

THESE DE DOCTORAT

présentée à

L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Ecole Doctorale Science de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement



pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

Dans la spécialité :

Optique et Lasers, Physico-Chimie, Atmosphère

par

Nazek MAALLOULI

Développement d'un banc plasmonique en goutte et conception de nouvelles interfaces appliquées à la biodétection

Directeur de thèse :

Bernard PINCHEMEL

Co-directrice de thèse :

Sabine SZUNERITS

devant le jury :

Claire-Marie Pradier	Rapporteur	Université Pierre et Marie Curie
Pierre-Michel Adam	Rapporteur	Université Technologie de Troyes
Anne-Chantal Gouget-Lammel	Examinateur	Ecole Polytechnique de Paris
Rabah Boukherroub	Examinateur	Université de Lille 1
Serge Habraken	Examinateur	Université de Liège
Jean-Pierre Vilmot	Examinateur	Université de Lille 1
Mohamed Bouazaoui	Membre invité	Université de Lille 1

Résumé

Les capteurs basés sur la résonance plasmonique de surface (SPR) sont devenus des outils très importants pour une détection sensible, sans marquage et en temps réel des interactions biochimiques et biologiques. Dans cette thèse, différents aspects de la plasmonique ont été étudiés tels que la configuration du système de détection et la façon dont les molécules sont attachées aux interfaces SPR. Dans la première partie de ce travail, l'intérêt d'un banc SPR en configuration "goutte" est présenté. Ce banc a permis d'étudier expérimentalement, pour la première fois, l'excitation des plasmons de surface par une "lame à réseaux", un dispositif intégré sans prisme. Dans la deuxième partie, différentes stratégies de fonctionnalisation de surface ont été développées sur différents types d'interfaces SPR hybrides. Une lame d'argent couverte par un film fin de silicium amorphe carboné ($\text{Ag/a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$) a été modifiée avec de l'acide nitrilotriacétique (NTA) terminé amine pour chélater les ions Cu^{2+} . L'interaction avec les peptides his-tagués peut être suivie, d'une façon simple, par le banc SPR en "goutte". L'intérêt de l'interaction glycane-lectine a motivé le développement des interfaces SPR modifiées avec des glycanes. En utilisant l'approche de la chimie "click", les sucres mannose/lactose terminés alcyne ont été attachés d'une façon covalente sur une lame d'or/oxyde de silicium (Au/SiO_x) fonctionnalisée azide. La détection de deux différents lectines (*Lens culinaris* et Peanut Agglutinin) par ces puces à glycanes a été validée. En parallèle, le greffage des sucres mannose/lactose "non modifiés" à l'interface Au/SiO_x modifiée par l'acide tétrafluoro-azidobenzoïque (ATFBA) via le photocouplage a été analysé. Cette stratégie a montré une efficacité dans la reconnaissance spécifique des lectines comparable à celle obtenue dans le cas de la chimie "click".

Mots clés : Résonance de plasmons de surface (SPR), banc SPR en configuration "goutte", stratégies de fonctionnalisation, interfaces SPR hybrides.

Abstract

Surface plasmon resonance (SPR) based biosensors have become very important tools for a sensitive, label-free and real-time detection of biochemical and biological interactions. In this thesis, different aspects for plasmonic-based sensor have been investigated such as the detection system configuration and the way molecules are linked to the SPR interfaces. In the first part of this thesis, the interest of a droplet-based SPR set-up was shown. This approach has allowed studying experimentally, for the first time, the excitation of surface plasmons by a diffraction grating chip, without integrated prisms. In the second part, different surface functionalization strategies have been developed on different thin film of a hybrid SPR interfaces. It was shown that silver-based SPR interfaces post-coated with amorphous silicon-carbon alloy ($\text{Ag/a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$) could be modified with amine-terminated nitrilotriacetic acid (NTA), a strong chelating agent for Cu^{2+} ions. The interaction with his-tagged peptides could be followed, in an easy manner, by the droplet-based SPR set-up. Motivated by the interest of the glycane-lectin interaction, glycan-modified SPR chips were developed. Alkynyl-terminated mannose/lactose were covalently linked to azide functionalized gold/silicon oxide (Au/SiO_x) interfaces using a "click" chemistry approach, the sensing of two different lectins (*Lens culinaris* and Peanut Agglutinin) was validated. In parallel, "unmodified" glycans were covalently linked to azide-tetrafluorobenzoic acid by a photocoupling strategy. This strategy showed high efficiency in the specific recognition of lectins comparable to the one obtained in the case of "clicked" sugar.

Key words: Surface plasmon resonance (SPR), droplet based SPR set-up, functionalization strategies, SPR hybrid interfaces.

A la mémoire de mon ami JAD

Cette ambition que tu avais malgré tout ...

Elle était et sera pour toujours une source de motivation

Remerciements

Tout d'abord mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèses Sabine Szunerits et Bernard Pinchemel.

Bernard, merci pour tes conseils, pour les discussions qu'on a eues ensemble, que ce soit sur le plan professionnel (surtout ta passion des montages expérimentaux) que sur le plan humain (tu as été d'un soutien exceptionnel) et pour la confiance que tu m'as accordée durant ces 3 ans. Ceci m'a soutenue pour mener à bien cette thèse. Merci...cela été un grand plaisir. J'associe bien volontiers ton épouse Lucie.

Sabine, merci de m'avoir transmis tes connaissances et tes compétences scientifiques qui m'ont aidée à enrichir les miennes et de m'avoir donné l'opportunité de visiter différents laboratoires en France et à l'étranger et de rencontrer des personnes de différents domaines. Ça m'a permis d'apprendre énormément de choses, de progresser scientifiquement et de me confronter à de nouveaux challenges!

Je tiens à remercier Claire-Marie Pradier, directrice de recherches CNRS au laboratoire de réactivité des surfaces (LRS) de l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI) et Pierre-Michel Adam, professeur au laboratoire de nanotechnologies et d'instrumentation optique (LNIO) de l'université de Technologie de Troyes (UTT) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Je remercie également Anne-Chantal Gouget-Lammel, chargée de recherches au CNRS au laboratoire de la Physique de la Matière Condensée (PMC) de l'école Polytechnique de Paris, Serge Habraken, professeur au laboratoire optique de l'université de Liège, Jean-Pierre Vilcot, directeur de recherches CNRS à l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) et responsable du contrat INTERREG IV "Plasmobio" d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie Rabah Boukherroub, directeur de recherches CNRS à l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI) d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et de m'avoir accueilli dans l'équipe "Nanobiointerfaces".

Je remercie aussi Mohamed Bouazaoui, professeur au laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM) d'avoir accepté d'être membre invité et de m'avoir accueilli dans l'équipe "Photonique".

Je souhaite remercier Messieurs Georges Wlodarczak, Directeur du laboratoire PhLAM et Vincent Villeret, Directeur de l'IRI de m'avoir accueillie durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Dominique Derozier, professeur au Centre d'Etudes et de Recherches Lasers et Applications (CERLA) de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans le cadre du partenariat entre l'université Lille 1 et la Faculté des sciences II de l'université Libanaise.

Merci à François Ozanam de m'avoir accueillie au sein du laboratoire PMC de l'école Polytechnique de Paris. Une pensée à Anne-Chantal pour son aide et le temps qu'elle m'a consacré lors de mes deux séjours au Laboratoire. J'ai beaucoup appréciée notre travail en commun.

Je désire également remercier Jakub Dostalek et Martin Bauch de m'avoir accueillie au département Health and Environment à l'Austrien Institut of Technology, Autriche.

Je remercie aussi Isabel Alves et Etienne Harté pour leur accueil et leur bonne humeur durant ma visite au laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets (CBMN) de l'université de Bordeaux 1.

Je voudrais aussi exprimer mes remerciements à Isabelle Jankowiak pour m'avoir formée à l'enseignement des TP d'électronique à l'Institut Universitaire de Technologies (IUT), pour sa disponibilité, sa sympathie et pour ses conseils.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes, secrétaires, techniciens, ingénieurs, chercheurs au sein des laboratoires PhLAM et IRI. Merci à Marie-Thérèse Ledee pour sa disponibilité et ses compétences dans la résolution des problèmes administratifs. Merci également à Laurent Hay pour son aide technique et sa disponibilité dans la mise au point du programme Labview.

Merci à Yannick Coffinier pour ses conseils d'expérimentateur et ses compétences scientifiques qu'il a su me faire partager durant les manipes effectuées à l'IEMN.

Un merci spécial à Alexandre Barras pour son aide, sa gentillesse et ses encouragements. Tu as une façon remarquable pour expliquer... même les mécanismes chimiques si compliqués !! Je ne risque pas d'oublier ma première fonctionnalisation de surface... que des fous rires :)

J'adresse mes remerciements à tous mes collègues francophones: Laurent, Liu, Rudy, Saliya... du PhLAM, Abdel hak, Houria, Larbi du PMC, Chahrazed, Fatiha, Lionel, Magalie, Guillaume, Cyril, Quentin, Flo,...de l'IRI.

Je remercie particulièrement "madame" Mouna, Nadia et Nhung pour toutes les séances de rires et de sourires, pour toutes les discussions autour d'un café et surtout pour votre amitié !

For all my multinational colleagues: Guohui, Iza, Kiran, Mykola, Manu, Marieta, Raluca, Wan Qi... Thank you for your kindness, for the good ambiance in the lab and for improving my multicultural knowledge (Chinese new year, Monday fruit,...) It has been a pleasure meeting you all.

Un énorme merci à Assaad, Béa, Benoit, Imane, Serguei, Stephanie, Vinconnnn avec qui j'ai passé de très bons moments: les midis au RU, au badminton, les anniversaires "surprises", les dimanches midi chez Chef Assaad avec les bons plats libanais,...

A Vincent, tu as toujours été là pour m'aider et m'encourager, pour me changer les idées quand j'en avais besoin et pour partager les bons et les moins bons moments...même quand tu étais loin à 11722 km de Lille et avec 6 heures de décalage!! Merci.

A ma mère, mon père, ma sœur et sa petite famille, je vous remercie profondément pour votre soutien inestimable, votre confiance en moi et vos prières. Vous êtes si précieux pour moi et je ne saurai jamais assez vous remercier de ce que vous avez fait pour moi.

Table des matières

GLOSSAIRE.....	- 13 -
INTRODUCTION GENERALE	- 15 -
CHAPITRE I - RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE: PRINCIPE ET APPLICATIONS.....	- 17 -
I.1-La résonance de plasmon de surface (Principe physique).....	- 19 -
I.2- Excitation des plasmons de surface par couplage par prisme	- 23 -
I.3- Les paramètres qui influent sur la résonance plasmonique	- 25 -
I.3.1- La nature du métal.....	- 26 -
I.3.2- Le choix de la longueur d'onde.....	- 28 -
I.4- Le principe de la détection de l'interaction biomoléculaire par SPR	- 30 -
I.4.1- Différents systèmes de transport d'analyte.....	- 31 -
I.4.2- Les procédures d'immobilisation des ligands sur les surfaces SPR	- 33 -
I.5- Sensibilité et Résolution.....	- 36 -
CHAPITRE II- AMELIORATION DU BANC SPR EN CONFIGURATION "GOUTTE"	- 39 -
II.1- Introduction	- 41 -
II.2- Historique du Banc.....	- 41 -
II.3- Perfectionnement du banc	- 43 -
II.3.1- Validation quantitative : reproductibilité et étalonnage.....	- 44 -
II.3.2- Amélioration du dispositif de détection.....	- 47 -
II.4- Dispositif plasmonique intégré sans prisme.....	- 48 -
II.5- Conclusion.....	- 51 -
CHAPITRE III- FONCTIONNALISATION DES COUCHES MINCES DE SILICIUM AMORPHE CARBONE POUR L'IMMOBILISATION DE PEPTIDES HISTAGUES	- 53 -
III.1- Introduction.....	- 55 -
III.2- Préparation des interfaces SPR Ag/a-Si _{1-x} C _x :H	- 56 -
III.3- Greffage des molécules NTA pour la complexation avec les ions Cu ²⁺	- 57 -
III.4- Immobilisation des peptides histagués	- 67 -
III.5- Conclusion	- 71 -
CHAPITRE IV- FONCTIONNALISATION DES COUCHES MINCES D'OXYDE DE SILICIUM POUR LE SUIVI DE L'INTERACTION GLYCANES-LECTINES PAR SPR.....	- 73 -
IV.1- Introduction	- 75 -
IV.2- Préparation des interfaces SPR Au/SiO _x	- 76 -

IV.3- Fonctionnalisation et Caractérisation des surfaces SPR pour le greffage des glycanes	- 77 -
IV.3.1- Via le photocouplage.....	- 78 -
IV.3.2- Via la chimie "click".....	- 82 -
IV.4- Etude de l'interaction glycanes-lectines par SPR.....	- 89 -
IV.5- Conclusion	- 94 -
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	- 97 -
BIBLIOGRAPHIE.....	- 99 -
ANNEXES	- 109 -
Annexe.1- Surfaces SPR	- 109 -
Annexe.1.1- Verre/Ti/Ag/a-Si _{0.63} C _{0.37} :H.....	- 109 -
Annexe.1.2- Verre/Ti/Au/SiO _x	- 109 -
Annexe.2- Fonctionnalisation des surfaces SPR.....	- 110 -
Annexe.2.1- Pour l'interaction peptides histagués-Cu ²⁺ /NTA sur Ti/Ag/aSi _{0.63} C _{0.37}	- 110 -
Annexe.2.2- Pour la reconnaissance des lectines par les glycanes sur Ti/Au/SiO _x	- 111 -
Annexe.3- Synthèse de l'acide azido-tetrafluorobenzoïque (ATFBA).....	- 112 -
Annexe.4- Instrumentation et Techniques de caractérisation	- 114 -
Annexe.4.1- Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR-FTIR) ..	- 114 -
Annexe.4.2- Spectroscopie des photoélectrons X (XPS).....	- 114 -
Annexe.4.3- Voltampérométrie cyclique	- 115 -
Annexe.4.4- Spectrophotométrie UV/Visible.....	- 115 -
Annexe.4.5- UV-Ozone.....	- 115 -
Annexe.5- Le modèle de l'interaction de 1:1 de Langmuir	- 115 -
Annexe.6- Dosage des glycanes par calorimétrie "acide sulfurique-phénol"	- 116 -
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	- 117 -

GLOSSAIRE

ABA	Acide azidobenzoïque, Azidobenzoic acid
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTMS	Aminopropyltriméthoxysilane
ATFBA	Acide tétrafluoro-azidobenzoïque, Azidotetrafluorobenzoic acid
ATR	Réflexion totale atténuée, Attenuated total reflectance
C	Coulomb
CCD	Dispositif à couplage de charge, Charge-coupled device
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDC	Ethyl-(diméthylamino)propylcarbodiimide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique, Ethylenediaminetetraacetic acid
EM	Electromagnétique
FOM	Facteur de Merite, Figure of Merit
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, Fourier transform infrared spectroscopy
FWHM	Largeur à mi-hauteur, Full width at half maximum
HBS	Tampon salin à partir de HEPES (HEPES = acide (hydroxyéthyl)pipérazine éthane sulfonique)
HF	Acide fluoridrique, Hydrogen fluoride
K _A	Constante d'association à l'équilibre, Equilibrium association constant
K _D	Constante de dissociation à l'équilibre, Equilibrium dissociation constant
LC	Lectine de lentille, Lens culinaris
LOD	Limite de détection, Limit of detection
MM	Masse moléculaire
NHS	N-hydroxysuccinimide
NTA	Acide nitrilotriacétique, Nitrilotriacetic acid
PBS	Tampon phosphate salin, Phosphate buffered Saline
PEG	Polyéthylène glycol

<i>PEVCD</i>	<i>Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma, Plasma-enhanced chemical vapor deposition</i>
<i>PNA</i>	<i>Lectine de l'arachide, Peanut agglutinin</i>
<i>R</i>	<i>Réflectivité</i>
<i>RIU</i>	<i>Unité d'indice de réfraction, Refractive index unit</i>
<i>RMN</i>	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>
<i>RU</i>	<i>Unité de réponse ou Unité de résonance, Responce unit or Resonance unit</i>
<i>S</i>	<i>Sensibilité, Sensitivity</i>
<i>SAM</i>	<i>Monocouches auto-assemblées, Self-assembled monolayers</i>
<i>SAW</i>	<i>Ondes acoustiques de surface, Surface acoustic waves</i>
<i>SPR</i>	<i>Résonance de plasmons de surface, Surface plasmon resonance</i>
<i>SDS</i>	<i>Dodécylsulfate de sodium, Sodium dodecyl sulfate</i>
<i>UV/Visible</i>	<i>Spectroscopie dans les longueurs d'ondes ultra-violettes et visible</i>
<i>TM</i>	<i>Transverse magnétique</i>
<i>XPS</i>	<i>Spectroscopie de photoélectrons X, X-ray Photoelectron spectroscopy</i>

INTRODUCTION GENERALE

Les recherches actuelles sur les biocapteurs utilisés en biochimie et en diagnostic médical ont pour objectif d'augmenter la sensibilité de la détection. Par exemple, depuis cinquante ans, les techniques de détection basées sur le phénomène de fluorescence sont les plus utilisées.¹ Ces méthodes sensibles permettent une détection jusqu'à quelques centaines de femtomoles de matériel biologique. Cependant, elles nécessitent la modification des molécules étudiées par des marqueurs fluorescents, ce qui demande un effort de synthèse et entraîne une augmentation du coût d'utilisation.

Afin de dépasser ces contraintes, différentes techniques de détection "sans marquage" ont fait l'objet de nombreux travaux scientifiques. Dans cette approche, les biocapteurs basés sur la résonance plasmonique de surface (SPR) ont connu un développement remarquable dans le domaine de la détection, de l'analyse des composés chimiques ou biologiques et de leurs interactions.² Cette méthode de détection repose sur les propriétés des électrons à l'interface d'un métal et d'un milieu diélectrique (par exemple un liquide contenant les molécules que l'on se propose d'étudier). L'excitation de ces électrons en présence d'un faisceau lumineux crée une onde électromagnétique que l'on appelle "plasmon de surface". L'étude des paramètres de son excitation (longueur d'onde, nature du métal, permittivités du métal et du diélectrique...) donne accès aux variations de l'indice de réfraction (n) du diélectrique. L'indice de réfraction permettra, par exemple, d'accéder à la concentration du produit étudié.

Différents dispositifs optiques ont été conçus pour créer la résonance plasmonique de surface. La configuration la plus répandue est celle proposée par Kretschmann.³ Celle-ci utilise un prisme triangulaire sur lequel l'interface métal/diélectrique est déposée. Actuellement, divers biocapteurs SPR commercialisés sont basés sur cette configuration (exemple : l'appareil Biacore® (General Electric) au début des années 90).^{4,5} Il existe une grande variété de biocapteurs SPR qui reposent sur différents concepts de la plasmonique. A titre d'exemple l'excitation des plasmons de surfaces localisés (Localised Surface Plasmon Resonance (LSPR)) à l'interface de nanoparticules métalliques.⁶ Les dispositifs SPR basés sur la résonance plasmonique par réseaux de diffraction a aussi connu un développement ces dernières années.⁷ Récemment, l'utilisation des structures qui transportent les plasmons de surfaces à longue portée (LRSP) représente une piste prometteuse dans le domaine de la détection des biomolécules non marquées.⁸ Ces exemples montrent la diversité des approches

offertes par l'étude des plasmons de surface qui font l'objet actuellement de nombreux travaux de recherche.

Lors de ce travail de thèse, un banc SPR en "goutte", basé sur la configuration de Kretschmann, a été développé. Ce banc a été initié durant la thèse de doctorat de Maxime Beaugeois (2007).⁹ Il nous a servi à étudier la réponse plasmonique de peptides histagués sur une lame d'argent couverte par un film fin de silicium amorphe carboné. D'autre part, sur le plan expérimental, un dispositif intégré sans prisme a été conçu et sa réponse plasmonique a été comparée à celle obtenue par le banc en "goutte". Finalement, une nouvelle stratégie de greffage de sucre "non modifié" a été développée et validée par plasmonique.

CHAPITRE I - *RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE: PRINCIPE ET APPLICATIONS*

I.1-La résonance de plasmon de surface (Principe physique)

La résonance plasmonique de surface, notée SPR, est un phénomène optique dans lequel la lumière interagit avec les électrons qui se trouvent à l'interface entre un métal et un diélectrique (par exemple un gaz ou un liquide). En 1902, R.W. Wood a observé ce phénomène pour la première fois sous la forme de bandes sombres et anormales dans le spectre de diffraction d'un réseau de diffraction métallique.¹⁰ En 1941, U. Fano a expliqué ce phénomène théoriquement en liant l'apparition de ces bandes sombres à l'excitation d'ondes guidées le long du réseau métallique (identifiés plus tard sous le nom d'ondes plasmoniques).¹¹ En 1968, simultanément, deux groupes A. Otto et E. Kretschmann ont montré deux configurations optiques de l'excitation des ondes plasmoniques par couplage à un prisme.^{3,12} En 1983, C. Nylander et B. Liedberg ont réalisé la première étude des interactions biomoléculaires par SPR, en analysant la reconnaissance anticorps/antigène sur une surface d'argent.²

Depuis, la résonance plasmonique a connu un développement rapide et important dans le domaine de l'analyse des processus biologiques et chimiques. Ces applications sont basées sur la variation de la réponse plasmonique qui est liée à un paramètre important : l'évolution de l'indice de réfraction du diélectrique étudié.

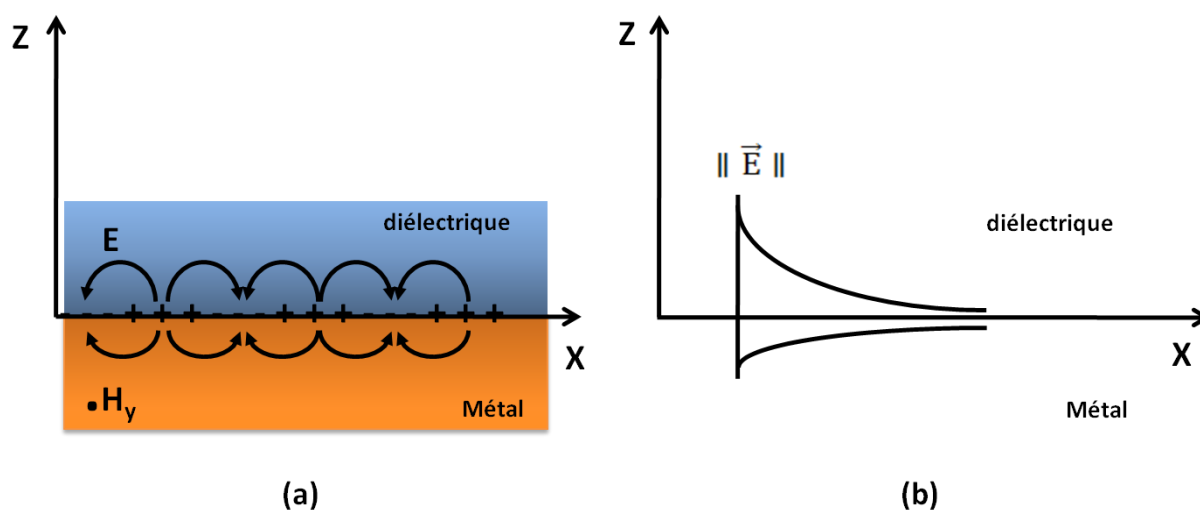


Figure 1 : (a) Schéma des plasmons de surface à l'interface métal/diélectrique, ayant un champ magnétique transversal (direction axe des Y) et un champ électrique perpendiculaire à la surface (dans le plan XZ). (b) La représentation de la décroissance exponentielle de l'amplitude du champ électrique suivant l'axe des X.

Le plasmon de surface (SP) est une onde électromagnétique, sous forme de densité de charge, oscillant à l'interface d'un métal/diélectrique.^{13,14} La Figure 1 représente l'onde SP avec un vecteur d'onde magnétique transversal $\vec{H}_y$. Tandis que le vecteur champ électrique $\vec{E}$ est perpendiculaire à l'interface et décroît exponentiellement de part et d'autre de celle-ci.

Afin de comprendre les conditions d'excitation des ondes plasmoniques par la lumière, nous allons introduire une description électromagnétique de celles-ci. La première condition est associée à la polarisation de l'onde électromagnétique EM. En effet l'excitation du déplacement de cette densité de charge ne peut s'effectuer que si l'orientation de l'onde EM est transverse magnétique TM, c'est à dire dans la même direction du déplacement que les ondes plasmoniques.

Nous cherchons maintenant des fonctions d'ondes, solutions des équations de Maxwell, qui se propagent parallèlement à l'interface entre les 2 milieux (Figure 1) et dont l'amplitude (axe des Z) décroît exponentiellement et perpendiculairement à celle-ci suivant l'axe des X.

L'équation de propagation d'une onde électromagnétique EM est définie par:

$$\Delta \vec{E} + k^2 \vec{E} = 0 \quad \text{Equation 1}$$

où $\vec{k}$ est le vecteur d'onde et $\vec{E}$ le champ électrique. D'après la Figure 1, comme nous venons de le préciser, ce champ a une amplitude selon l'axe des Z et une propagation selon l'axe des X, son expression est donnée par :

$$\vec{E} = \vec{e}(z)e^{ik_x x} \quad \text{Equation 2}$$

avec :

$$\vec{e}(z) = e_x(z)\vec{u}_x + e_z(z)\vec{u}_z \quad \text{Equation 3}$$

où e_x et e_z sont les composantes du champ électrique suivant l'axe des X (vecteur unitaire $\vec{u}_x$) et l'axe des Z (vecteur unitaire $\vec{u}_z$), respectivement. Ainsi en remplaçant l'expression du champ électrique (Equation 3) dans l'Equation 2, l'équation de la propagation de l'onde EM (Equation 1) selon la composante $e_x(z)$ devient :

$$\frac{\partial^2 e_x(z)}{\partial z^2} + (k^2 - k_x^2) e_x(z) = 0 \quad \text{Equation 4}$$

La résolution de cette équation différentielle du 2nd ordre a pour solution:

$$e_x(z) = \alpha e^{\sqrt{k_x^2 - k^2} z} + \beta e^{-\sqrt{k_x^2 - k^2} z} \quad \text{Equation 5}$$

La composante $e_z(z)$ est reliée à la composante $e_x(z)$ par l'expression suivante :

$$e_z(z) = -ik_x \int e_x(z) dz \quad \text{Equation 6}$$

Ainsi, les expressions des champs électriques dans le diélectrique et le métal seront définies par :

Dans le diélectrique ($z \rightarrow +\infty$):

$$e_x(z) = \beta_d e^{-\sqrt{k_x^2 - k^2} z} \text{ et } e_z(z) = ik_x \beta_d \frac{e^{-\sqrt{k_x^2 - k^2} z}}{\sqrt{k_x^2 - k^2}} \quad \text{Equation 7}$$

Dans le métal ($z \rightarrow -\infty$):

$$e_x(z) = \alpha_m e^{\sqrt{k_x^2 - k^2} z} \text{ et } e_z(z) = -ik_x \alpha_m \frac{e^{\sqrt{k_x^2 - k^2} z}}{\sqrt{k_x^2 - k^2}} \quad \text{Equation 8}$$

En tenant compte des relations de continuité des champs $e_x(z)$ et ϵe_z , à l'interface diélectrique/métal, on obtient pour $z = 0$:

$$\begin{cases} \beta_d = \alpha_m \\ ik_x \beta_d \frac{\epsilon_d}{\sqrt{k_x^2 - k^2}} = -ik_x \alpha_m \frac{\epsilon_m}{\sqrt{k_x^2 - k^2}} \end{cases} \quad \text{Equation 9}$$

En tenant compte des égalités de l'Equation 9 et en simplifiant, nous obtenons :

$$\frac{\epsilon_d}{\sqrt{k_x^2 - \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon_d}} = \frac{-\epsilon_m}{\sqrt{k_x^2 - \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon_m}} \quad \text{Equation 10}$$

Cette égalité définit la deuxième condition de l'existence d'un plasmon de surface (la première condition étant son existence en polarisation TM), qui est l'opposition des signes des permittivités ϵ_d et ϵ_m . D'où la nécessité d'avoir un métal dans l'un des deux milieux. La relation de dispersion d'un plasmon de surface est alors exprimée par :

$$k_x = k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad \text{Equation 11}$$

En effet, en appliquant le modèle de Drude, la fonction diélectrique du métal ϵ_m est donnée par :

$$\epsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad \text{Equation 12}$$

avec ω_p , la pulsation de plasma, qui est la fréquence des oscillations des charges électriques présentes dans les milieux conducteurs.

Etudions maintenant l'interaction de l'onde SP avec la lumière. Considérons une onde électromagnétique EM se propageant dans un diélectrique, la norme de son vecteur de propagation k_n est noté par :

$$k_n = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad \text{Equation 13}$$

D'après la Figure 2, pour une valeur de ω donnée, nous remarquons l'absence de l'interaction de la courbe de dispersion associée à l'onde EM (droite rouge) et celle associée au plasmon de surface (courbe bleue) (k_n est toujours inférieur à la constante de propagation du plasmon k_{sp}). Donc, il est impossible d'exciter le mode plasmon.

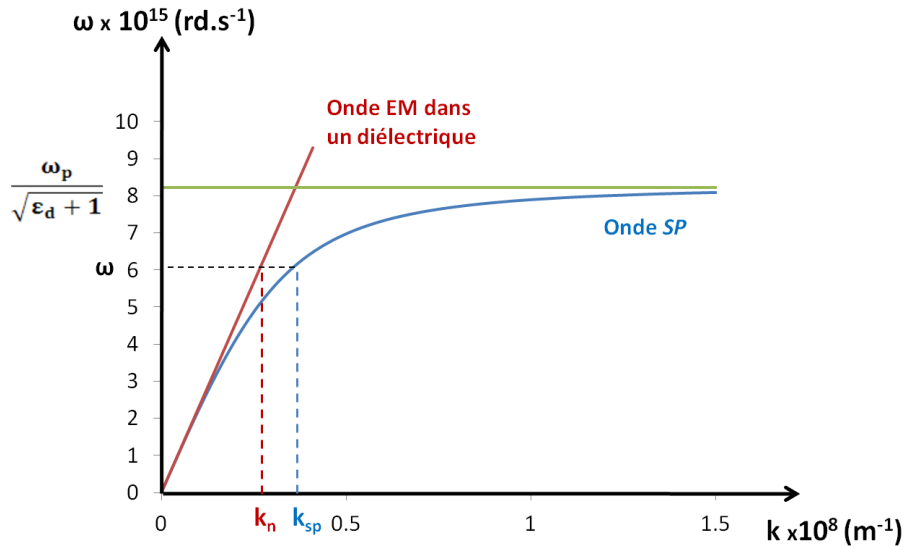


Figure 2 : La relation de dispersion d'une onde SP se propageant à l'interface d'un métal/diélectrique (courbe bleue) et la relation de dispersion d'une onde EM dans un diélectrique (droite rouge). Nous avons pris le cas de l'or comme métal et de l'eau comme diélectrique. Les constantes utilisées dans ce calcul sont : $\epsilon_d = 1.77$, $\omega_p = 13.71 \times 10^{15} \text{ rd.s}^{-1}$ et $c = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$. Sur la courbe de dispersion SP, la valeur limite de $\omega = 8.23 \times 10^{15} \text{ rd.s}^{-1}$.

Différentes configurations optiques ont été développées, pour réaliser le couplage plasmon de surface et onde électromagnétique : le couplage par prisme¹³, par réseau de diffraction¹⁵ ou par guide d'ondes.¹⁶

I.2- Excitation des plasmons de surface par couplage par prisme

En 1968, A. Otto¹² et parallèlement E. Kretschmann et H. Raether³ ont démontré théoriquement et expérimentalement la possibilité d'exciter un plasmon de surface *via* un prisme d'indice de réfraction n_p élevé (avec $n_p = \sqrt{\epsilon_p}$). Dans la configuration "Otto", le métal est séparé du prisme par un diélectrique (Figure 3 (a)). Tandis que dans la configuration "Kretschmann", le métal est directement déposé sur le prisme (Figure 3 (b)).

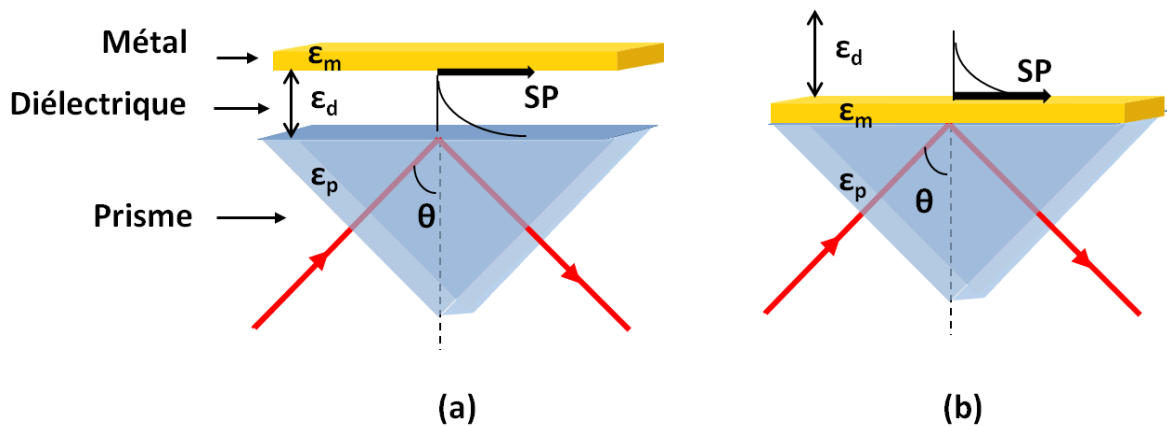


Figure 3 : Excitation d'un plasmon de surface SP par une onde évanescente résultant d'une réflexion totale interne dans un prisme traversé par une onde EM (faisceau rouge), selon (a) la configuration de Otto et (b) la configuration de Kretschmann.

Dans les deux cas, un faisceau lumineux de polarisation TM traverse un prisme sous un angle d'incidence θ à l'interface métal/prisme ou diélectrique/prisme, supérieur à l'angle critique θ_c , aussi appelé angle de réflexion totale. Au point d'incidence une onde évanescente est générée qui se propage parallèlement à la surface avec une amplitude exponentielle décroissante perpendiculairement à celle-ci.

La composante du vecteur d'onde, parallèle à l'interface, $k_{n\parallel}$ est donnée par la relation :

$$k_{n\parallel} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \sin \theta \quad \text{Equation 14}$$

Cette relation est représentée par la droite de dispersion de l'onde EM se propageant dans un prisme (Figure 4). L'excitation du plasmon est possible quand la norme du vecteur d'onde $k_{n\parallel}$ est égale à la norme du vecteur d'onde plasmon k_{sp} . Celle-ci est visualisée par l'intersection de cette droite avec la courbe de dispersion du mode plasmon (Equation 11), pour une pulsation ω (Figure 4). L'équation de couplage est représentée par :

$$\sqrt{\epsilon_p} \sin \theta = \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad \text{Equation 15}$$

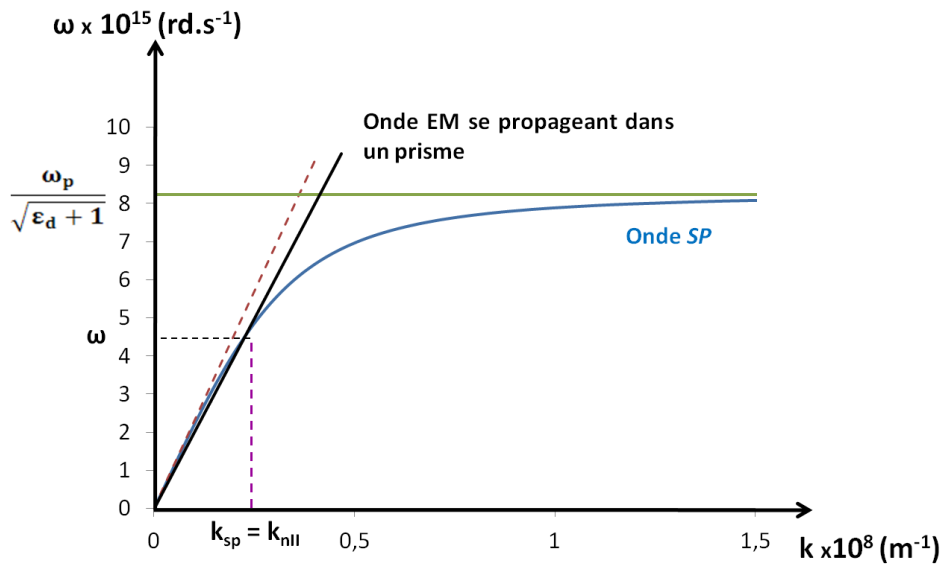


Figure 4 : La relation de dispersion d'une onde SP se propageant à l'interface d'un métal/diélectrique (courbe bleue) et la relation de dispersion d'une onde EM dans un prisme (droite noire). Nous avons pris le cas de l'or comme métal et de l'eau comme diélectrique.

Les constantes utilisées dans ce calcul sont : $\epsilon_d = 1.77$, $\omega_p = 13.71 \times 10^{15} \text{ rd.s}^{-1}$ ¹⁷ et $c = 3 \times 10^8 \text{ m. s}^{-1}$. L'angle d'incidence $\theta = 67^\circ$ et l'indice du prisme $n_p = \sqrt{\epsilon_p} = 1.64$.

Donc pour un angle d'incidence θ appelé "angle de résonance" θ_{sp} , où l'accord de phase est réalisé (Equation 15), l'onde évanescence créée à l'interface pénètre le métal (configuration de Kretschmann) ou le diélectrique (configuration de Otto), et le plasmon de surface est excité. Ce couplage onde évanescence et SP se manifeste par une diminution de

l'intensité dans le faisceau lumineux réfléchi (Figure 5(a)) qui se manifeste par un pic d'absorption (Figure 5 (b)).^{18,19} Une variation de l'indice de réfraction du milieu environnant Δn_d (avec $n_d = \sqrt{\epsilon_d}$) induit un déplacement du pic d'absorption qui sera visualisé par un détecteur optique. La cinétique de l'évolution de Δn_d est mesurée en enregistrant θ en fonction du temps (Figure 5 (c)).

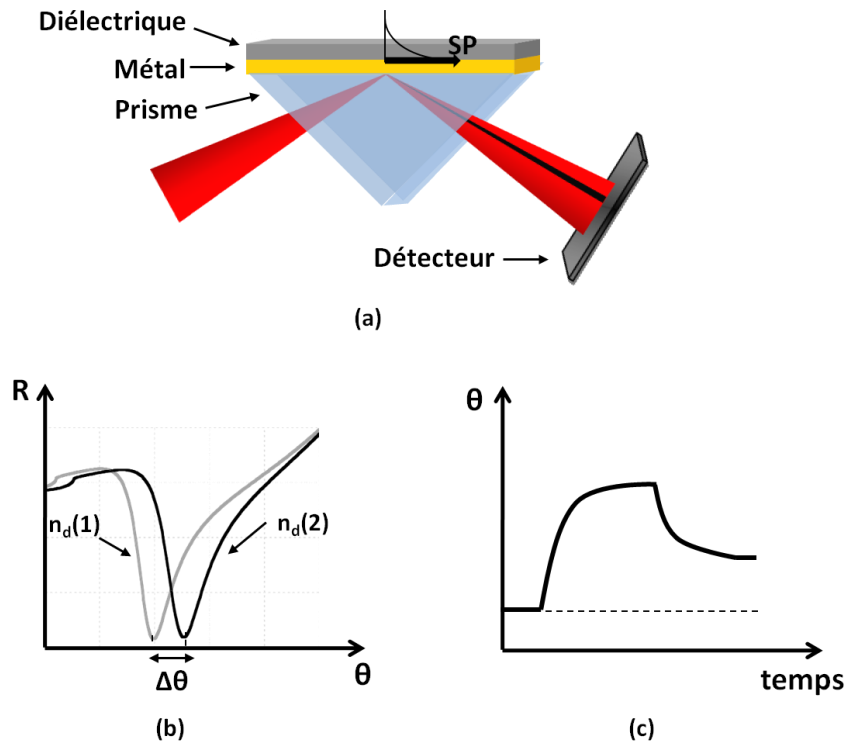


Figure 5 : (a) Schéma de principe de la détection de la résonance plasmonique (Kretschmann). (b) Mesure de la variation de l'indice de réfraction du diélectrique de $n_d(1)$ à $n_d(2)$ plus élevé. (c) Enregistrement de la cinétique de $\theta = f(t)$.

I.3- Les paramètres qui influent sur la résonance plasmonique

Dans les paragraphes qui précèdent, nous avons décrit les principes de base de l'excitation d'un plasmon de surface. Rappelons que le but est de mesurer la variation de l'indice de réfraction d'un diélectrique en fonction du déplacement angulaire $\Delta\theta$ (Figure 5).

Les développements tant théoriques qu'expérimentaux ont montré que de nombreux paramètres agissent sur la qualité des mesures. Dans ce paragraphe, nous allons décrire les principaux d'entre eux.

I.3.1- La nature du métal

Divers métaux peuvent être utilisés afin de répondre à la relation de couplage onde SP et onde EM (Equation 15). Les propriétés des films métalliques (épaisseurs de l'ordre de 50 nm) influent, par conséquence, sur l'aspect du signal plasmonique.²⁰ Parmi ces métaux, on peut citer: l'or (Au), l'argent (Ag), l'aluminium (Al), le cuivre (Cu), l'indium (In), etc. L'or est souvent employé dans la détection par SPR. Il possède une stabilité chimique dans les solutions aqueuses et une chimie de surface adaptée à différentes procédures de fonctionnalisation de surface en particulier pour les expériences de reconnaissance biomoléculaire par SPR (**paragraphe I.4.2**).²¹⁻²³ Cependant l'or n'est pas le meilleur choix en termes de sensibilité du capteur SPR. Dans cette approche, l'argent permet d'avoir un signal plasmonique plus étroit comparé à celui de l'or (Figure 6), d'où une meilleure sensibilité,²⁴ et il peut être fonctionnalisé d'une façon similaire à l'or. Le seul défaut de l'argent est qu'il est chimiquement instable (il s'oxyde rapidement) et ceci cause un signal plasmonique variable dans le temps. Par conséquent l'argent est moins utilisé dans la détection plasmonique.

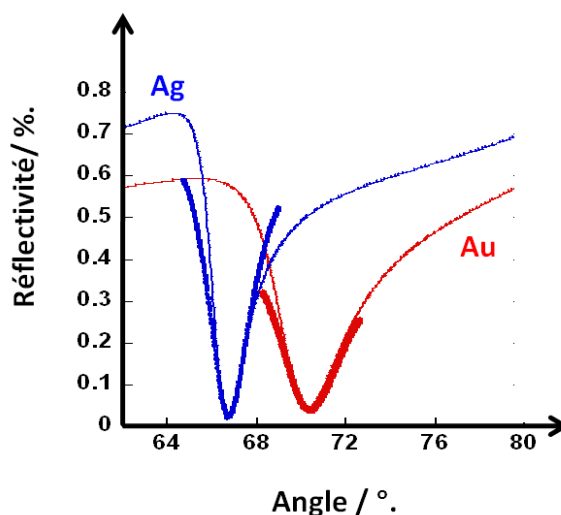


Figure 6 : Comparaison théorique (courbes en traits fins) et expérimental (courbes en traits gras) entre un signal SPR obtenu par un film Ti (5nm)/Ag (38 nm) et par un film Ti (5nm)/Au (50 nm) ; la longueur d'onde $\lambda = 670$ nm et les indices sont : $n_{\text{prisme}} = 1.510$, $n_{\text{Ti}} = 2.360 + i3.470$, $n_{\text{Ag}} = 0.140 + i4.581$, $n_{\text{Au}} = 0.197 + i3.670$ et $n_d = n_{\text{H}_2\text{O}} = 1.333$.

Une solution pour limiter l'oxydation de l'argent est de couvrir le film d'argent par une fine couche protectrice (5 à 10 nm), tout en conservant ses propriétés optiques. Une parmi plusieurs approches développées est celle de Zynio et coll. consiste à former un film bimétallique Ag/Au.²⁵ Elle associe l'avantage de la stabilité chimique de l'or et la meilleure résolution plasmonique de l'argent. Cette approche permet non seulement la protection de l'argent contre l'oxydation mais aussi l'augmentation de la sensibilité de la réponse plasmonique comparée à celle de l'or seul.²⁶

Une autre stratégie est de déposer des couches de diélectrique sur le film d'argent. Ceci a permis le développement de nouveaux protocoles de chimie de surface associés au type du diélectrique étudié tout en profitant d'une meilleure sensibilité plasmonique.²⁷ Les premiers dépôts utilisés sont des couches de silice SiO₂ sur de l'or. D'autres couches d'oxyde telles que les couches d'oxyde d'indium-étain ITO et d'oxyde d'étain SnO₂ ont été développés par Szunerits et coll.²⁸⁻³¹

D'autres approches consistent à utiliser des couches de carbone^{32,33} ou de silicium amorphe carboné a-Si_{1-x}C_x:H (x = 10 - 37 %).^{34,35} Par la technique PECVD en régime "basse puissance", les films a-Si_{1-x}C_x:H peuvent être déposés en couches minces. Leurs propriétés optiques peuvent être ajustées en faisant varier le taux de carbone (en modifiant la proportion de méthane dans le mélange [CH₄]/ {[CH₄] + [SiH₄]}).^{36,37} Dans la détection SPR, un dépôt de 5 nm de a-Si_{1-x}C_x:H, avec un pourcentage en carbone égale à 37%, sur une lame d'argent d'épaisseur 38 nm, a montré une sensibilité 2.8 fois plus importante qu'avec une lame d'or, et 2 fois plus élevée qu'avec une lame d'argent.³⁴ Dans le **chapitre III**, nous utilisons cette surface pour le suivi des interactions peptides histagués avec les ions cuivriques, par résonance plasmonique.

Il faut noter que l'épaisseur de la couche métallique est aussi un paramètre important qui influe sur la réponse plasmonique. Ekgasit et coll. ont montré que pour une longueur d'onde de 633 nm et pour une fonction diélectrique de l'or ϵ_{or} , il existe une épaisseur optimale égale à 45 nm pour laquelle la résonance plasmonique ainsi que la sensibilité sont optimisées.³⁸ Dans cette approche, E. Fontana a calculé numériquement les épaisseurs optimales pour différents métaux (Au, Ag, Al, Cu) à des longueurs d'onde comprises entre 400 à 1000 nm.³⁹ Par exemple, pour une longueur d'onde égale 670 nm, les épaisseurs optimales des films d'or ou d'argent sont respectivement de 50 nm et 38 nm.

I.3.2- Le choix de la longueur d'onde

La résonance plasmonique est détectée par une diminution de l'intensité du faisceau réfléchi à l'angle de résonance θ_{sp} (Figure 5). La valeur de cet angle et la forme du signal plasmonique varient avec le choix de la longueur d'onde λ . Dans la Figure 7, on observe que l'augmentation de la longueur d'onde se traduit par une diminution de la largeur à mi-hauteur (FWHM) du signal obtenu par une goutte d'eau déposée sur un film d'or ou d'argent d'épaisseurs égales respectivement à 50 nm et 38 nm. Ceci induit une amélioration de la sensibilité (signal plus étroit et donc une meilleure détermination de θ_{sp}).

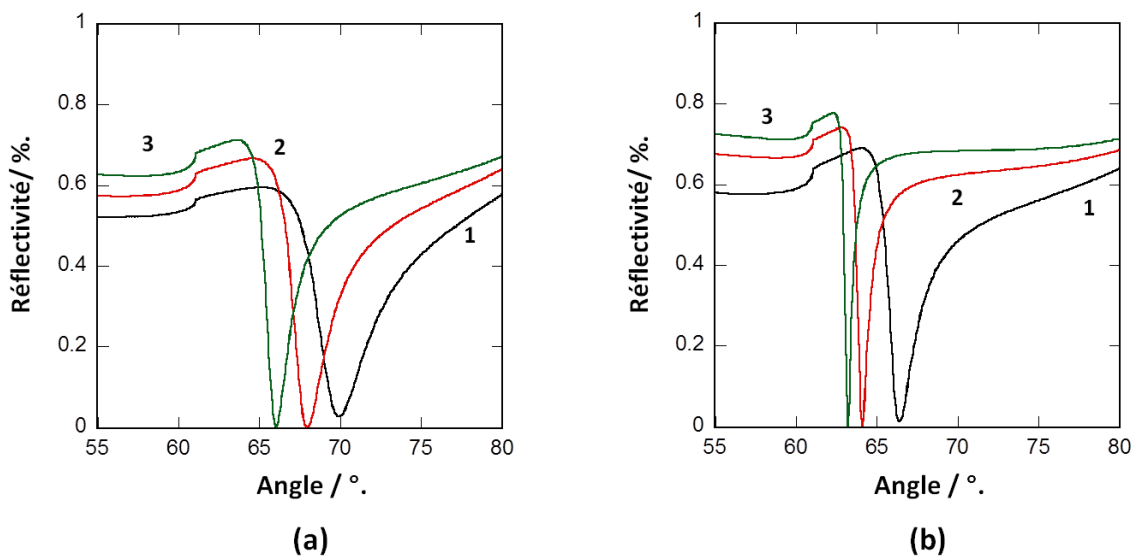


Figure 7 : Evolution du signal SPR d'une goutte d'eau ($n_d = 1.33$) déposée sur un film : (a) d'or et (b) d'argent d'épaisseur égale à 50 nm et 38 nm respectivement à des longueurs d'onde égales à (1) 670 nm, (2) 760 nm et (3) 850 nm.

Une autre caractéristique importante est la détermination de la profondeur de pénétration du champ électrique $\vec{E}$ selon l'axe des Z perpendiculaire à l'interface métal/diélectrique (Figure 1) qui dépend principalement de la longueur d'onde λ du faisceau incident. Cette information est contenue dans la partie imaginaire du champ (Equation 7). Cette fonction étant une exponentielle décroissante, la référence sera la "distance d'atténuation" qui correspond à la valeur pour laquelle l'amplitude du champ a diminué de $1/e$.

En égalant la partie exponentielle de l'expression $\mathbf{e}_z(\mathbf{z})$ de l'Equation 7 à $1/e$, on obtient :

$$|z_d| = \frac{1}{\sqrt{k_x^2 - k_n^2}} \quad \text{Equation 16}$$

En remplaçant k_x et k_n par leurs expressions (Equation 11 et Equation 13) on obtient :

$$z_d = \frac{c}{\omega} \sqrt{\frac{\epsilon_d + \epsilon_m}{\epsilon_d^2}} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{\epsilon_d + \epsilon_m}{\epsilon_d^2}} \quad \text{Equation 17}$$

puisque à la résonance, $\omega = 2\pi c/\lambda$, λ étant la longueur d'onde du faisceau incident. La Figure 8 est un exemple de la variation de Z_d en fonction de la longueur d'onde λ dans le cas de l'or comme surface métallique et l'eau comme diélectrique.

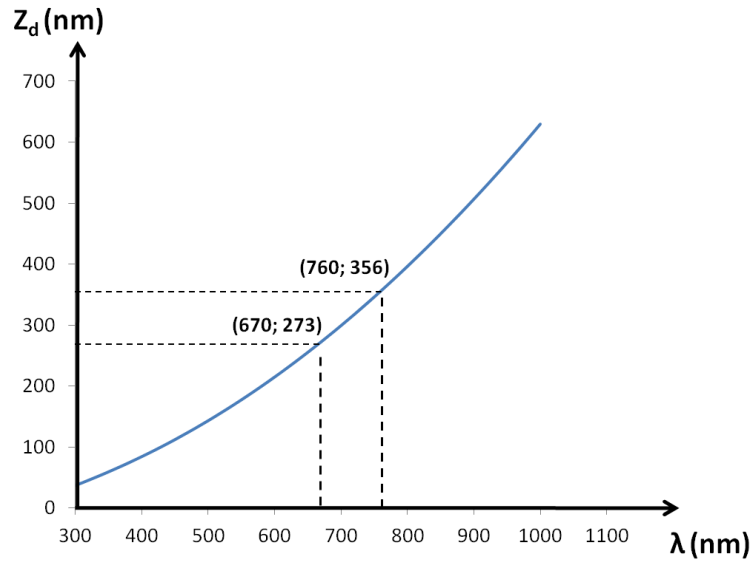


Figure 8 : La distance de pénétration du champ dans le diélectrique suivant Z en fonction de la longueur d'onde λ du faisceau incident à l'interface Or/eau. Les constantes utilisées dans ce calcul sont : $\epsilon_d = 1.77$, $\omega_p = 13.71 \times 10^{15} \text{ rd.s}^{-1}$ et $c = 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$.

Durant la thèse, le banc optique utilisé est équipé d'un laser à colorant accordable en longueur d'onde (620-780 nm). Nous avons choisi la longueur d'onde $\lambda = 760 \text{ nm}$, ce qui permettra de bénéficier d'un signal plasmonique étroit (Figure 7) et d'une distance de pénétration $Z_d \cong 360 \text{ nm}$. Alors que l'appareil commercial "Autolab" est équipé d'un laser à longueur d'onde fixe $\lambda = 670 \text{ nm}$, donc une distance de pénétration $Z_d \cong 273 \text{ nm}$.

I.4- Le principe de la détection de l'interaction biomoléculaire par SPR

L'usage des capteurs basés sur la résonance plasmonique, s'étend au début des années 1980 avec la mesure de la concentration des gaz.⁴⁰ Depuis les capteurs SPR ont connu un développement important, dans la détection et la mesure de grandeurs physique et chimique,⁴¹⁻⁴³ en particulier dans les études des interactions biomoléculaires.^{2,44} Au début des années 1990, apparaissent les premiers dispositifs commerciaux.^{4,5}

Afin d'étudier les interactions biomoléculaires par SPR, un récepteur ou "ligand" est immobilisé sur la surface métallique et une molécule cible ou "analyte" constitue le milieu environnant (Figure 9). L'association ou la dissociation du complexe analyte-ligand produit une variation dans l'indice de réfraction du diélectrique qui induit un déplacement angulaire du pic d'absorption $\Delta\theta$ (Figure 5(b)). L'enregistrement du déplacement de l'angle de résonance en fonction du temps permet de suivre l'interaction entre la molécule cible et le récepteur et de déterminer les paramètres cinétiques tel que la constante d'association (K_A) et de dissociation (K_D). Parmi les interactions biomoléculaires étudiées par les biocapteurs SPR : la reconnaissance anticorps-antigène,⁴⁵⁻⁴⁷ l'interaction protéine ou peptide-protéine,⁴⁸⁻⁵⁰ l'immobilisation des brins d'ADN,^{35,51-55} la détection de l'activité cellulaire...⁵⁶⁻⁵⁸

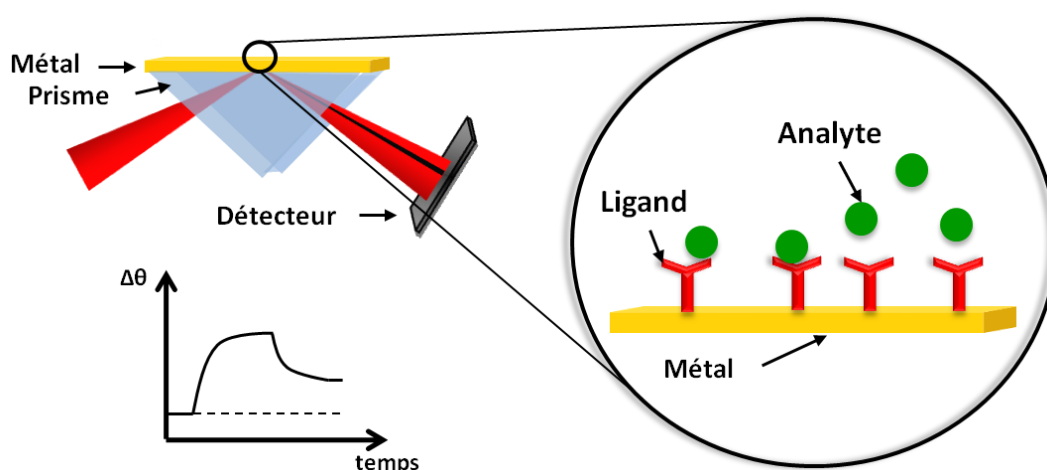


Figure 9 : Schéma du principe de détection des interactions biomoléculaires "ligand-analyte" par le capteur SPR. L'évolution de l'interaction entre la molécule cible et le récepteur est mise en évidence par la cinétique ($\theta = f(t)$).

Un intérêt important de l'utilisation des biocapteurs SPR est l'absence de marquage des molécules cibles. En effet l'utilisation d'une molécule cible modifiée par un fluorophore, comme dans une détection par fluorescence, nécessite un travail de synthèse long et sophistiqué. D'autre part, l'addition d'un marqueur peut déformer la conformation spatiale de la molécule et/ou bloquer son site actif. Ainsi la détection par SPR présente l'avantage de suivre la cinétique de la perturbation locale de l'indice de réfraction du diélectrique provoquée par l'association et la dissociation d'un complexe ligand-analyte non marqué.

I.4.1- Différents systèmes de transport d'analyte

Il existe différentes méthodes pour mettre en contact les molécules cibles sur la surface métallique (sur laquelle le ligand est immobilisé) du biocapteur SPR. Les principales sont : les méthodes basées sur la microfluidique, les dépôts statiques, les dépôts en goutte et les ondes acoustiques de surface (SAW).⁵⁹

Dans le système microfluidique, la cellule de mesure (la zone où l'interaction analyte-ligand se produit) est constituée d'un ou plusieurs microcanaux qui assurent le transport du fluide appelé "solution tampon" contenant les analytes. Le contrôle du flux est opéré par le réglage de la pression de l'air à l'entrée et à la sortie des canaux. Plusieurs capteurs SPR utilisent cette distribution dynamique, comme par exemple l'appareil commercial Biacore conçu au début des années 90.^{4,5} La récente version "Biacore 3000" utilise une cellule de mesure à 4 microcanaux (Figure 10).

