

Système de diagnostic à partir de l'**optimisation optique de biopuces à fluorescence**

Henri Benisty⁽¹⁾ (henri.benisty@institutoptique.fr) et **Claude Weisbuch**^(2,3) (Claude.Weisbuch@polytechnique.edu)

(1) Institut d'Optique Graduate School, 91127 Palaiseau Cedex

(2) Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (CNRS, IP Paris, École polytechnique), 91128 Palaiseau Cedex

(3) University of California at Santa Barbara (UCSB), USA



Machine Novodiag® issue des recherches développées par la startup Genewave, et commercialisée par la société Mobidiag, avec quatre modules de mesure permettant de faire quatre tests indépendants. On peut empiler quatre tels systèmes pour faire seize tests en parallèle.

Le diagnostic des infections évolue vers l'identification moléculaire des agents infectieux (virus ou bactéries), méthode bien plus rapide que les cultures.

L'identification repose sur l'appariement de brins d'ADN « cibles » issus de l'agent infectieux avec des brins d'ADN complémentaires « sondes » spécifiques des cibles recherchées.

Dans le cas des puces biophotoniques, l'appariement sur les sondes disposées sur un substrat est révélé par la fluorescence localisée de fluorophores accrochés aux brins cibles.

À partir de concepts d'architectures optiques simples, un long cheminement a mené des physiciens partis des excitons et des LEDs au développement d'un système automatique de diagnostic, témoignant des processus longs et transverses de l'innovation.

Les mots suivis d'un astérisque (*) sont définis dans le glossaire, p. 22.

.....

Le diagnostic d'infection par fluorescence d'acides nucléiques. Un cas simple : la PCR* monoplexe

La pandémie de Covid-19 a amplement documenté la nécessité d'une détection précoce du matériel génétique d'un virus, capable de rendre contagieux avant l'apparition des symptômes et la montée des anticorps générés par la réponse immunitaire. Un échantillon

prélevé sur le patient contiendra de l'ADN ou l'ARN du virus. Lorsqu'une seule infection domine le paysage, le test de PCR quantitative en temps réel* avec une seule sonde suffit, grâce à sa bonne sensibilité et sa bonne spécificité. Dans ce test, des « amorces » (courtes séquences d'ADN complémentaires des séquences auxquelles elles vont s'apparier) introduites dans la solution viennent s'hybrider sur une séquence cible de l'ADN spécifique de

l'infection, pour la multiplier en grand nombre, afin de pouvoir la détecter par fluorescence.

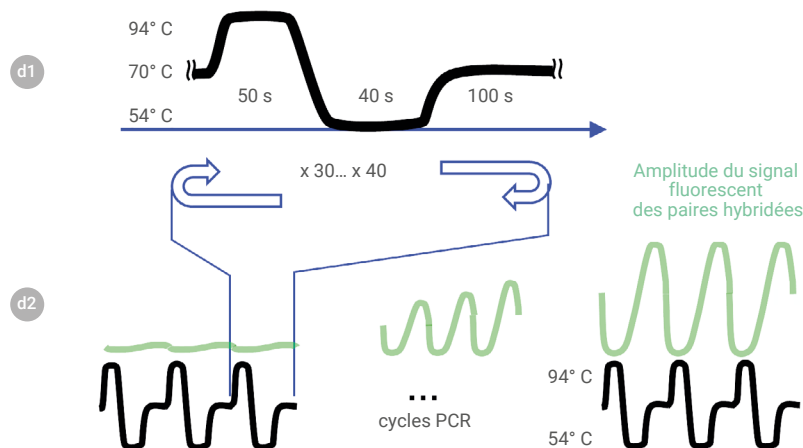
L'encadré 1 montre les différentes étapes de la technique de PCR et des amplicons* qu'elle produit. Dans le cas d'agents viraux détectés par leur ARN (virus à ARN, comme le SARS-CoV-2), il faut ajouter une étape préalable de transcription inverse, de l'ARN en ADN, dite RT-PCR*.

Dans la PCR en temps réel, la multiplication des amplicons est mesurée tout au long des cycles de température, grâce à la fluorescence d'un marqueur intercalé (fig. 1).

La détection d'une infection parmi plusieurs infections candidates : la détection multiplexe

On veut souvent disposer d'une capacité à détecter plusieurs agents infectieux en une seule opération de diagnostic. Ainsi sont apparus fin 2021 des tests détectant à la fois Covid 19, grippe A ou B, et virus respiratoire syncytial (VRS, la bronchiolite chez les bébés). La même technique de PCR en temps réel peut identifier jusqu'à cinq agents en même temps dans une détection dite alors « multiplexe »*, les différentes cibles étant identifiées en utilisant des sondes spécifiques marquées avec des fluorophores de couleurs différentes. C'est suffisant pour une situation où une poignée d'infections coexistent.

