



HAL
open science

Les nanoparticules d'or comme agents de nanostructuration et de transduction pour les biocapteurs. Application à l'immunodétection du diclofénac et de l'entérotoxine A de *S. aureus*

Maroua Ben Haddada

► **To cite this version:**

Maroua Ben Haddada. Les nanoparticules d'or comme agents de nanostructuration et de transduction pour les biocapteurs. Application à l'immunodétection du diclofénac et de l'entérotoxine A de *S. aureus*. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066625 . tel-01901562

HAL Id: tel-01901562

<https://theses.hal.science/tel-01901562>

Submitted on 23 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
Physique et Chimie des Matériaux (ED 397)

Présentée par
Maroua BEN HADDADA

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Les nanoparticules d'or comme agents de nanostructuration et de transduction pour les biocapteurs. Application à l'immunodétection du diclofénac et de l'entérotoxine A de *S. aureus*

Soutenance prévue le 21 octobre 2016

Devant le jury composé de :

Mme. Souhir BOUJDAY	Maître de Conférences Université Pierre et Marie Curie, Paris	Directrice de thèse
Mme. Michèle SALMAIN	Directrice de recherches Université Pierre et Marie Curie, Paris	Co-directrice de thèse
Mme. Mona TREGUER-DELAPIERRE	Maître de Conférences Université de Bordeaux	Rapporteur
M. Marc LAMY de la CHAPPELLE	Professeur des Universités Université Paris 13	Rapporteur
Mme. Hynd REMITA	Directrice de recherches Université Paris Sud, Orsay	Examineur
M. Bernold HASENKNOPF	Professeur des Universités Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur

« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas »

Léonard De Vinci

Remerciements

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprentie-chercheuse ». Je tiens à m'excuser par avance auprès de toutes les personnes que j'aurais pu oublier de citer dans ces remerciements, et qu'elles reçoivent ici toute ma gratitude et ma sympathie.

Ce travail a été réalisé avec le soutien de la Région Ile de France et le DIM Analytics que je tiens à remercier pour le financement qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans des conditions matérielles confortables.

Ma thèse de Doctorat a été réalisée au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS) et l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM) de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC).

Je remercie à ce titre Madame Claire-Marie Pradier, directrice du LRS jusqu'en septembre 2014, et Madame Hélène Pernot, qui lui a succédé à ce poste, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je remercie également Madame Anne Vessières-Jaouen et Monsieur Gérard Jaouen de m'avoir accueillie au sein de l'équipe ChemBio de l'IPCM. Je tiens aussi à remercier Monsieur Bo Liedberg, directeur du laboratoire CBSS de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant mes deux séjours à Singapour.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été co-dirigés par Madame Souhir Boujday et Madame Michèle Salmain. Je leur adresse à tous les deux mes chaleureux remerciements. Je leur remercie pour leur disponibilité dont elles ont fait preuve à mon égard, l'expertise qu'elles m'ont transmise, mais aussi la grande confiance qu'elles m'ont témoignée et la liberté qu'elles ont su me laisser ont fait de ces trois années de thèse une expérience extrêmement formatrice et enrichissante. J'aimerais également leur dire à quel point j'ai apprécié leur respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je leur ai adressés. Elles ont également apporté une contribution décisive à la rédaction de ce manuscrit, et dont je leur suis extrêmement reconnaissante. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. Si elles m'ont formée à la recherche, elles m'ont également aidée à grandir au sens humain du terme, et je les en remercie.

Je remercie sincèrement Madame Mona Tréguer-Delapierre et Monsieur Marc Lamy de la Chapelle de m'avoir fait honneur d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que Madame Hynd

Remita et Monsieur Bernold Hasenknopf pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres des deux laboratoires pour leur aide au quotidien. Je tiens tout particulièrement à remercier Sandra Casale pour la partie microscopie (s), et Christophe Méthivier et Vincent Humblot que j'ai sollicités pour la spectroscopie XPS. Je remercie Annie Mettendorff, Sabine Meme et Sonia M'barek pour leur gentillesse et leur bienveillance à mon égard, en plus de tout ce qu'elles ont fait pour moi sur le plan administratif. Je remercie aussi Nathalie Fischer-Durand pour les discussions conviviales lors des pauses-déjeuner et thé, pour sa sympathie et pour son efficacité.

Ces années de thèse ont par ailleurs été l'occasion pour moi d'exercer en tant qu'enseignante au sein des parcours de formation à l'UPMC. Je remercie l'ensemble du personnel de l'université que j'ai été amené à côtoyer à ce titre, et avec qui mes relations furent aussi cordiales que constructives. J'en profite également pour remercier l'IFD (Institut de formation doctorale) pour la formation octroyée pendant ces 3 années.

J'associe à ces remerciements, doctorants, post-doc et stagiaires passés et présents, notamment Camella, Claire, Tasnim, Maria, Manel, Chyrine, Antoine, Olfa, Mariem, Mohammed Dali, Océane, Achraf, M. Nour, Noémie, Néné et Lu. Un énorme merci à tous ceux avec qui j'ai tissé des liens durant ces 4 années (stage et thèse), qui ont partagé mon bureau (ou pas d'ailleurs !). Ces rencontres étaient pour moi d'un plus incontournable. Sans doute je n'oublierai pas mes chers voisins de bureau Jane, Sarah, Marc et Cédric, avec qui j'ai passé des moments très agréables. Merci Chocolat-Vanille pour l'amitié ainsi que le partage de bonnes et/ou mauvaises humeurs, pour toutes les discussions instructives allant des tortues aux problèmes capillaires, merci d'avoir crû à mes projets d'avenir sans que je crois à vos talents de chant et dance. Je remercie aussi Marie, Sarah.D et C. Junior qui ont souvent rendu notre bureau vivant et souriant.

J'adresse un énorme merci à ma famille pour leur soutien indéfectible et pour TOUT l'amour qu'ils me portent ... Sans cette petite famille je n'en serais sûrement pas arrivée là ! Merci aussi à meilleures amies : Sarah bh et Yosra pour leurs soutien au quotidien.

Je ne pourrais finir cette page de remerciements sans citer mon homme Slim, celui qui est devenue mon mari pendant la thèse, combien il a été important dans ce travail. Son écoute, sa patience et son affection m'ont permis de réaliser sereinement la thèse alors que le laboratoire était devenu ma seconde maison. Il a toujours su m'encourager quand le moral était moins bon,

et ferai tout pour être l'épaule qu'il a été durant ces trois dernières années. Les mots ne suffisent pas pour lui exprimer ma profonde gratitude.... Merci ... Merci d'être là pour moi ...

Merci encore à toutes et à tous, et à présent bonne lecture...

À mes parents qui m'ont appris à aller de l'avant...

À mon mari qui me donne l'espoir d'aller de l'avant...

Table des matières

Introduction générale	3
Chapitre 1 : Contexte et étude bibliographique	9
1. Les biocapteurs	11
1.1. Introduction et historique	11
1.2. Généralités	12
1.2.1. Définition et principe de fonctionnement	12
1.2.2. Familles de biocapteurs.....	13
1.3. Les immunocapteurs	14
1.3.1. L'anticorps	15
1.3.2. L'antigène.....	16
1.3.3. L'interaction anticorps/antigène	17
1.3.4. Formats de détection.....	17
1.4. Quelques techniques de transduction pour les immunocapteurs	18
1.4.1. Transducteurs électrochimiques	18
1.4.2. Transducteurs optiques.....	19
1.4.3. Transducteurs piézoélectriques.....	20
1.5. Axes d'amélioration des immunocapteurs piézoélectriques	23
1.5.1. Amplification de la masse déposée	24
1.5.2. Optimisation de la couche de capture.....	25
1.6. Bilan : vers la construction d'un immunocapteur performant	28
2. Les nanoparticules d'or	29
2.1. Introduction et historique	29
2.2. Etat de l'art sur les voies de synthèse des nanoparticules d'or.....	31
2.2.1. Méthode de Turkevich : réduction et stabilisation par les citrates	32
2.2.2. La méthode Slot : réduction par le citrate en présence d'acide tannique.....	33
2.2.3. Méthode de Brust-Schiffrin : synthèse en deux phases et stabilisation par les thiols	33
2.2.4. Stabilisation par d'autres ligands.....	34
2.2.5. Nucléation/ croissance.....	34
2.3. Propriétés optiques	36
2.3.1. L'effet de confinement électronique	36

2.3.2. LSPR : résonance de plasmon de surface localisée	37
2.3.3. Paramètres modifiant la réponse optique des nanoparticules.....	38
2.4. Bilan : l'immense potentiel des nanoparticules d'or	42
3. Les nanoparticules d'or pour les biocapteurs	43
3.1. Introduction	43
3.2. Les GNPs comme marqueurs du biorécepteur.....	45
3.3. Les GNPs comme agents de nanostructuration du transducteur	46
3.4. Biocapteurs colorimétriques	49
3.5. Bilan : les nanoparticules d'or, nouveau pan des biocapteurs.....	52
Références bibliographiques	54
Chapitre 2 : Méthodes et techniques d'analyse.....	67
1. Techniques de caractérisation et de transduction	69
1.1. Techniques de caractérisation.....	69
1.1.1. Mesure de l'Angle de contact	69
1.1.2. PM-IRRAS	70
1.1.3. ATR.....	73
1.1.4. XPS.....	73
1.1.5. MET	75
1.1.6. MEB	75
1.2. Techniques de transduction	76
1.2.1. QCM-D.....	76
1.2.2. LSPR	77
2. Protocoles expérimentaux	79
2.1. Préparation des nanoparticules d'or.....	79
2.1.1. Réactifs utilisés	79
2.1.2. Synthèse et caractérisation des GNPs par la voie citrate	80
2.1.3. Synthèse et caractérisation des GNPs par la voie citrate/acide tannique	81
2.2. Elaboration des surfaces nanostructurées.....	83
2.2.1. Réactifs utilisés	83
2.2.2. Pré-fonctionnalisation des surfaces	84
2.2.3. Dépôt des GNPs	87
2.2.4. Post-fonctionnalisation des GNPs.....	87
2.3. Construction et tests des immunocapteurs piezoélectriques.....	88

2.3.1. Construction de l'immunocapteur du diclofénac.....	88
2.3.2. Construction de l'immunocapteur anti-SEA	89
2.4. Bio-fonctionnalisation des GNPs.....	90
2.4.1. Réactifs utilisés	90
2.4.2. Conjugaison des GNPs.....	90
2.4.3. Caractérisation et quantification.....	91
Références bibliographiques	92
Chapitre 3 : Immobilisation des nanoparticules d'or sur des surfaces planes	95
Introduction	97
1. Fonctionnalisation des surfaces de silicium.....	100
1.1. Introduction	100
1.2. Sélection des SAMs	102
1.3. Assemblage des couches et caractérisation.....	103
1.3.1. Mesure de l'angle de contact.....	104
1.3.2. Analyse par ATR-IR.....	105
1.3.3. Caractérisation par XPS	106
1.4. Conclusion	108
Bilan	109
2. Fonctionnalisation des surfaces d'or	110
2.1. Introduction	110
2.2. Sélection des SAMs	111
2.3. Assemblage des couches et caractérisation.....	112
2.3.1. Mesure de l'angle de contact.....	112
2.3.2. Analyse par PM-IRRAS.....	113
2.4. Discussion	115
Bilan	116
3. Greffage des nanoparticules d'or	117
3.1. Introduction	117
3.2. Dépôt des GNPs sous agitation.....	118
3.3. Dépôt des GNPs sous sonication.....	119
3.3.1. Caractérisation par MEB.....	119
3.3.2. Dénombrement des particules et état d'agrégation	120
3.4. Dépôt des GNPs sous flux.....	122

3.4.1. Caractérisation par QCM-D	123
3.4.2. Caractérisation par MEB.....	125
3.4.3. Dénombrement des particules	126
3.5. Discussion	128
Bilan	129
4. Post-fonctionnalisation des nanoparticules d'or immobilisées	130
4.1. Introduction	130
4.2. Post-fonctionnalisation par la CEA.....	130
4.2.1. Caractérisation par MEB.....	131
4.2.2. Dénombrement des particules et état d'agrégation	131
4.3. Post-fonctionnalisation par le DAPEG.....	132
4.3.1. Caractérisation par MEB.....	132
4.3.2. Dénombrement des particules et état d'agrégation	133
4.4. Discussion	134
Bilan	135
Conclusion	136
Références bibliographiques.....	138
Chapitre 4 : Elaboration d'immunocapteurs piézoélectriques sur des surfaces nanostructurées pour la détection de cibles d'intérêt	147
Introduction	149
1. Elaboration d'immunocapteurs nanostructurés pour la détection du diclofénac.	152
1.1. Principe de détection.....	152
1.2. Greffage et caractérisation du diclofénac	153
1.3. Suivi de la reconnaissance par l'anti-DCF par QCM.....	155
1.4. Régénération stabilité de la couche de nanoparticules	158
1.5. Discussion	160
2. Immunocapteur pour la détection de la SEA	162
2.1. Présentation des étapes d'élaboration de l'immunocapteur.....	162
2.2. Immobilisation de la protéine A	163
2.3. Immobilisation de l'anticorps anti-SEA.....	167
2.4. Réponse des biocapteurs	168
2.4.1. Détection en format direct.....	168

2.4.2. Amplification par le format sandwich	170
2.5. Discussion	171
Conclusion	173
Références bibliographiques.....	175
Chapitre 5 : Biocapteurs plasmoniques pour la détection de la SEA.....	179
Avant-propos	181
INTRODUCTION	184
EXPERIMENTAL SECTION.....	185
RESULTS AND DISCUSSION	187
CONCLUSIONS	194
REFERENCES.....	195
Supplementary material	197
REFERENCES.....	201
Conclusion générale et perspectives.....	203
Annexes	209
Publications	219

Liste des abréviations

Ab : Anticorps
AFM : Microscopie à Force Atomique
Ag : Antigène
APTES : Aminopropyltriéthoxysilane
APTES : (3-Aminopropyl)triéthoxysilane
ATR : Réflexion totale atténuée
BSA : Albumine de sérum bovin
CEA : Cystéamine
CTAB : Hexadecyltriméthylammonium bromide
Da : Daltons
DAPEG : Poly(éthylène glycol) diamine
DCF : Diclofénac
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DMF : N, N-Diméthylformamide
DRX : Diffraction des rayons X
EDC : N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride
EF : Energie de Fermi
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Fc : Fragment constant
GNPs : Nanoparticules d'or
GOPTS : (3-Glycidylxypropyl)triméthoxysilane
IgG : Immunoglobuline G
LOD : Limite de détection
LSPR : Résonance plasmon de surface localisée
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique à transmission
MIP : Polymère à empreinte moléculaire
MUA : Acide mercapto-undécanoïque
MUA : acide 11-mercaptoundécanoïque
NHS : N-Hydroxysuccinimide
PBS : Tampon phosphate salin
PDITC : *p*-Phénylène diisothiocyanate
PM-IRRAS : Spectroscopie IR de réflexion-absorption par modulation de la polarisation
PrA : Protéine A
QCM-D : Microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation
Réf. : Référence
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
SAM : Monocouche auto-assemblée
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SEA : Entérotoxine A staphylococcale
SEB : Entérotoxine B staphylococcale
SERS : Raman exalté de surface
SERS : Spectroscopie Raman exaltée de surface
SPP : Surface plasmon polaritons
SPR : Résonance plasmon de surface
TOAB : Bromure de tétraoctylammonium
XPS : Spectrométrie de photoélectrons X

Introduction générale

De nombreux agents chimiques et biologiques risquant de porter atteinte à notre santé sont présents dans notre environnement (eau, air, aliments ...). Nous sommes face donc à une nécessité pressante de surveiller les matrices alimentaires, environnementales, particulièrement les eaux, les sols et l'air. La possibilité de détecter des contaminants dans des matrices variées dépend de la sensibilité des méthodes analytiques disponibles. Ainsi, l'évaluation du risque associé aux contaminants peut varier de plusieurs ordres de grandeur. Dans la plupart des cas, le défi principal est de déceler ces molécules polluantes ou toxiques dès les très faibles teneurs en un minimum de temps et avec une grande spécificité.

Les instruments classiques d'analyse utilisés pour la détection d'une espèce (bio)chimique sont généralement coûteux, volumineux et souvent complexes à mettre en œuvre. De plus, les phases de préparation des échantillons, d'incubation, et d'exploitation des résultats augmentent souvent très fortement la durée totale d'analyse. Les biocapteurs constituent une alternative efficace et économique par rapport aux instruments conventionnels d'analyse. Ces dispositifs reposent sur l'association d'un élément transducteur qui permet la lecture du signal et d'un récepteur qui assure la reconnaissance spécifique d'une cible dans un milieu complexe. L'intégration des anticorps dans les biocapteurs en tant que récepteurs moléculaires (i.e. les immunocapteurs) contribue à raccourcir la durée d'analyse et à augmenter la sensibilité et la spécificité de détection du fait de l'affinité inégalable qu'ont ces molécules pour leurs cibles. Cependant, l'activité des anticorps est étroitement liée à leur structure qui doit être donc préservée lors de leur immobilisation et nécessite un contrôle minutieux des conditions d'élaboration des immunocapteurs. Ainsi, d'importants efforts restent encore à réaliser pour l'obtention de biocapteurs robustes, sensibles et utilisables en routine.

La nanostructuration de la surface sensible des biocapteurs par des nanoparticules d'or (GNPs) est une piste très prometteuse pour améliorer leur sensibilité. En effet, la topographie qui en résulte induit une augmentation de la surface sensible permettant d'immobiliser un plus grand nombre de ligands de capture, mais également une meilleure orientation de ces ligands qui les expose et préserve leur accessibilité les rendant plus efficaces dans le processus de reconnaissance de la cible.

De plus, en s'appuyant sur les propriétés optiques singulières des nanoparticules d'or, en particulier sur la résonance de plasmon de surface localisée (LSPR), sensible à leur

environnement local, il est possible de détecter des interactions biomoléculaires par mesure de la variation de la position de bande LSPR. Cette variation peut être aisément quantifiée par mesure du spectre d'extinction des GNPs avec un équipement standard de laboratoire (spectrophotomètre UV-visible) voire, dans certains cas, à l'œil nu.

Quelque soit la stratégie envisagée, les nanoparticules d'or doivent être synthétisées, stabilisées contre l'agrégation, éventuellement immobilisées sur des surfaces et fonctionnalisées pour atteindre les objectifs de performance spécifiques.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est la conception d'immunocapteurs intégrant des nanoparticules d'or destinés à la détection d'une grande variété de cibles avec l'idée d'étudier l'apport potentiel des GNPs pour les performances analytiques de ces systèmes en termes de gamme de dosage et de limite de détection. Au-delà du besoin d'améliorer les performances analytiques des biocapteurs, sur un plan plus fondamental, la compréhension au niveau moléculaire des multiples étapes nécessaires à leur élaboration permettrait de généraliser les stratégies adoptées à d'autres applications impliquant des nanoparticules d'or. Nos travaux se sont focalisés sur la détection de deux types de cibles différant par leur taille et leur nature : le diclofénac, un polluant pharmaceutique de faible poids moléculaire et l'entérotoxine A, une cible protéique produite par la bactérie *S. aureus* (SEA).

Dans cette étude, les nanoparticules d'or ont été utilisées en tant qu'agents de nanostructuration et également en tant qu'agents de transduction pour les immunocapteurs. Ainsi, deux stratégies (schématisées dans la Figure 1) ont été mises en œuvre :

- La nanostructuration : Cette première voie est géométrique et consiste à structurer la surface du capteur à l'échelle nanométrique par immobilisation des nanoparticules d'or afin d'augmenter la surface spécifique ainsi que l'accessibilité des biorécepteurs. Dans cette partie, le contrôle de la densité et de la dispersion des nanoparticules, est un enjeu primordial puisqu'il est nécessaire de disposer de couches reproductibles et stables vis-à-vis des multiples étapes de préparation. Cela requiert une fonctionnalisation préalable du substrat, dans notre cas des surfaces d'or et des surfaces de silicium oxydé, et également une post-fonctionnalisation des nanoparticules. Chacune de ces étapes élémentaires a été caractérisée par des techniques d'analyse de surface, jusqu'à l'élaboration des immunocapteurs nanostructurés afin de comprendre les mécanismes mis en jeu et de définir les conditions optimales de greffage des nanoparticules. Enfin, la performance des

biocapteurs a été évaluée et comparée à celle atteinte avec des immunocapteurs plans (sans nanoparticules d'or) pour la détection de la SEA et du diclofénac.

- La transduction : Dans la seconde voie la transduction est assurée par la position de la bande LSPR des nanoparticules. Ce format requiert également l'immobilisation des anticorps sur les surfaces des nanoparticules ainsi que le contrôle du mode de liaison et de la stabilité des colloïdes formés. Elle a été appliquée à la détection de SEA.

Deux formats différents de dosage seront développés. La détection sera suivie par le changement de la position de la bande LSPR dans le spectre d'extinction UV-Visible résultant du changement d'indice de réfraction local induit par la réaction immunologique entre la SEA (libre, dans le format direct / immobilisée, dans le format compétitif) et l'anti-SEA-GNPs.

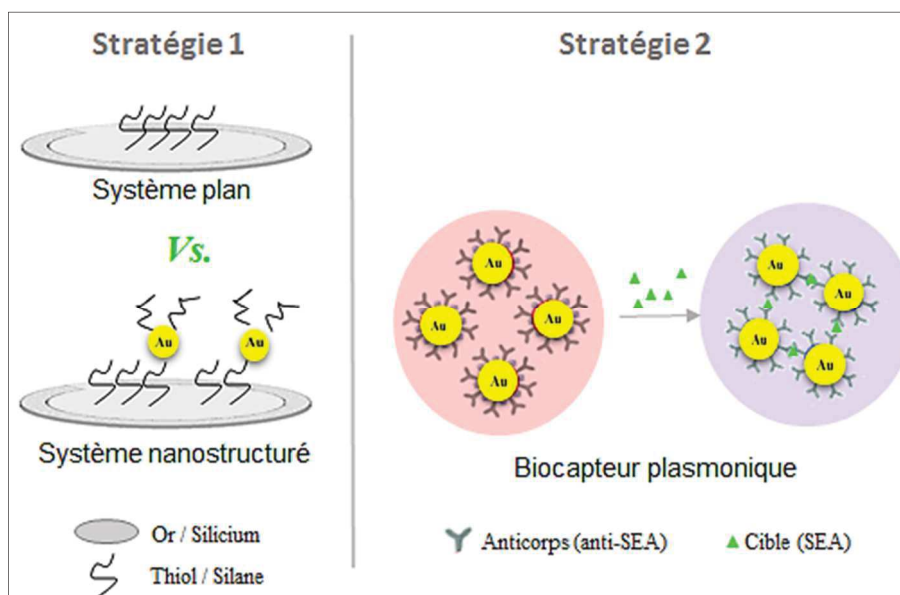


Figure 1 : Représentation générale des deux stratégies de travail.

Ces deux stratégies ont été employées séparément avec comme objectif l'amélioration de la limite de détection des deux cibles étudiées. Nous avons utilisé respectivement la microbalance à cristal de quartz et la spectroscopie d'absorption UV-Visible comme méthodes de transduction.

Ce manuscrit comporte cinq chapitres. Le **premier** est dédié à une étude bibliographique des biocapteurs et des nanoparticules d'or. Il résume l'état de l'art dans le domaine des biocapteurs nanostructurés. Le **deuxième** chapitre porte sur les protocoles expérimentaux et les techniques de caractérisation et de transduction utilisées dans cette étude. Il comporte également l'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés dans les chapitres suivants.

Dans le **chapitre 3**, l'immobilisation des nanoparticules d'or sur des surfaces planes est optimisée avec une approche analytique à l'échelle moléculaire. Il se décompose en trois grands axes : la fonctionnalisation des surfaces d'or et de silicium par des thiols et des silanes pour former la couche d'accroche des nanoparticules, l'immobilisation des nanoparticules sur ces couches et enfin, la post-fonctionnalisation des nanoparticules immobilisées. Les surfaces obtenues sont ensuite utilisées dans le **chapitre 4** pour la construction des immunocapteurs piézoélectriques nanostructurés et la détection des deux cibles. Il se décompose en deux parties correspondant aux deux cibles sélectionnées à savoir le diclofénac et la SEA. Dans le dernier chapitre, le **chapitre 5** la deuxième stratégie c'est-à-dire à l'élaboration d'un biocapteur plasmonique en phase homogène est mise en œuvre pour la détection en une étape de la SEA.

Enfin, le manuscrit se termine par l'ensemble des conclusions et perspectives qui découlent de ce travail de thèse.

Chapitre 1 : Contexte et étude bibliographique

Partie 1

Les biocapteurs

Cette partie est dédiée à l'état de l'art sur les biocapteurs en général et sur les immunocapteurs piézoélectriques en particulier, afin de mettre en évidence les axes d'amélioration à explorer pour les immunocapteurs piézoélectriques.

1.1. Introduction et historique

Dans les années 70, un capteur était souvent assimilé à une sonde. Ceci est lié au premier biocapteur développé par Leyland Clark et Champ Lyons en 1950 pour mesurer la concentration de l'oxygène dissous dans le sang ¹. En 1962, ce même biocapteur, appelé **électrode de Clark**, a été adapté pour doser le glucose dans le sang ². Puis en 1967, Updike et Hicks conçurent une électrode enzymatique pour doser le glucose dans une solution biologique ³. Cette découverte est devenue une réalité commerciale en 1975 avec la compagnie Yellow Springs Instrument Company Inc (YSI) ⁴ qui l'a commercialisé. Depuis ces travaux pionniers, l'intérêt porté aux biocapteurs n'a cessé de croître avec l'introduction de dispositifs simples et miniaturisés, parfaitement adaptés à l'électronique moderne ⁵.

Le biocapteur idéal doit être facile d'utilisation, peu encombrant et peu coûteux. Les transducteurs, qui permettent de mesurer le signal, sont de natures très variées et de tailles de plus en plus réduites. Dans les années 90, le concept de laboratoires portatifs miniaturisés appelés 'Lab-on-a-chip' a émergé dans ce domaine grâce au développement de la microfluidique ⁶.

Le caractère interdisciplinaire de ce domaine de recherche, alliant biologie, chimie et physique, a fait que les biocapteurs sont utilisés dans de multiples domaines tels que le diagnostic biologique ⁷, l'analyse de matrices environnementales ⁸, le domaine agroalimentaire ⁹, l'aérospatiale, la médecine légale ou encore la lutte contre le bioterrorisme ¹⁰. Leur champ d'application s'étend ainsi du contrôle des aliments à la recherche de vie sur Mars ¹¹.

Le marché mondial des biocapteurs a évolué de 5 millions de dollars en 1985 à 13 milliards en 2010 et une prévision de 17 milliards en 2018 ^{5,12}. Cette forte expansion est notamment liée à

la demande importante des marchés de la sécurité, de la bio-défense, de la surveillance environnementale et du diagnostic médical à domicile.

Le numéro de Juin 2004 du «Scientific American» décrit "des capteurs intelligents pour interconnecter le monde" ¹³. La couverture de «The Scientist» pose la question "Les biocapteurs sont-ils encore de la science-fiction?" en se référant à des capteurs utilisables sur le terrain pour signaler rapidement un évènement bioterroriste ¹⁴.

Le succès des biocapteurs se heurte toutefois à la « jeunesse » de ce domaine de recherche qui s'appuie sur peu de recherches fondamentales. De nombreux paramètres sont encore à maîtriser pour comprendre et façonner les biocapteurs modernes, principalement les étapes de conception.

1.2. Généralités

1.2.1. Définition et principe de fonctionnement

Les biocapteurs, sont des outils analytiques permettant de reconnaître et de quantifier une cible dans un milieu complexe. Ils sont constitués d'un biorécepteur intimement lié ou intégré dans un transducteur. Le biorécepteur assure la détection spécifique et sélective de la cible et l'information biochimique qui en résulte est convertie par le transducteur en un signal physique quantifiable et analytiquement exploitable ¹⁵. Dans le cas des biocapteurs d'affinité, la détection de la cible par le biorécepteur se fait par reconnaissance moléculaire. La Figure 2 en illustre le principe :

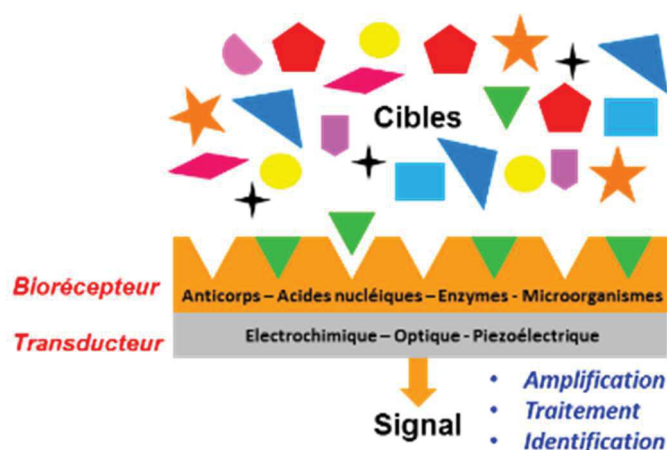


Figure 2 : Représentation schématique d'un biocapteur.

- Le biorécepteur : constitue le premier maillon du biocapteur et son choix est primordial dans la construction d'un biocapteur. La structure des biorécepteurs est très variée et il

existe autant de biorécepteurs que d'analytes potentiellement détectables. Il s'agit la plupart du temps d'anticorps, de fragments d'ADN ou d'enzymes.

- Le transducteur : génère un signal représentatif de la liaison cible-récepteur. Le mode de transduction peut être, classiquement optique, électrochimique, piézoélectrique ou calorimétrique. Selon le type d'interaction entre la cible et le biorécepteur, on choisira le type de transducteur approprié pour exploiter au mieux cette reconnaissance ¹⁶.

