couche de ssDNA-SH adsorbée sur platine et préparée avec la solution tampon PBS. Le meilleur ajustement détermine quatre modes de vibration situés à 2856, 2910, 2881 et 2932 cm^{-1}. Par analogie avec nos précédentes attributions, les deux pics situés à 2856 et 2910 cm^{-1} sont associés aux vibrations d'élongations symétrique ($CH_2 - SS$) et asymétrique ($CH_2 - AS$) des CH_2 de la chaîne alcane du bras d'ancrage. En effet, les résonances se situent à des fréquences identiques ou très proches (dans la limite de résolution du laser) de celles observées pour le MCH. Les deux autres modes sont attribués aux derniers groupements méthylènes de la chaîne moléculaire qui sont également liés à un atome d'oxygène. Pour ces modes, nous observons un déplacement en fréquence d'environ 25 cm^{-1} vers le bleu par rapport aux vibrations des CH_2 aliphatiques du bras d'ancrage, ce qui apparaît un peu plus élevé que pour le MCH. La raison est sans doute la nature de la liaison entre le brin d'ADN et son bras d'ancrage thiolé (voir figure 8.3).

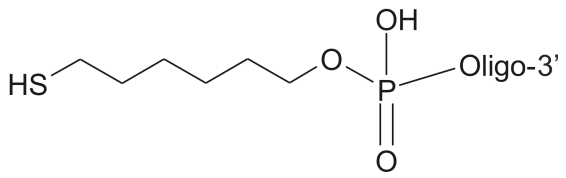


FIGURE 8.3 – *Représentation schématique du bras d'ancrage thiolé et de sa fixation sur le brin d'ADN.*

Ces différences mineures mises à part, les deux signatures vibrationnelles sont assez similaires. L'unique explication de cette similitude est d'admettre que le spectre SFG issu de la couche de ssDNA-SH est largement dominé par la contribution des bras d'ancrage thiolés dont la structure chimique ressemble fortement à celle du MCH. Ceci implique aussi que les molécules de mercaptohexanol et les bras d'ancrage en question s'adsorbent bien sur la surface dans une conformation semblable. Cependant, malgré la présence de nombreux groupements méthylènes dans sa structure, l'absence de contribution issue de l'ADN lui-même suggère que les brins adoptent une configuration extrêmement désordonnée.

Par ailleurs, l'intensité SFG apparaît légèrement inférieure dans le cas des spectres du ssDNA-SH, ce qui indique un recouvrement de surface et/ou une organisation des bras d'ancrage légèrement plus faibles par rapport au cas du MCH. Ceci est consistant avec l'observation générale statuant que des bases provenant de l'ADN peuvent interagir directement avec la surface métallique en adoptant une conformation désordonnée [133][134][135], ce qui perturbe le processus d'auto-assemblage des bras d'ancrage.

Quant aux couches mixtes ssDNA-SH/MCH, nous observons systématiquement une signature vibrationnelle indissociable de celle obtenue pour la couche d'ADN seule (données non présentées). Ceci nous permet seulement de confirmer que la formation de la couche s'effectue de manière similaire sans pouvoir en déduire d'informations supplémentaires.

Gamme des N-H et grandes longueurs d'onde

Comme nous pouvions nous y attendre au vu des résultats discutés ci-dessus, nous ne sommes jamais parvenus à obtenir une signature vibrationnelle caractéristique de l'ADN dans les autres gammes spectrales que nous avons investiguées et ce, malgré de nombreuses tentatives. Ceci résulte bien sûr du fait que les brins portant les différentes fonctions chimiques d'intérêt adoptent une configuration désordonnée. Ils pointent alors dans toutes les directions aléatoirement, ce qui, au regard des règles de sélection de la SFG, peut être assimilé à une conformation globalement centrosymétrique.

Pour contourner cette difficulté, prérequis indispensable à des analyses plus approfondies, nous avons multiplié les mesures SFG tout en variant bon nombre de paramètres expérimentaux dans le but de mieux contrôler l'orientation des brins. La table 8.3 présente un résumé des principaux paramètres que nous avons investigués au cours de nos expériences. Toutefois, au vu du volume de données expérimentales, nous avons choisi de ne pas présenter le détail de tous les spectres SFG associés qui sont, pour la plupart, dénués de toute résonance.

Malheureusement, cette profusion de résultats ne nous a toujours pas permis de mettre à jour un signal SFG propre à l'ADN. En effet, la plupart des paramètres restaient sans effet visible et pour certains, nous nous sommes

Paramètres	
Substrat	Or (films et monocristaux), platine (films et monocristaux), AuNP et diamant
Configuration expérimentale	Classique et TIR
Interface sondée	Solide/gaz et solide/liquide
Solution tampon	PBS et TE (voir section 8.5.3)
Salinité du tampon	de 0 à 150 mM
Type de sel	$NaCl$ et $CaCl_2$
pH du tampon	de 4,5 à 7,4
Séquences	Enrichies ou appauvries en thymine
Longueur du brin	Longs (25-mères) ou courts (2-mères)
Type de spacer	MCH ou PEG (voir [136])
Immersion MCH	de 5 minutes à 24 heures
Gamme spectrale	$C-H$, $N-H/O-H$ et $C=O$
Longueur d'onde visible	488, 532 et 647 nm
Méthode d'adsorption	Chimisorption ou micro-impression

TABLE 8.3 – Tableau récapitulatif des différents paramètres impliqués dans nos expériences SFG sur les couches d'ADN.

retrouvés confrontés à des difficultés expérimentales inattendues qui ne nous ont pas permis de pousser nos investigations plus loin (comme pour les interfaces solide/liquide par exemple).

8.5.2 Hybridation

Dans le but de détecter le processus de reconnaissance avec les brins complémentaires, nous avons systématiquement exposé les échantillons d'ADN sondes à la solution de ssDNA-comp dans l'espoir que, sous l'effet de l'hybridation, les brins adoptent une conformation plus organisée en prenant leur structure en double hélice et que cela mène à une activation de certains modes SFG. La durée standard de l'exposition à la solution de molécule cible était d'environ 2 heures. Puis, l'échantillon était à nouveau rincé et séché avant de procéder aux nouvelles analyses. Dans tous les cas, aucune modification sensible des signatures vibrationnelles n'a pu être observée, ce qui signifie que la détection du mécanisme d'hybridation n'a pas pu être mise en évidence. Ceci est bien entendu une conséquence de l'absence de signaux caractéristiques de l'ADN sonde. Cependant, puisque nous pouvons exclure l'apparition de nouvelles bandes caractéristiques de l'ADN cible (étant donné que dans ce cas précis, les molécules sondes et cibles sont identiques au niveau structurel, la séquence mise à part) et que l'occurrence de l'hybridation a été préalablement confirmée par nos mesures SPR, nous pouvons de nouveau conclure à une désorganisation complète des doubles brins hybridés.

8.5.3 Importance de la solution tampon

Parmi les paramètres expérimentaux que nous avons fait varier dans le but d'identifier la signature spectroscopique de l'ADN, nous avons notamment employé différentes solutions tampon pour réaliser nos échantillons. Ceci nous a amené à l'observation d'un phénomène inattendu mais néanmoins intéressant que nous nous proposons de décrire ici. Les panneaux (a) et (b) de la figure 8.4 présentent donc les spectres obtenus dans la gamme des $C-H$ à partir d'échantillons de ssDNA-SH préparés avec du tampon PBS ou TE.

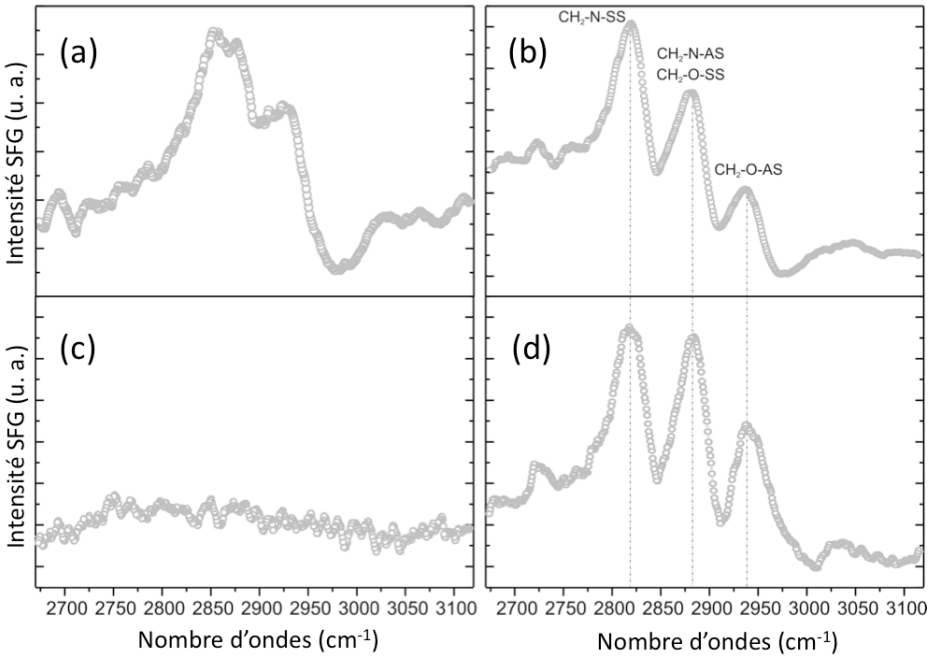


FIGURE 8.4 – *Spectres SFG de couches de ssDNA-SH adsorbées sur platine et préparées en utilisant du tampon PBS (a) ou du tampon TE (b). Spectres SFG de surfaces de platine exposées à du tampon PBS (c) ou du tampon TE (d).*

Comme nous pouvons le voir, ces spectres exhibent des signaux drastiquement différents. Dans le but de comprendre l'origine de ces dissemblances, nous avons également mesuré les signatures vibrationnelles de surfaces de platine exposées à du tampon PBS ou du tampon TE (figure 8.4 (c) et (d)). Comme le montrent les spectres, nous n'observons aucune résonance dans le premier cas, comme nous pouvions le prévoir au vu de l'absence de modes de vibration des molécules constituant le PBS dans la gamme spectrale considérée. Par contre, la surface immergée dans le tampon TE présente des pics très similaires à ceux observés précédemment.

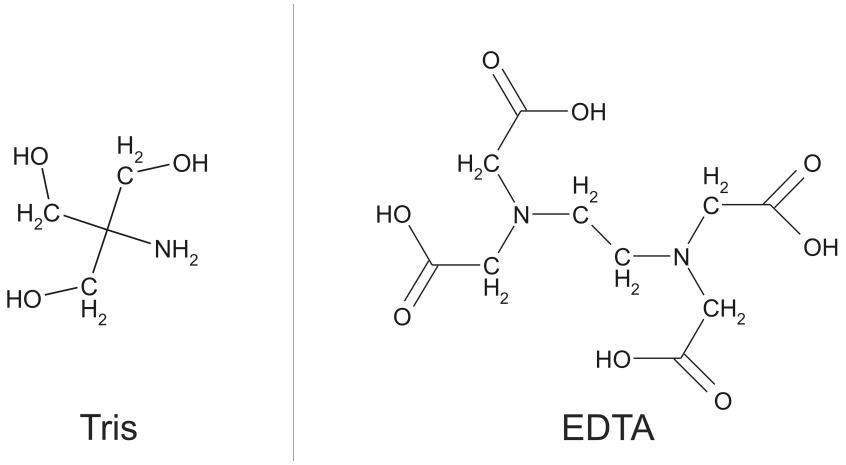


FIGURE 8.5 – *Représentation schématique des molécules de Tris et d'EDTA contenues dans la solution tampon TE.*

En ce qui concerne l'attribution de ces nouvelles résonances, nous pouvons tout d'abord statuer qu'elles proviennent de vibrations $C-H$ puisque le spectre se situe dans la gamme correspondante. Pour nous permettre d'aller plus loin, la figure 8.5 nous montre une représentation schématique des molécules de Tris et d'EDTA qui constituent le tampon TE. Comme nous le voyons, il n'y a pas de groupements méthyles présents dans leur structure, ce qui restreint donc notre assignation aux fonctions CH_2. Cependant, au vu du nombre de groupements méthylènes présents dans chacune des entités, il reste difficile de déterminer l'origine des résonances sans ambiguïté. Néanmoins, nous proposons une interprétation en associant les vibrations situées autour de 2880 et 2940 cm^{-1} aux modes d'élongations symétrique et asymétrique des fonctions CH_2 du Tris (CH_2-O-SS et CH_2-O-AS). Puisque ces dernières sont toutes connectées à un atome d'oxygène, nous observons un décalage en fréquence vers le bleu similaire à celui discuté dans le cas du MCH. La troisième résonance localisée à environ 2820 cm^{-1} se trouve quant à elle à une position inférieure en nombre d'ondes par rapport aux valeurs standards de la littérature. Nous pouvons toutefois attribuer ce mode à la vibration d'élongation symétrique des CH_2 issus de l'EDTA (CH_2-N-SS). En effet, ces derniers sont tous connectés à un atome d'azote ce qui, à l'opposé de la présence de l'oxygène, induit un assouplissement de la constante de force des liaisons $C-H$ voisines [137]. Ceci se traduit par un décalage en fréquence de la vibration vers les grandes longueurs d'onde (les petits nombres d'ondes). En ce qui concerne le mode asymétrique associé (CH_2-N-AS), nous pouvons imaginer un comportement similaire, ce qui signifie qu'il devrait également subir un décalage d'environ 30 cm^{-1} vers le bas par rapport à sa fréquence habituelle. Cette dernière étant initialement

de l'ordre de 2910 cm^{-1} (voir chapitre 4), nous nous attendons à trouver la résonance autour de 2880 cm^{-1}. Cette valeur correspondant également à la fréquence associée au mode $CH_2 - O - SS$, nous devons envisager que les deux pics sont confondus.