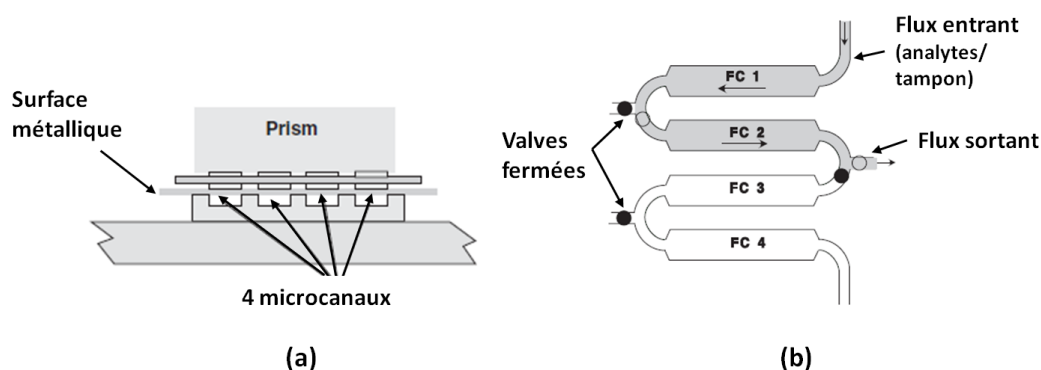


Figure 10 : (a) La représentation du système microfluidique à 4 microcanaux de l'appareil commercial "Biacore 3000". (b) Schéma simplifié du guidage du flux analytes/tampon dans les cellules (FC1, FC2, FC3 et FC4) du système microfluidique.⁶⁰

Dans la méthode statique, le liquide (tampon contenant les analytes) est injecté dans une cuvette en contact direct avec la surface métallique sur laquelle le ligand est immobilisé. L'injection est effectuée par une micropipette automatiquement ou manuellement (Figure 11). Dans cette configuration, en absence d'écoulement sous pression, le mouvement des molécules cibles se fait par diffusion, donc le temps de l'incubation est, contrairement au système microfluidique, indépendant du volume et du débit. Cependant, la durée de la réaction analyte-ligand dépend du temps de la diffusion des molécules (vers la surface) qui est relativement lent. De plus l'étape de rinçage est plus ou moins compliquée puisqu'elle nécessite des injections et des prélèvements du tampon à plusieurs reprises.

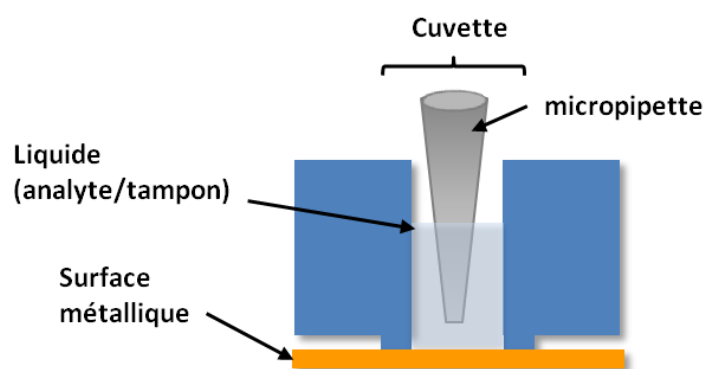


Figure 11 : Représentation schématique du système à cuvette.

Parmi les appareils commerciaux qui emploient cette technique, l'appareil "Autolab", utilisé durant ce travail de thèse. La cuvette de cet appareil est aussi équipée d'électrodes électrochimiques, ce qui nous a permis de réaliser simultanément des mesures plasmoniques et voltampérométrie cycliques (**chapitres III et IV**).

Une autre configuration que nous avons aussi utilisée est la configuration en goutte. Dans cette méthode, le liquide est déposé, par une micropipette, directement sur la couche métallique (où les molécules réceptrices sont greffées) (Figure 12). C'est la méthode la plus simple puisqu'elle ne sollicite pas l'emploi d'un matériel spécifique. Le petit volume de la goutte (de 2 à 10 μl) réduit le temps de réaction des analytes avec les ligands. De plus l'utilisation de faibles quantités de produits à injecter permet de réduire le coût des substances onéreuses. Ce dispositif offre la possibilité d'étudier plusieurs gouttes en même temps. Cette configuration "multispots" sera détaillée au **chapitre II**.

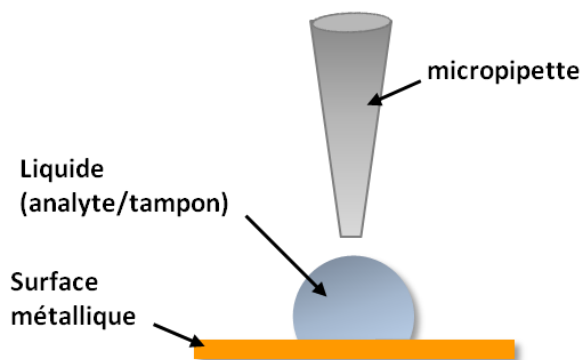


Figure 12 : Représentation schématique du système en goutte.

Galopin et coll. ont montré l'intérêt du couplage SAW-SPR en configuration "goutte" pour accélérer le processus de diffusion des molécules cibles vers l'interface métallique. Cette technique de microfluidique discrète permet de créer un mouvement à l'intérieur des gouttes ce qui induit une accélération de l'interaction entre le liquide à analyser et les surfaces SPR actives.⁶¹

I.4.2- Les procédures d'immobilisation des ligands sur les surfaces SPR

Dans le paragraphe précédent, nous avons exposé les moyens de déposer les analytes (brins d'ADN complémentaires, antigènes, protéines,...) à la surface SPR où les ligands sont immobilisés. Dans ce paragraphe, nous présentons différents concepts de chimie de surface utilisés pour fixer les biorécepteurs sur les surfaces SPR. A noter que la chimie de surface doit être conçue de façon à immobiliser une quantité suffisante de molécules réceptrices en gardant leurs sites actifs (sites où l'interaction analyte/récepteur se produit) accessibles, et en minimisant les adsorptions non spécifiques.

Le substrat le plus utilisé et commercialisé est la lame "CM5" de Biacore qui utilise une couche de carboxyméthyle dextrane (environ 100 nm d'épaisseur) sur un film d'or (Figure 13). Ce modèle développé par Lofas et Johansson en 1990,⁶² connu aussi sous le nom de l'immobilisation en "3D", permet de multiplier le nombre des sites actifs et fournit un meilleur environnement pour le stockage des molécules immobilisées pendant une longue durée.⁶³ Selon la nature du groupement fonctionnel des biomolécules (amine, thiols, aldéhyde), il existe différentes méthodes d'immobilisation covalente des biorécepteurs sur ces types de surface.⁶⁴

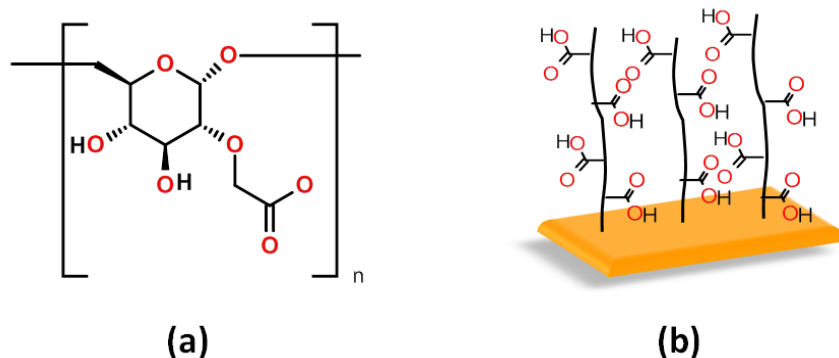


Figure 13 : (a) Structure du carboxyméthyle dextrane ; (b) Schéma symbolique de la lame Biacore "CM5".

Pour le modèle en "2D", les monocouches auto-assemblées SAM de thiols, formées sur différents métaux (Au, Ag, Cu,...) (Figure 14), sont les plus souvent utilisées pour l'immobilisation des ligands.^{65,66} Un thiol est un composé organique comportant un groupement sulfhydryle (-SH) lié à un atome de carbone. Grâce à son attachement direct et fort à la surface métallique (via la liaison métal-soufre), la formation de ces monocouches auto-assemblées présente un intérêt dans l'immobilisation des biomolécules réceptrices (protéines, ADN,...) à la surface métallique.⁶⁶ Dans cette approche, il existe deux façons pour immobiliser les biomolécules. La première consiste à synthétiser la molécule à greffer avec un groupement alcanethiol.⁶⁷⁻⁷⁰ Cette méthode demande un effort de synthèse surtout pour des biomolécules à structures complexes et peut affecter l'arrangement de la monocouche SAM. Nelson et coll. et Peeters et coll. ont montré l'efficacité d'un mélange de thiols (longues et courtes chaînes d'alcanethiol) pour la formation de SAM mieux définies.^{71,72} La deuxième méthode consiste à attacher des chaînes carbonées à la surface et ensuite à fixer les ligands à l'autre extrémité des chaînes. Cette extrémité peut être modifiée avec des groupements fonctionnels comme par exemple les groupements carboxyles (-COOH) du thiol acide 11-mercaptoundecanoïque (Figure 14) ou les terminaisons amine (-NH₂) du thiol amino 1-undécanoïque. Ce qui permet d'avoir une diversité de protocoles de fonctionnalisation afin d'immobiliser différents types de biomolécules.⁷³⁻⁷⁶

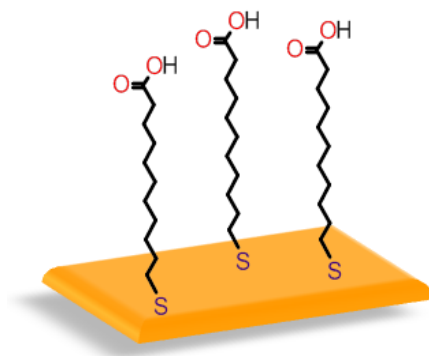


Figure 14 : Schéma d'une surface d'or recouverte par une monocouche de l'acide 11-mercaptopundecanoïque.

Récemment de nouvelles architectures en "2D" liées à la modification chimique des surfaces SPR à multicouches ont été proposées (**paragraphe I.3.1**). Parmi ces surfaces, nous nous sommes intéressés aux surfaces d'or couvertes par une fine couche d'oxyde de silicium Au/SiO_x par PECVD.⁷⁷ Afin de greffer les biomolécules, la fonctionnalisation de la surface Au/SiO_x se base sur la chimie de surface des silanes.⁷⁸ Les silanes sont composés d'un atome de silicium lié à trois groupements R ($\text{R} = \text{OCH}_3, \text{OC}_2\text{H}_5, \dots$) et à une chaîne carbonée terminée par un groupement fonctionnel. En utilisant par exemple, le groupement amine du silane aminopropyltriethoxysilane (APTMS) (Figure 15 (a)), des brins d'oligonucléotides peuvent être greffés sur les substrat SPR.⁷⁹ Cette chimie de surface nous a servis dans le greffage des sucres (mannose, lactose) pour étudier la cinétique de leurs interactions avec des lectines : *Lens culinaris* (LC) et *Peanut agglutinin* (PNA) (**Chapitre IV**).

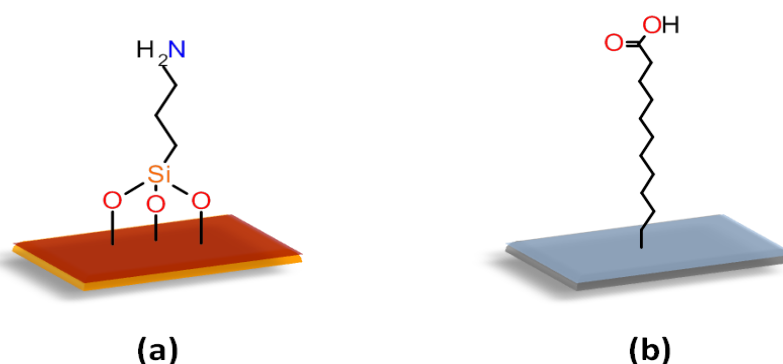


Figure 15 : Schéma de la modification chimique des surfaces SPR hybrides. (a) Surface Au/SiO_x avec une terminaison amine, et (b) surface $\text{Ag/ } a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ avec une terminaison acide.

Les surfaces d'argent couvertes par un film de silicium amorphe carboné $\text{Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ présentent un intérêt important dans l'amélioration de la sensibilité d'un capteur SPR ainsi que dans le greffage des ligands. L'accrochage covalent et stable des biorécepteurs repose sur l'utilisation de la forte liaison Si-C.⁸⁰⁻⁸³ A titre d'exemple, en vue d'étudier la réaction d'hybridation, Touahir et coll. ont modifié les surfaces $\text{Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ hydrogénées par des groupements carboxyles (Figure 15 (b)) pour immobiliser des brins d'ADN.³⁵ Dans le Chapitre III de ce manuscrit nous utilisons ces surfaces pour le suivi de la réaction peptides histidinylés et ions métalliques.⁸⁴

Dernièrement, les nouvelles surfaces hybrides "métal/graphène" (Figure 16) ouvrent des pistes prometteuses dans le domaine de la biodétection grâce à la structure moléculaire du graphène. En effet les interactions π - π créées entre les cellules hexagonales du graphène et les structures aromatiques, présentes dans les molécules biologiques, permettent le greffage des molécules réceptrices en une seule étape.⁸⁵⁻⁸⁷ Feng et coll. et Hu et coll. ont fonctionnalisé les couches de graphène pour la détection des cellules cancérigènes et l'étude de l'hybridation, respectivement.^{88,89}

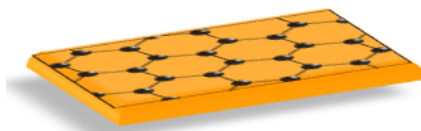


Figure 16 : Représentation schématique d'une surface métallique d'or couverte par un film de graphène.

I.5- Sensibilité et Résolution

La sensibilité S est un paramètre très important pour étudier la performance d'un capteur SPR. Elle est définie comme étant le rapport entre la variation de la réponse plasmonique (le déplacement angulaire $\Delta\theta_{sp}$ du signal plasmonique) et la variation de l'indice de réfraction du diélectrique Δn_d (Figure 17 (a)):

$$S = \frac{\Delta\theta_{sp}}{\Delta n_d} \quad \text{Equation 18}$$

Cependant pour mieux évaluer la sensibilité de détection, il est nécessaire de prendre en considération un autre paramètre : la largeur à mi-hauteur du signal SPR notée FWHM. Celle-ci augmente avec la valeur de l'indice de réfraction du diélectrique (n_d), induisant un signal SPR plus large. En divisant la valeur de S par le FWHM, nous introduisons la notion du Facteur de Mérite "Figure of Merit" FOM, un facteur utilisé pour analyser, globalement, les performances d'un capteur SPR (Figure 17 (b)):

$$\text{FOM} = \frac{S}{\text{FWHM}} \quad \text{Equation 19}$$

Ainsi, pour une même variation Δn_d , si le FOM est élevé cela indique un déplacement angulaire important du signal ou un signal plasmonique plus étroit (moins d'erreur dans la détermination de l'angle de résonance). Dans les deux cas cela se traduit par une meilleure performance du capteur.

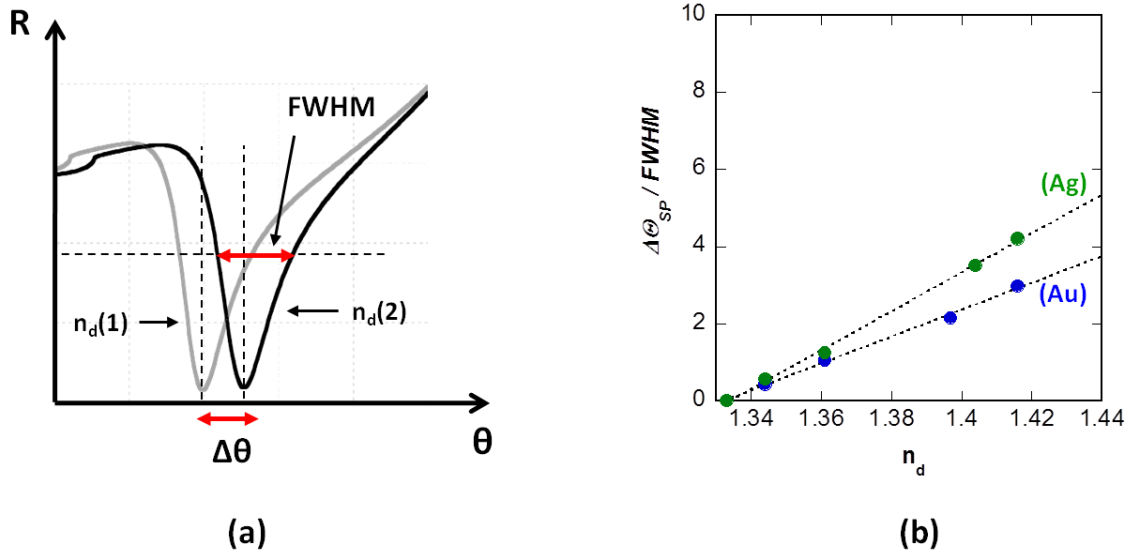


Figure 17 : (a) Déplacement du signal SPR avec un changement de l'indice du diélectrique de $n_d(1) = 1.33$ à $n_d(2) = 1.35$. La surface métallique utilisée est un film d'or de 50 nm d'épaisseur ($n_{Au} = 0.197 + i3.670$) et la longueur d'onde $\lambda = 670$ nm. (b) La variation du rapport $\Delta\theta/\text{FWHM}$ en fonction de l'indice de réfraction n_d de différents diélectriques déposés sur une lame : Au (bleu) et Ag (vert).

La résolution correspond à la détection d'une faible variation de l'indice de réfraction Δn_d par un déplacement visible de l'angle de résonance θ_{sp} du signal plasmonique. Ce paramètre est déterminé par la mesure de la limite de détection LOD, exprimée par :

$$LOD = \frac{(\Delta\theta_{sp})_{\min}}{S} \quad \text{Equation 20}$$

$(\Delta\theta_{sp})_{\min}$ est la variation angulaire minimale de l'angle de résonance (souvent égale à la valeur du niveau du bruit du capteur) et S la sensibilité angulaire exprimée dans l'Equation 18.

En termes de sensibilité, différentes approches ont été développées afin d'améliorer la qualité de la réponse plasmonique. Une approche, que nous avons abordée antérieurement dans le **paragraphe I.3.1**, consiste à utiliser des surfaces SPR "hybrides" : bimétalliques ou métal/diélectrique. Ces surfaces, pour une épaisseur bien déterminée, ont montré une extension de l'intensité du champ évanescent dans le diélectrique (Figure 1 (b)). Ceci permet une meilleure détection des analytes en particulier les biomolécules de grandes dimensions.^{26,90-92} Récemment Verma et coll. ont montré numériquement que l'utilisation des multicouches de silicium et de graphène sur une lame d'or augmente considérablement la sensibilité d'un biocapteur SPR.⁹³

CHAPITRE II- *AMELIORATION DU BANC SPR EN CONFIGURATION "GOUTTE"*

II.1- Introduction

Depuis le début des années 80, le couplage par prisme en utilisant la configuration de Kretschmann est la configuration la plus utilisée pour l'excitation des plasmons de surface par la lumière.² Différents concepts de mise en contact surface métallique/diélectrique ont été développés et adaptés à cette configuration: le système microfluidique, le système statique, et le système en goutte.

La technique en goutte est la technique la plus simple puisqu'elle ne demande pas de matériel sophistiqué ni de grandes quantités d'analytes (molécules cibles) durant le suivi de la reconnaissance biologique par la méthode SPR. Dans cette approche, un banc SPR en "goutte" a été développé durant la thèse de Maxime Beaugois au Laboratoire Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM).

Dans ce chapitre, nous présentons les tests de reproductibilité et d'étalonnage réalisés afin de valider la réponse plasmonique de ce montage en "goutte". Nous montrons les différentes modifications apportées au montage pour l'adapter à un dispositif intégré sans prisme développé dans le projet européen Interreg IV PLASMOBIO.

II.2- Historique du Banc

Le banc optique SPR en configuration "goutte", schématisé dans la Figure 18, a été initié durant la thèse de doctorat de Maxime Beaugois.⁹

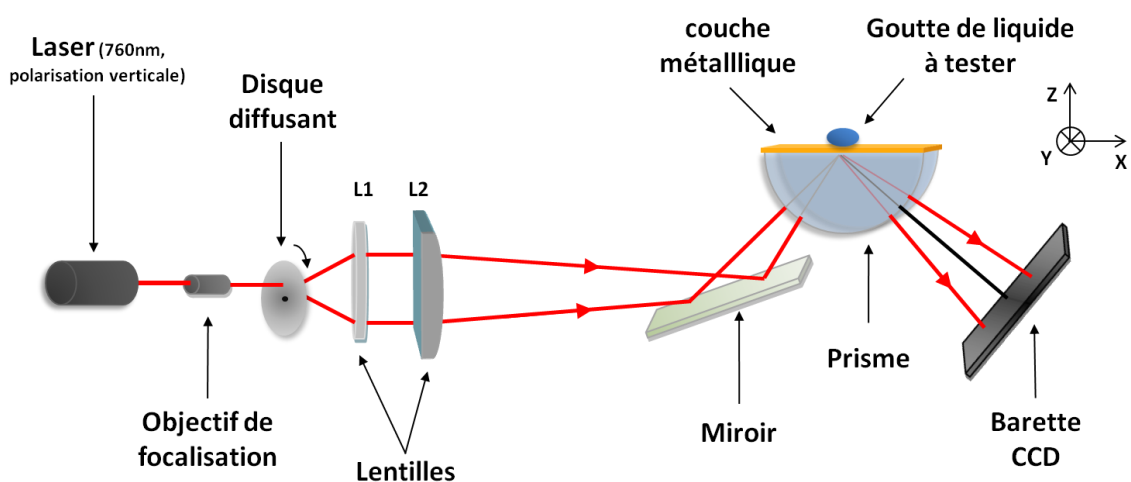


Figure 18 : Schéma du banc optique SPR en configuration de monogoutte.

Dans ce schéma qui utilise la configuration de Kretschmann, le système est composé d'une couche métallique (Au, Ag,...) et d'un prisme hémicylindrique ($n_p = 1.64$) d'épaisseur 2.5 cm et de rayon 2 cm. L'avantage de l'emploi d'un prisme hémicylindrique est l'obtention d'un faisceau incident non dévié lors de sa réfraction sur le dioptre air/prisme, pour autant que le faisceau lumineux reste confondu avec un rayon du demi-cylindre.

D'un point de vue pratique, le métal n'est pas déposé directement sur le prisme mais sur une lame de verre. Pour éviter les interférences créées par une lame d'air entre le prisme et la lame de verre, une goutte de "liquide d'indice" assure la continuité optique. L'ensemble prisme + lame dorée est fixé sur une platine de rotation "Newport PR50" motorisée. Un logiciel adapté fait tourner le demi-cylindre autour de son axe (axe Y). L'intérêt de cette platine sera détaillé dans le **paragraphe II.3.1**.

Nous disposons d'un laser à colorant polarisé TM (suivant l'axe Z) qui émet dans le rouge ($\lambda = 760$ nm). L'utilisation de cette longueur d'onde permet d'avoir un signal plasmonique plus étroit (voir Figure 7). La puissance du laser peut atteindre 200 mW. Une telle puissance n'est en général pas nécessaire pour les expériences plasmoniques, mais elle se révélera utile dans certaines configurations comme nous le verrons dans la suite de ce travail (**paragraphe II.4**). Le faisceau lumineux traverse un objectif de microscope (x8) qui le focalise en un point sur un disque diffusant en plastique pour éviter le speckle. Ce point sera considéré comme la source lumineuse du banc (50 mW), il est placé au foyer de la lentille sphérique L1 ($f = 20$ cm) pour obtenir un faisceau de lumière parallèle.

Suivant le type d'expériences réalisées, la lentille L2 est une lentille sphérique ou cylindrique ($f = 15$ cm) qui focalise le faisceau lumineux sur l'interface métal/diélectrique soit en un point (lentille sphérique), soit selon un trait (lentille cylindrique) de 2.5 cm de long suivant l'axe des Y. Nous avons constaté que la polarisation verticale de la lumière du laser est parfaitement conservée, ce qui nous dispense de l'utilisation d'un polariseur.

L'intérêt du montage utilisant une lentille cylindrique est de permettre l'observation simultanée de plusieurs signaux plasmoniques, en plaçant 2 à 4 gouttes sur le trait lumineux.

Initialement, le système de détection était constitué de deux barrettes CCD (SONY ILX554B) (Figure 19). Des filtres neutres et un polariseur permettent d'adapter la luminosité du signal à la sensibilité des barrettes. Le signal est envoyé sur un oscilloscope numérique, lui-même connecté à un ordinateur. Le suivi de la variation du signal plasmonique est traité par le logiciel Labview.⁶¹

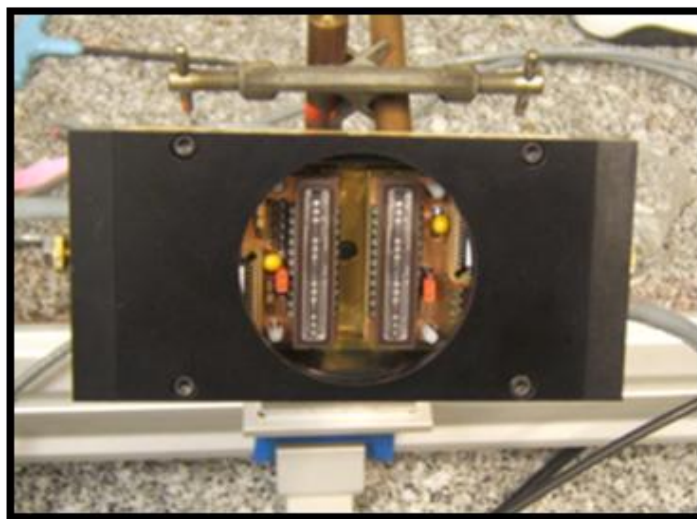


Figure 19 : Photo du système de détection à 2 barrettes CCD.

II.3- Perfectionnement du banc

La conception "ouverte" de ce banc le rend adaptable aux différents montages étudiés dans le projet européen PLASMOBIO (2009-2012) : déplacement des gouttes de diélectriques par électromouillage,⁵⁹ validation de nouveaux dispositifs intégrés pouvant déboucher sur une application industrielle (lame à 2 réseaux), mesures SPR "multispots". En parallèle, il était indispensable de valider quantitativement ce banc par comparaison aux appareils commerciaux et en particulier au "Biacore 3000" qui sert de référence dans le domaine de la plasmonique.^{4,5}

II.3.1- Validation quantitative : reproductibilité et étalonnage

Le dépôt direct des gouttes des liquides sur la lame dorée ne permet pas de garantir la reproductibilité des signaux. Un dispositif simple consistant en deux cuvettes de téflon dotées chacune d'une ouverture de 2 mm de diamètre a été réalisé (Figure 20 (a)). Une fois mis en place, ce système simplifie les réglages optiques, assure une localisation précise du point d'interaction entre la lumière et le liquide tout en gardant une surface de contact uniforme avec le métal (Figure 20 (b)). En outre, le confinement du liquide dans la cuvette réduit les phénomènes d'évaporation "à l'air libre" qui modifient la concentration des solutions analytes/tampon de très faibles volumes (2 à 5 μ l). Suivant le système de détection (2 barrettes CCD ou caméra), le dispositif en téflon est constitué de 2 ou 4 cuvettes (Figure 20 (c)).

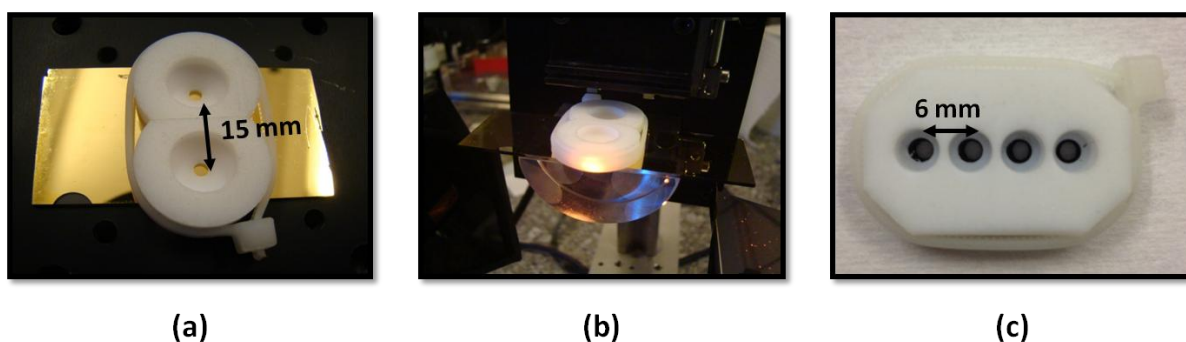


Figure 20 : Dispositif assurant la reproductibilité de la position des gouttes de référence et du liquide étudié : (a) détail des cuvettes de téflon à 2 spots, (b) cuvettes montées sur le système prime/substrat Au et (c) détail des cuvettes de téflon à 4 spots.

Pour valider ce dispositif, nous avons réalisé des tests de reproductibilité. Ces tests consistent à faire varier la concentration d'une solution et à enregistrer la cinétique associée. La Figure 21 montre un exemple utilisant 3 concentrations du tampon "HEPES Buffer Saline" (HBS) dilué dans de l'eau. L'enregistrement du signal plasmonique de l'eau pure (2^{ème} cuvette) permet de contrôler l'environnement physique.

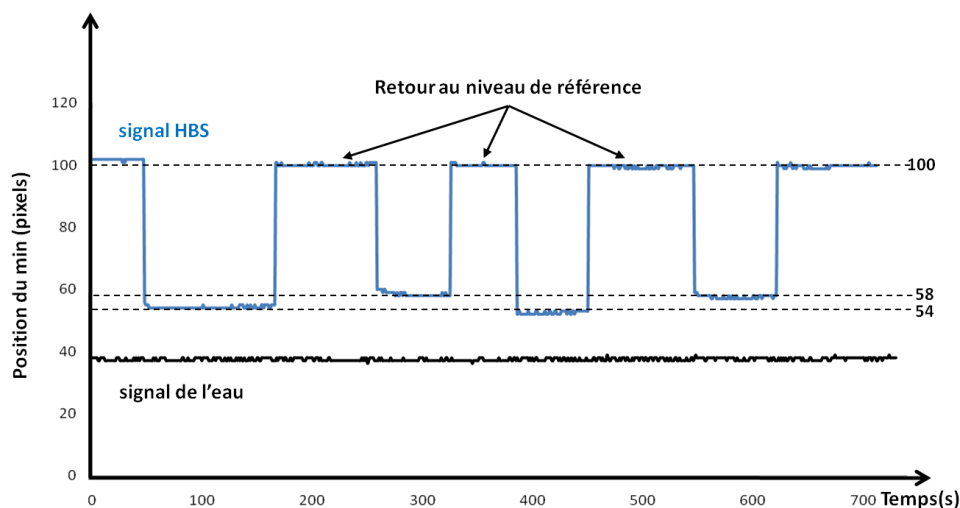


Figure 21 : Test de reproductibilité des mesures réalisé en utilisant le dispositif à 2 cuvettes de la Figure 20 pour 3 concentrations arbitraires de HBS. Le signal de l'eau permet de s'assurer que les paramètres physiques (stabilité du laser, température,...) n'influencent pas sur la stabilité du signal plasmonique.

La reproductibilité des mesures étant maintenant assurée, nous avons étudié la réponse plasmonique en fonction de différentes concentrations bien déterminées du tampon HBS (0%, 25%, 50%, 75% et 100%) sur une lame Biacore "CM5". La Figure 22 (a) confirme la reproductibilité des mesures et la bonne linéarité de la fonction "pixels = f (concentration)". On peut estimer l'incertitude absolue sur les mesures à ± 1 pixel.

L'étalonnage du banc peut se faire selon plusieurs méthodes. Lors d'une mesure, les 2 cuvettes permettent d'étudier simultanément les signaux SPR de deux liquides d'indices de réfraction connus, ce qui permet de convertir un écart mesuré en pixels en une variation de l'indice de réfraction. Une autre méthode consiste à enregistrer le signal associé à une rotation précise (par exemple 0.2°) autour de l'axe de symétrie du prisme puisque l'ensemble prisme/métal/cuvettes est monté sur une platine de rotation motorisée. Cette mesure rapide réalisée au début de chaque expérience permet de convertir un déplacement du pic d'absorption (Figure 5 (b)) des pixels aux degrés. L'incertitude sur l'angle de rotation est estimée à 2%.

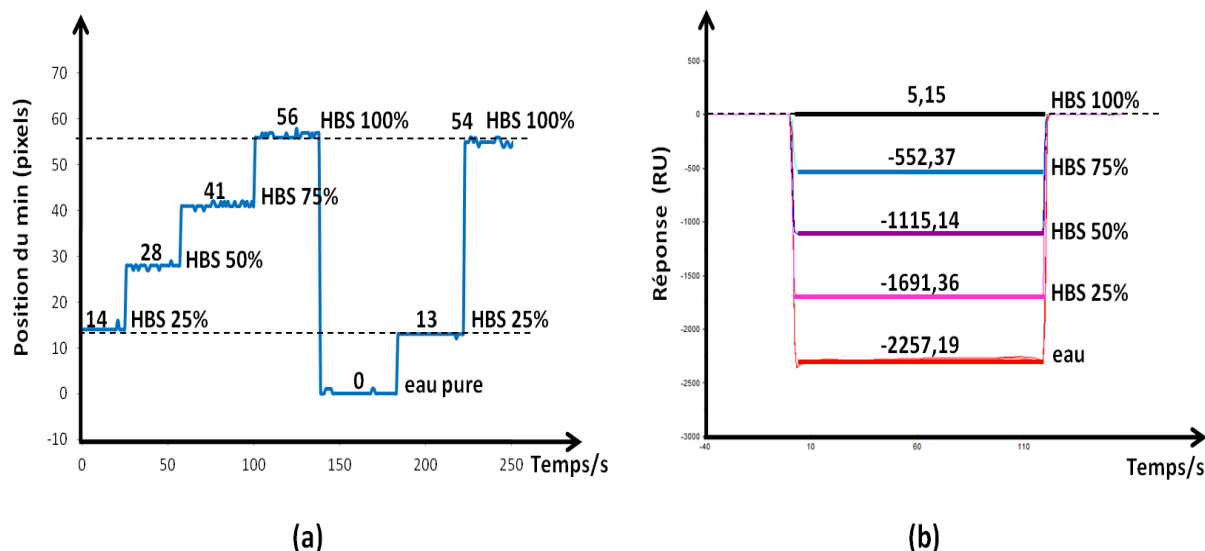


Figure 22 : (a) Etalonnage du banc en "goutte" par rapport (b) à l'appareil commercial "Biacore 3000" installé à l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique de l'université Lille 2.

Dans la littérature, l'unité la plus souvent utilisée est le "Response Unit" RU.⁶⁴ Cette unité introduite par la société Biacore est définie par la relation $1000 \text{ RU} = 0.1^\circ = 1 \text{ pg/mm}^2$.⁹⁴ Il était donc nécessaire de vérifier une mesure en pixels/angles sur le banc SPR en "goutte" et une mesure en RU. Le protocole décrit dans la Figure 22 (a) a été reproduit sur l'appareil "Biacore 3000" (Figure 22 (b)) installé à l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique de l'université Lille 2 en collaboration avec A.S. Drucbert et P.M. Danzé. La Table 1 permet d'établir facilement cette comparaison. L'incertitude sur $\Delta\theta$ est principalement due à l'erreur induite par la platine de rotation sur la conversion des pixels en une mesure angulaire. Nous constatons un bon accord entre nos mesures et celles réalisées sur l'appareil "Biacore 3000".

Table 1 : Comparaison des mesures réalisées sur le banc configuration en "goutte" avec l'appareil "Biacore 3000". La valeur théorique du rapport $\Delta\theta/RU$ est égale à 1×10^{-4} degrés/RU.

	HBS pur – HBS 75%	HBS pur – HBS 50%	HBS pur – HBS 25%	HBS pur – Eau
Biacore / RU	557.52	1120.29	1696.51	2262.34
SPR "goutte" / $\Delta\theta$ (°)	0.059 ± 0.004	0.111 ± 0.004	0.168 ± 0.004	0.235 ± 0.004
$\Delta\theta/RU$	1.06×10^{-4}	0.99×10^{-4}	0.99×10^{-4}	1.04×10^{-4}

La mesure absolue de l'indice de réfraction n'est pas directement accessible à partir de la détermination de $\Delta\theta$. En effet l'expression de l'Equation 15 ne permet pas de trouver une relation simple entre la variation angulaire $\Delta\theta$ et la variation Δn_d de l'indice de réfraction du diélectrique étudié.

Ce travail de validation réalisé, nous allons décrire dans la suite de ce travail les différents montages expérimentaux (**paragraphe II.4**) qui ont été étudiés ainsi que l'étude de la cinétique des interactions biomoléculaires sur des surfaces fonctionnalisées (**Chapitre III**).

II.3.2- Amélioration du dispositif de détection

L'aspect ouvert du banc en "gouttes" ne permet pas de fixer définitivement les paramètres géométriques et optiques. En particulier, la dimension physique des 2 barrettes CCD impose une distance minimum de 15 mm entre les 2 gouttes (Figure 20 (a)). Afin de s'affranchir de cette contrainte nous avons fait le choix d'une caméra (Thorlab DCU224M de 1280x1024 pixels). Cette caméra permet de placer plusieurs gouttes en parallèle sur une lame métallique nue, les seules limites, dans le nombre de gouttes que l'on peut étudier simultanément, sont l'épaisseur du prisme et le diamètre des gouttes. L'utilisation du dispositif en téflon de la Figure 20 (c) permet d'enregistrer 4 signaux SPR sur un prisme de 20 mm d'épaisseur. Un ensemble de filtres optiques et un polariseur permettent d'adapter la luminosité du signal à la sensibilité de la caméra. La vision directe de l'image des plasmons facilite les réglages optiques (Figure 23) en temps réel, en particulier pour les gouttes de très petites dimensions (par exemple : 1 μ l de diamètre $\approx$ 1.2 mm).

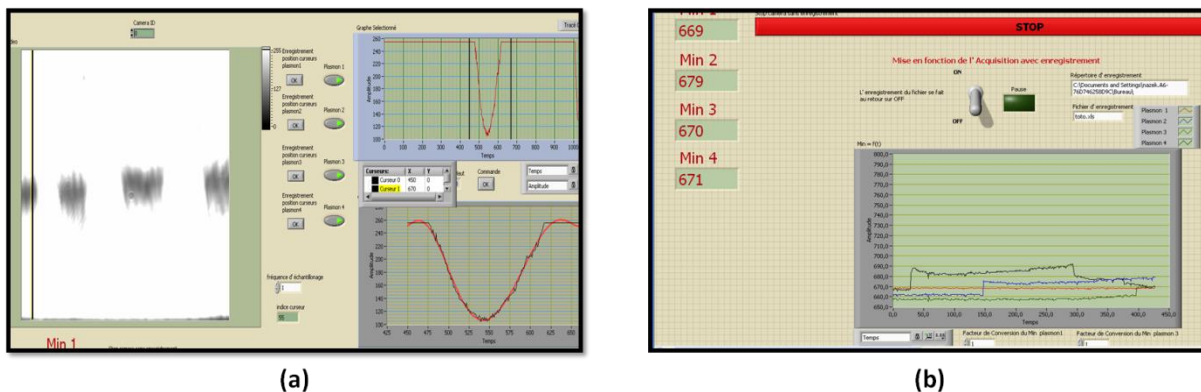


Figure 23 : (a) Capture d'écran du logiciel Labview : photo de 4 plasmons (à gauche) et du signal plasmonique d'une des 4 gouttes et sa courbe de lissage (à droite). (b) Lecture directe de la variation du minimum des 4 plasmons en fonction du temps.

L'évolution du minimum du signal plasmonique en fonction du temps (Figure 23 (b)), enregistré par le logiciel Labview, est reprise sur Excel pour le traitement des données, voir à titre d'exemple la Figure 22 (a).

II.4- Dispositif plasmonique intégré sans prisme

Dans le cadre du contrat européen Interreg IV "PLASMOBIO", un travail a été développé pour concevoir un dispositif du type "Lab-on-Chip". Ce concept a pour but de simplifier l'équipement scientifique et d'automatiser son usage mais aussi de réduire les coûts des consommables et donc des analyses biochimiques et médicales.

Le groupe de l'Université de Liège, dirigé par Serge Habraken, a proposé une approche permettant d'éliminer le couplage par un prisme et de le remplacer par une lame à deux réseaux de diffraction placés directement sous la surface métallisée.⁹⁵ Le substrat est une lame de verre BK7 de 2 mm d'épaisseur. Les deux réseaux de diffraction sont collés symétriquement sur une même face du substrat. La surface métallique (film de Au de 50 nm d'épaisseur) couvre la partie centrale de l'autre face (Figure 24 (b)).

La lumière diffractée par le réseau d'entrée converge à l'interface métal/liquide (Figure 24 (a) et (b)). Le signal plasmonique généré est ensuite détecté par le capteur CCD à la sortie du deuxième réseau. Notons qu'un brevet décrivant ce dispositif a été déposé en 2002 mais qu'il ne s'appuie sur aucune vérification expérimentale.⁹⁶

Afin de valider la réponse plasmonique, nous avons adapté le banc SPR en "goutte". Les simulations numériques réalisées par le groupe de Liège ont permis la détermination précise de l'angle entre le faisceau incident et l'axe perpendiculaire à la lame à réseaux (4.5°). Dans un premier temps nous avons placé la lame perpendiculairement au faisceau lumineux en nous basant sur le retour inverse de la lumière. Puis en faisant tourner la platine de rotation de 4.5° , nous nous sommes placés dans les conditions optimums pour observer le signal SPR (Figure 24 (c)). Bien que nous ayons utilisé une lentille sphérique pour focaliser le faisceau laser sur la zone d'interaction métal/liquide, nous avons constaté que les réseaux ne se comportent pas comme de simples miroirs et qu'il est possible d'observer 2 signaux SPR simultanément. Les pertes de puissance lumineuse sont importantes dans ce montage, pour une puissance d'entrée de 60 mW, la puissance mesurée à la sortie du dispositif à réseaux n'est que de 2 mW alors qu'elle est de 20 mW dans le cas du couplage classique avec un prisme.

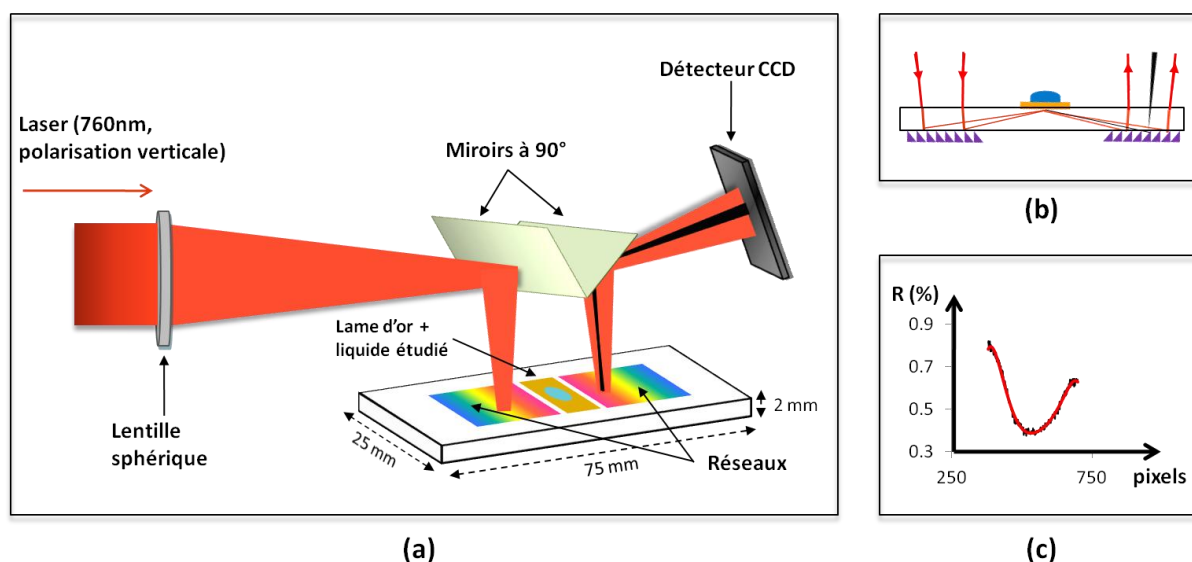


Figure 24 : (a) Adaptation du montage optique SPR "en goutte" au dispositif intégré sans prisme. (b) Détail du parcours de la lumière. (c) Le signal plasmonique enregistré par le détecteur CCD.

Afin d'étudier les performances de la lame à réseaux, nous avons enregistré le signal plasmonique de l'eau. La Figure 25 montre que la qualité du signal est comparable à celui obtenu avec le montage en prisme et va ainsi rendre possible des mesures quantitatives. L'absence d'un prisme dans ce montage ne permet pas d'utiliser la relation de couplage habituelle (Equation 15), de même il n'est pas possible de convertir les pixels Δpx en valeur angulaire $\Delta\theta$ en faisant pivoter la platine de rotation puisque la position de la lame par rapport du faisceau lumineux incident est imposée. L'étalonnage du dispositif ne peut se faire que par référence aux signaux correspondants à 2 liquides d'indices de réfraction connus entre lesquels on effectuera une interpolation dont nous allons mettre la linéarité en évidence ci-après.

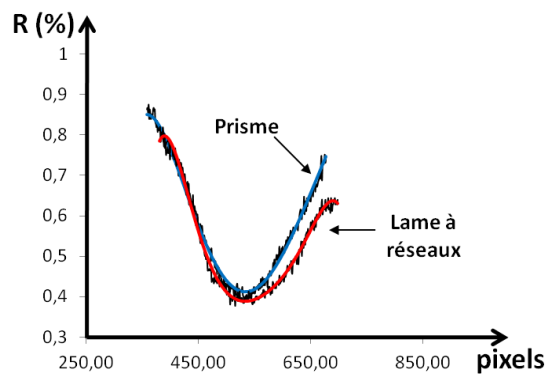


Figure 25 : Comparaison des signaux plasmoniques obtenus avec les 2 configurations : prisme (courbe bleue) et lame à réseaux (courbe rouge).

Pour valider le dispositif SPR intégré sans prisme, nous avons comparé la réponse plasmonique de différentes concentrations du tampon "Phosphate Buffer Saline" PBS avec le dispositif classique (prisme). La Figure 26 montre une bonne linéarité de la réponse en fonction de la concentration du PBS dans l'eau (0%, 50% et 100%) qui couvre les indices de réfraction 1.3330 et 1.3347 (ces valeurs sont obtenues par un réfractomètre). Les montages optiques n'étant pas les mêmes, les valeurs de la position du minimum ne sont pas égales mais sont proportionnelles.

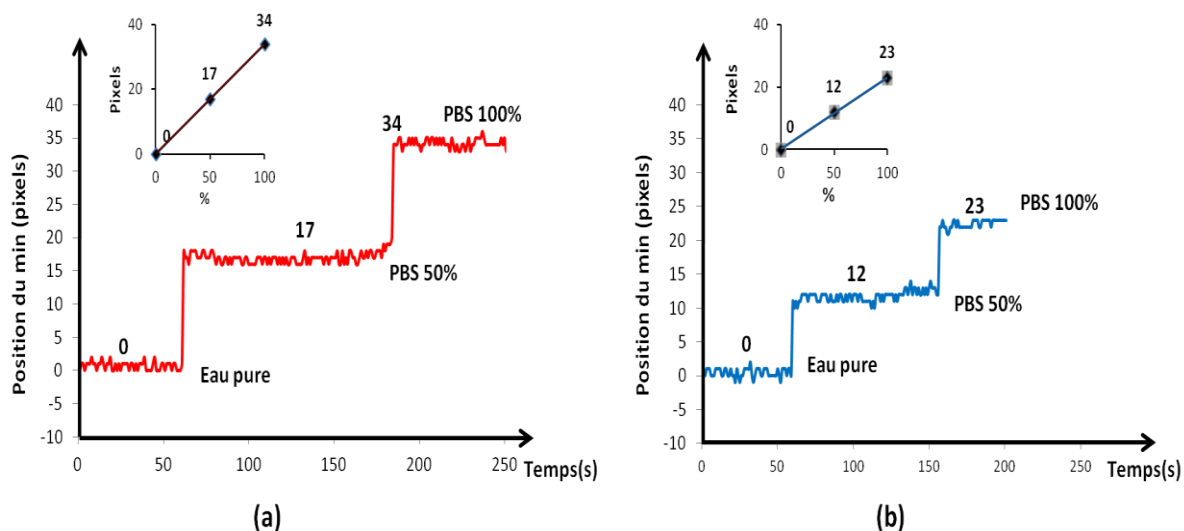


Figure 26 : Comparaison de la variation de la position du minimum du signal SPR pour différentes concentrations du tampon PBS : (a) lame à réseaux et (b) prisme.

Ce dispositif ouvre des perspectives intéressantes dans un contexte du type "Lab-on-Chip". Rappelons cependant que les pertes de puissance lumineuse lors des réflexions sur les 2 réseaux représentent un obstacle qu'il faudra prendre en considération dans la conception d'un dispositif commercial.

II.5- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons validé le banc optique SPR en configuration "goutte", développé durant la thèse de doctorat de Maxime Beaugeois. En premier lieu, nous avons réalisé un dispositif en téflon à 2 ou 4 cuvettes afin d'assurer la reproductibilité des mesures et de pouvoir visualiser plusieurs plasmons simultanément. Ensuite, des tests d'étalonnage ont été effectués en utilisant un tampon biologique à différentes concentrations. Une comparaison des résultats de ces tests avec les résultats obtenus sur l'appareil commercial Biacore 3000 a permis de trouver le rapport de conversion $\Delta\theta/\text{RU}$ qui est égal à $10^{-4} \text{ }^\circ/\text{RU}$.

Le banc décrit dans ce chapitre présente l'inconvénient de ne pas être "presse bouton", cependant l'accessibilité à tous ses composants permet de le modifier en fonction des besoins.

Son aspect "ouvert" nous a permis de l'adapter à d'autres montages étudiés dans le cadre du projet européen Interreg IV PLASMOBIO. Ainsi nous avons validé expérimentalement le

concept d'un dispositif intégré sans prisme du type "Lab on Chip". Le signal plasmonique produit par ce dispositif est comparable à celui obtenu dans la configuration SPR classique et les mesures quantitatives sur les variations d'indice de réfraction sont en très bon accord.

**CHAPITRE III- *FONCTIONNALISATION DES
COUCHES MINCES DE SILICIUM AMORPHE
CARBONE POUR L'IMMOBILISATION DE PEPTIDES
HISTAGUES***

III.1- Introduction

Depuis une dizaine d'années, de nouvelles surfaces SPR hybrides, basées sur le revêtement des lames métalliques avec des fines couches de diélectrique (SiO_x , ITO, silicium amorphe carboné, etc.), ont été développées.^{28-32,34,35,77,97} Les films de silicium amorphe carboné déposés sur une lame d'argent ont montré des caractéristiques particulièrement intéressantes concernant l'amélioration de la sensibilité du biocapteur SPR.³⁴ De plus la chimie de surface de ces substrats permet le greffage de monocouches organiques covalentes à travers la forte liaison Si-C, pour l'immobilisation des ligands.⁸¹⁻⁸³

L'immobilisation des biorécepteurs sur les surfaces de façon à contrôler leur orientation (pour conserver leurs sites actifs) est le principal défi dans le domaine de la biodétection. Parmi les approches développées, on peut citer celle qui utilise l'affinité spécifique d'un agent chélateur tel que l'acide nitrilotriacétique (NTA) avec les protéines ou peptides contenant des séquences de l'histidine (H).⁹⁸⁻¹⁰⁰ Dans cet esprit, Gautrot et coll. ont développé des "protéines-résistantes" brosse polymère fonctionnalisées NTA, pour la complexation de protéines histagués d'une manière sélective et réversible.¹⁰¹ De nombreuses expériences SPR, sont réalisées sur des substrats d'or modifiés chimiquement avec NTA *via* la chimie des thiols.^{99,102,103} Cependant, la qualité de ces substrats est influencée par l'environnement de stockage.¹⁰⁴ Nieba et coll. et Khan et coll. ont utilisé des lames SPR de type "Biacore" modifiées NTA pour étudier l'interaction entre l'histidine et les ions métalliques.^{105,106}

Dans ce chapitre, afin d'avoir une meilleure sensibilité couplée à une orientation spécifique de l'immobilisation des biomolécules, nous étudions les interactions de peptides histagués (analyte) avec des ions métalliques (ligand), sur l'interface SPR verre/Ti (5 nm)/Ag (38 nm)/a- $\text{Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{H}$ (5 nm), à travers l'agent chélateur NTA. En premier lieu, nous étudions les différentes étapes de fonctionnalisation de l'interface SPR pour la complexation des ions cuivreux. Ensuite, par le banc optique SPR en configuration de "goutte", nous suivrons la cinétique de l'interaction de deux peptides histagués, de masse moléculaire différente, avec les ions Cu^{2+} .

III.2- Préparation des interfaces SPR Ag/a-Si_{1-x}C_x:H

La Figure 27 montre le schéma de la surface SPR utilisée dans cette étude. Les films de titane Ti et d'argent Ag sont déposés, sur une lame de verre bien nettoyée, par la technique de l'évaporation thermique. L'incorporation du film de Ti est nécessaire afin de réaliser l'adhésion de l'argent sur le verre. La couche mince de silicium amorphe carboné est déposée sur le film Ti/Ag par PECVD en régime "basse puissance" où les gaz de méthane et de silane sont les sources de carbone et de silicium respectivement.^{36,37,107} Les détails de cette technique de dépôts sont décrits dans les **Annexes**. Pour éviter l'oxydation de l'argent durant le dépôt du silicium amorphe carboné, un traitement par un plasma d'hydrogène est appliqué à la surface Ti/Ag juste avant le dépôt. L'ajustement de l'épaisseur des différentes couches Ti, Ag et a-Si_{1-x}C_x:H est contrôlé par le temps de dépôt. La durée de 3s correspond à un dépôt d'une couche de silicium amorphe carboné de 1 nm d'épaisseur.

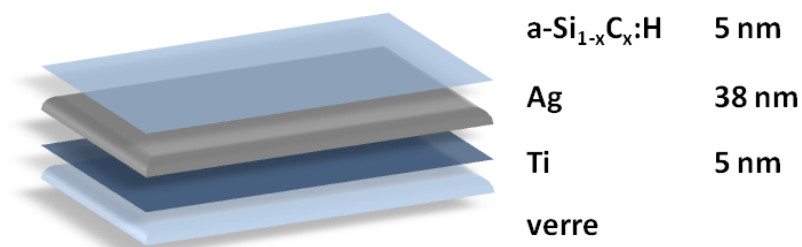


Figure 27 : Schéma de l'interface SPR verre/Ti (5nm)/Ag (38 nm)/ a-Si_{1-x}C_x:H (5nm).

Touahir et coll. ont évalué la performance du capteur SPR Ti/Ag couvert par 5 nm d'une couche de a-Si_{0.63}C_{0.37}:H en analysant le facteur de mérite FOM (défini par l'Equation 19). Celui-ci correspond à la pente de la droite de la variation de l'angle de résonance $\Delta\theta_{SP}$ divisée par la largeur à mi-hauteur FWHM du signal SPR en fonction de l'indice du milieu n_d (unité : RIU). D'après la Figure 28, le FOM de la structure Ti/Ag/a-Si_{0.63}C_{0.37}:H est de 101 RIU⁻¹ qui est respectivement 1.4 fois, 2 fois et 2.8 fois plus important que celui obtenu avec une lame d'or revêtue de 5 nm de a-Si_{0.63}C_{0.37}:H, une lame d'argent et une lame d'or nues.^{34,107} Ainsi avec cette structure, le capteur SPR montre une meilleure qualité de la réponse plasmonique, d'où le choix de cette surface dans la suite de ce travail.

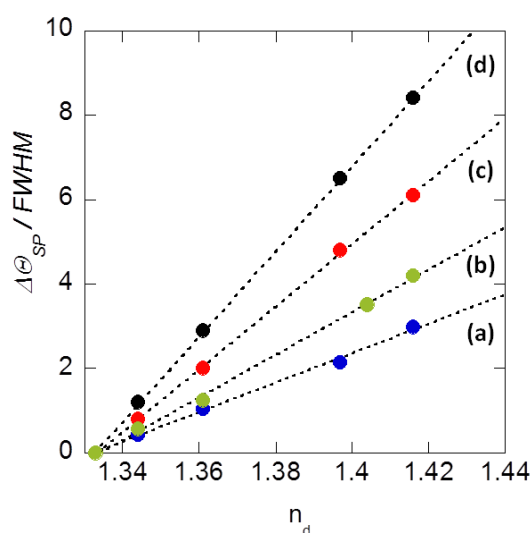


Figure 28 : La variation du rapport $\Delta\theta_{SP}/FWHM$ en fonction de l'indice de réfraction n de différents diélectriques déposés sur une lame : (a) Au (bleu); (b) Ag (vert); (c) Au/a- $Si_{0,63}C_{0,37}:H$ (5 nm) (rouge) ; (d) Ag/a- $Si_{0,63}C_{0,37}:H$ (5 nm) (noir).³⁴

III.3- Greffage des molécules NTA pour la complexation avec les ions Cu^{2+}

Nous avons fonctionnalisé chimiquement les surfaces SPR Ti/Ag/a- $Si_{0,63}C_{0,37}:H$, pour un greffage covalent du S-amino-carboxypentyl iminodiacétique (NTA- NH_2). Ensuite, les ions cuivreux sont complexés sur l'interface, pour le suivi de la fixation des peptides histagués par SPR. Les protocoles expérimentaux sont détaillés dans les **Annexes**.