Une unité d'amplification et de traitement du signal adéquate est également nécessaire au bon fonctionnement du dispositif.

La détection peut être assurée avec ou sans marqueur. La détection sans marqueur (label-free) permet d'enregistrer directement les changements physiques qui se produisent durant le phénomène de reconnaissance biomoléculaire ¹⁷ alors que pour la détection avec marqueur, le biorécepteur doit être marqué ou une étape de révélation est effectuée pour observer la reconnaissance. Ce type de détection exige la production d'un biorécepteur combiné au marqueur, qui est parfois nocif, et souvent coûteux (molécules fluorescentes). L'emploi de fluorochromes peut également altérer la reconnaissance et la réactivité des molécules étudiées ¹⁸.

Dans ce contexte, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux biocapteurs « label-free ». Ils présentent l'avantage de fournir une réponse directe quand l'analyte se lie sur la surface mais ils exigent un contrôle avancé de la surface afin d'éviter les faux positifs que peut induire l'adsorption non spécifique.

1.2.2. Familles de biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés selon le type de biorécepteur, selon le type de transducteur associé ou selon le domaine d'application ¹⁹.

Dans ce qui suit, nous optons pour un classement en fonction des biorécepteurs. Selon la nature de l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur, les biocapteurs peuvent être recensés en deux catégories : les biocapteurs catalytiques et les biocapteurs d'affinité dont il sera question dans la suite. Avec les progrès de la chimie et de la biochimie, une troisième catégorie peut maintenant être intégrée, les récepteurs biomimétiques tels que les polymères à empreinte moléculaire ²⁰ (voir Figure 3).

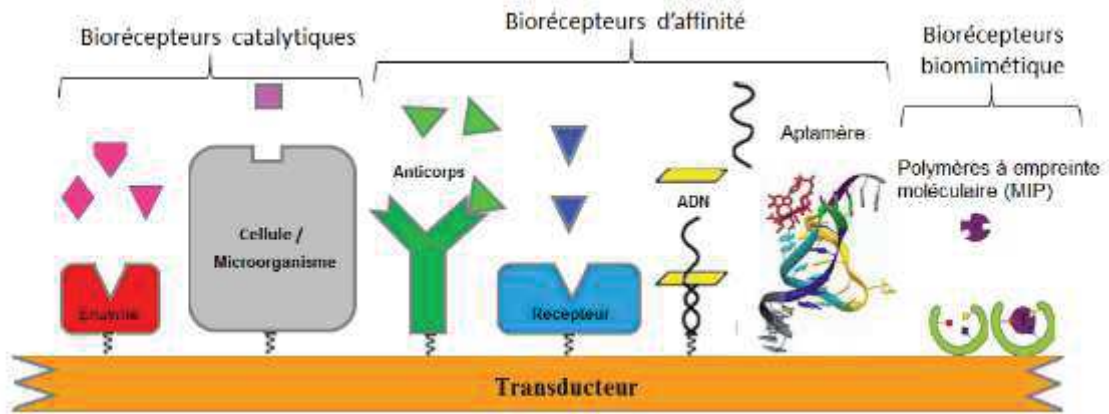


Figure 3 : Représentation schématique de différents biorécepteurs.

1.2.2.1. Les biocapteurs catalytiques

Cette classe met en jeu une réaction catalytique entre une enzyme et son substrat, comme dans le cas du premier biocapteur biomédical réalisé par Updike et Hicks, qui permet le dosage du glucose en suivant l'activité enzymatique de la glucose-oxydase³.

Les enzymes sont des protéines structurées de façon à posséder un site actif qui leur confère la capacité de catalyse spécifique sur un substrat donné. La rapidité de la réaction enzymatique, permet de produire plusieurs milliers de molécules par seconde²¹.

Cependant, l'inconvénient des enzymes réside dans le fait qu'elles ne sont pas très stables et nécessitent parfois la présence de cofacteurs. Il y a également une perte d'activité par dénaturation de l'enzyme qui réduit les conditions et les temps de conservation²². A la place d'enzymes isolées et purifiées, ce sont parfois des tissus animaux ou même des cellules entières, plus stables et plus robustes, qui sont utilisées²³.

1.2.2.2. Les biocapteurs d'affinité

Ces biocapteurs sont basés sur l'affinité entre les molécules biologiques de type récepteur/ligand comme l'association entre des saccharides et des protéines, entre un oligonucléotide et un brin d'ADN complémentaire, ou entre un antigène et un anticorps. Ceux se basant sur la reconnaissance anticorps/antigène sont appelés immunocapteurs et seront développés ci-dessous²⁴.

1.3. Les immunocapteurs

La découverte des anticorps en 1890 par Von Behring et Kitasato a été le fondement de l'immunologie moderne.

Une meilleure compréhension de la génétique des anticorps a permis aux chercheurs de manipuler leur structure et de tirer parti de leur vaste gamme de spécificités afin de répondre à des applications nécessitant une réponse rapide, en temps réel et sur le terrain ²⁵. Les immunocapteurs permettent la détection de faibles concentrations d'analyte (jusqu'au fM) dans des milieux complexes ²⁶. Cependant, ils présentent l'inconvénient de la réversibilité de l'association antigène / anticorps, ce qui les confine à des mesures de détection « one shot » ou discontinues, entrecoupées d'une étape de régénération de la surface par des lavages astringents, et peut induire une perte progressive de la sensibilité et de la spécificité du récepteur. Toutefois, dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut être plus adapté.

Un autre inconvénient majeur inhérent aux immunocapteurs est le manque de reproductibilité, dû essentiellement au mauvais contrôle de l'orientation des anticorps sur la surface de l'élément transducteur. L'immobilisation doit être judicieusement contrôlée afin d'assurer une orientation uniforme des sites récepteurs pour une réaction d'affinité optimale ²⁷.

Afin de mieux appréhender les enjeux liés à l'approche moléculaire de l'élaboration des immunocapteurs, il est nécessaire de connaître la structure moléculaire des anticorps ainsi que la nature de leur liaison avec leur cible.

1.3.1. L'anticorps

Les anticorps (Ab, de l'anglais antibody) sont des immunoglobulines (Ig) de plusieurs types, le plus courant étant le type G (IgG). Ce sont des glycoprotéines, de poids moléculaire égal à 150 kDa, formées de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (H pour heavy, 50 kDa) et 2 chaînes légères (L pour light, 25 kDa), liées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures et par des liaisons faibles de type hydrogène intra- et inter-chaîne assurant une cohésion de la macromolécule. L'ensemble forme une structure symétrique en Y (Figure 4). Les anticorps sont constitués d'un fragment constant (Fc) localisé sur les chaînes lourdes et, commun à tous les IgG d'une espèce animale, et de 2 fragments variables (Fab), incluant le site de reconnaissance de l'antigène appelé aussi paratope ^{26a,28}.

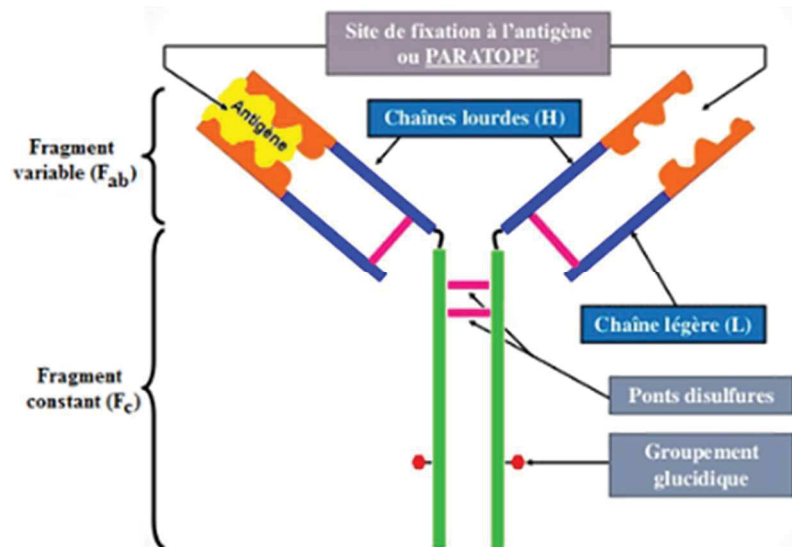


Figure 4 : Représentation de la structure d'un anticorps.

La polyvalence des anticorps est augmentée par le grand nombre de modifications possibles. En effet, ils peuvent être utilisés sous forme de molécule entière ou sous forme de fragments et peuvent être conjugués chimiquement à plusieurs types de molécules ²⁹. La disponibilité d'une large librairie d'anticorps en fait des outils universels pour une large gamme de plateformes d'essais.

1.3.2. L'antigène

Les antigènes (Ag) sont généralement des macromolécules étrangères à l'organisme hôte qui déclenchent la production d'anticorps par le système immunitaire. On peut néanmoins, disposer d'anticorps reconnaissant les molécules de plus faible masse moléculaire (inférieure à 2 kDa), appelées haptènes.

Cette reconnaissance s'effectue par l'intermédiaire de sites appelés épitopes. Comme le montre la Figure 5, un antigène comporte généralement plusieurs épitopes. En outre, on peut classer une population d'anticorps selon sa capacité à reconnaître un seul ou plusieurs épitopes. Les anticorps polyclonaux sont constitués d'un mélange d'immunoglobulines G dirigées contre le même antigène mais peuvent cibler des épitopes différents, alors que les anticorps monoclonaux sont dirigés contre un seul et même épitope de l'antigène ³⁰.

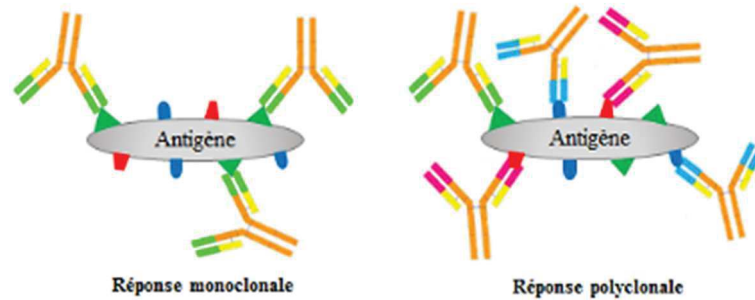


Figure 5 : Reconnaissance anticorps/antigène selon le type d'anticorps.

1.3.3. L'interaction anticorps/antigène

Une avancée majeure a eu lieu pendant les années 1940, quand Pauling a confirmé la théorie clé / serrure proposée par Emil Fisher ³¹ en prouvant que les interactions Ab-Ag dépendent davantage de leur forme que leur composition chimique.

La réaction Ab-Ag est spécifique. La forme de l'épitope doit correspondre exactement au paratope puisque l'interaction Ab-Ag met en jeu des liaisons faibles non covalentes (des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, des liaisons du type Van der Waals et des interactions hydrophobes) qui agissent à des distances interatomiques très faibles ³².

Les constantes thermodynamiques d'association ont été largement étudiées. L'ordre de grandeur de la constante d'association K_a varie généralement entre 10^8 et 10^{10} mol⁻¹.L

Cette complémentarité structurale et spécifique entre ces deux éléments ouvre également de grandes perspectives en termes de sensibilité de détection pour les immunocapteurs, à condition de disposer de la méthode de transduction adéquate.

1.3.4. Formats de détection

La plupart des immunocapteurs « label-free » développés sont basés sur une détection non compétitive dite "directe" ou compétitive selon la nature et la taille de l'analyte à détecter.

Les immunocapteurs au format non compétitif correspondent à la lecture directe de la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps de capture immobilisé sur le transducteur. Le format sandwich permet d'amplifier la réponse de ces systèmes (cf. paragraphe 1.5.1).

Dans le format compétitif, un analogue de la cible est immobilisé sur le transducteur et est donc reconnu par l'anticorps. La présence de la cible dans le milieu entraîne une compétition avec son analogue et la désorption ou la non-adsorption de l'anticorps (Figure 6). Ce second format est préféré dans le cas des cibles de faible poids moléculaire.

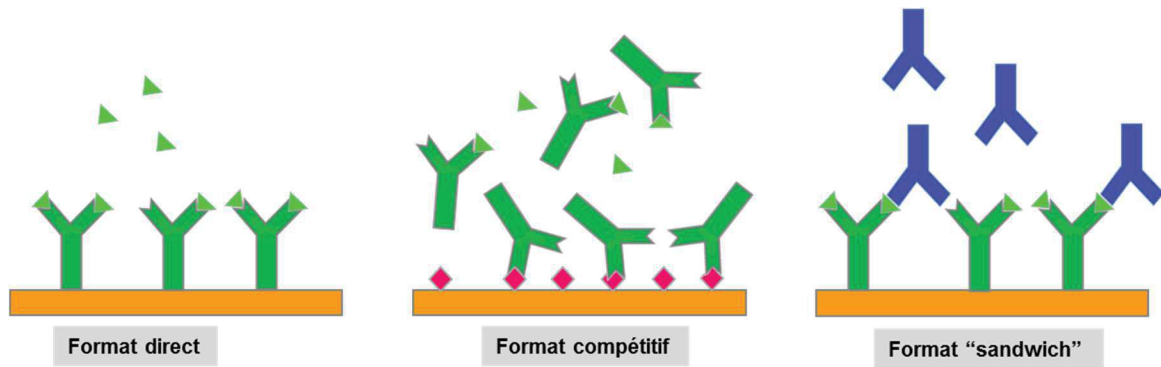


Figure 6 : Les principaux formats d'immunocapteurs.

1.4. Quelques techniques de transduction pour les immunocapteurs

La transduction électrochimique occupe une place prépondérante dans le domaine des immunocapteurs et des biocapteurs en général. Les progrès technologiques de ces dernières décennies ont permis l'émergence de nouvelles techniques et multiplié les modes de transduction. Il n'est donc pas question dans ce qui suit d'établir une liste exhaustive des techniques de transduction disponibles pour les immunocapteurs mais de citer les plus fréquemment utilisés, soit les capteurs électrochimiques, optiques et piézoélectriques ³³, en détaillant particulièrement les capteurs piézoélectriques qui font l'objet de cette thèse.

1.4.1. Transducteurs électrochimiques

Dans la transduction électrochimique, l'évènement de la reconnaissance est converti en un signal électrique pouvant être un courant électrique (transducteur ampérométrique), une différence de tension (transducteur potentiométrique), ou un changement de résistivité (transducteur conductimétrique) ³⁴.

Le principe repose sur le fait que certaines substances électroactives en solution (molécules ou ions) peuvent échanger des électrons avec une électrode, ceci dans des conditions analytiques définies par le potentiel auquel cet échange a lieu. Les électrodes utilisées sont généralement fonctionnalisées par des composés biologiques et opèrent en milieu liquide. La détection électrochimique combine plusieurs avantages en particulier le bas coût, la capacité d'analyser des échantillons troubles et la miniaturisation facile. Toutefois la sensibilité et sélectivité de ces techniques sont légèrement limitées en comparaison à la détection optique. Le couplage à d'autres techniques de transduction ³⁵, ou l'intégration de nanomatériaux permet d'exalter les performances des biocapteurs électrochimiques.

1.4.2. Transducteurs optiques

La reconnaissance de l'antigène modifie la couche moléculaire sur la surface du transducteur, ce qui peut induire une variation de l'indice de réfraction, de l'épaisseur de la couche sensible, un changement de l'absorption de la lumière, la fluorescence, ou d'autres paramètres optiques³⁶. Ces variations peuvent être décelées de manière sensible grâce à des techniques de transduction telles que : l'ellipsométrie, l'interférométrie, la spectroscopie par diffraction, la spectroscopie infrarouge ou encore la résonance de plasmon de surface (**Surface Plasmon Resonance**, SPR en anglais).

La SPR est l'une des techniques de transduction optique les plus utilisées et appropriées aux biocapteurs³⁷. Elle permet la détection sensible de cibles très variées³⁸ telles que des toxines³⁹, des médicaments⁴⁰, des pathogènes⁴¹ ou des hormones⁴².

La SPR exploite l'onde évanescente qui se propage à l'interface séparant deux milieux d'indice de réfraction différents : lorsque la lumière monochromatique polarisée atteint l'interface de ces deux milieux, l'intensité de la lumière réfléchi est nettement réduite pour un angle d'incidence particulier. La composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface, jusqu'à une certaine épaisseur dans la couche métallique et entre en résonance avec le plasmon de surface de la couche métallique se trouvant à l'interface. L'optimum de résonance des plasmons est au voisinage d'un angle d'incidence donnant le minimum de réflectivité⁴³.

Le principe de fonctionnement consiste à immobiliser un biorécepteur sur une surface métallisée posée sur un prisme, dont le rôle est de capturer les cibles qui sont injectées sur cette surface par un flux continu. La capture de l'analyte par le biorécepteur entraîne une variation de l'indice de réfraction et décale la position de l'angle de résonance. Cette variation dépend de la quantité d'analyte capturé.

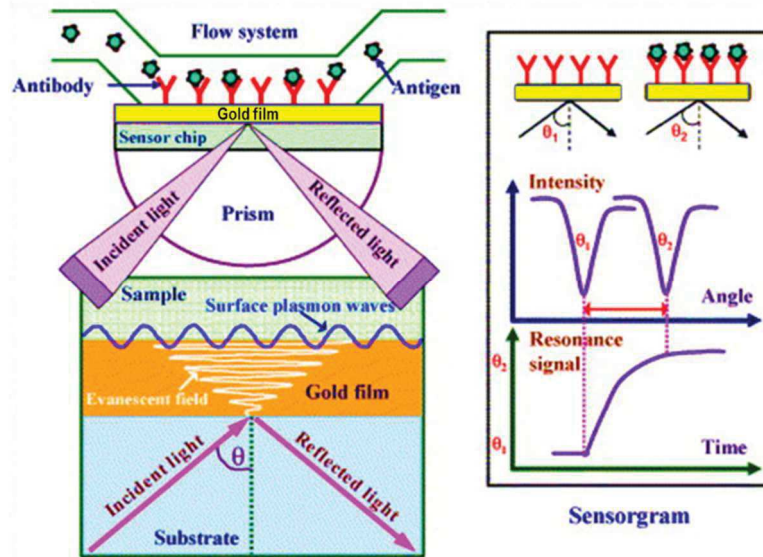


Figure 7 : Représentation schématique d'un immunocapteur SPR. Figure reproduite de la réf. ³⁸.

L'utilisation des plasmons de surface localisés (*Localised Surface Plasmon Resonance, LSPR*) est une technique proche mais, à l'inverse des plasmons propagatifs qui se déplacent le long d'un film métallique, la LSPR confine le plasmon résonant dans une nanostructure métallique. Les plasmons de surface localisés au voisinage des nanostructures sont excités et une immuno-détection peut alors être effectuée avec une grande sensibilité. Cette technique reposant souvent sur des nanoparticules d'or sera détaillée dans la deuxième partie de ce chapitre.

Une autre technique de détection optique intéressante est la spectroscopie infrarouge ⁴⁴. L'absorbance dans la région amide I (1655 cm^{-1}) est particulièrement sensible aux variations de concentration en protéines et peut donc être utilisée pour la détection semi-quantitative des complexes immuns. Cette technique, en particulier la spectroscopie IR à incidence rasante avec modulation de la polarisation (PM-IRRAS) a montré aussi son efficacité dans la détection de plusieurs cibles passant des protéines ⁴⁵ aux molécules de faible poids moléculaire ⁴⁶.

Dans l'ensemble, les biocapteurs optiques présentent une bonne implantation dans le monde industriel grâce leur possibilité de miniaturisation et leur capacité de détection simultanée de plusieurs analytes.

1.4.3. Transducteurs piézoélectriques

Les immunocapteurs piézoélectriques reposent sur les changements de masse qui ont lieu après la formation ou la dissociation du complexe Ab-Ag. Comme les transducteurs optiques, ils permettent une détection directe sans avoir recours à des marqueurs ⁴⁷.

La microbalance à cristal de quartz (*Quartz Crystal Microbalance, QCM*) est le système le plus répandu pour ce mode de transduction. Le principe est basé sur les propriétés piézoélectriques

du quartz, découvertes par les frères Curie en 1880 ⁴⁸, qui sous l'effet d'une contrainte mécanique, subit une déformation qui entraîne une polarisation et inversement, sous l'effet d'un courant alternatif, une polarisation qui entraîne une déformation. La microbalance à cristal de quartz utilise cette propriété, dans certaines conditions notamment de tension et d'orientation du cristal, pour faire vibrer le quartz à sa fréquence de résonance ⁴⁹.

Cette fréquence diminue lorsque des molécules se fixent à la surface du quartz et augmente dans le cas d'une perte de masse et permet donc une détection en temps réel des événements de désorption/adsorption. La mesure de la fréquence est très précise et la variation de fréquence (ΔF) mesurée est de l'ordre du dixième de Hz. Cet effet a été modélisé par Sauerbrey en 1959 pour aboutir à une équation qui porte désormais son nom et qui permet de corréler ΔF à la variation de la masse (ΔM) ⁵⁰:

$$\Delta F = \frac{-2Nf_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta M$$

Avec N l'ordre de l'harmonique, f_0 la fréquence de résonance fondamentale du quartz (non chargé), ΔM la masse totale ajoutée, A l'aire, sous électrode, d'une seule face du cristal, ρ_q la masse volumique du quartz ($2,651 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) et μ_q le module de cisaillement du quartz (coupe AT) ($2,947 \times 10^{11} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$).

En introduisant la masse ajoutée par unité de surface $\Delta m = \frac{\Delta M}{A}$, nous obtenons la relation suivante :

$$\Delta F = -N \frac{\Delta m}{C_f}$$

Avec $C_f = 17.7 \text{ ng}\cdot\text{Hz}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour un quartz oscillant à 5 MHz et N l'ordre de l'harmonique = 1, 3, 5, 7... . Pour les QCM actuelles, la fréquence est directement mesurée en tenant compte de N.

Cette équation est utilisée depuis longtemps pour suivre le dépôt de couches fines sous air et sous vide. Le passage en milieu liquide a été initié par les travaux de Nomura et al ⁵¹ et il a été possible par la suite d'utiliser la QCM pour suivre plusieurs types d'interactions ⁵²: l'hybridation de brins d'ADN ⁵³, la reconnaissance anticorps-antigène ⁵⁴, l'adhésion de cellules ⁵⁵, les interactions entre protéines ⁵⁶ ou encore leur configuration spatiale une fois adsorbées en surface ⁵⁷.

L'interprétation des variations de fréquence est alors rendue plus complexe du fait que les macromolécules (protéines, polymères...) déposées sur une surface ne constituent pas une fine

couche rigide, leur comportement viscoélastique induit une perte d'énergie de vibration par dissipation.

Les travaux de Kasemo et *al.* ⁵² ont permis d'appréhender la nature des interactions entre les électrodes et les molécules adsorbées en mesurant la dissipation. La nouvelle QCM est née en 1995 et baptisée QCM-D (D pour la mesure de la dissipation). La dissipation permet ainsi d'estimer la rigidité de la couche formée ^{54b, 58}.

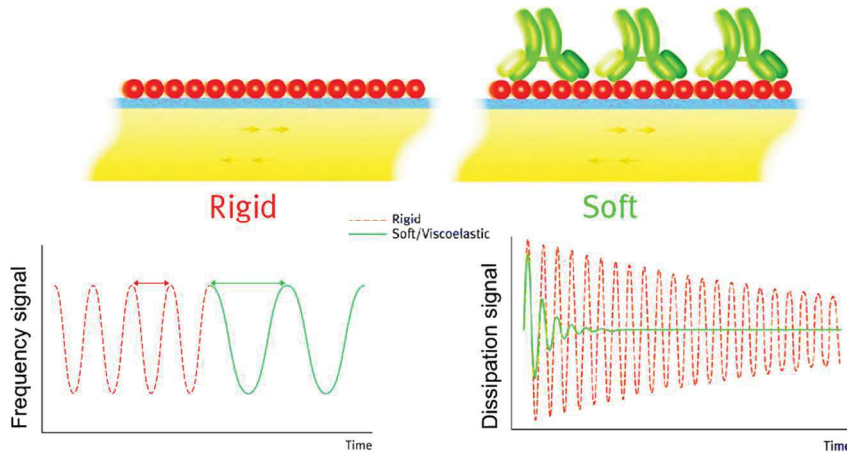


Figure 8 : Paramètres mesurés en QCM-D. Comparaison de l'effet de l'adsorption d'un film souple (en vert) et d'un film rigide (en rouge) sur les variations de fréquence et de dissipation [www.qsense.com].

Comme illustré dans la Figure 8, l'adsorption d'un film souple, se traduit par une diminution de la fréquence de résonance ($\Delta F < 0$) due à la prise de masse et une augmentation de la dissipation ($\Delta D > 0$) due à la forte atténuation de l'oscillation et donc une énergie de dissipation plus importante.

Dans le cas d'une mesure en phase liquide, il est important de prendre en considération la dissipation dans l'application du modèle de Sauerbrey. La linéarité entre Δm et ΔF dépend des propriétés viscoélastiques de la couche adsorbée. Reviakine et al ont énoncé les limites d'application de cette relation ⁵⁹.

La masse absolue calculée à partir de cette relation prend en compte les molécules déposées sur la surface, mais aussi l'eau (ou le solvant) prise au piège dans la couche ^{58, 60}. Donc, il faut être particulièrement prudent dans la comparaison des valeurs tirées de mesures QCM-D avec la masse adsorbée calculée à partir d'autres techniques. Une comparaison des techniques de transduction optique (SPR, PM-IRRAS) et piézoélectrique (QCM) appliquée aux immunocapteurs a permis de corrélérer les résultats de ces trois techniques et de conclure à des sensibilités comparables de ces techniques avec un avantage en sensibilité pour la SPR.

La QCM possède une bonne sensibilité avec une limite de détection de 1 ng/cm^2 pour un cristal de quartz de fréquence fondamentale égale à 5 MHz en atmosphère gazeuse, et 5 ng/cm^2 en phase liquide, une robustesse et de faibles temps de réponse, de plus elle permet des mesures in situ et en temps réel.

Elle apporte des informations sur les propriétés viscoélastiques du système ⁶¹ et bénéficie d'un gain en sensibilité de détection grâce à l'augmentation de masse correspondant à l'eau liée aux protéines. Une autre particularité est la possibilité de miniaturisation et la capacité de détection simultanée de plusieurs analytes. Elle constitue sans doute l'une des alternatives les plus séduisantes, proposant ainsi des systèmes simples, fiables, rapides, économiques et sélectifs de détection. Cependant, en bio-détection, les cibles sont généralement à l'état de traces, ce qui nécessite une amélioration de la performance de cette technique en termes de sensibilité.

1.5. Axes d'amélioration des immunocapteurs piézoélectriques

Les immunocapteurs piézoélectriques, comme tous les biocapteurs, doivent obéir à un cahier des charges énonçant un certain nombre de critères de développement à savoir la sensibilité, la limite de détection (LOD), la gamme linéaire et dynamique, la reproductibilité et/ou la sélectivité et spécificité ⁶². Les autres paramètres évalués incluent le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et de stockage du biocapteur. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable.

La qualité de la bio-interface gouverne autant la sensibilité que la spécificité du biocapteur. Donc, son design est l'étape clé pendant le processus d'élaboration du biocapteur. Pour le cas des immunocapteurs de multiples étapes sont à maîtriser, comme représenté sur la Figure 9.

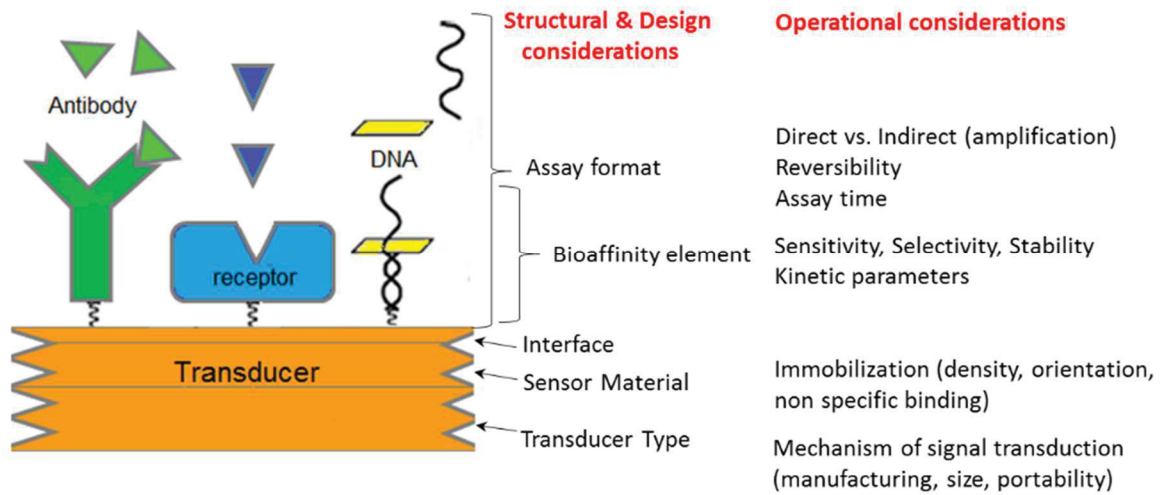


Figure 9 : Relations générales entre la conception et les caractéristiques opérationnelles des biocapteurs d'affinité. Figure reproduite de la réf. ⁶³.

Différentes méthodes permettant de promouvoir la sensibilité des immunocapteurs piézoélectriques ont été décrites dans la littérature. Concernant les approches chimiques, deux stratégies sont généralement utilisées ⁶⁴ : l'amplification de la masse déposée et l'optimisation de la couche de capture.

1.5.1. Amplification de la masse déposée

Un immunocapteur piézoélectrique est un dispositif sensible à la variation de masse. Dès lors, toute amplification de la masse, impliquera une amélioration de la sensibilité ⁶⁵.