Au final, ceci suggère que la signature vibrationnelle observée dans les spectres (b) et (d) est caractéristique des molécules de TE et non de l'ADN. Nous pouvons donc en arriver à la conclusion importante que des molécules issues de la solution tampon restent intercalées entre celles de ssDNA-SH, occultant alors le signal que nous souhaitons mesurer. Signalons par ailleurs que quand nous multiplions les rinçages successifs de l'échantillon à l'eau milliQ, il nous a été possible dans certains cas de retrouver la signature des molécules de ssDNA-SH telle que présentée à la figure 8.4(a). Ceci atteste que la couche d'ADN est belle et bien formée dans les deux cas.

8.5.4 Et la suite ?

Malgré notre incapacité à extraire le signal SFG de l'ADN en lui-même et, de ce fait, à détecter le processus d'hybridation, il nous faut être totalement objectif et rendre compte de l'actualité récente en matière de SFG appliquée aux capteurs ADN. En effet, force est de constater que les résultats présentés ici se posent comme les premiers jamais publiés sur le sujet (à notre connaissance du moins). Depuis, nous dénombrons à ce jour seulement trois articles scientifiques qui traitent de l'étude de monocouches d'ADN étudiées par spectroscopie SFG. Nous nous proposons de les décrire brièvement afin de faire le point sur la question.

Dans le premier, paru en juin 2007, Stokes *et al.* décrivent la signature des groupements méthyles issus d'homo-oligo-nucléotides modèles (toutes les bases sont identiques) composés de 15 thymines et assemblés sur du quartz [138]. L'utilisation de telles séquences a pour but de maximiser la présence de groupements méthyles à l'interface. Ces mesures, réalisées en phase liquide à l'aide d'un dispositif SFG femtoseconde, sont les premières à identifier clairement une signature caractéristique de l'ADN. A cet article fait écho une toute récente publication (janvier 2009) du groupe de Koelsch dans laquelle est présentée la signature SFG issue de simples brins d'ADN adsorbés sur des substrats d'or [139]. Les auteurs y présentent notamment des spectres faisant apparaître des résonances CH_3 et $C = O$ caractéristiques de la molécule et ce, à des interfaces solide/gaz et solide/liquide. Leur stratégie pour organiser les brins s'est portée sur l'utilisation de séquences très courtes (5-mères) d'homo-oligo-nucléotides, notamment des séquences $5' - TTTTT - 3'$.

Par ailleurs, fin 2008, le groupe de Uosaki présente une étude SFG discutant l'organisation de molécules d'ADN simples brins adsorbés sur une surface de silicium en fonction du type de sel présent dans le tampon [140]. Les spectres présentés dans l'article montrent, comme dans notre cas, les signatures vibrationnelles des bras d'ancrage utilisés pour l'accrochage des

oligo-nucléotides à la surface. Cependant, dans leur système, les molécules intercalées entre les brins (le MCH chez nous) possèdent un groupement terminal méthyle, ce qui leur permet de suivre les résonances CH_3. En réalité, ils obtiennent des spectres comparables à ceux présentés dans le chapitre 4. Ils discutent alors l'organisation des brins à travers les effets d'orientation que ceux-ci induisent dans la couche de fixation. Bien que les auteurs ne soulignent pas du tout cet aspect, ils sont cependant parvenus à mettre en évidence le phénomène de reconnaissance moléculaire de manière indirecte puisque leurs spectres avant et après hybridation présentent des variations induites par le processus de reconnaissance moléculaire.

8.6 Conclusions

Au terme de ce dernier chapitre, traitant de l'étude de capteurs ADN par spectroscopie SFG, nous pouvons conclure en soulignant que l'interprétation des spectres nous fournit des informations fondamentales sur la structure moléculaire à la surface de tels systèmes. En effet, nous avons pu confirmer que la monocouche d'oligo-nucléotides était effectivement formée sur nos échantillons ; les bras d'ancrage s'orientant d'une manière similaire à celle observée lors de la formation de SAM tandis que les brins d'oligo-nucléotides adoptent une conformation très désorganisée. Ceci a pour effet de les rendre inactifs en SFG et donc invisibles sur nos spectres. Pour cette raison, nous ne sommes cependant pas parvenus à mettre en évidence le processus d'hybridation au moyen de la spectroscopie SFG. Malgré cela, les informations recueillies, loin d'être anecdotiques, nous fournissent une meilleure compréhension des mécanismes de formation des capteurs ADN et posent des jalons importants pour des analyses ultérieures. Par ailleurs, en utilisant une solution tampon alternative, nous avons mis en évidence l'intercalation de molécules issues de celle-ci entre les molécules de ssDNA, ce qui peut amener à l'apparition de bandes indésirables sur les signatures vibrationnelles. Ceci souligne l'importance d'employer une solution tampon dont les éléments constitutifs ne possèdent pas de modes de vibration dans la gamme spectrale considérée.

Par ailleurs, une analyse sommaire de la bibliographie récente en la matière nous confirme que les perspectives résident dans les stratégies d'orientation des brins sondes à la surface du capteur. A ce propos, une méthode intéressante serait de travailler en conditions électrochimiques afin de pouvoir appliquer un champ électrique à l'interface du capteur. En effet, il a été montré que l'ADN, chargé négativement, s'aligne dans la direction du champ lorsqu'il est en solution [141]. Ceci nécessite néanmoins une maîtrise préliminaire de l'acquisition de spectres SFG de molécules d'ADN en phase liquide. Une autre piste à suivre serait d'utiliser des molécules d'acide nucléique peptidique (PNA -*Peptide Nucleic Acid*) qui sont des molécules syn-

thétiques semblables à l'ADN. En réalité, elles comportent les mêmes bases mais se différencient par leur squelette composé d'une succession d'unités N-(2-aminoethyl)-glycines reliées entre elles par des liaisons peptidiques. Pour nos applications, cette particularité pourrait s'avérer être un avantage du fait d'une plus grande traçabilité potentielle de ce squelette carboné dans les spectres. Par ailleurs, la reconnaissance moléculaire entre une séquence de PNA et son complémentaire en ADN s'avère meilleure et plus stable que l'équivalente ADN/ADN. En effet, la molécule étant non chargée (de par l'absence de groupement phosphate), il n'existe pas de répulsion électrostatique entre la cible et la sonde. Néanmoins, les PNA présentent deux inconvénients majeurs : d'une part, leur coût considérablement plus élevé et d'autre part, leur manipulation chimique, moins maîtrisée et beaucoup moins décrite dans la littérature.

Conclusion générale

La motivation initiale de ce travail était l'étude de biocapteurs au moyen de la spectroscopie de génération de fréquence-somme. Afin de mener à bien cet objectif, ce manuscrit s'est articulé autour de deux grandes parties. La première avait pour objet d'exposer les fondements de la spectroscopie SFG afin de mieux appréhender les spécificités de cette technique et de souligner les apports de celle-ci à un champ d'investigation nouveau tel que celui des capteurs biologiques. Cette partie s'est terminée par une discussion sur les considérations expérimentales et techniques nécessaires à la mise en œuvre pratique de cette spectroscopie.

La seconde partie de ce travail traitait des résultats expérimentaux. Dans celle-ci, nous nous sommes tout d'abord attachés à décrire l'étude spectroscopique d'un système simple, à savoir des monocouches auto-assemblées obtenues à l'aide de molécules de décanethiol et de décyl thiocyanate sur substrat de platine. Ceci nous a permis de présenter plus en détail les mécanismes d'interprétation des différents spectres SFG. Par ailleurs, nous avons également montré comment l'information spectroscopique de surface obtenue pouvait être complétée et enrichie grâce à d'autres techniques d'analyse de surface reconnues telles que la spectroscopie infrarouge, la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X ou encore la microscopie à effet tunnel. Au niveau du contenu des résultats présentés, nous sommes arrivés à la conclusion que, bien que les groupements d'ancrage thiocyanates autorisent la formation de SAM, ces dernières adoptent une conformation plus désordonnée que celle obtenue à l'aide de fonctions thiols. Ce comportement est induit par la persistance d'espèces cyanures adsorbées à l'interface métallique qui perturbent le processus d'assemblage.

Nous avons ensuite abordé la confrontation entre la spectroscopie SFG et un biocapteur modèle. Ce dernier, basé sur le système bien connu biotine/avidine, a joué le rôle de capteur-test au regard de cette première approche. Celle-ci s'est révélée prometteuse puisque nous avons été à même de montrer que certaines modifications des spectres SFG pouvaient être considérées comme caractéristiques du processus de reconnaissance moléculaire. Nous en avons déduit que la SFG est capable de détecter cette reconnaissance et donc de lire l'information du capteur. Ensuite, nous avons poursuivi notre démarche en démontrant, à l'aide de molécules cibles alternatives, que cette

détection s'effectue de manière sélective. Ceci positionne notre technique en bonne place comparativement aux outils de détection habituellement utilisés dans le domaine.

Avant d'appliquer ces constatations à un système plus complexe, nous nous sommes attachés à identifier une architecture chimique menant à l'élaboration de capteurs ADN efficaces en matière de qualité du processus d'hybridation. Pour ce faire, nous nous sommes initiés à une technique reconnue que nous avons utilisée comme référence, à savoir la résonance de plasmon de surface. A l'aide de cette dernière, nous avons mené une étude comparative des performances obtenues avec différentes méthodes de préparation de capteurs ADN sur substrats d'or. En insistant sur l'importance d'une couche protectrice destinée à réduire les adsorptions non spécifiques, les résultats nous ont permis d'identifier une procédure adaptée à notre démarche.

Le dernier chapitre de cette partie expérimentale consistait en l'application de la spectroscopie SFG au système préalablement identifié. Ces mesures ne nous ont pas permis de détecter le processus d'hybridation du fait de l'absence de signature caractéristique de la molécule d'ADN. Malgré cela, nous avons confirmé la formation de la couche de molécules sondes et montré que cette absence de signal était due à une désorganisation complète des brins à l'interface du capteur, ce qui contribue grandement à une meilleure compréhension des mécanismes de formation de capteurs ADN. Nous avons également mis en évidence l'intercalation de molécules issues de la solution tampon et par là même, souligné l'importance du choix de celle-ci. Finalement, une analyse sommaire de la bibliographie récente sur le sujet nous a permis de dégager quelques pistes pour de futures analyses.

En ce qui concerne les perspectives, nous pouvons mentionner que les résultats présentés ici ouvrent une voie prometteuse vers plusieurs champs d'investigation. Ils montrent que la SFG est capable de détecter le processus de reconnaissance moléculaire, même si une de ses limitations réside dans l'organisation régnant à la surface du capteur. En ce sens, les capteurs ADN sont un bon exemple puisque c'est précisément le désordre des molécules sondes qui limite nos investigations. Néanmoins, au vu de la multitude de biocapteurs différents examinés aujourd'hui par la communauté scientifique, il reste du pain sur la planche. Une première perspective évidente serait donc d'appliquer cette technique à la détection de la reconnaissance moléculaire entre différentes espèces impliquées dans d'autres types de capteurs. Nous citerons en guise d'exemples les réseaux de protéines ou encore les capteurs basés sur les complexes immuns (complexes antigènes/anticorps). Rien ne nous empêche également de nous tourner vers les capteurs chimiques utilisés pour détecter la présence d'une entité chimique particulière (comme un gaz par exemple). En effet, ces derniers impliquent généralement des molécules plus petites, ce qui peut s'avérer plus adapté à l'information spectroscopique dont nous disposons.

Au niveau des capteurs ADN, nous avons déjà soulevé quelques perspectives intéressantes en vue d'obtenir la signature vibrationnelle des molécules impliquées dans l'hybridation. D'une part, nous avons discuté l'utilisation de molécules sondes alternatives telles que les PNA (acide nucléique peptidique) et d'autre part, nous avons proposé des stratégies permettant de mieux contrôler l'orientation des brins à l'interface, notamment à l'aide d'un champ électrique.