Après le dépôt du silicium amorphe carboné, l'interface Ti/Ag/ a- $Si_{0,63}C_{0,37}:H$ est hydrogénée par exposition aux vapeurs de HF, pour former des liaisons Si-H. L'hydrogénation est une étape primordiale afin de former des monocouches organiques fonctionnalisées à la surface via la liaison Si-C. Parmi les méthodes chimiques et électrochimiques investiguées, l'hydrosilylation permet l'incorporation de monocouches denses et compactes, à travers la réaction entre des chaines alcène et l'hydrogène de la liaison Si-H (Figure 29).^{108–110}

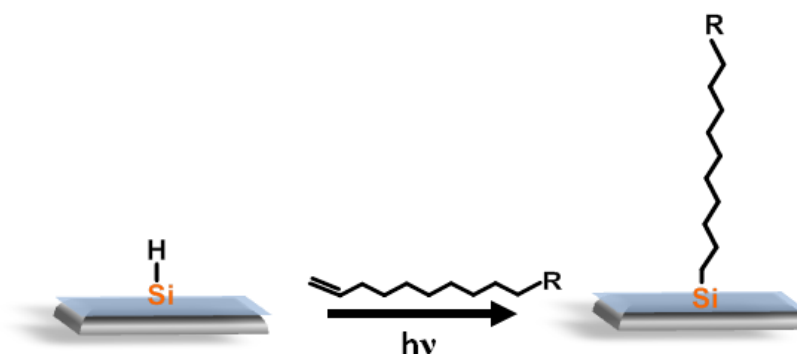


Figure 29 : Schéma de la réaction d'hydrosilylation.

Le choix du groupe fonctionnel de la chaîne greffée sur la surface est limité par sa réactivité chimique envers la surface. A titre d'exemple, les groupes fonctionnels tels que $-\text{OH}$ ou $-\text{NH}_2$ favorisent la formation de liaisons Si-O-C ou Si-N-C par rapport à la réaction d'addition.^{111–113} Faucheux et coll. ont préparé des monocouches denses et bien contrôlées terminées acide, d'une façon spontanée, à travers l'hydrosilylation par voie photochimique en présence de l'acide undécylénique (Figure 29).⁸³ Les terminaisons carboxyles présentent un intérêt important dans le domaine de la biodétection. Ils permettent d'accrocher d'une façon covalente des molécules avec des fonctions amines (ou biomolécules) *via* les liaisons amides.^{34,114,115}

La réaction d'amidation directe ne peut pas s'effectuer d'une façon spontanée à la température ambiante,¹¹⁶ il est donc nécessaire d'activer les acides carboxyliques. L'activation consiste à former un ester réactif qui réagit avec l'amine de la molécule à greffer (Figure 30). Parmi les différents composés générés par l'activation, on trouve les esters succinimides qui sont largement utilisés dans le domaine de la biodétection.^{64,114,117–120} La surface terminée ester succinimide est obtenue par réaction de la surface acide avec un agent de couplage tel que le N-éthyl-N'-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide (EDC) en présence du N-hydroxysuccinimide (NHS). Sam et coll. ont montré l'influence des concentrations des composés NHS et EDC ainsi que l'effet de la température sur le rendement de la réaction d'activation. Des concentrations équimolaires (de l'ordre de 5 mM) et une température comprise entre 15°C et 20°C présentent les conditions optimales pour obtenir une meilleure et complète modification de surface.^{35,117}

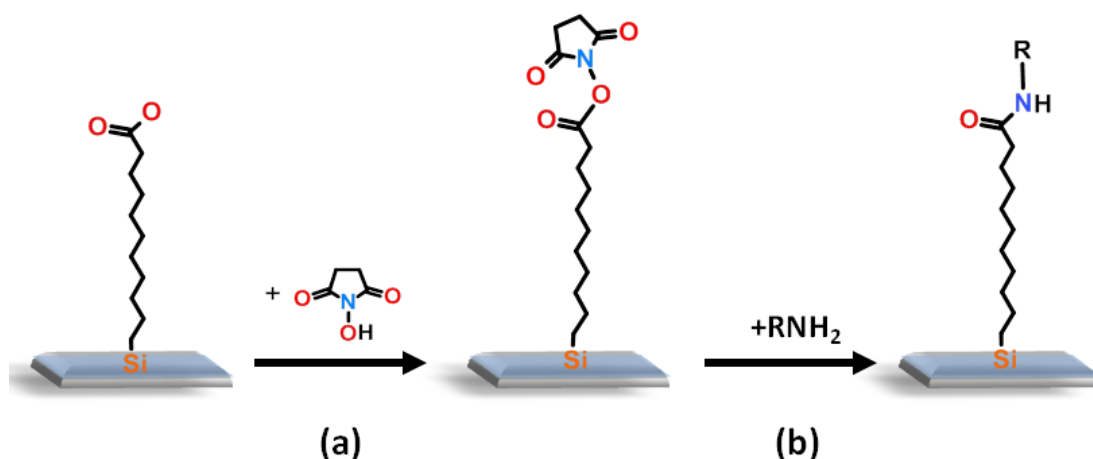


Figure 30 : Représentation schématique de l'activation du groupement carboxyle avec (a) *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) pour la réaction avec (b) une amine.

Dans ce travail, après l'étape de l'hydrogénation, la surface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ est immergée dans une solution d'acide undécylénique et puis irradiée à 312 nm pendant 3 h. Afin d'éliminer l'excès des molécules qui n'ont pas réagi et d'éviter la formation des dimères, un rinçage avec l'acide acétique est nécessaire.⁸³ La conversion de la fonction acide en fonction ester de succinimide est réalisée en incubant la surface acide dans une solution fraîchement préparée de NHS (5mM) et EDC (5mM) dans de l'eau pour une durée de 90 min à 15°C.

Pour la formation d'une surface terminée NTA, l'interface SPR activée est immergée dans une solution $\text{NTA-NH}_2/\text{PBS}$ (10^{-2} M). Ensuite la surface est rincée avec du PBS à un pH = 8-9 pour assurer la déprotonation des groupements carboxyles de la molécule. Finalement les ions cuivreux sont chélatés aux molécules NTA en introduisant la surface résultante dans une solution aqueuse de $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (5 mM).

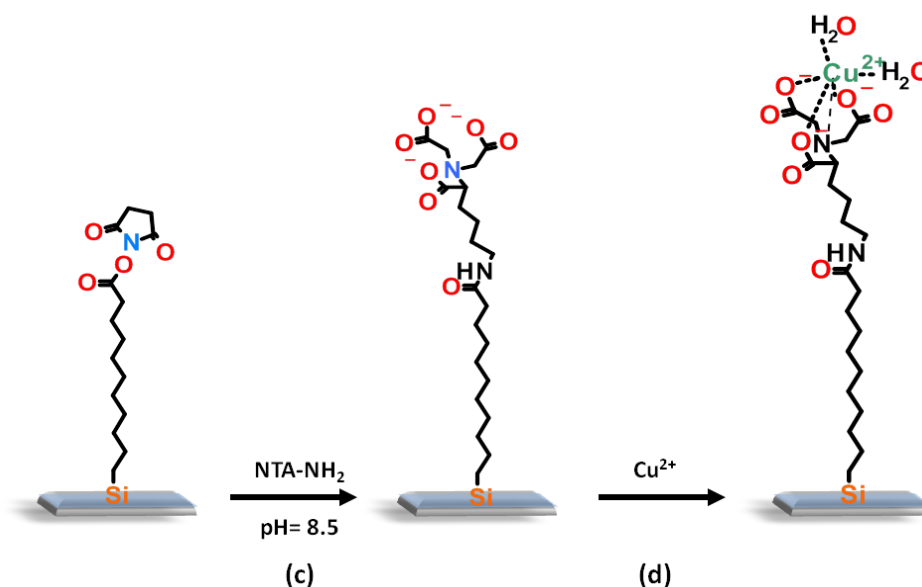


Figure 31 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation de l'interface SPR après la réaction d'activation : (d) greffage de la molécule NTA et (e) complexation des ions Cu^{2+} avec NTA.

Pour vérifier le greffage et l'orientation des molécules de chaque étape de la fonctionnalisation de l'interface SPR, nous avons effectué des caractérisations ATR-FTIR. Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée à l'école Polytechnique de Paris, en collaboration avec le groupe de F. Ozanam. Un descriptif de cette technique de caractérisation est présenté dans les **Annexes**.

La Figure 32 montre le spectre ATR-FTIR de l'interface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ après l'étape de l'hydrogénation. La présence du pic à 2115 cm^{-1} vérifie l'existence d'un grand nombre des liaisons Si-H . Les pics à 2894 et 2955 cm^{-1} , montrent que la plus grande part du carbone présent à la surface est sous forme de méthyle CH_3 .^{36,37}

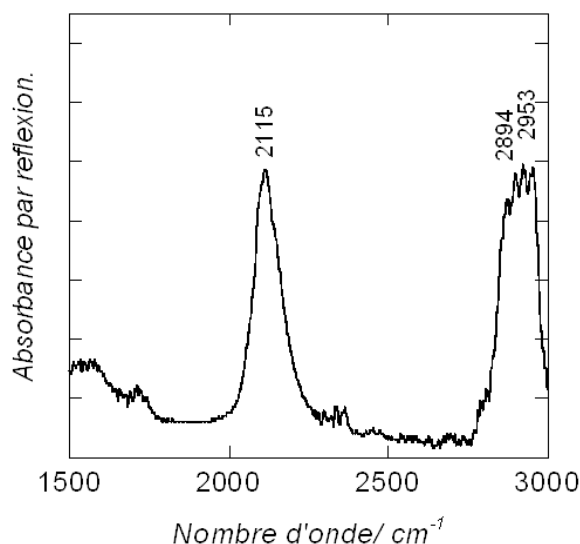


Figure 32 : Spectre ATR-FTIR de la surface $Ti/Ag/a-Si_{1-x}C_x:H$ hydrogénée.

Le spectre (a) de la Figure 33 est celui de la surface après la réaction photochimique avec l'acide undécylénique. Le pic intense à 1713 cm^{-1} est caractéristique des modes vibrationnels des liaisons $C=O$ et les pics à 2855 et 2925 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration des groupements CH_2 . Ce résultat indique, d'une façon qualitative, le succès de la formation des groupements carboxyles à l'interface $a-Si_{0.63}C_{0.37}:H$. Pour déterminer la densité des molécules acide greffées à la surface, nous avons utilisé la méthode quantitative élaborée par Faucheux et coll.⁸³ La densité calculée est égale à $N = 1.5 \pm 0.2 \times 10^{14}\text{ mol cm}^{-2}$, qui correspond à une faible valeur comparée à celle trouvée sur le silicium cristallin ($N = 2.5 \pm 0.2 \times 10^{14}\text{ mol cm}^{-2}$).⁸³ Cela est dû probablement à la présence des groupements méthyles à la surface.

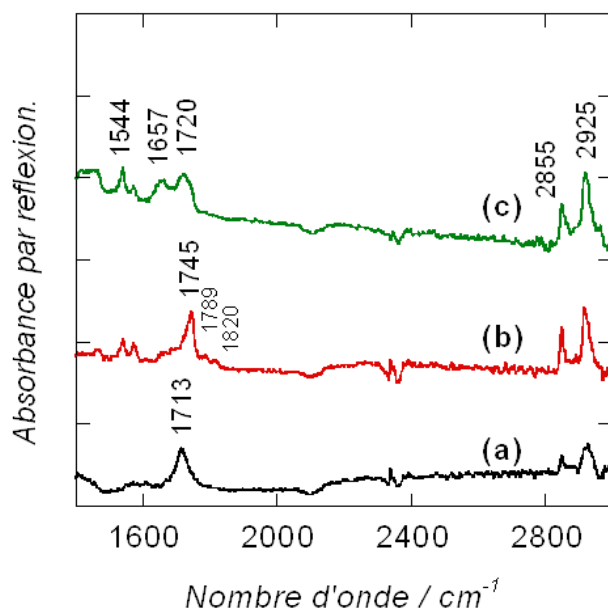


Figure 33 : Spectres ATR-FTIR des différentes étapes de modification de surface qui précèdent l'hydrogénation de la surface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$; (a) spectre de la surface acide, (b) après la réaction d'activation avec NHS/EDC, (c) après le greffage de la molécule NTA. Le spectre de référence est le spectre de la surface hydrogénée.

Le spectre (b) de la Figure 33 représente la surface après l'activation avec NHS/EDC. La disparition complète du pic à 1711 cm^{-1} et l'apparition des pics à 1745 , 1789 , et 1820 cm^{-1} qui correspondent aux modes de vibration des liaisons C=O des fonctions carbonyles de l'ester succinimide,¹¹⁷ confirment l'activation des groupements carboxyles. Dans cette étape, nous avons déterminé la densité des sites actifs en utilisant le calcul décrit par Moraillon et coll..¹¹⁵ La valeur obtenue est égale à $N = 5 \times 10^{13}\text{ mol cm}^{-2}$, ce qui correspond à un rendement de 33% de la surface modifiée acide.

Après le greffage de la molécule NTA à la surface activée, on trace le spectre (c) qui montre l'apparition des bandes à 1544 et 1657 cm^{-1} associées aux modes de vibrations des anions carboxylates (COO^-) asymétrique et de l'amide II (O=C-NH) respectivement. Le pic à 1720 cm^{-1} est essentiellement lié aux modes de vibrations des groupements carboxyles protonés de la molécule.¹²¹ Avec l'analyse quantitative, on détermine la quantité de molécules NTA greffées à la surface et qui est égale à $N = 5 \times 10^{13}\text{ mol cm}^{-2}$ signifiant une réaction avec un rendement de 100% de la surface activée.

Pour confirmer les résultats obtenus par ATR-FTIR, nous avons réalisé des mesures XPS (les informations relatives à la technique XPS sont détaillées dans les **Annexes**). La Figure 34 (a) montre le spectre XPS en haute résolution de la bande C1s de l'interface Ti/Ag/a-Si_{0.63}C_{0.37}:H après l'hydrosilylation. Ce spectre est décomposé en 4 composantes. La première composante **1** se situe à 283.9 eV et correspond aux liaisons C-Si. Le pic **2** centré à 285 eV est caractéristique des liaisons C-C(H), alors que les 2 derniers pics (**3** et **4**) à 286.5 et 288.9 eV correspondent aux carbones C proche du groupement carboxyle (-CH₂-COOH)¹²² et C du groupement O-C=O respectivement.

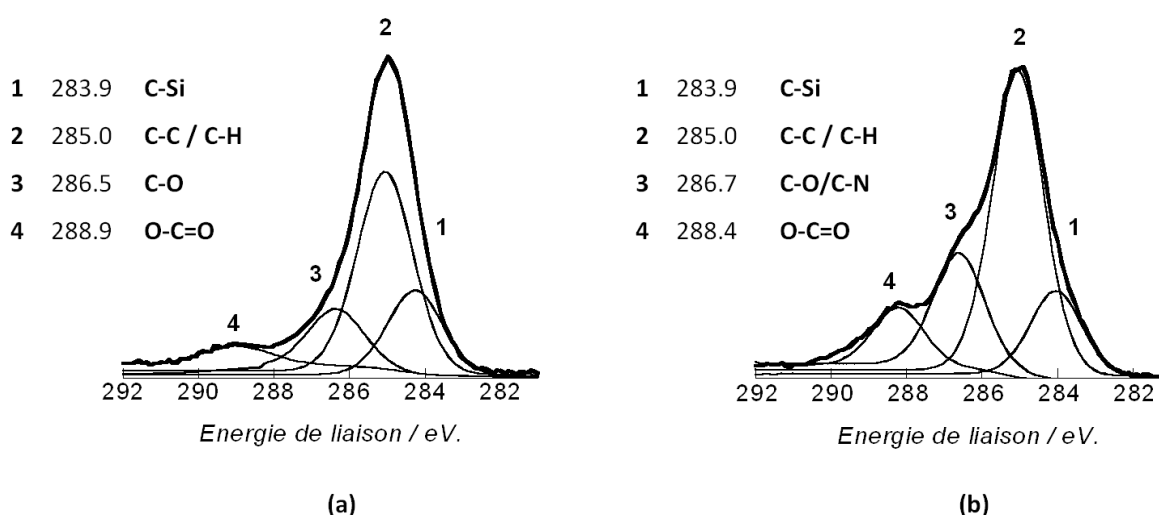


Figure 34 : Spectres XPS en haute résolution de l'élément C1s de la surface Ti/Ag/a-Si_{1-x}C_x:H (a) après immersion dans l'acide undécylénique et (b) après interaction avec la molécule NTA.

Le spectre (b) de la Figure 34 représente le résultat XPS en haute résolution de l'élément C1s de la surface Ti/Ag/a-Si_{1-x}C_x:H terminée amine-NTA après une activation de la surface acide avec NHS/EDC. Ce pic peut être décomposé en 4 composantes à 283.9, 285, 286.7 et 288.4 eV qui correspondent aux fonctions C-Si, C-C(H), C-O/C-N et O-C=O respectivement. Une augmentation remarquable du pic **4** à 288.4 eV est liée à l'addition des groupements carboxyles (COOH) de la molécule NTA. La formation de cette monocouche est confirmée aussi par le spectre XPS en haute résolution de l'élément N1s de la Figure 35 qui montre un pic à 400 eV caractéristique de l'amine tertiaire et de l'amide. Le rapport du nombre d'atomes d'azote sur le nombre d'atomes de carbone est égal à 0.090. Cette valeur proche de

la valeur du rapport théorique égal à 0.095, confirme le résultat quantitatif trouvé avec la caractérisation par ATR-FTIR.

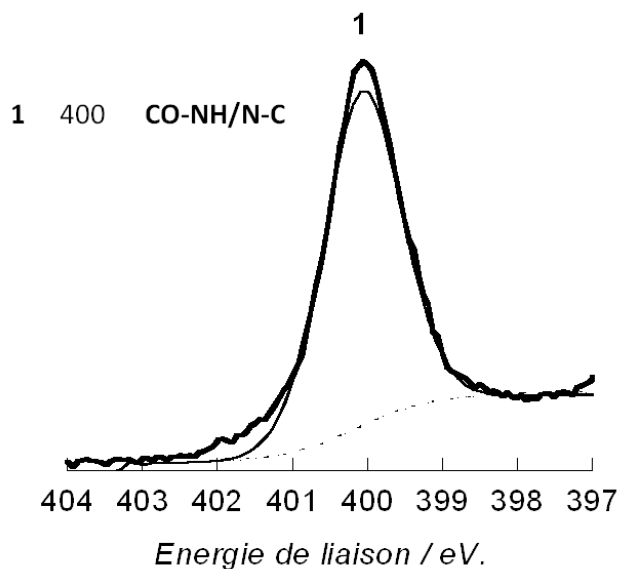


Figure 35 : Spectre XPS en haute résolution de l'élément N1s de la surface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ terminée NHS après son immersion dans une solution $\text{NTA-NH}_2/\text{PBS}$ ($\text{pH}=8.5$).

A cette étape de modification, nous avons voulu estimer l'épaisseur de la monocouche NTA greffée après l'étape de l'hydrosilylation. Les caractérisations ATR-FTIR ou XPS ne permettent pas le calcul de cette épaisseur, d'où la nécessité d'utiliser une autre technique de caractérisation : la résonance plasmonique de surface. Comme nous l'avons décrit dans le **Chapitre I**, la réponse plasmonique est sensible à toute variation de l'indice de réfraction du milieu environnant Δn_d (variation de la masse ou de l'épaisseur par exemple) qui induit un déplacement du pic d'absorption (Figure 17). La Figure 36 présente les courbes expérimentales (courbes en pointillées) et théoriques de réflectivité de l'interface SPR après la réaction photochimique avec l'acide undécylénique (courbe rouge) et après le greffage de la molécule NTA (courbe bleue). Un déplacement angulaire de 0.3° est enregistré. Afin de déterminer grossièrement l'épaisseur de cette couche greffée, nous avons utilisé les paramètres de modélisation de la Table 2 (en utilisant le logiciel WinSpall 3.0). Ainsi nous estimons que le déplacement angulaire correspond à une épaisseur égale à 3.4 nm. Cette valeur est en accord avec la valeur théorique de la dimension de la molécule NTA-NH_2 qui est approximativement égale à 3.8 nm.

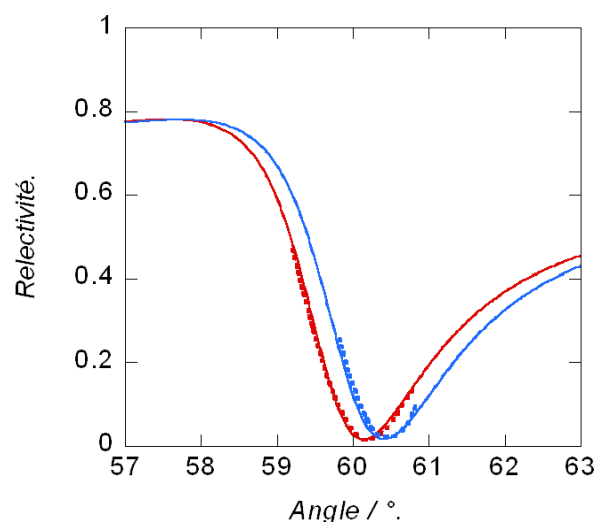


Figure 36 : Courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de l'interface Ti/Ag/a-Si_{1-x}C_x:H après la modification acide (rouge) et le greffage de la molécule NTA (bleu). Les courbes en pointillées correspondent aux résultats expérimentaux. Les courbes en trait plein correspondent aux modélisations obtenues par le logiciel WinSpall 3.0.

Table 2 : Les paramètres introduits sur le logiciel WinSpall 3.0 pour la détermination de l'épaisseur de la couche NTA.

Couche	$n' + i n''$	Epaisseur d (nm)
Verre	1.630	∞
Ti	2.400 + i 3.313	5
Ag	0.140 + i 4.581	41
aSi _{0.63} C _{0.37}	1.810 + i 0.040	5
NTA	1.500	3.4

Un rinçage avec du PBS à un pH=8.5 est nécessaire pour assurer la déprotonation des groupements COOH de l'interface Ti/Ag/a-Si_{1-x}C_x:H terminée NTA. La Figure 37 montre le spectre XPS en haute résolution de l'élément Cu2p après l'incubation de la surface NTA (déprotonée) dans une solution contenant des ions Cu²⁺. Il existe 2 pics à 930.6 et à 950.3 eV correspondants aux contributions Cu2p_{3/2} et Cu2p_{1/2} respectivement. La valeur du rapport atomique Cu/N est de 0.1. Or ce rapport, inférieur au rapport théorique (0.5), signifie qu'une petite portion des groupements carboxyles ont été complexés aux ions Cu²⁺.

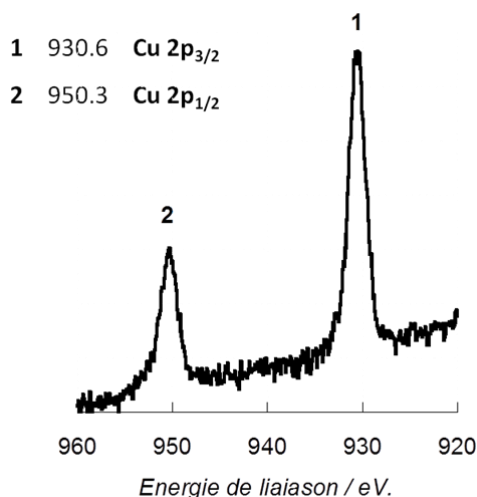


Figure 37 : Spectre XPS en haute résolution de l'élément $\text{Cu}2p$ de la surface $\text{Ti/Ag/a-Si}_1\text{-xC}_x\text{:H/NTA}$ après son incubation dans une solution de CuSO_4 (5 mM).

Après une validation qualitative par XPS de la modification de la surface par les ions Cu^{2+} , nous avons effectué des mesures électrochimiques pour déterminer le taux de couverture des ions complexés.

La Figure 38 montre les mesures de voltampérométrie cyclique de la surface modifiée NTA avant et après l'incubation dans une solution aqueuse de CuSO_4 (5mM). L'électrolyte est une solution de $\text{LiClO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M). Après l'interaction des groupements NTA avec les ions Cu^{2+} , nous remarquons dans le cyclovoltamogramme bleu la présence de la signature électrochimique du couple Cu^{2+}/Cu . Le pic de réduction 1 est associé à la conversion des ions Cu^{2+} en Cu^0 et celui de l'oxydation 2 correspond à une perte de 2 électrons du cuivre pour former des ions cuivriques.

$$\Gamma_{\text{Cu}^{2+}} = \frac{Q}{nFS} \quad \text{Equation 21}$$

Pour calculer la densité surfacique des ions cuivreux complexés $\Gamma_{\text{Cu}^{2+}}$, nous appliquons l'Equation 21, avec Q la charge intégrée (C), F la constante de Faraday ($\text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$), S la surface géométrique de l'interface SPR (cm^2) et n est égale à 2 électrons qui interviennent dans la réaction d'oxydo-réduction.⁹⁸ La valeur de la densité surfacique calculée est de $N_{\text{Cu}^{2+}} = 1.0 \times 10^{13} \text{ mol cm}^{-2}$ qui est une valeur très faible par rapport au nombre de molécules NTA greffées par unité de surface. Ce résultat, confirmé par les mesures XPS, peut être expliqué

par une déprotonisation d'une faible quantité des groupements carboxyles présents dans la molécule NTA.

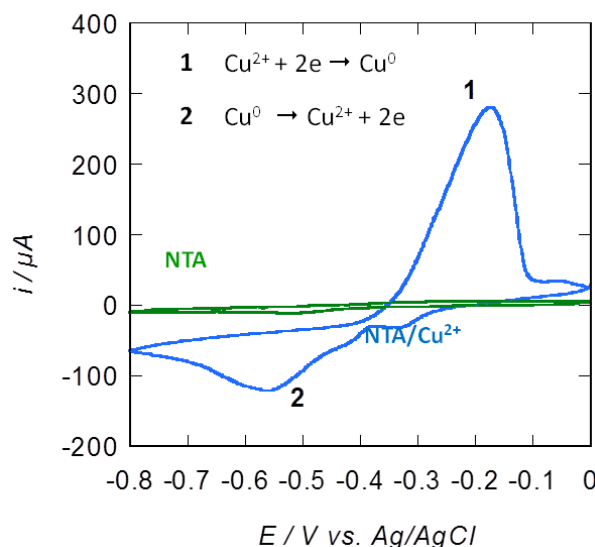


Figure 38 : Courbes de voltampérométrie cyclique effectuées dans une solution aqueuse de $\text{LiClO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) pour une surface $\text{Ti}/\text{Ag}/\text{a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}/\text{NTA}$ (gris) et après son incubation dans une solution de $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (5 mM) (noir) ; vitesse de balayage: $0,05 \text{ V s}^{-1}$.

III.4- Immobilisation des peptides histagués

Les peptides hystidinylés sont immobilisés grâce à l'interaction de l'azote du noyau imidazole (de l'histidine présent dans le peptide) avec le complexe Cu^{2+} -NTA (Figure 39). En effet, entre une molécule de NTA et 2 noyaux imidazole de l'histidine d'une biomolécule, une affinité de liaison $K = 10^{-6} \text{ M}$ est définie.¹⁰⁵ En plus, cette interface présente l'avantage d'être régénérée par l'addition d'un autre agent chélateur tel que l'acide éthylène diamine tétraacétique EDTA. Il permet la rupture de la liaison de coordination entre l'histidine et le complexe Cu^{2+} -NTA. Dans cette étude nous avons utilisé 2 peptides histagués :

- Le peptide "His-Tag-des-Arg9-Bradykinine peptide" de séquence: (Ac)-HHHHHHRPPGFSPF-(OH) (MM = 1.768 kD) synthétisé par Innobiochips à l'Institut de Biologie de Lille.
- Le peptide "P6c" de séquence: MGHHHHHHGDWKWDGGLVPRGSDEMLRELQET-NAALQDVRELLRQQVRQITFLRALLMGGRLRLARLEELERRLEE-LERRLEELERAINTVDELAALRRRLLEELAR (MM = 12.6 kD) synthétisé par Y. Yang

au département de biologie moléculaire et cellulaire de l'institut Materials Science à l'université de Connecticut, Etats Unis.

Après la fixation des ions Cu^{2+} aux interfaces $\text{Ti/Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ terminées NTA, l'immobilisation des peptides hystidinylés est réalisée entre lame et lamelle en injectant 50 μl du peptide (50 μM) dans du tampon PBS. Les peptides qui n'ont pas réagi sont éliminés par un rinçage au PBS (1X) contenant 0.1% SDS, PBS (0.2X), PBS (0.1X).

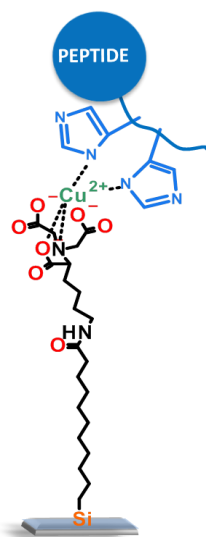


Figure 39 : Schéma réactionnel de l'interface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ terminée Cu^{2+} -NTA après l'immobilisation des peptides hystidinylés.

En premier lieu, nous avons étudié, par spectroscopie infrarouge, le spectre d'absorption correspondant au peptide histagué "Bradykinine" déposé sur un prisme ATR (spectre (a) de la Figure 40). Sur ce spectre, nous remarquons la présence de trois pics intenses à 1450, 1538 et 1663 cm^{-1} . Nous supposons que le pic à 1450 cm^{-1} est attribué aux modes de vibrations symétriques des COO^- . Le pic à 1663 cm^{-1} correspond aux liaisons C=O de l'amide I. La bande à 1538 cm^{-1} est probablement due à la présence des liaisons N-H de l'amide II, des vibrations symétriques COO^- et aux modes de vibrations du noyau aromatique.^{121,123,124} Ensuite nous avons tracé le spectre ATR-FTIR de l'interface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ terminée Cu^{2+} -NTA après son interaction avec le peptide, il est représenté par le spectre (b) de la Figure 40. L'apparition des 3 pics d'absorption confirme l'immobilisation du peptide "Bradykinine".

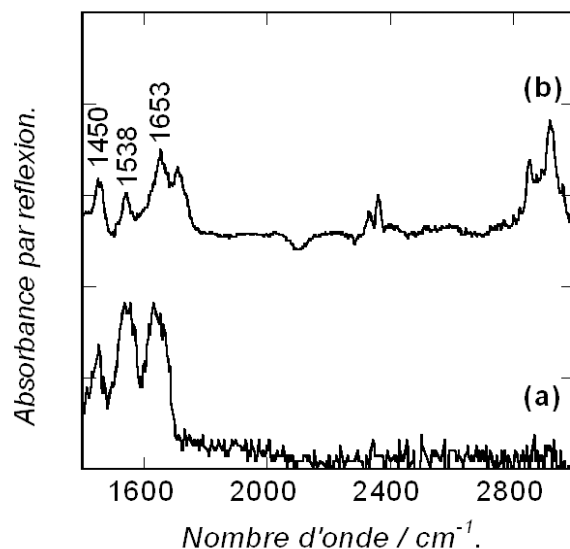


Figure 40 : Spectres ATR-FTIR du peptide Bradykinine (50 μ M) (a) déposé sur un substrat ATR couvert par un film de α -Si_{0.63}C_{0.37}:H, et (b) après son immobilisation sur une interface α -Si_{0.63}C_{0.37}:H terminée Cu²⁺-NTA.

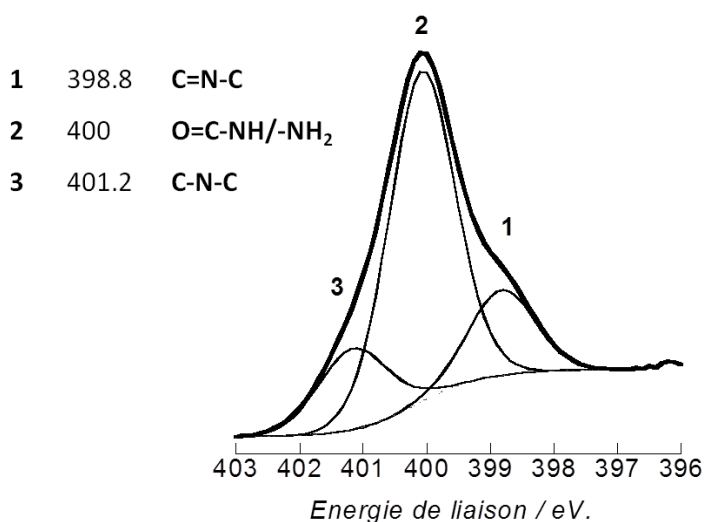


Figure 41 : Spectre XPS en haute résolution de l'élément N1s de la surface Ti/Ag/ α -Si_{1-x}C_x:H/NTA-Cu²⁺ après son interaction avec le peptide Bradykinine (50 μ M).

En complément de la caractérisation par spectroscopie infrarouge, des mesures XPS ont permis d'analyser l'interaction de l'azote du noyau imidazole du peptide "His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine" avec les ions cuivreux de l'interface SPR. La Figure 41 montre le spectre XPS en haute résolution de l'élément N1s obtenu après le contact de l'interface avec le peptide. Le pic intense à 400 eV est caractéristique des liaisons -NH₂ et O=C-NH du peptide. Les

composantes à 398.8 et 401.2 eV correspondent, respectivement, aux contributions C=N-C et C-N-C du noyau imidazole.

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la cinétique de l'interaction du noyau imidazole avec les ions Cu^{2+} , par résonance plasmonique en configuration "goutte".⁶¹ L'intérêt de cette configuration repose sur l'utilisation de petits volumes permettant d'accroître les cinétiques de diffusion et donc de réduire la durée de la réaction et le coût des produits biologiques utilisés. Les cinétiques ont été étudiées sur deux différents peptides histagués, le "His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine" et le "P6c" de masse moléculaire égale à 1.78 kD et 12.6 kD respectivement. Les courbes bleues de la Figure 42 représentent le suivi de l'immobilisation des peptides sur des surfaces SPR modifiées Cu^{2+} . La capacité de fixation pour "His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine" (graphe (a)) est de 300 RU, alors que pour "P6c" (graphe (b)) la valeur de la capacité de fixation est à peu près 3 fois plus importante. En considérant que 1 RU correspond à une densité surfacique de 1 pg mm^{-2} .¹²⁵ On trouve une densité égale à $30 \pm 5 \text{ ng cm}^{-2}$ ($N \approx 1 \times 10^{16} \text{ mol cm}^{-2}$) pour "Bradykinine", et $102 \pm 10 \text{ ng cm}^{-2}$ ($N \approx 6 \times 10^{16} \text{ mol cm}^{-2}$) pour "P6c". Cette différence dans la réponse plasmonique est liée à la grande masse moléculaire du peptide "P6c".

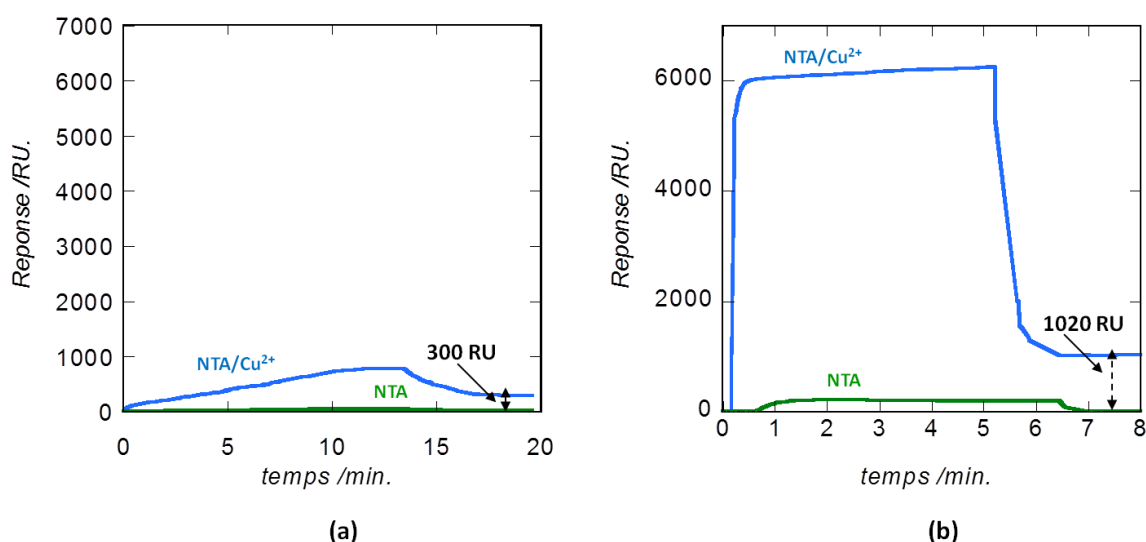


Figure 42 : Cinétique de l'interaction du peptide (A) Bradykinine ($c = 50 \times 10^{-6} \text{ M}$) et (B) P6c ($c = 50 \times 10^{-6} \text{ M}$) sur l'interface $\text{Ti/Ag/a-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ terminée NTA en présence (courbe bleue) et en absence (courbe verte) des ions cuivreux.

Les courbes vertes de la Figure 42 correspondent à la réaction des 2 peptides sur des surfaces SPR terminées NTA (sans la modification avec les ions cuivriques). Cette mesure de contrôle est nécessaire pour vérifier l'adsorption non spécifique des peptides histagués. On constate que l'absence des ions cuivriques produit une très faible réponse plasmonique comparée à celle en présence des ions.

Table 3 : Les valeurs des constantes de dissociations des 2 peptides "Bradykinine" et "P6c" déterminées par le logiciel BIAevaluation 3.2 RC1 en utilisant le modèle de 1 :1 de Langmuir.

	Bradykinine	P6c
Masse Moléculaire (kD)	1.77	12.60
K_{ass} (Ms)	0.7×10^2	4.4×10^4
k_{diss} (s⁻¹)	5×10^{-4}	106×10^{-4}
K_D (M⁻¹)	7×10^{-6}	2.5×10^{-7}

Finalement, nous utilisons le logiciel BIAevaluation 3.2 RC1 pour déterminer les constantes de dissociation à l'équilibre K_D des 2 peptides, en se basant sur le modèle 1:1 de Langmuir (**Annexes**).¹²⁶ Les valeurs obtenues sont reportées dans la Table 3. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Nieba et coll. qui ont estimé un K_D de l'ordre de 1μM sur une lame Biacore fonctionnalisée NTA.¹⁰⁵ Wegner et coll. ont déterminé une valeur de K_D du même ordre avec une surface d'or modifiée par des thiols.¹⁴⁷

III.5- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'utilisation de nouvelles surfaces SPR: lames d'argent (Ag) sur lesquelles des couches de silicium amorphe carboné (a-Si_{0.63}C_{0.37}: H) ont été déposées, pour l'immobilisation de peptides hystidinylés. Nous avons mis au point une nouvelle chimie de surface pour lier les peptides de manière covalente à la surface SPR, et selon une orientation bien définie. Cette nouvelle stratégie est basée sur la forte interaction des peptides avec les ions métalliques. Ces ions sont fixés à la surface SPR par l'intermédiaire d'un agent chélateur, l'acide nitrilotriacétique NTA.

Dans un premier temps, les couches de silicium amorphe carboné ont été fonctionnalisées avec des groupes acides. L'activation par le N-hydroxysuccinimide (NHS) a permis par la suite

de greffer la molécule NTA. Les groupements acides de la molécule NTA ont été déprotonés pour favoriser la complexation avec les ions métalliques. Les modifications chimiques de chaque étape ont été caractérisées par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR) et par spectrométrie de photoélectrons X (XPS). Ensuite, nous avons analysé, sur un banc optique SPR en configuration "goutte", la cinétique de deux peptides de différentes masses moléculaires sur les surfaces Ag/a-Si_{0.63}C_{0.37}:H terminées NTA-Cu²⁺. Et nous avons déterminé les valeurs des constantes de dissociation de ces deux peptides.

Cette nouvelle chimie de surface en 2D, développée sur ces surfaces SPR hybrides, a montré une capacité de fixation comparable à celle trouvée sur une surface 3D (utilisée dans l'appareil commercial Biacore) composée d'une couche de dextrane modifiée NTA. En général, la diffusion des molécules est plus simple sur les interfaces 2D, d'où l'intérêt de l'utilisation de cette nouvelle interface surtout pour l'étude de la cinétique des biomolécules à grande dimensions.

**CHAPITRE IV- *FONCTIONNALISATION DES
COUCHES MINCES D'OXYDE DE SILICIUM POUR LE
SUIVI DE L'INTERACTION GLYCANES-LECTINES PAR
SPR***

IV.1- Introduction

Les interactions glycanes-protéines jouent un rôle important dans l'étude des fonctions physiologiques et dans l'analyse des processus biologiques tels que la communication cellulaire, le transfert de l'information biologique entre les cellules et à travers la membrane cellulaire (Figure 43).^{50,128,129} Les glycanes ou sucres (monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides) constituent l'une des classes de molécules organiques (formule empirique : $C_m(H_2O)_n$) les plus abondantes dans la nature. Ils peuvent former des chaînes linéaires ou ramifiées qui, fixées à des protéines, participent à une grande variété des mécanismes biologiques.⁵⁰ Parmi les différentes approches développées pour comprendre et interpréter l'interaction carbohydrate-protéine, la préparation des surfaces avec des monocouches de glycanes a connu une révolution dans le domaine de la biotechnologie ces dernières années.^{130–}

133

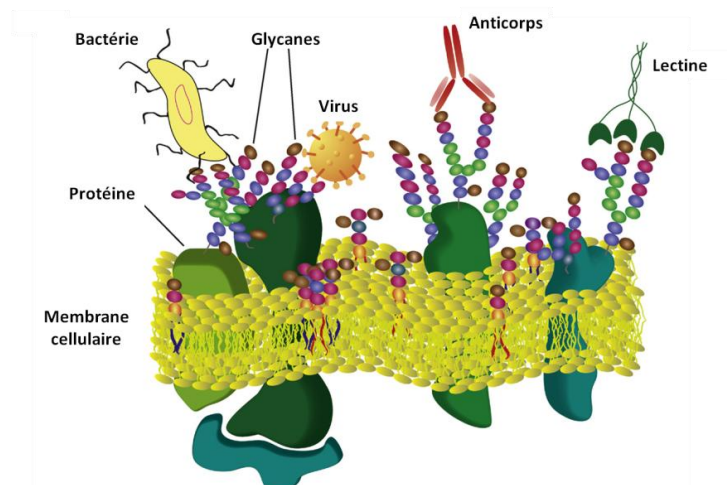


Figure 43 : Les interactions glycanes-macromolécules sur la membrane cellulaire.¹³²

Il existe différentes méthodes d'introduction des glucides à la surface. Nous pouvons citer la chimie des thiols sur des surfaces pour former des couches autoassemblées de glycanes.^{134–}
¹³⁶ Dans ce concept, la chimie "click" a aussi servi pour le greffage covalent des sucres fonctionnalisés azide ou alcyne sur des surfaces, via la réaction 1,3-dipolaire de Huisgen.^{137–139} Cependant, la préparation de ces surfaces demande un effort de synthèse en particulier pour des glycanes à structure complexe. Wang et coll. et Willats et coll. ont montré la possibilité d'immobiliser directement des glycanes intacts par physisorption.^{140,141} Mais cette méthode ne peut pas être appliquée aux sucres simples (petites dimensions) à cause des faibles interactions de van der Waals avec la surface. Pour dépasser cette limite, des monocouches d'hydrazide ou

d'amine-oxyde ont été construites pour attacher les glucides "non modifiés" selon une orientation bien spécifique via leur terminaison réduite.^{142–145} Des investigations très récentes ont montré l'intérêt de la fonctionnalisation des surfaces avec des agents photoactivables tel que l'acide azido-tétrafluorobenzoïque (ATFBA) dans l'étude de la reconnaissance biologique des protéines par les sucres.^{146–148}

La facilité et la rapidité de la photoactivation et le défi d'étudier l'affinité et la spécificité de ces interfaces où l'orientation des glycanes n'est pas spécifique, nous a motivés à appliquer cette chimie de surface sur l'interface Ti/Au/SiO_x développée par notre équipe.^{77,97} Nous étudions, par plasmonique, l'interaction lectine-glycane sur cette nouvelle interface et nous comparons la réponse à celle obtenue sur une interface Ti/Au/SiO_x modifiée par la chimie "click". La technique SPR va aussi nous servir pour analyser les paramètres cinétiques de l'interaction de deux lectines de plante sur deux substrats photocouplés respectivement avec du mannose et du lactose.

IV.2- Préparation des interfaces SPR Au/SiO_x

La Figure 44 montre le schéma de la surface hybride SPR utilisée dans la suite de ce chapitre. En premier lieu une couche de 5 nm de titane Ti et une couche de 50 nm d'or Au sont déposées par la technique de l'évaporation thermique sur un substrat de verre bien nettoyé. Ensuite les couches minces d'oxyde de silicium SiO_x sont préparées par la technique PECVD utilisant un mélange de gaz de silane SiH₄ et de protoxyde d'azote N₂O à une température égale à 300°C.^{77,97} Le protocole expérimental du dépôt est présenté dans les **Annexes**. L'ajustement de l'épaisseur de la couche est contrôlée par le temps de dépôt (vitesse de dépôt = 414 Å.min⁻¹). En SPR, une épaisseur de 5 à 10 nm (indice de réfraction n = 1.48) a montré une qualité optimale de la réponse plasmonique du point de vue de la stabilité chimique et de la sensibilité.^{27,79,149}

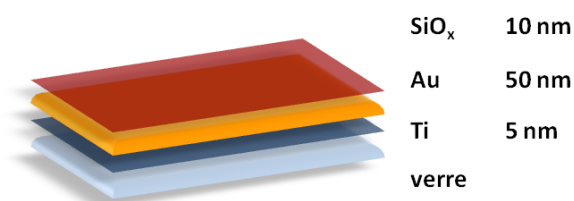


Figure 44 : Schéma de l'interface SPR verre/Ti (5nm)/Au (50 nm)/ SiO_x (10 nm).

IV.3- Fonctionnalisation et Caractérisation des surfaces SPR pour le greffage des glycanes

Nous avons fonctionnalisé chimiquement les surfaces SPR Ti/Au/SiO_x, pour un greffage covalent de glycanes "intactes" selon une nouvelle chimie de surface qui utilise des molécules photoactivables tel que l'acide azido-tetrafluorobenzoïque (ATFBA). En parallèle, nous utilisons la réaction "click" pour immobiliser des glycanes modifiées avec un alcyne sur les mêmes surfaces SPR. Ces surfaces vont nous servir comme références pour comparer les interactions protéines-glycanes, par plasmonique ultérieurement (**paragraphe IV.4**). Les protocoles expérimentaux sont décrits dans les **Annexes**.

Comme déjà mentionné dans le **paragraphe I.4.2**, la fonctionnalisation de la surface Ti/Au/SiO_x se base sur la chimie de surface des silanes.⁷⁸ En effet des monocouches organiques peuvent être formées sur des substrats terminés par des fonctions hydroxyles -OH à la surface des substrats, via les liaisons Si-O-Si. Ainsi la surface SPR hybride est tout d'abord traitée sous UV-Ozone pour éliminer les contaminations organiques et produire les groupements hydroxyles (Figure 45 (a)). Ensuite l'interface est mise sous agitation ultrasonique dans une solution d'APTMS dissoute dans un mélange de méthanol et d'eau, pour greffer les organosilanes modifiés amine -NH₂ (Figure 45 (b)).

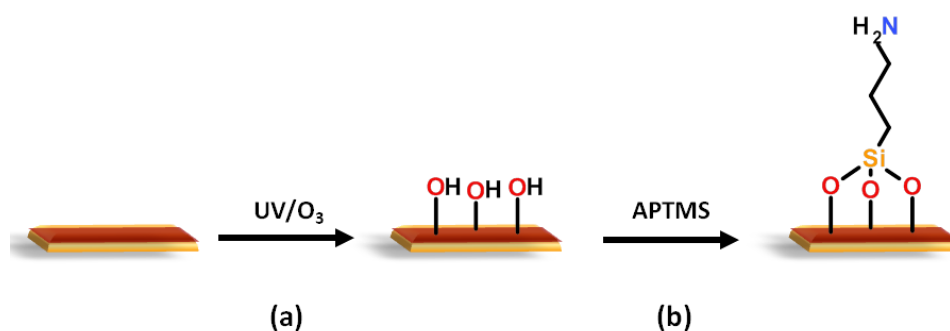


Figure 45 : Schéma des étapes de la modification chimique de la surface Au/SiO_x: (a) formation des groupements hydroxyles -OH et (b) le greffage des organosilanes fonctionnalisées amines -NH₂.

IV.3.1- Via le photocouplage

En 1969, Fleet et coll. introduisent les azido phényles comme des sondes photoactivables qui peuvent se coupler à des espèces biologiques à travers une liaison covalente stable.¹⁵⁰ Sous irradiation, l'azido phényle se décompose pour libérer le diazote N_2 et produire un nitrène. Cependant, ce composé très réactif peut subir différentes réactions pour former des produits tels que la céténimine cyclique ou un azophényle qui sont inutiles pour le marquage par photoaffinité. L'insertion des groupements -CH ou -NH est la réaction de préférence pour créer la liaison covalente (Figure 46).¹⁴⁷

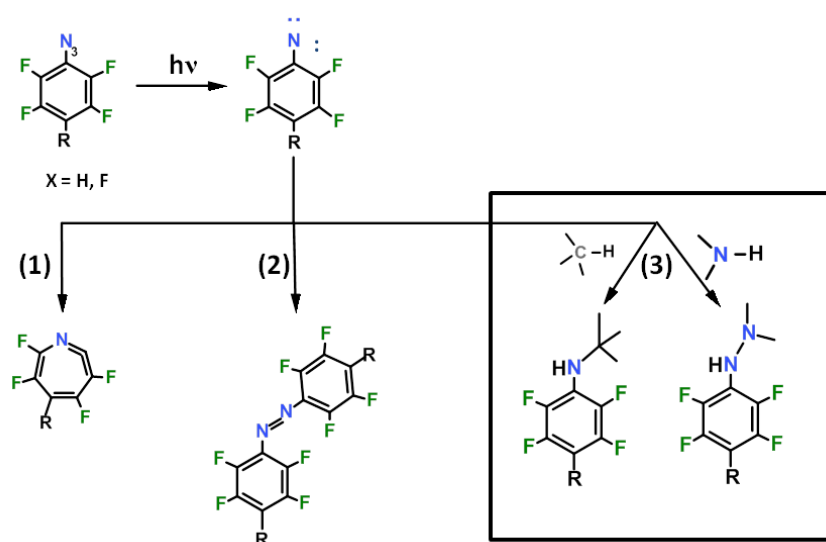


Figure 46 : Schémas réactionnels des différentes réactions du phényle avec un nitrène pour produire: (1) expansion du cycle, (2) interaction entre 2 phényles (3) insertion C-H ou N-H.

La découverte des cycles azido-phényles avec des atomes halogénés (F ou Cl) a permis d'améliorer le rendement de la réaction d'insertion¹⁵¹⁻¹⁵³ et par conséquent d'augmenter l'utilisation de ces photocoupleurs halogénés comme outils de synthèse et de fonctionnalisation. Récemment, le groupe de X. Wang a développé des nanoparticules d'or^{146,154} et d'oxyde de fer^{155,156} fonctionnalisées avec la molécule d'acide azido-tetrafluorobenzoïque (ATFBA) pour greffer des carbohydrates dédiés à l'étude des interactions glucides-protéines. Dans le même contexte, ce groupe a aussi préparé, par photocouplage, des matrices de glycanes sur des substrats d'or.¹⁴⁸

Dans notre étude, nous avons synthétisé la molécule ATFBA à partir du produit commercialisé : le méthyle pentafluorobenzoate (Figure 47).¹³³ Le protocole expérimental de la synthèse ainsi que les caractérisations par spectroscopie NMR sont présentés dans les **Annexes**.

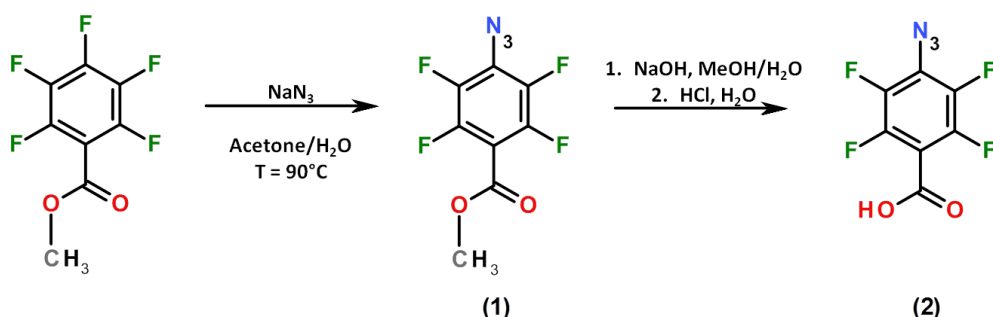


Figure 47 : Schéma réactionnel de la synthèse des produits (1) 4-Azido-2,3,5,6-tétrafluorobenzoate de méthyle et (2) 4-Azido-2,3,5,6-tétrafluorobenzoïque à partir du pentafluorobenzoate de méthyle.

La Figure 48 montre les spectres FTIR en transmittance après la synthèse. Le spectre (a) correspond à la molécule méthyle 4-Azido-2,3,5,6-tétrafluorobenzoate. Le pic intense à 2132 cm^{-1} est caractéristique des modes vibrationnels du groupement azide ($-\text{N}_3$). Les pics à 1742 et 1263 cm^{-1} correspondent respectivement aux liaisons $\text{C}=\text{O}$ de l'ester et $\text{C}-\text{F}$. Le spectre (b) correspond à l'acide 4-Azido-2,3,5,6-tétrafluorobenzoïque. La disparition du pic à 1742 cm^{-1} et l'apparition du pic à 1705 cm^{-1} associés aux liaisons $\text{C}=\text{O}$ de l'acide confirme la conversion de l'ester carboxylique en acide carboxylique. La bande à 1500 cm^{-1} correspond probablement aux liaisons $\text{C}=\text{C}$ de l'élongation du noyau aromatique. La large bande entre 3500 et 2500 cm^{-1} est due à la présence des groupements hydroxyles ($-\text{OH}$) de l'acide et/ou des molécules d'eau absorbées.

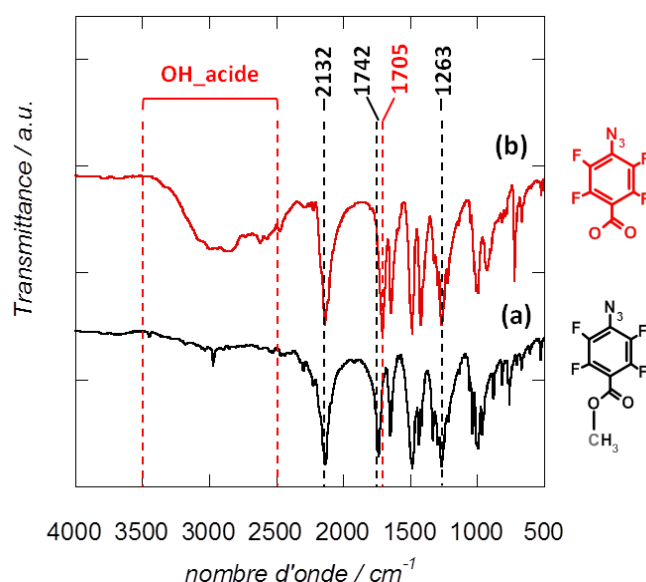


Figure 48 : Spectres FTIR en transmittance de la molécule (a) 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate de méthyle et de la molécule (b) acide 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoïque.

Nous avons aussi vérifié par FTIR le photocouplage du sucre D(+)-Mannose avec la molécule ATFBA après 5 minutes d'irradiation UV ($\lambda = 365$ nm). Dans le spectre (b) de la Figure 49, la disparition complète du pic à 2132 cm^{-1} et l'apparition des pics à 1320 et à 1047 cm^{-1} (élongations C-N et vibrations C-O du mannose respectivement) montrent bien la conversion du groupe azide ($-\text{N}_3$) de la molécule ATFBA en fonction amine après la photoréaction. La large bande avec un minimum proche de 3400 cm^{-1} est liée à la présence des groupements hydroxyles ($-\text{OH}$) du mannose et/ou des molécules de l'eau. Ces résultats FTIR confirment la synthèse du photocoupleur ATFBA et l'efficacité de la réaction pour attacher le mannose "non modifié".

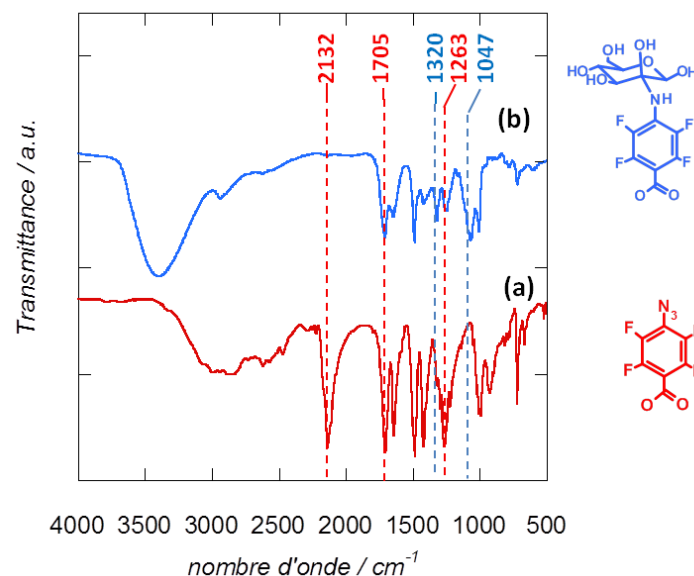


Figure 49 : Spectres FTIR en transmittance : (a) de la molécule ATFBA et (b) du produit résultant de la photoréaction du mannose sous irradiation UV à $\lambda = 365$ nm pour une durée de 5min.