Les immunocapteurs "classiques" assurent la détection par reconnaissance moléculaire sans marquage et en temps réel. Ce format de détection peut être amplifié par le format dit "Sandwich" ⁶⁶.

Dans ce format, l'anticorps primaire spécifique de la cible est immobilisé sur la surface, puis incubé avec l'antigène. Un autre anticorps reconnaissant un autre épitope de l'antigène est ensuite lié à l'antigène (voir Figure 10). L'antigène doit être assez grand et posséder au moins deux épitopes pour pouvoir se lier à la fois à l'anticorps de capture et à l'anticorps secondaire. La réponse QCM peut également être amplifiée ⁶⁷ au moyen d'anticorps liés à des nanoparticules ⁶⁸, de nanotubes de carbone, de particules magnétiques ou d'enzymes ⁶⁹. La masse importante de ces marqueurs entraîne un changement important de la masse déposée et amplifie ainsi la variation de fréquence de résonance induite ⁷⁰.

Comme l'illustre la figure ci-dessous, le marqueur peut être conjugué à l'anticorps secondaire ou un anticorps tertiaire qui est un anti-IgG secondaire.

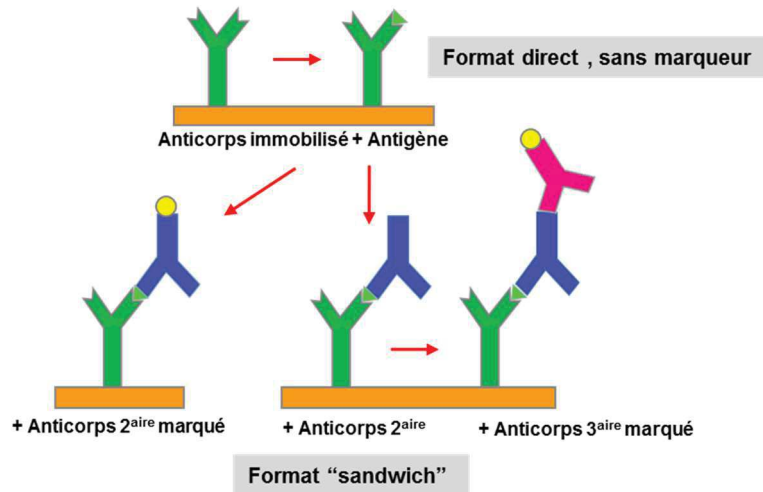


Figure 10 : Formats de détection amplifiés en QCM.

1.5.2. Optimisation de la couche de capture

Trois paramètres sont importants à considérer lors de la construction d'un immunocapteur : la densité surfacique de biorécepteur, son accessibilité à l'antigène, et finalement, la flexibilité de la couche de détection.

Cette approche vise à atteindre une densité de greffage de l'anticorps (ou l'antigène) optimale tout en gardant une orientation garantissant l'accessibilité des sites impliqués dans la reconnaissance biologique. En effet, l'immobilisation de l'anticorps ou l'antigène n'induit pas seulement une activation de la surface du transducteur, mais aussi détermine la sensibilité et le degré de régénéralité de l'immunocapteur.

Cette étape d'immobilisation est particulièrement délicate car, compte-tenu de la nature « métastable » des anticorps, il faut éviter, lors de leur immobilisation, une altération de leur conformation donc de leur fonction biologique. En effet, une fois immobilisés en surface, les anticorps sont susceptibles d'adopter différentes orientations ^{27a}. En outre, ces orientations peuvent être différenciées en QCM-D ⁵¹.

Il existe plusieurs méthodes d'immobilisation allant de la simple adsorption physique à l'élaboration de structures chimiques complexes ⁷¹. Le choix de la méthode influe directement sur les performances de la couche de capture.

Les avantages de l'immobilisation par physisorption sont liés à une mise en œuvre facile, ne nécessitant qu'une seule étape, pouvant être appliquée à un grand nombre de protéines. Cependant, elle n'est pas conseillée car elle peut conduire à la dénaturation des protéines et à une mauvaise orientation favorisant ainsi les adsorptions non-spécifiques et la génération de fausses réponses.

Le greffage des protéines (anticorps ou antigène) directement à la surface peut se faire par couplage chimique covalent⁷². Cette approche consiste à réaliser une monocouche auto-assemblée (Self-Assembled Monolayer, SAM) à la surface du transducteur. Il s'agit de dépôt organisé avec une orientation définie de molécules comportant deux groupements fonctionnels séparés par un bras espaceur. L'un est responsable de la liaison avec la surface (chimisorption d'un groupement thiol sur or par exemple), l'autre possède des groupes fonctionnels susceptibles de réagir avec des biomolécules (SH des cystéines et NH₂ des lysines, COOH, OH, etc.)⁷³. Les travaux de V. Lebec et *al.* ont montré une différence dans l'orientation de la protéine lorsqu'elle est en interaction avec une SAM amine ou une SAM alkyle⁷⁴. Ils ont montré aussi qu'une étape d'activation d'une SAM acide permettrait de passer d'une simple physisorption à une liaison covalente et donc de mieux contrôler l'orientation de l'anticorps à la surface fonctionnalisée⁷⁵.

De plus, les couches de capture fabriquées à partir de monocouche auto-assemblées sont bien plus stables que celles obtenues par simple adsorption. Mais ce mode de greffage peut conduire à une mauvaise orientation de l'anticorps s'il est greffé par le fragment variable. De plus, les liaisons au support peuvent être multiples et restreindre la flexibilité de la protéine, causant une perte de sa fonctionnalité.

Un moyen d'améliorer cette méthode est d'utiliser des fragments d'anticorps. Les fragments d'anticorps offrent plusieurs avantages par rapport aux anticorps entiers tels que la réduction des liaisons non spécifiques qui résultent de l'interaction avec le fragment constant Fc, l'amélioration de la sensibilité par réduction de l'encombrement stérique des épitopes et d'éviter le changement de conformation de l'anticorps lors de la reconnaissance de l'antigène^{29, 76}.

L'utilisation de protéines de liaison permet de contrôler l'immobilisation des anticorps à la surface des immunocapteurs. Les plus répandues utilisent le couple de haute affinité biotine/avidine (ou streptavidine, neutravidine), les protéines A ou G, les anticorps secondaires ou les brins d'ADN.

La grande affinité biotine/avidine est très utilisée dans les dosages immunologiques⁷⁷. Cette stratégie est efficace mais nécessite la « biotinylation » des anticorps, ce qui bien évidemment, ajoute une étape supplémentaire au processus d'élaboration.

La protéine A est une protéine située dans la paroi externe de *Staphylococcus aureus*. Elle a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines G, du fait d'une complémentarité de structure. Elle possède 4 sites de reconnaissance du fragment Fc et une forte affinité pour les IgG de lapin. Son efficacité pour l'immobilisation orientée des IgG a été prouvée par plusieurs

travaux ⁷⁸. La protéine G est aussi une protéine de la paroi bactérienne des staphylocoques du groupe G utilisée pour immobiliser des IgGs issues d'espèces telles que la souris, le rat ou la chèvre ⁷⁹. Elle possède 2 sites de reconnaissance du fragment Fc.

La comparaison entre immunocapteurs construits à partir de trois différentes plates-formes d'affinité souligne l'influence du mécanisme d'adsorption des protéines. Il a été démontré que l'immobilisation via la Protéine A est la plus efficace : elle présente l'avantage de greffer les anticorps à distance de la surface avec une bonne orientation et ainsi une meilleure sensibilité de détection, de même qu'une faible adsorption non spécifique ⁸⁰. Comme pour les anticorps, il est possible d'immobiliser la protéine A par différentes méthodes chimiques ou physiques. Afin d'éviter l'encombrement stérique des anticorps qui limiterait leur accessibilité, une optimisation de la densité de surface doit être effectuée. cela peut se faire par dilution des fonctions réactives de la couche d'accroche en formant notamment des SAMs mixtes ⁸¹.

La Figure 11 récapitule les principales stratégies d'immobilisation des anticorps décrites précédemment.

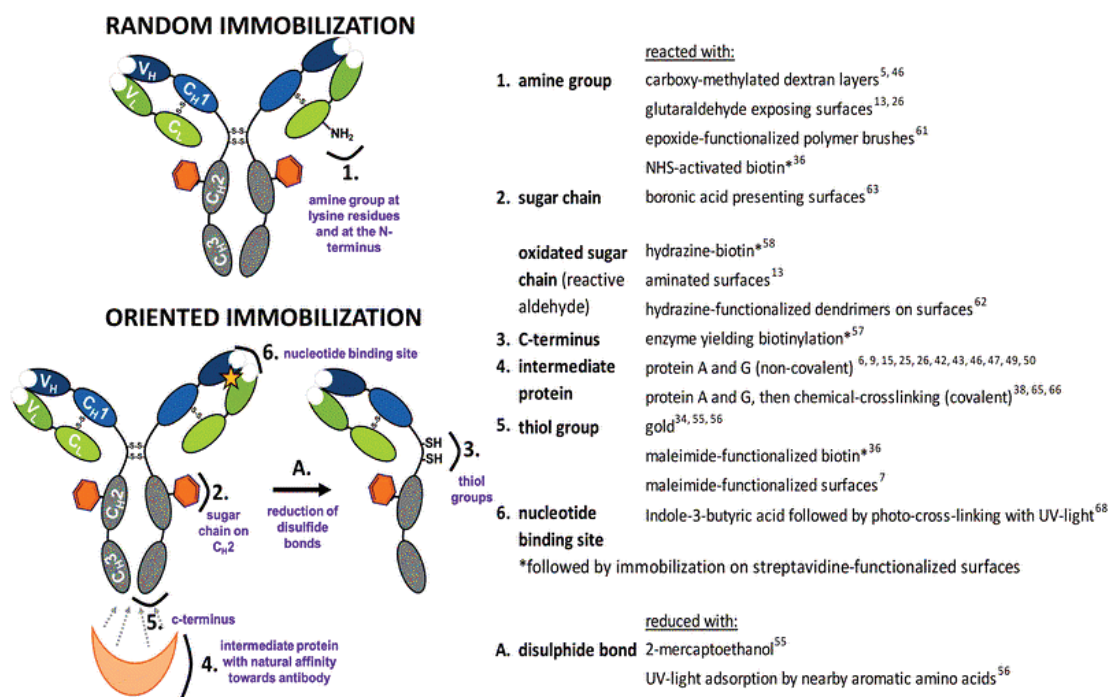


Figure 11 : Groupes fonctionnels utilisés pour l'immobilisation aléatoire et orientée d'Ab sur surface. Figure reproduite de la réf.^{27a}.

L'amélioration de l'accessibilité des anticorps peut également se faire en modifiant la topographie du transducteur et sa surface spécifique. Ainsi, l'immobilisation de nanoparticules sur la surface du transducteur permettrait d'augmenter à la fois la surface de greffage et la flexibilité des biorécepteurs ⁸².

Plusieurs travaux récents ont fait appel à une combinaison des stratégies décrites afin d'améliorer la sensibilité des immunocapteurs piézoélectriques ^{76b, 83}.

1.6. Bilan : vers la construction d'un immunocapteur performant

Les biocapteurs sont conçus afin de détecter la présence d'un analyte d'intérêt, présent généralement à l'état de trace dans des matrices variées. Le choix du biorécepteur et du type de transduction est donc primordial. Les anticorps, l'élément sensible des immunocapteurs, sont hautement spécifiques et ouvrent de grandes perspectives en termes de sensibilité de détection. Néanmoins, il faut maîtriser leur immobilisation pour avoir une bioactivité satisfaisante.

La Figure 12 récapitule les différentes étapes à maîtriser pour la construction d'un immunocapteur piézoélectrique performant. Une voie prometteuse pour améliorer la sensibilité de ces dispositifs est l'utilisation de nanoparticules comme agents de nanostructuration de la surface des transducteurs.

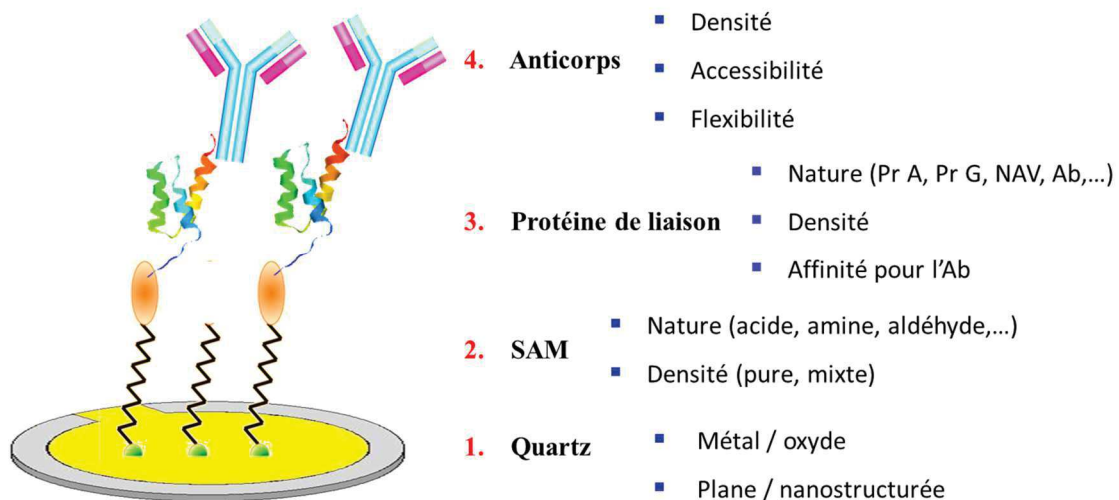


Figure 12 : Représentation schématique de la construction d'un immunocapteur piézoélectrique.

La partie suivante sera donc consacrée à une mise au point bibliographique sur les nanoparticules d'or, décrira les stratégies de synthèse les plus courantes ainsi que les propriétés qui font de ces nano-objets un outil très prometteur pour l'élaboration de biocapteurs performants.

Partie 2

Les nanoparticules d'or

Cette partie est consacrée aux nanoparticules d'or, leur historique, les méthodes communes de synthèse, et les propriétés optiques remarquables, grâce à la résonance plasmons de surface localisée.

2.1. Introduction et historique

Les nanoparticules* d'or, sont au cœur de nombreuses applications telles que la catalyse, l'électronique, l'optique, l'environnement et les biotechnologies et la médecine⁸⁷. Le terme nanotechnologie qui y est associé peut prendre un sens différent d'une discipline à une autre mais demeure lié à la génération de nouvelles propriétés par la miniaturisation.

L'or fascine l'humanité depuis des millénaires. Mais grâce à l'avènement de l'ère des nanosciences, on assiste à une véritable « ruée vers les nanoparticules d'or ». Ce métal, longtemps considéré inerte n'intéressait pas les chimistes, mais a révélé des propriétés inédites à l'échelle nanométrique.

Chose surprenante, l'or nanométrique est aussi exploité depuis longtemps avant même la définition du terme "nano". En effet, l'originalité des nanoparticules d'or (*Gold nanoparticles*, GNPs) n'était pas inconnue au moyen-âge par les souffleurs de verre. Ces derniers teintaient les verres en de multiples couleurs en utilisant des GNPs⁸⁸. Cependant, le phénomène n'était pas expliqué ni bien compris.

La coupe de Lycurgue, une coupe romaine en verre opacifié datant du IV^e siècle après Jésus-Christ, constitue l'une des pièces révélatrices de ce savoir-faire⁸⁹. Exposée actuellement au British Museum, à Londres, cette coupe est bichromatique, c'est-à-dire qu'elle change de couleur selon son éclairage (Figure 13). Cette coupe contient en effet des nanoparticules d'or et d'argent qui absorbent dans le vert. De ce fait, lorsqu'elle est éclairée de l'extérieur (lumière réfléchie) la couleur perçue est verte, alors qu'une source lumineuse placée à l'intérieur (ou à l'arrière) de cette coupe (lumière transmise) donne la couleur rouge rubis⁸⁸⁻⁸⁹. Ces propriétés optiques seront discutées par la suite.

* Les nanoparticules sont définies comme des particules dont au moins une dimension est inférieure à 100 nm.



Figure 13 : Photographies de la coupe de Lycurgue prises avec deux éclairages différents : en réflexion (gauche) et en transmission (droite). Source : The Trustees of the British Museum.

Il a été également rapporté qu'à cette même époque, l'or sous forme colloïdale est apparu en Egypte et en Chine ^{87b, 90}. Des préparations à base « d'or soluble » étaient utilisées à des fins thérapeutiques. Des revues bibliographiques regorgent des exemples sur la préparation des solutions colloïdales d'or et de leurs usages dans le domaine biomédical ^{88-89, 91}.

En 1818, Jeremias Benjamin Richters avait suggéré que la couleur rose ou pourpre de ces solutions était due à la présence de fines particules d'or, qui, une fois agrégées, donnent une couleur jaune ^{87b}.

C'est en 1857 que Michael Faraday publie la première synthèse documentée d'une solution de nanoparticules d'or en réduisant le chlorure d'or par le phosphore dans du CS₂ ⁹². Il a également observé que la couleur de films minces de particules variait en fonction de la compression mécanique subie ⁹³. Il explique alors de manière empirique que la couleur rouge de la solution était due à la petite taille des particules ⁹². Il utilisa ensuite un microscope à projection pour démontrer le changement de couleur de la solution en bleu lorsqu'on ajoute du sel. Sans fournir une explication complète, il l'attribua à une simple variation de la taille des particules. Pour ces raisons, certains attribuent à sa conférence de 1857 la naissance des nanotechnologies modernes ⁹⁴. Il faut attendre 1908 pour que Maxwell-Garnett ⁹⁵ et Mie ⁹⁶ élaborent une théorie qui explique la couleur des colloïdes d'or.

Plus tard, l'invention du premier microscope électronique à transmission par les ingénieurs allemands Ernst Ruska et Max Knoll permit à Turkevich et *al.* d'établir que les suspensions fabriquées par Faraday étaient constituées de particules d'or de 6 ± 2 nm ⁹⁷. Il convient de souligner que Richard Adolf Zsigmondy reçut le prix Nobel en 1925 pour sa démonstration de la nature hétérogène des solutions colloïdales et pour les méthodes qu'il a utilisés, lesquelles sont devenues fondamentales en chimie colloïdale moderne.

De plus, Turkevich a développé en 1951 une autre voie de synthèse utilisant le citrate de sodium comme agent de réduction et de stabilisation. Depuis, de nombreuses méthodes ont été décrites pour la préparation des GNPs de taille et de forme contrôlées.

La compréhension des mécanismes de formation des particules est nécessaire à l'obtention d'échantillons présentant des surfaces désirées avec des tailles et des morphologies bien définies.

2.2. Etat de l'art sur les voies de synthèse des nanoparticules d'or

Les propriétés des GNPs sont très fortement dépendantes de leur taille, forme et structure. Ceci a motivé le développement d'une pléthore de méthodes de synthèse de GNPs de taille et de forme diverses et contrôlées. Il est trop ambitieux de vouloir donner une énumération exhaustive des méthodes de synthèse des GNPs mais on peut les classer en deux voies principales :

- La voie descendante appelée communément «top-down» qui consiste à fragmenter un matériau macroscopique jusqu'à l'obtention des nanostructures souhaitées à l'aide de techniques physiques. La lithographie est une technique typique de cette approche ^{90a}. Si les techniques de fabrication top-down étaient auparavant très en avance, elles atteignent désormais leur limite physique pour des tailles inférieures à 100 nm ^{90b}.
- Une approche inverse qualifiée de « Bottom-up », du bas vers le haut, qui consiste à assembler (ou favoriser un auto-assemblage) des motifs atomiques ou molécules afin de constituer des objets nanométriques. Il s'agit de réduire un précurseur d'or par voie chimique ou physique. La voie chimique consiste à réduire un précurseur d'or par des techniques de chimie douce comme la réduction chimique, sonochimique, photochimie ou électrochimie ou encore biologique (alternative écologique). Pour la voie physique, la réduction des sels métalliques peut être produite par micro-ondes, thermolyse ou radiolyse. Cette dernière méthode est favorable à la synthèse de nanoparticules de taille, de forme et de structure contrôlées ⁹⁸. Le débit de dose et le temps d'exposition permettent de contrôler la taille et le nombre de nanoparticules créées ⁹⁹. Cette méthode est particulièrement adaptée à la synthèse des nanoparticules bimétalliques (cœur/coquille ou alliage), améliorant l'activité catalytique et la sélectivité ¹⁰⁰.

Par ailleurs, les références suivantes dressent un panorama relativement large des méthodes courantes de synthèse connues à ce jour ^{87b, 101}. La réduction chimique est de loin la plus utilisée. Elle consiste à réduire des sels métalliques par ajout d'un réducteur en présence d'un stabilisant. De nombreuses méthodes ont été développées et se différencient par la nature du réducteur

et/ou de l'agent stabilisant. La Figure 14 regroupe les réactifs qui peuvent agir à la fois comme agents réducteurs et stabilisants, donc ayant un double rôle dans la synthèse de nanoparticules. Nous présenterons les principales voies de synthèse des GNPs que nous avons privilégiées.

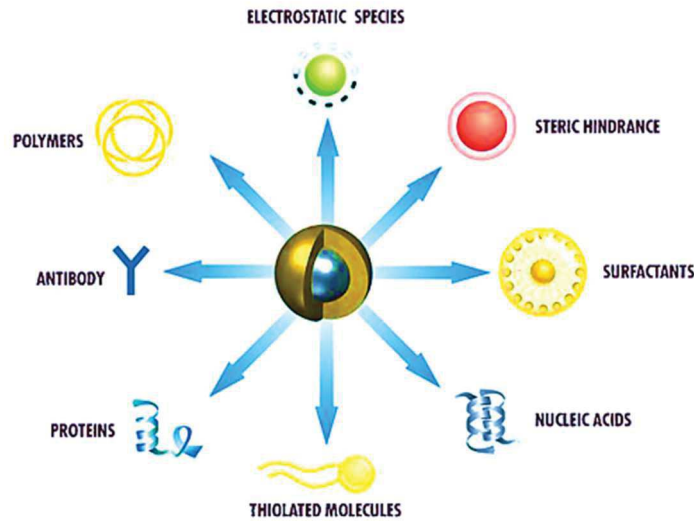


Figure 14 : Vue d'ensemble des stabilisants de nanoparticules d'or les plus utilisés. Figure reproduite de la réf. ^{101a}.

2.2.1. Méthode de Turkevich : réduction et stabilisation par les citrates

Parmi les méthodes conventionnelles de synthèse de GNPs, la plus connue a été décrite par Turkevich en 1951 ⁹⁷. Il s'agit de la réduction de HAuCl_4 par les ions citrate en solution aqueuse. Les ions citrate en solution s'adsorbent à la surface des particules pour créer une couche chargée négativement, ceci introduit une répulsion électrostatique entre ces particules empêchant leur agrégation et permettant ainsi leur stabilisation. Les GNPs obtenues sont de forme quasi-sphérique de diamètre compris entre 12 et 20 nm et une distribution en taille assez étroite (écart-type entre 10 et 16%).

En adoptant ce procédé mais en jouant sur le rapport or/citrate de sodium, Frens reprendra en 1973 ce procédé et parviendra à faire varier la taille de 16 à 147 nm ¹⁰². Récemment plusieurs travaux ont optimisé ce protocole par le contrôle de la température.

Même si la méthode Turkevich-Frens est simple à mettre en œuvre, les mécanismes de croissance des particules et l'influence de paramètres de la réaction ne sont pas totalement compris ¹⁰³.

2.2.2. La méthode Slot : réduction par le citrate en présence d'acide tannique

Des récentes recherches dirigées par J.W. Slot ont permis l'accès à des GNPs de taille inférieure à 10 nm en ajoutant de l'acide tannique lors de la synthèse des GNPs ¹⁰⁴.

En raison du faible pouvoir réducteur du citrate, la préparation des GNPs d'or par la méthode Turkevich a lieu au reflux. En utilisant un mélange d'acide tannique (réducteur rapide)/citrate (réducteur lent), cette synthèse se fait à 60 °C. De plus, l'acide tannique du fait de sa grande taille (longue chaîne carbonée) joue un rôle dans la stabilisation des GNPs.

Cette méthode permet la préparation de suspensions de GNPs de taille très variable par simple modification du rapport acide tannique/citrate de sodium. Le diamètre final de la particule est inversement proportionnel à la quantité d'acide tannique utilisée.

2.2.3. Méthode de Brust-Schiffrin : synthèse en deux phases et stabilisation par les thiols

En 1994, Brust et Schiffrin ont découvert une méthode pour synthétiser des GNPs en milieu organique ¹⁰⁵. La synthèse repose sur le transfert du sel d'or de la solution aqueuse initiale vers une solution organique au moyen d'un agent de transfert de phase tel que le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Puis l'ajout d'un thiol entraîne une polymérisation des monomères thiol-or. Un agent réducteur puissant doit alors être ajouté (NaBH₄ : borohydrure de sodium) pour provoquer la formation du cœur métallique d'Au(0).

Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules stabilisées par des thioalcanes, polydisperses en forme, de taille comprise entre 1,5 à 5,2 nm et re-dispersables dans un solvant organique sans agrégation ou décomposition. Murray a mis en évidence que le rapport sel d'or/dodécane-thiol détermine le diamètre final des GNPs ¹⁰⁶. De nombreux dérivés de thiols ont par la suite été utilisés pour la synthèse et/ou la stabilisation des GNPs ¹⁰⁷. Ceci a ouvert la voie à l'élaboration de GNPs enrobées de polyéthylène glycols-thiol qui présentent un intérêt biomédical ¹⁰⁸.

2.2.4. Stabilisation par d'autres ligands

Plusieurs ligands autres que les thiols peuvent être utilisés pour la synthèse des GNPs. Plus particulièrement, les ligands phosphorés, oxygénés ou azotés contenant des groupements électronégatifs tels que les groupements amines, carboxyliques, carbonyles, et phénols.

L'utilisation des réducteurs faibles peut être aussi combinée à des tensioactifs. Les surfactants permettent de contrôler la croissance et la stabilisation des nanoparticules. Par exemple, Chiang et al. ont produit des GNPs par réduction d' HAuCl_4 à l'aide d'hydrazine¹⁰⁹. Des GNPs ont aussi été obtenues en utilisant l'acétone comme réducteur au lieu du citrate¹¹⁰.

2.2.5. Nucléation/ croissance

Murphy et al. ont développé une synthèse dite «seeding-growth» qui comme son nom l'indique, consiste à découpler les étapes de nucléation/germination et croissance¹¹¹.

Dans une première étape, les germes (environ 2 nm) sont produits par réduction de HAuCl_4 par NaBH_4 . Puis, elles sont ajoutées à une solution de croissance contenant du sel d'or (HAuCl_4), un réducteur faible (acide ascorbique) et un tensioactif (CTAB). La méthode réside dans le fait que le réducteur est trop faible pour réduire Au(III) en Au(0) : la réduction ne peut se faire que lorsque les germes sont ajoutés car ils agissent comme des catalyseurs. Ceci a pour but d'éviter des nucléations indésirables dans l'étape de croissance. Cette approche permet de préparer des particules sphériques dans une gamme de taille 5-40 nm avec une dispersion relativement uniforme. Les étapes de croissance peuvent être répétées plusieurs fois en prenant comme germes les nanoparticules obtenues dans l'étape précédente¹¹².

D'autre part, Brown et al. ont remarqué que lors de synthèse des GNPs de diamètre variant de 20 à 100 nm par la méthode de croissance des germes, la présence de quelques nano-bâtonnets¹¹³. En effet, le CTAB ralentit sélectivement la croissance sur des facettes des germes d'or, et, l'ajout de sel d'or et de réducteurs, initie une croissance anisotrope pour former des bâtonnets, des cubes ou des étoiles¹¹⁴.

Cette synthèse a été donc étendue pour induire des croissances anisotropes (voir Figure 15). La revue de Dreaden^{87d} récapitule les dernières avancées dans la synthèse des nanoparticules non sphériques. L'équipe de M. El-Sayed¹¹⁵ a aussi notablement amélioré cette synthèse et a montré qu'en contrôlant les conditions de croissance, il était possible de synthétiser des nano-bâtonnets d'or et de moduler leur rapport d'anisotropie. Ils ont aussi constaté que l'ajout de nitrate d'argent (AgNO_3) varie le rendement, le rapport d'aspect des bâtonnets (longueur/diamètre) et leur

structure cristalline ¹¹⁶. Cette approche permet de contrôler la taille, la forme et la monodispersité. Cependant, la présence de CTAB pose une contrainte à l'utilisation de ces nanoparticules pour des applications biologiques à l'égard de sa toxicité à la concentration utilisée (0,1 M) ¹¹⁷. Cet excès de CTAB peut être éliminé par centrifugations et lavages successifs, mais entraîne l'agrégation des nanoparticules isolées. Plusieurs travaux récents, proposent des méthodes de synthèse de nano-bâtonnets stabilisés par échange de ligands permettant à la fois d'avoir des particules stables et biocompatibles ¹¹⁸.