Par ailleurs, il faut préciser que l'étude de biocapteurs telle qu'elle est développée ici, malgré son intérêt fondamental évident, ne peut pas trouver d'application pratique dans la mesure où c'est la même molécule sonde qui est adsorbée sur toute la surface. Afin de réaliser un dispositif complet et performant, d'autres paramètres restent à maîtriser. Dans un premier temps, il nous faudrait déposer sur le substrat différentes molécules sondes sous forme de nano-plots, ce qui pourrait être accompli à l'aide d'une technique comme la micro-impression de contact. L'idée serait alors d'effectuer une cartographie spectroscopique de la surface réalisée par *microscopie SFG*. Dans cette variante de la spectroscopie SFG classique, le signal est récolté simultanément à partir de différents points de l'échantillon par une caméra CCD, qui dévoile ainsi une image vibrationnelle de l'interface. Un tel dispositif est d'ailleurs actuellement en cours de développement au laboratoire et des premières images encourageantes ont été récemment obtenues par Dan Lis dans le cadre de ses travaux de recherche.

Au vu de ces différentes perspectives, il reste à conclure en disant que ce travail constitue une percée encourageante de l'optique non linéaire dans le monde des biocapteurs mais que la route est encore longue avant de faire de la spectroscopie SFG une technique de routine en matière de détection de reconnaissance moléculaire.

De surcroît, arrivé au terme de ce manuscrit, je voudrais terminer en évoquant ce que ce travail m'a apporté à titre personnel. Il s'agit premièrement d'un apport scientifique. En effet, la manipulation de plusieurs techniques de caractérisation de surface a considérablement enrichi mon bagage scientifique. Par ailleurs, les différents développements décrits dans ces pages m'ont amené à interagir avec bon nombre de scientifiques de qualité dans tous les domaines et ce, aux quatre coins du globe. Ceci m'a apporté une ouverture sur des points de vue différents et a affiné mon esprit critique. Je pense également à l'aspect « gestion de projet » qu'implique une thèse de doctorat. Celui-ci m'a appris à organiser mon temps en fonction des objectifs et à le partager de manière intelligente, ce qui est d'autant plus vrai lorsque les travaux de recherches s'accompagnent de charges didactiques. Pour toutes ces raisons (et d'autres), l'élaboration de ce travail a constitué pour moi une expérience extrêmement enrichissante à tous les niveaux. Je souhaiterais donc clôturer celui-ci en adressant à nouveau mes plus vifs remerciements à tous ceux qui y ont contribué de quelque manière que ce soit.

Annexes

Annexe A

Autres techniques utilisées

Cette annexe présente une description sommaire des différentes techniques qui ont été utilisées au cours de ce travail en complément de la spectroscopie SFG. L'ambition de cette section est de fournir au lecteur non initié des clés de compréhension pour lui permettre d'appréhender les quelques résultats qui ont été obtenus à l'aide de ces méthodes.

A.1 La résonance de plasmon de surface

De la même manière qu'un phonon désigne un quantum de vibration des ions dans un solide, un plasmon se définit comme une onde de plasma quantifiée qui correspond à une oscillation collective des électrons libres d'un métal. Mis à jour par U. Fano en 1941 [142] et décrits par R. H. Ritchie en 1957 [143], les plasmons de surface, connus aussi sous le nom de polaritons (combinaison entre un plasmon et un photon) de surface, sont donc des ondes électromagnétiques qui se propagent dans une direction parallèle à la surface du métal. Ils sont dits « de surface » car le vecteur d'onde qui les caractérise possède deux composantes. L'une, réelle, décrit leur propagation le long de l'interface tandis que l'autre, imaginaire, rend compte d'une décroissance exponentielle (évanescence) de l'intensité du champ électrique de part et d'autre de la surface. Ils représentent en fait une solution particulière des équations de Maxwell appliquées à la propagation des ondes électromagnétiques à l'interface entre certains milieux.

Initialement, la génération de plasmons de surface s'effectuait à l'aide de faisceaux d'électrons ou de photons couplés à des réseaux. Il a fallu attendre 1968, pour qu'Otto et Kretschmann décrivent, presque simultanément, des configurations expérimentales distinctes (respectivement connues sous les noms de configuration d'Otto et configuration de Kretschmann) permettant la conversion aisée d'un faisceau lumineux en plasmon de surface, ce qui ne semblait pas si évident à l'époque. En effet, le couplage entre l'onde plasma et la lumière n'est efficace que lorsqu'il y a un accord entre les vitesses des

ondes (accord de phase), c'est-à-dire égalité de leur vecteur d'onde le long de l'interface. Il faut donc qu'il existe une intersection entre les courbes de dispersion de la lumière et du plasmon. Si la relation de dispersion associée aux photons dans l'air est linéaire, il n'en est pas de même pour les plasmons de surface qui obéissent à l'équation suivante :

$$\omega = c\sqrt{\frac{\epsilon_1 + \epsilon_2}{\epsilon_1 \epsilon_2}}k, \tag{A.1}$$

avec k étant le vecteur d'onde ; ω, la pulsation ; c, la vitesse de la lumière et ϵ_1 et ϵ_2, les constantes diélectriques des deux milieux constituant l'interface où évolue le plasmon. Il en résulte que l'accord de phase est impossible a priori. Pour le comprendre, considérons le cas simple où nous souhaitons exciter un plasmon à l'aide de photons à une interface air/métal, ce qui impose que $\epsilon_1 \approx 1$. Dans ces conditions, la figure A.1 (volet de gauche) nous montre qu'en configuration classique, lorsque le faisceau lumineux est envoyé directement à travers l'air sur la surface métallique, il n'est pas possible d'obtenir un accord de phase car il n'y a pas d'intersection entre les deux courbes de dispersion (mis à part le point (0,0)).

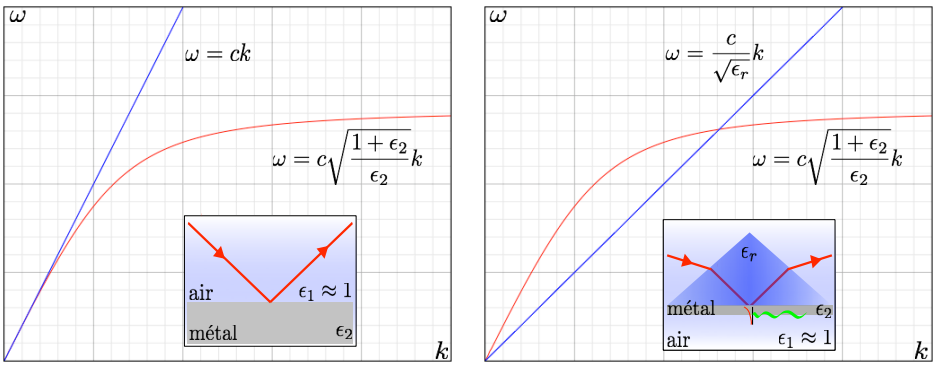


FIGURE A.1 – *Génération d'un plasmon de surface à une interface entre un métal ($\epsilon_2 = 1 - \omega_p^2/\omega^2$) et l'air ($\epsilon_1 \approx 1$) induite par des photons. A gauche : courbes de dispersion des photons se déplaçant dans l'air (en bleu) et du plasmon se propageant à l'interface air/métal (en rouge). L'accord de phase est impossible et aucun plasmon n'est excité. A droite : courbes de dispersion du photon se déplaçant dans un diélectrique de constante $\epsilon_r > 1$ (ici en configuration de Kretschmann) et du plasmon se propageant à l'interface métal/air. L'accord de phase se produit pour le couple de valeurs (k, ω) situé à l'intersection des deux courbes et un plasmon de surface peut être excité.*

L'idée commune de Otto et de Kretschmann a été de forcer la lumière à ralentir en la faisant passer préalablement dans un milieu diélectrique (dont la constante ϵ_r est supérieure à 1). Pour y parvenir, ils ont simplement dirigé

le faisceau à travers un prisme en verre avant que celui-ci ne parvienne à l'interface métal/air où le plasmon sera généré. Ceci a pour effet de diminuer le coefficient angulaire de la droite de dispersion du photon (en le divisant par $\sqrt{\epsilon_r}$), ce qui permet de trouver un nouveau point d'intersection non trivial entre les deux courbes (voir figure A.1, volet de droite). L'accord de phase est alors réalisé pour un couple donné de valeurs (k, ω) et un transfert d'énergie entre le rayonnement et l'onde plasmonique se produit.

En réalité, seule la composante parallèle à la surface du vecteur k associé aux photons ($k_{\parallel} = k \sin\theta$ où θ est l'angle d'incidence mesuré par rapport à la normale) contribue à l'excitation du plasmon. Ce qui signifie que la condition d'accord de phase $k_{photon} = k_{plasmon}$ devient finalement :

$$\sqrt{\epsilon_r} \sin\theta = \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}}. \tag{A.2}$$

Suite à ces développements, un réel engouement pour les plasmons s'est manifesté dans la communauté scientifique, en particulier dans le monde des biocapteurs avec l'émergence des techniques de Résonance de Plasmon de Surface (SPR - *Surface Plasmon Resonance*). En effet, en 1983, Liedberg *et al.* montrent que ces ondes surfaciques peuvent être appliquées à la détection de gaz ou de molécules biologiques [144]. Un peu plus tard, Magnus Malmqvist décrit un dispositif complet permettant la détection de molécules cibles en temps réel et sans marqueur à l'aide de plasmons [145] et rejoint la société *Biacore* qui reste aujourd'hui encore le leader sur le marché de la SPR. Son principe repose sur de simples mesures de réflectivité. Concrètement, il reprend la configuration de Kretschmann, à savoir un prisme de verre à haut indice de réfraction sur la base duquel est déposée une mince couche d'or qui est mise en contact avec la solution d'intérêt biologique. Un faisceau laser est alors focalisé sur la couche métallique à travers le prisme, dans le but d'exciter un plasmon à l'interface or/solution. Durant l'expérience, on fait varier l'angle d'incidence du faisceau lumineux tout en mesurant l'intensité réfléchie à sa sortie du prisme (dans la pratique, toutes les incidences sont envoyées simultanément et une CCD mesure instantanément la courbe de réflectivité). Comme nous le montre la condition A.2, l'accord de phase est réalisé pour un angle d'incidence θ particulier qui dépend des indices de réfraction de l'interface (appelons-le *angle plasmonique* θ_R). Cela signifie que lorsque θ_R est atteint par le faisceau lumineux, celui-ci génère effectivement un plasmon en lui communiquant son énergie, ce qui se traduit par une chute brutale dans l'intensité de la lumière réfléchie. Si des molécules viennent s'adsorber sur la surface d'or, elles vont induire une variation locale de l'indice de réfraction à l'interface proportionnelle à leur masse. Ceci signifie que la condition d'accord de phase désignera un nouvel angle θ_R pour l'excitation du plasmon et le minimum de réflectivité. Cette variation

angulaire est donc directement corrélée à la quantité de molécules déposées sur le métal. Ce principe est illustré à la figure A.2.

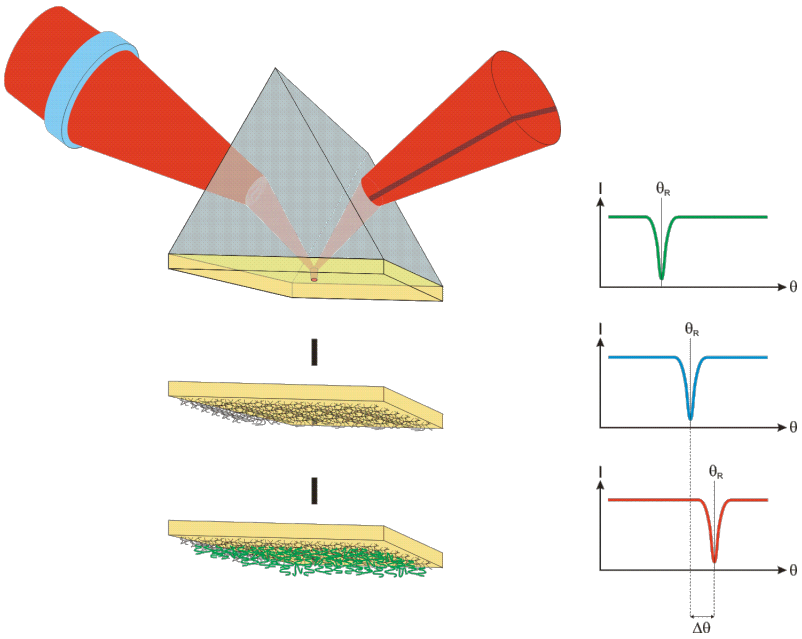


FIGURE A.2 – *Illustration schématique du principe de la SPR en configuration de Kretschmann. Un faisceau laser est focalisé sur une couche d'or à travers un prisme et l'intensité réfléchie est mesurée à sa sortie du prisme en fonction de l'angle d'incidence. Pour un angle θ_R donné, un plasmon est excité, ce qui se traduit par une chute de l'intensité réfléchie. Les panneaux inférieurs illustrent le fait que lorsque des molécules se déposent sur le film métallique, une variation de l'angle plasmonique est enregistrée.*

En mesurant les valeurs successives de l'angle plasmonique, il est possible de suivre l'adsorption et la désorption de molécules à la surface du film d'or. En particulier, si le film métallique a été fonctionnalisé préalablement à l'aide de molécules sondes, nous pouvons détecter la reconnaissance avec une solution de molécules cibles in situ et sans marqueur. L'évolution des θ_R est alors enregistrée en temps réel et reportée dans un sensorgramme en fonction du temps.