Dans beaucoup d'autres situations, comme aux urgences hospitalières, on souhaite détecter parmi de nombreux agents pathogènes, viraux ou bactériens, lequel infecte un patient, jusqu'à connaître la souche précise parmi les variants antibiorésistants, cela afin de

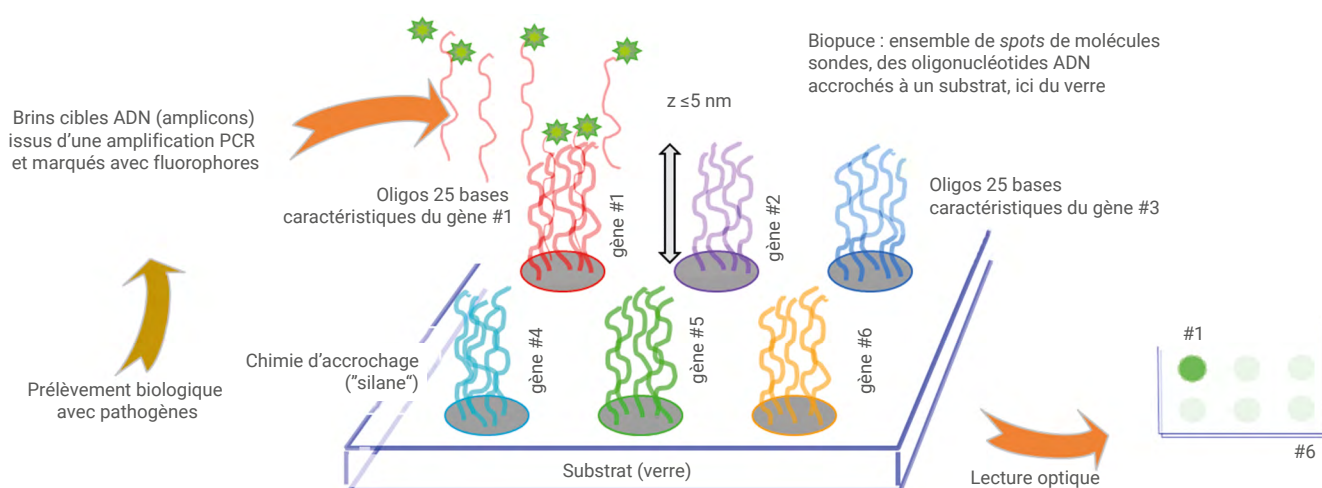


1. Cycles de température et augmentation de la fluorescence de l'intercalant.

Dans le module de chauffage, les cycles thermiques (d1, courbe noire) se répètent (d2), et le signal de fluorescence oscille lors de chaque dénaturation/hybridation, en croissant (courbe verte) si l'amplicon a pu être multiplié (donc si les amorces l'ont « encadré » dans l'ADN de départ, à la façon de l'étape a3 de la figure E1 ci-contre). L'amplification réelle, bien que moindre que 2^N , impulse une augmentation marquée du signal par multiplication des amplicons. L'analyse quantitative de cette montée de fluorescence suivant des critères bien rodés fournit le signal de « positivité PCR ».

n'administrer que les antibiotiques ou les antiviraux appropriés. Dans ce cas, la reconnaissance se fait d'une autre façon : il faut toujours faire la PCR pour produire une abondance d'amplicons de l'ADN de l'agent infectieux, mais l'identification par fluorescence intervient à l'aide d'une biopuce à laquelle on apparie ces amplicons, chacun doté d'un fluorophore, avec des brins d'ADN « sondes » complémentaires caractéristiques de

tous les P agents à détecter. Un petit « tapis » de brins sondes d'un des P agents, attachés par un bout à une surface, forme un plot de sondes dit "spot" : les P spots donnent la configuration des puces à ADN. L'appariement des « cibles » en solution (« amplicons » de l'agent recherché) avec les sondes d'un spot est détecté par la fluorescence localisée de fluorophores accrochés aux « cibles » (fig. 2).