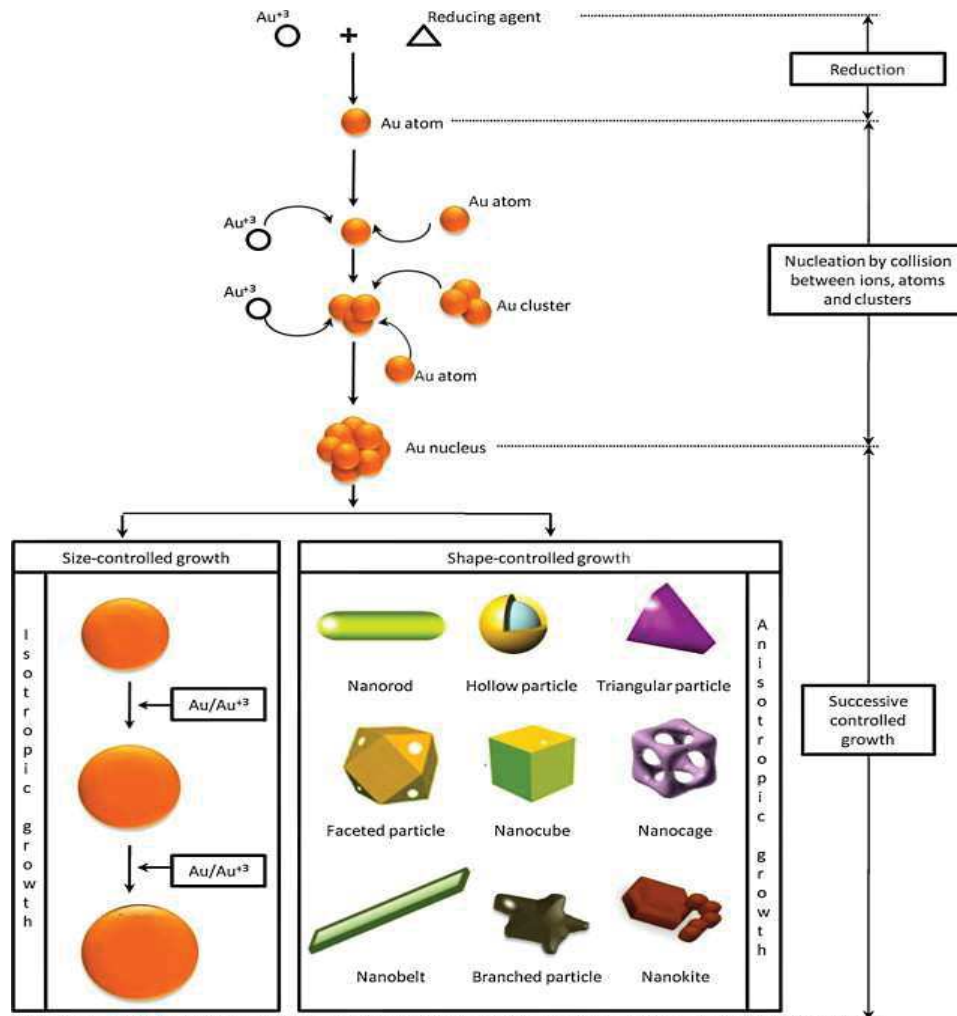


Figure 15 : Préparation par nucléation / croissance de nanoparticules d'or de tailles et de formes diverses. Figure reproduite de la réf. ¹¹⁹.

Bien évidemment, le design de particules de formes anisotropes n'est pas pour la beauté de ces formes exotiques mais pour les propriétés qui en découlent.

Quelles sont les raisons de cet attrait croissant pour les nanoparticules ? Quelles nouvelles spécificités les rendent intéressantes ? Nous allons expliquer dans la suite les particularités que présentent les « nanopépites » d'or.

2.3. Propriétés optiques

Comme énoncé précédemment, l'or sous forme nanométrique est doté de propriétés magnétiques, optiques, électroniques, catalytiques et biologiques uniques, différentes de celles du matériau massif correspondant ^{87b}. Par exemple, la petite taille des nanoparticules entraîne une augmentation du nombre d'atomes de surface qui devient non négligeable devant ceux du cœur. Ceci génère des sites de basse coordination, ce qui leur confère une réactivité catalytique considérable ¹²⁰.

Néanmoins, la propriété la plus frappante des solutions colloïdales d'or qui est à l'origine de l'engouement de nombreuses communautés scientifiques est la résonance de plasmon de surface localisée. En effet, l'or étant un métal conducteur, les électrons sont libres de mouvement au sein des particules mais ils y sont confinés. Ce confinement donne lieu à des propriétés optiques qu'on ne retrouve pas dans le cas des métaux massifs.

2.3.1. L'effet de confinement électronique

D'un point de vue électronique, un atome se caractérise par des niveaux d'énergie discrets, tandis qu'un métal massif possède des niveaux continus, appelés bandes de valence et de conduction. Une particule nanométrique dispose d'une structure électronique intermédiaire se situant entre l'état atomique et l'état massif ; ses niveaux énergétiques sont discrets, mais dégénérés par rapport à ceux de l'atome. La

Figure 16 représente schématiquement l'évolution de la structure électronique depuis les niveaux d'énergie discrets de l'atome vers les bandes d'énergie du solide massif ¹²¹.

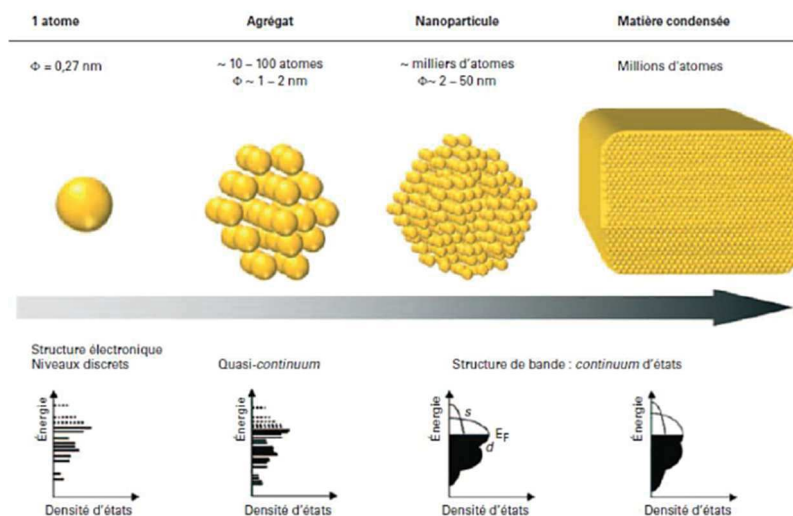


Figure 16 : Schéma des structures électroniques de l'atome, en passant de la particule à l'état macroscopique de l'or d'après ¹²².

Pour l'or, en passant de l'atome au solide, il y a hybridation de la bande 6s et de la bande 6p. La bande 5d la plus haute totalement occupée est appelée bande de valence, la bande 6sp, la plus basse vacante, est appelée bande de conduction. Le niveau de Fermi, (E_F sur la Figure 17) représente le niveau énergétique le plus haut occupé dans la bande de conduction. Des transitions inter-bandes des niveaux de cœur de la bande d vers des niveaux de la bande de conduction situés au-dessus du niveau de Fermi peuvent avoir lieu à partir d'un seuil d'énergie suffisamment bas pour être atteint avec des photons, du domaine visible ou du proche UV.

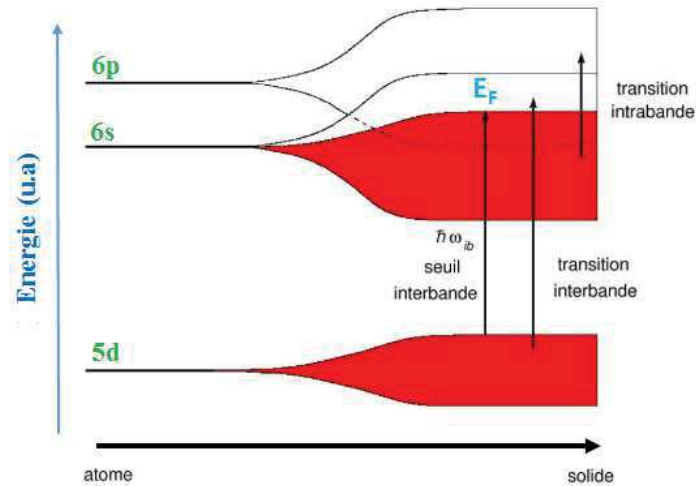


Figure 17 : Schéma simplifié du passage de la structure des niveaux d'énergie électronique discrets des atomes aux structures de bandes électroniques des solides à l'état massif, reproduit de ¹²³.

Ce confinement a pour conséquence une amplification de l'absorption ainsi que l'apparition d'une résonance. Cette résonance, appelée plasmon de surface, est identifiée dans le spectre d'absorption par une bande : la bande plasmon.

Si le plasmon de surface peut se propager dans au moins une direction de l'espace (cas des couches minces / nanofils) on parle de « plasmon polariton de surface » (*Surface Plasmon Polariton*, SPP). Dans le cas des nanoparticules, quand il n'y a pas de propagation possible, on utilise préférentiellement le terme « plasmon de surface localisé » (*Localized Surface Plasmon*, LSP). Par extension, ce phénomène est alors appelé la « résonance plasmon de surface localisé » (*Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR) ¹²³.

2.3.2. LSPR : résonance de plasmon de surface localisée

Une caractéristique des solutions colloïdales de GNPs est leur couleur rouge-rubis par opposition à l'or massif qui est jaune. La couleur observée est la complémentaire de celle absorbée par l'objet, et correspond donc au vert pour les GNPs. Cette variation de la longueur d'onde absorbée s'explique par le confinement de l'onde électromagnétique lumineuse dans les

nanoparticules. En effet, l'onde électromagnétique a une longueur d'onde (~ 520 nm) supérieure à la taille de la particule (quelques dizaines de nanomètres) si bien qu'elle "voit" l'onde comme un champ électrique uniforme et oscillant. Les électrons dans ce champ oscillent en bloc (voir Figure 18). Cependant, cette oscillation collective des électrons est contrariée par les dimensions réduites de la particule ¹²⁴.

Ces conditions entraînent une absorption importante de l'onde lumineuse aux alentours de 520 nm pour les particules sphériques ¹²⁵.

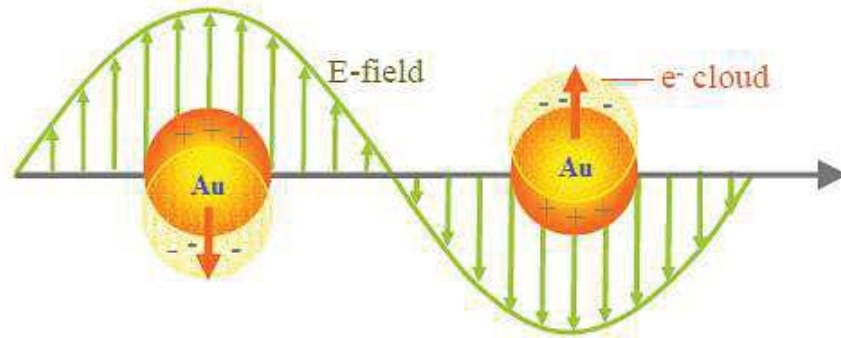


Figure 18 : Représentation schématique de l'oscillation des électrons de surface d'une GNP sphérique soumise à un champ électromagnétique, adaptée de la réf. ¹²⁶.

2.3.3. Paramètres modifiant la réponse optique des nanoparticules

Les caractéristiques de cette bande plasmon (position, largeur, amplitude spectrale et sensibilité à la polarisation de la lumière) dépendent non seulement des propriétés intrinsèques des nanoparticules (composition, structure, taille et forme) mais aussi de leur organisation et de l'environnement local ¹²⁶ (Figure 19). La connaissance de l'influence des différents paramètres géométriques et environnementaux des nanoparticules obtenues sur le profil des courbes d'extinction est d'une importance capitale pour la compréhension et l'amélioration des synthèses effectuées.

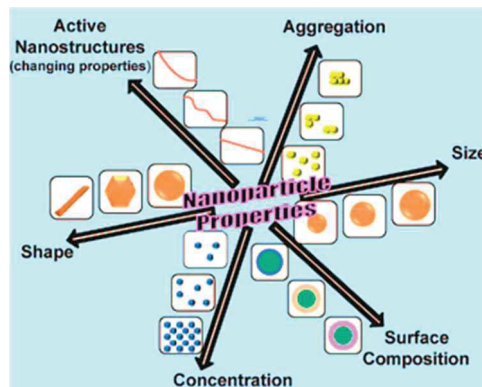


Figure 19 : Les paramètres influençant les propriétés optiques des nanoparticules d'or. Figure reproduite de la réf. ¹²⁷.

2.3.3.1. La taille des nanoparticules

La taille des nanoparticules est un paramètre important lors de l'interaction entre la lumière et les particules. En faisant varier la taille des nanoparticules, il est possible de faire varier la résonance plasmon sur toute la gamme du visible et du proche IR. Comme illustré dans la figure ci-dessous, la couleur d'une solution colloïdale d'or varie alors du bleu au rouge en passant par différentes teintes pourpres en réduisant la taille des GNPs¹²⁸. Généralement, une augmentation du diamètre entraîne un déplacement de ce pic vers le rouge ainsi qu'un accroissement de son intensité¹²⁹.

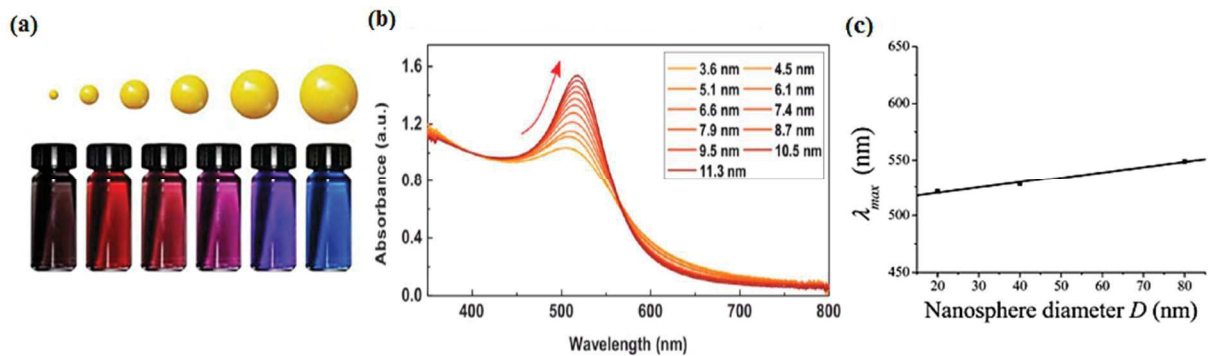


Figure 20 : Variation de la couleur (a), la position (b) et la longueur d'onde plasmon (c) des nanoparticules d'or sphériques en fonction de leur diamètre. Figures reproduites des réf. ^{128, 130}.

La bande plasmon n'est visible que pour des tailles supérieures à 2 nm. En dessous de cette taille la surface de la nanoparticule est trop faible pour qu'un plasmon de surface se crée¹³¹.

Cependant en augmentant la taille des particules, on observe l'apparition de résonances d'ordres supérieurs (multipolaires). Dans ce cas, il est nécessaire d'introduire les modes supérieurs pour pouvoir décrire les plasmon de surface.

La largeur à mi-hauteur de la bande de résonance plasmon augmente quand la taille de la particule diminue ainsi, Mie a pu tracer les spectres d'absorption et de diffraction des GNPs en fonction de la taille des nanoparticules sphériques (Figure 20-c)^{130a}.

En comparant la réponse optique de GNPs de même taille mais de formes différentes, l'équipe de C. Mirkin a démontré que pour décrire les propriétés plasmoniques dépendant de la taille des nanoparticules, il est important de se concentrer sur la distance le long de laquelle l'oscillation se produit plutôt que la forme intrinsèque des particules¹³².

2.3.3.2. La forme des nanoparticules

Lorsque les particules ne sont plus sphériques, le confinement et le déplacement des électrons de conduction sont naturellement modifiés. Suivant la géométrie de la particule, à chaque mode d'oscillation des électrons de surface va correspondre une fréquence de résonance qui va être propre à la géométrie de la particule. Dans le cas de GNPs de forme ellipsoïdale, la résonance

se dédouble. La bande plasmon est alors composée de deux bandes d'absorption dont les positions correspondent aux fréquences d'oscillation du mode transverse et du mode longitudinal. Ensuite pour des GNPs plus exotiques, les résonances peuvent être considérablement déplacées comme le montre la Figure 21-a. Ceci se traduit macroscopiquement par des suspensions allant de la couleur rouge-rubis aux couleurs tirant vers le bleu Figure 21-b. Ces effets colorés sont un premier diagnostic visuel, immédiat et très pratique des objets synthétisés.

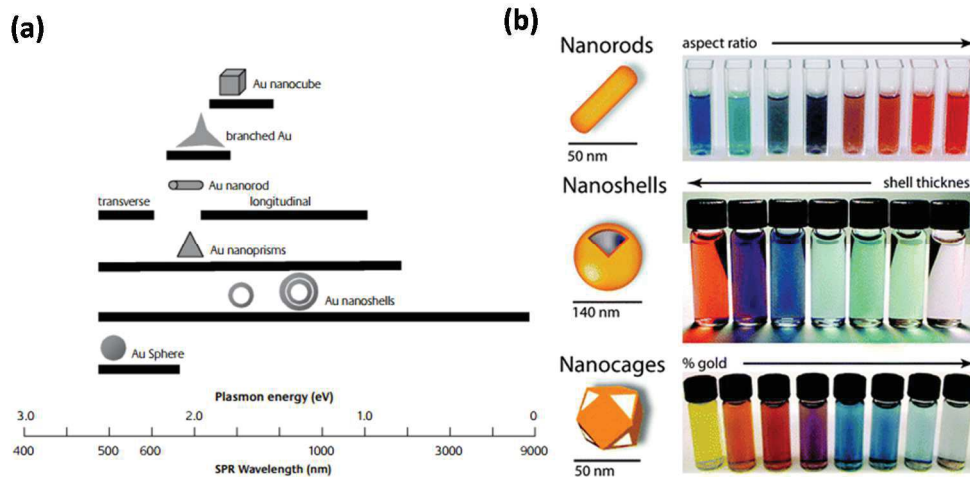


Figure 21 : Gamme de résonance plasmon (a) et de couleurs (b) de GNPs en fonction de leur géométrie. Figures reproduites des réf. ^{87d, 114f}.

Ainsi, au-delà du contrôle de la taille et de la monodispersité, le contrôle de la forme est un enjeu considérable. Des GNPs de différentes formes ont été synthétisées avec succès au cours des dernières années pour exploiter leurs propriétés optiques dans différentes applications ^{87d}.

2.3.3.3. Le milieu environnant

La polarisabilité d'une particule est une relation directe des permittivités relatives du métal et de la constante diélectrique du milieu environnant. Ainsi la réponse plasmonique d'une particule métallique est sensible à l'environnement local dans lequel elle se trouve par le biais de permittivité (ou l'indice de réfraction n) du milieu environnant ¹³³. Quand ce dernier augmente, la résonance se décale vers les grandes longueurs d'onde et sa largeur s'accroît ¹³⁴. La nature du ligand et son interaction chimique en surface va également moduler la fréquence de résonance. Ceci est dû à un effet d'écrantage des interactions électrostatiques répulsives entre particules.

La sensibilité au changement d'indice de réfraction du milieu augmente généralement quand les GNPs deviennent allongées et leurs sommets deviennent plus nets ¹³⁵. Comme mentionné

précédemment (cf. partie 2.3.3), le milieu environnant (le plus souvent l'agent stabilisant) est d'une grande importance car il empêche les particules de s'agréger.

2.3.3.4. L'interaction entre les particules (agrégation)

Nous avons vu que les plasmons sont le produit d'un couplage entre photons et oscillations collectives des électrons libres de la surface du métal. Par conséquent la présence d'un champ électrique proche généré par une source autre que le faisceau lumineux incident, peut avoir aussi un effet sur la réponse optique de la particule considérée ce qui est le cas quand les GNPs sont à proximité les unes des autres ¹³⁶. La fréquence d'absorption des modes couplés ainsi activés peut être contrôlée sur une plage de quelques dizaines voire de centaines de nanomètres en faisant varier l'espacement entre les nanoparticules ¹³⁷. Cet effet sera visible par un décalage en longueur d'onde ($\Delta\lambda$) et en intensité de la bande plasmon ¹³⁸. En champ proche, ce couplage peut induire une exaltation locale du champ électromagnétique donnant naissance à des «points chauds» (ou « hot spot » en anglais), qui peuvent être utilisés pour exalter de faibles signaux ¹³⁹.

Ainsi, en réduisant l'épaisseur de la coquille diélectrique de nanoparticules Au/SiO₂ de type cœur/coquille, Ung et *al.* ont ¹⁴⁰ montré qu'au fur et à mesure que les particules se rapprochent, le comportement optique devient de plus en plus anisotrope, le mode longitudinal augmente en intensité et se déplace vers le rouge tandis que le mode transverse diminue en intensité tout en se déplaçant vers le bleu jusqu'à l'agrégation (Figure 22). Ce décalage est dû au couplage accru entre les nanoparticules ¹⁴¹.

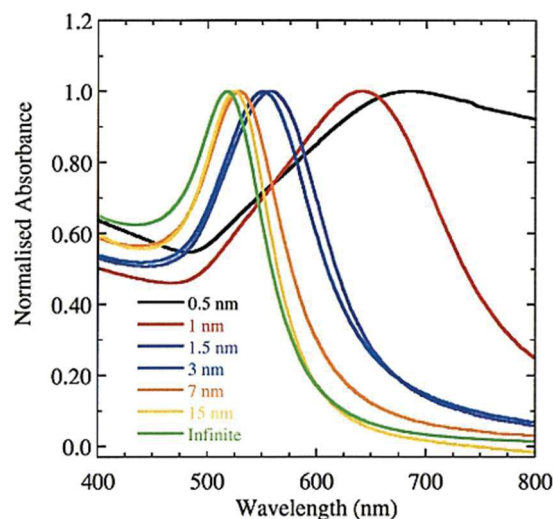


Figure 22 : Variation de la bande plasmon en fonction de la distance inter-particules. Figure reproduite de la réf. ¹⁴⁰.

Dès lors, il est possible de modifier la position spectrale du plasmon en contrôlant les interactions entre particules. Cette propriété a été mise au profit par le moyen de méthodes

numériques discutées dans la littérature pour analyser l'interaction de particules de forme quelconque en présence de substrat.

Ces calculs ont permis d'établir une relation exponentielle entre le décalage spectral normalisé par la longueur d'onde d'une particule isolée et la distance inter-particule normalisée par la taille des particules. Cette équation, généralement appelée équation du *plasmon ruler*, a été définie à partir de données expérimentales couplées à des simulations sur des nanodisques d'or de diamètre entre 5 et 50 nm ¹⁴². Par contre cette équation empirique ne prend pas en compte les décalages spectraux anormalement grands associés à l'apparition de nouvelles bandes lorsque les particules sont presque au contact. Néanmoins, elle permet de comparer différents dimères, étudiés en parallèle, à l'aide de leur réponse optique ^{142b}.

2.4. Bilan : l'immense potentiel des nanoparticules d'or

La synthèse et l'étude des propriétés des nanoparticules métalliques, en particulier les nanoparticules d'or est actuellement un domaine de recherche très actif. L'exploitation de ces particules en solution pour la conception de nouveaux dispositifs est alors d'un intérêt majeur. Les propriétés optiques confèrent à ces particules un intérêt crucial pour plusieurs applications telles que la détection, le diagnostic et la thérapie.

En fonction des applications visées, elles peuvent être obtenues par diverses méthodes présentant des avantages et des inconvénients. Les synthèses par réduction chimique permettent d'obtenir par des conditions réactionnelles et des stratégies très variées des particules sphériques monodisperses en taille et forme, stabilisées par des ligands faiblement liés à l'or, ce qui rend possible leur déplacement par d'autres molécules pour des fonctionnalisations ou greffages ultérieurs. De même, des particules possédant une grande variété de morphologies peuvent également être obtenues sous certaines conditions de synthèse.

L'effet plasmon a tendance à exacerber toutes les propriétés optiques des entités situées dans l'environnement proche de ces nanoparticules. Leur utilisation dans les applications telles que les biocapteurs colorimétriques que nous allons présenter dans la partie suivante sont basées essentiellement sur cet effet.

Leurs possibilités d'application sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leurs cœurs métalliques (propriétés optiques et électroniques ainsi que la variation de ces dernières en fonction de leur taille, leur forme et leur environnement), mais également à leurs grandes capacités de fonctionnalisation.

Partie 3

Les nanoparticules d'or pour les biocapteurs

Les nanoparticules d'or ont suscité un intérêt particulier dans le domaine des biocapteurs en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques exceptionnelles et la facilité de synthèse et fonctionnalisation. Cette partie a pour but de présenter l'état d'art sur l'exploitation des nanoparticules d'or pour l'amplification du signal et la nanostructuration des biocapteurs.

3.1. Introduction

Les propriétés physiques et chimiques uniques des nanoparticules d'or (GNPs) ont stimulé un intérêt croissant dans la conception d'une nouvelle génération de biocapteurs. Elles présentent en effet une excellente biocompatibilité et conductivité et sont dotées de propriétés structurales, électroniques, magnétiques, optiques et catalytiques uniques ce qui en fait des matériaux de choix pour la construction de biocapteurs avec une performance analytique améliorée par rapport à d'autres systèmes.

Dans une revue récente¹⁴³, les dernières avancées dans la construction de biocapteurs optiques, électrochimiques et piézoélectriques à base de GNPs sont passées en revue avec quelques exemples, en mettant l'accent sur le rôle que les GNPs jouent dans le processus de détection et l'amélioration des performances analytiques. Le Tableau 1 récapitule les différents biocapteurs à base de GNPs.

Le haut ratio surface/volume et la biocompatibilité des GNPs, font qu'elles fournissent un très grand nombre de sites d'interaction, améliorant ainsi la quantité et l'activité de l'élément de reconnaissance¹⁴⁴. De plus leur excellente biocompatibilité peut améliorer la stabilité de la reconnaissance biologique et la densité relativement haute des GNPs permet leur utilisation comme un amplificateur de masse¹⁴⁵.

Tableau 1: Les biocapteurs à base de GNPs ¹⁴³.

Type de biocapteurs	Principe de détection	Rôle des GNPs	Propriétés mises en jeu	Avantages	Exemples
Optique	Changement des propriétés optiques	changement de l'indice de réfraction	Grande constante diélectrique, haute densité, haut poids moléculaire.	Améliore la sensibilité	Biocapteurs à ADN 100 fois plus sensibles avec les GNPs ¹⁴⁶ .
		Augmentation du transfert électronique	Conductivité Dimension quantique	Améliore la sensibilité	Vitesse de transfert d'électrons de 5000/s et 700/s avec et sans les GNPs respectivement ¹⁴⁷ .
Electrochimique	Changement des caractéristiques électroniques	Plateforme d'immobilisation	Biocompatibilité, surface spécifique importante	Améliore la sensibilité et la stabilité	Diminution de la limite de détection du glucose à 0.18 µM ¹⁴⁸ .
		Catalyseur de réaction	Energie de surface élevée, Activité à l'interface	Améliore la sensibilité et la sélectivité	Biocapteur de NADH montre une diminution de 780 mV du potentiel sans médiateur de transfert électronique ¹⁴⁹ .
Piézoélectrique	Changement de masse	Immobilisation des biomolécules, amplification de masse.	Biocompatibilité, haute densité, rapport surface/volume élevé	Améliore la sensibilité	Biocapteurs d'ADN marqué au GNPs avec une limite de détection de 10 fM ^{145d} .
Spectroscopique (PM-IRRAS)	Augmentation de l'accessibilité	Immobilisation des biomolécules	Surface spécifique importante	Améliore la sensibilité	Augmente le nombre de récepteurs greffé ^{47a}

Pour avoir une haute sensibilité pour la détection de cibles, un certain nombre de stratégies d'amplification de détection/signal ont été développées à l'aide des GNPs de taille/forme diverses couplé à des étapes de reconnaissance comme l'hybridation d'ADN et la liaison anticorps/antigène en format sandwich. Ces stratégies incluent l'utilisation des GNPs comme des marqueurs du biorécepteur, nano-structurants du transducteur (Figure 23) ou pour la conception de biocapteurs colorimétriques.

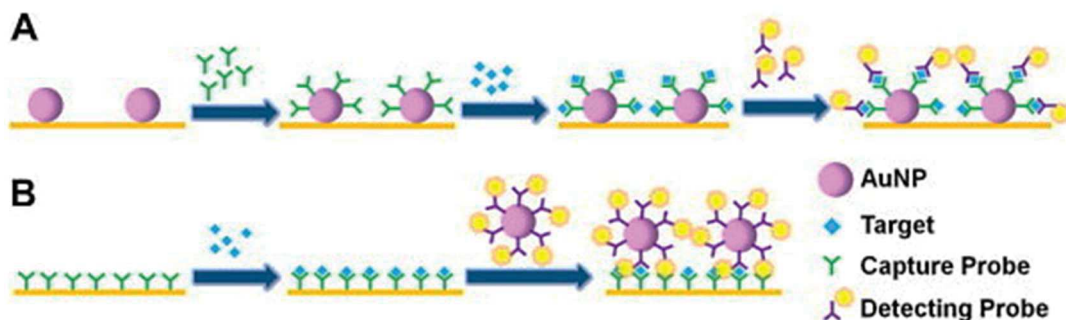


Figure 23 : Stratégies d'amplification du signal pour un immunocapteur en format sandwich. (A) GNPs immobilisés directement sur un substrat solide pour augmenter le nombre d'anticorps de capture à la surface du transducteur. (B) anticorps de révélation marqué par GNPs. Figure reproduite de la réf. ¹⁵⁰.

3.2. Les GNPs comme marqueurs du biorécepteur

Ces dernières années, les nanoparticules de différentes compositions et dimensions ont été largement utilisées comme des marqueurs polyvalents et sensibles pour la transduction de l'association entre différentes biomolécules ¹⁵¹. Par exemple, les GNPs ayant des propriétés (électronique, optique et magnétique) attachées aux molécules biologiques (par exemple des peptides, des protéines, des acides nucléiques, des anticorps) ont été développées pour l'utilisation dans des biocapteurs pour détecter et amplifier divers types de signaux ¹⁵². Cette nouvelle stratégie d'amplification du signal nécessite une attention particulière par rapport aux interactions non spécifiques qui pourraient avoir lieu. Pour une conjugaison idéale des protéines aux GNPs, les principaux critères pour "un ensemble d'outils" universels sont représentés dans la Figure 24.