Dans une deuxième partie, nous avons utilisé les surfaces Au/SiO_x/APTMS précédemment préparées (Figure 45) pour greffer la molécule synthétisée et puis immobiliser les glycanes non modifiés. Au début, la surface aminée est immergée dans un mélange d'ATFBA, DCC et DMAP préparé dans le dichlorométhane. La présence des agents DCC et DMAP permet l'introduction du groupe carboxyle de l'ATFBA sur l'amine de l'interface et de former la liaison amide. Ensuite, la surface résultante est incubée dans une solution aqueuse de mannose (D(+)-Mannose) ou de lactose (β -Lactose) puis exposée aux irradiations UV ($\lambda = 365$ nm, puissance $P = 100 \text{ mW cm}^{-2}$) (Figure 50). Il est important de signaler que durant la photoactivation, les glycanes ne sont pas forcément attachés à la surface à travers leur carbone anomérique.

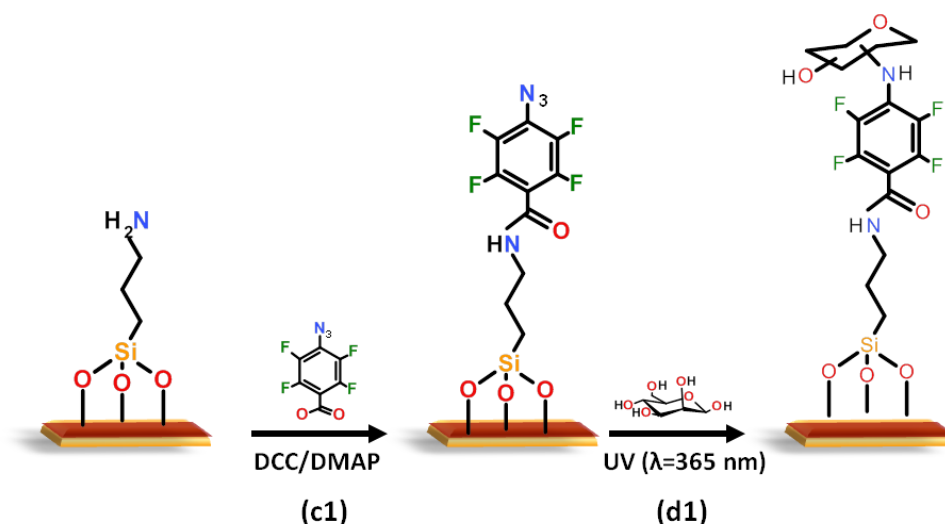


Figure 50 : Schéma réactionnel pour l'immobilisation du mannose après la réaction de silanisation sur Ti/Au/SiO_x : (c1) greffage de la molécule ATFBA en présence des agents d'activation DCC/DMAP et (d1) la photoréaction du mannose et la surface terminée azide sous irradiation UV ($\lambda = 365$ nm).

IV.3.2- Via la chimie "click"

La chimie "click" est un concept récemment proposé par Sharpless en 2001 dans le but de synthétiser une grande variété de composés à partir de réactions rapides et efficaces.¹⁵⁷ La plus connue des réactions "click" est la cycloaddition 1,3-dipolaire qui a lieu entre un alcyne et un azide pour former un composé triazole (Figure 51). En effet, cette réaction a été découverte initialement par A. Micheal en 1893¹⁵⁸ et ultérieurement étudiée par R. Huisgen (1963)¹⁵⁹ d'où le nom de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Néanmoins, le protocole expérimental produisait, à une température élevée et après un temps de réaction long, un mélange de deux triazoles régioisomères en 1,4 et 1,5. C'est en 2002 avec les groupes Sharpless¹⁶⁰ et Meldal¹⁶¹ que la réaction de Huisgen a produit un "scoop" dans la chimie "click". Ces 2 équipes ont montré séparément l'intérêt de l'utilisation du cuivre (I) comme catalyseur pour générer un seul régioisomère-1,4 du triazole, en réduisant la température et la durée de réaction. Sharpless et coll. ont aussi utilisé la méthode de la réduction d'un sel de Cu(II) par l'acide ascorbique ou l'ascorbate de sodium pour produire le Cu(I). C'est une méthode économique et qui permet d'avoir un rendement important.

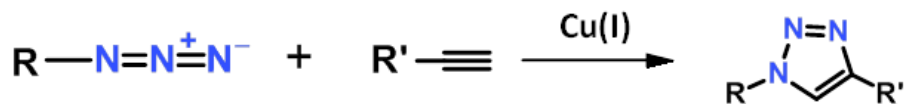


Figure 51 : Schéma de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azide et un alcyne catalysée par le cuivre (I) pour former un régioisomère-1,4 du triazole.

Sous ces conditions, le concept de la chimie "click" via la réaction de Huisgen a été aussi appliqué sur les surfaces pour une immobilisation covalente et stable des molécules ou des biomolécules.^{138,162–164} Dans cette approche, différentes stratégies ont été développées pour "clicker" des azido-carbohydrates. Par exemple, Zang et coll. ont fonctionnalisé des surfaces d'or par des monocouches autoassemblées (SAM) terminées alcynes.¹³⁷ Sun et coll. ont utilisé l' α,ω -poly(éthylène glycol) (PEG) synthétisé avec un alcyne.¹³⁸ Szunerits et coll. ont préparé des électrodes de diamant dopées bore terminées alcyne via l'acide 5-oxo-5-(prop-2-ynyloxy) pentanoïque.¹³⁹

Dans ce travail, nous utilisons la molécule d'acide azido-benzoïque (ABA) pour incorporer la fonction azide à l'interface Au/SiO_x après silanisation (Figure 45 (b)). Ceci est réalisé par la formation de la liaison amide entre la terminaison amine de l'interface et le groupe carboxyle de la molécule ABA. Dans une première étape, le groupe carboxyle est activé par l'agent de couplage N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence d'un catalyseur 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (voir **paragraphe III.3**) pour générer, par la suite, la liaison amide (Figure 52 (c2)).¹⁶⁴ La cycloaddition 1,2,3-triazole est produite en incubant la surface terminée azide dans une solution aqueuse contenant le glycane modifié avec un alcyne, en présence du sulfate de cuivre et de l'acide ascorbique (Figure 52 (d2)). Nous utilisons 2 types de glycanes : α -propargyle-mannopyranose et β -propargyle-lactose. Cette modification assure une orientation spécifique du glucide puisqu'il est attaché au triazole à travers son carbone anomérique. Les glycanes sont synthétisés par A. Siriwardena au Laboratoire des Glucides à l'Université de Picardie Jules Vernes d'Amiens.

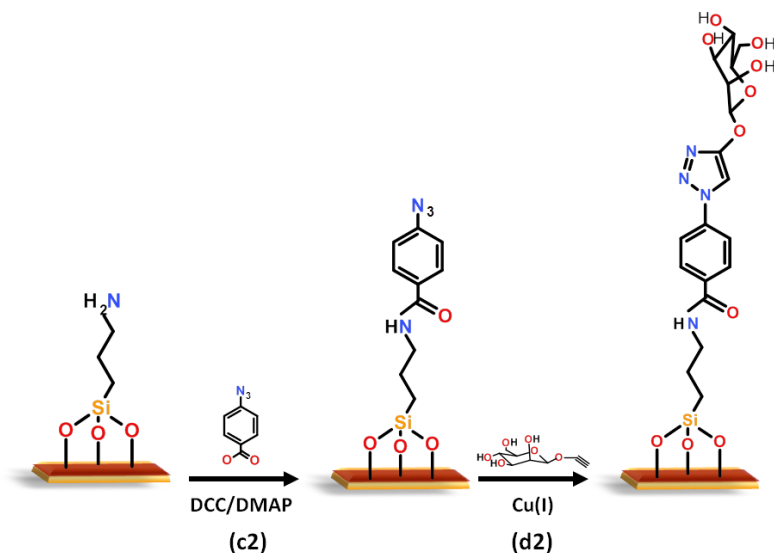


Figure 52 : Schéma réactionnel pour l'attachement du mannose triple liaison après la réaction de silanisation sur $\text{Ti}/\text{Au}/\text{SiO}_x$: (c2) greffage de la molécule ABA en présence des agents d'activation DCC/DMAP et (d2) la réaction du mannose triple liaison et la surface terminée azide selon la chimie "click".

Pour vérifier et confirmer le greffage des glucides, par voie chimie "click" ou par photocouplage, nous avons effectué des mesures XPS (voir les **Annexes**) après chaque étape de la modification chimique des interfaces SPR. La Figure 53 montre les spectres XPS en haute résolution des éléments C1s et N1s des surfaces après la réaction de silanisation ($\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{APTMS}$), après la modification avec l'acide azido-benzoïque ($\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{ABA}$) et avec l'acide azido-tetrafluorobenzoïque ($\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{ATFBA}$). La Table 4 présente les liaisons associées aux composantes des spectres C1s et N1s des surfaces fonctionnalisées.

Le spectre C1s de la surface terminée amine ($\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{APTMS}$) peut être décomposé en 3 pics. Le pic à 285 eV est caractéristique des liaisons C-C/C-H, le pic à 286.45 eV correspond aux liaisons C-N et la troisième composante à 288.81 eV est associée à la double liaison C=O. La présence de ce dernier pic, de très faible intensité comparée aux 2 autres, est due probablement à des contaminations ou des impuretés à la surface. Le spectre N1s montre 2 pics situés aux énergies de liaison de 399 eV et de 400.8 eV qui sont attribués à l'atome azote des groupes $-\text{NH}_2$ et $-\text{NH}_3^+$, respectivement. Le rapport expérimental du nombre des atomes de carbone sur celui de l'azote C/N est de 3.2. Ce résultat légèrement supérieur à

la valeur théorique qui est égale à 2 peut être interprété par des impuretés qui se trouvent à la surface.

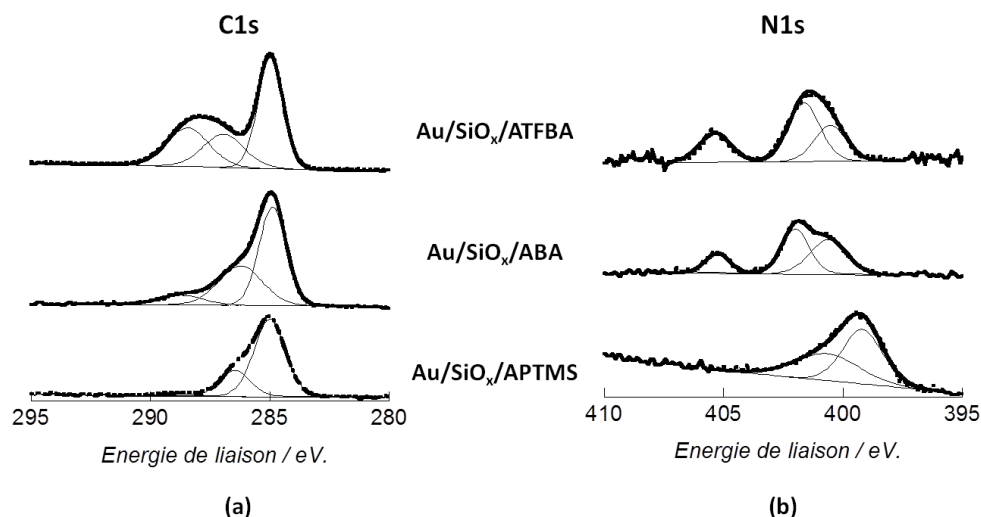


Figure 53 : Spectres XPS en haute résolution des éléments (a) C1s et (b) N1s des surfaces $\text{Ti}/\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{APTMS}$, $\text{Ti}/\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{ABA}$ et $\text{Ti}/\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{ATFBA}$.

Après l'interaction de l'acide azido-benzoïque (ABA) avec l'amine de l'interface $\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{APTMS}$, le spectre XPS C1s de l'interface $\text{Au}/\text{SiO}_x/\text{ABA}$ révèle une augmentation de l'intensité de la composante à 288.7 eV liée à la présence de la liaison C=O du groupe carboxyle. Nous pouvons estimer le rendement de la réaction en calculant le rapport expérimental entre les liaisons C-N et les liaisons C=O. Théoriquement ce rapport est égal à 4, alors que dans notre mesure nous trouvons une valeur de 3.7. Nous pouvons supposer qu'une faible quantité des groupes amines n'a pas réagi. Le spectre N1s de cette interface montre 3 pics, situés à 400.6, 401.9 et 405.3 eV, attribués à l'azote des fonctions $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$, $\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$ et $\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$, respectivement. Le rapport des 3 attributions, théoriquement égal à 1:2:1, est de 1.6:2.6:1. Ce rapport confirme l'existence des groupes $-\text{NH}_2$ et $-\text{NH}_3^+$ qui n'ont pas réagi et/ou la décomposition de l'azide de la molécule ABA sous les rayons X durant la mesure.¹⁶⁵

Dans le spectre C1s de la surface Au/SiO_x/ATFBA, le pic à 288.4 eV est beaucoup plus intense que dans le cas de l'interface Au/SiO_x/ABA. Ceci est dû à l'apparition des liaisons C-F avec les liaisons C=O. Afin d'évaluer le taux de la conversion des fonctions amines en fonctions amides pour lier la molécule ATFBA à l'interface SPR, on calcule le rapport [(C-F) + (C=O)]/(C-N). Dans cette mesure, on trouve une valeur égale à 1.19 qui est très proche de la valeur théorique égale à 1.25. Ce résultat indique un rendement de la réaction proche de 100%. Le spectre en haute résolution de l'élément N1s présente les mêmes attributions que celles de la surface terminée azide de l'ABA mais avec un rapport égal à 1:2:1. Ce rapport montre bien le succès de l'interaction de l'amine de l'interface avec les groupes carboxyles de l'acide azido-tetrafluorobenzoïque.

Table 4 : Les attributions associées aux énergies de liaison des composantes des spectres XPS en haute résolution des éléments C1s et N1s de la Figure 53.

Interface	C1s		N1s	
	Energie de liaison (eV)	Attribution	Energie de liaison (eV)	Attribution
Au/SiO _x /APTMS	285.0	C-C/C-H	399.0	-NH ₂
	286.4	C-N/C-O	400.8	-NH ₃ ⁺
	288.8	C=O		
Au/SiO _x /ABA	284.9	C-C/C-H	400.6	-NH-C=O/-NH ₂
	286.2	C-N	401.9	Ar-N=N ⁺ =N ⁻ /-NH ₃ ⁺
	288.7	C=O	405.2	Ar-N=N ⁺ =N ⁻
Au/SiO _x /ATFBA	285.0	C-C/C-H	400.6	-NH-C=O/-NH ₂
	286.9	C-N	401.5	Ar-N=N ⁺ =N ⁻
	288.4	C-F/C=O	405.3	Ar-N=N ⁺ =N ⁻

La Figure 54 (a) présente le spectre XPS N1s de la surface Au/SiO_x/ABA après le greffage du sucre mannose terminé par une fonction alcyne par la chimie "click". Le pic situé à l'énergie de liaison de 400.4 eV correspond aux fonctions -NH-C=O/-N=N- et le pic à 402.6 eV est attribué aux liaisons -C-N-. Ces 2 composantes ainsi que le rapport de 1:3.2 confirme la conversion de l'azide de la molécule ABA en un cycle triazole. La composante à 399.2 eV indique la présence de liaisons -NH₂ qui sont dues aux fonctions amines qui n'ont pas réagi et/ou à la décomposition de l'azide durant la réaction de chimie "click".

La Figure 54 (b) montre le spectre N1s de la surface terminée azide de la molécule ATFBA après son interaction avec le sucre mannose non modifié, sous irradiation UV ($\lambda = 365$ nm). Dans ce cas, les pics à 402.3 et à 400.6 eV sont caractéristiques des liaisons -C-NH- et -NH-C=O, respectivement. La présence des liaisons -NH₂ situées à l'énergie de 399.2 eV peut être expliquée par l'hydrolyse de l'azide en présence de l'eau durant la photoactivation. Ici le rapport est de 1 :1 :0.6.

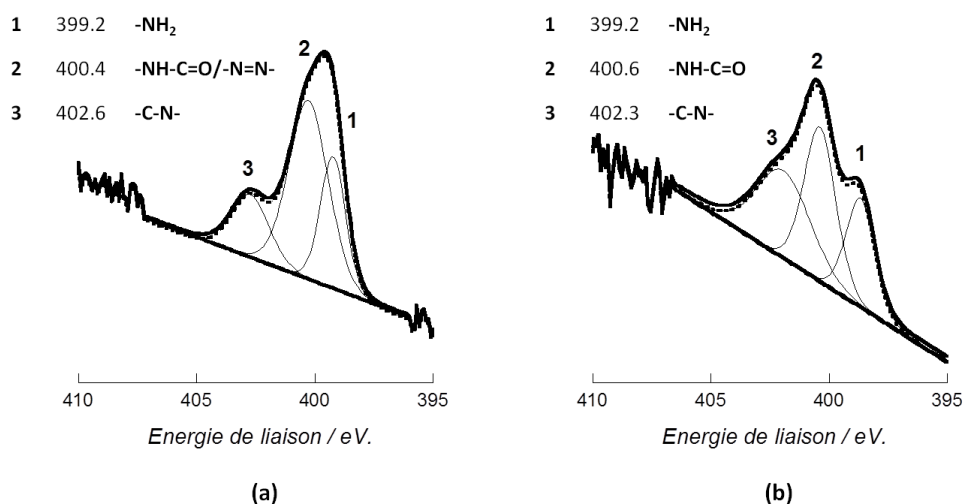


Figure 54 : Spectre en haute résolution de l'élément N1s des surfaces modifiées avec le sucre mannose par (a) voie chimie click et (b) photocouplage.

Il était important en outre de comparer le taux de couverture des surfaces SPR préparées *via* la photoréaction et la chimie "click". Dans cette approche, Grant et coll. ainsi que Szunerits et coll. ont montré que la densité surfacique des glucides greffés influence la capacité de l'immobilisation des protéines sur les surfaces.^{136,139} Dans cette analyse, on procède à la méthode calorimétrique "acide sulfurique-phénol" pour analyser la quantité de glucides à la surface. C'est une méthode simple et très sensible qui se décompose en deux étapes. La réaction initiale est la déshydratation des glucides en présence de l'acide fort, suivie par la formation de l'hydroxyméthylfurfural (HMF). Ce produit avec le phénol produit un composé complexe de couleur orange-jaune (Figure 55).¹⁶⁶ En spectrométrie UV-Visible, ce produit coloré possède une absorbance spécifique au glucide analysé et proportionnelle à sa concentration. Dans le cas du mannose et du lactose, l'absorbance est à 495 nm.^{167,168} Le protocole expérimental est détaillé dans les **Annexes**.

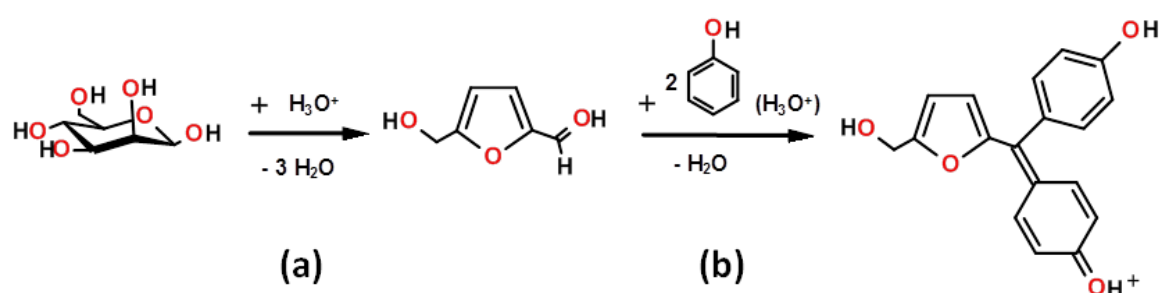


Figure 55 : (a) la formation de l'hydroxyméthylfurfural à partir de la déshydratation du mannose en présence d'un acide concentré tel que l'acide sulfurique ; (b) ce produit se condense avec 2 molécules de phénol (en milieu acide) pour former un composé de couleur orange-jaune.

La Figure 56 montre les absorbances obtenues à différentes concentrations du mannose et du lactose, par la méthode "acide sulfurique-phénol". En appliquant cette méthode sur les surfaces, nous pouvons déterminer, d'après les courbes de calibration, approximativement les densités surfaciques des glycanes greffés. Les valeurs sont présentées dans la Table 5. Nos résultats sont similaires à celles reportées par Liang et coll. et Park et coll. qui ont obtenu des quantités de glycanes à la surface entre 10^{14} et 10^{15} molécules cm^{-2} .^{126,145}

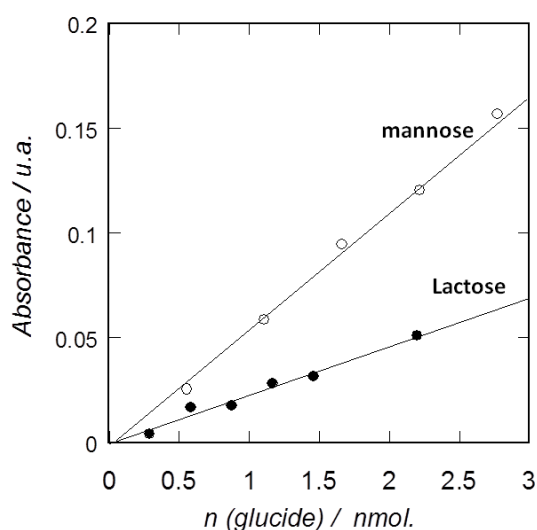


Figure 56 : Courbes de calibration du mannose et du lactose obtenues par la méthode acide sulfurique-phénol.

Table 5 : La densité surfacique des glycanes mannose et lactose greffés par photocouplage et par la chimie "click".

Interface	Nombre de moles (nmol)	Densité surfacique (molécules.cm ⁻²)
<i>Au/SiO_x/ATFBA/mannose</i>	0.9 ± 0.3	(5.4 ± 2.1) x 10 ¹⁵
<i>Au/SiO_x/ABA/mannose</i>	0.7 ± 0.4	(4.2 ± 2.1) x 10 ¹⁵
<i>Au/SiO_x/ATFBA/lactose</i>	0.5 ± 0.3	(2.9 ± 1.2) x 10 ¹⁴
<i>Au/SiO_x/ABA/lactose</i>	0.5 ± 0.4	(3.1 ± 0.2) x 10 ¹⁴

IV.4- Etude de l'interaction glycanes-lectines par SPR

Les surfaces préalablement fonctionnalisées et caractérisées sont utilisées par la suite pour étudier les interactions lectines-glucides par la résonance plasmonique. Les lectines sont des protéines qui se trouvent dans les plantes, les microorganismes, les animaux et les êtres humains. Elles reconnaissent et s'attachent aux glucides d'une façon spécifique via des liaisons hydrogène, de van der Waals et des interactions hydrophobes.^{50,169} Dans ce travail, nous utiliserons deux lectines provenant des plantes: la lectine de la lentille (LC) (Figure 57 (a)) et la lectine de l'arachide (PNA) (Figure 57 (b)). La lectine LC (M ≈ 46 kDa) possède une affinité spécifique aux monosaccharides (mannose, glucose,...) alors que la lectine PNA (M ≈ 110 kDa) reconnaît particulièrement les glycanes terminés par un résidu de galactose comme par exemple le lactose (β-D-galactopyranoside-(1→4)D-glucose).¹⁷⁰⁻¹⁷²

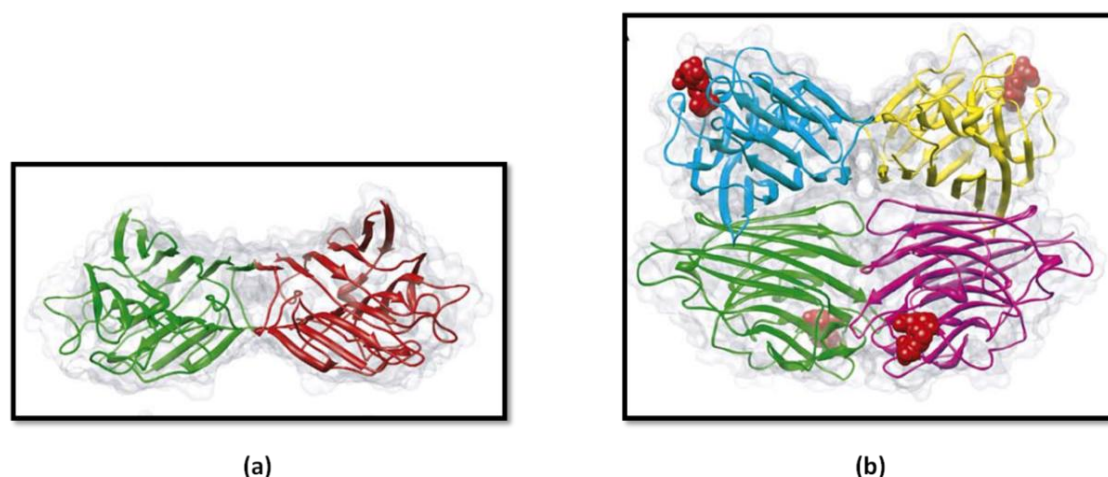


Figure 57 : Structures tridimensionnelles de (a) la lectine de la lentille LC et (b) la lectine de l'arachide PNA.¹⁷²

Dans les 2 cas, le suivi en temps réel de l'évolution de la réaction lectine-glucide est enregistré après l'injection d'une solution de lectine/PBS dans la cuvette de l'appareil commercial "Autolab" (voir Figure 11).

Pour vérifier la conservation des sites de reconnaissance du sucre greffé sur le substrat Ti/Au/SiO_x après le photocouplage, il était nécessaire de comparer l'interaction lectine-sucre, par SPR, sur les substrats préparés par la chimie "click" et par couplage avec ATFBA sous irradiation UV. Rappelons que, par la réaction "click", le sucre est attaché à la surface selon une orientation bien spécifique (via son carbone anomérique) qui permet de garder ses sites actifs accessibles.¹³⁹ Les cinétiques (a) et (b) de la Figure 58 représentent les interactions du lectine "*Lens culinaris*" (LC) avec le sucre "mannose" immobilisé sur les substrats Au/SiO_x/ATFBA et Au/SiO_x/ABA, respectivement. Dans cette mesure, la concentration de la lectine LC est de 10 µg/ml et le tampon utilisé est une solution de PBS. Nous remarquons une cinétique élevée dans les 2 cas, avec un déplacement en RU plus important dans la courbe (a). Les cinétiques montrent une forte association de la lectine aux 2 surfaces SPR modifiées avec le sucre. Ceci indique que le mannose, couplé à la surface via le pefluoro-azide, a préservé son affinité (les sites d'interactions avec le lectine sont restés intacts) après le photocouplage.

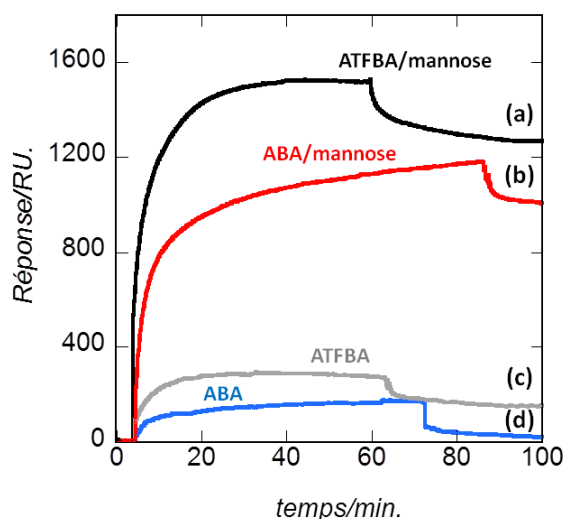


Figure 58 : Les courbes SPR de la reconnaissance biologique de la protéine "Lens Culinaris" (10 µg/ml) sur les surfaces (a) Ti/Au/SiO_x/ATFBA/mannose, (b) Ti/Au/SiO_x/ABA/mannose, (c) Ti/Au/SiO_x/ATFBA et (d) Ti/Au/SiO_x/ABA.

Cependant, il était important d'effectuer des mesures de contrôle pour étudier l'adsorption non spécifique de l'interface SPR terminée ATFBA. Les courbes (c) et (d) de la Figure 58 montrent que, sans le couplage avec le sucre, la réponse du lectine LC est très faible sur les substrats Au/SiO_x/ATFBA et Au/SiO_x/ABA, respectivement. Ceci indique que l'adsorption physique est négligeable.

Ensuite, nous avons testé la réponse plasmonique de la surface préparée avec le sucre mannose, par photocouplage, après sa régénération avec de l'acide phosphorique (0.1 M) pour 30 secondes à 1 minute. L'addition de l'acide permet de rompre les liaisons lectine-sucre (dans ce cas LC-mannose) et de retrouver la chimie de surface avant l'interaction. La Figure 59 représente l'enregistrement de la cinétique de l'immobilisation de la lectine LC (injection 10 µg/ml) sur l'interface SPR Ti/Au/SiO_x/ATFBA/mannose avant et après injection de l'acide phosphorique. Ce test montre clairement que la surface régénérée conserve sa reconnaissance biologique envers la lectine LC et possède la même affinité d'attachement.

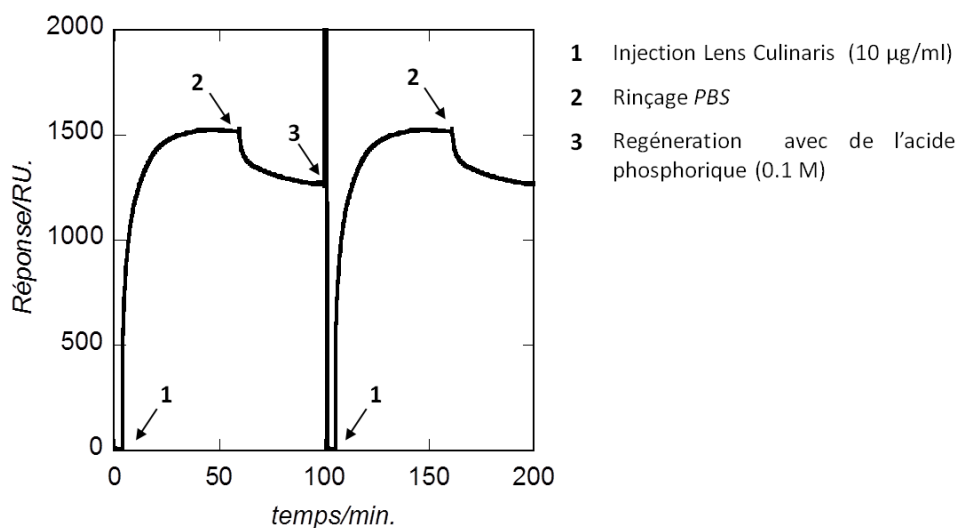


Figure 59 : La cinétique de l'immobilisation de la protéine "Lens Culinaris" (10 µg/ml) avant et après régénération de la surface Ti/Au/SiO_x/ATFBA/mannose avec de l'acide phosphorique (0.1 M).

Nous avons également étudié la spécificité de ces interfaces SPR. Pour cela nous avons préparé, par voie photochimique, deux substrats : Au/SiO_x/ATFBA/mannose et Au/SiO_x/ATFBA/lactose et nous avons étudié la cinétique de l'interaction de deux lectines : "Lens culinaris" (LC) et "Arachis hypogaea" (PNA), sur ces 2 substrats (Figure 60). Le tampon utilisé dans ces mesures est le PBS et les concentrations des lectines injectées sont égales à 10 µg/ml. Dans la littérature, la lectine LC possède une affinité plus importante pour les monosaccharides avec une constante de dissociation K_D de l'ordre des micromolaires. A titre d'exemple, Szunerits et coll. ont trouvé une valeur de K_A égale à $2.63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ sur des électrodes de diamant dopé bore.¹³⁹ Karlik et coll. ont déterminé, par des mesures sur Biacore 3000, des constantes de dissociation K_D entre 10^{-5} et 10^{-7} M en utilisant une lame "C1".¹⁷³ Pour la lectine PNA spécifique aux disaccarides tels que le lactose, les valeurs de K_A sont aussi de l'ordre des micromolaires.¹⁷⁴

La Figure 60 (a) montre que la réponse plasmonique, sur le substrat modifié mannose, obtenue avec la lectine PNA est négligeable comparée à celle obtenue en injectant la lectine LC, tandis que la Figure 60 (b) montre une réponse en RU très élevée de la PNA par rapport à LC sur le substrat modifié lactose. La Table 6 présente les valeurs des constantes d'association K_A relatives à chaque mesure. Ces valeurs ont été déterminées à l'aide du logiciel Biaevaluation 3.2 RC1 et en prenant le modèle 1:1 de "Langmuir" comme modèle

d'interaction (voir **Annexes**) .¹²⁶ Nous pouvons constater que ces valeurs sont comparables à celles trouvées dans la littérature.

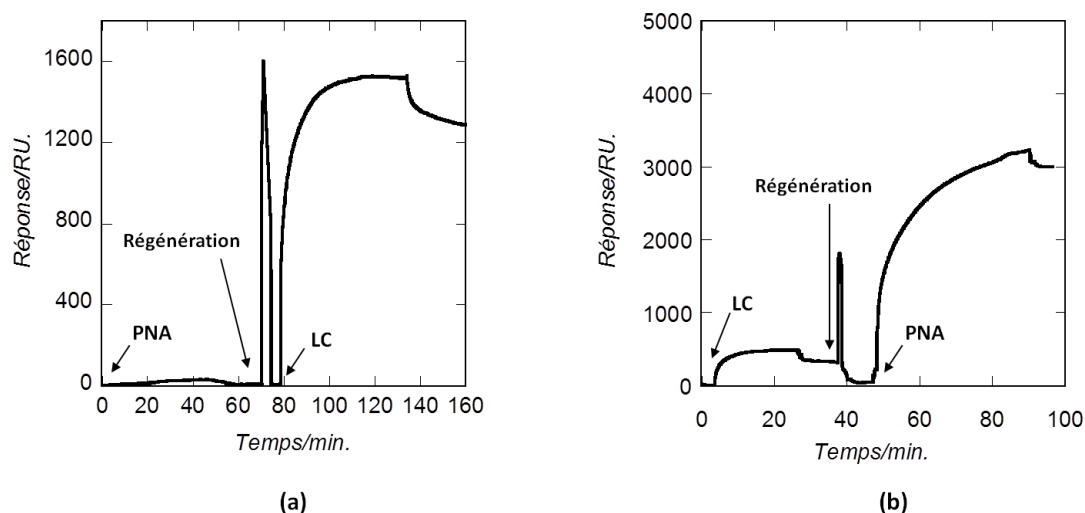


Figure 60 : Cinétiques de l'immobilisation des lectines PNA et LC ($C = 10 \mu\text{g/ml}$), par SPR, sur les interfaces modifiées (a) mannose et (b) lactose, après la photoréaction avec ATFBA. L'acide phosphorique (0.1 M) est utilisé pour régénérer la surface.

Table 6 : Les valeurs des constantes d'association des interactions lectine-sucre de la Figure 60. Les valeurs sont déterminées par le logiciel BIAevaluation 3.2 RC1 en utilisant le modèle 1 :1 de "Langmuir".

Interaction	Adsorption	$K_A (\text{M}^{-1})$
PNA-mannose	non spécifique	2.2×10^4
PNA-lactose	spécifique	5.6×10^6
LC-mannose	spécifique	9.2×10^6
LC-lactose	non spécifique	4.1×10^4

Finalement, nous avons utilisé ces 2 complexes LC-mannose et PNA-lactose pour déterminer la limite de détection LOD. Rappelons que la LOD est un des facteurs à étudier pour analyser la sensibilité (**paragraphe I.5**) du capteur SPR. La Figure 61 montre l'évolution de la réponse plasmonique en RU en fonction de l'addition successive des lectines LC (courbe (a)) et PNA (courbe (b)) sur les interfaces modifiées mannose et lactose, respectivement. Nous estimons cette valeur égale à $3 \mu\text{g/ml}$ ($C = 65 \text{ nM}$) pour LC. Cette réponse est très proche à celle trouvée par Linman et coll. qui ont utilisé l'interaction biotine-avidine pour attacher les carbohydrates à un substrat d'or.¹⁷⁵ Wang et coll. ont trouvé une

valeur de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en utilisant la technique imagerie SPRi et de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ par spectroscopie de fluorescence induite par laser qui exige la synthèse de lectines avec des fluorophores.¹⁴⁸ Avec le lectine PNA, la LOD est inférieure ou égale à $1 \mu\text{g/ml}$ ($C = 9 \text{ nM}$). Ce résultat montre une meilleure sensibilité de détection par rapport aux valeurs citées dans la littérature.¹⁷⁴

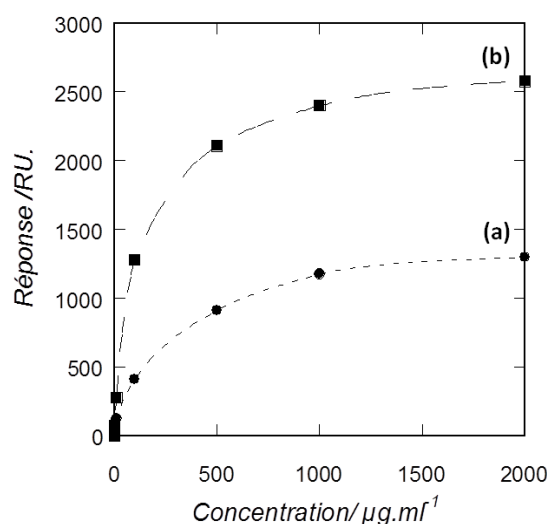


Figure 61 : La variation de la réponse plasmonique en fonction des concentrations des lectines: (a) LC sur l'interface Au/SiO_x/ATFBA/mannose et (b) PNA sur l'interface Au/SiO_x/ATFBA/lactose.

IV.5- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié, par plasmonique, la reconnaissance biologique des lectines (analytes) par des glycanes (ligands) non modifiés sur des substrats SPR d'or couverts par des fines couches d'oxyde de silicium. Nous avons réalisé le greffage covalent des glycanes via un agent photocoupleur : l'acide azido-tetrafluorobenzoïque ATFBA.

Pour vérifier l'efficacité de l'interaction analyte-ligand sur cette nouvelle interface, nous avons comparé la réponse de la cinétique de l'interaction de la lectine LC avec le mannose obtenue sur celle-ci à celle obtenue sur une lame Au/SiO_x modifiée, par la chimie "click", avec des glycanes synthétisés avec un alcyne. Les résultats similaires indiquent que les sites actifs du mannose sont restés intacts et accessibles par la lectine, après la photoréaction. De plus, cette interface maintient sa bioactivité envers la lectine après sa régénération avec l'acide phosphorique et montre une adsorption non spécifique négligeable. Nous avons aussi

montré la spécificité du couplage en analysant l'immobilisation des lectines LC et PNA sur deux substrats fonctionnalisés avec du mannose et lactose. L'affinité du lectine LC au mannose est prouvée par la valeur de la constante d'association $K_A = 9.23 \pm 0.8 \times 10^6$ alors qu'elle est de l'ordre de 10^4 dans le cas du PNA. Sur la surface Au/SiO_x/lactose, nous avons déterminé une $K_A = 5.56 \pm 0.8 \times 10^6$ avec le PNA qui est supérieure à celle avec LC ($4.06 \pm 0.8 \times 10^4$). Finalement, pour analyser la sensibilité, nous avons calculé les limites de détection LOD des systèmes LC-mannose ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) et PNA-lactose ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Les valeurs montrent un bon accord avec celles trouvées dans la littérature.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis leurs premiers usages au début des années 80, les capteurs SPR ont connu une évolution importante et rapide surtout dans la détection et l'étude des interactions biomoléculaires. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux trois aspects de la détection plasmonique : l'aspect optique du capteur SPR, l'aspect chimique des interfaces métalliques et l'aspect biochimique et biologique des interactions ligand-analyte.

La première partie de ce travail de thèse concerne la validation d'un banc optique SPR en configuration "goutte". Ainsi la reproductibilité des mesures a été acquise grâce à l'utilisation d'un dispositif en téflon à 2 ou 4 cuvettes. Ce système présente l'avantage de pouvoir visualiser plusieurs plasmons en même temps et la possibilité de disposer d'une mesure de référence en parallèle avec d'autres mesures de cinétique par SPR. L'étalonnage du banc a été réalisé avec un liquide biologique à différentes concentrations. Dans ce contexte, nous avons pu déterminer le facteur de conversion du déplacement angulaire $\Delta\theta$ en RU qui est l'unité de mesure de l'appareil commercial SPR Biacore 3000 ; Ce facteur est égal à 10^{-4} degré/RU. De plus, grâce à l'aspect "ouvert" du banc, nous avons mis en place différents montages tels que le dispositif intégré sans prisme du type "Lab on Chip" mais aussi le dispositif de couplage avec la base d'électromouillage EWOD qui n'est pas décrit dans ce travail et qui fait partie de travail de thèse de Guillaume Perry.¹⁷⁶

Parallèlement à ces travaux, ce banc a aussi servi comme plateforme de détection de l'interaction des peptides histagués avec les ions cuivreux. Pour cela nous avons utilisé une interface SPR d'argent couverte par un film de 5 nm de silicium amorphe carboné ($\text{a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}:\text{H}$). La surface hydrogénée était fonctionnalisée par hydrosilylation, en utilisant la liaison Si-C, pour greffer d'une façon covalente des monocouches organiques terminées acide. Nous avons ainsi immobilisé les molécules NTA pour chélater ultérieurement les ions Cu^{2+} . Par la suite, les mesures SPR sur le banc en configuration "goutte" ont permis de comparer la réponse de deux peptides histagués (de masse moléculaire différente) sur l'interface Ag/ $\text{a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}/\text{Cu}^{2+}$ et de déduire les constantes de dissociation K_D .

Dans la troisième partie de ce manuscrit, nous avons mis en évidence une nouvelle chimie de surface en 2D pour attacher d'une façon covalente des glycanes sans aucune modification chimique de leurs structures. Cette chimie de surface a été développée sur une lame SPR d'or revêtue par un film de 10 nm d'oxyde de silicium (SiO_x) pour étudier la cinétique de l'interaction lectine-glycane par plasmonique. La présence des groupements hydroxyles à la

surface de l'oxyde a permis l'immobilisation de l'acide azido-tetrafluorobenzoïque (ATFBA), par l'intermédiaire d'un organosilane aminé. L'ATFBA est un agent photocoupleur qui, sous irradiation UV, permet de lier le glucide à la surface SPR. Nous avons montré la validité et l'efficacité de cette nouvelle stratégie en comparant les résultats SPR de la reconnaissance biologique glycane-lectine avec ceux obtenus après la fonctionnalisation de la surface Au/SiO_x par la chimie "click". Nous avons aussi prouvé la conservation de la bioaffinité de l'interface après sa régénération. La spécificité a été confirmée par les constantes d'association K_A déterminées à partir des courbes de cinétiques de deux lectines LC et PNA sur deux substrats préparés avec du mannose et lactose. Les systèmes LC-mannose et PNA-mannose ont montré des limites de détection LOD de quelques µg mL⁻¹.

Les difficultés que nous avons rencontrées durant la réalisation des travaux liés au banc SPR en configuration "goutte" nous ont permis de tirer quelques réflexions pour le développement futur : Les pertes de puissance lumineuse lors des réflexions sur les deux réseaux du dispositif "Lab on Chip" supposent une modification de la technique de collage des réseaux sur la lame de verre pour rendre ce dispositif exploitable avec une diode laser de faible puissance peu coûteuse. Rappelons que ce concept a pour but de simplifier l'équipement scientifique et d'automatiser son usage mais aussi de réduire les coûts des consommables et donc des analyses biochimiques et médicales. Dans cet objectif, différentes réactions de la reconnaissance biologique peuvent être envisagées après une fonctionnalisation chimique de la surface métallique.

Les perspectives liées à la chimie de surface développée sur les surfaces SPR Ag/a-Si_{0.63}C_{0.37}:H et Au/SiO_x sont nombreuses. Le modèle de l'interaction des ions cuivreux avec l'histidine peut être appliqué pour la détection de biomolécules à plus grandes dimensions comme par exemple les protéines histaguées. La validation du concept de la préparation des interfaces SPR modifiées avec des glycanes est très prometteuse pour étudier d'autres interactions glycanes-protéines.

Récemment, nous avons débuté des essais sur l'analyse de la réponse plasmonique de différents systèmes biologiques (streptavidine-biotine, hybridation de l'ADN,...) sur une nouvelle surface SPR hybride : monocouche de graphène déposée sur un substrat d'or (Au/Gr) par la technique du transfert à sec connue sous le nom : "Dry Transfer technique" Ces interfaces ouvrent des pistes prometteuses dans le domaine de la biodétection grâce à la structure moléculaire du graphène.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Hof, M.; Hutterer, R.; Fidler, V. *Fluorescence Spectroscopy in Biology*; Springer, Ed.; Verlag Berlin, 2005.
- (2) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299–304.
- (3) Kretschmann, E.; Raether, H. *Zeitschrift für Naturforschung A* **1968**, 23, 2135–6.
- (4) Johansson, B., Lofas, S. & L. G. *Analytical Biochemistry* **1991**, 198, 268–277.
- (5) Jonsson, U., Faigierstam, L., Ivarsson, B., J.; B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., P.; B., Roos, H., Ronnberg, I., Sjolander, S., S.; E., Stathlberg, R., Urbaniczky, C., O.; H. & Malmqvist, M. *Bio Techniques* **1991**, 11, 620–627.
- (6) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 10596–10604.
- (7) Dostalek, J.; Homola, J.; Miler, M. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 107, 154–161.
- (8) Wang, Y.; Knoll, W.; Dostalek, J. *Analytical chemistry* **2012**, 84, 8345–50.
- (9) Beaugeois, M. *Modélisation et Caractérisation de composants optiques submicroniques pour le démultiplexage en longueur d'onde Application de la résonance de plasmon de surface à la detection d'espèces biologiques en goutte*; Thèse de doctorat de l'Université des Sciences et Technologies Lille 1, 2007.
- (10) Wood, R. W. *Proceeding of the Physical Society of London* **1902**, 269–275.
- (11) Fano, U. *Journal of Optical Society of America* **1941**, 31, 213.
- (12) Otto, A. *Zeitschrift für Physik* **1968**, 216, 398–410.
- (13) Raether, H., E. *SPR on smooth and rough surfaces and on gratings*; Springer-Verlag: Berlin, 1988.
- (14) Boardman, A. D. *Electromagnetic Surface Modes*; Wiley: Chichester, U.K., 1982.
- (15) Petit, R. *Electromagnetic theory of gratings*; Springer-Verlag, 1980.
- (16) Homola, J. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2003**, 377, 528–39.
- (17) Ordal, M. A.; Long, L. L.; Bell, R. J.; Bell, S. E.; Bell, R. R.; Alexander, R. W.; Ward, C. A. *Applied optics* **1983**, 22, 1099–20.
- (18) Homola, J. *Surface Plasmon Resonance Biosensors*; Springer-Verlag: Berlin, 2006; Vol. 4

- (19) Knoll, W. *Annual review of physical chemistry* **1998**, 49, 569–638.
- (20) Lecaruyer, P.; Canva, M.; Rolland, J. *Applied Optics* **2007**, 46, 2361–2369.
- (21) Lofas, S.; Johnsson, B.; Tegendal, K.; Inger, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1993**, 1, 83–89.
- (22) Mrksich, M.; Sigal, G. B.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1995**, 11, 4383–4385.
- (23) Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T. *Langmuir* **2005**, 21, 602–9.
- (24) De Bruijn, H. E.; Kooyman, R. P. H.; Greve, J. *Applied Optics* **1992**, 31, 440–441.
- (25) Zynio, S. A.; Samoylov, A. V; Surovtseva, E. R.; Mirsky, V. M.; Shirshov, Y. M. *Sensors* **2002**, 2, 62–70.
- (26) Ong, B. H.; Yuan, X.; Tjin, S. C.; Zhang, J.; Ng, H. M. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 114, 1028–1034.
- (27) Szunerits, S.; Shalabney, A.; Boukherroub, R.; Abdulhalim, I. *Reviews in Analytical Chemistry* **2012**, 31, 15–28.
- (28) Szunerits, S.; Castel, X.; Boukherroub, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112, 10883–10888.
- (29) Szunerits, S.; Castel, X.; Boukherroub, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112, 15813–15817.
- (30) Manesse, M.; Sanjines, R.; Stambouli, V.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Electrochemistry Communications* **2008**, 10, 1041–1043.
- (31) Manesse, M.; Sanjines, R.; Stambouli, V.; Jorel, C.; Pelissier, B.; Pisarek, M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Langmuir* **2009**, 25, 8036–8041.
- (32) Lockett, M. R.; Weibel, S. C.; Phillips, M. F.; Shortreed, M. R.; Sun, B.; Corn, R. M.; Hamers, R. J.; Cerrina, F.; Smith, L. M. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 8611–3.
- (33) Lockett, M. R.; Smith, L. M. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 6429–6437.
- (34) Touahir, L.; Niedziółka-Jönsson, J.; Galopin, E.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Solomon, I.; Petukhov, M.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *Langmuir* **2010**, 26, 6058–6065.
- (35) Touahir, L.; Jenkins, A. T. A.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Chazalviel, J.-N.; Peretti, J.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114, 22582–2258

-
- (36) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Sénémaud, C.; Driss Khodja M. *Physical Review. B* **1988**, 38, 13263–13270.
- (37) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Tran-Quoc, H. *Physical Review. B* **1988**, 38, 9895–9901.
- (38) Ekgasit, S.; Thammacharoen, C.; Yu, F.; Knoll, W. *Applied Spectroscopy* **2005**, 59, 661–667.
- (39) Fontana, E. *Applied Optics* **2006**, 45, 7632.
- (40) Nylander, C.; Liedberg, B.; and Lind, T. *Sensors and Actuators* **1982**, 3, 79–88.
- (41) Homola, J.; Schwotzwe, G.; Lehmann, W.; Willsch, R.; Ecke, W.; Bartelt, H. *Photonics* **1995**, 2A, 245–248.
- (42) Schilling, A.; Yavas, O.; Bischof, J.; Boneberg, J.; Leiderer, P. *Applied Physics Letters* **1996**, 69, 4159–4161.
- (43) Moslehi, B.; Foster, M. W.; Harvey, P. *Elec; Lett.* **1991**, 27, 951–953.
- (44) Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Sensors and Actuators B* **1999**, 54, 3–15.
- (45) Zeder-Lutz, G.; Zuber, E.; Witz, J.; Van Regenmortel, M. H. *Analytical Biochemistry* **1997**, 246, 123–32.
- (46) Woodbury, R. G.; Wendin, C.; Clendenning, J.; Melendez, J.; Elkind, J.; Bartholomew, D.; Brown, S.; Furlong, C. E. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, 1117–26.
- (47) Bich, C.; Scott, M.; Panagiotidis, A.; Wenzel, R. J.; Nazabal, A.; Zenobi, R. *Analytical Biochemistry* **2008**, 375, 35–45.
- (48) Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, 143, 513–526.
- (49) Torreri, P.; Ceccarini, M.; Macioce, P.; Petrucci, T. C. *Annali dell'Istituto superiore di sanità* **2005**, 41, 437–41.
- (50) Safina, G. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 712, 9–29.
- (51) Vries, E. F. A. De; Schasfoort, R. B. M.; Plas, J. Van Der *Biosensors & Bioelectronics* **1994**, 9, 509–514.
- (52) Homola, J. *Chemical Reviews* **2008**, 108, 462–93.
- (53) Pan, S.; Xu, J.; Shu, Y.; Wang, F.; Xia, W.; Ding, Q.; Xu, T.; Zhao, C.; Zhang, M.; Huang, P.; Lu, S. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, 26, 850–3.
- (54) Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tothill, I. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 712, 138–44.

- (55) Wood, S. J. *Microchemical Journal* **1993**, 47, 330–337.
- (56) Bechinger, C.; Herminghaus, S.; Riedel, M.; Leiderer, P.; Weiland, U.; Bastmeyer, M. *Biophysical Journal* **1999**, 76, 509–516.
- (57) Charbot, V.; Cuerrier, C. M.; Escher, E.; Aimez, V.; Granbois, M.; Charette, P. G. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, 24, 1667–1673.
- (58) Kuo, Y.-C.; Ho, J. H.; Yen, T.-J.; Chen, H.-F.; Lee, O. K.-S. *PloS One* **2011**, 6, e22382.
- (59) Galopin, E. *Adressage par microfluidique digitale: Application à la detection de marqueurs biologiques par Plasmon de Surface et détection intégrée*; Thèse de doctorat de l'Université des Sciences et Technologies Lille 1, 2007.
- (60) Biacore *Biacore 3000 Instrument Handbook*; General Electric Company, 2008.
- (61) Galopin, E.; Beaugeois, M.; Pinchemel, B.; Camart, J.-C.; Bouazaoui, M.; Thomy, V. *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, 23, 746–50.
- (62) Lofas, S.; Johansson, B. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications* **1990**, 21, 1526–1528.
- (63) Zhang, S. *Nature Materials* **2004**, 3, 7–8.
- (64) Biacore *Sensor Surface Handbook*; General Electric Company, 2005.
- (65) Ulman, A. *Chemical reviews* **1996**, 96, 1533–1554.
- (66) Love, J. C.; Estroff, L. a; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chemical reviews* **2005**, 105, 1103–69.
- (67) Prime, K.; Whitesides, G. *Science* **1991**, 252, 1164–7.
- (68) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 8916–8920.
- (69) Hederos, M.; Konradsson, P.; Liedberg, B. *Langmuir* **2005**, 21, 2971–80.
- (70) Ananthanawat, C.; Vilaivan, T.; Mekboonsonglarp, W.; Hoven, V. P. *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, 24, 3544–9.
- (71) Nelson, K. E.; Gamble, L.; Jung, L. S.; Boeckl, M. S.; Naeemi, E.; Golledge, S. L.; Sasaki, T.; Castner, D. G.; Campbell, C. T.; Stayton, P. S. *Langmuir* **2001**, 17, 2807–2816.
- (72) Peeters, S.; Stakenborg, T.; Reekmans, G.; Laureyn, W.; Lagae, L.; Van Aerschot, A.; Van Ranst, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, 24, 72–7.
- (73) Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4939–4947.

-
- (74) Zhang, Y.; Luo, S.; Tang, Y.; Yu, L.; Hou, K.-Y.; Cheng, J.-P.; Zeng, X.; Wang, P. G. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 2001–8.
- (75) Chen, Y.; Nguyen, A.; Niu, L.; Corn, R. M. *Langmuir* **2009**, 25, 5054–60.
- (76) Kyprianou, D.; Guerreiro, A. R.; Nirschl, M.; Chianella, I.; Subrahmanyam, S.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, 25, 1049–55.
- (77) Szunerits, S.; Boukherroub, R. *Electrochemistry Communications* **2006**, 8, 439–444.
- (78) Sagiv, J. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, 92–98.
- (79) Manesse, M.; Stambouli, V.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *The Analyst* **2008**, 133, 1097–103.
- (80) Linford, M. R.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 3145–3155.
- (81) Boukherroub, R. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2005**, 9, 66–72.
- (82) Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 1205–1209.
- (83) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J. N. *Langmuir* **2006**, 22, 153–162.
- (84) Maalouli, N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Pinchemel, B.; Bouazaoui, M.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Yang, Y.; Burkhard, P.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Langmuir* **2011**, 27, 5498–505.
- (85) Song, B.; Li, D.; Qi, W.; Elstner, M.; Fan, C.; Fang, H. *Chemphyschem* **2010**, 11, 585–9.
- (86) Tang, Z.; Wu, H.; Cort, J. R.; Buchko, G. W.; Zhang, Y.; Shao, Y.; Aksay, I. a; Liu, J.; Lin, Y. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2010**, 6, 1205–9.
- (87) He, S.; Song, B.; Li, D.; Zhu, C.; Qi, W.; Wen, Y.; Wang, L.; Song, S.; Fang, H.; Fan, C. *Advanced Functional Materials* **2010**, 20, 453–459.
- (88) Feng, L.; Chen, Y.; Ren, J.; Qu, X. *Biomaterials* **2011**, 32, 2930–7.
- (89) Hu, Y.; Wang, K.; Zhang, Q.; Li, F.; Wu, T.; Niu, L. *Biomaterials* **2012**, 33, 1097–106.
- (90) Yuan, X.-C.; Ong, B. H.; Tan, Y. G.; Zhang, D. W.; Irawan, R.; Tjin, S. C. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics* **2006**, 8, 959–963.
- (91) Shalabney, A.; Abdulhalim, I. *Sensors and Actuators A: Physical* **2010**, 159, 24–32.
- (92) Lahav, A.; Shalabaney, A.; Abdulhalim, I. *Journal of Nanophotonics* **2009**, 3, 031501.

- (93) Verma, R.; Gupta, B. D.; Jha, R. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *160*, 623–631.
- (94) Gershon, P. D.; Khilko, S. *Journal of Immunological Methods* **1995**, *183*, 65–76.
- (95) Lenaerts, C.; Hastanin, J.; Pinchemel, B.; Maricot, S.; Viltot, J.-P.; Habraken, S.; Maalouli, N.; Wijaya, E.; Bouazaoui, M.; Desfours, C.; Fleury-Frenette, K. In *SPIE*; 2012; Vol. 8424, pp. 84240–84249.
- (96) Henrik Chresten Pedersen, C. T. *US Patent 6646744 B2*, **2003**.
- (97) Szunerits, S.; Coffinier, Y.; Janel, S.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2006**, *22*, 10716–22.
- (98) Blankespoor, R.; Limoges, B.; Schöllhorn, B.; Syssa-Magalé, J.-L.; Yazidi, D. *Langmuir* **2005**, *21*, 3362–3375.
- (99) Kröger, D.; Liley, M.; Schiweck, W.; Skerra, A.; Vogel, H. *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 155–61.
- (100) Chevalier, S.; Cuestas-Ayllon, C.; Grazu, V.; Luna, M.; Feracci, H.; De la Fuente, J. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 14707–14715.
- (101) Gautrot, J. E.; Huck, W. T. S.; Welch, M.; Ramstedt, M. *Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 193–202.
- (102) Sigal, G. B.; Bamdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. M. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 490–497.
- (103) Borch, J.; Roepstorff, P. *Molecular Biotechnology* **2006**, *33*, 179–90.
- (104) Stapleton, J. J.; Harder, P.; Daniel, T. A.; Reinard, M. D.; Yao, Y.; Price, D. W.; Tour, J. M.; Allara, D. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 8245–8255.
- (105) Nieba, L.; Nieba-Axmann, S. E.; Persson, A.; Hämäläinen, M.; Edebratt, F.; Hansson, A.; Lidholm, J.; Magnusson, K.; Karlsson, a F.; Plückthun, A. *Analytical Biochemistry* **1997**, *252*, 217–28.
- (106) Khan, F.; He, M.; Taussig, M. J. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3072–9.
- (107) Touahir, L. *Nouvelles architectures de biopuces à base de silicium amorphe*; Thèse de doctorat de l'Ecole Polytechnique Paris, 2010.
- (108) Linford, M. R.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 12631–12632.
- (109) Boukherroub, R.; Morin, S.; Bensebaa, F.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 3831–3835.
- (110) Buriak, J. M. *Chemical Communications* **1999**, 1051–1060.