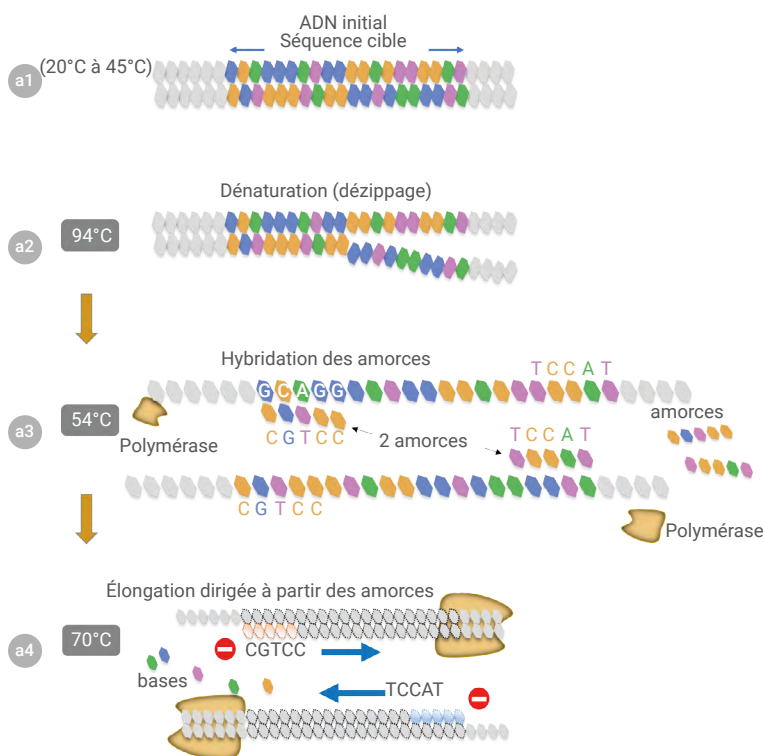


2. Biopuce à ADN pour diagnostic « multiplexe ». Les brins (oligos) « cibles » issus d'une amplification PCR sont marqués par une molécule fluorescente (verte ici). On a déposé au préalable sur la biopuce des spots « sondes », brins d'ADN courts (~ 25 à 50 bases) des différents P gènes infectieux recherchés (#1, #2... #6, en pratique des dizaines, ou même des milliers), à des positions bien repérées. L'appariement se fait en solution, et la lecture au choix à sec (après lavage des excès d'ADN fluorescent) ou en solution. Seuls les spots des ADN appariés donnent un signal fluorescent (ici, seulement le #1 identifié en rouge). Au total, une signature ADN des pathogènes est lisible sur la puce. Les échelles verticales pertinentes (~ 5 nm) sont très inférieures aux longueurs d'onde du spectre visible (~ 500 nm).

➔ L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (PCR)

La technique de PCR (fig. E1) se fonde sur les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température. Elle comprend un grand nombre (typiquement 30 à 40) de cycles thermiques, chaque cycle comportant trois étapes. Ces cycles multiplient les séquences d'ADN du virus, qui deviennent majoritaires par rapport aux brins d'ADN initiaux dès le troisième cycle. Cette technique permet de faire un milliard de copies en moins d'une heure.

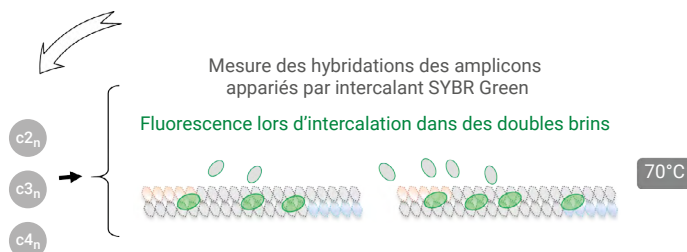
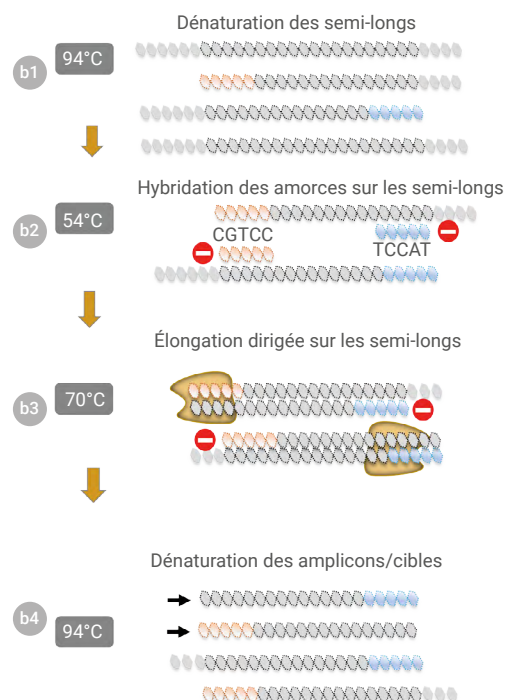
CYCLE N°1 : DE L'ADN LONG INITIAL AU « SEMI-LONG »



CYCLES N°3 À (30...40) : AMPLIFICATION DES AMPLICONS

- 54°C Hybridation des amorces sur les amplicons
- 70°C Élongation dirigée à partir des amorces
- 94°C Dénaturation des amplicons

CYCLE N°2 : DE L'ADN SEMI-LONG À L'AMPLICON



A : adénine - G : guanine - T : thymine - C : cytosine

E1. Les différentes étapes de la PCR monoplexe

Un double brin d'ADN de départ (a1) est chauffé à 94°C en solution (a2) pour séparer les simples brins (« dénaturation ») ; (a3) en descendant à 54°C, de courtes « séquences » d'ADN amorces contenues dans la solution (ici 5 bases pour l'exemple, CGTCC et TCCAT, en réalité 25 bases) s'hybrident à des zones ciblées spécifiques de l'ADN de l'infection recherchée. Après chauffage à 70°C, des enzymes polymérases contenues dans la solution avec des bases d'ADN entament la croissance du segment de brin manquant (élongation) uniquement dans la direction de la flèche bleue (suivant la règle dite sens/anti-sens, déterminée par la chiralité des amorces qui va avec la façon dont l'hélice d'ADN locale tourne). En (a4), on voit que le résultat de cette étape d'élongation est plus long que la séquence visée, un ADN « semi-long ».