Afin de fonctionnaliser les GNPs avec une protéine (en particulier un anticorps), trois fonctions principales peuvent être mises en jeu : $-NH_2$, $-COOH$ et $-SH$. Les différentes méthodes de fonctionnalisation des GNPs avec des anticorps seront décrites dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

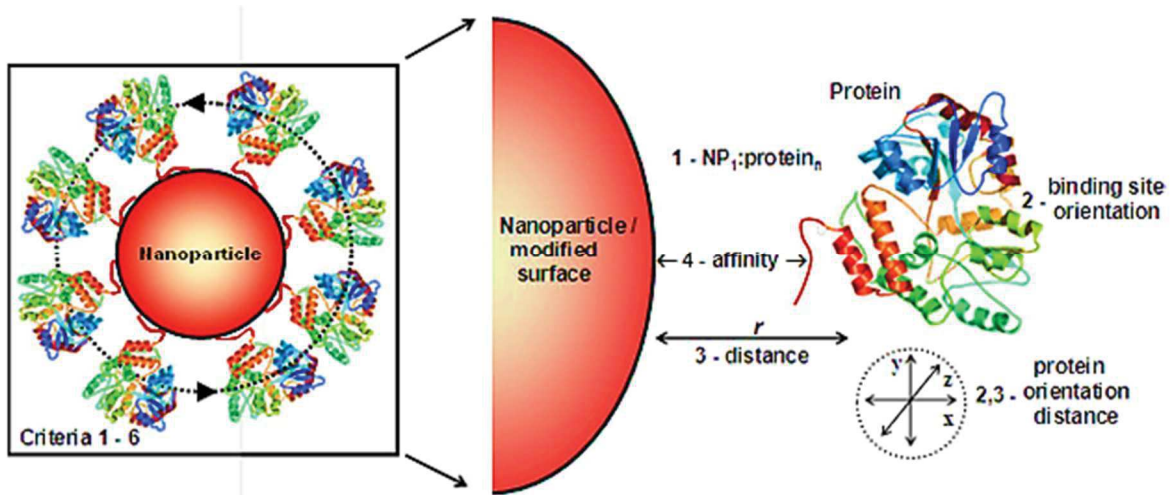


Figure 24 : Représentation schématique des six critères idéaux pour le contrôle de la conjugaison des GNPs aux protéines. Figure reproduite de la réf. ¹⁵³.

L'utilisation de biorécepteurs marqués avec des GNPs dans des formats de détection type sandwich permet d'augmenter la masse du complexe formé, donnant ainsi une augmentation de la sensibilité des dosages en QCM par exemple. Ceci est le cas dans les travaux rapportant la détection d'IgG humain ⁶⁷ et d'aflatoxine B ¹⁵⁴.

Chen et *al.* ont développé un biocapteur piézoélectrique pour la détection en temps réel du virus de la dengue par hybridation de brins d'ADN marqués par des GNPs illustré dans la Figure 25. Les GNPs ont été utilisées non seulement comme des amplificateurs pour améliorer la

sensibilité de détection, mais aussi comme des vérificateurs pour augmenter la spécificité de l'hybridation d'ADN ^{145a}.

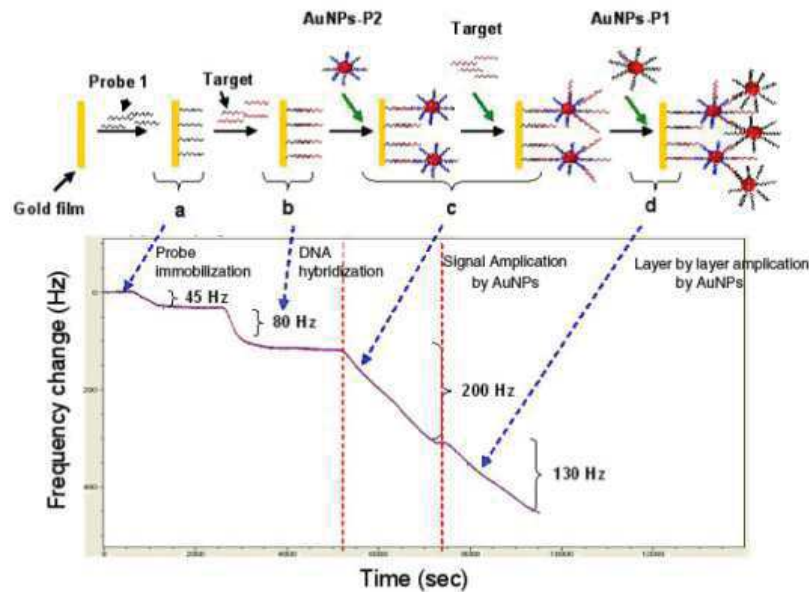


Figure 25 : Illustration schématique des différentes étapes de détection du virus de la dengue par QCM. Amplification du signal par des GNPs conjugués aux brins d'ADN. Figure reproduite de la réf. ^{145a}.

Récemment un biocapteur simple et sensible, a été développé, et appliqué directement au dosage de biomarqueurs de cancer de prostate dans du sérum humain (75 %) en utilisant un amplification par des anticorps modifiés par des GNPs ¹⁵⁵. Un quartz QCM composé de deux circuits microfluidiques permettant la mesure et le contrôle simultanément sur la surface du biocapteur a été utilisé dans ce travail. La même approche pour la détection de thrombine (enzyme provoquant la coagulation du sang) a permis une augmentation de la sensibilité de deux ordres de grandeur et d'atteindre une limite de détection de 0.1 nM ^{71c}. De même Kim et *al.* ont décrit un biocapteur sensible employant l'interaction streptavidine-biotine comme un système modèle ^{145h}.

3.3. Les GNPs comme agents de nanostructuration du transducteur

La bioactivité, la stabilité et la densité surfacique des éléments de reconnaissance immobilisés sur la surface du transducteur sont des enjeux majeurs dans les biocapteurs. Généralement, l'adsorption de biomolécules directement sur les surfaces peut aboutir à leur dénaturation et la perte de leur activité. Afin d'augmenter l'efficacité et la sensibilité d'interactions bio-

spécifiques, beaucoup d'attentions ont été portées au développement d'une couche interfaciale permettant l'immobilisation des biomolécules présentant une orientation contrôlée ¹⁵⁶.

Les GNPs sont des candidats excellents comme plateforme d'immobilisation. Ainsi la surface du capteur peut être structurée à l'échelle nanométrique par l'adsorption de nanoparticules, ce qui augmente la surface spécifique et la disponibilité des anticorps au sein de la couche sensible tout en conservant leur bioactivité et stabilité grâce à leur biocompatibilité et leur haute énergie de surface ^{47a, 85b, 157}.

Comparées aux surfaces planes, les surfaces modifiées par des GNPs sont des supports dotés d'une haute stabilité, d'une sensibilité significativement améliorée et une basse limite de détection pour l'analyse de biomolécules. Ainsi, plusieurs travaux ont exploré la contribution des GNPs pour l'immobilisation des biomolécules ¹⁵⁸.

Un travail intéressant de Kaufman et *al.* décrit les caractéristiques d'adsorption de trois protéines [l'albumine de sérum bovine (BSA), la myoglobine (Mb) et le cytochrome c (CytC)] sur des SAMs d'acide mercaptoundécanoïque (MUA) tant sur des GNPs que sur des surfaces planes d'or. La combinaison de mesures de QCM-D et de potentiel zêta en fonction du pH fournit des informations sur la structure de couche, la densité et le recouvrement de surface ¹⁵⁹.

Ces travaux ont montré que sur les surfaces nanostructurées, ces protéines ont tendance à former des monocouches stables tandis que sur les surfaces d'or planes, elles sont en multicouches.

La majorité des travaux faisant appel à cette stratégie d'amplification sont des biocapteurs d'ADN ¹⁶⁰. Fang et *al.* ¹⁶¹ ont immobilisé un oligonucléotide avec un groupement thiol sur des GNPs de 16 nm de diamètre, déposées sur une électrode d'or modifiée par la cystamine. La concentration surfacique d'ADN à la saturation sur l'électrode modifiée était environ 10 fois plus grande que celle sur une électrode d'or plane. Cette modification de la surface par des GNPs a été couplée à l'approche précédente d'amplification, comme l'illustre la Figure 26, a permis d'atteindre une limite de détection de 10^{-16} mol/L en QCM. Cette sensibilité est largement supérieure à celle mesurée avec une surface sans aucune modification ^{145d}.

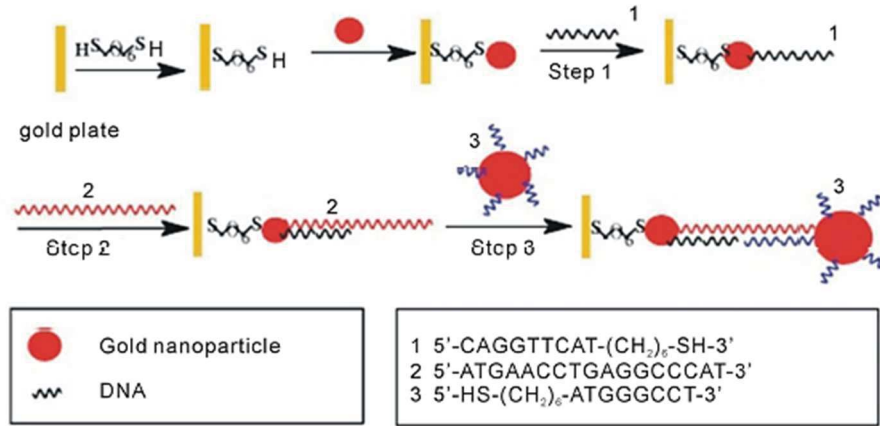


Figure 26 : Représentation schématique du processus de détection d'ADN en QCM d'un système amplifié à base de GNPs. Figure reproduite de la réf. ^{145d}.

Cependant, il a été montré que 20 nm est la taille de particules optimale pour avoir une augmentation maximale de la sensibilité. Des GNPs plus grandes se lient faiblement à la surface et sont donc détachées de la surface sous flux ¹⁶².

Récemment Chu et al. ont développé un immunocapteur de gliadine en immobilisant des GNPs de 25 nm à la surface d'une électrode de QCM ^{85c} permettant une augmentation du signal de 48% par rapport aux surface planes.

L'immobilisation des GNPs en surface permet non seulement la nanostructuration du transducteur mais aussi l'amélioration des propriétés optiques des biocapteurs SPR. En effet, un couplage électronique entre le plasmon localisé des GNPs (LSPR) et le plasmon de surface du film métallique permet d'améliorer de la sensibilité en SPR. Par la suite, une série de travaux différents ont porté sur des biocapteurs optiques à base de GNPs immobilisés en surface ^{146, 163}. Matsui et al. ¹⁶⁴ ont utilisé les polymères à empreinte moléculaires (MIP) pour immobiliser des GNPs en surface pour la détection de petites molécules (comme la dopamine) en SPR. Ils ont réussi à avoir une augmentation de la sensibilité avec le même temps de mesure et sans marqueur. Ils ont aussi constaté que le signal SPR était dépendant de la densité des GNPs en surface ¹⁶⁴.

Une autre spectroscopie qui peut considérablement profiter de l'immobilisation des GNPs en surface est la spectroscopie Raman en particulier le Raman exalté de surface (Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS) ¹⁶⁵. En présence de GNPs, il y a exaltation du signal Raman des molécules en surface. Cette exaltation peut atteindre plus de 6 ordres de grandeur ¹⁶⁶. Le SERS est largement utilisé pour la caractérisation chimique des matériaux et sa sensibilité permet d'atteindre des sensibilités de l'ordre de la monocouche ou de la molécule unique ¹⁶⁷ ce qui lui vaut d'être exploré dans le domaine des biocapteurs ¹⁶⁸.

Par ailleurs, une immobilisation sur un substrat optiquement transparent comme le verre permet d'avoir une transduction colorimétrique, qui est considérablement plus simple à mettre en œuvre puisqu'il s'agit de suivi UV-Visible de la bande plasmon localisée (LSPR) voire de lecture à l'œil nu ^{134a, 169}.

3.4. Biocapteurs colorimétriques

Lorsque les particules ($d > 3.5$ nm) se rapprochent, leur résonance se couple entraînant un décalage vers le rouge de la longueur d'onde de la bande plasmon. Ces effets sont d'autant plus marqués que les particules sont proches et ont permis de développer des biocapteurs optiques capables de suivre l'accrochage de biomolécules à leur surface.

De plus, grâce à leur haut coefficient d'extinction molaire et leurs propriétés plasmoniques sensibles à l'environnement immédiat (Cf. paragraphe 0), les GNPs offrent des possibilités de transformer des interactions moléculaires en signaux colorimétriques aisément détectables qui peuvent être mesurés par des équipements de laboratoire standards et parfois même à l'œil nu. Il est donc possible de concevoir des structures dynamiques sensibles à la présence d'une cible d'intérêt entraînant l'agrégation des particules, ce qui modifie drastiquement la couleur de la suspension colloïdale. Ce type de biocapteur est appelé biocapteur colorimétrique.

Ils permettent de générer une réponse prévisible et reproductible qui est proportionnelle à la concentration ou à l'activité d'une cible particulière sans interférence avec d'autres substances. L'amplification du champ électrique est limitée dans la proximité immédiate des GNPs et décroît exponentiellement en s'éloignant et devient négligeable si l'écart entre les deux particules excède environ 2,5 fois la longueur d'axe court des particules ^{133c, 170}. Afin d'obtenir une réponse colorimétrique détectable (formation d'agrégats denses), la distance interparticulaire doit être plus petite que le diamètre de particules. Un autre défi du développement de dosages colorimétriques à base de nanoparticules est de concevoir des récepteurs qui sont relativement petits. En plus d'être petits, les récepteurs doivent être aussi spécifiques.

Les premiers capteurs colorimétriques ont été développés par le groupe de Chad Mirkin en 1997 ¹⁷¹ et se basent sur le couplage plasmon entre des particules proches. Le principe est schématisé dans la

Figure 27. Deux groupes de nanoparticules sont fonctionnalisés avec des brins d'ADN non complémentaires. En présence du brin complémentaire, les GNPs s'agrègent (à gauche) donnant un changement de la couleur de la solution du rouge au bleu (à droite). ¹⁷²

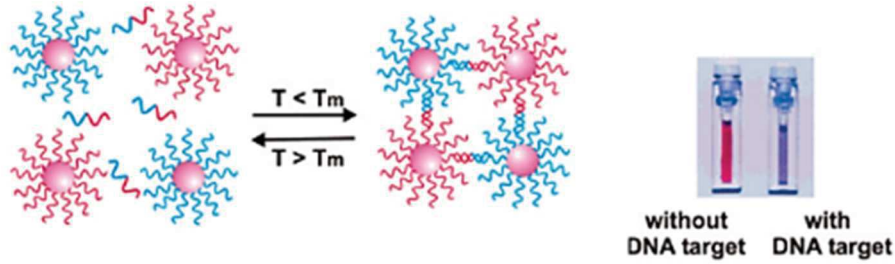


Figure 27 : Schéma de principe du biocapteur colorimétrique.

Etant donné que les GNPs peuvent être fonctionnalisées par plusieurs types de biorécepteurs, ce biocapteur exemplaire s'est étendu rapidement aux analyses biologiques pour une variété d'analytes ¹⁵², incluant des acides nucléiques, des protéines ¹⁷³, des toxines ¹⁷⁴, des petites molécules, des ions métalliques ¹⁷⁵ et même des cellules.

La clé de la maîtrise d'une telle plateforme de détection est le contrôle du processus d'agrégation / dispersion en présence de l'analyte d'intérêt, c'est-à-dire, la capacité à réguler les forces attractives et répulsives entre les particules ce qui détermine si les particules sont à l'état stabilisé (dispersées) ou agrégé. Comprendre tous les facteurs qui régissent de tels systèmes fournira des idées sur les stratégies de conception de ces dosages colorimétriques.

Plusieurs molécules de reconnaissance et stratégies d'essais proposées sont décrites dans la littérature ¹⁵². Le dénominateur commun est que cette reconnaissance entraîne l'augmentation ou la diminution de la stabilité colloïdale, menant à l'agrégation ou à la redispersion des nanoparticules. La dernière stratégie est de loin la plus commune à cause de la tendance inhérente de nanoparticules à s'agréger et parce que l'accumulation est souvent irréversible.

Le déplacement de la bande plasmon peut atteindre les 300 nm et donc le changement de couleur peut être détecté à l'œil nu, sans avoir besoin d'instrumentation sophistiquée pour des essais qualitatifs. Pour une analyse quantitative, les spectres UV-vis sont enregistrés normalement à la saturation ou à un temps arbitraire, étant donné que l'agrégation est un processus continu.

La différence entre l'absorbance à 520 nm, qui correspond aux particules dispersées et celle à une longueur d'onde plus grande, qui correspond aux particules agrégées, est souvent utilisée pour quantifier l'analyte. Typiquement la limite de détection (LOD) des dosages colorimétriques, sans étape d'amplification de signal, est dans la gamme du nM- μ M selon la stratégie et l'affinité du biorécepteur utilisé ¹⁷⁶. Ce type de détection est devenu rapidement une alternative aux techniques de détection conventionnelles.

La plupart des travaux sur les biocapteurs colorimétriques exploitent la LSPR des GNPs sphériques, mais ce format de détection est aussi applicable aux particules non-sphériques ¹⁷⁷.

L'un des avantages de l'utilisation de particules allongées est leur sensibilité aux changements de l'environnement diélectrique local et leur gamme spectrale étendue et la possibilité d'avoir des formats de détection multiples ^{177c}.

L'agrégation contrôlée de GNPs peut être réalisée par la présence d'une molécule intermédiaire (« interparticle crosslinking aggregation mechanism ») ayant une affinité pour le récepteur lié aux GNPs, ou par le déplacement des stabilisants des GNPs (« non crosslinking aggregation mechanism ») (Figure 28). Dans le premier mécanisme, l'agrégation des GNPs se produit en présence de la cible qui joue le rôle d'intermédiaire (cross-linker) et permet de lier les GNPs les unes aux autres, ou par interaction directe entre des particules modifiées par le récepteur ou la cible. Jusqu'à présent, c'est le mécanisme le plus souvent utilisé.

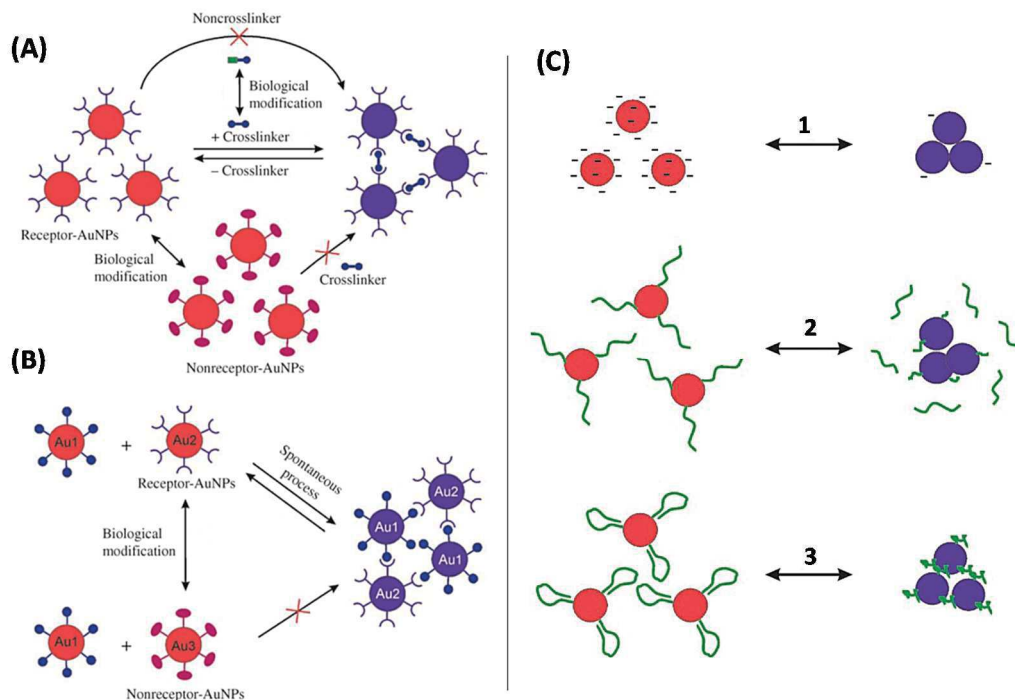


Figure 28 : Représentation schématique des différentes stratégies d'agrégation des GNPs dans les biocapteurs colorimétriques. Mécanisme de réticulation par interaction avec la cible non immobilisée sur les GNPs (A) ou par interaction directe entre les particules fonctionnalisées par la cible ou le biorécepteur (B). Mécanisme de non-réticulation par déplacement des stabilisants des GNPs (C) par la perte des interactions électrostatiques (1), de la stabilisation par effet stérique (2), le changement de conformation d'un polymère (3).

3.5. Bilan : les nanoparticules d'or, nouveau pan des biocapteurs

Aujourd'hui, l'intérêt pour les GNPs reste encore vif avec des applications dans différents domaines. Les études décrites ci-dessus démontrent les performances avantageuses des GNPs pour les biocapteurs.

Leurs possibilités d'application dans ce domaine sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur cœur métallique mais aussi et surtout à leurs propriétés optiques, électroniques ainsi que leurs énormes capacités de fonctionnalisation.

Rendre de telles nanostructures optiquement sensibles à des molécules permet alors de sonder et d'analyser la matière à l'échelle du nanomètre et est une approche séduisante pour le développement de biocapteurs ultrasensibles. De plus, le changement de couleur prévisible pendant l'agrégation des GNPs (ou leur redispersion) fournit une plate-forme élégante pour la détection. Ainsi, les GNPs ont été explorées dans le développement de nouveaux formats de détection en une seule étape (single-step immunoassay formats). Cette technique est très sensible et fournit une méthode type "test décisif" pour détecter la présence de cibles.

Indépendamment du rôle que jouent les GNPs dans le processus de détection, les GNPs offrent plusieurs avantages par rapport aux formats de dosage conventionnels tels que une simple préparation, une bonne stabilité, une utilisation facile, en temps réel et à cout faible.

Afin d'exploiter au mieux les propriétés des GNPs au service des biocapteurs, le design de biocapteurs avec une capacité de sonder des cibles multiples est un enjeu crucial. Une autre direction de recherche prometteuse est la production de GNPs avec une bonne stabilité à long terme dans des environnements divers. De plus, comme la taille et la forme influencent grandement sur les propriétés optiques et électriques des GNPs, il est primordial de maîtriser la synthèse de GNPs avec une géométrie bien définie. D'autre part, l'effort dans l'amélioration des performances analytique à l'étape de détection en termes de prévention de l'adsorption non spécifique de biomolécules sur les GNPs, ou la réduction du temps d'analyse, mérite aussi l'attention.

Le challenge aujourd'hui est de comprendre et maîtriser les mécanismes à l'origine de leur synthèse et de leur organisation en surface. Etre capable de placer les nanoparticules sur une position donnée apparait comme être un pré-requis primordial en vue de leur intégration dans les biocapteurs. Cette étape n'est pas encore maîtrisée et les stratégies décrites dans la littérature n'aboutissent pas nécessairement à l'obtention de surfaces nanostructurées régulières, bien

ordonnées et bien définies. Des agrégats ou des particules dont la répartition sur la surface est inhomogène sont souvent rencontrés.

Références bibliographiques

1. Clark, L. C., Monitor and control of blood and tissue oxygen measurements. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* **1956**, 2 (1), 41-48.
2. Clark, L. C.; Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1962**, 102 (1), 29-45.
3. Updike, S. J.; Hicks, G. P., The enzyme electrode. *Nature* **1967**, 214 (5092), 986-8.
4. Wang, J., Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis* **2001**, 13 (12), 983-988.
5. Turner, A. P. F., Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (8), 3184-3196.
6. (a) Lafleur, J. P.; Jonsson, A.; Senkbeil, S.; Kutter, J. P., Recent advances in lab-on-a-chip for biosensing applications. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, 76, 213-233; (b) Luka, G.; Ahmadi, A.; Najjaran, H.; Alocilja, E.; DeRosa, M.; Wolthers, K.; Malki, A.; Aziz, H.; Althani, A.; Hoorfar, M., Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications. *Sensors* **2015**, 15 (12), 30011-30031.
7. Gruhl, F. J.; Rapp, B. E.; Lange, K., Biosensors for diagnostic applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2013**, 133, 115-48.
8. (a) Van Dyk, J. S.; Pletschke, B., Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* **2011**, 82 (3), 291-307; (b) Verma, N.; Bhardwaj, A., Biosensor Technology for Pesticides—A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, 175 (6), 3093-3119.
9. (a) Mello, L. D.; Kubota, L. T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* **2002**, 77 (2), 237-256; (b) Patel, P. D., (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, 21 (2), 96-115; (c) Monosik, R.; Stredansky, M.; Tkac, J.; Sturdik, E., Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Analytical Methods* **2012**, 5 (1), 40-53.
10. (a) Burnworth, M.; Rowan, S. J.; Weder, C., Fluorescent Sensors for the Detection of Chemical Warfare Agents. *Chemistry – A European Journal* **2007**, 13 (28), 7828-7836; (b) Clark, D. P.; Pazdernik, N. J., Chapter 22 - Biological Warfare: Infectious Disease and Bioterrorism. In *Biotechnology (Second Edition)*, Academic Cell: Boston, 2016; pp 687-719.
11. Fornaro, T.; Brucato, J. R.; Pucci, A.; Branciamore, S., Development of extraction protocols for life detection biosensor-based instruments. *Planetary and Space Science* **2013**, 86, 75-79.
12. Turner, A. P. F., Biosensors and bioelectronics 20 years on. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20 (12), 2387.
13. Culler, D. E.; Mulder, H., Smart sensors to network the world. *Sci. Am.* **2004**, 290 (6), 84-91.
14. May, M., Building a better biosensor. *Scientist* **2004**, 18 (10), 36-38.
15. Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S., *Biosensors : fundamentals and applications*. Oxford University Press: Oxford [etc.], 1987.
16. Sethi, R. S., Transducer aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **1994**, 9 (3), 243-264.
17. Sang, S.; Wang, Y.; Feng, Q.; Wei, Y.; Ji, J.; Zhang, W., Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, 36 (3), 465-81.
18. Haab, B. B., Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. *Proteomics* **2003**, 3 (11), 2116-2122.
19. Collings, A. F.; Frank, C., Biosensors: recent advances. *Rep. Prog. Phys.* **1997**, 60 (11), 1397.
20. Lowe, R. S., Overview of biosensor and bioarray technologies. *Handbook of Biosensors and Biochips* **2008**.
21. Leca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J., Enzyme for biosensing applications. In *Recognition Receptors in Biosensors*, 2010; pp 177-220.
22. Tothill, I. E., Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Comput. Electron. Agric.* **2001**, 30 (1-3), 205-218.
23. Tothill, I. E.; Turner, A. P. F., Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1996**, 15 (5), 178-188.

24. Lippa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *314* (1–2), 1-26.
25. Buch, R. M.; Rechnitz, G. A., Intact chemoreceptor-based biosensors: responses and analytical limits. *Biosensors* **1989**, *4* (4), 215-230.
26. (a) Lowe, C. R.; Yon Hin, B. F. Y.; Cullen, D. C.; Evans, S. E.; Gray Stephens, L. D.; Maynard, P., Eight international symposium on affinity chromatography and biological recognition Biosensors. *J. Chromatogr. A* **1990**, *510*, 347-354; (b) Madou, M.; Tierney, M. J., Required technology breakthroughs to assume widely accepted biosensors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1993**, *41* (1), 109-128.
27. (a) Ramírez, N. B.; Salgado, A. M.; Valdman, B., The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: Problems and perspectives. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2009**, *26* (2), 227-249; (b) Donahue, A. C.; Albitar, M., Antibodies in Biosensing. In *Recognition Receptors in Biosensors*, Zourob, M., Ed. 2010; pp 221-248.
28. (a) Killard, A. J.; Deasy, B.; O'Kennedy, R.; Smyth, M. R., Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1995**, *14* (6), 257-266; (b) Maraldo, D.; Rijal, K.; Campbell, G.; Mutharasan, R., Method for label-free detection of femtogram quantities of biologics in flowing liquid samples. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (7), 2762-70.
29. (a) Trilling, A. K.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H., Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst* **2013**, *138* (6), 1619-1627; (b) Baniukevic, J.; Hakki Boyaci, I.; Goktug Bozkurt, A.; Tamer, U.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A., Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 281-8; (c) Lin, P.-C.; Weinrich, D.; Waldmann, H., Protein Biochips: Oriented Surface Immobilization of Proteins. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211* (2), 136-144.
30. Wright, K., Antibodies a laboratory manual. *Biochemical Education* **1989**, *17* (4), 220-220.
31. Saerens, D.; Huang, L.; Bonroy, K.; Muyltermans, S., Antibody Fragments as Probe in Biosensor Development. *Sensors* **2008**, *8* (8), 4669-4686.
32. Goodchild, S.; Love, T.; Hopkins, N.; Mayers, C., Engineering Antibodies for Biosensor Technologies. In *Adv. Appl. Microbiol.*, Allen I. Laskin, J. W. B. G. M. G.; Sima, S., Eds. Academic Press: 2005; Vol. Volume 58, pp 185-226.
33. Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27* (3), 2985-2993.
34. Reverberi, R.; Reverberi, L., Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus* **2007**, *5* (4), 227-40.
35. (a) Hock, B., The Second Workshop on Biosensors and Bioanalytical Techniques in Environmental Analysis Antibodies for immunosensors a review. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347* (1), 177-186; (b) Yoon, J.-Y., Immunosensors. In *Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors*, Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 229-255.
36. Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16* (1–2), 121-131.
37. Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (2), 232-254.
38. Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S., Optical Biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 423-461.
39. (a) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I., Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10* (8), i-ix; (b) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
40. Shankaran, D. R.; Gobi, K. V.; Miura, N., Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors Actuators B: Chem.* **2007**, *121* (1), 158-177.
41. Naimushin, A. N.; Soelberg, S. D.; Nguyen, D. K.; Dunlap, L.; Bartholomew, D.; Elkind, J.; Melendez, J.; Furlong, C. E., Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17* (6–7), 573-584.
42. Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1* (7), 515-528.