Dans la pratique, les mesures du chapitre 7 ont été réalisées au *Laboratory of Polymer Chemistry* de l'Université Keio (Japon) à l'aide d'un dispositif Biacore 2000. Cet équipement possède quatre canaux d'analyse couplés à un système de microfluidique robotisé permettant de réaliser quatre expériences en parallèle sur le même capteur. Les données expérimentales sont alors traitées avec le logiciel *BIAevaluation*.

A.2 La spectroscopie infrarouge

Par définition, la spectroscopie est l'étude expérimentale du spectre d'un phénomène physique, c'est-à-dire de sa décomposition sur une échelle d'énergie (ou d'une grandeur équivalente). De nos jours, il existe une grande quantité de techniques spectroscopiques, avec des applications dans tous les domaines scientifiques. Parmi elles, la spectroscopie infrarouge (IR) est probablement la plus répandue, aussi bien dans la recherche académique que dans l'industrie. Elle est ainsi dénommée car elle traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Dans cette plage, on distingue trois domaines particuliers : le proche infrarouge qui comprend les rayonnements dont la longueur d'onde est comprise entre 1 et 2,5 μm, le moyen infrarouge qui court de 2,5 à 25 μm et l'infrarouge lointain pour les longueurs d'onde supérieures à 25 μm. La gamme intermédiaire est celle qui présente le plus d'intérêt pour l'étude de composés organiques. Le domaine du proche infrarouge est peu utile à l'élucidation des structures moléculaires et est utilisé pour des applications quantitatives dont nous ne discuterons pas ici. L'observation du domaine lointain présente une complexité technique plus grande et n'est intéressante que pour l'étude de molécules incluant des atomes lourds.

La spectroscopie IR exploite le fait que les molécules vibrent à des fréquences spécifiques correspondant aux niveaux d'énergie discrets du système. En effet, la gamme énergétique couverte par le domaine infrarouge correspond typiquement à des transitions entre états vibrationnels. De ce fait, elle fait partie de la famille des spectroscopies vibrationnelles qui, par définition, permettent d'obtenir des informations sur les vibrations du milieu étudié. De manière identique à toutes les techniques de spectroscopie, elle permet l'identification de composés chimiques grâce à l'utilisation de tables de corrélation qui sont largement présentes dans la littérature.

Le phénomène physique qui entre en jeu dans cette technique est l'absorption d'un rayonnement par la matière, c'est pourquoi on parle souvent de spectroscopie d'absorption infrarouge. L'absorption d'une onde électromagnétique se produit quand la fréquence du rayonnement s'accorde avec la fréquence propre du vibrateur moléculaire. Nous observons alors une interaction résonante entre la composante électrique de l'onde et le dipôle associé à la liaison ou au groupe d'atomes impliqués dans la vibration. Le champ électrique interagit avec la vibration du dipôle dont elle augmente l'amplitude lorsque les fréquences sont en accord. Il y a transfert d'énergie : l'amplitude de la vibration croît et l'intensité de l'onde diminue. Sur un schéma de niveaux, ce mécanisme peut être représenté par l'absorption d'un photon induisant une transition du niveau fondamental vers un niveau vibrationnel excité si la pulsation ω du quantum de lumière correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux (voir figure A.3).

Finalement, le spectre infrarouge d'une molécule donnée reprend toutes les transitions permises entre ses différents états vibrationnels. Parmi ces

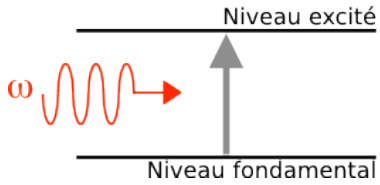


FIGURE A.3 – *Représentation du mécanisme d'absorption d'un photon induisant une transition du niveau fondamental vers un niveau excité.*

vibrations, les oscillations ou élongations, associant les mouvements relatifs de deux atomes séparés par une liaison, sont parmi les plus significatives. Pour faciliter l'étude de ce type de vibrations, on a généralement recours au modèle physique de l'oscillateur harmonique qui consiste à assimiler les deux atomes à un système constitué de masses ponctuelles m_1 et m_2 reliées par un ressort de raideur k figurant la liaison chimique. A partir de ce modèle, il est facile d'établir les relations associant la fréquence des vibrations du système aux deux grandeurs le caractérisant c'est-à-dire les masses et la constante de raideur. C'est ainsi que différents groupements moléculaires vont donner lieu à des fréquences de vibration caractéristiques différentes en fonction du type d'atomes et de liaisons impliqués. Il en résulte que le spectre infrarouge constitue une véritable signature vibrationnelle propre à la molécule étudiée et à ses constituants.

Expérimentalement, pour obtenir le spectre infrarouge du volume d'un échantillon, il suffit d'envoyer un rayonnement infrarouge à travers celui-ci et de mesurer la quantité d'énergie absorbée lorsque la fréquence de lumière infrarouge varie. Malheureusement, cette approche nécessite l'utilisation d'un monochromateur et un temps d'acquisition relativement long. Pour ces raisons, la mise en œuvre de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR - *Fourier Transform InfraRed Spectroscopy*) est généralement préférée. Dans cette approche, la lumière infrarouge émise par un corps noir chauffé (toutes fréquences confondues) passe au travers d'un interféromètre de Michelson. Après avoir traversé l'échantillon, le signal mesuré constitue alors un interférogramme auquel nous faisons subir une transformée de Fourier afin d'obtenir un spectre résolu en fréquence.

Les spectres infrarouges présentés dans ce travail sont pour la plupart des spectres de surface. Dans ce cas, la méthode décrite ci-dessus ne peut pas s'appliquer directement car l'atténuation du rayonnement induite par l'interface est très faible par rapport aux perturbations induites par le volume. Cette difficulté peut être contournée par la technique dite de réflexion-absorption (FT-IRRAS - *Fourier Transform InfraRed Reflection-Absorption Spectroscopy*) où le faisceau infrarouge adopte une incidence très rasante par rapport à la surface et où le spectre est acquis en collectant le signal réfléchi. Une autre alternative intéressante repose sur l'utilisation d'une méthode

de réflectivité différentielle basée sur la modulation rapide de la polarisation de l'onde électromagnétique qui privilégie les absorptions de surface : la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation (PM-IRRAS - *Polarization Modulation IRRAS*). Cette méthode facilite grandement la détection des absorptions de surface, en distinguant efficacement les absorptions polarisées venant de l'interface de celles isotropes provenant de l'environnement de l'échantillon. Concrètement, nos mesures ont principalement été réalisées au *Laboratoire de Réactivité de Surface* de Jussieu (Paris). Le dispositif expérimental que nous avons utilisé est constitué d'un spectromètre FTIR Nicolet qui peut être couplé à un modulateur de polarisation photoélastique implanté à l'extérieur du spectromètre, celui-ci permettant de moduler la polarisation du faisceau à une fréquence donnée. L'acquisition du signal s'effectue alors par détection synchrone à l'aide d'un détecteur infrarouge cryogénique.

A.3 L'XPS

La spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS - *X-ray Photoemission Spectrometry*), anciennement nommée ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*), a été développée à l'origine par Kai M. Siegbahn dans les années 60 [146]. Comme son père avant lui, il s'est vu décerner un prix Nobel de Physique en 1981 pour sa contribution à la mise au point de cette technique de caractérisation de surface largement utilisée de nos jours en recherche fondamentale et appliquée. Le principe d'analyse est fondé sur l'effet photoélectrique décrit par Einstein en 1905 dans lequel le concept du photon a été utilisé pour décrire l'éjection d'électrons d'une surface excitée par un rayonnement. Dans ce cas précis, l'échantillon est irradié par des rayons X monochromatiques qui provoquent l'ionisation de ses atomes. L'énergie cinétique des électrons arrachés au matériau est alors mesurée. Un spectre XPS est obtenu en comptant le nombre de photoélectrons en fonction des énergies mesurées. Celui-ci dévoile une série de pics d'émission à laquelle se superpose un fond continu résultant des électrons qui, au hasard des collisions avec d'autres atomes, ont perdu ou gagné de l'énergie cinétique. Ces résonances sont caractéristiques des éléments chimiques présents à l'interface. En effet, comme le faisceau incident est monochromatique, tous les photons excitateurs possèdent une énergie connue. Dans ces conditions, la relation d'Einstein nous montre que la mesure de l'énergie cinétique nous permet aisément de trouver l'énergie de liaison que possédait le photoélectron avant son ionisation :

$$h\nu = E_k + E_b. \tag{A.3}$$

Dans cette équation, $h\nu$ est l'énergie d'un photon X ; E_k, l'énergie cinétique mesurée et E_b, l'énergie de liaison. Puisque dans un atome, les électrons

sont regroupés en différentes orbitales auxquelles sont associées des valeurs d'énergie caractéristiques, la connaissance de ces énergies E_b donne accès à la composition chimique de la surface du matériau analysé. En particulier, la gamme d'énergies utilisée pour le rayonnement incident est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation d'électrons de cœur, ce qui fournit des informations propres à la nature des atomes investigués. D'un autre côté, les informations relatives à l'environnement chimique de ces atomes peuvent être déduites de petits déplacements des pics correspondant à la variation d'énergie entre couches de valence. Concrètement, toute modification de la structure électronique (liaison chimique, oxydation, *etc.*) de l'échantillon se traduira par un déplacement de la raie considérée.

Par ailleurs, l'intensité des pics observés dépend de plusieurs paramètres au nombre desquels nous retrouvons la longueur d'atténuation effective. Celle-ci rend compte du fait qu'un électron photoémis à une certaine profondeur dans le matériau doit traverser celui-ci avant de pouvoir être collecté. Cette traversée est affectée par des collisions potentielles avec les atomes qui constituent l'échantillon et ce phénomène est d'autant plus marqué que l'électron vient d'une profondeur importante. Il en résulte que l'XPS possède une profondeur d'analyse limitée au-delà de laquelle les photoélectrons ne peuvent parvenir jusqu'au détecteur. Celle-ci est de l'ordre de 10 nm au maximum lorsque nous collectons les électrons en émission normale, ce qui classe l'XPS parmi les techniques d'analyse de surface.

Un des grands avantages de l'XPS en tant que technique de caractérisation provient du fait que l'information fournie peut être utilisée de manière semi-quantitative. En effet, l'aire de chacun des pics permet le calcul de la concentration élémentaire en pourcentage atomique. Dans la pratique, bien que tout électron dont l'énergie de liaison est inférieure à celle du photon incident puisse être éjecté de l'atome, la probabilité d'ionisation varie d'une orbitale à l'autre. Il convient donc de pondérer l'intensité des pics par la section efficace du niveau considéré avant de procéder à la quantification. Par contre, puisque nous souhaitons collecter des électrons, cette technique nécessite un environnement ultra-haut vide (UHV) considéré généralement comme plus lourd à mettre en œuvre expérimentalement.

Les quelques spectres XPS réalisés au cours de ce travail ont été mesurés au *Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Electronique* (LISE) de Namur sur un spectromètre SSX-100 (*Surface Science Instruments*) utilisant un analyseur hémisphérique et des rayons X $AlK\alpha_{1,2}$ à 1486,6 eV. Le faisceau X est obtenu en bombardant une anode en aluminium avec des électrons de 10 keV. Les photons sont ensuite rendus monochromatiques par diffraction de Bragg sur un monocristal, ce qui leur confère une résolution en énergie de 0,95 eV. Pour finir, l'angle d'analyse pour la collecte des électrons était de 15°, mesuré par rapport à la surface de l'échantillon.

A.4 Le STM

Le premier microscope à effet tunnel à balayage (STM - *Scanning Tunneling Microscopy*) a été mis au point en 1982 par Binnig et Rohrer [147], ce qui leur a valu le prix Nobel de Physique cinq ans plus tard. Depuis, cette technique a pris une importance de plus en plus grande en science des matériaux, se positionnant aujourd'hui comme un outil indispensable pour l'analyse des surfaces à l'échelle atomique. Cet essor considérable est notamment dû à la capacité du STM à reconstruire une image de la topographie depuis l'échelle micrométrique jusqu'à l'échelle moléculaire ou atomique mais surtout à sa capacité de mesurer les propriétés électroniques individuelles d'objets nanoscopiques. Il fait partie de la famille des microscopies dites « à sonde locale ». Cette appellation signifie que les dimensions de la sonde et sa distance par rapport à l'échantillon sont très petites devant celles de l'objet dont on veut obtenir l'image. C'est la raison pour laquelle il faut balayer l'échantillon pour reconstruire l'image de l'ensemble de l'objet ligne par ligne.