En (b1), au début du 2^e cycle, on sépare à 94°C les deux brins, et les amorces se placent dans la phase à 54°C comme indiqué en (b2). L'élongation à 70°C conduit au résultat (b3), qui « bute » sur la fin du brin semi-long au bout de la première amorce. Les deux brins « courts » ainsi obtenus sont les premiers amplicons, brins cibles. (b4) On sépare à 94°C ces amplicons (flèches noires) pour leur amplification.

Les étapes de chacun des cycles suivants ((c2)_n, (c3)_n, (c4)_n, n = 3 à n ~ 30 à 40) amplifient les amplicons de la même façon que (b2, b3, b4). Dans la phase hybridée (c3), la fluorescence d'un fluorophore, ici SYBR Green, est activée lorsqu'il est intercalé dans le double brin. Dans les cycles (3...40), l'amplitude du signal fluorescent sert de contrôle de la multiplication des amplicons. Eux seuls ont une multiplication exponentielle ($2^{30} \sim 10^9$ en ordre de grandeur), le brin d'origine ne donnant pour sa part qu'une copie de l'ADN « semi-long » par cycle.

“ Pour savoir quelle infection a été détectée, il suffit de faire l'image de fluorescence de la puce, de repérer quel *spot* émet de la lumière et remonter à l'agent qui correspond à la sonde en question.”

L'appariement, événement microscopique, devient détectable grâce à la fluorescence : c'est comme un phare côtier la nuit, bien perçu à très grande distance, même si l'on ne peut résoudre la taille du phare. Un *spot* devenu fluorescent (de diamètre 50 à 500 μm) indique la présence d'espèces porteuses du matériau génétique associé dans le prélèvement, spécifique de la sonde ADN présente sur ce *spot*. Pour savoir quelle infection a été détectée, il suffit donc de faire l'imagerie de fluorescence de la puce, de repérer quel *spot* émet de la lumière, et remonter à l'agent qui correspond à la sonde en question.

Habituellement, une biopuce à fluorescence est lue dans un microscope confocal à fluorescence. C'est cette étape d'identification que nous avons largement améliorée grâce à de nouveaux concepts optiques, menant à des systèmes de détection ultra-sensibles, à faible cout d'emploi et utilisables par un personnel non qualifié.

Les défis pour les physiciens : collecter, exciter, rejeter

Pour un fluorophore dont la lumière se propage dans le vide, « il n'y a plus qu'à » bien la recueillir. Las, sur un substrat, voire dans un matériau, l'affaire est différente, ce que la physique des LEDs nous avait bien montré, car la majorité de la lumière émise dans un milieu d'indice supérieur à celui de l'air reste captive dans le matériau.

Pour une biopuce, les molécules sont proches ($\sim 5 \text{ nm}$) d'un support du type lame de verre. Le gros de la

fluorescence est alors émis directement dans le verre et sort peu par la face avant (fig. 3a). La photonique nous en propose une explication simple par la plus grande densité d'états de photons dans le verre que dans l'air, qui capturent donc une plus grande fraction de l'émission. Les ondes qui partent dans l'air sont émises dans toutes les directions. Pour bien les recueillir, il faudra donc une optique de très grande ouverture, peu commode et menant à un faible champ. Dernier problème : la fluorescence à large bande du verre lui-même est en compétition avec celle des fluorophores. On la rejette bien, à condition de filtrer spatialement la lumière du verre pour ne la collecter que sur un très faible volume, ce qui impose la géométrie dite de « confocalité » pour l'excitation et la collecte.

Sortir la lumière émise à l'intérieur d'une LED est un problème qui nous a occupés une dizaine d'années, avec les concepts de microcavités et de cristaux photoniques (voir l'interview sur l'histoire de Genewave, pp. 24-26) qui permettent de contrôler les modes d'émission (microcavités) et de propagation (cristaux photoniques). Il nous a paru évident que notre « boîte à outils » pourrait aider dans les biopuces à fluorescence.

Mieux exciter et sortir la lumière d'une biopuce avec un substrat miroir est facile dans l'absolu : il se crée par réflexion du faisceau incident une onde stationnaire ; on ajuste l'épaisseur d'un espaceur diélectrique transparent pour localiser un ventre du champ sur la mince couche émettrice (fig. 3b, voir aussi [1]). On gagne ainsi un facteur 4

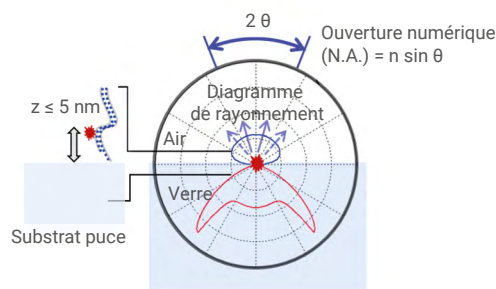
environ, grâce à l'effet d'interférence constructive pour des molécules directement déposées sur la surface. On gagne un autre facteur 4 par les interférences entre la lumière émise vers le haut et celle réfléchi par le miroir après émission initiale vers le bas. On atteint une efficacité de collecte de la fluorescence dans un objectif d'ouverture standard de l'ordre de 25%, grâce à la directionnalité de l'émission qui porte l'empreinte des interférences constructives.