43. Enrico, D. L.; Manera, M. G.; Montagna, G.; Cimaglia, F.; Chiesa, M.; Poltronieri, P.; Santino, A.; Rella, R., SPR based immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. *Optics Communications* **2013**, *294*, 420-426.
44. Gobi, K. V.; Iwasaka, H.; Miura, N., Self-assembled PEG monolayer based SPR immunosensor for label-free detection of insulin. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (7), 1382-1389.
45. (a) Daniels, P. B.; Deacon, J. K.; Eddowes, M. J.; Pedley, D. G., Surface plasmon resonance applied to immunosensing. *Sensors and Actuators* **1988**, *15* (1), 11-18; (b) Mayo, C. S.; Hallock, R. B., Immunoassay based on surface plasmon oscillations. *J. Immunol. Methods* **1989**, *120* (1), 105-114.
46. Pradier, C. M.; Salmain, M.; Boujday, S., Chapter 7 - IR spectroscopy for biorecognition and molecular sensing. In *Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy*, Elsevier: Amsterdam, 2011; pp 167-216.
47. (a) Morel, A.-L.; Boujday, S.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.; Pradier, C.-M., Biosensors elaborated on gold nanoparticles, a PM-IRRAS characterisation of the IgG binding efficiency. *Talanta* **2011**, *85* (1), 35-42; (b) Briand, E.; Salmain, M.; Compère, C.; Pradier, C.-M., Anti-rabbit immunoglobulin G detection in complex medium by PM-RAIRS and QCM: Influence of the antibody immobilisation method. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (12), 2884-2890.
48. Boujday, S.; de la Chapelle, M. L.; Srajer, J.; Knoll, W., Enhanced Vibrational Spectroscopies as Tools for Small Molecule Biosensing. *Sensors (Basel)* **2015**, *15* (9), 21239-64.
49. Skládal, P.; Minunni, M.; Mascini, M.; Kolář, V.; Fránek, M., Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microbalance in solution. *J. Immunol. Methods* **1994**, *176* (1), 117-125.
50. Curie, J.; Curie, P., Développement Par Compression de L'électricité Polaire Dans Les Cristaux Hémicèdres À Faces Inclinées. *Bull. la Société Minéralogique Fr* **1880**, *3*, 90-93.
51. (a) Rodahl, M.; Höök, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B., Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66* (7), 3924-3930; (b) O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G., Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14* (8-9), 663-670.
52. Sauerbrey, G., Use of quartz vibrator for weighing thin layers and as a micro-balance. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155* (2), 206-222.
53. Nomura, T.; Hattori, O., Determination of micromolar concentrations of cyanide in solution with a piezoelectric detector. *Anal. Chim. Acta* **1980**, *115*, 323-326.
54. Höök, F.; Kasemo, B., The QCM-D Technique for Probing Biomacromolecular Recognition Reactions. In *Piezoelectric Sensors*, Janshoff, A.; Steinem, C., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 425-447.
55. Passamano, M.; Pighini, M., QCM DNA-sensor for GMOs detection. *Sensors Actuators B: Chem.* **2006**, *118* (1-2), 177-181.
56. (a) Shons, A.; Dorman, F.; Najarian, J., An immunospecific microbalance. *Journal of Biomedical Materials Research* **1972**, *6* (6), 565-570; (b) Höök, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B., Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody-Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1998**, *14* (4), 729-734.
57. (a) Wei, X. L.; Mo, Z. H.; Li, B.; Wei, J. M., Disruption of HepG2 cell adhesion by gold nanoparticle and Paclitaxel disclosed by in situ QCM measurement. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2007**, *59* (1), 100-4; (b) Lord, M. S.; Modin, C.; Foss, M.; Duch, M.; Simmons, A.; Pedersen, F. S.; Besenbacher, F.; Milthorpe, B. K., Extracellular matrix remodelling during cell adhesion monitored by the quartz crystal microbalance. *Biomaterials* **2008**, *29* (17), 2581-2587.
58. Liu, Y.; Yu, X.; Zhao, R.; Shanguan, D.-H.; Bo, Z.; Liu, G., Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18* (11), 1419-1427.
59. Wiseman, M. E.; Frank, C. W., Antibody Adsorption and Orientation on Hydrophobic Surfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (3), 1765-1774.
60. Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H., Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (24), 5796-5804.

61. Reviakine, I.; Johannsmann, D.; Richter, R. P., Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (23), 8838-8848.
62. Höök, F.; Vörös, J.; Rodahl, M.; Kurrat, R.; Böni, P.; Ramsden, J. J.; Textor, M.; Spencer, N. D.; Tengvall, P.; Gold, J.; Kasemo, B., A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2002**, *24* (2), 155-170.
63. Boujday, S.; Methivier, C.; Beccard, B.; Pradier, C. M., Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: comparing the efficiency of Fourier transform-surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance with dissipation measurements, and polarization modulation-reflection absorption infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* **2009**, *387* (2), 194-201.
64. Golosovsky, M.; Lirtsman, V.; Yashunsky, V.; Davidov, D.; Aroeti, B., Midinfrared surface-plasmon resonance: A novel biophysical tool for studying living cells. *J. Appl. Phys.* **2009**, *105* (10), 102036.
65. Fredriksson, C.; Kihlman, S.; Rodahl, M.; Kasemo, B., The Piezoelectric Quartz Crystal Mass and Dissipation Sensor: A Means of Studying Cell Adhesion. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1998**, *14* (2), 248-251.
66. Rogers, K. R., Principles of affinity-based biosensors. *Mol. Biotechnol.* **2000**, *14* (2), 109-129.
67. Chu, X.; Zhao, Z.-L.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q., Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex. *Sensors Actuators B: Chem.* **2006**, *114* (2), 696-704.
68. Richards, J. C.; Bach, D. T., Signal amplification in an assay employing a piezoelectric oscillator. Google Patents: 1989.
69. Shen, J.; Li, Y.; Gu, H.; Xia, F.; Zuo, X., Recent development of sandwich assay based on the nanobiotechnologies for proteins, nucleic acids, small molecules, and ions. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7631-77.
70. Pei, X.; Zhang, B.; Tang, J.; Liu, B.; Lai, W.; Tang, D., Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 1-18.
71. (a) Liu, F.; Li, Y.; Su, X.-L.; Slavik, M. F.; Ying, Y.; Wang, J., QCM immunosensor with nanoparticle amplification for detection of Escherichia coli O157:H7. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* **2007**, *1* (4), 161-168; (b) Zhu, Z.; Su, Y.; Li, J.; Li, D.; Zhang, J.; Song, S.; Zhao, Y.; Li, G.; Fan, C., Highly Sensitive Electrochemical Sensor for Mercury(II) Ions by Using a Mercury-Specific Oligonucleotide Probe and Gold Nanoparticle-Based Amplification. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (18), 7660-7666; (c) Chen, Q.; Tang, W.; Wang, D.; Wu, X.; Li, N.; Liu, F., Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (2), 575-579; (d) Uludag, Y.; Tothill, I. E., Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (14), 5898-5904; (e) Luo, Y.; Liu, T.; Zhu, J.; Kong, L.; Wang, W.; Tan, L., Label-Free and Sensitive Detection of Thrombomodulin, a Marker of Endothelial Cell Injury, Using Quartz Crystal Microbalance. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (22), 11277-11284; (f) Masdor, N. A.; Altintas, Z.; Tothill, I. E., Sensitive detection of Campylobacter jejuni using nanoparticles enhanced QCM sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 328-336.
72. Ebersole, R. C.; Ward, M. D., Amplified mass immunosorbent assay with a quartz crystal microbalance. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (26), 8623-8628.
73. Su, X.; Chew, F. T.; Li, S. F. Y., Design and Application of Piezoelectric Quartz Crystal-based Immunoassay. *Anal. Sci.* **2000**, *16* (2), 107-114.
74. Storri, S.; Santoni, T.; Minunni, M.; Mascini, M., Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13* (3), 347-357.
75. Steen Redeker, E.; Ta, D. T.; Cortens, D.; Billen, B.; Guedens, W.; Adriaensens, P., Protein Engineering For Directed Immobilization. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (11), 1761-1777.
76. Samanta, D.; Sarkar, A., Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2567-2592.

77. Lebec, V.; Landoulsi, J.; Boujday, S.; Poleunis, C.; Pradier, C. M.; Delcorte, A., Probing the Orientation of β -Lactoglobulin on Gold Surfaces Modified by Alkyl Thiol Self-Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (22), 11569-11577.
78. Lebec, V.; Boujday, S.; Poleunis, C.; Pradier, C. M.; Delcorte, A., Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Investigation of the Orientation of Adsorbed Antibodies on SAMs Correlated to Biorecognition Tests. *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118* (4), 2085-2092.
79. (a) Kurosawa, S.; Nakamura, M.; Park, J. W.; Aizawa, H.; Yamada, K.; Hirata, M., Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20* (6), 1134-9; (b) Makaraviciute, A.; Ruzgas, T.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A., A QCM-D Study of Reduced Antibody Fragments Immobilized on Planar Gold and Gold Nanoparticle Modified Sensor Surfaces. *Key Eng. Mater.* **2014**, *605*, 340-343.
80. Wilchek, M.; Bayer, E. A., The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* **1988**, *171* (1), 1-32.
81. (a) Babacan, S.; Pivarnik, P.; Letcher, S.; Rand, A. G., Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15* (11-12), 615-21; (b) Serizawa, T.; Nagasaka, Y.; Matsuno, H.; Shimoyama, M.; Kurita, K., A Stereocomplex Platform Efficiently Detecting Antigen–Antibody Interactions. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (2), 355-362; (c) Guilbault, G. G.; Hock, B.; Schmid, R., A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7* (6), 411-419; (d) Gerdon, A. E.; Wright, D. W.; Cliffel, D. E., Quartz Crystal Microbalance Detection of Glutathione-Protected Nanoclusters Using Antibody Recognition. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (1), 304-310.
82. Akerstrom, B.; Bjorck, L., A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (22), 10240-7.
83. Boujday, S.; Bantegnie, A.; Briand, E.; Marnet, P.-G.; Salmain, M.; Pradier, C.-M., In-Depth Investigation of Protein Adsorption on Gold Surfaces: Correlating the Structure and Density to the Efficiency of the Sensing Layer. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (21), 6708-6715.
84. Briand, E.; Salmain, M.; Compère, C.; Pradier, C.-M., Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2006**, *53* (2), 215-224.
85. (a) Fonseca, R. A.; Ramos-Jesus, J.; Kubota, L. T.; Dutra, R. F., A nanostructured piezoelectric immunosensor for detection of human cardiac troponin T. *Sensors (Basel)* **2011**, *11* (11), 10785-97; (b) Tang, D.-Q.; Zhang, D.-J.; Tang, D.-Y.; Ai, H., Amplification of the antigen–antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back-filling immobilization of nanogold on biorecognition surface. *J. Immunol. Methods* **2006**, *316* (1–2), 144-152; (c) Chu, P.-T.; Lin, C.-S.; Chen, W.-J.; Chen, C.-F.; Wen, H.-W., Detection of Gliadin in Foods Using a Quartz Crystal Microbalance Biosensor That Incorporates Gold Nanoparticles. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60* (26), 6483-6492.
86. (a) Deng, X.; Chen, M.; Fu, Q.; Smeets, N. M. B.; Xu, F.; Zhang, Z.; Filipe, C. D. M.; Hoare, T., A Highly Sensitive Immunosorbent Assay Based on Biotinylated Graphene Oxide and the Quartz Crystal Microbalance. *ACS applied materials & interfaces* **2016**, *8* (3), 1893-1902; (b) Makaraviciute, A.; Ruzgas, T.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A., Antibody fragment immobilization on planar gold and gold nanoparticle modified quartz crystal microbalance with dissipation sensor surfaces for immunosensor applications. *Analytical Methods* **2014**, *6* (7), 2134-2140.
87. (a) Boisselier, E.; Astruc, D., Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (6), 1759-1782; (b) Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 293-346; (c) Das, M.; Shim, K.; An, S.; Yi, D., Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicology and Environmental Health Sciences* **2011**, *3* (4), 193-205; (d) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740-2779; (e) Khan, A.; Rashid, R.; Murtaza, G.; Zahra, A., Gold nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery. *Trop J Pharm Res* **2014**, *13* (7), 1169-1177.
88. Wagner, F. E.; Haslbeck, S.; Stievano, L.; Calogero, S.; Pankhurst, Q. A.; Martinek, K. P., Before striking gold in gold-ruby glass. *Nature* **2000**, *407* (6805), 691-692.

89. (a) Barber, D. J.; Freestone, I. C., An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical TEM. *Archaeometry* **1990**, *32* (1), 33-45; (b) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C., The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin* **2007**, *40* (4), 270-277.
90. (a) Xia, D.; Brueck, S. R. J., A Facile Approach to Directed Assembly of Patterns of Nanoparticles Using Interference Lithography and Spin Coating. *Nano Lett.* **2004**, *4* (7), 1295-1299; (b) Tennant, D. M., Limits of Conventional Lithography. In *Nanotechnology*, Timp, G., Ed. Springer New York: 1999; pp 161-205; (c) Lee, J.-H.; Choi, S.; Jang, S.; Lee, S., Production of aqueous spherical gold nanoparticles using conventional ultrasonic bath. *Nanoscale Research Letters* **2012**, *7* (1), 1-7; (d) Brown, C. L.; Whitehouse, M. W.; Tiekink, E. R. T.; Bushell, G. R., Colloidal metallic gold is not bio-inert. *Inflammopharmacology* **2008**, *16* (3), 133-137.
91. Hunt, L. B., The true story of Purple of Cassius. *Gold Bulletin* **1976**, *9* (4), 134-139.
92. Faraday, M., The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145-181.
93. Jellinek, J., Nanoalloys: tuning properties and characteristics through size and composition. *Faraday Discuss.* **2008**, *138* (0), 11-35.
94. Thompson, D., Michael Faraday's recognition of ruby gold: the birth of modern nanotechnology. *Gold Bulletin* **2007**, *40* (4), 267-269.
95. Garnett, J. C. M., Colours in Metal Glasses and in Metallic Films. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1904**, *203* (359-371), 385-420.
96. Wriedt, T., Mie Theory: A Review. In *The Mie Theory*, Hergert, W.; Wriedt, T., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2012; Vol. 169, pp 53-71.
97. Turkevich, J., Colloidal gold. Part II. *Gold Bulletin* **1985**, *18* (4), 125-131.
98. (a) Abidi, W.; Remita, H., Gold based Nanoparticles Generated by Radiolytic and Photolytic Methods. *Recent Patents on Engineering* **2010**, *4* (3), 170-188; (b) Redjala, T.; Apostolecu, G.; Beaunier, P.; Mostafavi, M.; Etcheberry, A.; Uzio, D.; Thomazeau, C.; Remita, H., Palladium nanostructures synthesized by radiolysis or by photoreduction. *New J. Chem.* **2008**, *32* (8), 1403-1408.
99. Treguer, M.; de Cointet, C.; Remita, H.; Khatouri, J.; Mostafavi, M.; Amblard, J.; Belloni, J.; de Keyzer, R., Dose Rate Effects on Radiolytic Synthesis of Gold-Silver Bimetallic Clusters in Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (22), 4310-4321.
100. (a) Klein, M.; Nadolna, J.; Gołębiewska, A.; Mazierski, P.; Klimczuk, T.; Remita, H.; Zaleska-Medynska, A., The effect of metal cluster deposition route on structure and photocatalytic activity of mono- and bimetallic nanoparticles supported on TiO₂ by radiolytic method. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *378*, 37-48; (b) Ghosh, S.; Holade, Y.; Remita, H.; Servat, K.; Beaunier, P.; Hagège, A.; Kokoh, K. B.; Napporn, T. W., One-pot synthesis of reduced graphene oxide supported gold-based nanomaterials as robust nanocatalysts for glucose electrooxidation. *Electrochim. Acta* **2016**, *212*, 864-875.
101. (a) Jimenez-Ruiz, A.; Perez-Tejeda, P.; Grueso, E.; Castillo, P. M.; Prado-Gotor, R., Nonfunctionalized Gold Nanoparticles: Synthetic Routes and Synthesis Condition Dependence. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21* (27), 9596-9609; (b) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W., Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2009**, *25* (24), 13840-13851.
102. Frens, G., Particle size and sol stability in metal colloids. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **1972**, *250* (7), 736-741.
103. (a) Wuthschick, M.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Sztucki, M.; Vainio, U.; Pinna, N.; Rademann, K.; Emmerling, F.; Kraehnert, R.; Polte, J., Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 7052-7071; (b) Ji, X. H.; Song, X. N.; Li, J.; Bai, Y. B.; Yang, W. S.; Peng, X. G., Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: The third role of citrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*.
104. Slot, J. W.; Geuze, H. J., A method to prepare isodisperse colloidal gold sols in the size range 3–17 NM. *Ultramicroscopy* **1984**, *15* (4), 383.
105. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R., Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. In *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994.
106. Templeton, A. C.; Hostetler, M. J.; Kraft, C. T.; Murray, R. W., Reactivity of monolayer-protected gold cluster molecules: Steric effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*.

107. Trouiller, A. J.; Hebie, S.; El Bahhaj, F.; Napporn, T. W.; Bertrand, P., Chemistry for oncotheranostic gold nanoparticles. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *99*, 92-112.
108. (a) Zheng, M.; Li, Z.; Huang, X., Ethylene Glycol Monolayer Protected Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Interactions with Biological Molecules. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, *20* (10), 4226-4235; (b) Conde, J.; Dias, J. T.; Grazú, V.; Moros, M.; Baptista, P. V.; de la Fuente, J. M., Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in Chemistry* **2014**, *2*, 48.
109. Chiang, C.-L., Controlled Growth of Gold Nanoparticles in AOT/C12E4/Isooctane Mixed Reverse Micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *239* (2), 334-341.
110. Li, G.; Lauer, M.; Schulz, A.; Boettcher, C.; Li, F.; Fuhrhop, J.-H., Spherical and Planar Gold(0) Nanoparticles with a Rigid Gold(I)-Anion or a Fluid Gold(0)-Acetone Surface. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2003**, *19* (16), 6483-6491.
111. (a) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Evidence for Seed-Mediated Nucleation in the Chemical Reduction of Gold Salts to Gold Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (7), 2313-2322; (b) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2001**, *17* (22), 6782-6786.
112. Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntès, V., Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2011**, *27* (17), 11098-11105.
113. Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J., Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chem. Mater.* **1999**, *12* (2), 306-313.
114. (a) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (19), 4065-4067; (b) Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T., Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (29), 13857-13870; (c) Sau, T. K.; Murphy, C. J., Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (28), 8648-8649; (d) Sau, T. K.; Murphy, C. J., Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, *20* (15), 6414-6420; (e) Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P., Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17–18), 1870-1901; (f) Tréguer-Delapierre, M.; Mornet, S.; Majime, J.; Duguet, E.; Ravaine, S., Synthesis of non-spherical gold nanoparticles. *Golden Bulletin* **2008**, *41*, 195-207.
115. Mohamed, M. B.; AbouZeid, K. M.; Abdelsayed, V.; Aljarash, A. A.; El-Shall, M. S., Growth Mechanism of Anisotropic Gold Nanocrystals via Microwave Synthesis: Formation of Dioleamide by Gold Nanocatalysis. *ACS Nano* **2010**, *4* (5), 2766-2772.
116. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (10), 1957-1962.
117. Takahashi, H.; Niidome, Y.; Niidome, T.; Kaneko, K.; Kawasaki, H.; Yamada, S., Modification of Gold Nanorods Using Phosphatidylcholine to Reduce Cytotoxicity. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *22* (1), 2-5.
118. Parab, H. J.; Chen, H. M.; Lai, T.-C.; Huang, J. H.; Chen, P. H.; Liu, R.-S.; Hsiao, M.; Chen, C.-H.; Tsai, D.-P.; Hwu, Y.-K., Biosensing, Cytotoxicity, and Cellular Uptake Studies of Surface-Modified Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (18), 7574-7578.
119. Nguyen, D. T.; Kim, D.-J.; Kim, K.-S., Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron* **2011**, *42* (3), 207-227.
120. (a) Bond, G. C.; Thompson, D. T., Catalysis by Gold. *Catalysis Reviews* **1999**, *41* (3-4), 319-388; (b) Haruta, M., Catalysis: Gold rush. *Nature* **2005**, *437* (7062), 1098-1099; (c) Meyer, R.; Lemire, C.; Shaikhutdinov, S. K.; Freund, H. J., Surface chemistry of catalysis by gold. *Gold Bulletin* **2004**, *37* (1-2), 72-124.
121. (a) Roduner, E., Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (7), 583-592; (b) Kreibig, U.; Vollmer, M., Theoretical Considerations. In *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer Berlin Heidelberg: 1995; Vol. 25, pp 13-201; (c) Schmid, G.; Simon, U., Gold nanoparticles: assembly and electrical properties in 1-3 dimensions. *Chem. Commun.* **2005**, *0* (6), 697-710.

122. Pluchery, O.; Humbert, C.; Valamanesh, M.; Lacaze, E.; Busson, B., Enhanced detection of thiophenol adsorbed on gold nanoparticles by SFG and DFG nonlinear optical spectroscopy. *PCCP* **2009**, *11* (35), 7729-7737.
123. Louis, C.; Pluchery, O., *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology*. World Scientific: 2012.
124. Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209-217.
125. (a) Petryayeva, E.; Krull, U. J., Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706* (1), 8-24; (b) Chen, P.; Liedberg, B., Curvature of the Localized Surface Plasmon Resonance Peak. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (15), 7399-7405; (c) Kubo, R.; Kawabata, A.; Kobayashi, S., Electronic Properties of Small Particles. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1984**, *14* (1), 49-66.
126. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *107* (3), 668-677.
127. Grassian, V. H., When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (47), 18303-18313.
128. Link, S.; El-Sayed, M. A., Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (21), 4212-4217.
129. Huang, X.; El-Sayed, M. A., Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* **2010**, *1* (1), 13-28.
130. (a) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (14), 7238-7248; (b) Piella, J.; Bastús, N. G.; Puntès, V., Size-Controlled Synthesis of Sub-10-nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (4), 1066-1075.
131. Logunov, S. L.; Ahmadi, T. S.; El-Sayed, M. A.; Khoury, J. T.; Whetten, R. L., Electron Dynamics of Passivated Gold Nanocrystals Probed by Subpicosecond Transient Absorption Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101* (19), 3713-3719.
132. Ringe, E.; Langille, M. R.; Sohn, K.; Zhang, J.; Huang, J.; Mirkin, C. A.; Van Duyne, R. P.; Marks, L. D., Plasmon Length: A Universal Parameter to Describe Size Effects in Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3* (11), 1479-1483.
133. (a) Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P., Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat Mater* **2008**, *7* (6), 442-53; (b) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G., Nanostructured plasmonic sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 494-521; (c) Willets, K. A.; Van Duyne, R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267-97; (d) Hutter, E.; Fendler, J. H., Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (19), 1685-1706.
134. (a) Nath, N.; Chilkoti, A., Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: optimization of nanoparticle size. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5370-8; (b) Frederix, F.; Friedt, J. M.; Choi, K. H.; Laureyn, W.; Campitelli, A.; Mondelaers, D.; Maes, G.; Borghe, G., Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (24), 6894-900.
135. (a) Chen, H.; Kou, X.; Yang, Z.; Ni, W.; Wang, J., Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24* (10), 5233-5237; (b) Lee, S.; Mayer, K. M.; Hafner, J. H., Improved Localized Surface Plasmon Resonance Immunoassay with Gold Bipyramid Substrates. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (11), 4450-4455.
136. (a) Ghosh, S. K.; Pal, T., Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4797-4862; (b) Aravind, P. K.; Nitzan, A.; Metiu, H., The interaction between electromagnetic resonances and its role in spectroscopic studies of molecules adsorbed on colloidal particles or metal spheres. *Surf. Sci.* **1981**, *110* (1), 189-204.
137. Quinten, M.; Kreibig, U., Optical properties of aggregates of small metal particles. *Surf. Sci.* **1986**, *172* (3), 557-577.

138. Zhang, W.; Li, Q.; Qiu, M., A plasmon ruler based on nanoscale photothermal effect. *Opt. Express* **2013**, *21* (1), 172-181.
139. (a) Moskovits, M., Persistent misconceptions regarding SERS. *PCCP* **2013**, *15* (15), 5301-5311; (b) Schatz, G.; Young, M.; Duyn, R., Electromagnetic Mechanism of SERS. In *Surface-Enhanced Raman Scattering*, Kneipp, K.; Moskovits, M.; Kneipp, H., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2006; Vol. 103, pp 19-45.
140. Ung, T.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P., Optical Properties of Thin Films of Au@SiO₂ Particles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (17), 3441-3452.
141. Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W.-S.; Link, S.; Nordlander, P., Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3913-3961.
142. (a) Tabor, C.; Murali, R.; Mahmoud, M.; El-Sayed, M. A., On the Use of Plasmonic Nanoparticle Pairs As a Plasmon Ruler: The Dependence of the Near-Field Dipole Plasmon Coupling on Nanoparticle Size and Shape. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (10), 1946-1953; (b) Jain, P. K.; Huang, W.; El-Sayed, M. A., On the Universal Scaling Behavior of the Distance Decay of Plasmon Coupling in Metal Nanoparticle Pairs: A Plasmon Ruler Equation. *Nano Lett.* **2007**, *7* (7), 2080-2088.
143. Li, Y.; Schluesener, H. J.; Xu, S., Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin* **2010**, *43* (1), 29-41.
144. (a) Lin, L.; Zhao, H.-q.; Li, J.-r.; Tang, J.-a.; Duan, M.-x.; Jiang, L., Study on Colloidal Au-Enhanced DNA Sensing by Quartz Crystal Microbalance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274* (3), 817-820; (b) Hongqiu, Z.; Lin, L.; Ji'an, T.; Mingxing, D.; Long, J., Enhancement of the immobilization and discrimination of DNA probe on a biosensor using gold nanoparticles. *Chin. Sci. Bull.* **2001**, *46* (13), 1074-1077; (c) Weizmann, Y.; Patolsky, F.; Willner, I., Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on Au-nanoparticles. *Analyst* **2001**, *126* (9), 1502-1504.
145. (a) Sz-Hau, C.; Yao-Chen, C.; Yi-Chen, L.; Hsiu-Chao, L.; Yun-Liang, Y.; Chih-Sheng, L., A method of layer-by-layer gold nanoparticle hybridization in a quartz crystal microbalance DNA sensing system used to detect dengue virus. *Nanotechnology* **2009**, *20* (21), 215501; (b) Zhao, H. Q.; Lin, L.; Li, J. R.; Tang, J. A.; Duan, M. X.; Jiang, L., DNA Biosensor with High Sensitivity Amplified by Gold Nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2001**, *3* (4), 321-323; (c) Liu, T.; Tang, J. a.; Jiang, L., Sensitivity enhancement of DNA sensors by nanogold surface modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295* (1), 14-16; (d) Liu, T.; Tang, J. a.; Jiang, L., The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *313* (1), 3-7; (e) Pang, L.; Li, J.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R., DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach. *Anal. Biochem.* **2006**, *358* (1), 99-103; (f) Willner, I.; Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, B., Amplified detection of single-base mismatches in DNA using microgravimetric quartz-crystal-microbalance transduction. *Talanta* **2002**, *56* (5), 847-856; (g) Chen, S.-H.; Wu, V. C. H.; Chuang, Y.-C.; Lin, C.-S., Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *73* (1), 7-17; (h) Kim, N. H.; Baek, T. J.; Park, H. G.; Seong, G. H., Highly sensitive biomolecule detection on a quartz crystal microbalance using gold nanoparticles as signal amplification probes. *Anal. Sci.* **2007**, *23* (2), 177-81.
146. He, L.; Musick, M. D.; Nicewarner, S. R.; Salinas, F. G.; Benkovic, S. J.; Natan, M. J.; Keating, C. D., Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (38), 9071-9077.
147. Xiao, Y.; Patolsky, F.; Katz, E.; Hainfeld, J. F.; Willner, I., "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science* **2003**, *299* (5614), 1877-1881.
148. Andreescu, S.; Luck, L. A., Studies of the binding and signaling of surface-immobilized periplasmic glucose receptors on gold nanoparticles: A glucose biosensor application. *Anal. Biochem.* **2008**, *375* (2), 282-290.
149. Raj, C. R.; Jena, B. K., Efficient electrocatalytic oxidation of NADH at gold nanoparticles self-assembled on three-dimensional sol-gel network. *Chem Commun (Camb)* **2005**, (15), 2005-7.
150. Cao, X.; Ye, Y.; Liu, S., Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal. Biochem.* **2011**, *417* (1), 1-16.