-
- (111) Zhu, X.-Y.; Boiadjev, V.; Mulder, J. A.; Hsung, R. P.; Major, R. C. *Langmuir* **2000**, *16*, 6766–6772.
- (112) Boukherroub, R.; Morin, S.; Sharpe, P.; Wayner, D. D. M.; Allongue, P. *Langmuir* **2000**, *16*, 7429–7434.
- (113) Lin, Z.; Strother, T.; Cai, W.; Cao, X.; Smith, L. M.; Hamers, R. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 788–796.
- (114) Voicu, R.; Boukherroub, R.; Bartzoka, V.; Ward, T.; Wojtyk, J. T. C.; Wayner, D. D. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 11713–20.
- (115) Moraillon, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Ozanam, F.; Chazalviel, J.-N. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7158–7167.
- (116) Jursic, B. S.; Zdravkovski, Z. *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 2761–2770.
- (117) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 809–14.
- (118) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V.; Park, M.; Ox, A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- (119) Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 606–31.
- (120) Hinterwirth, H.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *733*, 90–97.
- (121) Liu, X.; Han, H.-M.; Liu, H.-B.; Xiao, S. *Surface Science* **2010**, *604*, 1315–1319.
- (122) Rouez, O. D.; Debiemme-Chouvy, C.; Malthete, J.; Silberzan, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 4138–4143.
- (123) Rigler, P.; Ulrich, W.-P.; Hoffmann, P.; Mayer, M.; Vogel, H. *Chemphyschem* **2003**, *4*, 268–275.
- (124) Andersson, P. O.; Lundquist, M.; Tegler, L.; Börjegen, S.; Baltzer, L.; Osterlund, L. *Chemphyschem* **2007**, *8*, 712–722.
- (125) Jungar, C.; Mandenius, C. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *449*, 51–58.
- (126) Liang, P.-H.; Wang, S.-K.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 11177–84.
- (127) Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Marriott, G.; Corn, R. M. *Analytical chemistry* **2003**, *75*, 4740–6.
- (128) Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 1593–608.

- (129) Muñoz, F. J.; Rumbero, A.; Sinisterra, J. V.; Santos, J. I.; André, S.; Gabius, H.-J.; Jiménez-Barbero, J.; Hernáiz, M. J. *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 633–646.
- (130) Jelinek, R.; Kolusheva, S. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 5987–6015.
- (131) Mercey, E.; Sadir, R.; Maillart, E.; Roget, A.; Baleux, F.; Lortat-Jacob, H.; Livache, T. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 3476–82.
- (132) Oyelaran, O.; Gildersleeve, J. C. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13*, 406–13.
- (133) Norberg, O.; Deng, L.; Yan, M.; Ramström, O. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 2364–70.
- (134) Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 10575–10582.
- (135) Houseman, B. T.; Mrksich, M. *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 443–54.
- (136) Grant, C. F.; Kanda, V.; Yu, H.; Bundle, D. R.; McDermott, M. T. *Langmuir* **2008**, *24*, 14125–32.
- (137) Zhang, Y.; Luo, S.; Tang, Y.; Yu, L.; Hou, K.-Y.; Cheng, J.-P.; Zeng, X.; Wang, P. G. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 2001–8.
- (138) Sun, X.; Stabler, C. L.; Cazalis, C. S.; Chaikof, E. L. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 52–7.
- (139) Szunerits, S.; Niedziolka-Jönsson, J.; Boukherroub, R.; Woisel, P.; Baumann, J.-S.; Siriwardena, A. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 8203–10.
- (140) Wang, D.; Liu, S.; Trummer, B. J.; Deng, C.; Wang, A. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 275–81.
- (141) Willats, W. G. T.; Rasmussen, S. E.; Kristensen, T.; Mikkelsen, J. D.; Knox, J. P. *Proteomics* **2002**, *2*, 1666–71.
- (142) Lee, M.-R.; Shin, I. *Organic Letters* **2005**, *7*, 4269–72.
- (143) Zhi, Z.; Powell, A. K.; Turnbull, J. E. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 4786–93.
- (144) Zhou, X.; Zhou, J. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *21*, 1451–8.
- (145) Park, S.; Lee, M.-R.; Shin, I. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 155–62.
- (146) Wang, X.; Ramström, O.; Yan, M. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19*, 8944–8949.
- (147) Liu, L.-H.; Yan, M. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43*, 1434–43.

- (148) Wang, H.; Zhang, Y.; Yuan, X.; Chen, Y.; Yan, M. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22, 26–32.
- (149) Szunerits, S.; Kirchner, C. N.; Wittstock, G.; Boukherroub, R.; Gondran, C. *Electrochimica Acta* **2008**, 53, 7908–7914.
- (150) Fleet, G. W. J.; Porter, R. R.; Knowles, J. R. *Nature* **1969**, 224, 511–512.
- (151) Banks, R. E.; Sparkes, G. R. *Journal of the Chemical Society* **1972**, 2964.
- (152) Keana, J. F. W.; Cai, S. X. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 3640–3647.
- (153) Platz, M. S. *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 487–492.
- (154) Wang, X.; Ramström, O.; Yan, M. *Advanced Materials* **2010**, 22, 1946–53.
- (155) Wang, X.; Liu, L.-H.; Ramström, O.; Yan, M. *Experimental Biology and Medicine* **2009**, 234, 1128–39.
- (156) Liu, L.-H.; Dietsch, H.; Schurtenberger, P.; Yan, M. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, 1349–55.
- (157) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie* **2001**, 40, 2004–2021.
- (158) Michael, A. *Journal für Praktische Chemie* **1893**, 48, 94–95.
- (159) Huisgen, R. *Angewandte Chemie* **1963**, 2, 565–598.
- (160) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie* **2002**, 41, 2596–9.
- (161) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 3057–64.
- (162) Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Chidsey, C. E. D. *Langmuir* **2004**, 20, 1051–3.
- (163) Lee, J. K.; Chi, Y. S.; Choi, I. S. *Langmuir* **2004**, 20, 3844–7.
- (164) Barka-Bouaifel, F.; Niedziółka-Jönsson, J.; Castel, X.; Saison, O.; Akjouj, A.; Pennec, Y.; Djafari-Rouhani, B.; Woisel, P.; Lyskawa, J.; Sambe, L.; Cooke, G.; Bezzi, N.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21, 3006.
- (165) Liu, L.; Zorn, G.; Castner, D. G.; Solanki, R.; Lerner, M. M.; Yan, M. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20, 5041.
- (166) Audigé, C.; Zonszain, F. *Biochimie Structurale*; Wolters Kluwer, 1991.
- (167) DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Analytical Chemistry* **1956**, 28, 350–356.

- (168) Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S. I.; Lee, Y. C. *Analytical Biochemistry* **2005**, 339, 69–72.
- (169) Elgavish, S.; Shaanan, B. *Trends in Biochemical Sciences* **1997**, 22, 462–467.
- (170) Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, 1383, 9–36.
- (171) Das, M. P. *Condensed Matter: New Research*; Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2007.
- (172) Rougé, P.; Culerrier, R.; Granier, C.; Rancé, F.; Barre, A. *Revue Française d'Allergologie* **2010**, 50, 281–284.
- (173) Katrlík, J.; Škrabana, R.; Mislovičová, D.; Gemeiner, P. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, 382, 198–202.
- (174) Gondran, C.; Dubois, M.-P.; Fort, S.; Cosnier, S.; Szunerits, S. *The Analyst* **2008**, 133, 206–12.
- (175) Linman, M. J.; Taylor, J. D.; Yu, H.; Chen, X.; Cheng, Q. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 4007–13.
- (176) Perry, G.; Maalouli, N.; Pinchemel, B.; Bouazaoui, M.; Thomy, V.; Boukherroub, R. In *2nd European Conference on Microfluidics, μ Flu'10*; Villeneuve d'Acsq, 2010.
- (177) Friedli, C. K. W. *Chimie générale pour ingénieur*; Presses polytechniques et universitaires romandes, 2002.
- (178) Attie, A. D.; Raines, R. T. *Journal of Chemical Education* **1995**, 72, 119.

ANNEXES

Annexe.1- Surfaces SPR

Le dépôt des films métalliques et des couches de silicium amorphe carboné ou d'oxyde de silicium est effectué sur des lames de verre de dimension : 76 x 26 x 1 mm. Avant l'étape de la métallisation, les substrats sont nettoyés au Piranha, un mélange 3:1 d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 30%. Après 15 min, les substrats sont rincés abondamment à l'eau MilliQ et puis séchés sous un flux d'azote.

Annexe.1.1- Verre/Ti/Ag/a-Si_{0.63}C_{0.37}:H

Sur les substrats de verre nettoyés, le film de Ti/Ag est déposé par évaporation thermique de 5 nm de titane Ti (utilisé comme une couche d'adhésion) et 38 nm d'argent Ag.²⁹ Les couches minces de silicium amorphe carboné a-Si_{1-x}C_x:H sont ensuite déposées par décomposition chimique en phase vapeur assistée par plasma PECVD en "régime basse puissance" (RF= 13,56 MHz), sous une pression de 35 mTorr, une densité de puissance de 0.06 W cm⁻² et à une température de 250°C. Un mélange de gaz de méthane CH₄ et de silane SiH₄ est injecté dans la chambre à plasma à un flux de 20 cm³ min⁻¹. La proportion des gaz à injecter c.à.d. la détermination de la valeur du pourcentage en carbone "x" est calculée par le modèle empirique proposé par Solomon et coll.^{36,37} Ainsi pour la couche de a-Si_{0.63}C_{0.37}:H 97% de méthane est utilisé. L'épaisseur de la couche déposée est contrôlée par le temps de dépôt et vérifiée par ajustement des mesures SPR à l'aide du logiciel Winspall 3.0.

Signalons que la durée du chauffage appliqué pour atteindre la température de 250°C peut causer l'oxydation partielle de l'argent. Pour éviter cette conséquence, le substrat métallisé subit un traitement par un plasma d'hydrogène à une pression de 150 mTorr et à une densité de puissance de 0.1 W cm⁻², juste avant le dépôt.

Annexe.1.2- Verre/Ti/Au/SiO_x

L'étape de la métallisation des lames de verre préalablement nettoyées consiste tout d'abord par un dépôt d'une couche d'adhésion de 5 nm de titane Ti, suivi d'une couche de 50 nm d'or par évaporation thermique. Les lames métallisées sont rincées dans 3 bains successifs d'acétone, d'isopropanol et d'eau MilliQ et puis séchées. Ensuite elles sont placées dans une chambre à plasma pour un chauffage à T = 300°C sous une pression de 5 mTorr pendant une heure. Par la technique de dépôt chimique en phase vapeur assisté par Plasma PECVD, les

couches minces de SiO_x sont déposées sur les lames d'or. Ce procédé est réalisé en injectant dans la chambre un flux de 260 sccm (centimètres cubes standards par minute) de gaz de silane SiH_4 (3% dans N_2) et de 700 sccm de protoxyde d'azote N_2O , à la même température de 300°C , sous une pression de 1 Torr, à une puissance de 10 W et une fréquence de 13.56 MHz. Sous ces conditions, la vitesse de dépôt est de $414 \text{ \AA} \cdot \text{min}^{-1}$. Ainsi l'épaisseur est ajustée en fonction du temps.

Annexe.2- Fonctionnalisation des surfaces SPR

Annexe.2.1- Pour l'interaction peptides histagués- Cu^{2+} /NTA sur $\text{Ti/Ag/aSi}_{0.63}\text{C}_{0.37}$

Hydrogénation et hydrosilylation : Le substrat $\text{Ti/Ag/aSi}_{0.63}\text{C}_{0.37}$ est exposé aux vapeurs HF pendant 10 secondes pour former des liaisons Si-H. L'introduction des fonctions acides à la surface hydrogénée se fait *via* l'hydrosilylation par voie photochimique. Pour cela, le substrat est immergé dans l'acide undécylénique préalablement dégazé à 100°C pendant 20 minutes et soumis à une irradiation UV à $\lambda = 312 \text{ nm}$ pendant 3 h. La surface résultante est ensuite rincée 2 fois pendant 15 mn à l'acide acétique chauffé à 75°C .

Activation NHS/EDC : La conversion de la fonction acide en fonction ester de succinimide est réalisée en incubant la surface acide dans un schlenk qui contient une solution fraîchement préparée de NHS (5mM) et EDC (5mM) dans de l'eau. Le récipient est placé dans un bain thermostaté à 15°C , pour une durée de 90 min. Ensuite, la surface est rincée copieusement à l'eau MilliQ et puis séchée sous un flux d'azote.

Greffage des molécules NTA- NH_2 et complexation des ions cuivreux : La surface activée est placée dans une solution de NTA- NH_2 /PBS (10^{-2} M) et laissée sous agitation pendant la nuit, à température ambiante et sous azote. Pour éliminer les molécules qui n'ont pas réagi et assurer la déprotonation des groupements carboxyliques greffés, un rinçage avec du tampon PBS à un pH = 8-9 est nécessaire. Finalement, pour la complexation des ions Cu^{2+} , la surface $\text{Ti/Ag/aSi}_{0.63}\text{C}_{0.37}$ /NTA est immergée dans une solution aqueuse de CuSO_4 /eau (5 mM) durant 2 heures et puis rincée à l'eau MilliQ.

Immobilisation des peptides histagués : Pour les caractérisations ATR-FTIR et XPS, un volume de 50 µl du peptide (50 µM) dans du tampon PBS est déposé sur l'échantillon Ti/Ag/aSi_{0.63}C_{0.37}/NTA-Cu²⁺. Le substrat est ensuite placé dans une chambre d'hybridation pendant 1 heure. Les peptides qui n'ont pas réagi sont éliminés par un rinçage au PBS (1X) contenant 0.1% SDS, PBS (0.2X), PBS (0.1X).

Pour l'étude de l'interaction peptide histagué-Cu²⁺ sur le banc SPR en configuration "goutte", un volume de 10 µl de la solution peptide/PBS (50 µM) est injecté dans la cuvette en téflon (Figure 20 (a)). La cinétique a été effectuée pendant t = 20 min pour le peptide "Bradykinine" et t = 8 min pour "P6c". Les rinçages sont réalisés avec le même tampon PBS.

Annexe.2.2- Pour la reconnaissance des lectines par les glycanes sur Ti/Au/SiO_x

Silanisation: La surface SPR hybride Ti/Au/SiO_x est tout d'abord traitée sous ozone, pendant 10 min, pour éliminer les contaminations organiques et produire les groupements hydroxyls. Ensuite l'interface est mise sous agitation ultra-sonique dans une solution à 3% d'APTMS dissoute dans un mélange de 95%, de méthanol et de 5% d'eau. Après un rinçage au méthanol puis à l'eau, la surface est placée dans une étuve pour un recuit à 110°C pendant 20 minutes.

Greffage des glycanes par photocouplage: Pour introduire les groupes carboxyles des molécules de l'agent photocoupleur ATFBA à l'interface terminée amine, celle-ci est placée dans un récipient contenant une solution ATFBA (2 mM), DCC (2.2 mM) et DMAP (0.66 mM) dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂) sous atmosphère d'azote, pendant 24 heures à température ambiante. Pour éliminer l'excès des molécules qui n'ont pas réagi, la surface est rincée deux fois au CH₂Cl₂ et puis à l'éthanol. Ensuite, pour la photoactivation, l'interface Ti/Au/SiO_x/N₃ est incubée dans une solution aqueuse de D(+)-Mannose ou β-Lactose et puis exposée aux irradiations UV (λ = 365 nm, P= 100 mW cm⁻²) pour 5 min. La surface résultante est abondamment rincée à l'eau MilliQ et séchée sous flux d'azote.

Greffage des glycanes par la chimie click: La surface terminée amine est tout d'abord plongée dans une solution d'acide azido-benzoïque (ABA) (2mM), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide DCC (2.2 mM) et 4-diméthylaminopyridine DMAP (0.66 mM), préparée dans le dichlorométhane. Après une durée de 24 heures sous agitation à température ambiante, l'interface est rincée deux fois au dichlorométhane et puis à l'éthanol pendant 10 min (chaque rinçage) et finalement séchée sous flux d'azote. Pour réaliser la réaction "click", l'interface Ti/Au/SiO_x/N₃ est incubée dans une solution aqueuse de α -propargyle-mannopyranose ou β -propargyle-lactose (2mM) en présence du catalyseur CuSO₄.5H₂O (200 μ M), et l'acide ascorbique (300 μ M). L'échantillon est laissé sous agitation, pendant 24 et puis rincé 2 fois à l'eau MilliQ pour 10 min.

Immobilisation des lectines : La reconnaissance de la lectine "*Lens Culinaris*" (LC) ou "*Arachis hypogaea*" (PNA) par les sucres greffés à la surface Ti/Au/SiO_x est effectuée dans la cellule SPR de l'appareil Autolab (Figure 11). Après la stabilisation du signal plasmonique avec le tampon PBS sur l'interface, un volume de 100 μ l de la solution du lectine à étudier dans du PBS (10 μ g/ml) est injecté dans la cuvette. Quand la courbe de la cinétique enregistrée atteint l'équilibre (approximativement 2h), le tampon PBS est réinjecté à plusieurs reprises pour enlever les lectines qui ne sont pas liés aux glycanes.

Annexe.3- Synthèse de l'acide azido-tetrafluorobenzoïque (ATFBA)

La synthèse de la molécule ATFBA est effectuée selon le protocole développé par Norberg et coll.¹³³ à partir du produit commercialisé le méthyle pentafluorobenzoate en deux étapes :

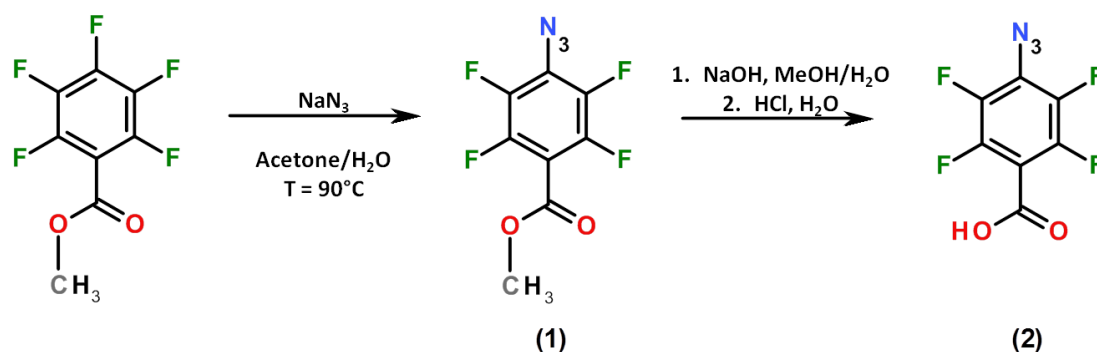


Figure 62 : Schéma réactionnel de la synthèse des produits (1) 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate de méthyle et (2) 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoïque à partir du pentafluorobenzoate de méthyle.

Préparation de l'4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate de méthyle (1): Tout d'abord, une solution de pentafluorobenzoate de méthyle (13.55 mmol) et de l'azoture de sodium (17.6 mmol) est préparée dans un volume de 30 mL d'acétone et d'eau (v/v 2:1) et laissée sous agitation à $T = 90^\circ\text{C}$ pendant deux heures. Par la suite, le mélange est refroidi et puis dilué dans un volume de 60 mL d'eau MilliQ. Après l'extraction avec l'éther diéthylique ($v = 60$ mL à 3 reprises), le solvant est évaporé sous vide et le produit récupéré est sous forme de cristaux blancs.

Préparation de l'acide 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoïque (2): Le produit Méthyle 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate (15.49 mmol) est dissous dans du méthanol ($v = 14.6$ mL). Un mélange d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (20%, w/w ; $v = 1.5$ mL) et d'eau ($v = 3.1$ mL) est ajouté au produit. L'ensemble est mis sous agitation à température ambiante pendant quatre heures. Ensuite, le mélange est acidifié avec le chlorure d'hydrogène (1M) puis extrait avec du dichlorométhane ($v = 60$ mL à 3 reprises). Finalement le produit est obtenu après évaporation sous vide et puis stocké au frais ($T = 8^\circ\text{C}$).

Les spectres RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C des deux produits (dissous dans le solvant DMSO- d_6) ont été enregistrés par un spectromètre Bruker à une fréquence de 300 MHz.

Le spectre ^1H de l'4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate de méthyle montre les déplacements δ (ppm) 3.91 (s, 3 H, COCH_3), 3.34 (HOD) et 2.51-2.49 (DMSO). Les attributions des pics ^{13}C sont : δ (ppm) 159.24 ($-\text{COOMe}$), 146.27-142.73 (C-F, m, $J_{\text{C-F}} = 265.5$ Hz), 141.55-138.43 (C-F, m, $J_{\text{C-F}} = 234$ Hz), 106.57 (C_{aryle}), 53.37 (CH_3) et 40.2-38.6 (DMSO). Après la préparation de l'acide 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoïque, les déplacements dans le spectre ^{13}C sont : δ (ppm) 160.06 (s, COOH), 141.88-138.38 (C-F, m, $J_{\text{C-F}} = 263$ Hz), 145.90-142.88 (C-F, m, $J_{\text{C-F}} = 227$ Hz), 109.38 (C_{aryle}) et 40.2-38.5 (DMSO). Dans le spectre proton, la disparition du pic CH_3 montre bien le passage à l'acide. Les résultats obtenus sont en bon accord avec ceux trouvés par Norberg et coll.¹³³ et vérifient ainsi la caractérisation des produits synthétisés.

Annexe.4- Instrumentation et Techniques de caractérisation

Annexe.4.1- Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réfexion Totale Atténuée (ATR-FTIR)

Les mesures ATR-FTIR du **chapitre III**, ont été réalisées sur un film $\text{a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ déposé sur un substrat de silicium cristallin (dans lequel les réflexions internes s'effectuent) de dimensions $15 \times 15 \times 0.5 \text{ mm}^3$. Les spectres infrarouges ont été enregistrés par un spectromètre "Bruker Equinox FTIR" installé au laboratoire Physique de la Matière Condensée PMC à l'école polytechnique de Paris. Les spectres des surfaces avant fonctionnalisation servent comme spectres de référence.

Annexe.4.2- Spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

Les mesures XPS ont été réalisées avec le spectromètre XPS Axis Ultra DLD de Kratos analytical, installé au "Regional Platform of Surface Analysis" à l'Unité de Catalyse et Chimie de Surface UCCS de l'université Lille 1. Le spectromètre utilise la source d'aluminium monochromatique ($h\nu = 1486 \text{ eV}$). L'angle de détection entre la surface de l'échantillon et le détecteur est de 90° . Les énergies de liaisons mesurées sont corrigées par rapport à celles de Au 4f7/2 située à 80.0 eV et Ag 3d5/2 à 368.3 eV. Les échantillons analysés sont placés sous pression de 10^{-9} mbar .

Annexe.4.3- Voltampérométrie cyclique

La cellule SPR de l'appareil Autolab SPRINGLE, commercialisé par Metrohm (Pays-Bas), est aussi adaptée aux mesures électrochimiques. La cuvette de la cellule peut contenir jusqu'à 150 μL de volume et la surface de contact avec le substrat métallique est de 0.07 cm^2 . Une contre-électrode en platine, une électrode de référence Ag/AgCl et une tige conductrice (pour assurer le contact avec la surface du capteur qui joue le rôle de l'électrode de travail) sont incorporés dans la cellule. Les mesures de voltampérométrie cycliques sont réalisées à l'aide d'un potentiostat Autolab/PGSTAT30 fourni par la même compagnie.

Annexe.4.4- Spectrophotométrie UV/Visible

Les spectres d'absorption sont obtenus par un spectrophotomètre UV/Visible "Perkin Elmer Lambda 950". Le balayage est effectué pour des longueurs comprises entre 400 et 800 nm.

Annexe.4.5- UV-Ozone

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé un "UVO cleaner" modèle 42 fourni par la compagnie Jelight (Etats Unis).

Annexe.5- Le modèle de l'interaction de 1:1 de Langmuir

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé le modèle de Langmuir pour déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction ligand "L" (molécule greffée à la surface) et de l'analyte "A" (molécule injectée à la surface) (Figure 63). C'est un modèle d'adsorption simple qui se base sur les critères suivants :

- l'adsorption est réversible et conduit à un équilibre dynamique entre espèces libres et espèces immobilisées.
- tous les sites d'adsorption sont équivalents
- l'aptitude d'une molécule à s'adsorber sur un site donné est indépendante de l'occupation des sites voisins
- la surface du solide est uniforme¹⁷⁷

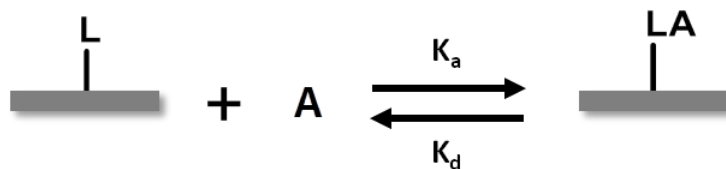


Figure 63 : Le schéma de l'interaction d'un ligand (L) immobilisé sur une surface avec un analyte (A) en solution d'après le modèle de Langmuir. K_a et K_d sont respectivement les constantes d'association et de dissociation de la réaction.

La vitesse de la formation du complexe "LA" peut être représentée par la relation suivante :

$$\frac{\partial[\text{LA}]}{\partial t} = k_a[\text{A}](\text{[L]} - \text{[LA]}) - k_d[\text{LA}] \quad \text{Equation 22}$$

avec [L], [A] et [LA] représentent respectivement les concentrations des molécules réceptrices, des molécules cibles et des complexes formés par l'association de ces deux. k_a et k_d sont les constantes d'association et de dissociation de la réaction.

A l'équilibre thermodynamique où $\frac{\partial[\text{LA}]}{\partial t} = 0$, les constantes d'association et de dissociation à l'équilibre, " K_A " et " K_D " sont obtenues en appliquant l'expression suivante :

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{[\text{LA}]}{[\text{L}][\text{A}]} \quad \text{Equation 23}$$

En biochimie, K_D est la plus utilisée et exprimée en mol L^{-1} . La valeur de cette constante permet d'évaluer l'affinité du complexe "LA" formé : un faible K_D se traduit par une forte affinité du récepteur pour son ligand, ce qui signifie également qu'une faible concentration du ligand sera efficace.^{126,178}

Annexe.6- Dosage des glycanes par calorimétrie "acide sulfurique-phénol"

La méthode calorimétrique "acide sulfurique-phénol" est basée sur la décomposition des glucides par l'acide sulfurique pour former avec le phénol un composé coloré orange-jaune. En spectrométrie UV-Visible, ce produit coloré possède une absorbance spécifique au glucide analysé et proportionnelle à sa concentration.

Pour le dosage, une gamme de solutions aqueuses à différentes concentrations du glycane à étudier (mannose ou lactose) est préparée. Un volume de 60 μL d'une solution aqueuse de phénol à 5 % et de 900 μL d'acide sulfurique concentré est injecté dans des cuvettes contenant chacune un volume de 60 μL d'une solution de glycane à une concentration bien définie. Après une agitation pendant 10 min, des spectres d'absorbances sont enregistrés par le spectromètre UV/Vis. Le balayage est effectué pour des longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm et le spectre "blanc" correspond à une solution phénol/acide sulfurique sans glycane. La courbe de calibration est tracée en mesurant la différence de l'absorbance à $\lambda_1=495$ and $\lambda_2=570$ nm en fonction de chaque concentration du carbohydrate étudié.

Finalement, pour déterminer la quantité de sucres greffés sur les substrats SPR Ti/Au/SiO_x, on mesure la différence ($\lambda_1 - \lambda_2$) obtenue sur les spectres d'absorbance des surfaces trempées dans le mélange phénol/acide sulfurique.

Nazek MAALLOULI

Ecole Doctorale "Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement" – Lille 1

FORMATION

- Décembre 2009-présent Thèse troisième année, Laboratoire Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM) et Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI), *Université Lille1*, Villeneuve d'Ascq, France.
- 2008 – 2009 M2 Physique Biomédicale, Faculté des Sciences I, *Université Libanaise*, Liban.
- 2004 – 2008 M1 Physique Générale, Faculté des Sciences II, *Université Libanaise*, Liban.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- Juillet 2012 Laboratoire Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets, Université Bordeaux 1.
Etude des interactions biomoléculaires par un montage optique basé sur la résonance plasmonique en mode guidé (PWR).
- Avril-Juin 2012 Institut Universitaire de Technologie, Université Lille 1.
Enseignement TP électronique, 1^{ère} année Mesures Physique.
- Octobre 2011 Austrien Institute of Technology, Vienna, Austria.
Stage d'initiation sur des bancs optiques dédiés à l'étude des interactions biologiques par SPR couplée à la fluorescence.
- Mai-Juin et Septembre 2010 Laboratoire de Physique de la Matière Condensée, Ecole Polytechnique.
Formation Spectrométrie Infrarouge et fonctionnalisation des surfaces.

PUBLICATIONS

Articles:

Szunerits, S.; **Maalouli, N.**; Wijaya, E.; Vilcot, J.-P.; Boukherroub, R. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405*, 1435–43.

Maalouli, N.; Barras, A.; Siriwardena, A.; Bouazaoui, M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *The Analyst* **2013**, *138*, 805–12.

Maalouli, N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Pinchemel, B.; Bouazaoui, M.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Yang, Y.; Burkhard, P.; Boukherroub, R.; Szunerits, S., "Development of a metal-chelated plasmonic interface for the linking of His-peptides with a droplet-based surface plasmon resonance read-off scheme", *Langmuir* **2011**, *27*, 5498-505.

Proceedings:

Lenaerts, C.; Hastanin, J.; Pinchemel, B.; Maricot, S.; Vilcot, J.-P.; Habraken, S.; **Maalouli, N.**; Wijaya, E.; Bouazaoui, M.; Desfours, C.; Fleury-Frenette, K., "Integrated prism-free coupled surface plasmon resonance biochemical sensor", *Proceeding SPIE* **2012**, 8424, 84240–84249.

Wijaya, E.; **Maalouli, N.**; Boukherroub, R.; Szunerits, S.; Vilcot, J.-P. "Graphene-based high-performance surface plasmon resonance biosensors", *Proceeding SPIE* **2012**, 8424, 84240R–84240R–7.

Perry, G.; **Maalouli, N.**; Pinchemel, B.; Bouazaoui, M.; Thomy, V.; Boukherroub, R., "EWOD-based micromixing for fast protein sensing using SPR", *Proceeding Microfluidics* **2010**, 1–6.

COMMUNICATIONS et POSTERS

- Octobre 2011 Journée Franco-Libanaises Physique et Interfaces (Université Lille 1, France)
Oral: *Développement de nouvelles surfaces métalliques destinées à l'immobilisation de peptides histidinylés détectés par un capteur à base de plasmons de surface*
- Avril 2011 The international European Summer School "Plasmonics, Functionalization, and Biosensing" (Heidelberg, Allemagne)
Oral: *Droplet-based surface plasmon resonance investigation of histidine-tagged Biomolecules interaction with metal-chelated interfaces*
- Décembre 2010 Microfluidics 2010 conference (Toulouse, France)
Poster: *EWOD-based micromixing for fast protein sensing using SPR*

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Comparison of photo- and Cu(I)-catalyzed "click" chemistries for the formation of carbohydrate SPR interfaces

Cite this: *Analyst*, 2013, 138, 805

Nazek Maalouli,^{a,b} Alexandre Barras,^a Aloysius Siriwardena,^c Mohamed Bouazaoui,^b Rabah Boukherroub^a and Sabine Szunerits^{*a}

Understanding interactions of glycans with proteins in key biological events has seen the development of various analytical methods such as microarray techniques. Label-free approaches, such as surface plasmon resonance (SPR) techniques are particularly attractive and we explore here the potential of a novel interface composed of lamellar Ti/Au/silicon dioxide derivatized with sugars to probe lectin–sugar interactions by SPR. Two parallel surface functionalization strategies have been developed: one in which azide-functionalized surfaces are linked via a Cu(I) "click" method to alkynyl-derivatized glycan partners and another wherein perfluorophenyl azide-functionalized surfaces are reacted through a C–H insertion photocoupling reaction with underivatized glycans. The effectiveness of the two interfaces is assessed for their lectin-recognition abilities in an SPR format.

Received 7th September 2012
Accepted 13th November 2012

DOI: 10.1039/c2an36272d

www.rsc.org/analyst

1 Introduction

Advances in biology continue to reveal that cell-surface oligosaccharides play an essential role in the development and maintenance of all living systems and that they confer an exquisite level of structural and functional diversity characteristic of higher organisms.^{1,2} It is not surprising then that the development of carbohydrate microarrays has received sustained attention over the past 10 years.^{3–8} Most of the sensors so far developed rely on end point detection and thus provide indirect detection of a labeled protein (fluorescence tag, biotin motif). Among the label-free methods available such as quartz crystal microbalance (QCM),⁶ electrochemical impedance spectroscopy (EIS),⁵ plasmonic-based techniques: surface plasmon resonance (SPR), SPR-imaging,^{3,8} and localized surface plasmon resonance (LSPR)^{9,10} have received the greatest attention. The choice of chemistry for linking glycans to the sensor surface is also of paramount importance. Physisorption approaches are convenient, but are less useful in the case of simple sugars due to weak van der Waals interaction forces with the surface.^{11,12} Self-assembled monolayers of thiol-functionalized carbohydrates have found wide use in decorating gold interfaces.^{13,14} However, the prerequisite thiol-functionalized

glycan analogues are not straightforward to synthesize, and furthermore the packing of such molecules to form structurally well-defined monolayers is not guaranteed.¹⁵ Mercey *et al.* used pyrrole-derivatized oligosaccharides formed by electrochemical co-polymerization to link glycans to SPR interfaces.³ The Cu(I) catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition between an azide and alkyne reacting partners to form a triazole linkage, termed "click" chemistry, has been established as an attractive method of immobilizing carbohydrates onto solid surfaces.^{5,16} Nevertheless, the requirement for prior derivatization of glycans with either propargyl or azide functions by one- or multi-step sequences presents a significant hurdle for the construction of functional microarrays using the Cu(I) "click", especially when complex glycans are to be immobilized. The field would undoubtedly benefit greatly from alternate direct conjugation strategies where the need for functionalization of glycans, prior to immobilization, is obviated. Direct strategies include for example conjugation of reducing sugars to hydrazine or aminoxyacetyl-functionalized substrates.^{17,18} Another more recent scenario involves photoinduced covalent attachment to interfaces coated with photoreactive groups.^{8,19–24} A drawback of this latter approach is that the coupling reaction is non-specific and that the attachment of glycans to the surface does not occur *via* their reducing ends. Although it might be expected that attachment of glycans to be specific and reproducible for the construction of interfaces appropriate for studying glycan–protein interactions.²⁵ This method has been exploited for the synthesis of glycan arrays as well as a variety of other glyco-nanomaterials.^{19,26}

In this paper, we describe the fabrication of a novel SPR interface composed of lamellar Ti/Au/silicon dioxide derivatized

^aInstitut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, USR CNRS 3078), Université Lille 1, Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: sabine.szunerits@iri.univ-lille1.fr; Fax: +33 3 62 53 17 01; Tel: +33 3 62 53 17 25

^bLaboratoire de Physique des Lasers, atomes et Molécules (UMR CNRS 8523), Université Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

^cLaboratoire des Glucides (FRE 3617-CNRS), Université de Picardie Jules Verne, 33 rue saint Leu, 80039 Amiens, France

with sugars and examine it to probe lectin–sugar interactions by SPR.^{27–30} Silicon dioxide-based materials have been routinely explored for biosensing being inexpensive and being amenable to a rich variety of coupling strategies based on silane-coupling chemistry. We have previously reported that this lamellar Ti/Au/silicon dioxide interface was indeed useful for the investigation of DNA hybridization³¹ although we are not aware of this interface being previously evaluated for examining sugar–protein interactions. Two methods of linking glycans to the Ti/Au/silicon dioxide lamellar surfaces have been exploited including one in which a classical “click” reaction is used wherein alkyne-derivatized glycans are immobilized onto an azide-functionalized surface and another wherein unmodified glycans are immobilized directly to a perfluorophenyl azide functionalized interface using photocoupling chemistry. The novel surfaces decorated with mannose or lactose have been evaluated for the possibility of detecting specifically glycan/lectin interactions *via* SPR. Legume lectins are the model system of choice to study the molecular basis of carbohydrate/protein recognition events as they are not only easy to purify in large quantities, but also exhibit a wide variety of carbohydrate specificities.³² The legume lectins investigated in this work were *Lens culinaris agglutinin* (LENS) and *Arachis hypogaea* (PNA). *Lens culinaris* is classified together with *concanavalin A* as glucose/mannose-binding lectin.^{32,33} To demonstrate selective binding to mannose PNA, a lactose-specific lectin, was investigated in addition.

2 Experimental section

2.1 Materials

All chemicals were of reagent grade or higher and were used as received unless otherwise specified. Methyl pentafluorobenzoate, sodium azide (NaN₃), diethyl ether, magnesium sulfate (MgSO₄), acetone, methanol (MeOH), sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), dichloromethane (DCM), (3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS), *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-(dimethylamino)-pyridine (DMAP), copper(II) sulfate pentahydrate (CuSO₄·5H₂O), ascorbic acid, α(+)-mannose, β-lactose and ethanol (EtOH) were purchased from Sigma-Aldrich and were used without further purification. 4-Azido-benzoic acid (ABA) was purchased from TCI Europe (Belgium). Lectins from *Lens culinaris* (LENS) and from *Arachis hypogaea* (PNA) were obtained from Aldrich and were prepared in phosphate buffer saline (PBS) 10×. Ultrapure water (Milli-Q, 18 MΩ cm) was used for the preparation of the solutions and for all rinsing steps. Alkyne-terminated glycans were synthesized as described by Roy and Lee.³⁴

2.2 Synthesis of 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid

The preparation of 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (1) was performed as previously reported.^{6,8} A solution of methyl pentafluorobenzoate (13.55 mmol) and sodium azide (17.6 mmol) was prepared in a mixture of acetone and water (v/v 2 : 1) and left at 90 °C for 2 h. After cooling, the solution was diluted with water, and extracted with diethyl ether. The solvent was

evaporated under vacuum and the resulting product was dried to yield white crystals of methyl 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate. An aqueous solution of NaOH–H₂O (w/w 20%) was added to a solution of methyl 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoate (15.49 mmol) and methanol. The resulting mixture was kept under stirring at room temperature for 4 h. After stirring, HCl (1 M) was added and the mixture was directly extracted with dichloromethane and dried under MgSO₄. 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid was isolated as a white powder (yield: 84%) and stored at 8 °C.

2.3 Preparation of SPR sensors

5 nm of titanium and 50 nm of gold were successively deposited onto cleaned glass slides by thermal evaporation. The Ti/Au coated interfaces were then heated in a plasma chamber at 300 °C at a pressure of 0.005 Torr for 1 h. SiO_x layers were synthesized by plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) in a Plasmalab 800 Plus (Oxford Instruments, UK). The growth conditions used were as follows: substrate temperature, 300 °C; gas mixture, SiH₄ (3% in N₂) and N₂O (the gas flow was 260 and 700 sccm for SiH₄ and N₂O, respectively); total pressure in the reactor, 1 Torr; power, 10 W at 13.56 MHz. Under these experimental conditions, the deposition rate was 414 Å min^{−1} and the silica films display a refractive index of 1.48. We have adjusted the silica film thicknesses by varying the deposition time. The thicknesses varied by ±0.5 nm from the targeted one.

WinSpall 2.0 software (Max-Planck-Institute for Polymer Research, Mainz) was used to calculate the SPR curves and approximate the experimental dependences with an optical model within the framework of Maxwell macroscopic approach.

2.4 Preparation of carbohydrate-derivatized surface

2.4.1 Through “click” chemistry

2.4.1.1 Amine-terminated interfaces. The Au/SiO_x interfaces were first cleaned by UV/ozone to remove any organic contaminants on the surface and to generate surface hydroxyl groups. The silanization reaction was carried out in a liquid phase by reacting the Au/SiO_x interface with 3% APTMS in methanol–water (v/v 95/5) for 30 min under sonication. The interface was then washed with methanol and water (two times) and annealed for 20 min at 110 °C.

2.4.1.2 Azide-terminated interface. The amine-terminated surface was immersed in a solution of 4-azidobenzoic acid (2 mM), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (2.2 mM) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.66 mM) dissolved in dry dichloromethane and left under stirring at room temperature for 24 h. The interface was rinsed twice with dichloromethane and ethanol and then dried under a stream of nitrogen.³⁵

2.4.1.3 “Clicking” of alkynyl-terminated glycans. The “click” reaction was performed by incubation of the azide-terminated Au/SiO_x interfaces in an aqueous solution of either alpha propargyl mannopyranoside or beta propargyl lactoside (2 mM), CuSO₄·5H₂O (200 μM) and ascorbic acid (300 μM). The SPR surfaces were left under shaking for 24 h at room temperature and then washed twice with milli-Q water and dried under a stream of nitrogen.

2.4.2 Through photocoupling

2.4.2.1 Perfluorophenyl azide-terminated interface. Amine-terminated Au/SiO_x interfaces (prepared as previously) were reacted with 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (**1**) (2 mM), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (2.2 mM) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.66 mM) dissolved in dry dichloromethane. The SPR interfaces were left under shaking at room temperature overnight. The resulting interfaces were rinsed twice with dichloromethane and ethanol and then dried under a stream of nitrogen.

2.4.2.2 Photoactivation. The formation of carbohydrate-terminated Au/SiO_x interfaces was achieved by immersion of the perfluorophenyl azide-terminated surface into a Schlenk tube containing an aqueous solution of the carbohydrate (2 mM) and exposed to UV irradiation ($\lambda = 365$ nm, $P = 100$ mW cm⁻²) for 5 min. The resulting surface was rinsed twice with milli-Q water and dried under a stream of nitrogen.

2.5 Determination of the coupling efficiency of glycans onto the SPR surface

First, a calibration curve was constructed for a set of carbohydrate dilutions in water. For this, a phenolic aqueous solution (5 wt%, 60 μ L) and concentrated H₂SO₄ (900 μ L) were added to an aqueous carbohydrate solution (60 μ L), stirred for 10 min and then an absorption spectrum was recorded against a blank sample (without carbohydrate). The absorbance of the solution was measured at two wavelengths: $\lambda_1 = 495$ nm and $\lambda_2 = 570$ nm (background signal) and the difference in absorbance ($A_{495} - A_{570}$) was plotted against the concentration of the corresponding carbohydrate. The surface-linked carbohydrate quantity on the SPR interfaces was determined by dipping the interface into a phenol-H₂SO₄ following the same protocol described above.

2.6 Surface characterization

2.6.1 X-ray photoelectron spectroscopy. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were performed with an ESCALAB 220 XL spectrometer from Vacuum Generators featuring a monochromatic Al K α X-ray source (1486.6 eV) and a spherical energy analyzer operated in the CAE (constant analyzer energy) mode (CAE = 100 eV for survey spectra and CAE = 40 eV for high-resolution spectra), using the electro-magnetic lens mode. No flood gun source was needed due to the conducting character of the substrates. The angle between the incident X-rays and the analyzer is 58°. The detection angle of the photoelectrons is 30°, as referenced to the sample surface. The XPS spectra were recorded according to the binding energy of Au 4f7/2, equal to 80.0 eV.

2.6.2 UV/Vis measurements. Absorption spectra were recorded using a Perkin Elmer Lambda UV/Vis 950 spectrophotometer in quartz cuvettes with an optical path of 10 mm. The wavelength range was 400–800 nm.

2.6.3 SPR instrumentation. The surface plasmon resonance instrument used was a double-channel Autolab ESPRIT instrument (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) allowing simultaneous electrochemical and SPR measurements. The

configuration of this equipment is described elsewhere.^{36,37} In short, polarized laser light ($\lambda = 670$ nm) is directed to the bottom side of the sensor disk *via* a hemispheric lens and the reflected light is detected using a photodiode. The angle of incidence is varied using a vibrating mirror with a frequency of 44 Hz. SPR curves were scanned on the forward and backward movements of the mirror and the minima in reflectance were determined and averaged. The instrument is equipped with a cuvette of about 100 μ L. The prism used was N-BAF-3 having a refractive index of $n = 1.58$. The value of the equilibrium dissociation constant K_D of lectins to the glycan-modified SPR interface was evaluated with the BIAevaluation 3.2 RC1 program using the Langmuir binding model.

3 Results and discussion

3.1 Coupling of glycans onto lamellar SPR interfaces

As mentioned above, silica-based materials have attracted considerable attention for biological sensing because of the high reactivity of the surface silanol groups, enabling the immobilization of different molecules through silane coupling chemistry.^{29–31} A thin layer of SiO_x was deposited on the gold-based SPR interface using plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) as described recently.²⁷ These silica films exhibit very good stability in both organic and aqueous solutions as well as in piranha solution at 80 °C. Piranha treatment generates surface silanol groups required for silane coupling chemistry. One important aspect when considering a multilayered SPR interface such as Ti/Au/SiO_x is the effect of the top dielectric layer on the sensitivity of the sensor. The effect of the silica layer thickness on the sensitivity was recently theoretically examined in more detail.³⁸ Increasing the SiO_x layer thickness shifts the resonance angle to higher values, enhances the angular sensitivity of the plasmonic sensor chip, which is maximal at ≈ 55 nm, and simultaneously increases the EM field intensity at the SiO_x/analyte interface. On the other hand, increasing the silica thickness broadens the SPR dip and reduces the accuracy of the resonance measurements.

Phenyl azide- and perfluorophenyl azide-terminated SPR interfaces were generated as outlined in Fig. 1. The silanol groups were first reacted with (3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS) to yield surface NH₂ terminal groups. Well established amine-chemistry between the carboxylic acid group of 4-azido-benzoic acid (**2**) or 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (**1**) in the presence of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) was used to link phenyl azide and perfluorophenyl azide functions onto the SPR interface. The successful coupling of (**1**) or (**2**) onto the surface was confirmed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The high resolution spectra of the interfaces after modification with APTMS and further reaction with (**1**) and (**2**) are displayed in Fig. 2. The C1s spectrum of the APTMS modified SPR interface (Fig. 2Aa) can be deconvoluted into three bands at 285.0 (C–C/C–H), 286.4 (C–N) and 288.8 eV (C=O). The band at 288.8 eV is rather low and corresponds to surface impurities or contamination. The N1s high resolution XPS spectrum of the APTMS modified surface (Fig. 2Ba) shows a contribution at

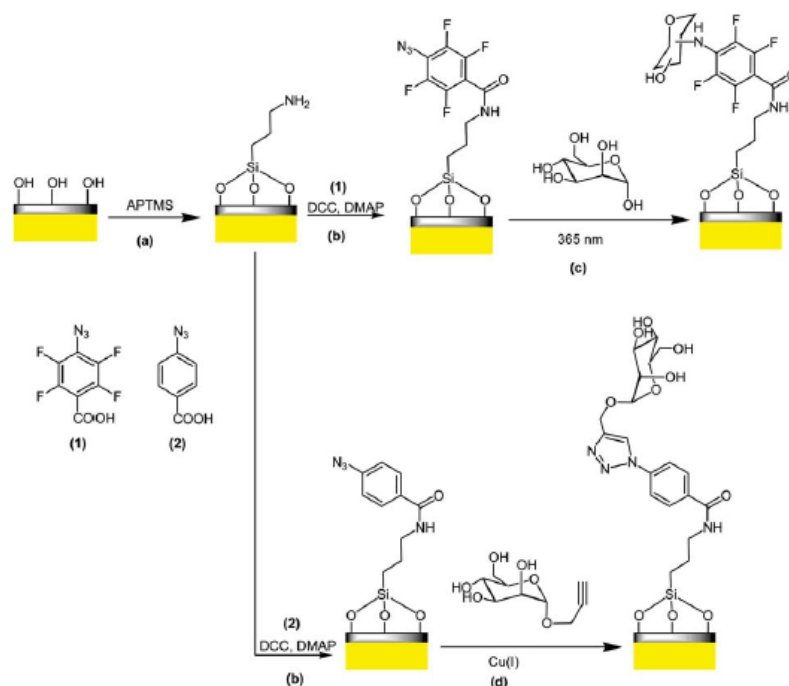


Fig. 1 Schematic representation of the SPR surface functionalization strategies employed for the covalent linking of mannose: (a) 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS), (b) *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), (c) photocoupling, and (d) "click" chemistry with alkynyl-terminated mannose.

399.0 eV ($-\text{NH}_2$) and 400.8 eV ($-\text{NH}_3^+$).³⁹ The experimentally determined ratio of C/N was 3.2. Unreacted APTMS has a C/N ratio of 6 : 1. As on ideal films all three methoxy groups are replaced by siloxane, a theoretical C/N ratio of 3 : 1 is expected. The higher C/N ratio is most likely due to the presence of some residual unreacted methoxy groups or/and contamination of the surface.^{40,41}

The C1s spectrum after aminolysis between the carboxylic acid function of 4-azidobenzoic acid (2) and the surface amine groups can be fitted with three bands at 284.8 (C–C/C–H), 286.2 (C–N) and 288.6 (C=O) (Fig. 2Ab). The ratio of C–N/C=O = 3.7 is somehow lower than the theoretical value of 4. This might be due to the presence of some unreacted amine groups. The N1s high resolution XPS spectrum of the azidophenyl modified interface displayed in Fig. 2Bb displays characteristic bands for the $-\text{N}_3$ group at 405.2 ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$) and 401.9 eV ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$) and a band at 400.6 eV due to the $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ function. The ratio of the bands corresponds to 1 : 2.6 : 1.6 (theoretical 1 : 2 : 1). The increased surface area recorded for the contribution at 401.98 eV and 400.61 eV is attributed to the presence of additional $-\text{NH}_3^+$ and NH_2 function due to unreacted surface amine functions and possibly formed by partial decomposition of the azide functions upon X-ray exposure during XPS analysis.⁴²

When the aminolysis reaction is performed with 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (1), an increase in the band at 288.4 due to C–F/C=O and at 286.9 (C–N) is observed,

suggesting a covalent linking of 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid to the SPR interface (Fig. 2Ac). The ratio of $[(\text{C}-\text{F}) + (\text{C}=\text{O})]/(\text{C}-\text{N}) = 1.19$ is close to the theoretical value of 1.25. This indicates that all the available amine groups were converted into amide linkage with 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid. The N1s high resolution XPS spectrum of the perfluorophenyl azide-modified interface (Fig. 2Bc) is comparable to that with 4-azidobenzoic acid (Fig. 2Bb) showing bands at 405.3 ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$), 401.5 eV ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$) and 400.6 eV ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ linkage) with a ratio of 1 : 2 : 1 in accordance with the chemical nature of the surface.

The N1s XPS spectrum changes significantly in the case of the Cu(I) catalyzed "click" of propargyl mannose to azidophenyl-terminated SPR interfaces (Fig. 3Aa). The conversion of the azide group into a triazole function is evident in the N1s XPS spectrum by the disappearance of the band at 405.2 eV. The N1s signal can be fitted into bands at 402.6 eV ($-\text{C}-\text{N}-$) and 400.4 eV ($-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$) due to the formation of the triazole ring with a ratio of 1 : 3.2. The additional band at 399.2 eV ($-\text{NH}_2$) is due to unreacted amine groups during the amidation reaction and/or due to some hydrolyzed azide groups.

Reaction of the perfluorophenyl azide with mannose *via* photoirradiation at 365 nm for 5 min with a power of 100 mW cm^{-2} is consistent with the conversion of the $-\text{N}_3$ group to the $-\text{NH}-$ function (Fig. 3Ab). The N1s band can be deconvoluted into three components at 402.3 ($-\text{C}-\text{N}-$), 400.6 ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$) and 399.2 eV ($-\text{NH}_2$) with a ratio of 1 : 1 : 0.6. The formed $-\text{NH}_2$ is

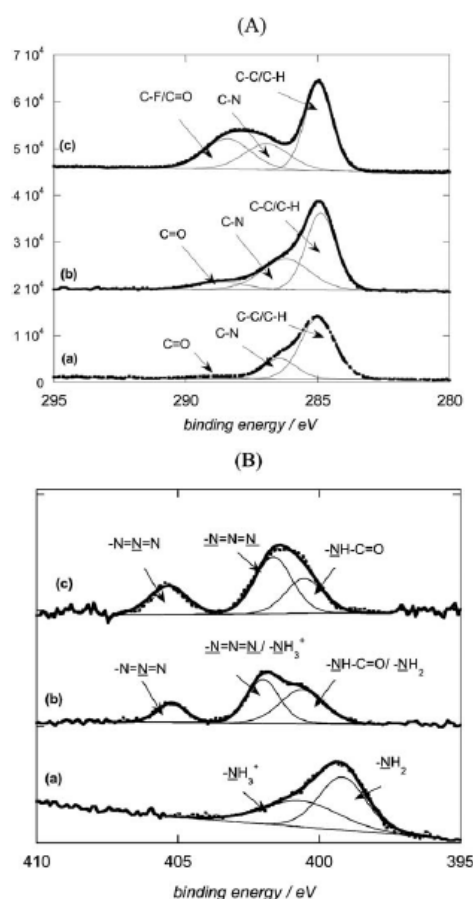


Fig. 2 High resolution XPS of C1s (A) and N1s (B) core level spectra of amine- (a), azidophenyl- (b), and perfluorophenyl azide-terminated (c) SPR interfaces.

most likely from some of the various side reactions of the perfluorophenyl azide under photoactivation.¹⁹ The absence of the band at 405.2 (Ar-N=N=N⁺) indicates, *a priori*, a complete activation of the azido groups under this conditions.

3.2 Coupling efficiency of glycan

The density of a particular glycan on a given surface is known to have important consequences on its avidity and even, in some cases, on its selectivity towards a particular lectin receptor.^{5,14} The efficiency of coupling either mannose or β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose (lactose) onto the newly constructed SPR interfaces was determined using a method based on the reaction of carbohydrates with phenol in concentrated sulfuric acid. Fig. 3B shows the calibration curve for mannose and lactose used in the determination of the density of glycans on a given sugar-functionalized SPR interface. The mannose concentrations on perfluorophenyl azide and phenyl azide activated SPR interfaces were determined as 3.9 nmol cm^{-2} and 3.4 nmol cm^{-2} , corresponding to $(2.4 \pm 1.1) \times 10^{15}$ and

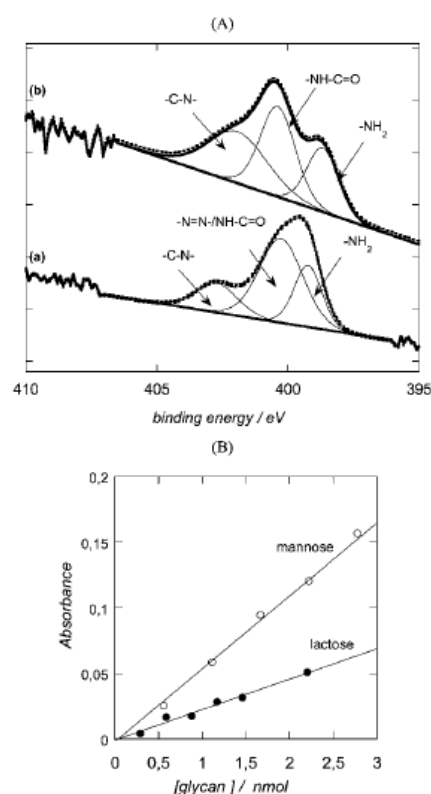


Fig. 3 (A) High resolution XPS of N1s core level spectra of (a) azidophenyl-terminated interface after "click" reaction with propargyl mannose, (b) perfluorophenyl azide-terminated interfaces after photocoupling of mannose. (B) Standard calibration curve (absorption at 495 nm) of mannose (O) and lactose (●) in water using the phenol-sulfuric acid reaction.²⁰

$(2.1 \pm 2.1) \times 10^{15}$ molecules per cm^2 , respectively. This compares to grafting densities reported on other mannose functionalized surfaces.⁴³ In the case of the disaccharide lactose, saccharide concentrations of $(2.2 \pm 1.2) \times 10^{15}$ and $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{15}$ molecules per cm^2 were obtained for photochemical and "click" approaches, respectively. This indicates that the efficiency of the linking chemistry is not affected whether it is a mono or a disaccharide. The amounts of sugar linked to the SPR interfaces using either of the coupling strategies are thus seen to be comparable and the coupling efficiency is of the same order as that reported previously for other methods.^{21,44}

3.3 Activity and specificity of glycan modified interfaces

The biorecognition properties of the mannose and lactose modified SPR interfaces were subsequently evaluated using SPR by injection of *Lens culinaris* and *Arachis hypogaea* (PNA). *Lens culinaris* is primarily specific to mannopyranoside units, while PNA binds specifically to α -D-galactopyranose. The SPR technique allows for real-time monitoring of the association and

dissociation of the lectins and provides an easy way to access the stability of the immobilization over several injections. Typical binding curves for the two lectins on mannose-modified interfaces are presented in Fig. 4A.

The highly reactive perfluorophenylnitrene intermediate, generated through UV irradiation, is known to give a wide range of potential reaction products, although it is the C–H insertion pathway that is reported to be preferred.¹⁹ Nevertheless, this pathway can in principle lead to sugars conjugated to surfaces *via* centers other than their anomeric carbons and alpha and beta selectivity is not guaranteed either. To investigate whether immobilized sugar ligands do indeed maintain their expected binding affinity and selectivity towards the appropriate lectin partner, the SPR signal obtained on the mannose-modified SPR interface formed *via* a photocoupling strategy (with perfluorophenyl azide functionalized surfaces) was compared to that recorded for the corresponding mannose-decorated interface obtained through the “click” approach.