Avant la détection de la lumière de fluorescence provenant de la biopuce, il faut filtrer la lumière excitatrice parasite hélas proche spectralement (écart en longueur d'onde souvent limité à 50-60 nm entre excitation de type laser ou LED et fluorescence), et ce avec une réjection supérieure à 10^6 .

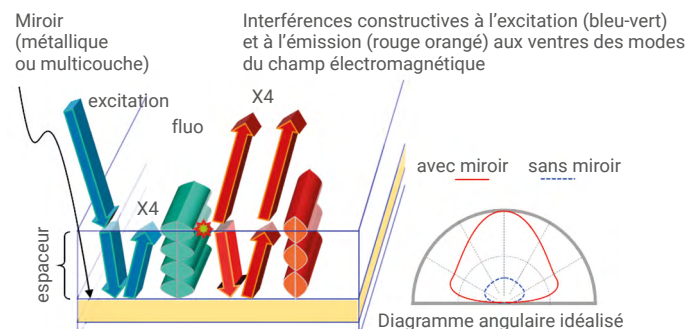
Les marqueurs fluorescents courants sont souvent des colorants organiques. Leur efficacité quantique est élevée ($> 50\%$), mais ils présentent un risque de photoblanchiment (perte de fluorescence) parfois gênant. Un des remèdes est de passer aux boîtes quantiques⁽¹⁾ comme marqueurs. Dans ce cas, l'écart entre longueurs d'ondes excitatrice et d'émission (*Stokes shift*) devient grand ($> 150 \text{ nm}$) : le filtrage à haute réjection est alors bien plus aisé.

Une détection directe par contact de la biopuce avec un capteur d'image (de type CMOS) mène à une efficacité de collecte de l'ordre de 70%, puisque toute la lumière émise vers le bas est capturée (fig. 3c).

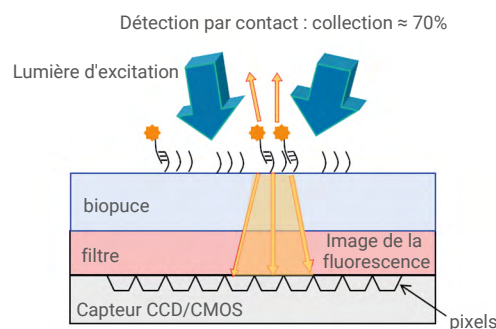
La solution que nous avons retenue associe cette géométrie de collecte avec une excitation par guide d'onde (fig. 3d) : c'est un concept très exploré pour les concentrateurs solaires à fluorescence. Le soleil y éclaire une lame contenant des fluorophores : à cause de la réflexion interne totale de la fluorescence, la plus grande partie de l'émission se propage dans la lame. L'intensité dans le guide s'accumule et peut, aux extrémités, nettement surpasser l'intensité incidente : ce cumul met essentiellement en jeu le rapport géométrique entre la dimension latérale de la lame et son épaisseur. Dans le cas de la biopuce (fig. 3d), le champ évanescant qui va exciter les fluorophores en surface est d'une amplitude proche de celui qui se propage dans la lame. La fluorescence que l'on collecte étant émise hors du



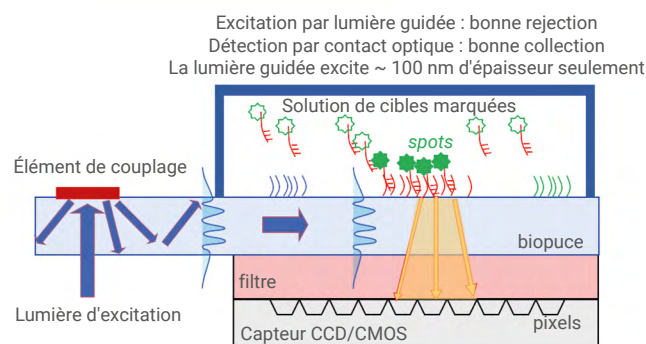
a



b



c



d

3. Les différentes étapes de la détection de la lumière émise par les *spots* fluorescents.

(a) **Le défi de la collecte de la lumière émise** : un émetteur placé sur un substrat émet l'essentiel de la lumière dans le milieu de haut indice. La lumière collectée dans une optique à grande ouverture ne représente que quelques pourcents de l'émission.