L'effet tunnel est le principe physique de base sur lequel fonctionne la technique. Pour obtenir une image d'un échantillon conducteur, nous approchons une pointe (la sonde) également conductrice au voisinage de la surface. La couche d'air ou de vide isolante séparant ces deux conducteurs représente pour les électrons une barrière de potentiel. Si cette couche est suffisamment mince, la mécanique quantique nous apprend qu'il existe une probabilité non nulle pour que des électrons passent d'un métal à l'autre. En microscopie à effet tunnel, nous utilisons cette constatation et nous approchons suffisamment la pointe de l'échantillon pour qu'un courant d'électrons mesurable traverse la barrière. Cependant, autant d'électrons passent dans un sens que dans l'autre ce qui, globalement, donne un courant nul. En appliquant une différence de potentiel entre la pointe et l'échantillon, nous faisons apparaître un courant net d'électrons dans un sens ou dans l'autre. Ce courant, appelé courant tunnel, dépend exponentiellement de la distance pointe-échantillon. Le dispositif sonde alors la densité des états électroniques au voisinage du niveau de Fermi. Celle-ci est cartographiée grâce au balayage, avec une résolution sans précédent qui résulte de cette dépendance exponentielle. C'est cette dernière qui permet au STM de contourner le fameux critère de Rayleigh et d'obtenir, dans le meilleur des cas, une résolution atomique. En effet, il est aisé de comprendre l'excellente résolution verticale du microscope puisque le courant est très sensible aux variations du relief. Pour ce qui est de la bonne résolution latérale, elle découle également de cette sensibilité verticale car dans ces conditions, seul l'atome à l'apex de la pointe contribue au courant tunnel. La contribution venant des atomes situés légèrement en retrait décroît rapidement et est donc considérée comme négligeable.

Pratiquement, le dispositif STM est constitué de trois parties principales : un scanner piézoélectrique qui permet d'effectuer le balayage nécessaire à l'imagerie ainsi que l'approche de la sonde, une pointe conductrice

et une unité de contrôle qui assure l'acquisition des données et le contrôle du microscope. En ce qui concerne l'acquisition des données, il existe deux principales méthodes : le mode à courant constant, qui est le plus utilisé et le mode à hauteur constante. Dans le premier cas, l'utilisateur fixe une valeur de référence pour le courant tunnel. Pendant le balayage, le microscope utilise une boucle de contre-réaction c'est-à-dire qu'à chaque point de mesure, si le courant mesuré est différent de la valeur de référence, l'ordinateur ajuste le potentiel envoyé au scanner piézoélectrique afin de rétablir la valeur du courant de référence. Comme nous l'avons vu, le courant tunnel dépend de la distance pointe-échantillon. Dans ces conditions, maintenir un courant tunnel constant équivaut à garder cette distance constante. La pointe suivra donc, plus ou moins fidèlement, la topographie de la surface analysée et l'image obtenue sera en fait une retranscription des mouvements du scanner selon l'axe z. Ce mode de fonctionnement convient parfaitement aux surfaces accidentées puisque la position de la pointe est constamment corrigée. Cependant, son inconvénient majeur est un balayage plus lent puisqu'il nécessite à tout moment l'intervention de la boucle de contre-réaction. Dans le second mode, c'est la hauteur qui reste constante et les mesures portent sur les variations du courant tunnel en fonction de la topographie. Ce sont les valeurs du courant tunnel à chaque point de mesure qui serviront à former l'image. La boucle de contre-réaction n'est pas utilisée, ce qui permet un balayage plus rapide et par conséquent une diminution de l'influence de la dérive thermique. Cependant, la pointe reste dans un plan horizontal par rapport à l'échantillon. Dans ces conditions, si la surface est accidentée, il peut y avoir un accrochage entre celle-ci et la pointe ce qui conduit souvent à une détérioration de cette dernière. L'utilisation de ce mode est donc réservée à des surfaces très planes où les aspérités ne dépassent pas quelques nanomètres.

Pour réaliser les images présentées dans ce travail, nous avons utilisé un microscope Nanoscope IIIa multimodes SPM fabriqué par *Digital Instruments* disponible au laboratoire. Cet instrument fonctionne à l'air et à température ambiante.

Annexe B

Analyse de spectres SFG : le Fit-O-Matic

Comme nous l'avons mentionné à la section 4.4.3, il est parfois nécessaire de réaliser un ajustement paramétrique sur les spectres SFG expérimentaux afin d'en extraire certains paramètres comme l'intensité des pics ou leur phase par exemple. Dans ce but, nous avons développé un petit programme *LabVIEW* baptisé *Fit-O-Matic*. Cette annexe a pour objectif d'en décrire brièvement le fonctionnement.

LabVIEW est l'acronyme de *Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench*, il s'agit d'un environnement de développement mis au point par *National Instrument* et basé sur un langage de programmation graphique appelé langage G. De par sa conception, ce type de langage est parfaitement adapté aux processus d'acquisition de données et de commande d'instruments de mesure. En particulier, il s'agit du langage qui a été utilisé pour concevoir l'interface de contrôle et d'acquisition de notre dispositif SFG. Nous avons donc choisi de développer notre programme d'ajustement en *LabVIEW* afin de nous assurer une meilleure intégration à la routine d'acquisition des spectres existante et de nous permettre, par exemple, d'importer directement les spectres SFG au format brut sans traitement préalable.

La fonction du *Fit-O-Matic* est donc d'ajuster aux données expérimentales l'équation suivante (établie à la section 4.4.3, équation 4.4) pour N modes de vibration :

$$I_{SFG} \propto \left| |A_{NR}|\, e^{i\varphi_{NR}} + \sum_{q=1}^{N} \frac{|A_q|\, e^{i\varphi_q}}{(\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q)} \right|^2 . \tag{B.1}$$

Malheureusement, cette expression fait apparaître des exponentielles complexes qu'il nous est nécessaire de réduire avant de pouvoir intégrer cette expression dans notre algorithme. Pour ce faire, nous utilisons la propriété bien connue de ce type d'exponentielle :

$$e^{i\varphi} = \cos\varphi + i\sin\varphi. \tag{B.2}$$

L'équation précédente devient alors :

$$I_{SFG} \propto \left| |A_{NR}| \left(\cos\varphi_{NR} + i\sin\varphi_{NR}\right) + \sum_{q=1}^{N} \frac{|A_q| \left(\cos\varphi_q + i\sin\varphi_q\right)}{(\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q)} \right|^2. \tag{B.3}$$

En divisant par $(\omega_{IR} - \omega_q - i\Gamma_q)$ pour faire disparaître la partie imaginaire du dénominateur :

$$I_{SFG} \propto \left| |A_{NR}| \left(\cos\varphi_{NR} + i\sin\varphi_{NR}\right) + \sum_{q=1}^{N} \frac{|A_q| \left(\cos\varphi_q + i\sin\varphi_q\right)(\omega_{IR} - \omega_q - i\Gamma_q)}{(\omega_{IR} - \omega_q + i\Gamma_q)(\omega_{IR} - \omega_q - i\Gamma_q)} \right|^2. \tag{B.4}$$

En mettant un peu d'ordre :

$$I_{SFG} \propto \left| |A_{NR}| \cos\varphi_{NR} + i\,|A_{NR}| \sin\varphi_{NR} + \sum_{q=1}^{N} \frac{(|A_q| \cos\varphi_q + i\,|A_q| \sin\varphi_q)(\omega_{IR} - \omega_q - i\Gamma_q)}{(\omega_{IR} - \omega_q)^2 + \Gamma_q^2} \right|^2. \tag{B.5}$$

Et finalement, en distribuant et en séparant les termes réels des imaginaires :

$$I_{SFG} \propto \left| \left(|A_{NR}| \cos\varphi_{NR} + \sum_{q=1}^{N} \frac{(|A_q| \cos\varphi_q(\omega_{IR} - \omega_q) + |A_q| \sin\varphi_q\Gamma_q)}{(\omega_{IR} - \omega_q)^2 + \Gamma_q^2} \right) + i \left(|A_{NR}| \sin\varphi_{NR} + \sum_{q=1}^{N} \frac{(|A_q| \sin\varphi_q(\omega_{IR} - \omega_q) - |A_q| \cos\varphi_q\Gamma_q)}{(\omega_{IR} - \omega_q)^2 + \Gamma_q^2} \right) \right|^2. \tag{B.6}$$

Pour terminer, nous appliquons la propriété statuant que le carré du module d'un nombre complexe est égal à la somme de ses parties réelles et imaginaires prises au carré :

$$I_{SFG} \propto \left(|A_{NR}| \cos\varphi_{NR} + \sum_{q=1}^{N} \frac{(|A_q| \cos\varphi_q(\omega_{IR} - \omega_q) + |A_q| \sin\varphi_q\Gamma_q)}{(\omega_{IR} - \omega_q)^2 + \Gamma_q^2} \right)^2 + \left(|A_{NR}| \sin\varphi_{NR} + \sum_{q=1}^{N} \frac{(|A_q| \sin\varphi_q(\omega_{IR} - \omega_q) - |A_q| \cos\varphi_q\Gamma_q)}{(\omega_{IR} - \omega_q)^2 + \Gamma_q^2} \right)^2. \tag{B.7}$$

Nous obtenons alors l'expression mathématique utilisée dans le programme. Dans celle-ci, nous retrouvons les différents paramètres d'ajustement rencontrés précédemment, à savoir les variables $|A_q|$ (amplitude), φ_q (phase), ω_q (pulsation) et Γ_q (largeur à mi-hauteur) associées à chacune des résonances, auxquelles s'ajoutent $|A_{NR}|$ et φ_{NR} associés à la réponse non résonante du substrat. Dans la pratique, le programme est conçu pour gérer simultanément un maximum de 5 vibrations et un fond non résonant, ainsi que leurs paramètres associés (pour un maximum de 22). Bien que cette limitation soit suffisante pour couvrir la grande majorité des cas rencontrés, un spectre reprenant plus de 5 résonances devrait alors se traiter en deux fois en divisant la gamme spectrale investiguée en deux parties disctinctes.

La figure B.1 présente une capture d'écran de l'interface utilisateur du *Fit-O-Matic*. Nous nous proposons de la commenter sommairement afin d'en comprendre le principe d'utilisation. Elle comprend principalement 3 volets. Le premier, situé dans la partie inférieure, a pour fonction l'affichage du spectre expérimental brut (en bleu) et des courbes ajustées (en rouge et en vert). Sur sa droite se trouve toute une série d'outils permettant la manipulation des graphiques, comme la mise à l'échelle, le zoom sur une zone d'intérêt ou l'insertion de marqueurs.

Le second volet se trouve dans la partie supérieure droite de l'interface et concerne l'ajustement proprement dit. Il propose deux méthodes différentes : d'une part, un ajustement manuel (à gauche) calculé à partir de coefficients introduits par l'utilisateur et donnant lieu à la courbe rouge sur le graphe et d'autre part, un ajustement itératif que nous qualifions d'automatique (à droite) et qui est représenté par la courbe verte. Un onglet alternatif permet également d'afficher les propriétés du spectre SFG importées du programme d'acquisition comme le montre la figure B.2.