The two methods give identical amounts of mannose on the respective interfaces, and therefore their SPR signals can be directly compared. As can be seen, an immediate change in the SPR signal is observed upon injection as a consequence of the

association of the mannopyranoside specific *Lens culinaris* lectin, with either mannose-decorated surface. The difference in change in the SPR signal is somewhat larger in the case of the mannose interface formed through the photocoupling approach compared with that fabricated *via* the “click” strategy (Fig. 4A). The random photoimmobilization seems to be thus less random than expected, having a strong tendency to take preferential place at the reducing ends.

This indicates that although this immobilization scheme might not necessarily give sugars linked exclusively *via* their anomeric positions this does not impact on their interaction with their lectin binding partners. The hydrophobic character of the perfluorophenyl azide-terminated interface results in very low nonspecific interaction of the lectin with the surface, while some nonspecific interaction is observed for that functionalized with azidophenyl groups. Furthermore, the mannose chip could easily be regenerated upon phosphoric acid treatment (Fig. 4B). Not only was the recognition ability retained for the photocoupled mannose interface, but also the relative binding affinity (Fig. 4B). The binding specificity of photocoupled mannose- and lactose-interfaces was further investigated. Fig. 5 shows SPR curves for the interaction of *Lens culinaris* and PNA on mannose- and lactose-modified SPR interfaces, respectively. The results indicate that photochemically linked mannose is recognized

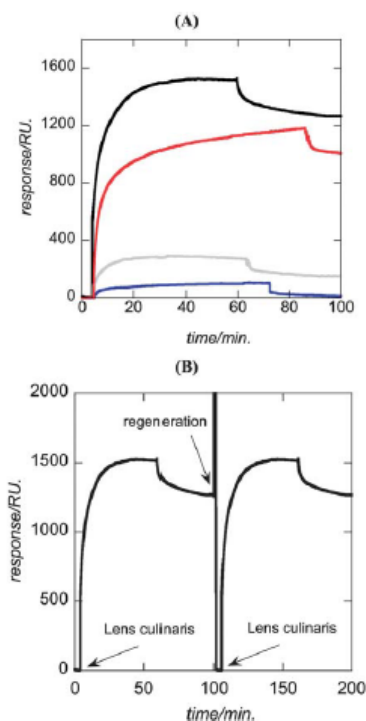


Fig. 4 SPR binding curves of *Lens culinaris* ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) to mannose-modified and unmodified SPR interfaces. (A) Mannose linked to perfluorophenyl azide through UV irradiation (black), mannose linked to phenyl azide *via* “click” (red), interaction with perfluorophenyl azide- (blue) and with phenyl azide- (grey) terminated interfaces. (B) Injection of *Lens culinaris* ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), regeneration of the surface with phosphoric acid (0.1 M), and injection of *Lens culinaris* ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

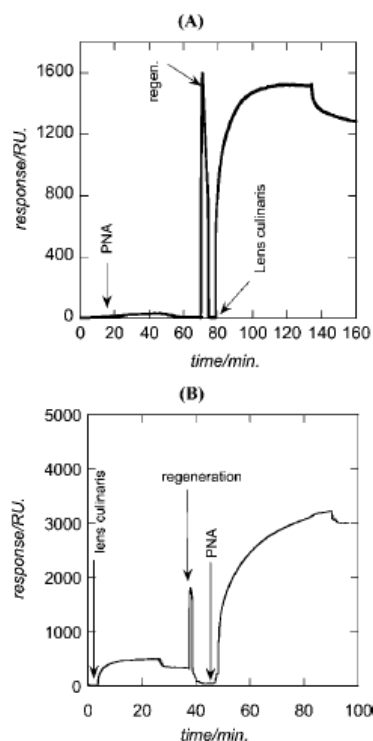


Fig. 5 Determination of the specificity of the glycan interface to lectins: (A) mannose- and (B) lactose-modified interfaces formed by photoreaction on perfluorophenyl azide-modified SPR chips: interaction with *Lens culinaris* or PNA ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

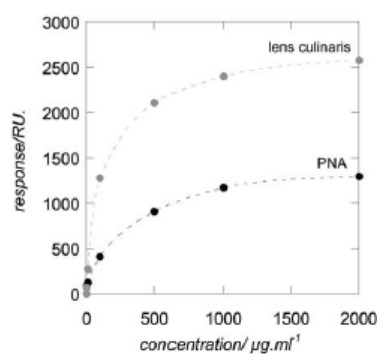


Fig. 6 SPR signal vs. lectin concentration curve determined on the photochemically linked mannose interface: *Lens culinaris* (grey), PNA (black).

preferentially by *Lens culinaris*, while lactose-modified surfaces interact mainly with PNA. The association constant K_A of the systems is $(9.23 \pm 0.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for mannose/*Lens culinaris* and $(5.56 \pm 0.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for lactose/PNA, respectively. The association constant determined for mannose/*Lens culinaris* for the photoimmobilization strategy was higher than that obtained by electrochemical impedance analysis on mannose modified diamond interfaces,⁵ but comparable to that obtained using other methods.^{21,45,46} The same is valid for lactose/PNA.⁴⁷ This indicates, that the photoimmobilization is less random than expected and has a tendency to take preferential place at the reducing ends. This is in accordance with the observation (Fig. 4A) that the interaction with specific lectins with photoimmobilized saccharides shows larger SPR signals as compared to the “clicked” glycans. Non-specific lectin association constants of $(2.23 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for mannose/PNA and $(4.06 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for lactose/*Lens culinaris* were determined, respectively.

As expected the SPR signal is dependent on the lectin concentration as seen in Fig. 6. The detection sensitivity is dictated by a number of factors, of which the most important are the coupling efficiency of the analytes to the chip matrices, strength of recognition, and method of detection. With mannose as a test interface, the SPR curve levels off at a concentration of $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ of *Lens culinaris* with an estimated detection limit of $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. This is comparable to detection limits reported for other protein-carbohydrate interactions using SPR.⁴⁸ The disaccharide, lactose, gives a slightly lower detection limit of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ when tested with the galactose specific, PNA lectin.

4 Conclusion

In conclusion, we have shown that the photocoupling of perfluorophenyl azide modified SPR interfaces with free glycans such as mannose and lactose is a convenient strategy for the covalent immobilization of sugars onto novel lamellar Ti/Au/silicon dioxide interfaces. Although this latter surface conjugation strategy need not give anomeric center specific surface attachment, this is seen not to have a bearing on the SPR

behavior of the fabricated sugar interfaces, which are seen to maintain their expected binding affinity and specificity towards their partner lectins. Further, the sensitivity of response of the photocoupled interfaces to lectins such as *Lens culinaris* is comparable to that obtained with azidophenyl functionalized SPR interfaces, decorated with sugars via a Cu(I) catalyzed “click” reaction with propargylated sugars.

References

- 1 F. J. Munoz, A. Rumero, J. V. Sinisterra, J. I. Santos, S. André, H.-J. Gabius, J. Jiménez-Barbero and M. J. Hernaiz, *Glycoconjugate J.*, 2008, 25, 633.
- 2 M. Ambrosi, N. R. Cameron and B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 1593.
- 3 E. Mercey, R. Sadi, E. Maillart, A. Roget, F. Baleux, H. Lortat-Jacob and T. Livache, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 3476.
- 4 R. Jelinek and S. Kolusheva, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 5987.
- 5 S. Szunerits, A. Siriwardena and R. Boukherroub, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 8203.
- 6 O. Norberg, L. Deng, M. Yan and O. Ramstrom, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 2364.
- 7 O. Oyeleran and J. C. Gildersleeve, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, 13, 406.
- 8 H.-K. Wang, Y. Zhang, X. Yuan, Y. Chen and M. Yan, *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, 26.
- 9 C. R. Yonzon, E. Jeoung, S. Zhou, G. C. Schatz, M. Mrksich and R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 12669.
- 10 K. Mizukami, H. Takakura, T. Matsunaga and H. Kitano, *Colloids Surf., B*, 2008, 66, 110.
- 11 D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng and A. Wang, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 275.
- 12 W. G. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen and J. P. Knox, *Proteomics*, 2002, 2, 1666.
- 13 D. A. Mann, M. Kanai, D. J. Maly and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 10575.
- 14 C. F. Grant, V. Kanda, H. Yu, D. R. Bundle and M. T. McDermott, *Langmuir*, 2008, 24, 14125.
- 15 B. T. Housemann and M. Mrksich, *Chem. Biol.*, 2002, 9, 443.
- 16 W.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis and E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.*, 2006, 17, 52.
- 17 M. R. Lee and I. Shin, *Org. Lett.*, 2005, 15, 4269.
- 18 X. Zhou and J. Zhou, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21, 1451.
- 19 L.-H. Liu and M. Yan, *Acc. Chem. Res.*, 2010, 43, 1434.
- 20 X. Wang, O. Ramstrom and M. Yan, *J. Mater. Chem.*, 2009, 19, 8944.
- 21 S.-M. Park, M. R. Lee and I. Shin, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 155.
- 22 A. Tyagi, X. Wang, L. Deng, O. Ramstrom and M. Yan, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 26, 344.
- 23 O. Norberg, L. Deng, T. Aastrup, M. Yan and O. Ramstrom, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 1000.
- 24 O. Norberg, I. H. Lee, T. Aastrup, M. Yan and O. Ramstrom, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 34, 51.
- 25 K. R. Love and P. H. Seeberger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41, 3583.

- 26 X. Wang, O. Ramström and M. Yan, *Adv. Mater.*, 2010, 22, 1946.
- 27 S. Szunerits and R. Boukherroub, *Langmuir*, 2006, 22, 1660.
- 28 S. Szunerits and R. Boukherroub, *Electrochem. Commun.*, 2006, 8, 439.
- 29 S. Szunerits, Y. Coffinier, S. Janel and R. Boukherroub, *Langmuir*, 2006, 22, 10716.
- 30 E. Wijaya, C. Lenaerts, S. Maricot, J. Hastanin, S. Habraken, J. P. Vilcot, R. Boukherroub and S. Szunerits, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2011, 15, 208.
- 31 M. Manesse, V. Stambouli, R. Boukherroub and S. Szunerits, *Analyst*, 2008, 133, 1097.
- 32 W. H. Thomas, L. Remy, B. Julie and W. Lode, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 1998, 10, 349.
- 33 A. K. Allen, N. N. Desai and A. Neuberger, *Biochem. J.*, 1976, 155, 127.
- 34 R. K. Roy and K. R. Lee, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2007, 83, 72.
- 35 F. Barka-Bouaïfel, J. Niedołtka-Jönsson, X. Castel, O. Saison, A. Akjouj, Y. Pennec, B. Djafari-Rouhani, P. Woisel, J. Lyskawa, L. Sambe, G. Cooke, N. Bezzi, R. Boukherroub and S. Szunerits, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 3006.
- 36 T. Wink, S. J. Van Zuilen, A. Bult and W. P. Van Bennekom, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 827.
- 37 R. P. H. Kooyman, A. T. M. Lenferink, R. G. Eenik and J. Greve, *Anal. Chem.*, 1991, 63, 83.
- 38 S. Szunerits, A. Shalabney, I. Abdulhalim and R. Boukherroub, *Rev. Anal. Chem.*, 2012, 31, 15–28.
- 39 C. Haensch, S. Hoepfner and U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 39, 2323.
- 40 S. Xiang, G. Xing, W. Xue, C. Lua and J.-M. Lin, *Analyst*, 2012, 137, 1669.
- 41 J. P. Youngblood and J. A. Howarter, *Langmuir*, 2006, 22, 11142.
- 42 L.-H. Liu, G. Zorn, D. G. Castner, R. Solanki, M. M. Lerner and M. Yan, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 5041.
- 43 W. Song, C. Xiao, L. Cui, Z. Tang, X. Zhuang and X. Chen, *Colloids Surf., B*, 2012, 93, 188.
- 44 P.-H. Liang, S.-K. Wang and C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 11177.
- 45 E. Duverger, N. Frison, A.-C. Roche and M. Monsigny, *Biochimie*, 2003, 85, 167.
- 46 A. Kussrow, E. Kaltgrad, M. L. Wolfenden, M. J. Cloninger, M. G. Finn and D. J. Bornhop, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 4889.
- 47 K. Kwonil, M. Kazunori and K. Nobuo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 4311.
- 48 M. J. Linman, J. D. Taylor, H. Yu, X. Chen and Q. Cheng, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 4007.

Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces

Sabine Szunerits · Nazek Maalouli · Edy Wijaya ·
Jean-Pierre Vilcot · Rabah Boukherroub

Received: 11 September 2012 / Revised: 20 November 2012 / Accepted: 30 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Surface plasmon resonance (SPR) is a powerful technique for measurement of biomolecular interactions in real-time in a label-free environment. One of the most common techniques for plasmon excitation is the Kretschmann configuration, and numerous studies of ligand–analyte interactions have been performed on surfaces functionalized with a variety of biomolecules, for example DNA, RNA, glycans, proteins, and peptides. A significant limitation of SPR is that the substrate must be a thin metal film. Post-coating of the metal thin film with a thin dielectric top layer has been reported to enhance the performance of the SPR sensor, but is highly dependent on the thickness of the upper layer and its dielectric constant. Graphene is a single-atom thin planar sheet of sp² carbon atoms perfectly arranged in a honeycomb lattice. Graphene and graphene oxide are good supports for biomolecules because of their large surface area and rich π conjugation structure, making them suitable dielectric top layers for SPR sensing. In this paper, we review some of the key issues in the development of graphene-based SPR chips. The actual challenges of

using these interfaces for studying biomolecular interactions will be discussed and the first examples of the use of graphene-on-metal SPR interfaces for biological sensing will be presented.

Keywords Biosensors · Thin films · Bioanalytical methods · Biological samples · Electrochemical sensors · Mass sensitive sensors · Interface · Surface analysis

Introduction

Biosensors based on the detection principle of surface plasmon resonance (SPR) have become routine analytical tools [1]. The promising potential of such SPR sensors is their very high sensitivity to a change in the refractive index of the sensing medium, which occurs upon binding of target molecules (analyte), in solution, to their affinity partners (ligand) immobilized on the SPR chip (Fig. 1a). This change in the refractive index of the sensed medium induces specific alternations in the surface plasmon resonance characteristics (e.g. the position of the SPR minimum angle, the amount of light reflected, the full half width of the SPR signal). The quality of an SPR sensor, for example its sensitivity and selectivity, are defined by the chemical and optical stability of the metal and sensing layer and by the dip depth and width of the sensor signal. Most commonly, thin films of gold or silver deposited on a high-refractive-index prism are used, because these metals support the propagation of surface plasmon polaritons at visible light frequencies. Gold substrates are preferentially used because they have stable optical and chemical properties. However, gold substrates are not the best candidates for achieving high-sensitivity SPR sensing. In the conventional visible range, silver substrates seem to be the most appealing, because plasmon coupling has sharper angular resonance than that

Published in the topical collection *Characterization of Thin Films and Membranes* with guest editors Daniel Mandler and Pankaj Vadgama.

S. Szunerits (✉) · N. Maalouli · R. Boukherroub
Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, UMR 3078),
Université Lille 1, Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley,
BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France
e-mail: Sabine.Szunerits@iri.univ-lille1.fr

N. Maalouli
Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (UMR
CNRS 8523), Université Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

E. Wijaya · J.-P. Vilcot
Institut d'Electronique, de Microélectronique, et de
Nanotechnologie (IEMN, UMR 8520), Université Lille 1,
Avenue Poincaré, BP 60069, 59652 Villeneuve d'Ascq,
France

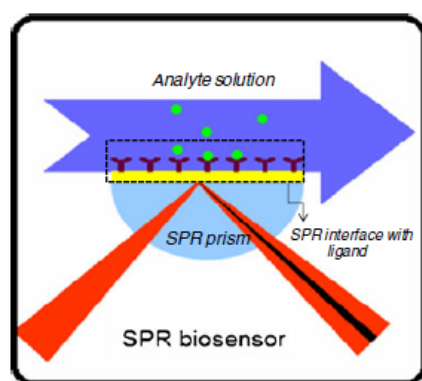


Fig. 1 SPR set up: the gold surface is functionalized with a biorecognition element, which can react with biological analytes, represented as green dots. The large blue arrow indicates the flow of the solution to be analyzed; in practice this flow is ensured by use of a microfluidic system

on gold, yielding increased sensitivity [2, 3]. However, silver suffers from a poor chemical stability which hampers its wide use for SPR sensing. One strategy to circumvent this limitation is to use bimetallic silver–gold layers [4, 5]. Alternatively, lamellar structures, in which silver is post-coated with 5–10 nm thin oxide films (ITO, SnO_2) have been used and have enabled sensitive sensing [2, 6–10]. In a related approach, Lockett et al. deposited a thin layer of amorphous carbon on surface plasmon active silver substrates [11]. In this case, very stable covalent chemistry as a result of C–C bond formation was used to modify the SPR chip. The sensitivity achieved was, however, lower than that on gold, which is indicative of the need for overlayers that do not absorb light in the visible range, as is observed for amorphous carbon [12]. The use of amorphous carbonated silicon ($\text{a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$) could overcome this limitation [6, 7], because changing the carbon content enables fine tuning the material properties to obtain a rather transparent film in the visible range. These overlayers also provided the scope for new surface functionalization, which can be used for anchoring ligands to the SPR sensor chip.

More recently, graphene has been theoretically considered as an alternative coating on silver [13] and on gold [14] (Fig. 1b). The refractive index of graphene in the visible range was estimated to be $n=3+iC\lambda/3$, where λ is the wavelength in μm and the constant C equals $5.446\ \mu\text{m}^{-1}$ [15]. Graphene functionalized SPR surfaces are believed to have several advantages:

1. Graphene has a very high surface-to-volume ratio which is expected to be beneficial for efficient adsorption of biomolecules compared with gold.
2. Graphene should increase the adsorption of organic and biological molecules because their carbon-based ring

structure enables π stacking interaction with the hexagonal cells of graphene.

3. The presence of graphene on the top of silver passivates the surface against oxidation, making possible the use of silver as plasmon-active interface.
4. Controlling the number of graphene layers transferred on to the metal interface enables control of the SPR response and the sensitivity of SPR measurements.

All this together should result in enhanced performance and sensitivity of SPR-based sensors. A theoretical study by Wu et al. showed that graphene could improve the performance of SPR-based biosensors in two ways:

1. by enhancing the adsorption of biomolecules by the metal–graphene interfaces, because of the specific nature of graphene; and
2. by controlling the number of transferred graphene layers.

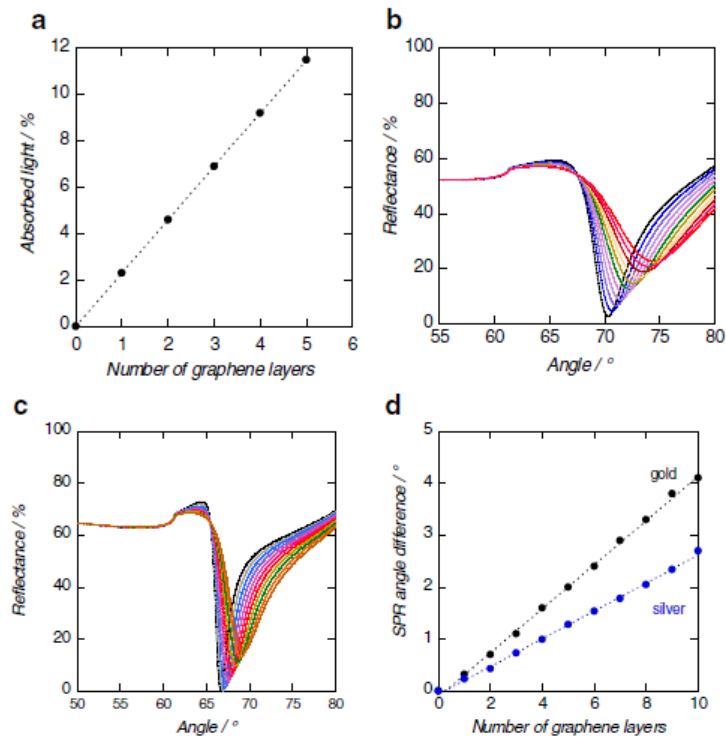
However, π -stacking interaction is not specific, and any organic molecule or biomolecule of appropriate aromatic structure will integrate onto the graphene matrix. This is currently a major limitation of these SPR interfaces.

In this mini-review, we will present the state of the art of graphene-based SPR chips (Fig. 1b). First, general issues, for example the effect of a single or several graphene nanosheets on the plasmonic response will be discussed. The importance of the underlying thin metal films being gold or silver will be evaluated. The different strategies used for the formation of stable and reproducible graphene-on-metal interfaces will be presented. Finally, the use of these interfaces for study of biomolecular interactions will be emphasized by a few examples.

General considerations

The number of publications devoted to graphene-based propagating SPR sensors is still surprisingly low [13, 14, 16–22]. It is only two years ago that theoretical calculations by Wu's group [14] reported that graphene-on-gold SPR biosensors are expected to be more sensitive than conventional thin film SPR biosensors. It was shown that the light transmittance at $\lambda=633\ \text{nm}$ through a graphene monolayer is approximately 97.7 %, which is related to the fine structures constant, a , by $\pi a=2.3\%$ [14, 15]. This implies that a one-atom-thick graphene layer will absorb 2.3 % of the incident light and each additional graphene layer absorbs the same amount (Fig. 2a). For SPR, this means that every additional layer of graphene results in a shift to higher plasmonic angles as seen in Fig. 2b and c for gold and silver-based SPR interfaces, respectively. The change of the position of the surface plasmon minimum varies linearly with the number of additional graphene layers (Fig. 2d),

Fig. 2 Theoretically predicted change in absorbed light as a function of the number of graphene layers (a). Change of SPR signal as a function of graphene layers (0–10 layers) on gold (b) and on silver (c) at $\lambda=633$ nm ($n_{\text{graphene}}=3+i1.49106$, $n_{\text{gold}}=0.197+i3.67$ ($d=50$ nm), $n_{\text{silver}}=0.140+i4.581$ ($d=38$ nm); $n_{\text{Tl}}=2.36+i3.47$ ($d=5$ nm), $n_{\text{prism}}=1.52$, $n_{\text{dielectric}}=1.333$); (d) change in SPR angle as a function of the number of graphene layers on gold and on silver, determined from b and c



being less pronounced on silver than on gold. For gold, however, the curve width and magnitude of the reflectivity change dramatically with additional graphene layers. This absorptive plasmon damping is associated with the nonzero imaginary dielectric component ($k=1.149106$ at 633 nm) [13]. Although the use of silver rather than gold results in smaller increase of the resonance angle with additional graphene layers, silver-based SPR interfaces result in less broadening of the SPR curve and are, thus, good candidates for affinity-based sensing. The sensitivity of the graphene-based sensor, S , is defined by:

$$S = \frac{\Delta P}{\Delta n} \times E \quad (1)$$

where ΔP is the change in the sensor output (e.g. change of reflectance intensity, change of position of surface plasmon resonance angle) and Δn the change in the refractive index. The term E represents the absorption efficiency of the target molecule on the graphene–SPR interface. Compared with gold, biomolecules adsorb more strongly on graphene, because of π -stacking interactions between the graphene's hexagonal cells and the carbon-based ring structures present in biomolecules [23]. This enhanced adsorption efficiency on graphene (Eq. 2):

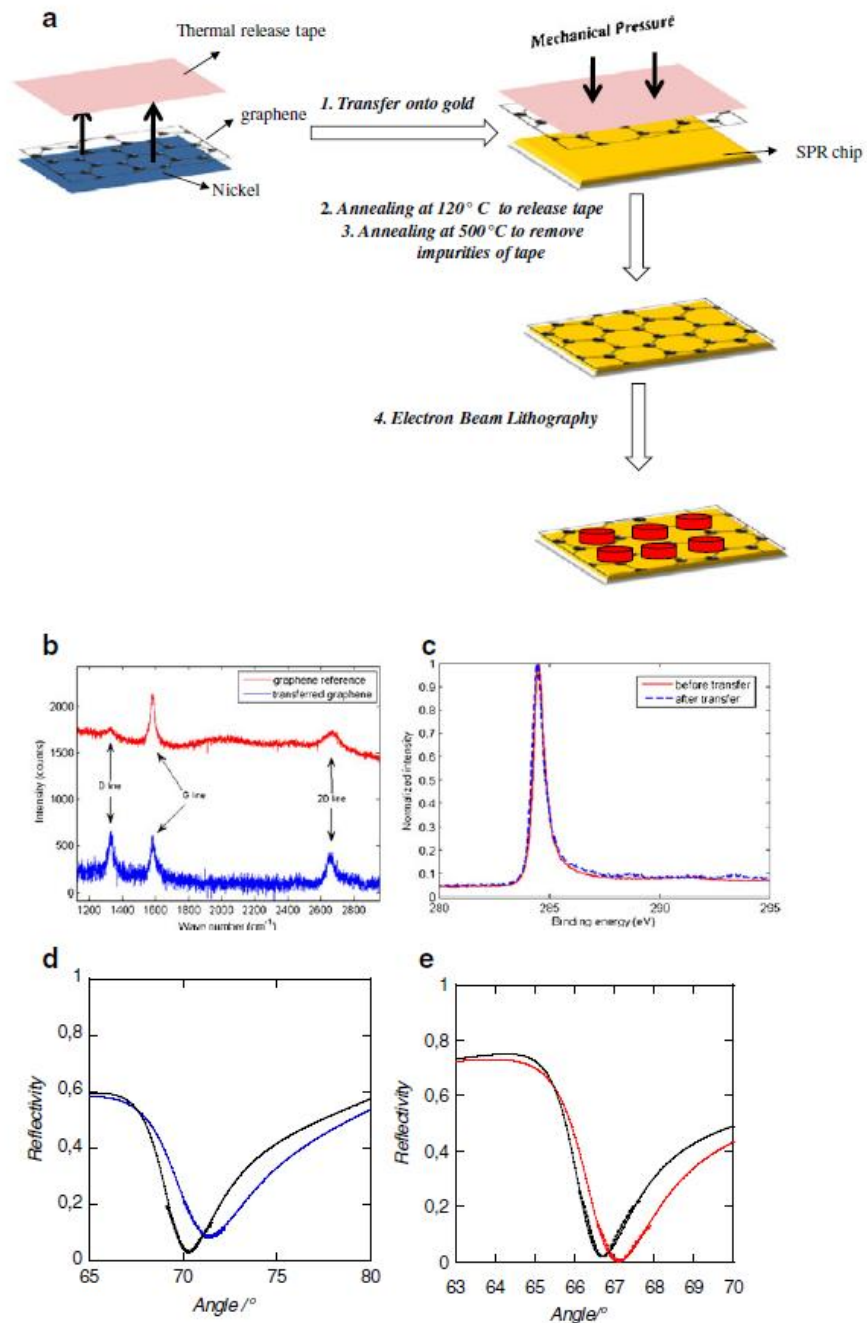
$$E_{\text{graphene}} = \gamma \times E_{\text{conventional}} \quad (2)$$

is one of the important mechanisms increasing the overall sensitivity of the graphene-based SPR interface. In addition to the number of graphene sheets transferred onto gold, the adsorption efficiency must be taken into account when determining the overall sensitivity of graphene-based SPR interfaces. As suggested by Wu et al. [14], addition of a few graphene layers L on to gold is able to increase sensor sensitivity $(1+0.025L) \times \gamma$ times. To obtain a clear understanding of the refractive index sensitivity improvement, γ must be estimated experimentally. The development of approaches for transfer of graphene thus became timely.

Fabrication of graphene-modified SPR chips

The transfer of graphene onto gold and silver SPR interfaces can be achieved in several ways. The transfer of large-area graphene grown by chemical vapour deposition (CVD) onto metal substrates is an attractive approach because it results in reproducible graphene SPR interfaces where the number of transferred graphene layers can be controlled. The use of a dry transfer technique, similar to wire bonding, to transfer the top graphene layer onto gold or silver thin films is a fast and highly reproducible means of fabricating graphene-based SPR interfaces (Fig. 3a) [21]. It is based on the use of a commercial thermal release tape, which enables

Fig. 3 (a) Dry transfer process. (b) Raman spectra of the transferred graphene (blue) and the original graphene (red) on Ni. (c) C1s high-resolution XPS spectra of graphene before (solid red) and after (dashed blue) transfer. Surface plasmon resonance curves of gold (d) and silver (e) surfaces before (black) and after (blue, red) transfer of graphene using the dry transfer process described in a. Experimental data, dotted lines; theoretical SPR curves, full lines. ($n_{\text{prism}}=1.52$, $n_{\text{Ti}}=2.36+i3.47$ ($d=5$ nm); $n_{\text{Au}}=0.197+i3.67$ ($d=50$ nm); $n_{\text{Ag}}=0.14+i4.581$ ($d=38$ nm); $n_{\text{graphene}}=3.0+i1.216$; $\lambda=633$ nm)



mechanical transfer of the surface of a 1 mm² graphene sheet, originally grown by chemical vapour deposition (CVD), onto nickel-coated silicon substrate. The tape is released by annealing the interface at 120 °C for 2–3 min and then rinsed with acetone followed by a high temperature annealing at 500 °C for 360 min to remove any remaining

traces of the tape. The transferred graphene was characterized by Raman (Fig. 3b) and X-ray photoelectron spectroscopy (Fig. 3c) to check whether the transfer process results in oxidation or carbonization of the graphene. Figure 3b shows Raman spectra of graphene grown on nickel foil and of graphene transferred onto gold. The G-band and

2D-band Raman signals are clearly seen in both cases. The intensity of the D-band is very small for graphene formed by CVD on nickel foil, indicative of a high-quality graphene layer. The integrated intensity ratio of the 2D peak to the G peak of the Raman spectra increases from 0.5 before transfer to 0.75 after transfer, suggesting that unavoidable mechanical defects do result from the transfer process. The C1s core level high-resolution X-ray photoelectron (XPS) spectrum (Fig. 3c) of the transferred graphene contains a single sharp band at 284.5 eV, arising from the sp^2 C–C bonds of the graphene sheet, which confirms that the chemical state of the transferred graphene is unaltered compared with the original graphene. The resulting surface plasmon resonance curves for gold and silver before and after graphene coating are seen in Fig. 3d, e; a prism with $n_{\text{prism}}=1.52$ and a wavelength of $\lambda=633$ were used to illuminate the metal–graphene interface. The imaginary part of the refractive index is $k=1.216$ at this wavelength, and this was used to fit the experimentally determined SPR curves. From the angle shift, a thickness of approximately 1.02 nm can be deduced in both cases, which corresponds to three graphene layers.

A similar strategy was used by the group of Kocabas, as outlined in Fig. 4a [17]. In this case, CVD-grown graphene on Cu foil was first coated with a 1.4 μm thick photoresist (AZ5214). A flat elastomeric polydimethylsiloxane (PDMS) stamp was then placed on the top and the copper foil was etched with iron chloride (1 mol L^{-1}) solution, leaving the photoresist with graphene on the PDMS stamp. The stamp was applied to metal coated glass slides and heated to 80°C to release the photoresist. The high quality of the CVD-grown graphene was apparent from the small intensity of the D-band in the Raman spectrum (Fig. 4b). The intensity ratio of the 2D to the G band is approximately 1.7 and the Lorentzian line-width of the 2D band is 37 cm^{-1} . A red shift of 43 cm^{-1} is observed for the 2D peaks after the transfer process, most likely because of release of the stress on the graphene [17]. The presence of the graphene layer induced an angle shift of 1° (Fig. 4c), which at a wavelength of 633 nm corresponds to approximately two transferred graphene layers (cf. Fig. 2d).

Although transfer of CVD graphene has the advantage of using high-quality graphene and enables control of the number of graphene layers, the strategy implies access to CVD-grown graphene. Direct deposition of either graphene oxide (GO) or chemically reduced graphene oxide (rGO) is an appealing alternative. GO has been directly bound to gold by spin-coating an ethanolic solution of GO containing 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) [20]. The MPTS enables linking of GO to gold via thiol bonds, and the trimethoxy groups of MPTS react in subsequent hydrolysis and/or condensation reactions with hydroxyl groups present on the GO. This modification resulted in a total angle shift of 1.5° and indicates, a priori, that several GO sheets are transferred to the gold interface.

Strong electrostatic interactions between a positively charged gold interface and rGO [19] or polyelectrolyte-functionalized ionic liquid-decorated graphene sheet (PFIL-rGO) composites [18] enabled simple modification of gold SPR interfaces. Positively charged SPR interfaces were formed by immersing the gold interface in 3-mercaptopropionic acid, followed by immersion in 1 % poly-diallyldimethylammonium chloride (PDDA) solution for 1 h. This interface was then immersed into a solution of graphene. A rapid increase in the SPR angle indicated spontaneous assembly as a result of electrostatic interactions between the graphene and PDDA [19]. Curve fitting suggests that two layers of graphene are transferred onto the gold surface. From AFM images on positively charged gold and after graphene deposition, it is evident that graphene adheres uniformly to the surface and the outline of graphene can also be clearly seen.

The other, similar, approach is based on the formation of positively charged graphene by modifying graphene with an ionic liquid [18]. The ionic liquid interacts strongly with graphene by π – π interactions between the imidazole ring and the aromatic rings of graphene sheets. This graphene–ionic liquid composite is transferred to gold by a layer-by-layer approach using Prussian blue (PB)-modified nanoparticles as negative counterparts.

Chemical sensing

Although the literature on the use of graphene for electrochemical sensing is steadily increasing [24], there are only a few reports on the use of graphene-based SPR interfaces [17–21]. As already mentioned, graphene serves as a good support for biomolecules, because of its large surface area (theoretical limit $2630\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$) and rich π -conjugation structure. The increase in adsorption of such biomolecules as biotinylated BSA on graphene has been investigated by us. This is rather important, because it would enable estimation of the efficiency of adsorption of graphene as compared with gold (Eq. 2). Figure 5a shows the increase in SPR response units upon addition of $1.5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ biotinylated BSA (molecular mass 66.5 kDa) to gold and graphene-on-gold interfaces. The coverage of biotinylated BSA on the gold film is approximately 230 ng cm^{-2} whereas that on graphene is 1205 ng cm^{-2} i.e. five times more. This estimate is based on the assumption generally accepted that 1 RU (response unit) change corresponds to 1 ng cm^{-2} mass change at the sensor interface [25]. The detection limit of biotinylated BSA on graphene is $\sim 1\text{ nmol L}^{-1}$ whereas on gold it is $\sim 100\text{ nmol L}^{-1}$ (Fig. 5b) with a dissociation constant $K_D=4.6\times 10^{-13}\text{ mol L}^{-1}$ for graphene–BSA, approaching the $K_D\approx 10^{-15}\text{ mol L}^{-1}$ of biotin–avidin. The dissociation constant of BSA on gold is two orders of magnitude lower, $K_D=4.6\times 10^{-11}\text{ mol L}^{-1}$, in

Fig. 4 (a) Transfer printing process based on the use of a photoresist layer. (b) Raman spectra of as-grown graphene on copper (*green*) and transfer-printed graphene on silver (*blue*) and gold (*red*) [17]. (c) SPR curves of gold (*red*) and graphene-on-gold (*black*) (kindly provided by C. Kocabas)

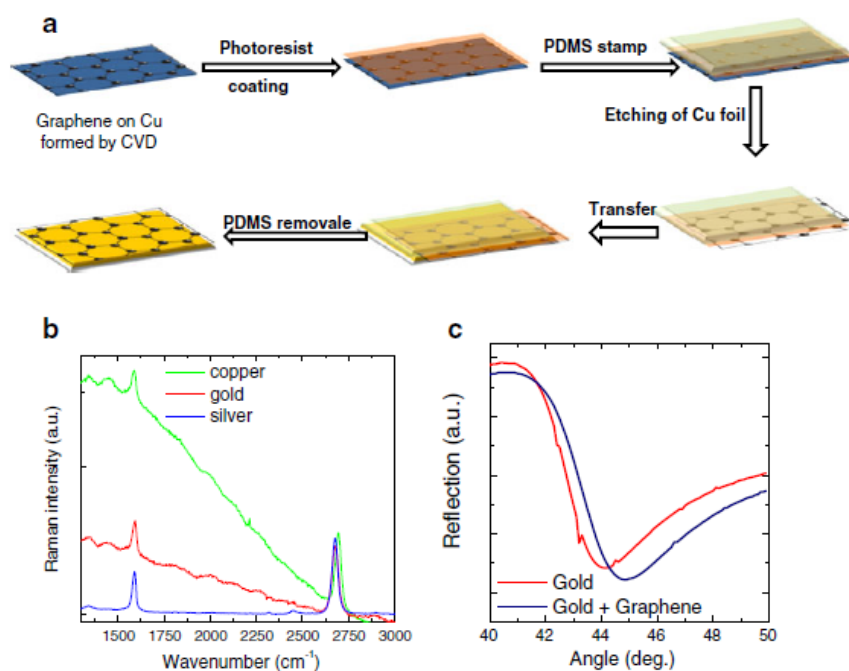
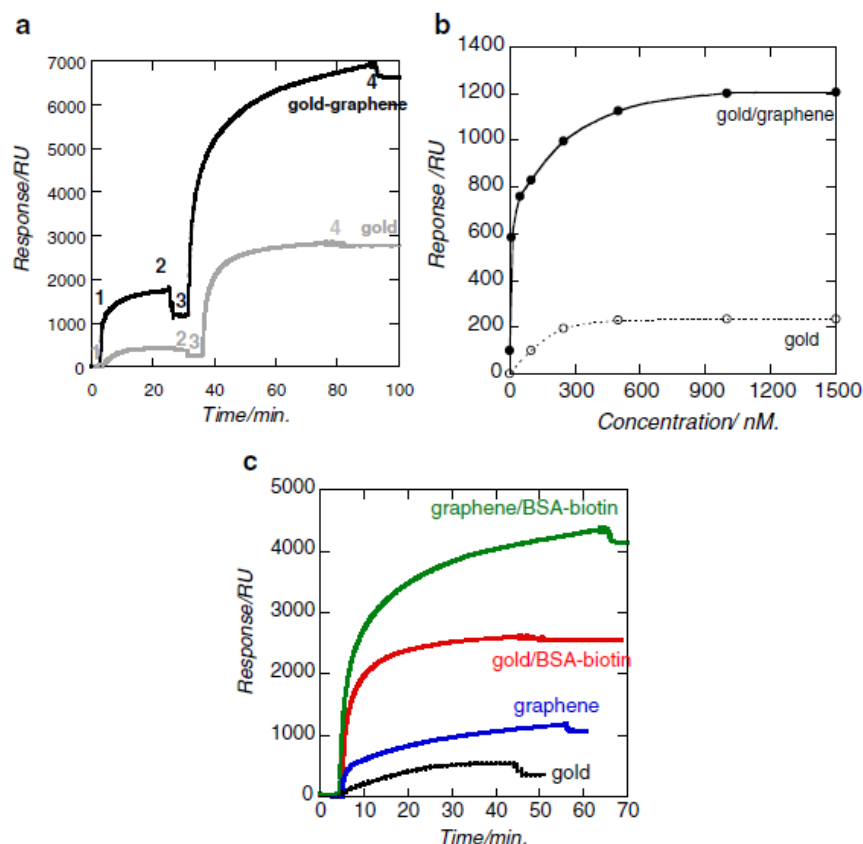


Fig. 5 (a) Binding curves for biotinylated-BSA ($1.5 \mu\text{molL}^{-1}$) on gold (*grey*) and gold-graphene (*black*) and further addition of streptavidin ($0.16 \mu\text{molL}^{-1}$); 1, injection of streptavidin; 2, washing with PBS; 3, injection of biotinylated-BSA; 4, washing with PBS. (b) Calibration curve for adsorption of different concentrations of biotinylated BSA on gold and gold-graphene. (c) Addition of $0.16 \mu\text{molL}^{-1}$ streptavidin to gold (*black*), graphene-on-gold (*blue*), gold-BSA-biotin (*red*), and graphene-on-gold/BSA-biotin (*green*)



accordance with the general belief that gold is a poor adsorbent for hydrophilic molecules. Similar experiments were reported by Kocabas, who used non-biotinylated BSA in the concentration range 40–500 nmolL⁻¹ [17]. From a biochemical perspective it can be argued whether this is indeed an advantage, because of the total lack of specificity of the interaction and the possibility that the native folding of adsorbed biomolecules will not be preserved by such non-specific physisorption. The BSA–biotin modified interface in a typical affinity biosensor experiment enabled measurement of the real-time binding kinetics of biotin–streptavidin (Fig. 5c). Addition of 0.16 μmolL^{-1} streptavidin (60 kDa) to gold and graphene-on-gold interfaces results in a change of 4104 RU for the graphene-based interface and 2516 RU for gold. This converts into streptavidin loadings of 4104 ngcm⁻² and 2516 ngcm⁻², respectively. The importance of using biotinylated BSA is also illustrated in Fig. 5c.—Addition of streptavidin to a BSA–biotin-modified SPR interface results in a much larger SPR change because of the strong biotin–streptavidin interaction. Although the BSA–biotin-modified interface, in a typical affinity biosensor experiment, enables real-time measurement of the biotin–streptavidin binding kinetics (Fig. 5c), such a system does not answer the question of eventual denaturation of the BSA protein, because it merely serves as a carrier of the chemical biotin moiety. This is thus one of several issues which must be addressed to show the bioanalytical relevance of the graphene-on-metal substrate.

Irrespective of the answer to this question, we investigated whether graphene-on-metal SPR enables direct detection of such small molecules as biotin ($MW=244.31\text{ g mol}^{-1}$) or dopamine ($MW=153.18\text{ g mol}^{-1}$), because such molecules

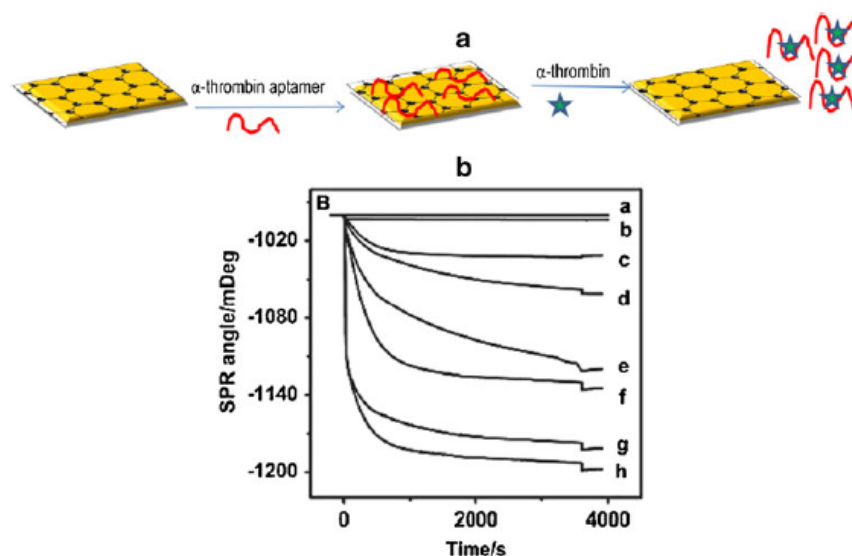
would interact strongly with graphene by π – π stacking interactions [26, 27]. However, the detection limit was 0.1 mmolL⁻¹ for biotin and 1 mmolL⁻¹ for dopamine on graphene, which is not competitive with any electrochemical detection scheme based on graphene [28, 29].

The only graphene-on-metal sensing application described in the literature relies on the capacity of α -thrombin to strip a specific aptamer from the surface. Dong et al. showed that the α -thrombin aptamer can be adsorbed on graphene-based SPR by strong non-covalent binding, reaching a coverage level of 100 ngcm⁻² [19]. The binding between the aptamer and the target molecule greatly disturbs the interaction of the aptamer with graphene (Fig. 6a). Upon interaction of α -thrombin with the α -thrombin-specific aptamer, the complex formed is desorbed from the graphene layer. Reduction in the molecular density of the aptamer on the SPR interface results in a significant decrease of the SPR angle with a limit of detection of 0.4 nmolL⁻¹ (Fig. 6b).

Future perspectives

Over the last two years, different approaches to the fabrication of graphene-on-metal SPR interfaces have finally been established and one might wonder about the future of graphene for plasmonic-based sensors. Use of mechanical approaches to transfer high-quality CVD-grown graphene onto metal enables the reproducible formation of high-quality SPR interfaces. This approach can be used for construction of graphene-on-silver SPR interfaces and might be used in the future for the development of highly performing SPR chips. More recently, the direct growth of graphene on

Fig. 6 (a) Fabrication of an α -thrombin-selective graphene-on-gold SPR interface by adsorbing α -thrombin aptamer on to graphene. Interaction with α -thrombin results in release of the aptamer– α -thrombin from the graphene sheets. (b) SPR curves for the detection process between α -thrombin aptamer with different concentrations of α -thrombin: 0 nmolL⁻¹ (a), 0.08 nmolL⁻¹ (b), 0.4 nmolL⁻¹ (c), 1 nmolL⁻¹ (d), 20 nmolL⁻¹ (e), 25 nmolL⁻¹ (f), 100 nmolL⁻¹ (g), 150 nmolL⁻¹ (h) (kindly provided by L. Wang and S. Dong) [19]



gold has been achieved [30]. A polycrystalline gold surface partially (111) orientated was in this case formed by annealing 25 μm thin gold foil in a hydrogen flame. Graphene was grown between 850 and 1050 $^{\circ}\text{C}$ on the gold foil, using methane gas as carbon source. This ability to grow graphene layers directly on gold surfaces should lead to new possibilities for plasmonics.

However, despite the progress made in the reproducible fabrication of graphene-based SPR interfaces, it might come as a surprise to learn that only a few advances in real-time sensing have been achieved. This contrasts with electrochemical-based analytical methods, in which graphene-modified electrodes have clearly emerged as innovative interfaces overcoming sensitivity and selectivity problems. Graphene-modified electrodes are, however, generally formed by simple drop-casting of graphene suspensions onto different electrode materials. There have been a few, if any, dedicated attempts to take advantage of the full possibility of careful and deliberate deposition of a single layer or a few layers of graphene nanosheets to maximize electrochemical sensitivity and selectivity of the final electrode. The advantages of SPR techniques are related to the sensitivity of surface plasmons to changes in the refractive index in close vicinity to the metal thin film, enabling direct indication of whether a single or a few graphene sheets have been deposited. This is a direct means of tuning and improving the sensing interface for developing present-day plasmonic devices. The possibility of coupling SPR with electrochemical deposition techniques is, in this respect, highly appealing, because it would enable the electrochemical deposition of graphene by reduction of graphene oxide solutions. Work on electrochemical reduction of GO on ITO and carbon electrodes indicates that the resulting reduced graphene oxide can contain a little as 3.5 % oxygen, which is ca two or three times less than typical values for reduced graphene oxide synthesized by chemical and thermal reduction [31].

The major limitation of graphene-on-metal SPR substrates for real-time sensing is, however, currently the lack of specificity of these interfaces. Indeed, most biomolecules adsorb on graphene, making selective sensing rather difficult. This is one of the principle reasons there is currently only one real sensing application using graphene-on-metal interfaces [19]. This sensing application relies on the capacity of α -thrombin to strip a specific aptamer way from the graphene-on-metal surface. This suggests that the strength of binding of biomolecules to graphene is affected, next to π -stacking interactions, by several other factors, for example pH and ionic strength. This issue has recently been highlighted by investigation of adsorption and desorption of DNA on graphene oxide [32]. Our group has shown that the organic molecule tetrathiafulvalene (TTF), integrated onto graphene by π - π -stacking interactions, can be released from the graphene matrix on changing its oxidation state

[33]. Although graphene-on-metal is only at the stage of proof of principle, demonstration of bio-analytical relevance might be possible in the near future. To make these interfaces of common interest, ways of introducing specificity must be sought after. Chemical modification of graphene's basal plane and edges substantially affects graphene-based devices. Functionalization is an obvious topic for continuing investigation, because the rich chemistry of graphene and its derivatives provides many opportunities for incorporating selectivity into graphene. Covalent attachment of sensing elements to graphene has the greatest potential for development of commercial sensors, owing to the stability of the resulting bond. Non-covalent approaches have the obvious advantage of being easy to perform, because they are simply based on exploiting π - π stacking and van der Waals interactions between graphene and aromatic molecules. In addition, this surface functionalization strategy will not disrupt the extended π -conjugation of graphene, unlike covalent functionalization, which creates defects on the graphene sheets.

In conclusion, graphene related research has grown at a spectacular speed since the first isolation of single-layer flakes in 2004. In only a decade this material has become the focus of efforts by scientists in different disciplines. To advance further in this exciting field of graphene, multidiscipline efforts by chemists, physicists, biologists, and researchers in materials science will be needed. Graphene-on-metal is only at the stage of proof of principle. Although the possibility of protecting silver-SPR interfaces by graphene has been demonstrated, future applications rely entirely on the possibility of functionalizing graphene for selective binding. The question of whether graphene-on-metal will retain superior binding capacity when functionalized is still not answered. Much remains to be done to show that graphene-on-metal is a promising alternative to other SPR interfaces. It is, however, certain that graphene still holds several surprises for the different communities and it is difficult to believe that the future of graphene-based SPR is nothing else than bright.

Acknowledgments The EU-ERDF via the Interreg IV programme (project "Plasmobio"), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Lille 1, and the Nord-Pas-de Calais region are gratefully acknowledged for financial support.

References

1. Wijaya E, Lenaerts C, Maricot S, Hastanin J, Habraken S, Vilcot JP, Boukherroub R, Szunerits S (2012) *Curr Opin Solid State Mater Sci* 15:208–222
2. Szunerits S, Castel X, Boukherroub R (2008) *J Phys Chem C* 112:15813–15817
3. Yuan X-C, Ong BH, Tan YG, Zhang DW, Irawan R, Tjin SC (2006) *J Opt A: Pure Appl Opt* 8:959

4. Wang L, Sun Y, Wang J, Zhu X, Jia F, Cao Y, Wang X, Zhang H, Song D (2009) *Talanta* 78:265
5. Zynio SA, Samoylov AV, Surovtseva ER, Mirsky VM, Shirshov YM (2002) *Sensors* 2:62
6. Touahir L, Jenkins ATA, Boukherroub R, Gouget-Laemmel AC, Chazalviel J-N, Peretti J, Ozanam F, Szunerits S (2010) *J Phys Chem C* 114:22582
7. Touahir L, Niedziółka-Jönsson J, Galopin E, Boukherroub R, Gouget-Laemmel AC, Solomon I, Petukhov M, Chazalviel J-N, Ozanam F, Szunerits S (2010) *Langmuir* 26:6058
8. Manesse M, Sanjines R, Stambouli V, Boukherroub R, Szunerits S (2008) *Electrochem Commun* 10:1041
9. Manesse M, Sanjines R, Stambouli V, Boukherroub R, Szunerits S (2009) *Langmuir* 25:8036
10. Maalouli N, Gouget-Laemmel AC, Pinchemel B, Bouazaoui M, Chazalviel JN, Ozanam F, Yang Y, Burkhard P, Boukherroub R, Szunerits S (2011) *Langmuir* 27:5498
11. Lockett MR, Smith EA (2009) *Anal Chem* 81:6429
12. Lockett MR, Weibel SC, Philips MF, Shortreed MR, Sun B, Com RM, Hamers RJ, Cerrina F, Smith LM (2008) *J Am Chem Soc* 130:8611
13. Choi SH, Kim YL, Byun KM (2010) *Opt Expr* 19:458
14. Wu L, Chu H-S, Koh WS, Li EP (2010) *Opt Expr* 18:14395
15. Nair RN, Blake P, Grigorenko AN, Novoselov KS, Booth TJ, Stauber T, Peres NMR, Geim AK (2008) *Science* 320:5881
16. Verma R, Gupta BD, Jha R (2011) *Sens Actuators B* 160:623
17. Salihoglu O, Balci O, Kocabas C (2011) *Appl Phys Lett* 100:213110
18. Mao Y, Bao Y, Wang W, Li Z, Li F, Niu L (2011) *Talanta* 85:2106
19. Wang L, Zhu C, Han L, Jin L, Zhou M, Dong S (2011) *Chem Commun* 47:7794
20. Sing VV, Gupta G, Batra A, Nigam AK, Boopathi M, Gutch PK, Tripathi BK, Srivastava A, Samuel M, Agarwal GS, Sing B, Vijayaraghavan R (2012) *Adv Funct Mater* 22:2352
21. Wijaya E, Maalouli N, Boukherroub R, Szunerits S, Vilcot J-P (2012) *Proceedings of the SPIE*:84240R-40R-7
22. Maharana PK, Jha R (2011) *Sensors Actuator B* 169:161
23. Song B, Li D, Qi W, Elstner M, Fan C, Fang H (2010) *Chem Phys Chem* 11:585
24. Guo SJ, Dong S (2011) *J Mater Chem* 21:18503
25. Wang JL, Zhou HS (2008) *Anal Chem* 80:7174
26. Kaminska I, Das MR, Coffinier Y, Niedziolka-Jonsson J, Sobczak J, Woisel P, Lyskawa J, Opallo M, Boukherroub R, Szunerits S (2012) *ACS Appl. Mater Interfaces* 4:1016
27. Xu LQ, Yang WJ, Neoh K-G, Kang E-T, Fu GD (2010) *Macromolecules* 43:8336
28. Hou C-Y, Kasner ML, Su SJ, Patel K, Cuellari R (2010) *J Phys Chem C* 114:14915
29. Wang Y, Li YM, Tang LH, Lu J, Li JH (2009) *Electrochem Commun* 11:889
30. Oznuluer T, Pince E, Polat EO, Balci O, Salihoglu O, Kocabas C (2011) *Appl Phys Lett* 98:183101
31. Zhou M, Wang Y, Zhai Y, Zhai J, Ren W, Wang F, Dong S (2009) *Chem Eur J* 15:6116
32. Wu M, Kempaiah R, Jimmy Huang P-J, Maheshwari V, Liu J (2011) *Langmuir* 27:2731
33. Kaminska I, Das MR, Coffinier Y, Niedziolka-Jonsson J, Woisel P, Opallo M, Szunerits S, Boukherroub R (2012) *Chem Commun* 48:1221

Development of a Metal-Chelated Plasmonic Interface for the Linking of His-Peptides with a Droplet-Based Surface Plasmon Resonance Read-Off Scheme

Nazek Maalouli,^{†,‡} Anne Chantal Gouget-Laemmel,[§] Bernard Pinchemel,[‡] Mohamed Bouazaoui,[‡] Jean-Noël Chazalviel,[§] François Ozanam,[§] Yongkun Yang,^{||} Peter Burkhard,^{||} Rabah Boukherroub,[‡] and Sabine Szunerits^{*,†}

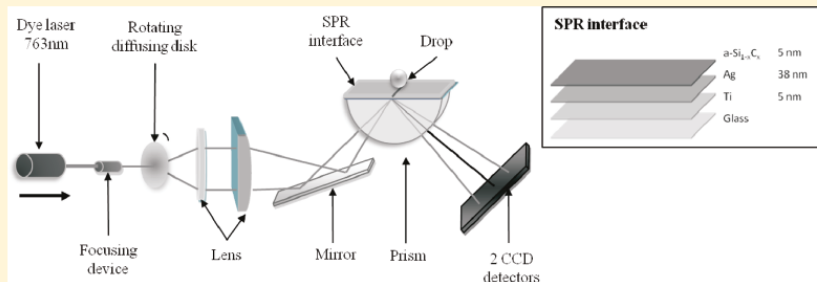
[†]Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI, USR 3078), Université Lille Nord de France, Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

[‡]Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (UMR CNRS 8523), Université de Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

[§]Physique de la Matière Condensée, Ecole Polytechnique, CNRS, 91128 Palaiseau, France

^{||}The Institute of Materials Science and Department of Molecular and Cell Biology, 97 North Eagleville Road, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, United States

ABSTRACT:



Monolayers of metal complexes were covalently attached to the surface of lamellar SPR interfaces ($\text{Ti}/\text{Ag}/a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$) for binding histidine-tagged peptides with a controlled molecular orientation. The method is based on the activation of surface acid groups with *N*-hydroxysuccinimide (NHS), followed by an amidation reaction with (*S*)-*N*-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (NTA). FTIR and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to characterize each surface modification step. The NTA modified SPR interface effectively chelated Cu^{2+} ions. Once loaded with metal ions, the modified SPR interface was able to bind specifically to histidine-tagged peptides. The binding process was followed by surface plasmon resonance (SPR) in a droplet based configuration. The Cu^{2+} -NTA modified interface showed protein loading comparable to commercially available NTA chips based on dextran chemistry and can thus be regarded as an interesting alternative. The sensor interface can be reused several times due to the easy regeneration step using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) treatment.