(b) **Amplification de l'excitation et de l'émission par interférences constructives**, avec à droite une illustration heuristique de la modification du rayonnement de l'émission vers la collecte, dans le demi-espace supérieur.

(c) **Détection par contact entre biopuce et capteur**.

(d) **Excitation par onde guidée**. La lumière excitatrice est couplée dans le substrat et s'y propage de manière guidée. La partie évanescence des ondes guidées excite les molécules sur une épaisseur de 100 nm environ, ce qui permet de n'observer que les cibles hybridées, celles en solution étant très peu nombreuses dans l'épaisseur de l'onde évanescence. La cartographie de l'émission de la biopuce est détectée par contact avec un capteur bidimensionnel de type photo numérique. La lumière d'excitation parasite qui masquerait la fluorescence est rejetée par la géométrie de guidage de l'excitation, qui se propage orthogonalement à la direction de collection, et par un filtre sélectif en longueur d'ondes. L'efficacité de collection est de l'ordre de 70% et, alliée au rejet de l'excitation, permet l'observation de molécules uniques.

guide, elle est séparée directionnellement de la lumière excitatrice qui est guidée. On peut l'imager côté verre, en gardant une continuité d'indice jusqu'au détecteur. Comme on ne peut plus insérer de lentille dans ce cas, la détection se fait par contact pour une imagerie de proximité. Cela exige des capteurs apposables sur du verre (fig. 3d). La taille de l'image d'un fluorophore projetée sur le capteur est de l'ordre de l'épaisseur séparant l'émetteur du capteur, avec un effet de pénombre. On récolte alors plus de 70% de la lumière émise. Avec une

taille de *spots* de 300 à 400 μm , l'interposition d'un substrat de 100 μm n'est pas rédhibitoire pour résoudre et qualifier ces *spots* : elle n'induit pas de « diaphonie » entre *spots*.

La détection par contact, associée à la géométrie d'excitation par onde évanescence, est clairement optimale avec sa grande efficacité de collecte. Les données des capteurs silicium à l'ambiante et la géométrie évoquée ont pour résultat une sensibilité dans la gamme de un à cent molécules de fluorophore par pixel [2]. Tout est critique : notamment, la mesure doit être

faite avec au plus 10^5 photons émis par fluorophore pour ne pas risquer la dégradation de ce dernier. Cependant, avec 10^5 photons, dont ~ 40% donnent du photocourant et des « bruits » de l'ordre de 1000 photons/VHz pour des capteurs optimaux à l'ambiante, il est possible d'atteindre la molécule unique par pixel. Notons que par rapport aux systèmes habituels de détection de molécules uniques en géométrie confocale, on détecte ici un ensemble de molécules uniques en grand champ.



GLOSSAIRE

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (voir encadré, p. 19).

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR.

RT-PCR (à ne pas confondre avec le *Real time PCR* ci-dessous) : *reverse transcriptase PCR*. L'amplification débute par la transcription de l'ARN de l'agent infectieux en ADN qui va subir la PCR.

PCR en temps réel (*Real time PCR*) : la lecture classique du résultat d'une amplification PCR se fait par migration sous champ électrique des amplicons en solution sur une colonne de gel à la fin des cycles. La présence d'amplicons apparaît comme une bande noire ou colorée, suivant la méthode de révélation. La mesure en temps réel détecte l'amplification au fur et à mesure des cycles. Des molécules spéciales comme le colorant SYBR Green ne sont fluorescentes qu'intercalées entre les deux brins. Cycle après cycle, les amplicons se multiplient et l'intensité du signal de fluorescence croît. En plus de la reconnaissance de l'infection, la précocité de la phase de croissance de l'intensité informe sur le nombre initial d'agents infectieux dans le prélèvement, *modulo* calibration.

Multiplexe : test multiplexe. Se dit d'un test qui donne des résultats sur plusieurs tests moléculaires individuels, alors que la PCR décrite dans l'encadré 1 n'est qu'un test « monoplexe ». Ces tests multiples peuvent être de nature très proche (pour des variantes de souches bactériennes, par exemple) ou de nature largement différente (combinant ADN et protéines, ADN et ARN, etc.).

Boîte quantique (dans le contexte de marqueurs pour la biologie) : nanocristaux fluorescents à base de semi-conducteurs II-VI du type $(\text{Cd}_x\text{Zn}_{1-x})(\text{S}_y\text{Se}_{1-y})$. Le confinement quantique lié à la taille (2 à 7 nm) influe sur la longueur d'onde de luminescence. Une boîte quantique doit être protégée par une « coquille » (de plus grand *gap*, comme CdS par exemple), puis fonctionnalisée pour devenir un marqueur utilisable. Voir la référence [6].

Passif/passive : se dit d'un dispositif qui ne possède pas d'éléments moteurs ou d'éléments source de lumière. En conséquence, l'énergie des processus mis en jeu doit provenir entièrement de l'extérieur (flux électriques, lumineux, aérauliques).

la puce [3]. La fraction de cibles accrochées est un facteur critique, limitant la sensibilité de tout système basé sur l'accrochage de cibles.