Le dernier volet est celui des coefficients d'ajustement et occupe la région supérieure gauche du programme. Les différentes variables sont réparties par résonance et un système d'onglets permet de passer aisément de l'une à l'autre. L'activation d'une résonance s'effectue par une pression sur le bouton situé en bas à droite du volet. Lorsqu'il est enclenché (le bouton s'allume en vert), cela signifie que la vibration et les paramètres qui lui sont associés seront pris en compte dans les ajustements. Ils sont ignorés dans le cas contraire. Cette fonction est utile pour activer un nombre de résonances adapté au spectre considéré. Par ailleurs, elle permet également de visualiser rapidement la contribution d'un mode particulier. Pour le reste, nous observons dans chaque onglet, différents champs associés à chacun des coefficients. Tout à gauche se trouve la valeur utilisée dans la procédure d'ajustement manuelle (courbe rouge). Celle-ci est introduite par l'utilisateur et deux petits boutons en forme de flèche permettent de la faire varier finement afin d'en observer le résultat en temps réel sur le graphe. Juste à droite se situe une case à cocher portant la mention « Varier ? ». Si la case est cochée, cela

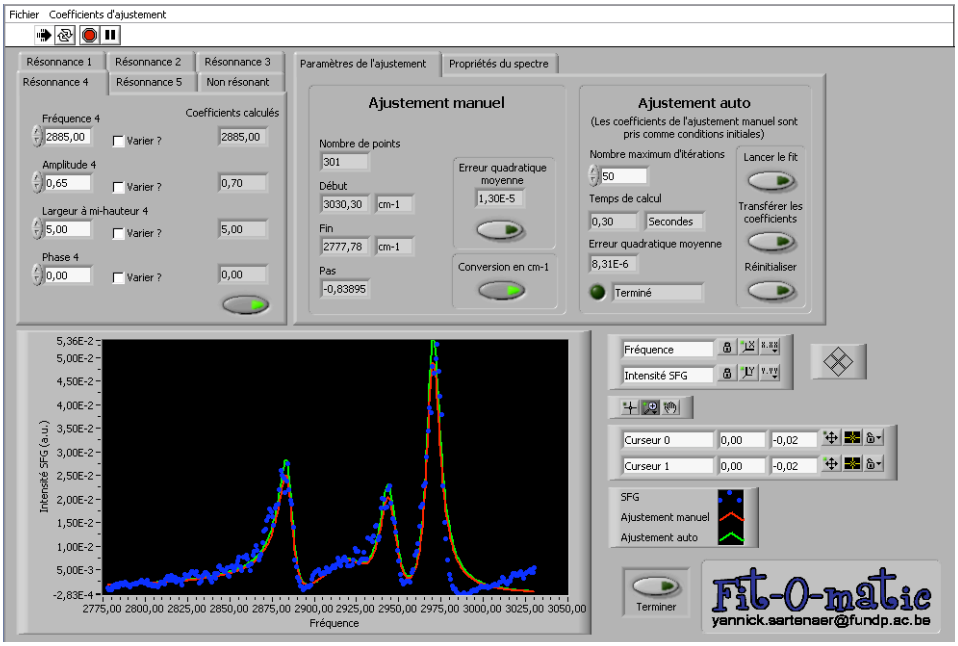


FIGURE B.1 – *Interface utilisateur du Fit-O-Matic.*

signifie que ce paramètre sera pris en compte lors de la procédure d'ajustement automatique. Dans le cas contraire, il sera repris comme une constante égale à la valeur introduite précédemment. La présence de ces cases permet donc de réaliser préférentiellement des ajustements automatiques uniquement sur certains paramètres, ce qui s'avère très utile lorsque le nombre de variables à considérer est important. Le dernier champ est nommé « Coefficients calculés ». Il ne permet aucune modification car il est présent à titre informatif. Il renvoie la meilleure valeur du paramètre trouvée par la procédure d'ajustement automatique. Il s'agit donc des coefficients utilisés pour tracer la courbe verte. Pour finir, notons qu'une présentation similaire est reprise pour l'onglet relatif au fond non résonant (comme illustré à la figure B.2).

Revenons maintenant au volet traitant des ajustements. Sur son côté gauche sont reprises quelques caractéristiques du spectre original qui sont également utilisées pour le calcul des ajustements. Nous retrouvons donc le nombre de points de mesures, les bornes supérieure et inférieure de la gamme spectrale ainsi que le pas de mesure. Par ailleurs, les spectres expérimentaux sont traditionnellement présentés en utilisant une échelle de fréquence exprimée en nombre d'ondes mais sont généralement acquis avec une ordonnée en longueur d'onde. Nous disposons donc d'un interrupteur permettant de convertir en un clic l'échelle du spectre brut en cm^{-1}. Finalement, un bouton permet à tout moment de calculer l'erreur quadratique moyenne (EQM)

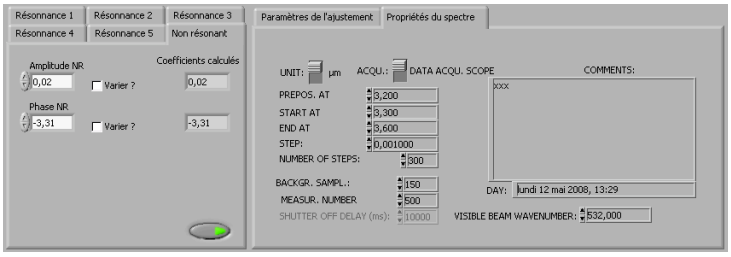


FIGURE B.2 – *Détail de l'interface utilisateur du Fit-O-Matic - Onglets alternatifs.*

entre les données brutes et l'ajustement manuel obtenu avec les coefficients introduits. Cet indicateur statistique est utilisé pour évaluer la qualité de l'ajustement, le plus petit étant le mieux. Il est établi de la manière suivante pour n points de mesure :

$$EQM = \frac{1}{n}\sum_{i=0}^{n}(I_i^{SFG} - I_i^{Ajust})^2. \tag{B.8}$$

En ce qui concerne l'ajustement automatique, la méthode est basée sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt qui est souvent utilisé dans les problèmes de régression. Cette routine suit une procédure itérative au départ de valeurs de paramètres particulières et tend à minimiser, à chaque itération, une fonction donnée en faisant varier les coefficients mis à sa disposition (ceux dont la case a été cochée dans le volet des coefficients). Dans notre cas, la fonction en question est l'erreur quadratique moyenne calculée entre les données expérimentales et la courbe d'ajustement automatique. Les coefficients introduits par l'utilisateur sont pris comme paramètres initiaux. Autrement dit, la courbe de l'ajustement manuel constitue le point de départ de l'algorithme. Il va sans dire que mieux les conditions initiales sont choisies, plus rapidement le système converge vers un minimum. En effet, le programme est conçu pour permettre à l'expérimentateur de définir une solution grossièrement acceptable en utilisant l'ajustement manuel. Après quoi, il dispose de l'opportunité de lancer directement un ajustement automatique qui affinera sa solution. Au niveau de l'interface, nous retrouvons dans la partie « ajustement auto » trois boutons de commande. Le premier permet de démarrer l'algorithme. Celui-ci recherchera alors à minimiser l'erreur quadratique moyenne en effectuant le nombre nécessaire d'itérations. Toutefois, il nous est possible de brider la routine en lui imposant une limite maximum d'itérations dans le champ voisin. Ceci permet d'éviter que le programme ne consomme trop de temps de calcul. Arrivé au terme de la procédure, l'algorithme renvoie la valeur minimum de l'EQM à laquelle il est parvenu dans le champ éponyme. Il fournit également le temps mis pour

effectuer le calcul et les valeurs des différents coefficients qui permettent d'arriver à cette solution (en les affichant dans le volet des coefficients). Le second bouton porte la mention « Transférer les coefficients » et permet de faire passer les valeurs des paramètres d'ajustement calculées vers les champs relatifs à ceux de l'ajustement manuel, autrement dit, de faire coller la courbe d'ajustement manuel à celle qui vient d'être déterminée par calcul. Ceci permet à l'expérimentateur de reprendre la main sur la solution proposée et de l'éprouver en modifiant légèrement certains coefficients. Il peut également décider de lancer une nouvelle procédure d'ajustement automatique qui utilise la solution proposée comme nouvelle condition initiale. Le dernier bouton a pour fonction de réinitialiser toutes les variables utilisées. Ceci a pour effet de remettre la courbe verte à zéro. Pour finir, un champ nous informe sur le statut du programme. Il affiche « calcul en cours » et allume un indicateur lorsque le logiciel est occupé et donc indisponible.

La dernière partie de l'interface est la barre d'état. Cette dernière est constituée de deux menus distincts, « Fichiers » et « Coefficients d'ajustement ». Le premier onglet a deux fonctions. D'une part, il permet de sauvegarder les ajustements sous la forme d'un fichier d'extension « .fit ». Dans celui-ci sont sauvegardées en ASCII les différentes courbes (spectre expérimental, ajustements manuel et automatique) ainsi que les valeurs des coefficients d'ajustement utilisés pour les tracer. D'autre part, il est utilisé pour ouvrir un nouveau fichier. Les deux types de fichiers compatibles sont les spectres SFG bruts et bien sûr les fichiers « .fit » préalablement sauvés. Finalement, l'onglet « Coefficients d'ajustement » permet de sauvegarder et de charger une autre classe de fichiers d'extension « .coef ». Ces derniers sont utilisés pour consigner uniquement les valeurs des coefficients d'ajustement.

Annexe C

Publications issues de ce travail

Les résultats discutés dans ce travail ont donné lieu à un certain nombre de publications dans des revues nationales et internationales. Il va sans dire que les différents développements discutés dans ces pages en sont largement inspirés. A titre informatif, nous en présentons ici les références en les regroupant par chapitre.

- **Chapitre 4 - DT vs DTCN**
  - Y. Sartenaer, G. Tourillon, P. Louette, C. Volcke, C. Humbert, A. Peremans, P. A. Thiry, and L. Dreesen. Thiocyanate and thiol self-assembling process on platinum investigated by means of sum-frequency generation. *Physicalia mag.*, 27(4) :405-413, 2005.
  - L. Dreesen, C. Volcke, Y. Sartenaer, A. Peremans, P. A. Thiry, C. Humbert, J. Grugier, and J. Marchand-Brynaert. Comparative study of decyl thiocyanate and decanethiol self-assembled monolayers on gold substrates. *Surf. Sci.*, 600(18) :4052-4057, 2006.
  - Y. Sartenaer, L. Dreesen, C. Humbert, C. Volcke, G. Tourillon, P. Louette, P. A. Thiry, and A. Peremans. Adsorption properties of decyl thiocyanate and decanethiol on platinum substrates studied by sum-frequency generation spectroscopy. *Surf. Sci.*, 601(5) :1259-1264, 2007.

- **Chapitre 6 - Biotine/Avidine**
  - Y. Sartenaer, L. Dreesen, C. Humbert, A. A. Mani, J. J. Lemaire, M. Salmain, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. Study by the sum-frequency generation spectroscopy of a model biosensor: The biocytin-avidin complex. *Physicalia mag.*, 25(3) :221-229, 2003.
  - L. Dreesen, Y. Sartenaer, C. Humbert, A. A. Mani, C. Méthivier, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. Probing ligand-protein

recognition with sum-frequency generation spectroscopy: the avidin-biocytin case. *ChemPhysChem*, 5(11) :1719-1725, 2004.
  - L. Dreesen, Y. Sartenaer, C. Humbert, A. A. Mani, J. J. Lemaire, C. Méthivier, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. Sum-frequency generation spectroscopy applied to model biosensors systems. *Thin Solid Films*, 464-465 :373-378, 2004.

- **Chapitre 7 - Capteurs ADN par SPR**
  - Y. Sartenaer, R. Hara, H. Kawaguchi, and P. A. Thiry. Relative specificity of the hybridization process on DNA chips: Direct comparison of four interfacial architectures investigated by Surface Plasmon Resonance. *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, 7 :777-782, 2009.

- **Chapitre 8 - Capteurs ADN par SFG**
  - Y. Sartenaer, G. Tourillon, L. Dreesen, D. Lis, A. A. Mani, P. A. Thiry, and A. Peremans. Sum-Frequency Generation Spectroscopy of DNA Monolayers. *Biosens. Bioelectron.*, 22(9-10) :2179-2183, 2007.

Bibliographie

[1] D. Deming, F. Espenak, D. Jennings, T. Kostiuk, M. Mumma, and D. Zipoy. Observations of the 10-um natural laser emission from the mesospheres of Mars and Venus. *Icarus*, 55 :347–355, 1983.

[2] A. Schawlow and C. Townes. Infrared and optical masers. *Phys. Rev.*, 112(6) :1940–1949, 1958.

[3] T. Maiman. Optical and microwave-optical experiments in ruby. *Phys. Rev. Lett.*, 4(11) :564–566, 1960.

[4] P. Franken, A. Hill, C. Peters, and G. Weinreich. Generation of optical harmonics. *Phys. Rev. Lett.*, 7(4) :118–119, 1961.

[5] L. Landau and E. Lifchitz. *Electrodynamique des milieux continus*. Mir Eds., 1969.

[6] T. Andersen and R. Ahuja. Linear and nonlinear semiclassical optics beyond the electric dipole approximation. *Phys. Scripta*, T109 :106–115, 2004.

[7] C. H. Yang, Q. Z. Ye, and J. Li. The validity range of the dipole approximation for a dielectric mixture. *J. Electrostat.*, 64(3-4) :247–253, 2006.

[8] P. A. Thiry. *Cours d'optique non linéaire*. FUNDP, 2004.

[9] R. W. Boyd. *Nonlinear Optics*. Academic Press, 2003.

[10] P. A. Thiry. *Introduction à l'optique non linéaire*. Müllerthal, 1999.

[11] M. Bass, P. Franken, A. Hill, C. Peters, and G. Weinreich. Optical mixing. *Phys. Rev. Lett.*, 8(1) :18–18, 1962.

[12] F. Brown, R. Parks, and A. Sleeper. Nonlinear optical reflection from a metallic boundary. *Phys. Rev. Lett.*, 14(25) :1029–1031, 1965.

[13] P. Guyot-Sionnest, J. Hunt, and Y. R. Shen. Sum-frequency vibrational spectroscopy of a langmuir film: study of molecular orientation of a two-dimensional system. *Phys. Rev. Lett.*, 59(14) :1597–1600, 1987.

[14] Y. R. Shen. Surface properties probed by 2nd-harmonic and sum-frequency generation. *Nature*, 337(6207) :519–525, 1989.