151. (a) Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in Biodiagnostics. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1547-1562; (b) Niemeyer, C. M., Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (22), 4128-4158.
152. Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (5), 2739-2779.
153. Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L., Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1904-2074.
154. (a) Xiulan, S.; Xiaolian, Z.; Jian, T.; Zhou, J.; Chu, F. S., Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *99* (2), 185-194; (b) Jin, X.; Jin, X.; Chen, L.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R., Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for quantification of aflatoxin B1. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (8), 2580-2585.
155. Uludağ, Y.; Tothill, I. E., Development of a sensitive detection method of cancer biomarkers in human serum (75%) using a quartz crystal microbalance sensor and nanoparticles amplification system. *Talanta* **2010**, *82* (1), 277-282.
156. (a) Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Schröder, H.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H., Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (50), 9618-9647; (b) Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J., Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (6), 1775-1789.
157. (a) Morel, A.-L.; Volmant, R.-M.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2010**, *81* (1), 304-312; (b) Frasconi, M.; Tortolini, C.; Botrè, F.; Mazzei, F., Multifunctional Au Nanoparticle Dendrimer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor and Its Application for Improved Insulin Detection. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (17), 7335-7342; (c) Lyon, L. A.; Musick, M. D.; Natan, M. J., Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance Immunosensing. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (24), 5177-5183.
158. (a) Du, D.; Chen, S.; Cai, J.; Zhang, A., Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (1), 130-134; (b) Lu, L.; Lin, X., Glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles and DNA for the simultaneous determination of uric acid and norepinephrine under coexistence of ascorbic acid. *Anal. Sci.* **2004**, *20* (3), 527-30; (c) Tang, L.; Zeng, G.-M.; Shen, G.-L.; Li, Y.-P.; Zhang, Y.; Huang, D.-L., Rapid Detection of Picloram in Agricultural Field Samples Using a Disposable Immunomembrane-Based Electrochemical Sensor. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (4), 1207-1212.
159. Kaufman, E. D.; Belyea, J.; Johnson, M. C.; Nicholson, Z. M.; Ricks, J. L.; Shah, P. K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldotö, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Franzen, S., Probing Protein Adsorption onto Mercaptoundecanoic Acid Stabilized Gold Nanoparticles and Surfaces by Quartz Crystal Microbalance and ζ -Potential Measurements. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, *23* (11), 6053-6062.
160. (a) Liu, T.; Tang, J. a.; Zhao, H.; Deng, Y.; Jiang, L., Particle Size Effect of the DNA Sensor Amplified with Gold Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2002**, *18* (14), 5624-5626; (b) Liu, S.-f.; Li, J.-R.; Jiang, L., Surface modification of platinum quartz crystal microbalance by controlled electroless deposition of gold nanoparticles and its enhancing effect on the HS-DNA immobilization. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, 257-258, 57-62.
161. Cai, H.; Xu, C.; He, P.; Fang, Y., Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *510* (1-2), 78-85.
162. Liu, T.; Tang, J. a.; Han, M.; Jiang, L., Surface modification of nanogold particles in DNA detection with quartz crystal microbalance. *Chin. Sci. Bull.* **2003**, *48* (9), 873-875.
163. (a) Lin, H.-Y.; Chen, C.-T.; Chen, Y.-C., Detection of Phosphopeptides by Localized Surface Plasma Resonance of Titania-Coated Gold Nanoparticles Immobilized on Glass Substrates. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (19), 6873-6878; (b) Lei, Y.; Chen, H.; Dai, H.; Zeng, Z.; Lin, Y.; Zhou, F.; Pang, D., Electroless-plated gold films for sensitive surface plasmon resonance detection of white spot syndrome virus. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23* (7), 1200-1207; (c) Luo, Y.; Yu, F.; Zare, R. N., Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab Chip* **2008**, *8* (5), 694-700;

- (d) Sato, Y.; Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M., Surface plasmon resonance imaging on a microchip for detection of DNA-modified gold nanoparticles deposited onto the surface in a non-cross-linking configuration. *Anal. Biochem.* **2006**, *355* (1), 125-131; (e) Zayats, M.; Kharitonov, A. B.; Pogorelova, S. P.; Lioubashevski, O.; Katz, E.; Willner, I., Probing Photoelectrochemical Processes in Au-CdS Nanoparticle Arrays by Surface Plasmon Resonance: Application for the Detection of Acetylcholine Esterase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (51), 16006-16014.
164. Matsui, J.; Akamatsu, K.; Hara, N.; Miyoshi, D.; Nawafune, H.; Tamaki, K.; Sugimoto, N., SPR sensor chip for detection of small molecules using molecularly imprinted polymer with embedded gold nanoparticles. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (13), 4282-5.
165. (a) Brown, L. O.; Havrilla, G. J.; Montoya, V. M.; Dooen, S. K., Surface patterning with SERS-active nanoparticle aggregates for safeguards applications. **2011**, Medium: ED; (b) Hossain, M. K.; Huang, G. G.; Kaneko, T.; Ozaki, Y., Characteristics of surface-enhanced Raman scattering and surface-enhanced fluorescence using a single and a double layer gold nanostructure. *PCCP* **2009**, *11* (34), 7484-7490.
166. (a) Laurence, T. A.; Braun, G. B.; Reich, N. O.; Moskovits, M., Robust SERS Enhancement Factor Statistics Using Rotational Correlation Spectroscopy. *Nano Lett.* **2012**, *12* (6), 2912-2917; (b) Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J., Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (4), 735-743.
167. (a) Park, W.-H.; Kim, Z. H., Charge Transfer Enhancement in the SERS of a Single Molecule. *Nano Lett.* **2010**, *10* (10), 4040-4048; (b) Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78* (9), 1667-1670.
168. (a) Kho, K. W.; Dinish, U. S.; Kumar, A.; Olivo, M., Frequency Shifts in SERS for Biosensing. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4892-4902; (b) Bantz, K. C.; Meyer, A. F.; Wittenberg, N. J.; Im, H.; Kurtuluş, Ö.; Lee, S. H.; Lindquist, N. C.; Oh, S.-H.; Haynes, C. L., Recent Progress in SERS Biosensing. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2011**, *13* (24), 11551-11567; (c) Fu, C.; Gu, Y.; Wu, Z.; Wang, Y.; Xu, S.; Xu, W., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) biosensing based on nanoporous dielectric waveguide resonance. *Sensors Actuators B: Chem.* **2014**, *201*, 173-176.
169. Nath, N.; Chilkoti, A., A Colorimetric Gold Nanoparticle Sensor To Interrogate Biomolecular Interactions in Real Time on a Surface. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (3), 504-509.
170. (a) Ghosh, S. K.; Pal, T., Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4797-4862; (b) Su, K. H.; Wei, Q. H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S., Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett.* **2003**, *3* (8), 1087-1090.
171. (a) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **1996**, *382* (6592), 607-609; (b) Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L., One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (9), 1959-1964; (c) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A., Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science* **1997**, *277* (5329), 1078-1081.
172. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (1), 1547-1562.
173. (a) Geng, J.; Qu, K.; Ren, J.; Qu, X., Rapid and efficient screening of Alzheimer's disease [small beta]-amyloid inhibitors using label-free gold nanoparticles. *Molecular BioSystems* **2010**, *6* (12), 2389-2391; (b) Chen, P.; Selegard, R.; Aili, D.; Liedberg, B., Peptide functionalized gold nanoparticles for colorimetric detection of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) activity. *Nanoscale* **2013**, *5* (19), 8973-6.
174. (a) Liu, X.; Wang, Y.; Chen, P.; Wang, Y.; Zhang, J.; Aili, D.; Liedberg, B., Biofunctionalized Gold Nanoparticles for Colorimetric Sensing of Botulinum Neurotoxin A Light Chain. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (5), 2345-2352; (b) Schofield, C. L.; Field, R. A.; Russell, D. A., Glyconanoparticles for the Colorimetric Detection of Cholera Toxin. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (4), 1356-1361; (c) Lai, W.; Zhuang, J.; Tang, D., Novel Colorimetric Immunoassay for Ultrasensitive Monitoring of Brevetoxin B Based on Enzyme-Controlled Chemical Conversion of Sulfite to Sulfate. *J. Agric. Food. Chem.* **2015**, *63* (7), 1982-1989.

175. (a) Aili, D.; Enander, K.; Rydberg, J.; Nesterenko, I.; Bjorefors, F.; Baltzer, L.; Liedberg, B., Folding induced assembly of polypeptide decorated gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (17), 5780-8; (b) Slocik, J. M.; Zabinski, J. S., Jr.; Phillips, D. M.; Naik, R. R., Colorimetric response of peptide-functionalized gold nanoparticles to metal ions. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2008**, *4* (5), 548-51.
176. Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y., Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem* **2008**, *9* (15), 2363-71.
177. (a) Wang, C.; Chen, Y.; Wang, T.; Ma, Z.; Su, Z., Biorecognition-Driven Self-Assembly of Gold Nanorods: A Rapid and Sensitive Approach toward Antibody Sensing. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (24), 5809-5811; (b) Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V., Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors Actuators B: Chem.* **2014**, *195*, 332-351; (c) Yu, C.; Irudayaraj, J., Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods. *Anal. Chem.* **2006**, *79* (2), 572-579; (d) Nakashima, H.; Furukawa, K.; Kashimura, Y.; Torimitsu, K., Anisotropic assembly of gold nanorods assisted by selective ion recognition of surface-anchored crown ether derivatives. *Chem. Commun.* **2007**, (10), 1080-1082.

Chapitre 2 : Méthodes et techniques d'analyse

Partie 1

Techniques de caractérisation et de transduction

La conception d'un biocapteur est un processus comportant une succession d'étapes qui, pour être optimisées, nécessitent de pouvoir observer à l'échelle moléculaire ce que l'on construit. Dans cette optique, nous avons eu recours durant notre étude à plusieurs techniques d'analyse de surface. Une fois les biocapteurs produits, nous avons utilisé deux techniques de transduction pour détecter des cibles d'intérêt. Dans ce deuxième chapitre, nous présentons l'ensemble des techniques d'analyse de surface et de transduction que nous avons employées.

1.1. Techniques de caractérisation

Les surfaces présentées dans les différents chapitres ont été caractérisées par différentes techniques physico-chimiques :

- Le caractère hydrophile ou hydrophobe des surfaces a été déterminé par la mesure de l'angle de contact.
- La nature chimique et l'organisation des monocouches ont été étudiées par spectroscopie infrarouge en mode ATR (réflexion totale atténuée) et en PM-IRRAS (spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation).
- La composition chimique a été déterminée par spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS).
- La morphologie et la taille des nanoparticules d'or ont été déterminées par microscopie électronique à transmission (MET)
- La topographie des surfaces a été étudiée par microscopie électronique à balayage (MEB).

1.1.1. Mesure de l'Angle de contact

Principe : Les modifications des propriétés chimiques des surfaces fonctionnalisées et en particulier les variations du caractère hydrophile/hydrophobe induites par le nettoyage ou par la fonctionnalisation, ont été suivies par la technique de la mesure de l'angle de contact. Cette méthode présente l'avantage d'être simple, rapide, reproductible et non destructive.

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide appelé angle de contact (θ) (Figure 29).

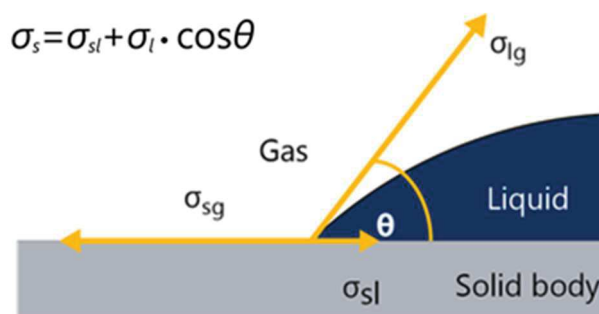


Figure 29: Principe de mesure de l'angle de contact. Source : www.kruss.de

La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface si on utilise plusieurs solvants. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire à l'interface liquide-solide. Si on utilise l'eau comme seul liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface. Dans le cadre des travaux de cette thèse, seule l'eau a été utilisée comme solvant et ce afin de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe des surfaces fonctionnalisées.

Appareillage : Les mesures présentées dans le chapitre 3 ont été réalisées à l'aide d'un analyseur Krüss (modèle FM40 EasyDrop). Une goutte d'eau (Milli-Q) de 1 μL déposée à l'aide d'une microseringue, est éclairée sur le côté par une lumière blanche. La caméra CCD associée à un logiciel de traitement d'images permet d'extraire la photographie de la goutte puis de mesurer l'angle de contact 5 secondes après son dépôt sur l'échantillon. Pour chaque échantillon, la valeur de θ est la moyenne des résultats obtenus sur 3 gouttes avec un écart type inférieur à 5°.

Pour chaque goutte, nous avons utilisé le mode « sessile drop » et mesuré l'angle de contact entre la goutte et la surface en utilisant trois modèles mathématiques (fournis par le constructeur) permettant d'obtenir une valeur moyenne de l'angle de contact.

1.1.2. PM-IRRAS

Principe : La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique spectroscopique vibrationnelle, qui permet d'identifier les fonctions chimiques des molécules grâce aux informations provenant des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques.

Cependant la spectroscopie IR conventionnelle en transmission ne permet pas d'étudier les couches ultra-minces au vu de l'opacité de la plupart des matériaux sur lesquels les films sont déposés. Pour y remédier, une technique spectroscopique IR exploitant l'amplification du signal lorsque le faisceau est réfléchi à angle rasant sur une surface métallique a été développée. Il s'agit de la spectroscopie IRRAS pour Infrared Reflexion Absorption Spectroscopy. La spectroscopie IRRAS est une méthode très répandue pour la caractérisation de films minces déposés sur des surfaces métalliques. L'anisotropie ainsi que le phénomène d'exaltation du champ électrique créé à la surface d'un métal sont exploités pour tirer des informations sur l'orientation des molécules à la surface.

Dans le cas des surfaces métalliques, les interactions entre la composante électrique de l'onde incidente, le moment dipolaire des vibrations au sein des molécules et les propriétés de réflexion du métal conditionnent l'absorption du faisceau IR. Les travaux de Greenler ont montré l'importance de l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la surface métallique et de l'état de polarisation de la lumière sur le spectre de réflexion adsorption ¹.

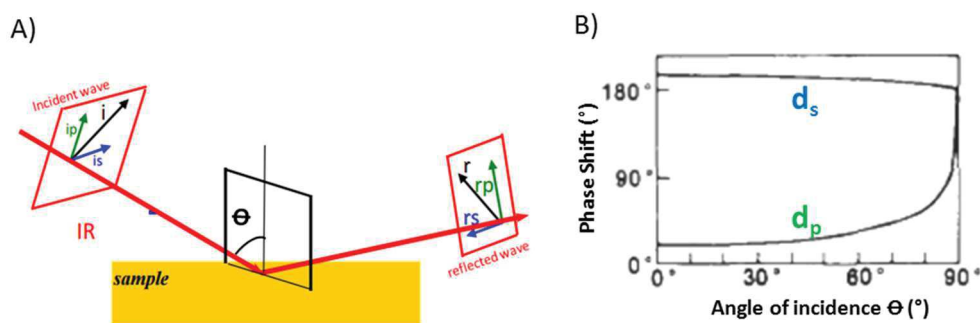


Figure 30 : Schéma de la décomposition du champ électromagnétique avant et après sa réflexion sur une surface métallique (A) et changement de phase intervenant sur les composantes parallèles (d_p) et perpendiculaire (d_s) au plan d'incidence en fonction de l'angle d'incidence (B). Figures reproduites des réf. ².

La Figure 30 décrit la réflexion d'un faisceau incident sur une surface métallique. Il est représenté par une onde électromagnétique qui est séparée en deux composantes :

- La composante perpendiculaire au plan i_s du champ électrique subit un changement de phase de 180° (pour n'importe quel angle d'incidence). L'onde stationnaire créée par ce champ à la surface ($i_s + r_s$) est donc quasi nulle.
- La composante parallèle au plan d'incidence i_p du champ électrique subit un changement de phase faible dans une large gamme d'angle d'incidence. Puis, pour une incidence rasante ($\theta=80-88^\circ$), le déphasage est proche de 180° et conduit à une exaltation du champ électrique ^{2b}.

La règle de sélection, spécifique au substrat métallique, est la suivante : les vibrations ayant un moment de transition parallèle à la surface présentent des intensités nulles, tandis que celles ayant un moment dipolaire perpendiculaire à la surface présentent des bandes dont l'intensité est maximale.

Pour discriminer les absorptions surfaciques des absorptions volumiques (phase gazeuse environnante), il est possible de normaliser le spectre de l'échantillon par le spectre du substrat seul afin de faire ressortir les absorptions relatives au film. Cependant, l'enregistrement non simultané des deux spectres introduit des fluctuations inévitables du montage optique (source infrarouge, interféromètre) et de l'environnement qui affectent la qualité du spectre IRRAS. Pour pallier ces inconvénients, des techniques spectroscopiques différentielles ont été développées parmi lesquelles la spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation-InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy). Cette spectroscopie permet d'obtenir des spectres normalisés en temps réel et permet donc de séparer les adsorptions polarisées, se produisant au voisinage de la surface, des adsorptions isotropes dues à la phase gazeuse en combinant les trois techniques suivantes :

- La réflectivité en lumière polarisée et sous incidence rasante (IRRAS) ;
- La modulation rapide de la polarisation du champ électrique incident entre les polarisations s et p ;
- Le traitement électronique qui va permettre de filtrer, démoduler et de traiter mathématiquement le signal reçu par le détecteur. On obtient ainsi le signal de réflectivité différentiel normalisé ⁴:

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s}$$

Appareillage : Cette technique a été utilisée pour analyser des surfaces d'or fonctionnalisées. Les spectres PM-IRRAS ont été enregistrés sur un spectromètre commercial Nicolet Nexus 5700. Le rayon externe est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un miroir placé à un angle d'incidence optimal de 75 °. Un polariseur à grille de ZnSe et un modulateur photoélastique de ZnSe placés en amont des échantillons permettent de moduler le faisceau incident entre les polarisations p et s (= fréquence de modulation de 37 kHz, 90 PEM, Hinds Instruments, USA). Le faisceau réfléchi par l'échantillon est dirigé vers un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. Les spectres présentés résultent de la somme de 1024 balayages enregistrés avec une résolution de 8 cm⁻¹.

1.1.3. ATR

Principe : La spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (ATR) utilise la réflexion totale du rayon IR dans un cristal d'indice élevé dont les parois sont en contact avec l'échantillon à analyser (d'indice plus faible) (Figure 31). Dans ce format, lorsque le rayonnement arrive à l'interface cristal/échantillon, une partie de la lumière, l'onde évanescente, pénètre de quelques micromètres dans l'échantillon se trouvant en contact direct avec le cristal et peut être absorbée : une partie de l'énergie est retenue et la réflexion totale est atténuée. L'échantillon est donc pressé contre le cristal, et ce rayonnement est absorbé par les molécules de l'échantillon avec une sensibilité qui décroît en s'éloignant de l'interface du cristal⁵. Le détecteur permet d'analyser le faisceau modifié.

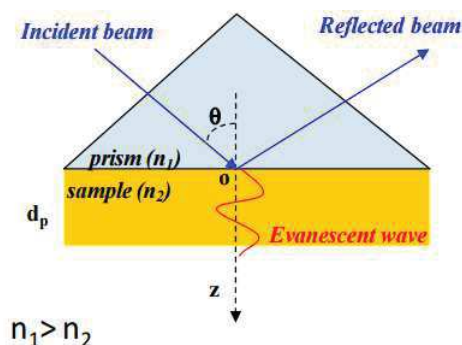


Figure 31 : Schéma du principe de la spectroscopie infrarouge ATR. Figure reproduite de la réf. 2^a.

Appareillage : Cette technique sera utilisée pour obtenir les spectres IR des surfaces de silicium fonctionnalisées avec spectromètre FTIR-ATR Bruker équipé d'un accessoire VariGATR pour lequel l'angle θ varie entre 60 et 65° (Harrick Scientific, Pleasantville, NY, USA).

1.1.4. XPS

Principe : La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) ou spectroscopie électronique pour l'analyse chimique (ESCA) permet d'étudier la composition chimique des couches formées et d'estimer le taux de recouvrement des molécules greffées. L'échantillon est irradié par un faisceau de rayons X monochromatiques qui provoquent l'ionisation de ses atomes par effet photoélectrique. Tous les éléments présents dans l'échantillon, excepté l'hydrogène (pas d'électron de cœur), sont détectés par XPS.

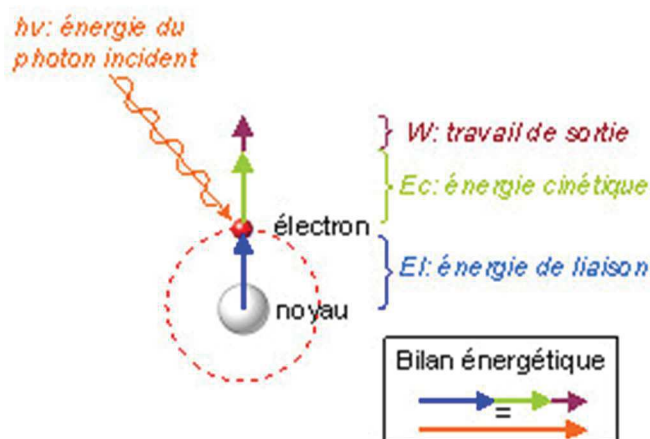


Figure 32 : Bilan énergétique pour l'XPS. Source : www.lasurface.com.

L'énergie cinétique E_c de ces photoélectrons est mesurée, ce qui donne un spectre de l'intensité des pics de photoélectrons en fonction de l'énergie mesurée. Chaque photon X incident a la même énergie $h\nu$, puisque le faisceau est monochromatique (h étant la constante de Planck et ν la fréquence de l'onde lumineuse incidente). Lors de l'interaction avec l'atome, une partie de cette énergie sert à rompre la liaison, c'est l'énergie de liaison, E_L ; le reste est transféré à l'électron sous la forme d'énergie cinétique (Figure 32).

Le spectre en énergie cinétique présente donc des pics d'émission, et l'on peut déterminer l'énergie de liaison correspondant à chaque pic par la relation d'Einstein :

$$E_L = h\nu - E_c - W$$

Avec E_L l'énergie de liaison, E_c l'énergie cinétique de l'électron, h la constante de Planck, ν , la fréquence de radiation et, W le travail de sortie du spectromètre. L'énergie du photon X incident est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation des électrons de cœur. Leur émission donne les pics XPS essentiellement caractéristiques de la nature de l'atome. L'information chimique (surtout le degré d'oxydation) est tirée des déplacements du pic XPS correspondant à la variation d'énergie due à l'environnement de l'atome. Cette variation d'énergie est faible devant celle des rayons X. Pour certains éléments, le couplage spin-orbite entraîne l'apparition de plusieurs pics correspondant à la même couche d'un élément.

Appareillage : Les analyses des surfaces fonctionnalisées ont été effectuées sur un spectromètre (SPECS, Allemagne), équipé d'une source de rayons X monochromatique d'aluminium ($Al K\alpha$: $h\nu = 1486,74$ eV) et d'un analyseur hémisphérique (Phoibos MCD 150) avec une fente d'entrée de 20 mm et une résolution de 0.1 eV. L'énergie de passage est de 20 eV pour le spectre général et de 10 eV pour les photo-pics des éléments. Les spectres ont été traités à l'aide du logiciel Casa XPS (Casa Software Ltd., Angleterre).

1.1.5. MET

Principe : La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique qui utilise des électrons de haute énergie (soumis à des fortes tensions d'accélération de 60 à 400 kV) pour former une image d'objets de faible épaisseur (de l'ordre de 50 à 150 nm). Le canon à électrons est généralement situé au sommet de la colonne du microscope. Les électrons sont extraits en chauffant un filament de tungstène (ou cristal d'hexaborure de lanthane) puis ils sont accélérés. L'énergie des électrons permet d'une part la traversée de l'échantillon et d'autre part le traitement ondulatoire du faisceau. Une fois le vide fait dans la cellule, on fait passer le faisceau d'électrons au travers d'un échantillon d'environ 3 mm de diamètre. Puis ce faisceau est focalisé à l'aide de lentilles magnétiques vers l'écran ou la plaque photographique.

Cette méthode de caractérisation fournit des images à résolution nanométrique, où les cœurs métalliques des échantillons peuvent être distingués et étudiés.

Les images obtenues par MET ont été examinées à l'aide du logiciel de traitement et d'analyse ImageJ. Ce programme permet de dénombrer les particules de mesurer le diamètre des noyaux métalliques. La distribution de tailles des GNPs peut ensuite être évaluée sous la forme d'un histogramme. Ce dernier apporte des informations cruciales sur la dispersion des particules.

Appareillage : Les clichés sont réalisés sur un microscope JEOL JEM 1011 à une tension d'accélération de 100 kV. Les grilles MET ont été préparées en déposant 2 μ L de la suspension de particules sur une grille de cuivre recouverte de carbone séchées à l'air ambiant.

1.1.6. MEB

Principe : La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

S'appuyant sur les travaux de Max Knoll et Manfred Von Ardenne dans les années 1930, la MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.

La microscopie électronique à balayage (MEB) donne une image précise de la surface et nous donne des informations sur sa topographie. Dans notre étude, la MEB nous a permis d'observer

la topologie des nanoparticules d'or sur des surfaces d'or et de silicium. Cette analyse a été faite sur différentes zones de la surface et à différents grossissements.

Appareillage : L'appareil que nous avons utilisé dans cette étude est un microscope FEG Hitachi SU-70 muni d'un canon à effet de champ, en appliquant une tension d'accélération des électrons de 1 kV. L'échantillon est posé sur un support en aluminium recouvert d'une fine couche de graphite dont la surface est adhésive et placé à une distance de 1,9 à 2,3 mm de l'objectif.

1.2. Techniques de transduction

Deux techniques de transduction principales ont été utilisées au cours de ce travail : une technique piézoélectrique : la microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) pour l'élaboration d'immunocapteurs piézoélectriques (chapitre 4) et une technique plasmonique : la résonance plasmon de surface localisée (LSPR) pour les biocapteurs colorimétriques (chapitre 5).

1.2.1. QCM-D

Le principe de la QCM-D a été décrit dans le premier chapitre (paragraphe 1.4.3).

La Figure 33 montre un exemple de cristal de quartz utilisé en QCM. Il se présente sous la forme d'un disque de quartz « AT-cut » de 14 mm de diamètre, recouvert d'un dépôt d'or sur ses deux faces afin de constituer les électrodes. L'électrode de la face arrière sert uniquement à mesurer la fréquence de résonance. Celle de la face avant permet l'étude de la matière que l'on dépose à sa surface (10 mm de diamètre). L'électrode d'or peut être elle-même recouverte d'un autre matériau comme par exemple du silicium.

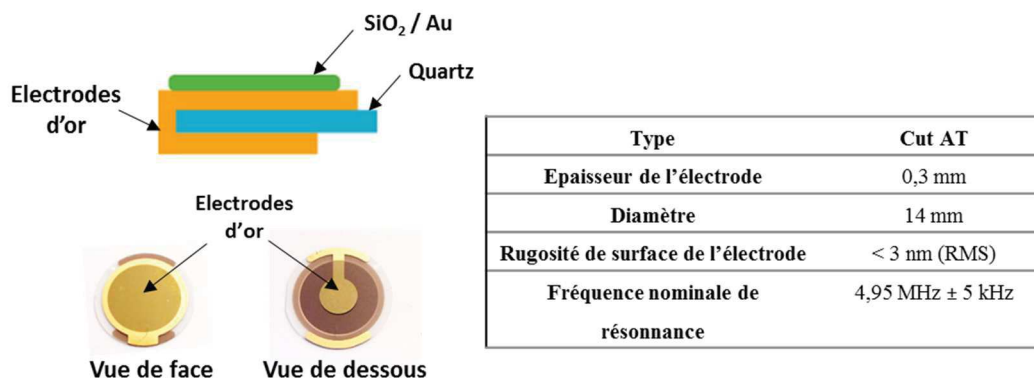


Figure 33 : Caractéristiques du cristal de quartz utilisé en QCM.

L'appareil que nous utilisons est un système commercial : QCM-E4 de Q-Sense® (Göteborg, Suède), présenté à la Figure 34. Il a l'avantage d'avoir quatre cellules indépendantes les unes des autres, ce qui permet de pouvoir monter quatre résonateurs en parallèle et de faire quatre études simultanées. Les solutions sont injectées dans les cellules de mesure à l'aide d'une pompe péristaltique multi-canaux (Ismatec IPC-N4) à un débit de $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.



Figure 34 : Montage QCM-E4.

Le cristal de quartz constitue la partie inférieure des cellules qui est rendue étanche à l'aide d'un joint torique. L'ensemble est relié à un système de régulation de la température par effet Peltier. Ce dispositif a une importance primordiale étant donné qu'une variation, même faible de température peut conduire à la variation minime de fréquence que l'on veut corrélérer au changement de masse. Toutes les mesures ont été effectuées à une température de 20°C . Le tout est relié à un ordinateur permettant de procéder aux acquisitions grâce à un logiciel approprié (QSoft 401) fourni par le constructeur. Les données ont été acquises à la fréquence fondamentale de 5 MHz et pour les 7 fréquences (5, 15, 25, 35, 45 et 55 et 65 MHz). Deux paramètres physiques sont étudiés : la fréquence d'oscillation du quartz et la dissipation. Sur les figures du manuscrit, les données sont représentées pour une seule fréquence, généralement à la 5^{ème} harmonique ΔF_5 .

1.2.2. LSPR

Le principe de la LSPR a été décrit dans le premier chapitre. La position de la bande LSPR des GNPs dépend de l'indice de réfraction local.

Les mesures ont été effectuées au laboratoire CBSS (Centre for Biomimetic Sensor Science, NTU, Singapour). L'instrument de mesure est un Insplorion XNano II (Insplorion AB, Göteborg, Suède) adapté à des mesures en solution. Comme l'illustre la figure ci-dessous, il inclut une unité optique, une unité de commande de température et la cellule de mesure.