1. INTRODUCTION

Biosensors based on the principle of surface plasmon resonance (SPR) have emerged among the most widely used label-free detection tools for the study of biomolecular interactions and are still in the forefront of evolving sensing technologies.¹ One current research focus concerns the development of new SPR active interfaces, which show higher electric field enhancement while additionally presenting unique advantages with regard to surface chemistry aspects. The development and use of lamellar SPR interfaces, where the SPR active metal film is postcoated with dielectric overlayers such as silicon dioxide,^{2–4} indium tin oxide,^{5,6} tin oxide,^{7,8} carbon,⁹ or amorphous silicon–carbon alloy ($a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$)^{10,11} are in this respect of high

interest. Silver coated with $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$ thin layers has been found to be of particular interest for sensitive SPR sensing. A 5 nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$ overcoating efficiently protects the underlying silver thin film, while it increases at the same time the overall sensitivity of the interface significantly.¹⁰ Such an interface is thus an ideal candidate for sensitive SPR sensing. Additionally, surface hydrogenated $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ films can be conveniently functionalized by stable organic layers through robust Si–C covalent bonds in a similar way to crystalline silicon.^{10,11}

Received: February 10, 2011

Revised: March 9, 2011

Published: April 11, 2011

In this work, we describe a strategy to covalently attach nitrilotriacetic acid (NTA) onto silver/*a*-Si_{0.63}C_{0.37}:H interfaces for SPR sensing. One of the most versatile methods used to control and assess the molecular orientation of immobilized proteins onto surfaces is based on metal-ion chelating agents such as NTA.^{12–14} Random attachment of proteins and peptides using direct covalent linking has been shown to alter the binding capacity significantly.^{15,16} Nitrilotriacetic acid forms a tetradentate chelate with Ni²⁺ or Cu²⁺, which is capable of binding histidine-tagged biomolecules *via* metal coordinated bonds for pH > 6.¹⁷ A coordinative complex with a binding affinity of $K = 1 \mu\text{M}$ ¹⁸ is readily formed between one molecule of NTA and two imidazole rings on adjacent histidine residues of the biomolecule.¹⁹ The M²⁺-NTA/histidine system is particularly attractive because competitive chelators such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) can be used to disrupt the M²⁺-NTA/histidine binding, resulting in a reusable sensor interface. Furthermore, the popularity of the His sequence lies in the rapid one-step purification of native and denatured proteins. It requires minimal addition of extra amino acids, can be fused at either the N- or C-termini or even within internal sites, and rarely alters protein folding and functions.²⁰ Classical gold-based SPR interfaces have been decorated with thiol-functionalized NTA to study the specific binding between the immobilized histidine-tagged protein and a partner in solution.^{13,14,21} One drawback in the use of such functional chips is the degradation of the chemisorbed monolayer during storage, owing to the oxygen sensitivity of thiol compounds.²² Covalent linking of metal-chelating species would thus be of great advantage.^{12,23} Dextran-based SPR chips modified with covalently linked NTA units are commercially available and have been used for the detection of M²⁺-NTA/histidine interactions.²⁴ The use of polymers is indeed an alternative to thiol/gold based assemblies. Recently, the functionalization of protein-resistant polymer brushes with NTA groups together with SPR characterization has been reported.²⁵

We show in this article that a simple alternative to such complex systems is the covalent linking of amine-terminated NTA to acid-terminated silver/*a*-Si_{0.63}C_{0.37}:H SPR architectures. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used next to FTIR spectroscopy to characterize the modified SPR interfaces. A droplet-based SPR setup was used to study the formation of the coordinative bond between surface linked NTA/Cu²⁺ and His-tagged proteins of different concentrations. Two different peptides were investigated: Bradykinine peptide with a molecular weight (MW) of 1.768 kD and P6c peptides (MW = 12.6 kD) which can form peptide nanoparticles.²⁶

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials. Hydrofluoric acid (HF) and acetic acid were purchased from Carlo Erba and were of VLSI grade. Undecylenic acid (99%) was supplied by Acros organics. (S)-N-(S-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (NTA), potassium ferrocyanide (K₄Fe(CN)₆), N-hydroxysuccinimide (NHS), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium chloride (NaCl), glycerol, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), phosphate buffer saline (PBS) 10×, potassium chloride, copper sulfate (CuSO₄), lithium perchlorate (LiClO₄), ethanol, hexane, 1-butanol, 2-propanol, 1-hexanol, 1,3-propanediol, and 1-pentanol were obtained from Aldrich and were used without further purification. Ultrapure water (Milli-Q, 18 MΩ cm) was used for the preparation of the solutions and for all rinses.

The His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine peptide (sequence: (Ac)-HHHHHHHRPPGFSPF-(OH), MW = 1.768 kD) was synthesized on solid phase by Innobiochips (IBL, Lille, France).

The modified pPEP-T vector containing the code for the P6c peptide (sequence: MGHHHHHHGDWKGGLVPRGSDLEMLRELQET-NAALQDVRELLRQQYRQITFLRALLMGGRLLARLEELERRLEELERRLEELERAINTVDELAALRRRLEELAR; MW = 12.6 kD) was transformed into the *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS expression cells (Novagen, Madison, WI, USA).²⁶ The bacteria were incubated at 37 °C in Luria Broth (LB) medium in the presence of 200 mg/mL ampicillin and 30 mg/mL chloramphenicol. Expression was induced by adding 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside. After 3 h of expression, the bacteria were collected by centrifugation at 4000 × *g* for 15 min. The bacterial pellet was resuspended and lysed in a lysis buffer (9 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 8.0) by sonication. The cell debris were removed by centrifugation at 6000 × *g* for 45 min. The supernatant was incubated with Ni-NTA Agarose beads (Qiagen, Valencia, CA, USA) overnight and then loaded into a column. The protein contaminants were removed by washing the column sequentially with pH buffers 6.3, 5.9, and 5.0, which contain 9 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 20 mM sodium citrate, 10 mM imidazole, and 10 mM β-mercaptoethanol. The P6c peptides were then eluted by the elution buffer containing 9 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 500 mM imidazole, and 10 mM β-mercaptoethanol, at pH 8.0. The purity of the P6c peptides was verified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. In a final step, the P6c peptide (0.05 mg/mL) was stepwise refolded by dialysis in a buffer containing HEPES (20 mM, pH 7.5), 150 mM NaCl, and 5% glycerol.

2.2. Preparation of the SPR Sensors. Ti/Ag films were prepared by thermal evaporation of 5 nm of titanium and 38 nm of silver onto cleaned glass slides. Titanium is used as an adhesion layer between the glass surface and the metal layer. Amorphous silicon–carbon alloy layers were deposited onto Ti/Ag films using plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) in a “low-power” regime.^{27,28} The following parameters were used: pressure = 40 mTorr, temperature = 250 °C, power density = 0.06 W cm^{−2}, gas flow rate = 20 standard cm³ min^{−1}. By varying the methane ratio in the gas mixture [CH₄]/([SiH₄] + [CH₄]), the final carbon (C) content in the material and thus the optical properties can be adjusted. For the deposition of a thin film with the stoichiometry *a*-Si_{0.63}C_{0.37}:H, 97 at % of [CH₄] was used. The carbon content in the film has been found to be governed by the methane ratio in the gas mixture only, as long as deposition continues to be performed in the low-power regime. The relationship between the carbon content *x* in the *a*-Si_{1-x}C_x:H film and the methane ratio has been determined by using a combination of various techniques including electron spectroscopy and elemental analysis.^{27,28}

In order to remove partial oxidation of the silver surface, which may take place during its heating at 250 °C prior to *a*-Si_{0.63}C_{0.37}:H deposition, a hydrogen plasma treatment (150 mT, 0.1 W/cm² for 5 min) was applied just before turning on the silane/methane plasma for the deposition of the amorphous silicon–carbon films.

The thicknesses of the different layers were adjusted by controlling the deposition time and afterward determined using ellipsometry on five different areas of the sample. The thicknesses varied by ±0.5 nm from the targeted one.

WinSpall 2.0 software (Max-Planck-Institute for Polymer Research, Mainz) was used to calculate the SPR curves and approximate the experimental dependences with an optical model within the framework of Maxwell macroscopic approach.

2.3. Monolayer Formation on Amorphous Silicon–Carbon Alloys. *Acid-Terminated Surface.* The surface of the Ti/Ag/*a*-Si_{0.63}C_{0.37}:H structure was first etched with HF vapor for 15 s to generate Si–H termination. The hydrogen-terminated surface was placed at room temperature in a Schlenk tube containing previously

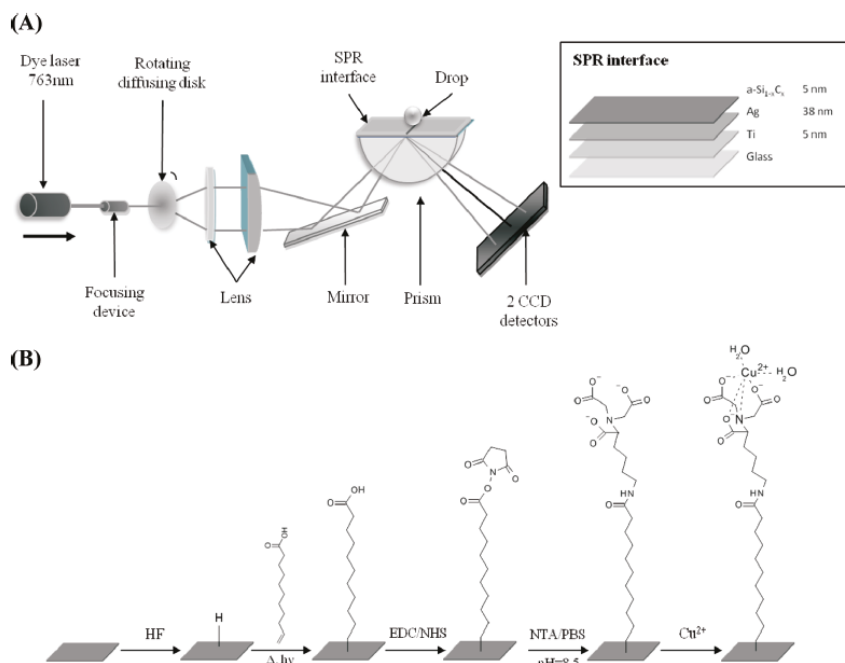


Figure 1. (A) Experimental setup of the droplet-based SPR. In the upper right-hand corner of the figure is a schematic representation of the metallic interface: Glass/Ti (5 nm)/Ag (38 nm)/a-Si_{0.63}C_{0.37} (5 nm). (B) Schematic illustration of the chemical functionalization of an amorphous silicon-carbon alloy surface with NTA followed by metal ion loading.

deoxygenated neat undecylenic acid solution at 100 °C and irradiated at 312 nm for 3 h. The excess of unreacted and physisorbed reagent was removed by a final rinse in hot acetic acid for 30 min. Then, the sample was dried under nitrogen flow.

NHS-Functionalized Surface. The conversion of the acid function to succinimidyl ester was accomplished as follows: the acid-terminated surface was covered with 10 mL of an aqueous solution of NHS (5 mM) and EDC (5 mM) and allowed to react for 90 min at 15 °C. The resulting surface was copiously rinsed with deionized water and dried under a stream of argon.²⁹

NTA-Terminated Surface. The NHS-functionalized surface was immersed in a Schlenk tube containing 10 mL NTA/PBS 1× solution (10^{−2} M) at room temperature, and was left under nitrogen flow overnight. To ensure the deprotonation of the carboxylic acid groups of the NTA molecule, the surface was washed with PBS at pH = 8–9 and was dried under nitrogen flow.

Safety Considerations. HF is a hazardous acid which can result in serious tissue damage if burns are not appropriately treated. Etching of silicon should be performed in a well-ventilated fume hood with appropriate safety considerations: face shield and double layered nitrile gloves.

2.4. Cu²⁺ and Protein Immobilization, Washing. The complexation of Cu²⁺ ions to the NTA was achieved by immersion of the deprotonated NTA surface in 10 mL of an aqueous solution of CuSO₄ (5 mM) for 2 h at room temperature under a stream of argon. Then, the sample was rinsed with deionized water and dried under nitrogen flow.

2.4. Surface Characterization. *X-ray Photoelectron Spectroscopy.* X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were performed with an ESCALAB 220 XL spectrometer from Vacuum Generators featuring a monochromatic Al Kα X-ray source (1486.6 eV) and a spherical energy analyzer operated in the CAE (constant analyzer energy) mode (CAE = 100 eV for survey spectra and CAE =

40 eV for high-resolution spectra), using the electromagnetic lens mode. No flood gun source was needed due to the conducting character of the substrates. The angle between the incident X-rays and the analyzer is 58°. The detection angle of the photoelectrons is 30°, as referenced to the sample surface. The XPS spectra were corrected according to the binding energies of Au 4f_{7/2}, equal to 80.0 eV, and Ag 3d_{5/2}, equal to 368.3 eV.

Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR). For infrared characterization of the functionalized layer, Fourier-transform infrared spectroscopy in the attenuated total reflection geometry (ATR-FTIR) was chosen owing to its high sensitivity. For that purpose, 20 nm a-Si_{0.63}C_{0.37}:H thin films were deposited onto a ~45° crystalline silicon prism used as the ATR element. The dimensions of the prism (typically 15 × 15 × 0.5 mm³) were limiting the infrared path length in silicon, providing access to the vibrations down to 1000 cm^{−1}. The spectra were recorded on a Bruker Equinox 55 FTIR spectrometer coupled to a homemade, nitrogen-gas purged external ATR compartment. The spectra, taken with a 4 cm^{−1} resolution, result from the averaging of 100 scans. They are displayed as absorbance per reflection (computed using natural logarithm) by using the spectrum recorded prior to surface modification as the reference, and by normalizing the spectrum with the actual number of reflections determined by measuring the exact prism dimensions and angle.

Contact Angle Measurements. Water contact angles were measured using deionized water. We used a remote computer-controlled goniometer system (DIGIDROP by GBX, France) for measuring the contact angles. The accuracy is ±1°. All measurements were made in ambient atmosphere at room temperature.

Droplet-Based Surface Plasmon Resonance Measurements. SPR measurements were performed on a homemade instrument as described elsewhere.³⁰ A TM-polarized incident beam at 763 nm excited resonantly the plasmon of the Ag/a-Si_{1-x}C_x:H interface under total

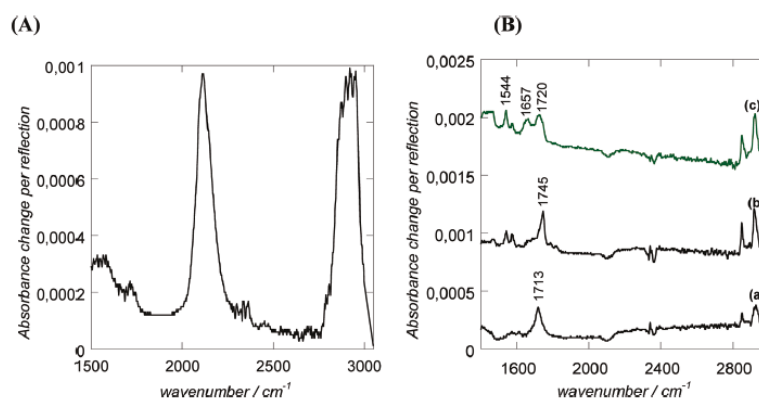


Figure 2. ATR-FTIR spectra of (A) a 5 nm $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ film deposited on a silicon ATR prism, (B) after photochemical modification with undecylenic acid (a), activation with NHS/EDC (b), and reaction with NTA (c). The reference spectrum is the hydrogenated $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ layer.

reflection, through a half-cylinder prism with a refractive index $n = 1.63$. The SPR substrate adhered to the prism using index matching oil. The change of the SPR minimum in the droplet was measured as a function of incidence angle using a ILX554B Sony CCD device (2048 pixels $56\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$). The recorded signal is then monitored through LabView software (Figure 1A). The value of the equilibrium dissociation constant K_D of the His-tagged sample to the Cu^{2+} -NTA-modified SPR interface was evaluated with the BIAevaluation 3.2 RC1 program using the Langmuir binding model.

3. RESULTS AND DISCUSSION

As shown recently by us, stable $a\text{-Si}_{1-x}\text{C}_x\text{:H}$ thin films with a carbon content between 20% and 37% can be deposited on SPR-active silver substrates. The best SPR signal in terms of resonance width and refractive index sensitivity was obtained on a 5-nm-thick film with a carbon content of 37%. A sensitivity as high as $101\ \text{RIU}^{-1}$ could be experimentally determined, twice as high as that measured on simple silver-based SPR structures.³¹ One important step in any SPR-based protocol concerns the way the receptor molecule is anchored onto the SPR interface. Here, we describe a novel approach showing how a dense monolayer of a metal chelating compound such as nitrilotriacetic acid (NTA) can be formed on a $\text{Ag}/a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ SPR interface for the subsequent binding of histidine-tagged peptides. Figure 1B depicts the reaction scheme used to covalently attach NTA to the $\text{Ag}/a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ SPR interface and subsequently attach histidine-tagged peptides via Cu^{2+} ions. Hydrogen-terminated $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$, formed by exposing the surface to HF vapor,³² was modified with undecylenic acid by photochemical irradiation at 312 nm for 3 h. The covalently grafted carboxydecyl groups were converted into activated ester groups using EDC/NHS chemistry and further reacted with aminated-NTA through amide bond formation.

3.1. Characterization of the Functionalized SPR Interface. The different surface modification steps were followed using ATR-FTIR spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Figure 2A shows the ATR-FTIR spectra of a hydrogenated $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ surface deposited on a silicon ATR prism. The presence of an intense peak at $2115\ \text{cm}^{-1}$ confirms the presence of a large amount of silicon–hydrogen bonds in the bulk of the material. The bands detected at 2899 and $2953\ \text{cm}^{-1}$ reveal the presence of carbon in the film in the form of CH_3 , with

a minor but sizable presence of CH_2 groups.^{27,28} After photochemical reaction with undecylenic acid, the presence of vibrational bands of $\text{C}=\text{O}$ at $1713\ \text{cm}^{-1}$ and CH_2 at 2855 and $2925\ \text{cm}^{-1}$ indicates the successful transfer of the carboxydecyl groups onto the $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ film (Figure 2Ba). Integration of the peak area of the $\text{C}=\text{O}$ band enables one to determine the molecular density of linked carboxydecyl groups, which is found to be $N = 1.5 \times 10^{14}\ \text{cm}^{-2}$. This value, lower than on crystalline silicon ($N = (2.5 \pm 0.2) \times 10^{14}\ \text{cm}^{-2}$),^{32,33} is plausibly due to the presence of surface methyl groups. However, the density of the carboxydecyl groups is rather high, allowing for additional linking of amine-terminated NTA. For this purpose, the acid function was first activated through chemical reaction with an aqueous NHS/EDC (5 mM/5 mM) solution (Figure 2Bb). The appearance of new peaks at 1745 , 1789 , and $1820\ \text{cm}^{-1}$, due to the stretching modes of the carbonyl functions of the succinimide ester, is consistent with the formation of the activated ester. The amount of formed ester groups was estimated as $N = 5 \times 10^{13}\ \text{cm}^{-2}$. This corresponds to an activation efficiency of 33% only. Amine-terminated NTA was finally linked to the ester-activated surface. ATR-FTIR spectrum of the resulting surface shows the appearance of peaks at 1544 and $1657\ \text{cm}^{-1}$ assigned to the vibration of carboxylate anions (COO^-) and to the $\text{C}-\text{NH}$ vibration of the amide, respectively (Figure 2Bc). The band at $1720\ \text{cm}^{-1}$ results most likely from protonated carboxylic acid groups of the NTA.³⁴ The amidation reaction is found to be total, corresponding to an amide group surface concentration of $5 \times 10^{13}\ \text{cm}^{-2}$.

In addition to ATR-FTIR, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and contact angle measurements were used to analyze the chemical composition and the nature of the chemical bonding on the $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ surface before and after modification with NTA molecules. The change in the contact angle from $95 \pm 1^\circ$ for as-deposited $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ to $75 \pm 1^\circ$ for the carboxydecyl-modified $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ indicates that a reaction took place. These values are somewhat larger than those found on crystalline silicon (80° for the hydrogenated surface and 60° for the carboxydecyl-modified one), an expected feature indeed in view of the presence of methyl groups in the amorphous material. The high resolution XPS spectrum of the C 1s core level after chemical functionalization of the $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ overlayer with undecylenic acid is displayed in Figure 3A. It can be deconvoluted into four different components. The main peak centered at

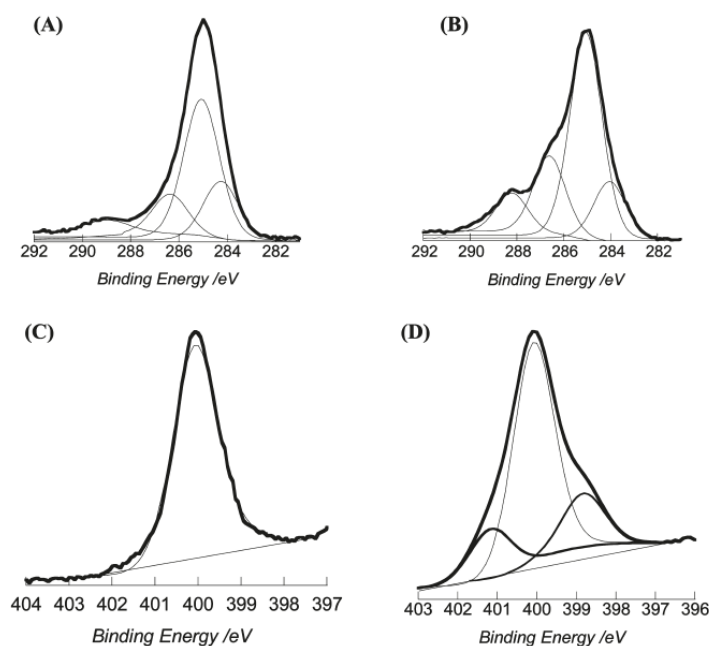


Figure 3. High-resolution XPS spectra of (A) C 1s of acid-terminated and (B) C 1s of NTA-modified α -Si_{0.63}C_{0.37}, (C) N 1s band of NTA-modified α -Si_{0.63}C_{0.37} and (D) N 1s band of NTA-modified α -Si_{0.63}C_{0.37} after interaction with Bradykinine peptide (50 μ M) for 1 h.

285 eV is characteristic of C–C(H) structures, while the band at 283.9 corresponds to C–Si of the initial surface. The band at 288.9 eV is characteristic of surface-linked O–C=O groups, while the band at 286.5 corresponds to the carbon close to the acid function (–CH₂–COOH).³⁵ Linking of amine-terminated NTA to ester activated acid groups on α -Si_{0.63}C_{0.37}:H results in the XPS C 1s spectrum as seen in Figure 3B. The spectrum can be deconvoluted into bands located at 283.9 (C–Si), 285 (C–C(H)), 286.7 (C–O/C–N), and 288.4 (O–C=O). A significant increase of the band at 288.4 eV, characteristic of O–C=O linkage of the COOH groups of NTA, is in accordance with the chemical composition of the organic layer. In addition, the presence of N 1s due to the amine group in the NTA-modified interface is expected (Figure 3C). It appears as a broad band centered at 400 eV. The atomic ratio of N/C is 0.090 which is close to the theoretical expected ratio of 0.095 and corresponds to an almost quantitative reaction. This result is in accordance with the FTIR data presented above.

The NTA-modified SPR interface was then coordinated with Cu²⁺. The absence of a cyclic voltammetric oxidation or reduction wave from the NTA-modified SPR interface immersed in aqueous solution of LiClO₄ (0.1 M) indicates that the surface-attached NTA groups are not electroactive in the potential window of the solution (Figure 4). However, after incubation of the NTA-modified SPR interface in a solution of Cu²⁺ and reimmersion into the electrolyte solution, the cyclic voltammogram shows a broad reduction wave and a relatively well-defined oxidation wave in the reverse scan (Figure 4). The reduction wave is attributed to the irreversible reduction of chelated Cu²⁺ to Cu⁰ and the oxidation wave to the redissolution of the electrodeposited metallic copper to free Cu²⁺. The electroactivity of the copper complex gives the opportunity to indirectly

determine the surface coverage of the grafted ligand. The surface coverage ($\Gamma_{\text{Cu}^{2+}}$) was estimated from charge integration of the reoxidation wave according to $\Gamma_{\text{Cu}^{2+}} = Q/nFS$ where Q is the integrated charge, F the Faraday constant, S the geometric area of the SPR interface, and $n = 2$ for the two-electron oxidation at a low scan rate in such a way that all the electrodeposited Cu atoms were oxidized.¹² A surface coverage of $\Gamma_{\text{Cu}^{2+}} = 1.0 \times 10^{13}$ mol cm^{−2} was obtained. This indicates that only a fraction of the NTA molecules were complexed with Cu²⁺. In addition, the presence of the NTA–Cu²⁺ ligand on the SPR interface was confirmed by the presence of Cu in the XPS spectrum. Figure 4B shows the high resolution Cu 2p XPS spectrum contributions at 950.3 eV (Cu 2p_{1/2}) and 930.6 (Cu 2p_{3/2}). The atomic ratio of Cu/N is 0.1, lower than the theoretical value of 0.5 indicating that not all groups have been complexed with Cu²⁺. This is in quantitative agreement with the comparison between electrochemical and infrared results. This rather low Cu²⁺ binding efficiency can tentatively be ascribed to partial protonation of the tertiary amino group and incomplete deprotonation of the carboxyl groups of the NTA moieties, an effect which can be enhanced by electrostatic interactions at a surface.³⁶

3.2. Hexahistidine Tagged Protein Immobilization. **3.2.1. Characterization of the Captured His-Tagged Proteins.** On the Cu²⁺–NTA modified SPR chips, His-tagged peptides were finally captured through affinity between the imidazole groups of histidine-tagged peptides and complexed Cu²⁺–NTA SPR interfaces (Figure 5A). The ATR-FTIR spectrum of the Bradykinine peptide deposited on an ATR prism is shown in Figure 5B (lower trace). It shows three main absorbance bands at 1450, 1538, and 1663 cm^{−1} attributed to the bending vibrations of the N–H bond (amide II band), and the stretching vibrations of the C=O bond (amide I band).^{34,37,38} The binding of the Bradykinine

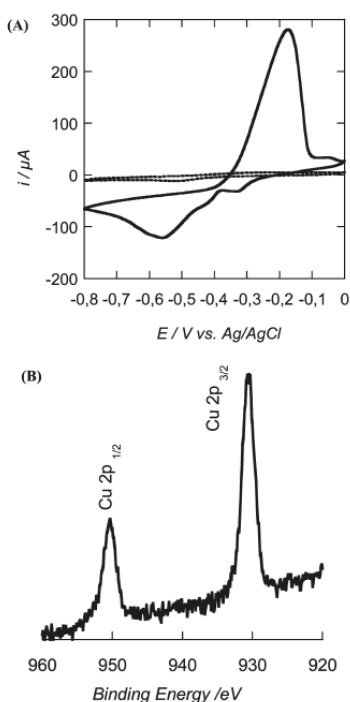


Figure 4. (A) Cyclic voltammograms recorded in LiClO_4 (0.1 M)/water at a NTA-modified SPR interface (----) and after preconditioning in a 1 mM CuSO_4 solution for 30 min (—); scan rate: 50 mV/s. (B) High resolution Cu 2p core level spectrum of NTA- Cu^{2+} modified SPR interface.

peptide to the Cu^{2+} -NTA modified SPR interface can thus be monitored using FTIR. Indeed, after immersion of the Cu^{2+} -NTA modified $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}$ prism into a 50 μM solution of Bradykinine peptide for 1 h, the vibration bands of the His-Bradykinine peptide became visible (Figure 5B, upper trace).

The coordination of the His-tagged peptide to NTA- Cu^{2+} terminated chip results in a strong XPS signal of the N 1s core level (Figure 3D). It shows a main contribution at 400 eV due to NTA and $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ bonds of the peptide, as well as contributions from imidazole at 398.8 eV due to $\text{C}=\text{N}-\text{C}$ and at 401.2 eV due to $\text{C}-\text{N}-\text{C}$ bonds.

3.2.2. Droplet-Based SPR Measurements. To show the interest of these interfaces for SPR measurements, the coordination of the His-tagged peptides was followed with a droplet-based SPR setup. The SPR signal of the acid-terminated surface and of that after NTA modification is seen in Figure 6. The surface modification steps do not result in a deterioration of the SPR characteristics. A shift of about 0.3° is detected on the NTA-modified silver-based SPR surface, which correlates with a thickness of the organic layer of about 3.4 nm. This is in the order of the theoretical length of the amine-terminated NTA molecule, indicating that a NTA monolayer is formed.

The interface was finally used to measure the binding capacity of two different hexahistidine peptides to the Cu^{2+} -NTA modified SPR chips in a droplet-based configuration as schematically shown in Figure 1A. The interest of this SPR configuration is that it allows the use of very small sample volumes together with increased diffusion kinetics in an extremely simple setup.³⁰ The

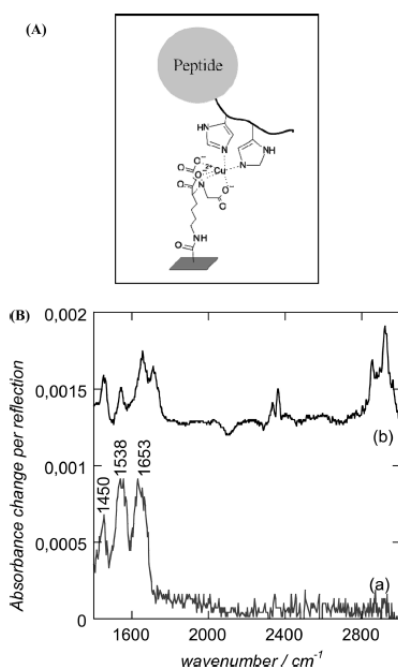


Figure 5. (A) Schematic illustration of the His-tagged peptide interaction with the Cu^{2+} -NTA surface. (B) ATR-FTIR spectra of (a) Bradykinine peptide solution (50 μM) measured in an ATR cell and (b) the Cu^{2+} -NTA-modified $a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{:H}$ -coated ATR prism after interaction with Bradykinine peptide for 1 h.

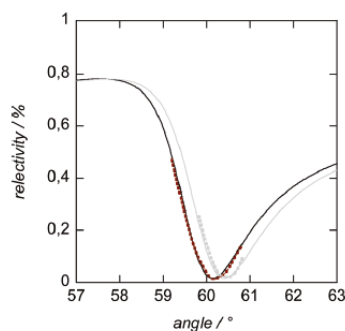


Figure 6. Angular scan of the reflected light intensity of the different SPR interfaces: $\text{Ag}/a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{-COOH}$ (black), $\text{Ag}/a\text{-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{-NTA}$ (gray), dotted lines are experimental values; full lines correspond to fitted curves using Winspall 3.02 and the following parameters: $n_{\text{prism}} = 1.63$, $n_{\text{T1}} = 2.4 + i3.313$ (5 nm), $n_{\text{Ag}} = 0.14 + i4.581$ (41 nm), $n_{\text{Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}} = 1.81 + i0.04$ (5 nm), $n_{\text{organic}} = 1.5$.

different peptides investigated are His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine peptide with a molecular mass of 1.768 kD and P6c peptide with a mass of 12.6 kD. Figure 7 shows the SPR sensograms for both His₆-tagged peptides demonstrating the specific and reversible coordination of His-tagged peptides to the Cu^{2+} -NTA modified surface. The high level of Cu^{2+} -NTA derivatization is apparent from the much higher on-rate compared to only

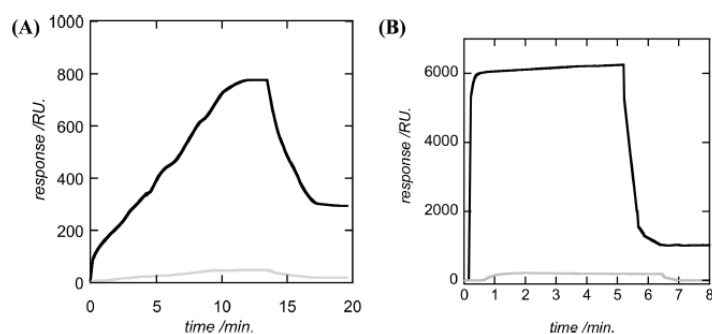


Figure 7. Binding of (A) Bradykinine peptide ($c = 50 \times 10^{-6}$ M) and (B) P6c ($c = 5 \times 10^{-6}$ M) to NTA-modified SPR interface in the presence (black line) and absence (gray line) of Cu^{2+} .

NTA-derivatized interfaces. Indeed, the nonspecific adsorption of His-tagged peptides was evaluated on an NTA-SPR interface without Cu^{2+} activation. The sensograms in Figure 7 show that the absence of the metal chelating intermediate results in almost no detectable peptide binding. The Cu^{2+} -NTA sensor chip showed a binding capacity in the range of 300 response units (RU) for His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine peptide and of 1020 RU for P6c. The higher binding capacity in the case of P6c is related to the almost ten times higher molecular mass. These results compare very well with a Biacore NTA-chip used on the same SPR device with the same His-tagged protein concentration range. The adsorbed protein concentration corresponds on average to $30 \pm 5 \text{ ng cm}^{-2}$ for the His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine peptide and to $102 \pm 10 \text{ ng cm}^{-2}$ for the P6c peptide assuming that 1 RU corresponds to 1 pg mm^{-2} . At a concentration of $50 \mu\text{M}$ of His-Tag-des-Arg⁹-Bradykinine peptide, the observed dissociation rate constants were $k_{\text{diss}} = 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ with a final binding affinity $K_D = 7 \times 10^{-6} \text{ M}$ using the *BLIAevaluation 3.2 RC1* program. For P6c ($c = 5 \mu\text{M}$), a $k_{\text{diss}} = 106 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ with a final binding affinity $K_D = 2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ was observed. These values are comparable with those reported in the literature using classical SPR.^{18,24,39} This indicates that the droplet-based SPR device allows for a viable determination of binding constants and that the developed Cu^{2+} -NTA interface is comparable to those reported in the literature.

4. CONCLUSION

A novel strategy to covalently attach nitrilotriacetic acid (NTA) onto $\text{Ag/a-Si}_{0.63}\text{C}_{0.37}\text{H}$ interfaces for SPR sensing was developed. This interface was used in connection with a droplet-based SPR set to study the formation of coordinative bond between surface-linked NTA/ Cu^{2+} and His₆-tagged peptides of different concentrations. The binding capacity is comparable to a Biacore NTA-chip based on NTA-modified dextran layers. As it is generally more difficult for molecules to diffuse through such a hydrogel than to access a two-dimensional layer, the developed interface could be an interesting alternative when the analytes of interest are large molecules and for kinetic parameter determination, when a low amount of nonspecific binding is fundamental and low level of immobilization is recommended.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +33 3 62 53 17 25; Fax: +33 3 62 53 17 01. E-mail: sabine.szunerits@iri.univ-lille1.fr.

REFERENCES

- (1) Abbas, A.; Linma, M. J.; Cheng, Q. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 957.
- (2) Szunerits, S.; Coffinier, Y.; Janel, S.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2006**, *22*, 10716.
- (3) Szunerits, S.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2006**, *22*, 1660.
- (4) Szunerits, S.; Boukherroub, R. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 439.
- (5) Castel, X.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 15813.
- (6) Szunerits, S.; Castel, X.; Boukherroub, R. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 10883.
- (7) Manesse, M.; Sanjines, R.; Stambouli, V.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Langmuir* **2009**, *25*, 8036.
- (8) Manesse, M.; Sanjines, R.; Stambouli, V.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 1041.
- (9) Lockett, M. R.; Weibel, S. C.; Philips, M. F.; Shortreed, M. R.; Sun, B.; Corn, R. M.; Hamers, R. J.; Cerrina, F.; Smith, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8611.
- (10) Touahir, L.; Niedziółka-Jönsson, J.; Galopin, E.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Solomon, L.; Petukhov, M.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 6058.
- (11) Touahir, L.; Jenkins, A. T. A.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Chazalviel, J.-N.; Peretti, J.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 22582.
- (12) Blankespoor, R.; Limoges, B.; Schollhorn, B.; Syssa-Magale, J.-L.; Yazidi, D. *Langmuir* **2005**, *21*, 3362.
- (13) Sigal, G. B.; Bamdad, C.; Barberis, A.; Strominger, J.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 490.
- (14) Kroger, D.; Liley, M.; Schiweck, W.; Skerra, A.; Vogel, H. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 155.
- (15) Peluso, P.; Wilson, D. S.; Do, D.; Tran, H.; Venkatasubbaiah, M.; Quincy, D.; Heidecker, B.; Poindexter, K.; Tolani, N.; Phelan, M.; Witte, K.; Jung, L. S.; Wagner, P.; Nock, S. *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 113.
- (16) Huang, S.-C.; Caldwell, K. D.; Lin, J.-N.; Wang, H.-K.; Herron, J. N. *Langmuir* **1996**, *12*, 4292.
- (17) June, R. K.; Gogoi, K.; Eguchi, A.; Cui, X.-S.; Dowdy, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10680.
- (18) Nieba, L.; Nieba-Axmann, S. E.; Persson, A.; Hamalainen, M.; Edebratt, F.; Hansson, A.; Lidholm, J.; Magnusson, K.; Karlsson, A. F.; Pluckthun, A. *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217.
- (19) Crowe, J.; Dobeli, H.; Gentz, R.; Hochuli, E.; Stuber, D.; Henco, K. *Methods Mol. Biol.* **1994**, *31*, 371.
- (20) Paramban, R. I.; Bugos, R. C.; Su, W. W. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 687.
- (21) Borch, J.; Roepstorff, P. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 179.
- (22) Stapleton, J. J.; Harder, P.; Daniel, T. A.; Reinhard, M. D.; Yao, Y.; Price, D. W.; Tour, J. M.; Allara, D. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 8245.

- (23) Chavalier, S.; Cuestas-Ayllon, C.; Grazu, V.; Luna, M.; Feracci, H.; de la Fuente, J. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 14707.
- (24) Khan, F.; He, M.; Taussig, M. J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1478.
- (25) Gautrot, J. E.; Huck, W. T. S.; Welch, M.; Ramstedt, M. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 193.
- (26) Raman, S. K.; Machaidze, G.; Lustig, A.; Aebi, U.; Burkhard, P. *Nanomedicine* **2006**, *2*, 95.
- (27) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Sénémaud, C.; Driss Khodja, M. *Phys. Rev. B* **1988**, *38*, 13263.
- (28) Solomon, I.; Schmidt, M. P.; Tran-Quoc *Phys. Rev. B* **1988**, *38*, 9895.
- (29) Sam, S.; Touahir, L.; Salvador Andresa, J.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Moraillon, A.; Ozanam, F.; Gabouze, N.; Djebbar, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 809.
- (30) Galopin, E.; Beaugeois, M.; Pinchemel, B.; Camart, J.-C.; Bouazaoui, M.; Thomy, V. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 746.
- (31) Touahir, L.; Niedziolka-Jonsson, J.; Galpin, E.; Boukherroub, R.; Gouget-Laemmel, A. C.; Solomon, I.; Petukhov, M.; Chazalviel, J.-N.; Ozanam, F.; Szunerits, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 6058.
- (32) Faucheux, A.; Gouget-Laemmel, A. C.; Henry de Villeneuve, C.; Boukherroub, R.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2006**, *22*, 153.
- (33) Boukherroub, R. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2005**, *9*, 66.
- (34) Liu, X.; Han, H. M.; Liu, H. B.; Xiao, S. J. *Surf. Sci.* **2010**, *604*, 1315.
- (35) Rouez, O. D.; Debiemme-Chouvy, C.; Malthete, J.; Silberzan, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 4138.
- (36) Aureau, D.; Ozanam, F.; Allongue, P.; Chazalviel, J.-N. *Langmuir* **2008**, *24*, 9440.
- (37) Rigler, P.; Ulrich, W.-P.; Hoffmann, P.; Mayer, M.; Vogel, H. *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 268.
- (38) Anderson, P. O.; Lundquist, M.; Tegler, L.; Borjegen, S.; Baltzer, L.; Osterlund, L. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 712.
- (39) Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Marriott, G.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4740.

Integrated prism-free coupled surface plasmon resonance biochemical sensor

C. Lenaerts^a, J. Hastanin^a, B. Pinchemel^b, S. Maricot^c, J-P. Vilcot^c, S. Habraken^{a,d},
N. Maalouli^b, E. Wijaya^c, M. Bouazaoui^b, C. Desfours^d, K. Fleury-Frenette^a

^a Centre Spatial de Liège, Université de Liège, Angleur, Belgium, B-4031

^b Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules, UMR 8523, Université Lille1,
Bâtiment P5, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

^c Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie, UMR 8520, Université
Lille1, Avenue Poincaré, BP 60069, 59652 Villeneuve d'Ascq cedex, France

^d Université de Liège, Physics Department, HoloLab, Liège, Belgium, B-4000

ABSTRACT

We present the design, implementation and characterization of an integrated surface plasmon resonance biosensor chip involving diffractive optical coupling elements avoiding the need of prism coupling. The integrated sensor chip uses the angular interrogation principle and includes two diffraction gratings and the SPR sensing zone. The theoretical design is presented as well as the fabrication procedure. Experimental results, using reference index fluids, are compared to theoretical predictions and prism coupling experimental results. We believe that this architecture is perfectly suitable for low cost and reproducible SPR biochemical sensor chips since the sensing zone can be functionalized as any other one.

Keywords: surface plasmon resonance, grating coupler, biochemical sensor, integrated sensor

INTRODUCTION

Over the past few decades, intense theoretical and experimental efforts have been devoted to lab-on-chip biosensors that opens up an opportunity to drastically reduce the total duration and cost of biochemical analysis. Among the various measurement techniques, the optical label-free affinity detection format appears as an appropriate approach for lab-on-chip platforms requirements. In this method, the concentration of target biochemical species (analytes) in the liquid sample is quantified by measuring the amount of biomolecule binding events at a sensor surface functionalized with the chemical or bio-recognition elements (ligands).

The instrumental platform investigated in this work involves the surface plasmon resonance (SPR) detection principle, in which the number of binding events is monitored via the increase in refractive index they produce. This index change is detected within the evanescent field of the surface plasmon polaritons (SPPs) or surface plasma waves (SPWs) propagating onto the functionalized surface.

SPR is a well-known technique in biochemical analysis [1-4]. The sensing architecture is usually shared into two main parts: the first one deals with the in and out coupling of the light probe beam to the sensing area and the second one is constituted by the sensor chip which handles the sensing area. Managing the light beam commonly involves a prism in order to generate the SPW and to retrieve the light beam containing the SPR data. So, coupling and sensing regions are separate components that need to be closely fitted to avoid any trouble (e.g. interferences due to air gap) during the measurement; that is regularly achieved in commercial equipment using bulky mechanics. Here, we present an integrated approach avoiding this prism coupling technique; two diffractive gratings are integrated with the sensing region onto the sensor chip itself.

The proposed configuration involves angular interrogation principle as with conventional prism coupling scheme. The SPWs are excited using the first diffraction order of the input-coupler diffraction grating. The

output-coupler diffraction grating provides the optical coupling between the reflected light beam and the optical detector.

The theoretical analysis of the grating design optimization procedure as well as the sensor design performance are presented and compared with experimental results. The validity of the implemented setup was verified using water and ethylene glycol as reference refractive index solutions.

CONCEPT CONSIDERATIONS

The SPWs are charge density longitudinal oscillations of the free electron gas on the interface between a metal and a dielectric medium. The tangential component of the SPW vector is larger than the one of incident light wave. Accordingly, in order an impinging light wave can excite a SPW, one needs to increase its wave vector using either a prism or a metallic grating [1-3]. Here, the prism coupling principle is cloned, i.e. passing the light wave through an optically denser medium in the attenuated total reflection (ATR) method, but the light coupling is accomplished without any critical positioning or fitting.

Figure 1 depicts a schematic view of the integrated sensor compared to the usual SPR sensor. The main difference is in the light coupling scheme. For a usual sensor (top), the light is coupled via a prism, this prism is tightly fitted to the sensing slide in order to avoid any air gap in between both parts, air gap which can generate interference patterns in the response. In the integrated sensor (bottom), the coupling is made using grating couplers that are located on the sensing slide.

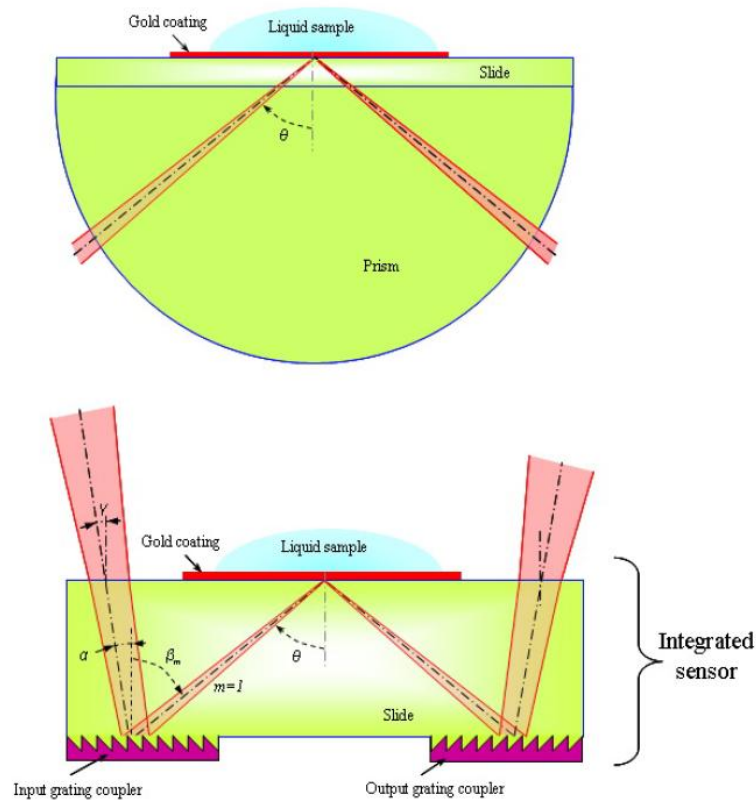


Figure 1. Usual (top) and integrated (bottom) SPR sensor concepts. Even if gratings are qualified as input and output couplers for sake of understanding, the sensor is entirely reversible.

The integrated SPR sensor includes the sensing area (50 nm gold film) on one side and the two light coupling gratings on the other side of a BK7 slide which acts as sensor chip support and light guide. The light diffracted by the input coupler into the first ($m = +1$) diffraction order converges at the metal film/liquid sample interface. The range of incidence angles corresponding to this light cone is optimized to provide the sensor the ability to detect the required refractive index range (*from 1.33 to 1.38, in our case*). As it is shown in Figure 2, the SPR is observed as a dip in the reflected light angular spectrum. Numerical simulations involving the rigorous integral method reveal that the reflectivity dip exhibits Lorentzian line-shape in the vicinity of the SPR angle. The SPR angle depends strongly on the refractive index of the liquid sample. In our case, the SPR angle sensitivity to the sample refractive index change is about $120^\circ/\text{RIU}$.

Figure 2a depicts angular reflectance spectra of the interface between gold thin film and the liquid sample numerically calculated using original software involving the transfer matrix algorithm [4]. Figure 2b shows the same angular reflectance spectra at the sensor chip output (the conversion between the spectra inside and outside the sensor chip substrate has been performed numerically using the Snell law and the grating equation [5-6]).

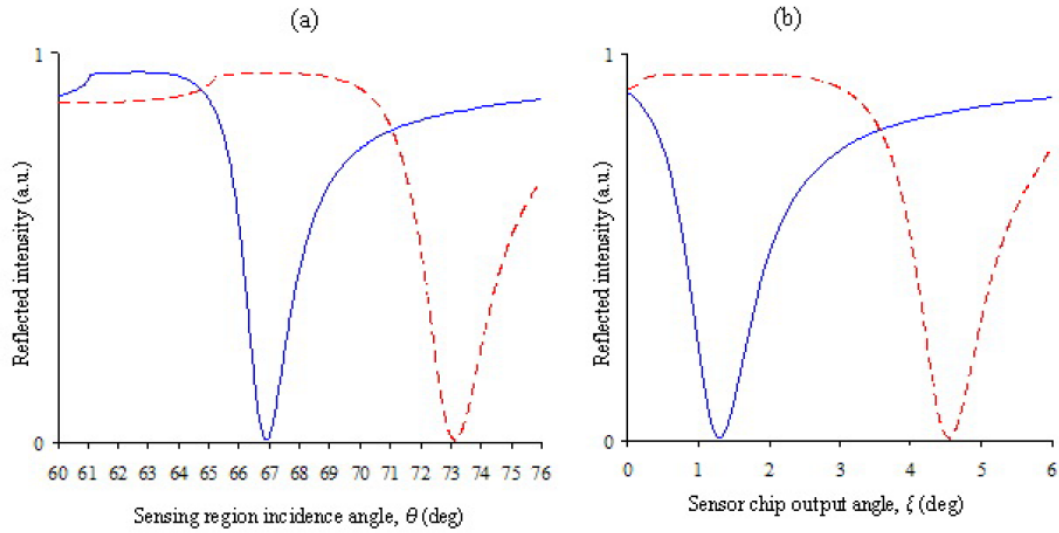


Figure 2. Normalized reflected intensity versus the angle of incidence at the interface between the gold coating and the liquid sample (a) and at the sensor chip output side (b) calculated for two sample refractive indices: $n_D = 1.33$ (solid lines) and $n_D = 1.38$ (dashed lines). The refractive index of the substrate is taken as $n_p = 1.52$; the gold coating dielectric permittivity of the sensing area measured in our experiments was: $\epsilon = -18.847 + 1.23i$ (at $\lambda = 760 \text{ nm}$).

The theoretical model of SPR sensor implemented in this work involves the two following well-known equations:

$$\begin{cases} m \lambda \Lambda^{-1} = n_p (\sin \alpha + \sin \beta_m) \\ \sin \theta_{SPR} = n_p^{-1} \cdot n_{eff(\lambda)} \end{cases} \quad (1) \quad (2)$$

where n_p , Λ , λ , α and β_m are the substrate refractive index, the grating constant, the light wavelength in vacuum, the angle of incidence at the grating and the diffraction angle of the m reflected order, respectively; $n_{eff(\lambda)}$ is the real part of the surface plasmon wave effective index; θ_{SPR} is the incidence angle at which the resonance conditions are fulfilled.

In the first approach, where the effect of finite thickness of the metal layer on the SPW propagation constant is completely neglected, the SPW effective index can be found using the following equation [1-3]:

$$n_{eff} \approx \sqrt{\epsilon_{r(\lambda)} n_D^2 / (\epsilon_{r(\lambda)} + n_D^2)} \quad (3)$$

where $\varepsilon_r(\lambda)$, λ and n_D are the real part of the metal film dielectric permittivity, the light wavelength in vacuum and the refractive index of the liquid sample, respectively.

The Eq.(1) presents the well-known grating equation describing the angular dispersion of the diffraction grating [5], while the Eq.(2) specifies the SPR conditions to be fulfilled, in the case of prism-base coupler [1-3]. It is instructive to note that, since the BK-7 glass slide sides are parallel, the diffraction angle β_m in Eq.(1) can be substituted for the incident angle θ from Eq. (2).

Solutions of this system of equations define the grating constant range enabling the SPW excitation at the interface between the thin metal film and the liquid sample.

The operation principle of the SPR sensor is that a slight change in the refractive index of the sample induced, for instance, by target molecules binding, a SPR dip shift in the detected angular spectra (Figure 2). Thus, a SPR peak shift quantifies uniquely the refractive index change induced by binding events. Accordingly, the SPR dip monitoring gives access to measuring the concentration of the target molecules in the sample solution.

The sample refractive index changes can be found straightforwardly from the following equation:

$$\delta n_D = (\partial \theta_{SPR} / \partial n_D)^{-1} \cdot \delta \theta_{SPR} \quad (4)$$

where $\delta \theta_{SPR}$ is the measured SPR angle shifts; n_D is refractive index of the sample; $\partial \theta_{SPR} / \partial n_D$ denotes the first derivatives of SPR angle θ_{SPR} with respect to the sample refractive index, which can be easily obtained either from the equation (2), in the first approach, or calculated more accurately using numerical methods (such as the transfer matrix algorithm [4] or the rigorous integral method [6]).

It is instructive to note that the SPR dip preserves its line-shape when slight sample refractive index variations occur [1-4]. Accordingly, simplest methods of SPR data analysis appear to be well-suited for monitoring the SPR angle. In this first experimental demonstration, the data analysis involves the polynomial fitting method for the identification of the SPR dip position in the angular spectrum.

It is worth noting that, in order to reduce the optical losses, the light beam should be at near-normal oblique incidence on the input side of the sensor chip. In this case, the diffraction grating forms two symmetric diffraction orders. Accordingly, the master grating must be selected so that to suppress one of these orders, as well as unused high diffraction orders ($m > 1$, in our case). Thus, we need to use the ruled diffraction grating.

In the case of the investigated instrumental platform, the diffraction grating parameters are optimized to achieve the SPPs excitation via the $m = +1$ reflected diffraction order and the best performance of the sensor is achieved for ruled grating with 1800 grooves/mm and a blaze angle from 21° to $26^\circ 44'$.

Figure 3 depicts the simulation results for the selected ruled diffraction grating obtained using the computer simulation package PC-Grate (International Intellectual Group Inc.) involving the rigorous integral method [7].

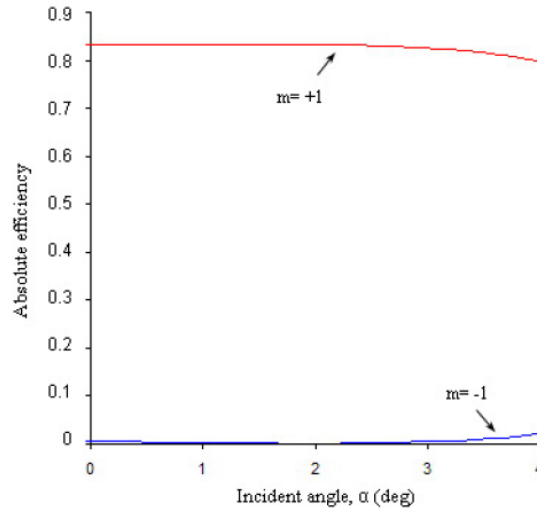


Figure 3. Absolute efficiency of the $m = +1$ and $m = -1$ reflected orders formed by the ruled diffraction grating versus incident angle α . The metal coating permittivity is taken as $\epsilon = -24.736 + 1.44i$ (silver, at $\lambda = 760$ nm); the grating constant and blaze angle are fixed at $\Lambda = 555$ nm (grating constant of 1800 lines/mm) and $26^\circ 44'$, respectively.

The sensor signal-to-noise ratio as well as the reliability of the optical coupling between its components are inherently limited by the diffraction efficiency of the diffraction gratings. For this reason, the gratings have been metal-coated in order to improve their efficiency.

EXPERIMENTAL SETUP

Integrated sensor fabrication

The sensor chip base is constituted of a 2mm-thick BK7 slide. On one side of this slide, two blazed gratings are placed in order to allow the coupling and the outcoupling of the light probe. On the other side of the glass plate, the sensitive area is deposited (see Figure 1). The originality in the manufacturing of the sensor chip is inherent to the imprinting technique which is used to fabricate the gratings.

The imprinting technique uses commercially available blazed gratings (GR13-1850 from Thorlabs GmbH). The first step in the replication process is to proceed to the molding of the original gratings into silicone elastomer in order to get an inverted replica for the molding process. A diffraction study is preliminary carried out on an optical bench using a blue laser (403nm) and results are compared to numerical simulations so as to determine the blaze orientation of the gratings. Knowing such information, both gratings can be disposed with the right spacing distance and orientation to create the inverted replica into the silicon elastomer (see Figure 4a). An UV curing polymer having the same refractive index as BK7 is then deposited onto the glass substrate plate. This polymer is molded with the silicone mold (Figure 4b) and UV cured. The non-useful part of polymer is cut out and delaminated from the slide (Figure 4c). Finally, in order to increase the reflectivity of the replicated gratings, we proceed to a silver coating of 200nm thick by ion beam evaporation, (Figure 4d). The last step consists in the coating of the active sensing area. A 50nm gold layer is deposited, after masking, on the opposite glass plate side of the gratings, by ion beam evaporation (Figure 4e).

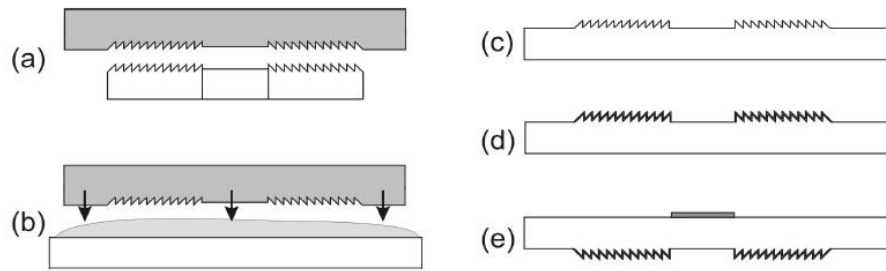


Figure 4. Scheme of the replication process: (a) Silicone molding of the gratings with spacer, (b) replication from the silicone mold to UV curable polymer coated on the BK7 substrate, (c) demolding and cutting out of the useless parts, (d) metallization of the gratings, (e) coating of the sensing area.

Figure 5 shows the fabricated sensor chip inserted in the characterization set-up (which is presented in the next paragraph).

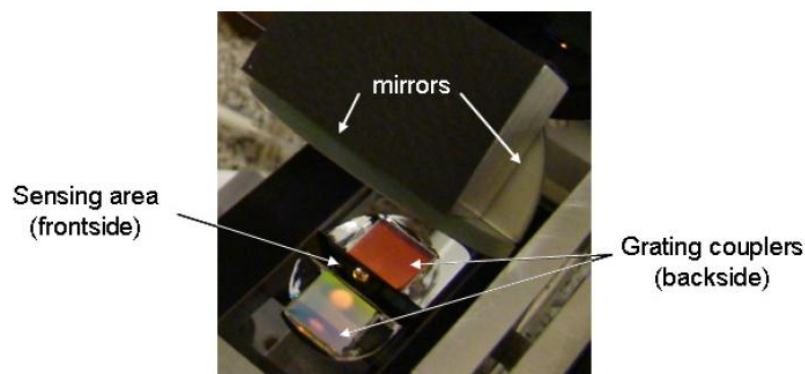


Figure 5. Integrated sensor chip inserted in the characterization set-up (top view)

Experimental set-up

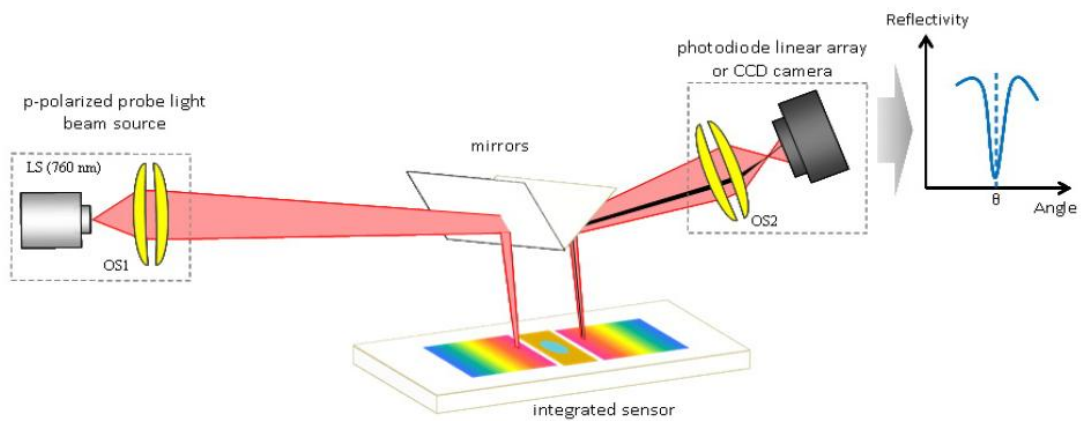


Figure 6. Experimental set-up.