Grâce à l'utilisation de vannes passives sur la cartouche (fig. 4b), dont l'actionnement est réalisé par déformation depuis l'extérieur d'un film polymère qui vient obturer ou non l'entrée d'un micro-canal, et d'un pompage des fluides depuis l'extérieur, la cartouche peut être de fabrication très simple et de bas coût. Le corps plastique obtenu par injection-moulage contient des canaux, des chambres réactionnelles et des micro-vannes qui sont activées grâce à des membranes souples collées sur les deux faces (fig. 4b).

La machine de test automatique

Après son insertion dans l'automate, la cartouche passive et ses fluides sont activés de l'extérieur à partir de différents accès : pompage et injection des fluides par une micro-seringue, cycles thermiques par platine chauffante, excitation et détection optique avec filtres et voies optiques adaptées à notre géométrie d'excitation évanescence et de détection par contact. La machine abrite donc une « opto-mécatronique » sophistiquée pour commander ces flux et les capteurs associés (fig. 4c). Un contrôleur commande les étapes et, en sortie, le traitement d'image et un accès aux bases de données donnent le résultat aux opérateurs. Soulignons le choix architectural fondamental : la cartouche est passive ⁽¹⁾, donc à bas coût. Toute « l'intelligence » est dans la machine, avec les actionneurs, les sources, les filtres, etc...

D'un nouveau concept de biopuce fluorescente à un système de test commercialisable

Un système de diagnostic automatique contient deux sous-systèmes principaux : la cartouche consommable contenant la biopuce et tous les éléments et réactifs réalisant l'analyse, et l'automate de contrôle/mesure.

La cartouche consommable

On cherche à avoir le consommable le moins cher à produire, le plus passif possible, en reportant toutes les fonctions d'actuation et de mesure (fig. 4a :

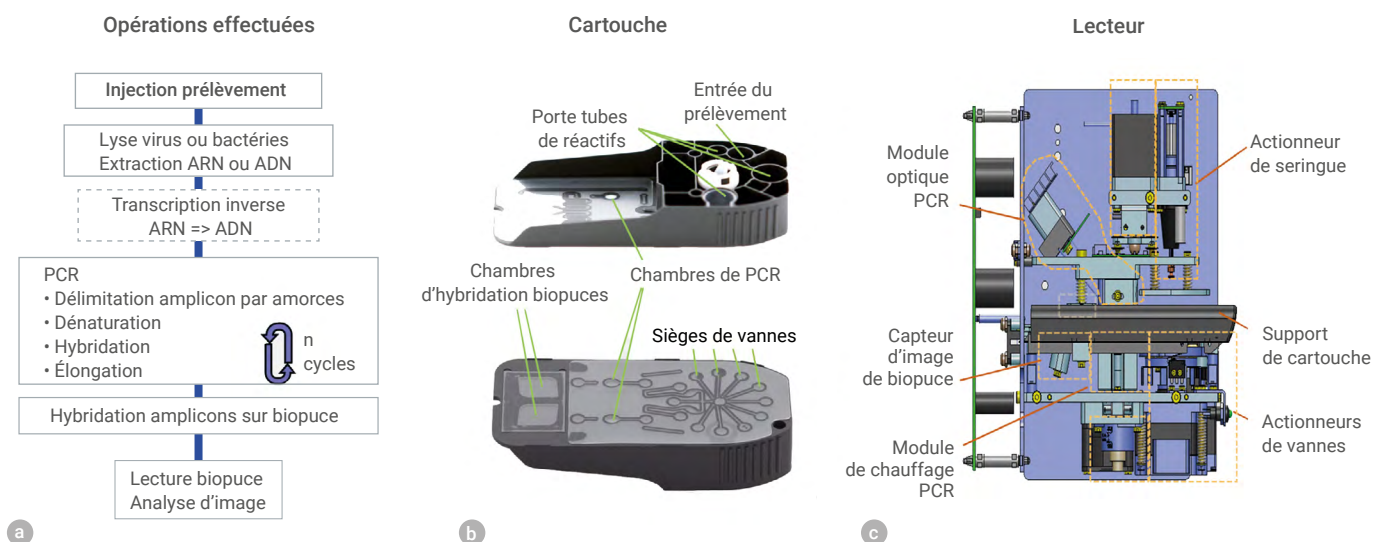
les « opérations effectuées ») dans l'appareil qui va avaler la cartouche contenant le prélèvement.

La capture de l'image de la biopuce par un capteur bidimensionnel CMOS permet de voir tous les *spots* fluorescents à la fois. On fait donc l'économie d'un balayage spatial. De plus, la présence de *spots* fluorescents de référence permet de caler l'image par rapport à ces *spots*, et donc de s'affranchir d'un positionnement précis de la cartouche dans son support, évitant une mécanique de précision.