[15] Y. R. Shen. *The Principles of Nonlinear Optics*. John Wiley and Sons Ltd, 1984.

[16] N. Bloembergen. *Nonlinear Optics*. W. A. Benjamin Inc., 1965.

[17] R. L. Sutherland. *Handbook of Nonlinear Optics*. Marcel Dekker Inc., 2003.

[18] F. Sanchez. *Optique non linéaire*. Ellipses Eds., 1999.

[19] A. Tadjeddine and A. Peremans. *Spectroscopy for Surface Science*. John Wiley and Sons Ltd, 1998.

[20] C. Humbert. *Développement d'une nouvelle spectroscopie optique non linéaire utilisant la génération de fréquence-somme doublement résonnante. Application à l'étude des couplages vibrationnels et électroniques aux interfaces films minces-métaux*. PhD thesis, FUNDP, 2003.

[21] Namur, un outil aux multiples applications. *Le Soir*, 3 avril 2000.

[22] P. Hollander. *Développement de sources lasers pour la spectroscopie de génération de fréquence-somme*. PhD thesis, FUNDP, 2001.

[23] A. A. Mani. *Development of a sum-frequency generation spectrometer*. PhD thesis, FUNDP, 2004.

[24] A. A. Mani, P. Hollander, P. A. Thiry, and A. Peremans. All-solid-state 12 ps actively passively mode-locked pulsed Nd:YAG laser using a nonlinear mirror. *Appl. Phys. Lett.*, 75(20) :3066–3068, 1999.

[25] A. A. Mani, L. Dreesen, P. Hollander, P. A. Thiry, and A. Peremans. Development of an all-solid-state pulsed Nd:YAG laser for pumping picosecond OPO systems. *Proceedings of Photomec'99*, :153–156, 1999.

[26] K. A. Stankov. A mirror with an intensity-dependent reflection coefficient. *Appl. Phys. B*, 45(3) :191–195, 1988.

[27] J. Clavilier, R. Faure, G. Guinet, and R. Durand. Preparation of monocrystalline Pt microelectrodes and electrochemical study of the plane surfaces cut in the direction of the (111) and (110) planes. *J. Electroanal. Chem.*, 107 :205–209, 1980.

[28] B. S. Mendoza, W. L. Mochan, and J. A. Maytorena. Visible-infrared sum and difference frequency generation at adsorbate-covered Au. *Phys. Rev. B*, 60(20) :14334–14340, 1999.

[29] A. Liebsch. Theory of sum frequency generation from metal surfaces. *Appl. Phys. B*, 68(3) :301–304, 1999.

[30] L. Dreesen, C. Humbert, M. Celebi, J. J. Lemaire, A. A. Mani, P. A. Thiry, and A. Peremans. Influence of the metal electronic properties on the sum-frequency generation spectra of dodecanethiol self-assembled monolayers on Pt(111), Ag(111) Au(111) single crystals. *Appl. Phys. B*, 74(7-8) :621–625, 2002.

[31] C. Humbert, M. Buck, A. Calderone, J. P. Vigneron, V. Meunier, B. Champagne, W. Q. Zheng, A. Tadjeddine, P. A. Thiry, and A. Peremans. In situ monitoring of the self-assembly of p-nitroanilino terminated thiol on gold: a study by IR-vis sum-frequency generation spectroscopy. *Phys. Status Solidi A*, 175(1) :129–136, 1999.

[32] G. M. Whitesides and B. Grzybowski. Self-assembly at all scales. *Science*, 295(5564) :2418–2421, 2002.

[33] W. C. Bigelow, D. L. Pickett, and W. A. Zisman. Oleophobic monolayers, I. films adsorbed from solution in non-polar liquids. *J. Colloid Sci.*, 1 :513–518, 1946.

[34] R. G. Nuzzo and D. L. Allara. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 105(13) :4481–4483, 1983.

[35] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 111(1) :321–335, 1989.

[36] J. Chen. Large on-off ratios and negative differential resistance in a molecular electronic device. *Science*, 286(5444) :1550–1552, 1999.

[37] R. M. Crooks and A. J. Ricco. New organic materials suitable for use in chemical sensor arrays. *Acc. Chem. Res.*, 31(5) :219–227, 1998.

[38] D. G. Castner and B. D. Ratner. Biomedical surface science : Foundations to frontiers. *Surf. Sci.*, 500(1-3) :28–60, 2002.

[39] J. J. Stapleton, P. Harder, T. A. Daniel, M. D. Reinard, Y. Yao, D. W. Price, J. M. Tour, and D. L. Allara. Self-assembled oligo(phenyleneethynylene) molecular electronic switch monolayers on gold: structures and chemical stability. *Langmuir*, 19(20) :8245–8255, 2003.

[40] J. M. Tour, L. Jones, D. L. Pearson, J. J. S. Lamba, T. P. Burgin, G. M. Whitesides, D. L. Allara, A. N. Parikh, and S. Atre. Self-assembled monolayers and multilayers of conjugated thiols, alpha, omega-dithiols, and thioacetyl-containing adsorbates. Understanding attachments between potential molecular wires and gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(37) :9529–9534, 1995.

[41] J. W. Ciszek, M. P. Stewart, and J. M. Tour. Spontaneous assembly of organic thiocyanates on gold sufaces. Alternative precursors for gold thiolate assemblies. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(41) :13172–13173, 2004.

[42] J. W. Ciszek and J. M. Tour. Mechanistic implications of the assembly of organic thiocyanates on precious metals. *Chem. Mater.*, 17(23) :5684–5690, 2005.

[43] C. Humbert, L. Dreesen, Y. Sartenaer, A. Peremans, P. A. Thiry, and C. Volcke. On the protoporphyrin monolayers conformation. *ChemPhysChem*, 7(3) :569–571, 2006.

[44] C. Humbert, L. Dreesen, A. A. Mani, Y. Caudano, J. J. Lemaire, P. A. Thiry, and A. Peremans. IR-visible sum-frequency vibrational spectroscopy of biphenyl-3 methylene thiol monolayer on gold and silver: effect of the visible wavelength on the SFG spectrum. *Surf. Sci.*, 502 :203–207, 2002.

[45] M. Himmelhaus, F. Eisert, M. Buck, and M. Grunze. Self-assembly of n-alkanethiol monolayers. A study by IR-visible sum frequency spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 104(3) :576–584, 2000.

[46] A. Rao, H. Rangwalla, V. Varshney, and A. Dhinojwala. Structure of poly(methyl methacrylate) chains adsorbed on sapphire probed using infrared-visible sum frequency generation spectroscopy. *Langmuir*, 20(17) :7183–7188, 2004.

[47] P. Kondratyuk. Analytical formulas for Fermi resonance interactions in continuous distributions of states. *Spectrochim. Acta, Part A*, 61(4) :589–593, 2005.

[48] C. D. Bain. Sum-frequency vibrational spectroscopy of the solid-liquid interface. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 91(9) :1281–1296, 1995.

[49] M. A. Hines, J. A. Todd, and P. Guyot-Sionnest. Conformation of alkanethiols on Au, Ag(111), and Pt(111) electrodes: a vibrational spectroscopy study. *Langmuir*, 11(2) :493–497, 1995.

[50] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, and F. Laloë. *Mécanique quantique II*. Hermann, 1993.

[51] G. Beamson and D. Briggs. *High Resolution XPS of Organic Polymers*. John Wiley and Sons Ltd, 1992.

[52] A. Ulman. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.*, 96(4) :1533–1554, 1996.

[53] G. E. Poirier. Characterization of organosulfur molecular monolayers on Au(111) using scanning tunneling microscopy. *Chem. Rev.*, 97(4) :1117–1128, 1997.

[54] Y. C. Yang, Y. P. Yen, L. Y. O. Yang, S. L. Yau, and K. Itaya. Elucidation of the deposition processes and spatial structures of alkanethiol and arylthiol molecules adsorbed on Pt(111) electrodes with in situ scanning tunneling microscopy. *Langmuir*, 20(23) :10030–10037, 2004.

[55] S. Lee, J. Park, R. Ragan, S. Kim, Z. Lee, D. K. Lim, D. A. A. Ohlberg, and R. S. Williams. Self-assembled monolayers on Pt(111): molecular packing structure and strain effects observed by scanning tunneling microscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(17) :5745–5750, 2006.

[56] Y. C. Yang, Y. L. Lee, L. Y. O. Yang, and S. L. Yau. In situ scanning tunneling microscopy of 1,6-hexanedithiol, 1,9-nonanedithiol, 1,2-benzenedithiol, and 1,3-benzenedithiol adsorbed on Pt(111) electrodes. *Langmuir*, 22(11) :5189–5195, 2006.

[57] P. Sautet. Images of adsorbates with the scanning tunneling microscope: theoretical approaches to the contrast mechanism. *Chem. Rev.*, 97(4) :1097–1116, 1997.

[58] L. A. Bumm, J. J. Arnold, T. D. Dunbar, D. L. Allara, and P. S. Weiss. Electron transfer through organic molecules. *J. Phys. Chem. B*, 103(38) :8122–8127, 1999.

[59] M. Toerker, R. Staub, T. Fritz, T. Schmitz-Hubsch, F. Sellam, and K. Leo. Annealed decanethiol monolayers on Au(111) - intermediate phases between structures with high and low molecular surface density. *Surf. Sci.*, 445(1) :100–108, 2000.

[60] E. Barrena, C. Ocal, and M. Salmeron. Structure and stability of tilted-chain phases of alkanethiols on Au(111). *J. Chem. Phys.*, 114(9) :4210–4214, 2001.

[61] L. Dreesen, C. Volcke, Y. Sartenaer, A. Peremans, P. A. Thiry, C. Humbert, J. Grugier, and J. Marchand-Brynaert. Comparative study of decyl thiocyanate and decanethiol self-assembled monolayers on gold substrates. *Surf. Sci.*, 600(18) :4052–4057, 2006.

[62] C. N. Satterfield. *Heterogeneous Catalysis in Practice*. McGraw-Hill, New York, 1980.

[63] A. Tadjeddine, A. Peremans, A. Le Rille, W. Q. Zheng, M. Tadjeddine, and J. P. Flament. Investigation of the vibrational properties of CN- on a Pt electrode by in situ vis-IR sum frequency generation and functional density calculations. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 92(20) :3823–3828, 1996.

[64] E. Hesse and J. A. Creighton. Investigation of cyanide ions adsorbed on platinum and palladium coated silver island films by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 303(1-2) :101–106, 1999.

[65] B. Ren, X. Q. Li, D. Y. Wu, J. L. Yao, Y. Xie, and Z. Q. Tian. Orientational behavior of cyanide on a roughened platinum surface investigated by surface enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 322(6) :561–566, 2000.

[66] L. C. Clark. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 2 :41–48, 1956.

[67] L. C. Clark and C. Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.*, 102 :29–45, 1962.

[68] A. McWilliams. Bio039b. Technical report, BCC Research, 2005.

[69] J. H. T. Luong, K. B. Male, and J. D. Glennon. Biosensor technology : Technology push versus market pull. *Biotechnol. Adv.*, 26(5) :492–500, 2008.

[70] Journal citation reports, www.isiknowledge.com, June 2009.

[71] C. A. Rowe, S. B. Scruggs, M. J. Feldstein, J. P. Golden, and F. S. Ligler. An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. *Anal. Chem.*, 71(2) :433–439, 1999.

[72] L. Viveros, S. Paliwal, D. McCrae, J. Wild, and A. Simonian. A fluorescence-based biosensor for the detection of organophosphate pesticides and chemical warfare agents. *Sens. Actuators, B*, 115(1) :150–157, 2006.

[73] L. Häussling, H. Ringsdorf, F. J. Schmitt, and W. Knoll. Biotin-functionalized self-assembled monolayers on gold: surface plasmon optical studies of specific recognition reactions. *Langmuir*, 7(9) :1837–1840, 1991.

[74] S. Roy, J. H. Kim, J. T. Kellis, A. J. Poulose, C. R. Robertson, and A. P. Gast. Surface plasmon resonance/surface plasmon enhanced fluorescence: an optical technique for the detection of multicomponent macromolecular adsorption at the solid/liquid interface. *Langmuir*, 18(16) :6319–6323, 2002.

[75] R. S. Chouhan, K. V. Babu, M. A. Kumar, N. S. Neeta, M. S. Thakur, B. E. A. Rani, A. Pasha, N. G. K. Karanth, and N. G. Karanth. Detection of methyl parathion using immuno-chemiluminescence based image analysis using charge coupled device. *Biosens. Bioelectron.*, 21(7) :1264–1271, 2006.

[76] N. Lala, A. G. Chittiboyina, S. P. Chavan, and M. Sastry. Biotinylation of colloidal gold particles using interdigitated bilayers: a UV-visible spectroscopy and TEM study of the biotin-avidin molecular recognition process. *Colloids Surf., A*, 205(1-2) :15–20, 2002.