The experimental set-up is presented in Figure 6. Apart the integrated sensor which fabrication is reported in §3.1, the experimental bench is composed of the optical probe generation and detection. Generation uses a p-polarized 760nm dye laser source. In- and out-coupling to and from the integrated sensor is achieved via two mirrors arranged so that the coupling angles are respected ($\gamma = \xi = 4.5^\circ$). Collimation is made using lenses. Detection is made either using a photodiode linear array (HAMAMATSU S9840) or a CCD camera (DCU223M/224M, THORLABS) in case of single or multiple analysis channels, respectively. LabVIEW based software has been set-up in order to drive the experiment.

EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

Currently, only a non-functionalized integrated sensor chip has been experimentally investigated. However, the main target is here to compare its characterization results with the results obtained with a conventional sensor chip under a usual prism-coupled architecture. No difference occurs in the functionalization process of this integrated version compared to the one used in a conventional SPR system, that is to say that the comparison of the "physical" characterization results will give the direct comparison between the two optical coupling approaches, which corresponds to the interesting figure to evaluate, at present.

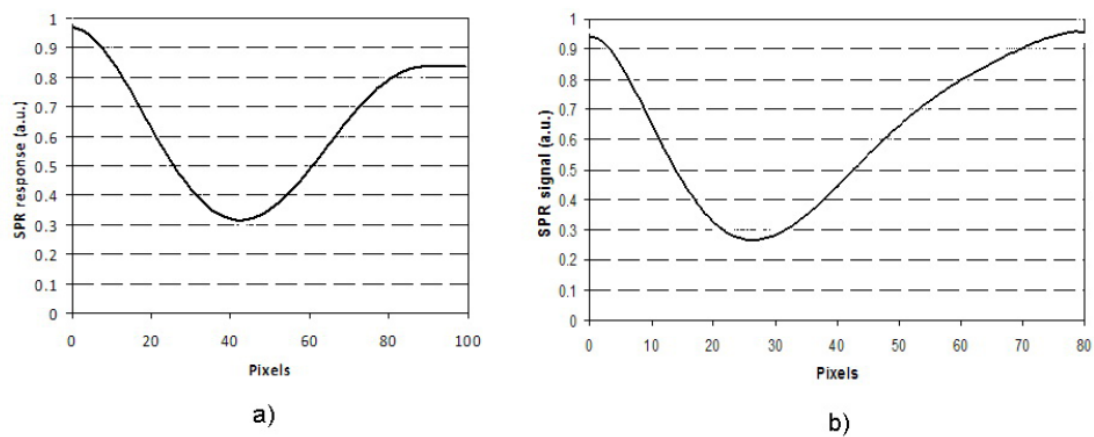


Figure 7. SPR responses of a) a prism coupled sensor chip, b) the integrated sensor chip.

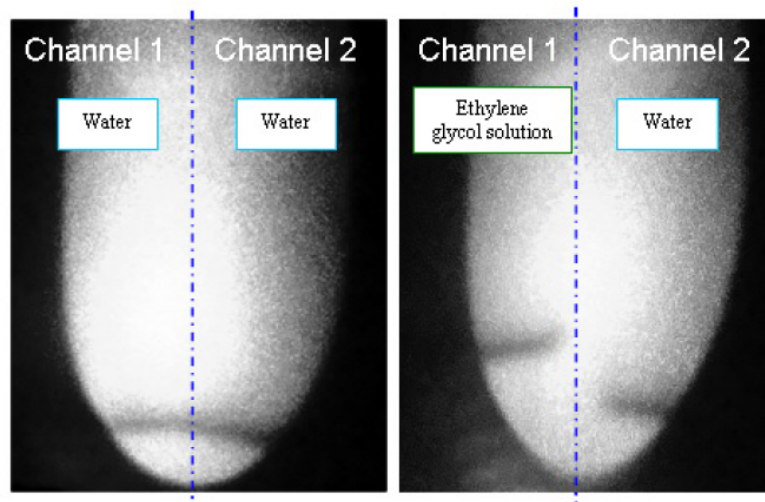


Figure 8. SPR responses for a test bench modified as to follow simultaneously two droplets (CCD camera images).

Figure 7 shows the qualitative comparison in the SPR response of the integrated sensor and a usual sensor using a prism coupling technique. Both sensor chips have been measured on the same test bench, so a prism coupling scheme has also been implemented. Data got a slight post-treatment in order to filter noise. No manifest difference is observed between the two responses indicating that the grating coupling efficiency is far enough adequate for the integrated sensor chip behaviour.

Fluidics has been adapted in order to follow simultaneously two droplets. The detection system is composed of either two linear arrays of photodiodes or the CCD camera. In Figure 8, the image obtained on the CCD camera is presented: two distilled water ($n_D \approx 1.33$) droplets are used, the plasmonic response is observed at the same location on the two channels (left picture), then a water droplet is replaced by an ethylene glycol droplet ($n_D \approx 1.34$), the difference in the SPR response is qualitatively observed (right picture).

CONCLUSION

In this paper, we discuss a SPR sensor chip architecture dedicated to miniaturized lab-on-chip platforms. The sensor chip integrates the sensing zone and the light coupling elements avoiding so the tight fitting of the usual optical prism which is used in SPR experiments. The light coupling is made using two blazed gratings that are fabricated using the imprinting technique and an UV curable polymer, allowing a low cost as well as reproducible fabrication process. Theoretical issues mainly concern the grating design as the sensing zone behaves as in classical prism coupling scheme.

In the first experimental demonstrations, this integrated sensor has been compared to a usual sensor that was tested in the same conditions in terms of qualitative results on SPR responses. No relevant difference has been pointed out between the results obtained for both sensor types; it validates the grating coupling scheme which is used for the integrated sensor design. Fluidics and image acquisition system have also been adapted in order to follow simultaneously two or more SPR experiments. Quantitative comparisons will now be carried out in order to fully compare the two sensors. Anyway, the raw data obtained up to now may imply that quantitative results will corroborate the qualitative ones, i.e. that this sensor configuration could replace the usual prism coupling configuration relaxing then the constraints on the sensor chip characterization environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge partial support from the Walloon region and European Regional Development Fund under Project INTERREG IV FW1.1.9 "Plasmobio" [8].

REFERENCES

- [1]Dostalek J. et al., [Surface plasmon resonance based sensors], Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 177–190 (2006)
- [2]Homola J., "Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species", Chemical Reviews 108, 462-493(2008).
- [3]Homola J., [Surface plasmon resonance based sensors], Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 45-67 (2006).
- [4]Sprokel G., "Determination of the Surface Tilt angle by Attenuated Total Reflection & The Reflectivity of a Liquid Crystal Cell in a Surface Plasmon Experiment", Mol. Cryst. Liq. Cryst. 68, 29 (1981)
- [5]Palmer C., "Diffraction grating handbook", 6th ed., Newport Corp., New-York, 237-252 (2005)
- [6]Petit R. et al, "Electromagnetic Theory of Gratings", Springer-Verlag (1980).
- [7]International Intellectual Group, Inc. PC-Grate: <http://www.pcgrate.com>
- [8]"PLASMOBIO" project: <http://www.interreg-fwvl.eu>

Graphene-based high-performance surface plasmon resonance biosensors

E. Wijaya^{*a}, N. Maalouli^b, R. Boukherroub^b, S. Szunerits^b, J-P. Vilcot^a

^aInstitut d'Electronique, de Microélectronique, et de Nanotechnologie (IEMN), UMR 8520, Université Lille 1, Avenue Poincaré BP 60069, Villeneuve d'Ascq 59652, France;

^bInstitut de Recherche Interdisciplinaire (IRI), USR-3078, Université Lille 1, 50 Avenue de Halley, BP 70478, Villeneuve d'Ascq 59658, France

ABSTRACT

Surface plasmon resonance (SPR) biosensors have become a central tool for the study of biomolecular interactions, chemical detection, and immunoassays in various fields. SPR biosensors offer unparalleled advantages such as label-free and real-time analysis with very high sensitivity. To further push the limits of SPR capabilities, novel SPR structures and approaches are being actively investigated. Here we experimentally demonstrate a graphene-based SPR biosensor. By incorporating a graphene layer to the conventional gold thin film SPR structure, its biosensing sensitivity is significantly increased. This is shown in a typical affinity biosensing experiment to measure the real-time binding kinetics of biotin-streptavidin. In addition to higher sensitivity, we also obtain a much higher signal-to-noise ratio without the slightest modification of the usual measurement setup. This implies that a considerably lower limit of detection can be made possible with the novel structure. Moreover, our graphene-based SPR biosensors do not require sophisticated surface functionalization schemes as in conventional SPR in order to function. Previous reports have also suggested that graphene might effectively prevent non-specific binding of biomolecules on the sensor surface. With relatively simple fabrication methods and large scalability, these combined distinctive advantages can enable future generation of high-performance SPR biosensors.

Keywords: plasmonics, surface plasmons and devices, SPR biosensors, graphene

1. INTRODUCTION

Surface plasmons, also often known in the literature as surface plasmon polaritons (SPP) or surface plasma waves (SPW), are p-polarized (also referred to as transverse-magnetic (TM)) electromagnetic excitations in the form of charge density oscillations propagating at the interface between a metal and a dielectric, evanescently confined in the perpendicular direction to the surface. The propagation constant of surface plasmons is very sensitive to refractive index variations of the dielectric¹. This is the founding principle of the surface plasmon resonance (SPR) optical sensor which can then be transformed into an SPR biosensor by imparting certain bio-functionalities through some interface chemistry, i.e., surface functionalization².

In SPR biosensors, the sensed medium (typically aqueous biological solutions in a micro fluidic flow cell) plays the role of the dielectric. Biomolecular interactions near the metal-dielectric interface (e.g., specific binding of analytes) induce a local change in the refractive index of the sensed dielectric medium. This refractive index variation then changes the propagation constant of the surface plasmons which can be optically detected with very high accuracy, most frequently by angular interrogation in the attenuated total reflection (ATR) configuration (Figure 1). In this method, a thin metal film is sandwiched between a high refractive index glass prism and the sensed dielectric medium. A p-polarized monochromatic light wave passing through the prism and totally reflected at the prism base generates an evanescent wave penetrating the thin metal film.

*edy.wijaya@ed.univ-lille1.fr

If the thickness of the metal film is properly chosen, this evanescent wave can then tunnel through the metal film to excite surface plasmons at the interface between the metal layer and the sensed dielectric medium. The optical excitation of surface plasmons which takes place only for a certain incident angle is accompanied by the transfer of the light wave energy into the surface plasmons and its subsequent dissipation in the metal film. This process results in a drop in the intensity of the reflected light. Therefore if the incident angle is varied and the resulting reflectance is plotted as a function of the incident angle, the resonance can be observed as a sharp dip in the reflectivity spectrum corresponding to the SPR angle whose position shifts when the refractive index of the sensed dielectric changes. The SPR angle shift can be monitored in real time and a plot of SPR response/resonance signal over time (a sensorgram) can thus be generated (Figure 1).

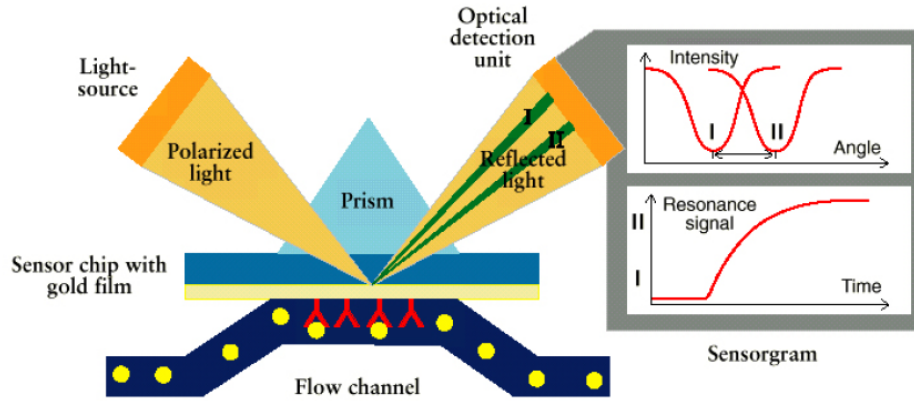


Figure 1. (a) Excitation of surface plasmons by the attenuated total reflection (ATR) method. The angle of resonance shifts as the refractive index of the sensed dielectric changes following binding events of analyte on the sensor surface as indicated by curves I and II.

As an SPR biosensor is made up of an SPR sensor and suitable surface functionalization acting as the biorecognition element, it follows that the overall sensitivity of an SPR biosensor is determined by both the intrinsic optical sensitivity of the SPR sensor and the characteristics of the surface functionalization. The overall sensitivity S_{tot} of an SPR biosensor in detecting an analyte with concentration c can thus be decomposed into two components as expressed in Equation 1:

$$S_{tot} = \frac{\partial Y}{\partial c} = \frac{\partial Y}{\partial n} \frac{\partial n}{\partial c} = S_{opt} S_{surf} \quad (1)$$

where S_{opt} denotes the optical sensitivity of the SPR sensor (i.e. the ratio of the change in sensor output Y , e.g. resonance angle, to the change in refractive index of the sensed medium n) and S_{surf} describes the effectiveness of the surface functionalization (i.e. the ratio of the local change in refractive index of the sensed medium to the amount of specific binding of the analyte on the sensor surface). S_{surf} depends solely on the surface properties of the biorecognition element affecting the biomolecular interaction.

The metal used in conventional SPR structure is usually gold thin film, chosen mainly for its stability in aqueous environments required for monitoring biomolecular interactions and the relative ease with which it can be functionalized. As a matter of fact, one of the first steps in any SPR-based protocol concerns the way the receptor molecules are anchored onto the SPR surface. The bioreceptors are either physisorbed or chemically attached onto the sensor surface. Covalent attachment is often preferred, as it provides strong and stable binding of the receptor to the SPR surface. The covalent immobilization strategies include chemical reactions such as amine, aldehyde or thiol coupling on previously formed functional self-assembled monolayers. Here we demonstrate a novel approach by using a graphene layer as the SPR bio-interface. The effects of graphene on the sensitivity indicators S_{opt} and S_{surf} of the resulting SPR biosensor in ATR configuration are investigated in this work.

2. CONCEPT CONSIDERATION

In conventional SPR biosensors, the most widely used approach for the introduction of functional groups onto thin gold SPR films is based on thiolated organic compounds, which spontaneously form self-assembled monolayers (SAMs) on gold surfaces (Figure 2a). Despite its widespread use, one of the limitations of this approach resides in the kind of functional thiolated molecules which can be synthesized and the follow-up reaction to bind the receptor. Furthermore, the susceptibility of the gold-sulfur bond to oxidation and photodecomposition is a real challenge for thiol chemistry². Currently, the new primary research focus using thiolated SAMs in connection with SPR is also oriented towards decreasing the number of surface reaction steps involved in bioreceptors linking. At the same time, there is a growing interest in the applications of carbon nanomaterials, notably carbon nanotubes and graphene, for biosensing³.

Graphene, a single sheet of carbon atoms in a hexagonal lattice, has attracted great interest in various fields^{4,5}. Recent advances in large-area growth and isolation of graphene established it as a promising candidate for several potential applications⁶⁻⁸. In particular, the unique surface physicochemical characteristics of graphene make it very attractive for biomedical applications. Through the π -stacking interactions between its two-dimensional hexagonal cells and the carbon-based ring structures widely present in biomolecules, graphene can strongly and stably adsorb biomolecules⁹. Hence the incorporation of graphene into SPR biosensors structure can substantially simplify the bioreceptors linking to the sensor surface. This gold-graphene SPR combination can be quite easily realized thanks to the similarity of graphene's electronic and surface properties to carbon nanotubes and the strong adhesion between carbon nanotubes and gold¹⁰.

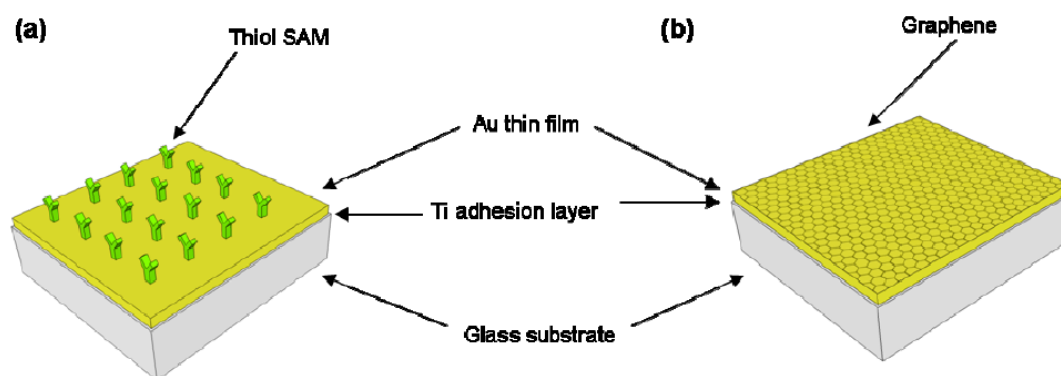


Figure 2. (a) Conventional SPR structure: gold thin film on glass substrate with thiolated SAM. (b) Novel graphene-based SPR structure.

3. EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

The novel SPR structure incorporating a graphene layer consists of a glass substrate onto which a 5 nm titanium adhesion layer and 50 nm gold thin film are deposited, as in conventional SPR, and an additional layer of graphene on top of the gold film as schematically illustrated in Figure 2b. This top layer was fabricated by a dry transfer technique¹¹. A thermal release tape was used to transfer a 1 mm x 1 mm commercial graphene sheet originally grown by chemical vapor deposition (CVD) on nickel-coated silicon substrate. Raman spectroscopy (532 nm excitation) was used to characterize and confirm the presence of graphene on the transfer substrate (Figure 3). The integrated intensity ratio of the D peak to the G peak is increased from 0.5 before transfer to 0.75 after transfer. This suggests that some unavoidable mechanical defects result from the transfer process.

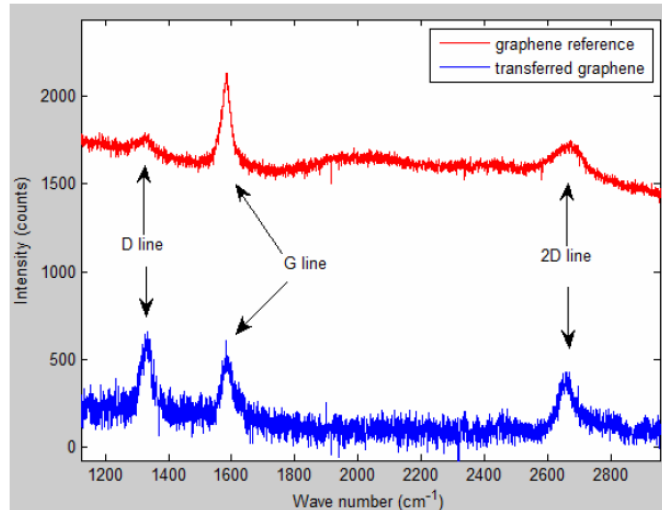


Figure 3. Raman spectra of transferred graphene compared to the original graphene. The identifying characteristic D, G, and 2D peaks are indicated.

The resulting SPR structure was then tested in a typical affinity biosensing experiment (Autolab SPR systems) to measure the real-time binding kinetics of streptavidin-biotin. In this experiment, the initial SPR reference was first established by the injection of PBS (phosphate-buffered saline) buffer solution. Solution of albumin biotin (0.1 mg/L) was then injected until the saturation of the measured response. This is then followed by rinsing with PBS buffer to wash off biotin molecules not adsorbed on the sensor surface. Solution of streptavidin (0.01 mg/L) was subsequently injected until the saturation of the measured response. This is finally followed by rinsing with PBS buffer to wash off excess streptavidin molecules. The experimental outcome along with a comparison to conventional SPR surface is shown in Figures 4 and 5.

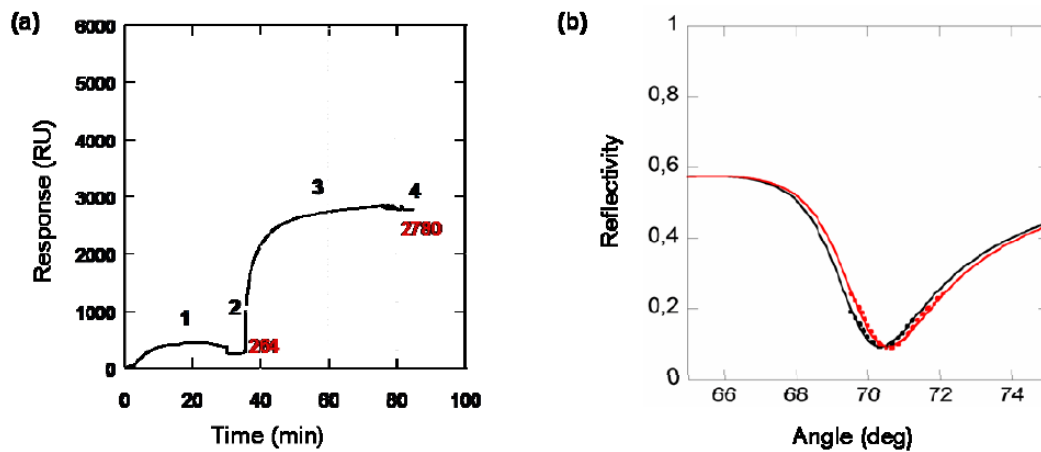


Figure 4. (a) Biotin-streptavidin binding kinetics response on conventional thiol-functionalized SPR surface. The markings on the curve correspond to the following: 1 = injection of albumin biotin, 2 = rinsing with PBS buffer, 3 = injection of streptavidin, 4 = rinsing with PBS buffer. (b) SPR curves for gold modified with mercaptoundecanoic acid and covalently linked biotin in water: before binding of biotin binding (black), after binding of biotin (red). Dotted lines are experimental data, full lines are SPR fits.

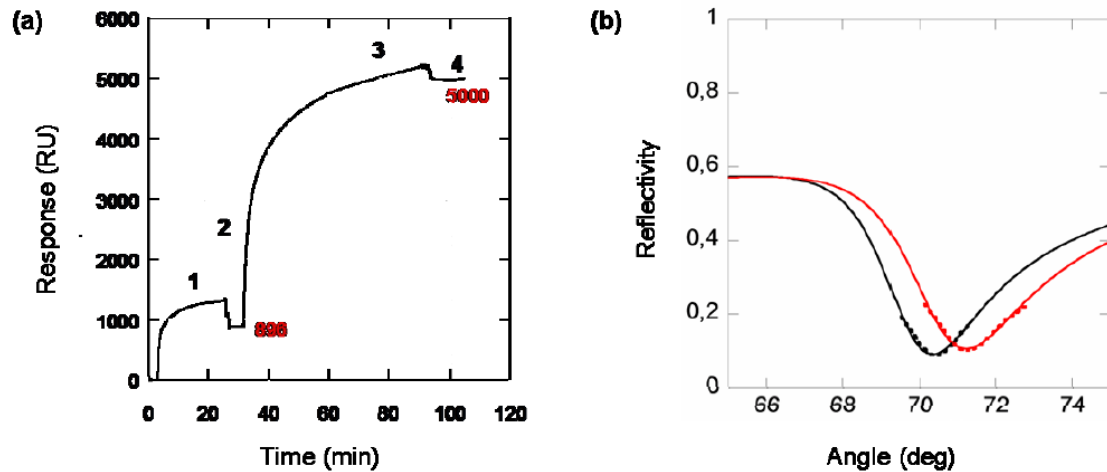


Figure 5. (a) Biotin-streptavidin binding kinetics response on graphene-based SPR surface. The markings on the curve correspond to the following: 1 = injection of albumin biotin, 2 = rinsing with PBS buffer, 3 = injection of streptavidin, 4 = rinsing with PBS buffer. (b) SPR curves in water before binding of biotin: gold surface (black), graphene-based surface (red). Full lines are SPR fits, dotted lines: experimental data.

To analyze Figures 4a and 5a, two cases can be distinguished: binding of small molecules (biotin, molecular mass 240 Da) and binding of large molecules (streptavidin, molecular mass 60 kDa). In the case of the binding of small molecules, Figure 5a shows that for the graphene-based structure, the measured response upon steady-state biotin immobilization is 896 RU (RU = response unit; 1 RU here corresponds to an SPR angle shift of 1 millidegree, which in turn correlates with a change in refractive index of approximately 10^{-5}) while for the conventional SPR structure (Figure 4a), the measured response is only 264 RU upon steady-state biotin immobilization. The measured response on the graphene-based surface in this case is amplified by 340% compared to the measured response on the conventional SPR surface. For the binding of large molecules, the measured response upon streptavidin binding is $5000 - 896 = 4104$ RU for the graphene-based surface. For the conventional SPR surface, the response following the binding of streptavidin is only measured to be $2780 - 264 = 2516$ RU. This amounts to a sensitivity amplification factor of 163%, about half the amplification factor for the binding of biotin. Referring to Equation 1, these numbers pertain to the overall biosensing sensitivity S_{tot} which can be broken down into the optical sensitivity component S_{opt} and the biorecognition sensitivity of the surface S_{surf} . In fact, it has been theoretically predicted that the incorporation of a single layer of graphene only adds 2.5% to the optical sensitivity of SPR sensors¹². Comparing this to the measured sensitivity, even the lower increase in sensitivity for the case of streptavidin binding (63%) exceeds significantly the 2.5% increase theoretically predicted by solely considering the optical contribution. Therefore, the significant increase in biosensing sensitivity of graphene-based surface can be mainly attributed to the unique surface physicochemical properties of the graphene layer.

Turning our attention to Figures 4b and 5b, it can be seen that apart from an initial reference shift of about 0.8° , the form of the SPR curves are fairly identical for both the graphene-based and the conventional SPR surfaces. The angular shifts upon biotin and streptavidin binding are more significant for the graphene-based surface but no resonance broadening is observed. As a matter of fact, the same experimental setup was used for both surfaces and no instrumental adjustment was necessary when changing the sensor chip. This shows that the graphene-based SPR surface can easily be used in place of conventional SPR surface without any modification to the measurement system. The graphene-based SPR surface can thus be readily integrated into existing SPR technology. Moreover, the signal generated upon immobilization and binding is much stronger on the graphene-based surface compared to conventional SPR structure. Since the instrumental setup is identical in the two cases, the signal-to-noise ratio of the graphene-based sensor surface is clearly enhanced. Therefore, this novel structure allows a considerably lower limit of detection to be achieved. In

particular, the direct detection of small molecules (< 1000 Da), one of the major limitations of SPR biosensors, can be significantly improved.

Another distinctive advantage of graphene-based SPR structure is that sophisticated or susceptible surface functionalization is not mandatory as in conventional SPR. Nevertheless, if necessary, chemical modification of graphene to introduce additional functional groups could be easily performed¹³⁻¹⁶. Finally, it is also expected that the constraint exerted on bioreceptors upon their immobilization on the graphene surface can help prevent non-specific binding of biomolecules. In fact, it has been experimentally shown that functionalized graphene improves the biostability and specificity of single-stranded DNA¹⁷.

4. CONCLUSIONS

In conclusion, we have successfully demonstrated graphene-based SPR biosensors with significantly exalted performance (higher sensitivity, higher signal-to-noise ratio, lower limit of detection), simpler surface conditioning, relative ease of fabrication, and large scalability. With the possibility of prompt integration into existing technology, this novel structure clearly shows promising potentials for next generation of ultra-high-performance SPR biosensors.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge partial support from European Regional Development Fund under Project INTERREG IV FW1.1.9 "Plasmobio".

REFERENCES

- [1] Homola, J., "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species," *Chem. Rev.* 108(2), 462-493 (2008).
- [2] Wijaya, E., Lenaerts, C., Maricot, S., Hastanin, J., Habraken, S., Vilcot, J-P., Boukherroub, R. and Szunerits, S., "Surface plasmon resonance-based biosensors: from the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 15(5), 208-224 (2011).
- [3] Yang, W., Ratnac, K. R., Ringer, S. P., Thodarson, P., Gooding, J. J. and Braet, F., "Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene?," *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(12), 2114 – 2138 (2010).
- [4] Geim, A. K. and Novoselov, K. S., "The rise of graphene," *Nature Mater.* 6, 183-191 (2007).
- [5] Geim, A. K., "Graphene: status and prospects," *Science* 324, 1530-1534 (2009).
- [6] Li, X., Cai, W., An, J., Kim, S., Nah, J., Yang, D., Piner, R., Velamakanni, A., Jung, I., Tutuc, E., Banerjee, S. K., Colombo, L. and Ruoff, R. S., "Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils," *Science* 324, 1312-1314 (2009).
- [7] Kim, K. S., Zhao, Y., Jang, H., Lee, S. Y., Kim, J. M., Kim, K. S., Ahn, J-H., Kim, P., Choi, J-Y. and Hong, B. H., "Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes," *Nature* 457, 706-710 (2009).
- [8] Lee, Y., Bae, S., Jang, H., Jang, S., Zhu, S-E., Sim, S. H., Song, Y. I., Hong, B. H. and Ahn, J-H., "Wafer-scale synthesis and transfer of graphene films," *Nano Lett.* 10(2), 490-493 (2010).
- [9] Song, B., Li, D., Qi, W., Elstner, M., Fan, C. and Fang, H., "Graphene on Au(111): a highly conductive material with excellent adsorption properties for high-resolution bio/nanodetection and identification," *ChemPhysChem* 11(3), 585–589 (2010).
- [10] Song, L., Ci, L., Gao, W. and Ajayan, P. M., "Transfer printing of graphene using gold film," *ACS Nano* 3(6), 1353–1356 (2009).
- [11] Caldwell, J. D., Anderson, T. J., Culbertson, J. C., Jernigan, G. G., Hobart, K. D., Kub, F. J., Tadjer, M. J., Tedesco, J. L., Hite, J. K., Mastro, M. A., Myers-Ward, R. L., Eddy, Jr., C. R., Campbell, P. M. and Gaskill, D. K., "Technique for the dry transfer of epitaxial graphene onto arbitrary substrates," *ACS Nano* 4(2), 1108–1114 (2010).

- [12] Wu, L., Chu, H. S., Koh, W. S. and Li, E. P., "Highly sensitive graphene biosensors based on surface plasmon resonance," *Opt. Express* 18(14), 14395-14400 (2010).
- [13] Quintana, M., Spyrou, K., Grzelczak, M., Browne, W. R., Rudolf, P. and Prato, M., "Functionalization of graphene via 1,3-dipolar cycloaddition," *ACS Nano* 4(6), 3527–3533 (2010).
- [14] Steenackers, M., Gigler, A. M., Zhang, N., Deubel, F., Seifert, M., Hess, L. H., Haley, C., Lim, Y. X., Loh, K. P., Garrido, J. A., Jordan, R., Stutzmann, M. and Sharp, I. D., "Polymer brushes on graphene," *J. Am. Chem. Soc.* 133(27), 10490–10498 (2011).
- [15] Kaminska, I., Das, M. R., Coffinier, Y., Niedziolka-Jonsson, J., Woisel, P., Opallo, M., Szunerits, S. and Boukherroub, R., "Preparation of graphene/tetrathiafulvalene nanocomposite switchable surfaces," *Chem. Commun.* 48(19), 1221-1223 (2012).
- [16] Kaminska, I., Das, M. R., Coffinier, Y., Niedziolka-Jonsson, J., Sobczak, J., Woisel, Lyskawa, J., P., Opallo, M., Boukherroub, R. and Szunerits, S., "Reduction and functionalization of graphene oxide sheets using biomimetic dopamine derivatives in one step," *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4(2), 1016-1020 (2012).
- [17] Tang, Z., Wu, H., Cort, J. R., Buchko, G. W., Zhang, Y., Shao, Y., Aksay, I. A., Liu, J. and Lin Y., "Constraint of DNA on functionalized graphene improves its biostability and specificity," *Small* 6(11), 1205-1209 (2010).

μFLU10-207

EWOD-BASED MICROMIXING FOR FAST PROTEIN SENSING USING SPR

Guillaume Perry^{1,3*}, Nazek Maalouli^{2,3}, Bernard Pinchemel², Mohamed Bouazaoui², Vincent Thomy¹, Rabah Boukherroub³

Université Lille Nord de France

¹ IEMN UMR CNRS 8520, Avenue Poincaré, BP60069, 59652 Villeneuve d'Ascq
guillaume.perry@ed.univ-lille1.fr, vincent.thomy@iemn.univ-lille1.fr

² Laboratoire PhLAM UMR CNRS 8523, Bât.P5, Cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex
nazek.maalouli@phlam.univ-lille1.fr, bernard.pinchemel@phlam.univ-lille1.fr,
mohamed.bouazaoui@phlam.univ-lille1.fr

³ IRI USR CNRS 3078, Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley, BP70478, 59658 Villeneuve d'Ascq
rabah.boukherroub@iri.univ-lille1.fr

KEY WORDS

Digital microfluidic, Droplet micromixing, biosensor

ABSTRACT

This work reports on an original device combining electrowetting-on-dielectric (EWOD) actuator and surface plasmon resonance (SPR) sensor for the detection of protein adsorption. In a classical microfluidic system, the reaction time is limited by diffusion. In the present study, EWOD actuator is used to create a micromixing for enhancing diffusion and thus reducing the chemical reaction time while SPR sensor allows real time monitoring and quantification of protein adsorption. Several experiments are performed to detect the SPR response with and without EWOD micromixing. Even though diffusion-induced micromixing occurs after a long time, EWOD induced micromixing leads to a significant decrease of mixing time.

1. INTRODUCTION

Microfluidic platforms are essential to reach ultra sensitive detection or analysis of specific biomarkers like peptides or proteins at a very low concentration. To attain this objective using Lab-on-Chip devices, mass transport has to be enhanced in microfluidic systems using a continuous flow. Up to now, the reported studies focus mainly on theoretical aspects for coupling continuous flow system and biosensors [1,2]. The use of droplet-based microfluidics instead of a continuous flow displays several advantages. For example, a droplet can be used as a microreactor for chemical reaction. Concerning the droplet actuation, there is also multiple devices based on surface acoustic waves or pressure flow and so on. The EWOD actuation is one of them; it is based on apparent contact angle change upon application of a voltage. The theoretical aspects and potential applications of this technique are reviewed by Mugele and Baret [3]. However, the use of EWOD technique is often limited to liquid actuation. Very recently, Malk et al. [4] have studied EWOD-induced microstirring using a 1D electrodes platform contrary to previous reports limited to a classical needle experimental set up. Recently, Malic et al. [5] review biochemical sensors using EWOD-based digital microfluidic systems but there are no reports on label-free detection of molecules using EWOD micromixing so far. SPR-based sensor is particularly used because it allows label-free and real-time detection [5]. There are already some commercially available biomedical devices using SPR detection scheme but they are all based on a

* Corresponding Author

continuous flow microfluidic system. However, a device coupling EWOD actuation and SPR detection scheme is less investigated. The combination of SPR sensor and EWOD actuator was reported by Malic et al. [6] for DNA (deoxyribonucleic acid) hybridization and detection with SPR imaging technique. The DNA probe density, orientation and DNA hybridization were controlled by the EWOD-induced electric field. Nevertheless, molecules diffusion inside the droplet and micromixing aspects are almost not studied in the literature whereas the enhancement effect of droplet-based microstreaming has been already demonstrated using surface acoustic waves actuation mode [7].

In this report, we take advantage of the electrowetting (EW) droplet-based microstreaming to avoid an analyte depleted layer around the biosensor created by molecules diffusion and mass transport for ultra fast and sensitive detection of protein adsorption. The EWOD clearly enhances the mixing and decreases the mixing time by a factor 3, a time to obtain 66% of the final SPR values regarding a simple diffusion.

2. EXPERIMENTAL PART

2.1 Materials and method

All components of EWOD-SPR device are realized at IEMN clean-room with conventional techniques of microfabrication. The wafers are cleaned in successive baths of acetone and isopropyl alcohol and finally in a piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, 1:1 v/v, 15min).

2.1.1 EWOD actuator: the electrodes array

The EWOD actuator is realized on a squared glass wafer onto which 20nm thick Ni layer is deposited by sputtering. The electrodes pattern is released by photolithography ($\lambda=400\text{nm}$) and a wet chemical etching ($\text{H}_2\text{O}/\text{HNO}_3$, 3:1 v/v, 1min). The photoresist is removed in a bath of acetone, cleaned with isopropyl alcohol and dried under a stream of nitrogen. Then, SU-8 (SU-8 2002, $\epsilon_r=3,2$ at 10 MHz) resist is spin-coated to obtain about $2\mu\text{m}$ thick dielectric layer. Finally, a thin hydrophobic layer (Cytop® CTL-809M) is deposited by spin coating (see Fig.1).

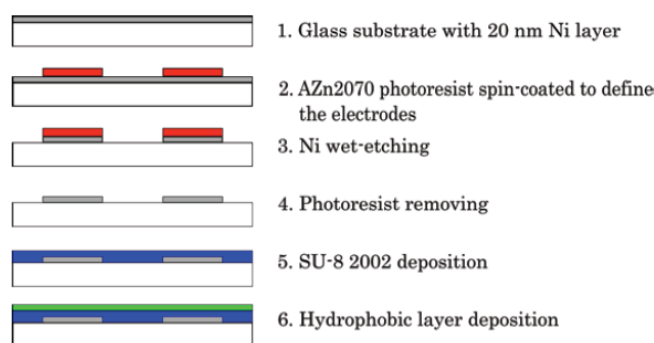


Figure 1: Description of the technological process for the fabrication of the EWOD actuator

We performed contact angle and contact angle hysteresis measurements on each surface. Droplet volume of $3\mu\text{L}$ of deionized water was used for these measurements with a sessile droplet mode using a remote-computer controlled goniometer system (DSA 100, Krüss). The advancing contact angle θ_a and receding contact angle θ_r are measured by tilting the sample using the goniometer. The hysteresis is obtained by the difference $\theta_a - \theta_r$, calculated just before the droplet sliding. Contact angle and contact angle hysteresis of the hydrophobic Cytop® surface are around $112^\circ \pm 2^\circ$ and $11^\circ \pm 2^\circ$, respectively.

2.1.2 SPR sensor

The EWOD counter-electrode used as a SPR sensor consists of titanium/gold (5/50 nm) deposited on glass coated with a thin layer (30nm) of Cytop® (see Fig.2).

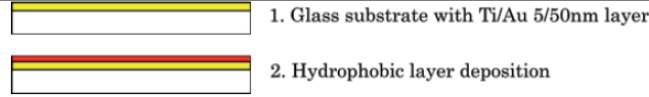


Figure 2: Description of the technological process for the fabrication of the SPR sensor

2.2 EWOD-SPR setup for micromixing

2.2.1 Mass transport and micromixing

The most important parameter in microfluidic is the diffusion time. Indeed, for very small volumes around a few μL , molecule diffusion can take several minutes even several hours! For mixing various liquids, large effects must be taken into consideration. These effects can be compared each other by various dimensionless numbers introduced to simplify the understanding. In this review [8], Squires and Quake remind dimensionless numbers for microfluidics. Reynolds number R_e defined in Eq.1 characterizes the ratio

$$R_e = \frac{UL}{\nu} \quad (1)$$

between inertia and friction effects.

In microfluidics, R_e is often low because surface effects are important. Mixing simply by diffusion is impossible because of the laminar flow. Another dimensionless number called Peclet number P_e (Eq.2), is the

$$P_e = \frac{UL}{D} \quad (2)$$

ratio between convection and diffusion effect. At the biosensor surface, the reaction consumes analytes but

$$D_a = \frac{\tau_M}{\tau_C} = \frac{k_a R_T L}{D} \quad (3)$$

their transport is limited by diffusive effects. In this case, the Damköhler number D_a brings valuable information, by comparing these two effects.

In the micromixing context, these both last dimensionless numbers (P_e and D_a) are relevant and must be optimized for a given device at the same time. Therefore, the Damköhler number is not the same for hybridization of 19 base single stranded DNA and for binding biotin to immobilized streptavidin. In reference [7], Ducloux et al. showed that for ss-DNA the reaction will not significantly benefit from micromixing, but will be enhanced for binding biotin and streptavidin. The nature of molecules inside the droplet influences the microstreaming. To have an efficient mixing, the Damköhler number must be less than 1. If it is superior to 1, the microstreaming must be enhanced by increasing the Peclet number. Ducloux et al. [7] discussed these different conditions to enhance the ability of a biosensor to detect biomolecules with high sensitivity.

In our experiment, micromixing induced by EWOD allows to increase the flow velocity inside the droplet and thus the Peclet number.

2.2.2 EWOD-induced micromixing

To enhance micromixing and decrease mass transport in a droplet, EWOD represents a good alternative. The micromixing is created by droplet oscillations produced by EW. Some papers investigated the micromixing effect by EW [9] and hydrodynamic flows inside a droplet in EW [10]. They showed that hydrodynamic flows inside a droplet depend on AC frequency applied and the droplet conductivity. However, they used a device where the applied voltage is made through a needle. According to Malk and co-workers [4], the needle disturbs the droplet's flows. They developed an EWOD device using coplanar electrodes similar to a lab-on-chip configuration. Rotating flows inside the droplet are studied by applying AC voltage. These flows induced by vortices have a quadripolar shape and their main velocity is around 1mm/s which is higher than the droplet flow velocity in [4]. These different papers describe [4,9,10] also an interesting effect: increasing frequency drives a change in the vortices position which tends to bring biomolecules closer to the triple contact line.

2.2.3 EWOD-SPR experiments setup

Each electrode on the device is controlled by a LabView home-made program through an electric relay card which switches the applied voltage by a signal generator (33120A, Hewlett-Packard) 0-12V output at 1kHz, coupled to a 50dBm high-voltage amplifier (2340, Tegam). Electrode/counter electrode distance is round 300 μ m for a 2 μ L droplet. The applied voltage is varied from 68 to 140V_{TRMS} depending on the nature of the liquid (the applied voltage to displace biomolecules droplet is higher). The droplet velocity can be modulated between 1.7 to 141mm/s thanks to the switching time from one electrode to another (1 to 0.012s).

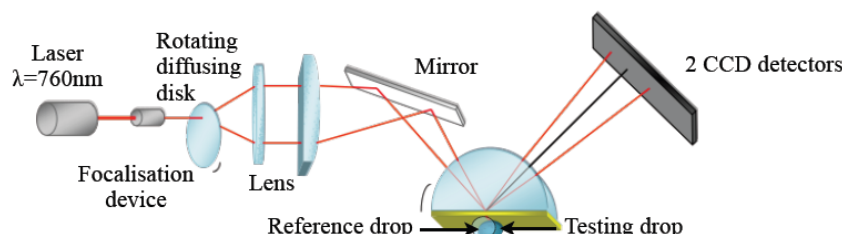


Figure 3: SPR device for two droplets biosensing

Concerning the SPR device, after passing through a focalization device, a lens and a mirror (Newport, Thorlabs and Edmund), an incident laser beam (CR-690, Coherent, $\lambda=760$ nm) interacts with the droplets. The reflected laser beam is detected by two CCD (Charge-coupled device) detectors (ILX554B, Sony). A device scheme is shown in Fig.3. Output CCD detectors signals are recovered by another LabView home-made program through an oscilloscope (TDS3052, Tektronix). Here, the Kretschmann's configuration is used for SPR creation, the wavelength is fixed and SPR excitation conditions are obtained by angular adjustment of the prism. It is to be noted that both signals have not the same initial base line because the measurements are realized in relative values. Furthermore, a variation of 10 points in our display corresponds to a resonant angle variation of 0.05°.

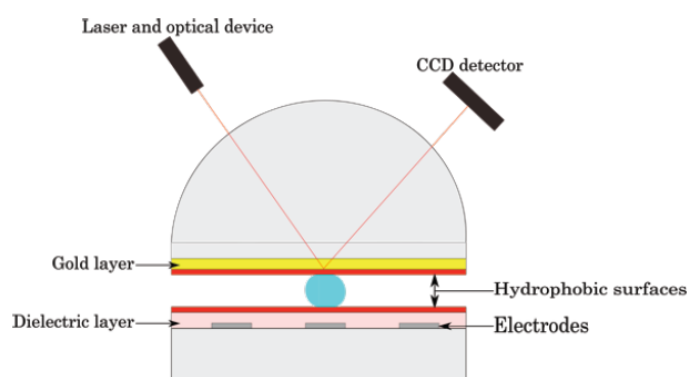


Figure 4: EWOD-SPR bench

To validate the system, two 2 μ L droplets of deionized water have been displaced by EWOD actuation in air medium on the SPR biosensor (see Fig.4). EWOD displacement is carried out in the following way: the two droplets are successively put on the SPR biosensor and removed: this cycle is operated up to 5 times with a switching time equal to 1s thus a droplet velocity to 1.7mm/s. The SPR signals of the droplets on the computer display rise and fall always at the same level immediately at the droplets displacement.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A micromixing experiment is carried out using a reference droplet and a test droplet. Two 2 μ L droplets containing 1 μ g/mL of β 2 microglobulin (AbD Serotec) have been displaced on the biosensor. These two droplets are put into contact, at the same time, with the same volume of deionized water droplets by EWOD. The micromixing induced by natural diffusion is recorded for the reference droplet while a EWOD-enhanced microstirring is created in the test droplet by application of a squared signal at 1 kHz on a single electrode placed above the SPR sensor.

In figure 5, the two SPR responses of the micromixing are displayed. The natural diffusion SPR response (reference droplet) is represented by the black curve and the EWOD-induced micromixing SPR response by the red curve. For the black curve, an increasing of 102 points of the SPR signal is observed, corresponding to the coalescence of the droplets. Then the SPR signal slowly decreases to a constant value being 54 points higher than the initial signal. The difference between the initial and the final SPR signal is attributed to the protein adsorption on the biosensor modifying the resonant angle. A similar behavior is observed for the EWOD-induced micromixing SPR response (red curve). After a maximum value corresponding to an increase of 369 points, the signal decreases to a value of 55 points higher than the initial signal, similar to the one obtains by diffusion. Furthermore to determine the mixing speeds, we have

$$V_{66i} = V_{Pi} - \frac{66}{100}(V_{Pi} - V_{Fi}) \quad (4)$$

calculated the time constant τ for each curve according to Eq.4 and Eq.5. It corresponds to the time to reach 66% of the difference between the maximum starting value, V_{Pi} and the final one, V_{Fi} . The constant time

$$\tau_{Mi} = \tau_{66i} - \tau_{Pi} \quad (5)$$

obtained for the passive mixing τ_{Mb} is equal to 21s while for the EWOD induced one τ_{Mr} , we obtain 7s.

From these results, we can draw the following conclusion:

- Whatever the mixing technique (passive or active), the final concentration of adsorbed proteins is the same showing that same amount of protein has been absorbed on the surface.
- The maximum value of the SPR signal is more than 3 times higher with active mixing than passive mixing (369 points against 102 points). This is ascribed to the EWOD induced effect, already observed by some other groups, among them Malk et al.[4]. This effect leads to a protein concentration near the triple contact line, at the vicinity of the biosensor surface. At this location, the SPR signal is very sensitive to the modification of the optical properties of the liquid because of the depth penetration of the evanescent wave is about half the laser wavelength ($\lambda/2=380\text{nm}$).
- Using EWOD mixing, the time is decreased by a factor 3 as compared to the diffusive one. The EWOD effect induces a flow creating a recirculation inside the droplet, due to the viscous friction driving the triple contact line motion. In fact, AC frequency used in our case is quite low (1 kHz) so there is no presence of an electric field inside the droplet [10]. Furthermore, the EWOD-induced flow is very sensitive to the viscosity of the droplet [9] and the applied voltage frequency [4,10].

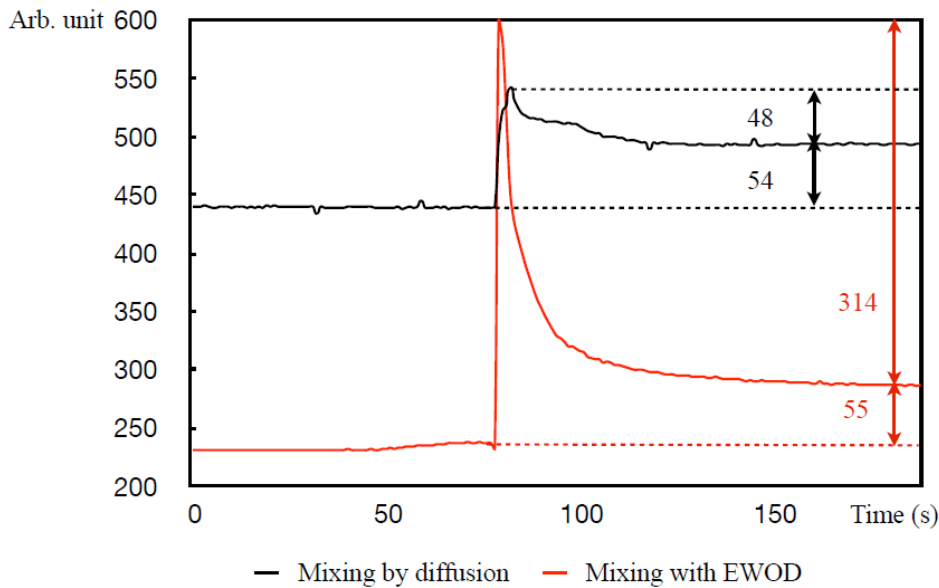


Figure 5: Micromixing SPR response

4. CONCLUSION

After a first validation of the device, two micromixing experiments are realized. The SPR response shows that EW micromixing is an efficient technique for real-time and label-free detection of protein adsorption by decreasing the mixing time by a factor 3. It is to be noted that there is no specific treatment of the Cytop® surface. Indeed, such a surface treatment (functionalization) will lead to specific interactions between ligands on the surface and analytes in solution (droplet). Furthermore, the results confirm a previous theoretical study of Ducloux et al. [4] on droplet microstirring effect on biodetection.

Several ways must be exploited to: (i) reach a high level of sensitivity with very low concentrations of biomolecules, (ii) have specificity by developing gold surface inside apertures made in the hydrophobic layer and (iii) understand the effect of the device design and biomolecules' size on the nature of the EWOD-induced flows inside the droplet.

NOMENCLATURE

D: Diffusion coefficient (Eq.2 and 3)	U: Flow velocity (Eq.1 and 2)
D _a : Damköhler number (Eq.3)	V _{pi} : i curve peak value (Eq.4), i=b (black curve) or r (red curve)
DNA: Desoxyribonucleic acid	V _{fi} : i curve final value (Eq.4)
EW: Electrowetting	V _{66i} : i curve 66% value (Eq.4)
EWOD: Electrowetting-on-dielectric	λ: laser wavelength
k _a : Association rate (Eq.3)	ν: Kinetic viscosity (Eq.1)
L: System main dimension (Eq.1, 2 and 3)	τ _c : Reaction time (Eq.3)
P _e : Peclet number (Eq.2)	τ _M : Diffusion time (Eq.3)
Re: Reynolds number (Eq.1)	τ _{66i} : i curve time corresponding to V _{66i} (Eq.5)
R _r : Ligant concentration (Eq.3)	τ _{Mi} : i curve mixing time (Eq.5)
SPR: Surface plasmon resonance	τ _{pi} : i curve peak time (Eq.5)

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank A.-S. Drucbert from IFR114 IMPRT for providing the biomolecules investigated in this work. We also acknowledge the European Regional Development Fund for financial support under the INTERREG IVa FW1.1.9 "PLASMOBIO" project.

REFERENCES AND CITATIONS

- [1] Kim J., Junkin M., Kim D.H., Kwon S., Shin Y.S., Wong P.K., & Gale B.K. (2009). Applications, Techniques, and Microfluidic Interfacing for Nanoscale Biosensing, *Microfluidics and Nanofluidics*, **7**, 149-67.
- [2] Squires T.M., Messinger R.J., & Manalis S.R. (2008), Making It Stick: Convection, Reaction and Diffusion in Surface-Based Biosensors, *Nature Biotechnology*, **26**, 417-26.
- [3] Mugele F., & Baret J.-C. (2005), Electrowetting: From Basics to Applications, *Journal of Physics-Condensed Matter*, **17**, R705-R74.
- [4] Malk R., Fouillet Y., & Davoust L. (2010), Rotating Flow within a Droplet Actuated with Ac Ewod, *Sensors and Actuators B-Chemical*, doi:10.1016/j.snb.2009.12.066
- [5] Malic L., Brassard D., Veres T., & Tabrizian M. (2010), Integration and Detection of Biochemical Assays in Digital Microfluidic Loc Devices, *Lab on a Chip*, **10**, 418-31.
- [6] Malic L., Veres T., & Tabrizian M. (2009), Biochip Functionalization Using Electrowetting-on-Dielectric Digital Microfluidics for Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization, *Biosensors & Bioelectronics*, **24**, 2218-24.
- [7] Ducloux O., Galopin E., Zoueshtiagh F., Merlen A., & Thomy V. (2010), Enhancement of Biosensing Performance in a Droplet-Based Bioreactor by in Situ Microstreaming, *Biomechanics*, **4**, 011102.
- [8] Squires T.M., & Quake S.R. (2005), Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale, *Reviews of Modern Physics*, **77**, 977-1026.
- [9] Mugele F., Baret J.-C., & Steinhauser D. (2006), Microfluidic Mixing through Electrowetting-Induced Droplet Oscillations, *Applied Physics Letters*, **88**, 204106.
- [10] Ko S.H., Lee H., & Kang K.H. (2008), Hydrodynamic Flows in Electrowetting, *Langmuir*, **24**, 1094-101.

EWOD-based micromixing for fast protein sensing using SPR

G. Perry^{1,2}, N. Maalouli^{2,3}, B. Pinchemel³, M. Bouazaoui³, V. Thomy¹, R. Boukherroub²

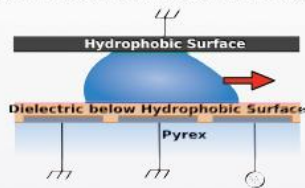
Université Lille-Nord de France
¹IEMN, UMR CNRS 8520, Avenue Poincaré, BP60069, 59652 Villeneuve d'Ascq
²IRI, USR CNRS 3078, Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley, BP70478, 59658 Villeneuve d'Ascq
³PHLAM, UMR CNRS 8523, Bat. P5, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq
 Contact: gull.perry@univ-lille.fr



In biomedical research, tools are required to manipulate low concentration of analytes, real time monitoring and highly sensitive label-free detection schemes. Our aim is to propose a new biosensor combining Surface plasmon resonance (SPR) sensor and Electrowetting-on-dielectric (EWOD) device for controlled droplet actuation and micromixing enhancement.

Electrowetting-On-Dielectric (EWOD) Device: Droplet microfluidic for controlled actuation and mixing

Digital microfluidic device for basic microfluidic operations
 EWOD actuation creates flow vortices inside a droplet [1]. The vortices position and flows' nature depend on AC voltage frequency applied on EWOD device and allow the homogenization of the micromixing with recirculation flows.

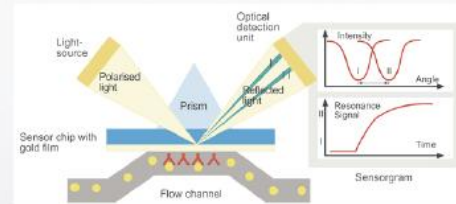


With fluoropolymer hydrophobic surfaces:
 $V_{act}=80V$, $f=1kHz$, $v_{drop}=55mm/s$

Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor: Real time monitoring of mixing and biological interactions

At the resonance angle, evanescent field is created at the surface of thin metal film. Reactions occurring at the metal surface produce changes in refractive index.

In available commercial devices as Biacore™, continuous microfluidic system is used with low Reynolds number implying laminar flows. So, mass transport is limited by diffusion.



In the droplet, mass transport is enhanced by recirculation flows

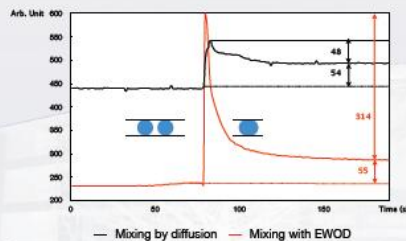
Is limited by mass transport

EWOD micromixing conditions:
 Squared signal at $f=1kHz$
 Applied voltage $V_{act}=100V$

Two droplets micromixing:
 One of desionized water
 One containing $\beta 2$ ($1\mu g/mL$)

Surface / Liquid Interactions

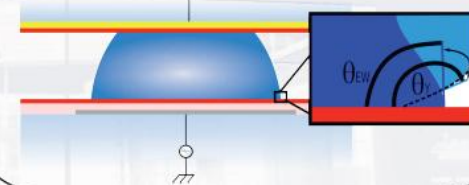
Interaction between droplets' micromixing and surface monitoring by SPR



Mass Transport and Mixing Effect

Micromixing by two effects in analyte droplet

Flows due to wetting and dewetting
 Flows due to the AC voltage



Conclusion: The use of EWOD actuator improves micromixing by creation of recirculation flows inside the droplet, which is already demonstrated for surface acoustic waves[2]. Besides the SPR sensor allows a real time monitoring of micromixing at the sensor surface.

References: [1] Malik et al., Sensors and Actuators B, doi:10.1016/j.snb.2009.12.066
 [2] Ducloux et al., Biomicrofluidics, Vol.4 (2010), 011102

Acknowledgement: Authors thank European Regional Development Fund for their part support under the INTERREG IVa FW1.1.9 "PLASMOBIO" project