La fluidique doit mettre en contact efficacement les molécules cibles de la solution avec les molécules sondes sur

La possibilité de détection de mutations

On a exposé jusqu'ici le cas de brins d'ADN identifiés en termes d'absence ou présence sur une « photo finale de l'hybridation des cibles ». On peut aussi passer à un « film » dynamique, afin de mesurer finement les différences entre énergies d'hybridation qui révèlent des mutations entre ADN proches. En effet, si une seule base diffère dans un brin (mutations *Single Nucleotide Polymorphism* : SNP), l'analyse de l'association au brin quasi-complémentaire est importante. Le SNP peut être révélé par le faible écart de la température dite de « fusion »,



4. Cartouche à biopuce et son lecteur. (a) Opérations effectuées et (b) schéma fonctionnel de la cartouche. La biopuce est visible de dessous (image b inférieure). Après l'injection du prélèvement, les différentes opérations – lyse, extraction/purification, PCR multiplexe, marquage, hybridation sur biopuce – sont réalisées par les flux des fluides entre réservoirs et chambres réactionnelles grâce à une seringue créant pressions et dépressions, et une circulation séquentielle routée via des microcanaux qui sont ouverts ou fermés par des microvannes. Celles-ci sont activées par des poussoirs du lecteur qui déforment un film polymère, lequel vient obturer ou non l'entrée d'un microcanal. La cartouche contient au départ les réactifs nécessaires aux opérations de la PCR, et injecte ensuite les cibles amplifiées et marquées dans les chambres de biopuces où l'on réalise l'hybridation entre sondes et cibles, lue par le capteur d'image [cf. (c)]. Il y a deux canaux entièrement indépendants, afin de traiter des échantillons complexes – ou contenant ADN ou ARN, et effectuer alors une transcription inverse d'un ARN avant la PCR. (c) Station d'accueil très compacte (0,5 dm³), avec ses fonctionnalités.

point de mi-réaction de dénaturation où les cibles se dissocient des sondes à 50%. Un suivi en cyclage thermique montrera, par le changement de signal lors du décrochage des cibles, les écarts de cette température, de quelques degrés entre brin de référence et SNP, révélant ainsi les mutations SNP [4].

D'autres offres de détection optique

Il existe beaucoup d'offres de concepts photoniques permettant la détection d'événements d'hybridation. Le marquage avec des fluorophores exposé ici permet la détection de molécules accrochées uniques. Considérant le marquage comme une contrainte, beaucoup de propositions sont faites pour une détection sans marquage. Il faut alors un phénomène qui exacerbe la modification optique locale du milieu par l'hybridation. Pour des brins d'ADN, il en faut alors beaucoup, et l'on perd en sensibilité. En revanche, c'est possible pour les protéines qui occupent un volume bien plus grand que des brins d'ADN, et c'est cela qui est largement utilisé dans les systèmes à plasmons de surface ou à modes très localisés (métasurfaces avec haut indice, ou métaux, structures guidantes avancées,

réseaux résonnants, etc.). De telles structures à modes très localisés sont aussi invoquées pour effectuer des détections de molécules uniques accrochées [5]. Elles ont le défaut de n'avoir que de très faibles volumes actifs, et ce que l'on gagne en sensibilité est perdu par la faible probabilité d'accrochage des brins à détecter sur le volume actif optiquement : la biopuce actuelle offre une surface d'un pixel (25 x 25 µm²) pour accrocher une cible détectable, alors que le volume d'un mode localisé est de l'ordre de fractions de micron carré pour les plus grands d'entre eux.

Conclusion

Les techniques de la biochimie moléculaire et de la photonique sont en synergie depuis plusieurs décennies. À la recherche d'instruments porteurs des performances ultimes, et utilisant les connaissances du physicien, nous avons abouti à des architectures qui intègrent les bonnes conditions de fluorescence et les contraintes de la biologie moléculaire telle qu'elle se pratique aujourd'hui dans la médecine, et dont les services sont si précieux face aux agents infectieux de toutes sortes. ■



- 1• H. Choumane *et al.*, "Double interference fluorescence enhancement from reflective slides: Application to bicolor microarrays", *Applied Physics Letters* **8** (2005) 031102.
- 2• L. Martinelli *et al.*, "Sensor-integrated fluorescent microarray for ultrahigh sensitivity direct-imaging bioassays: Role of a high rejection of excitation light", *Applied Physics Letters* **91** (2007) 083901.
- 3• S. Squires *et al.*, "Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors", *Nature Biotechnology* **26** (2008) 417–426.
- 4• Y. Marcy *et al.*, "Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays", *BioTechniques* **44** (2008) 913–920.
- 5• A.B. Taylor et P. Zijlstra, "Single-Molecule Plasmon Sensing: Current Status and Future Prospects", *ACS Sensors* **2** (2017) 1103–1122.
- 6• I.V. Martynenko *et al.*, "Application of semiconductor quantum dots in bioimaging and biosensing", *Journal of Materials Chemistry B* **5** (2017) 6701–6727.