[77] M. Sastry, N. Lala, V. Patil, S. P. Chavan, and A. G. Chittiboyina. Optical absorption study of the biotin-avidin interaction on colloidal silver and gold particles. *Langmuir*, 14(15) :4138–4142, 1998.

[78] J. Clarkson, C. Sudworth, S. I. Masca, D. N. Batchelder, and D. A. Smith. Ultraviolet resonance Raman study of the avidin biotin complex. *J. Raman Spectrosc.*, 31(5) :373–375, 2000.

[79] A. Torreggiani and G. Fini. A Raman study of the interactions of streptavidin with biotin and biotinyl derivatives. *J. Mol. Struct.*, 481 :459–463, 1999.

[80] C. M. Yam, C. M. Pradier, M. Salmain, N. Fischer-Durand, and G. Jaouen. Molecular recognition of avidin on biotin-functionalized gold surfaces detected by FT-IRRAS and use of metal carbonyl probes. *J. Colloid Interface Sci.*, 245(1) :204–207, 2002.

[81] C. M. Pradier, M. Salmain, L. Zheng, and G. Jaouen. Specific binding of avidin to biotin immobilised on modified gold surfaces - Fourier transform infrared reflection absorption spectroscopy analysis. *Surf. Sci.*, 502 :193–202, 2002.

[82] R. B. Honzatko and R. W. Williams. Raman spectroscopy of avidin : secondary structure, disulfide conformation, and the environment of tyrosine. *Biochemistry*, 21(24) :6201–6205, 1982.

[83] Y. Hiller, E. A. Bayer, and M. Wilchek. Studies on the biotin-binding site of avidin - minimized fragments that bind biotin. *Biochem. J.*, 278 :573–585, 1991.

[84] L. Pugliese, A. Coda, M. Malcovati, and M. Bolognesi. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 A resolution. *J. Mol. Biol.*, 231(3) :698–710, 1993.

[85] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, and F. R. Salemme. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 243(4887) :85–88, 1989.

[86] Pharmacorama, www.pharmacorama.com, June 2009.

[87] D. L. Allara and R. G. Nuzzo. Spontaneously organized molecular assemblies. 2. Quantitative infrared spectroscopic determination of equilibrium structures of solution-adsorbed n-alkanoic acids on an oxidized aluminum surface. *Langmuir*, 1(1) :52–66, 1985.

[88] C. M. Pradier, M. Salmain, Z. Liu, and C. Méthivier. Comparison of different procedures of biotin immobilization on gold for the molecular recognition of avidin: an FT-IRRAS study. *Surf. Interface Anal.*, 34(1) :67–71, 2002.

[89] E. E. Snell, R. E. Eakin, and R. J. Williams. A quantitative test for biotin and observations regarding its occurrence and properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 62(1) :175–178, 1940.

[90] D. Duvivier. *Mise en évidence du phénomène de reconnaissance moléculaire d'un biocapteur par la spectroscopie de génération de fréquence-somme : le système biocytine-avidine.* Mémoire de licence, FUNDP, 2004.

[91] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, and J. L. Sussman. 3-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(11) :5076–5080, 1993.

[92] L. Dreesen, Y. Sartenaer, C. Humbert, A. A. Mani, C. Methivier, C. M. Pradier, P. A. Thiry, and A. Peremans. Probing ligand-protein recognition with sum-frequency generation spectroscopy : The avidin-biocytin case. *ChemPhysChem*, 5(11) :1719–1725, 2004.

[93] R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf, and C. Salesse. Interaction between biotin lipids and streptavidin in monolayers - formation of oriented two-dimensional protein domains induced by surface recognition. *Biochemistry*, 28(20) :8214–8221, 1989.

[94] T. M. Herne and M. J. Tarlov. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(38) :8916–8920, 1997.

[95] Y. Sakao, F. Nakamura, N. Ueno, and M. Hara. Hybridization of oligonucleotide by using DNA self-assembled monolayer. *Colloids Surf., B*, 40(3-4) :149–152, 2005.

[96] Y. Sato, A. Okumura, K. Suzuki, and H. Kawaguchi. Flow-stress-induced discrimination of a K-ras point mutation by sandwiched polymer microsphere-enhanced surface plasmon resonance. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 15(3) :297–310, 2004.

[97] A. W. Peterson, R. J. Heaton, and R. M. Georgiadis. Kinetic control of hybridization in surface immobilized DNA monolayer films. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(32) :7837–7838, 2000.

[98] B. Nguyen, F. Tanious, and W. Wilson. Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule–nucleic acid interactions. *Methods*, 42(2) :150–161, 2007.

[99] Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. F. Wang, and L. M. Smith. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.*, 22(24) :5456–5465, 1994.

[100] M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, and S. P. Fodor. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 274(5287) :610–614, 1996.

[101] C. Debouck and P. N. Goodfellow. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat. Genet.*, 21 :48–50, 1999.

[102] J. Lamartine. The benefits of DNA microarrays in fundamental and applied bio-medicine. *Mater. Sci. Eng., C*, 26(2-3) :354–359, 2006.

[103] A. B. Steel, T. M. Herne, and M. J. Tarlov. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Anal. Chem.*, 70(22) :4670–4677, 1998.

[104] D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L. J. Whitman, and M. J. Tarlov. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(17) :5219–5226, 2003.

[105] W. J. Parak, T. Pellegrino, C. M. Micheel, D. Gerion, S. C. Williams, and A. P. Alivisatos. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Lett.*, 3(1) :33–36, 2003.

[106] L. M. Demers, D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S. W. Chung, and C. A. Mirkin. Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography. *Science*, 296(5574) :1836–1838, 2002.

[107] S. Wenmackers, S. D. Pop, K. Roodenko, V. Vermeeren, O. A. Williams, M. Daenen, O. Douheret, J. D'Haen, A. Hardy, M. K. Van Bael, K. Hinrichs, C. Cobet, M. vandeVen, M. Ameloot, K. Haenen, L. Michiels, N. Esser, and P. Wagner. Structural and optical properties of DNA layers covalently attached to diamond surfaces. *Langmuir*, 24(14) :7269–7277, 2008.

[108] S. Hahn, S. Mergenthaler, B. Zimmermann, and W. Holzgreve. Nucleic acid based biosensors: the desires of the user. *Bioelectrochemistry*, 67(2) :151–154, 2005.

[109] A. W. Peterson, R. J. Heaton, and R. M. Georgiadis. The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 29(24) :5163–5168, 2001.

[110] R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, and S. K. Satija. Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(38) :9787–9792, 1998.

[111] C. Y. Lee, P. C. T. Nguyen, D. W. Grainger, L. J. Gamble, and D. G. Castner. Structure and DNA hybridization properties of mixed nucleic acid/maleimide-ethylene glycol monolayers. *Anal. Chem.*, 79(12) :4390–4400, 2007.

[112] K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, and M. J. Tarlov. Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(14) :3401–3402, 1997.

[113] C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, and R. M. Corn. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.*, 69(24) :4939–4947, 1997.

[114] A. Okumura, Y. Sato, M. Kyo, and H. Kawaguchi. Point mutation detection with the sandwich method employing hydrogel nanospheres by the surface plasmon resonance imaging technique. *Anal. Biochem.*, 339(2) :328–337, 2005.

[115] N. Yang, X. Su, V. Tjong, and W. Knoll. Evaluation of two- and three-dimensional streptavidin binding platforms for surface plasmon resonance spectroscopy studies of DNA hybridization and protein–DNA binding. *Biosens. Bioelectron.*, 22(11) :2700–2706, 2007.

[116] R. M. Georgiadis, K. P. Peterlinz, and A. W. Peterson. Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(13) :3166–3173, 2000.

[117] H. Raether. Surface-plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. *Springer Tracts in Modern Physics*, 111 :1–133, 1988.

[118] N. Shimizu, K. Sugimoto, J. W. Tang, T. Nishi, I. Sato, M. Hiramoto, S. Aizawa, M. Hatakeyama, R. Ohba, H. Hatori, T. Yoshikawa, F. Suzuki, A. Oomori, H. Tanaka, H. Kawaguchi, H. Watanabe, and H. Handa. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat. Biotechnol.*, 18(8) :877–881, 2000.

[119] M. Ageno, E. Dore, and C. Frontali. The alkaline denaturation of DNA. *Biophys. J.*, 9(11) :1281–1311, 1969.

[120] J. S. Ullman and B. J. McCarthy. Alkali deamination of cytosine residues in DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 294(1) :396–404, 1973.

[121] L. M. Demers, M. Ostblom, H. Zhang, N. H. Jang, B. Liedberg, and C. A. Mirkin. Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(38) :11248–11249, 2002.

[122] L. K. Wolf, Y. Gao, and R. M. Georgiadis. Sequence-dependent DNA immobilization: specific versus nonspecific contributions. *Langmuir*, 20(8) :3357–3361, 2004.

[123] J. D. Watson and F. H. Crick. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356) :737–738, 1953.

[124] Wikipédia, l'encyclopédie libre, http ://fr.wikipedia.org, June 2009.

[125] E. Taillandier and J. Liquier. Infrared spectroscopy of DNA. *Methods Enzymol.*, 211 :307–335, 1992.

[126] W. L. Peticolas. Raman spectroscopy of DNA and proteins. *Methods Enzymol.*, 246 :389–416, 1995.

[127] Z. Y. Li, S. C. Chang, and R. S. Williams. Self-assembly of alkanethiol molecules onto platinum and platinum oxide surfaces. *Langmuir*, 19(17) :6744–6749, 2003.

[128] P. Lang, Z. Mekhalif, B. Rat, and F. Garnier. Self-assembled alkylthiols monolayers onto platinum; influence of the adsorbed oxygen. *J. Electroanal. Chem.*, 441(1-2) :83–93, 1998.

[129] T. Laiho and J. A. Leiro. Influence of initial oxygen on the formation of thiol layers. *Appl. Surf. Sci.*, 252(18) :6304–6312, 2006.

[130] B. Schrader. *Raman/Infrared Atlas of Organic Compounds 2nd Edition.* VCH Publishers, Weinheim, 1989.

[131] D. Lien-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, and J.G. Grasselli. *Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules.* Academic Press, San Diego, :71-72, 1991.

[132] D. C. McKean, J. E. Boggs, and L. Schaefer. CH bond length variations due to the intramolecular environment: a comparison of the results obtained by the method of isolated CH stretching frequencies

and by ab initio gradient calculations. *J. Mol. Struct.*, 116 :313–330, 1984.

[133] D. Y. Petrovykh, V. Perez-Dieste, A. Opdahl, H. Kimura-Suda, J. M. Sullivan, M. J. Tarlov, F. J. Himpsel, and L. J. Whitman. Nucleobase orientation and ordering in films of single-stranded DNA on gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(1) :2–3, 2006.

[134] U. Rant, K. Arinaga, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, and M. Tornow. Structural properties of oligonucleotide monolayers on gold surfaces probed by fluorescence investigations. *Langmuir*, 20(23) :10086–10092, 2004.

[135] W. Haiss, B. Roelfs, S. N. Port, E. Bunge, H. Baumgartel, and R. J. Nichols. In-situ infrared spectroscopic studies of thymine adsorption on a Au(111) electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 454(1-2) :107–113, 1998.

[136] C. Boozer, S. F. Chen, and S. Y. Jiang. Controlling DNA orientation on mixed ssDNA/OEG SAMs. *Langmuir*, 22(10) :4694–4698, 2006.

[137] D. Lien-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, and J.G. Grasselli. *Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, San Diego, :171-172, 1991.

[138] G. Y. Stokes, J. M. Gibbs-Davis, F. C. Boman, B. R. Stepp, A. G. Condie, S. T. Nguyen, and F. M. Geiger. Making sense of DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(24) :7492–7493, 2007.

[139] C. Howell, R. Schmidt, V. Kurz, and P. Koelsch. Sum-frequency-generation spectroscopy of DNA films in air and aqueous environments. *Biointerphases*, 3(3) :FC47–FC51, 2009.

[140] H. Asanuma, H. Noguchi, K. Uosaki, and H. Z. Yu. Metal cation-induced deformation of DNA self-assembled monolayers on silicon : Vibrational sum frequency generation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(25) :8016–8022, 2008.

[141] U. Rant, K. Arinaga, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, and M. Tornow. Dynamic electrical switching of DNA layers on a metal surface. *Nano Lett.*, 4(12) :2441–2445, 2004.

[142] U. Fano. The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces. *J. Opt. Soc. Am.*, 31(3) :213–222, 1941.

[143] R. H. Ritchie. Plasma losses by fast electrons in thin films. *Phys. Rev.*, 106(5) :874–881, 1957.

[144] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators*, 4 :299–304, 1983.

[145] M. Malmqvist. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature*, 361(6408) :186–187, 1993.

[146] K. Siegbahn. Electron spectroscopy for chemical analysis (E.S.C.A.). *Phil. Trans. Roy. Soc. London A*, 268(1184) :33–57, 1970.

[147] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 49(1) :57–61, 1982.