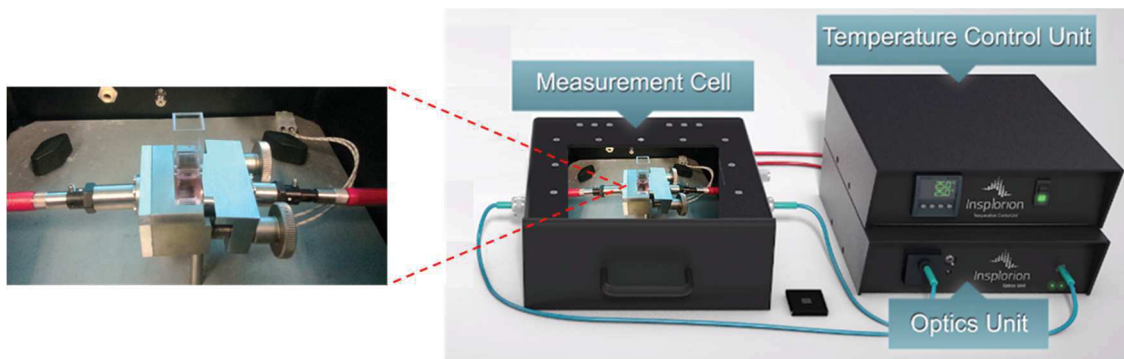


Figure 35 : Montage Insplorion XNano II.

Ce système est sensible à un changement de l'indice de réfraction à proximité des GNPs jusqu'à une distance de 50-60 nm. Le logiciel de contrôle (Insplorer®) permet d'atteindre théoriquement une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde et une résolution optique de 10^{-2} nm.

Les GNPs ont été ainsi employées comme des plateformes de biodétection colorimétriques de l'entérotoxine A de *S. aureus* (SEA). Dans une expérience type, la SEA a été ajoutée à une solution de GNPs conjuguée à l'anticorps anti-SEA (GNPs-anti-SEA) et la variation de la position de bande LSPR a été mesurée après 1 h (le temps de stabilisation). Comme l'illustre la Figure 36, la fixation de l'analyte (SEA) aux nanoparticules d'or recouverte de l'anticorps (GNPs-anti-SEA) entraîne un changement mesurable de la position de la bande LSPR.

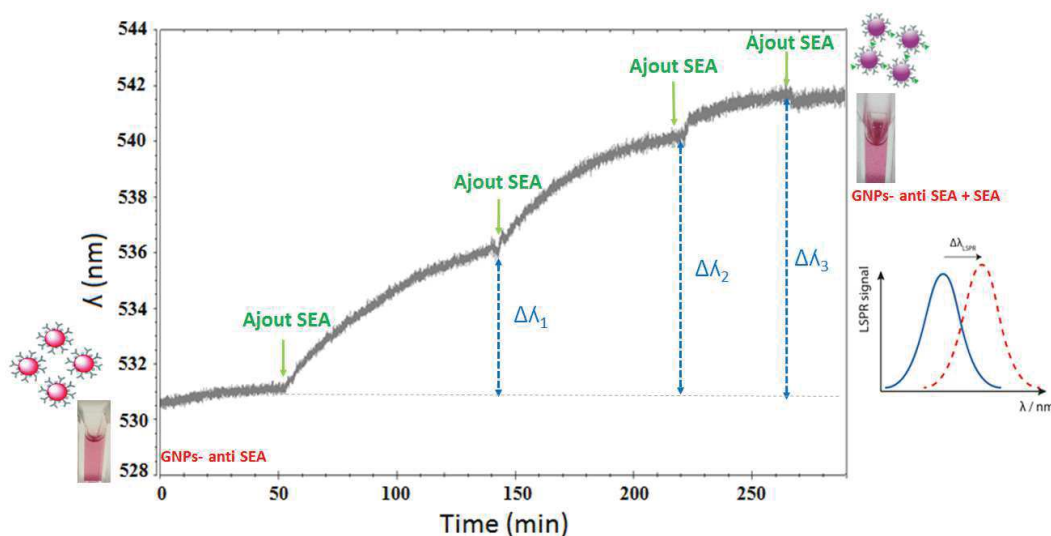


Figure 36 : Exemple de mesure de la variation de la position de la bande plasmon en fonction du temps après ajouts successifs de SEA aux GNPs-anti SEA.

Partie 2

Protocoles expérimentaux

Cette partie décrit les protocoles expérimentaux suivis au cours de ces travaux. Tous les réactifs utilisés au cours de cette étude sont de qualité analytique. De l'eau ultra-pure MilliQ® (18 MQ) a été utilisée.

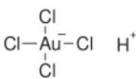
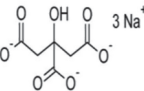
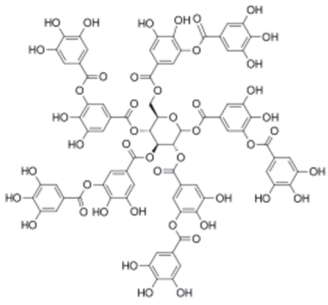
2.1. Préparation des nanoparticules d'or

L'élaboration des nanoparticules sphériques a nécessité, dans un premier temps, la mise au point de modes opératoires à partir de ceux décrits dans la littérature. Dans cette partie, nous allons présenter les deux voies explorées dans ce travail en décrivant le protocole de synthèse. Nous allons ensuite comparer le résultat de ces deux synthèses en analysant les GNPs par spectroscopie UV-vis et microscopie électronique à transmission (MET).

2.1.1. Réactifs utilisés

Le Tableau 2 :regroupe tous les réactifs utilisés pour la synthèse des GNPs.

Tableau 2 : Liste de produits utilisés pour la synthèse des GNPs.

Réactif	Structure	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Pureté	Fournisseur
Acide chloraurique		H ₃ AuCl ₄ ·3H ₂ O	393,83	≥99.9%	Aldrich
Citrate de sodium		Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	258,06	99%	Aldrich
Acide tannique		C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆	1701,2	99%	Sigma Aldrich

2.1.2. Synthèse et caractérisation des GNPs par la voie citrate

Afin de synthétiser des nanoparticules d'or sphériques, nous nous sommes appuyés sur la méthode standard décrite par Turkevich et *al.*⁶ et affinée par Frens⁷. Il s'agit de la réduction de l'or sous forme HAuCl_4 (Au^{3+}) en $\text{Au}(0)$ par le citrate de sodium. Les GNPs obtenues sont de 15 nm de diamètre et sont recouvertes à leur surface par les citrates qui empêchent leur agrégation.

2.1.2.1. Protocole de synthèse

Dans un ballon de 50 mL équipé d'une colonne réfrigérante, 40 mL d'acide tétrachloroaurique trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) de concentration à 1 mM sont portés à reflux sous agitation vigoureuse. Au reflux, on ajoute très rapidement 4 mL de la solution de citrate de sodium à 38,8 mM. Le mélange est agité magnétiquement à vitesse modérée et chauffé jusqu'à l'obtention d'une solution rouge-rubis indiquant ainsi la formation de colloïdes d'or (environ 20 min). Ensuite, le chauffage est arrêté et la solution est conservée au réfrigérateur et à l'abri de la lumière.

2.1.2.2. Caractérisation

Les GNPs obtenues par cette méthode de synthèse ont été caractérisées par spectroscopie UV-visible. Le spectromètre montre une bande d'absorption très intense dans le visible, centrée à 525 nm (figure ci-dessous). La position de cette bande correspond à des particules de taille ~ 15 nm^{6,8}. Cette taille a été vérifiée par MET.

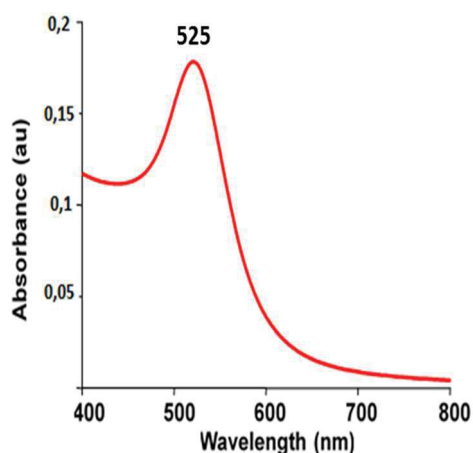


Figure 37 : Spectre d'absorption de la solution colloïdale d'or obtenue par la voie citrate.

L'analyse MET montre qu'on obtient des nanoparticules sphériques avec la présence, notamment à plus grande échelle, de nanoparticules de taille variée (Figure 38). Ceci se traduit par une distribution en taille large avec des particules allant de 9 à 21 nm. La taille moyenne

est de 14,7 nm de diamètre avec un écart-type de 2 nm ce qui est en accord avec la position de plasmon mesurée par UV-vis.

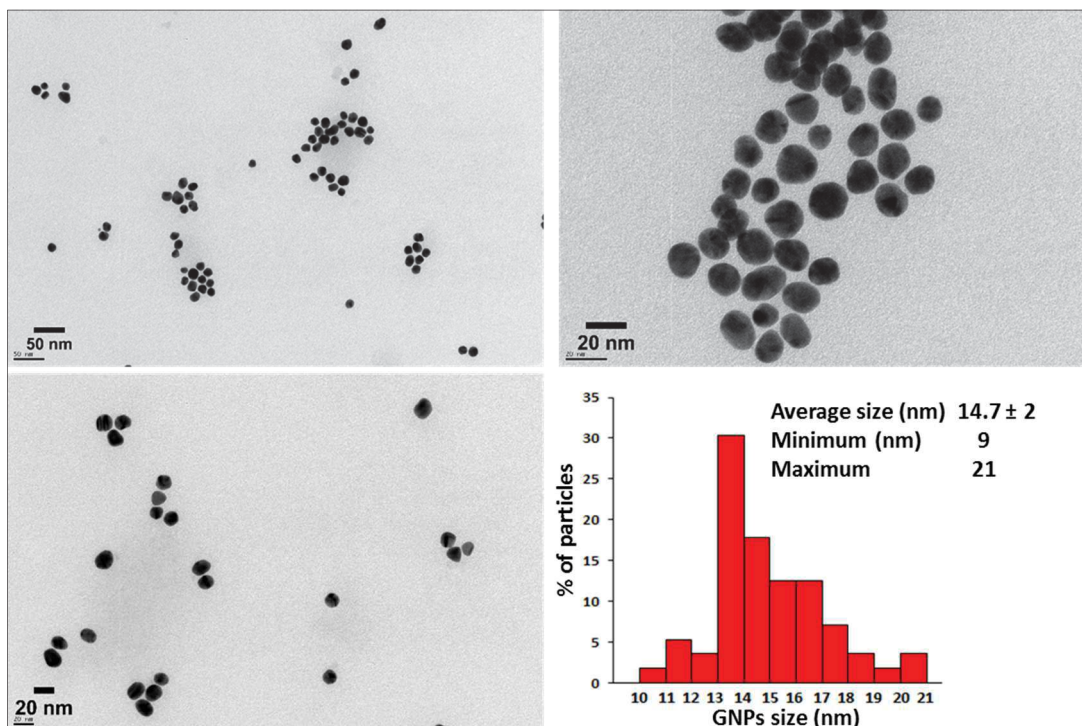


Figure 38 : Clichés de MET et histogramme de la distribution de taille des GNPs obtenues par la voie citrate.

2.1.3. Synthèse et caractérisation des GNPs par la voie citrate/acide tannique

Le protocole utilisé ici pour préparer les nanoparticules d'or est conforme à celui décrit par Slot *et al.*⁹. Le seul paramètre permettant de moduler la taille des GNPs dans le domaine 3-17 nm est la concentration en acide tannique (Figure 39).

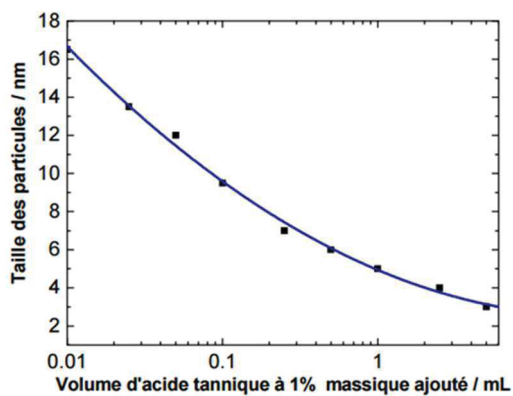


Figure 39 : Effet de la concentration en acide tannique dans la solution réductrice sur la taille des nanoparticules d'or synthétisées⁹.

2.1.3.1. Protocole de synthèse

Deux solutions sont préparées et portées à 60 °C :

- l'une contenant 1 mL d'une solution aqueuse à 1% massique en HAuCl_4 dans 79 mL d'eau.
- l'autre contenant 4 mL d'une solution aqueuse à 1% massique en citrate de trisodium et de 0 à 5 mL (selon la taille des nanoparticules souhaitée) d'une solution aqueuse à 1% massique d'acide tannique. La solution réductrice est versée dans la solution contenant le sel d'or et le tout est porté à ébullition. Lorsque la couleur de la solution devient rouge, la température est portée jusqu'à 95°C (ébullition). Le mélange obtenu est conservé au réfrigérateur et à l'abri de la lumière.

Afin d'obtenir des GNPs de taille proche de celle obtenues par la voie citrate, nous avons ajouté un volume de 25 μL de la solution d'acide tannique à 1%.

2.1.3.2. Caractérisation

Comme l'illustre la Figure 40, le spectre UV-visible des solutions colloïdales présente une bande d'absorption correspondant au plasmon de surface des colloïdes d'or qui est centré autour de 520 nm. On peut en effet penser que plus les nanoparticules sont petites que celles obtenues par la voie citrate. De plus, la bande d'absorption est beaucoup plus étroite traduisant ainsi une plus faible dispersion en taille. Ceci va être vérifié par analyse MET.

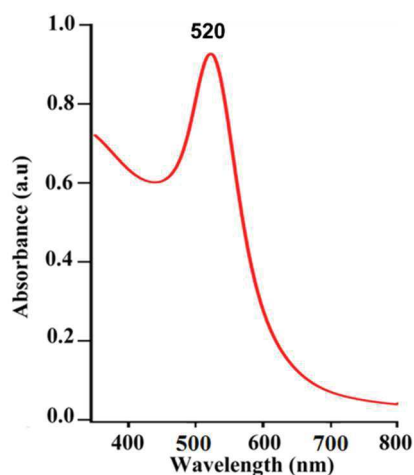


Figure 40 : Spectre d'absorption de la solution colloïdale d'or obtenue par la voie citrate/acide tannique.

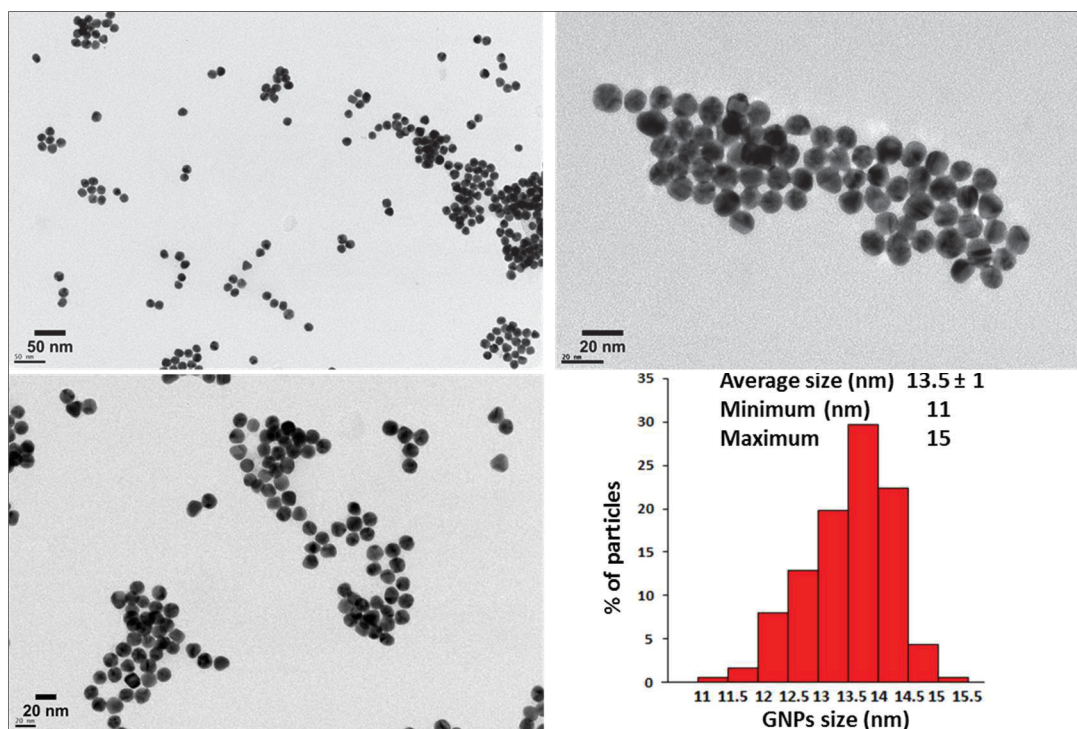


Figure 41 : Clichés de MET et histogramme de la distribution en taille des GNPs obtenues par la voie citrate/acide tannique.

Comme l'allure du spectre UV-vis pouvait le laisser présager, la Figure 41 montre des nanoparticules présentant une distribution de tailles étroite et un écart-type plus faible. La taille moyenne est de $13,5 \pm 1$ nm. Ces nanoparticules seront par la suite utilisées dans l'élaboration des immunocapteurs nanostructurés. La concentration de ces GNPs est de 3,3 nM (voir calcul dans l'annexe 1-1).

2.2. Elaboration des surfaces nanostructurées

2.2.1. Réactifs utilisés

Les surfaces de silicium utilisées sont des plaquettes de silicium de <100> appelées wafers de silicium, commercialisées par Sigma Aldrich. Les deux faces des plaques ne sont pas identiques ; une face est polie, l'autre ne l'est pas. C'est la face polie qui est traitée par la suite. Ces plaquettes sont découpées en pièces de 1x1 cm². La désignation <100> se réfère à l'orientation des plans du silicium cristallin qui est décrite en utilisant les indices de Miller.

Les substrats d'or utilisés dans cette étude proviennent de la firme Arrandee®. Ce sont des lamelles de verre borosilicaté sur lesquelles est évaporée une couche de 200 à 300 nm d'or.

Entre le verre et l'or, une couche de chrome de 50 Å est déposée pour assurer l'adhérence. Ces substrats ont des dimensions de 1x1 cm².

Le Tableau 3 énumère les différents réactifs chimiques utilisés lors de la préparation des surfaces nanostructurées de silicium et d'or. Tous les solvants utilisés sont de haut grade de pureté.

Tableau 3 : Liste de produits utilisés pour la fonctionnalisation des surfaces de silicium et d'or et la post-fonctionnalisation des GNPs.

Réactif	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Pureté	Fournisseur
(3-aminopropyl) triéthoxysilane (APTES)	H ₂ N(CH ₂) ₃ Si(OC ₂ H ₅) ₃	221,37	99%	Aldrich
(3-Glycidyloxypropyl) triméthoxysilane (GOPTS)	C ₉ H ₂₀ O ₅ Si	236,34	≥ 98%	Sigma Aldrich
Acide 11-mercaptoundecanoïque (MUA)	HS(CH ₂) ₁₀ CO ₂ H	218,1	95%	Aldrich
Cysteamine hydrochloride (CEA)	HS(CH ₂) ₂ NH ₂ · HCl	113,61	≥ 98%	Sigma Aldrich
Poly (ethylene glycol) bis (amine) (DAPEG)₄₅	H ₂ N(CH ₂ CH ₂ O) ₄₅ CH ₂ CH ₂ NH ₂	2000	-	Huntsman (Rozenburg, Pays -Bas)
Poly (ethylene glycol) bis (amine) (DAPEG)₆₈	H ₂ N(CH ₂ CH ₂ O) ₆₈ CH ₂ CH ₂ NH ₂	3000	-	Sigma Aldrich
N-hydroxysuccinimide (NHS)	C ₄ H ₅ NO ₃	115,09	98%	Sigma Aldrich
N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)	C ₈ H ₁₇ N ₃ .HCl	191,70	≥99%	Sigma Aldrich

Tous les protocoles impliquant une agitation des surfaces immergées dans les solutions ont été faits avec une table d'agitation (va-et-vient).

2.2.2. Pré-fonctionnalisation des surfaces

2.2.2.1. Les surfaces d'or

i. Prétraitement des surfaces

Des mesures AFM sur les lamelles Arrandee[®] montrent des îlots d'environ 30 nm à 60 nm de diamètre, répartis sur toute la surface. Ils ne présentent aucune structure particulière. Il est difficile d'étudier une telle surface, les variations de rugosité étant trop importantes. De plus, la surface ne possède pas de plans pour permettre le dépôt de thiols sur une large surface. Il nous faut donc traiter les échantillons Arrandee[®], en vue de pouvoir y déposer les SAMs.

En fait c'est la surface (111) de l'or qui nous intéresse. Cette surface étant celle de moindre énergie, c'est suivant cette direction que le cristal a tendance à croître. Une méthode pour obtenir des plans (111) à partir des échantillons Arrandee[®], consiste à recuire la surface. Pour ce faire, on utilise une flamme bleue butane/propane. Sa température de combustion permettant de recuire la surface sans sublimer l'or et ainsi sans détruire l'échantillon.

On effectue le recuit de la surface de préférence dans une pièce sombre pour pouvoir observer le rougissement de la surface. En appliquant la flamme sur la surface, il faut veiller à ne pas trop chauffer les bords, sinon le verre lui aussi chauffe et l'échantillon a tendance à se bomber. Lorsque la surface est légèrement rougie on ôte la surface de la flamme. Après quelques secondes, on recommence, et ceci environ dix fois. Cette technique permet d'obtenir de larges plans (111) d'or. Les surfaces d'or sont ensuite traitées dans un ozonateur (Bioforce Nanosciences) pendant 20 minutes, lavées à l'éthanol 1 fois pendant 15 min puis séchées par un flux de N₂. Avant utilisation, les surfaces sont de nouveau ozonées.

ii. Fonctionnalisation des surfaces

➤ Au-NH₂

Les surfaces d'or sont immergées dans 20mL d'une solution de cystéamine (CEA) à 10 mM dans l'éthanol absolu. Après 24h d'immersion à température ambiante, les échantillons sont rincés 3 fois pendant 5 min dans un volume d'éthanol absolu équivalent au volume d'immersion. Le séchage des surfaces se fait sous flux d'azote.

➤ Au-NH₂/SH

Une solution de MUA à 10 mM et activée par EDC 1.2 eq. et NHS 2.4 eq dans l'éthanol pendant 1 h 30 – 2h. Les substrats Au-NH₂ sont ensuite immergés dans cette solution. Après 24h, les échantillons sont rincés 3 fois 5 min dans un volume d'éthanol absolu équivalent au volume d'immersion puis séchées sous flux de N₂.

➤ Au-PEG

Les surfaces d'or sont immergées dans 20mL d'une solution d'acide 11-mercaptoundecanoïque (10 mM) dans l'éthanol à température ambiante pendant 18 h puis rincées 3 fois pendant 5 min dans un volume d'éthanol équivalent au volume d'immersion. Le séchage des surfaces se fait sous flux d'azote.

Une goutte (150 µL) d'une solution d'EDC (12 mM)/ NHS (24 mM) dans l'eau ultra-pure est déposée sur les surfaces d'or fonctionnalisées pendant 2 h après quoi les surfaces sont rincées à l'eau ultra-pure et séchées sous flux d'azote.

A l'aide d'une micropipette, une goutte de 600 µL de Poly(éthylène glycol) bisamine (DAPEG)₄₅ préalablement chauffé à 98°C est déposée sur la surface. Une seconde plaque issue

du même protocole est placée par-dessus de façon à former un sandwich. Les sandwichs formés sont placés dans une étuve à 98°C pendant une nuit. Les surfaces sont séparées sous sonication dans l'eau pendant 15 min, rincées et séchées sous flux d'azote.

2.2.2.2. Les surfaces de silicium

i. Prétraitement des surfaces

L'oxydation de la surface est une condition *sine qua non* à la fonctionnalisation des surfaces de silicium (voir paragraphe 1.1. du chapitre 3). Afin d'obtenir une forte densité de groupements hydroxyles (OH) en surface, la procédure de nettoyage suivante a été utilisée¹⁰ :

- Phase d'élimination des contaminants minéraux de type "poussières": les surfaces sont immergées dans une solution d'Hellmanex® à 2% (v/v) pendant 2h sous ultrasons puis rincées 5 fois dans l'eau puis séchées sous flux d'azote.
- Phase d'élimination des contaminants organiques : les surfaces sont ensuite immergées dans un mélange d'acide chlorhydrique 37% et de méthanol (v/v = 1/1) pendant 1h sous agitation puis rincées 5 fois à l'eau.

Les fonctions réactives -OH sont créées en immergeant les surfaces dans une solution d'acide sulfurique concentré pendant une heure après quoi les surfaces sont rincées à l'eau ultra-pure puis séchées sous un flux d'azote. Ces surfaces sont directement utilisées pour l'étape de silanisation sinon stockées dans de l'eau ultra-pure.

ii. Fonctionnalisation des surfaces

➤ Si-NH₂

Les surfaces de silicium nettoyées sont immergées dans 50 mL d'une solution d'APTES 50 mM dans du toluène anhydre et portés à 75°C pendant 24 h. Après l'étape de silanisation, les échantillons ont été soumis aux ultrasons pendant 10 min dans du toluène anhydre, séchés sous flux d'azote puis mis à l'étuve à 90°C pendant 2 h¹¹.

➤ Si-NH₂/SH

Une solution de MUA à une concentration de 10 mM a été mélangée à volumes égaux à une solution de N-hydroxysuccinimide (NHS) à 24 mM et de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC) à 12 mM. Ces solutions ont été préparées dans l'éthanol. Après 90 min, les surfaces de silicium greffée amine, sont immergées pendant 90 minutes sous agitation dans la solution de MUA, de NHS et de EDC. Enfin les surfaces sont rincées dans un bain d'éthanol pendant 5 min puis séchées sous flux d'azote.

➤ Si-PEG

A l'aide d'une micropipette, une goutte (150 μL) de GOPTS est déposée à la surface d'une plaque de silicium sur laquelle une seconde plaque est placée de façon à former un sandwich. Les sandwichs sont conservés à température ambiante pendant 3 h après quoi les deux plaques sont séparées et plongées 5 min dans de l'éthanol puis 5 min dans du méthanol et une nouvelle fois 5 min dans de l'éthanol (sous sonication à chaque fois). Les plaques sont enfin séchées sous un flux d'azote et chauffées à 85°C pendant 5 min.

Une goutte de 600 μL de DAPEG₄₅ préalablement chauffé à 98°C est déposée sur une plaque de silicium fonctionnalisée GOPTS. Une seconde plaque est placée par-dessus de façon à former un sandwich que l'on incube à 98°C pendant 12 h. Les surfaces sont par la suite séparées à l'aide d'une pince, plongées dans de l'eau ultra-pure sous sonication pendant 15 min, rincées 3 fois 5 min à l'eau ultra-pure puis séchées sous un flux d'azote ¹².

2.2.3. Dépôt des GNPs

Les GNPs synthétisées par la voie citrate/acide tannique ont été ensuite déposées sur les surfaces fonctionnalisées. Chaque plaque est immergée dans 5mL de solution non diluée de GNPs pendant 2 h sous agitation (utilisation d'une table d'agitation) ou sous sonication. Les surfaces sont ensuite rincées 2 x 5 min à l'eau ultra-pure et séchées sous flux de N₂.

Les GNPs ont été aussi déposées sous flux avec suivi en temps réel par QCM-D. Les quartz fonctionnalisés avec la même procédure décrite précédemment ont été montés dans la QCM. L'ordre d'injections a été effectué comme suit à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$:

- (1) Stabilisation dans l'eau ultra-pure pendant 10-20 min ;
- (2) injection de la solution de GNPs 10 fois diluée à l'eau pendant 50 min ;
- (3) lavage à l'eau.

2.2.4. Post-fonctionnalisation des GNPs

Les plaques d'or et de silicium nanostructurées sont immergées dans une solution de CEA ou DAPEG₆₈ à une concentration de 1 mM dans l'éthanol pendant 2 h. Elles sont ensuite rincées 2 fois pendant 5 min à l'éthanol puis séchées sous flux d'azote.

2.3. Construction et tests des immunocapteurs piezoélectriques

2.3.1. Construction de l'immunocapteur du diclofénac

2.3.1.1. Réactifs utilisés

- Diclofénac sodique (DCF), dodécylsulfate de sodium (SDS), 10 mM tampon phosphate salin (PBS), pH= 7.4 et anti-IgG de souris issus de chèvre (spécifique au fragment Fc) achetés chez Sigma–Aldrich.
- Sérum de lapin anti-diclofénac (anticorps polyclonal Anti-DCF) préparé par l'institut d'hydrochimie (TUM), Munich.

2.3.1.2. Greffage de l'analyte

L'immobilisation du diclofénac est conduite selon le même protocole sur les surfaces contenant ou non des nanoparticules, en faisant réagir la fonction acide carboxylique du diclofénac avec les fonctions amines terminales pour former une fonction amide.

Le diclofénac est activé dans du DMF anhydre (10 mM) par ajout de NHS (12 mM) et d'EDC (12 mM). La solution est agitée pendant 1h30 après lesquelles les quartz d'or et de silicium y sont immergés pendant toute une nuit à température ambiante et sous agitation. Les substrats sont ensuite lavés dans de l'eau ultra-pure pendant 15 min, séchées sous un flux d'azote montés en QCM.

2.3.1.3. Suivi QCM de la reconnaissance moléculaire

La reconnaissance moléculaire entre l'anti-DCF en solution et le DCF immobilisé sur les substrats plans ou nanostructurés a été suivie par QCM-D. Un mélange PBS/EtOH (9:1) dégazé a été utilisé comme solvant et le débit a été fixé à 25 μ L/min. Les injections ont été effectuées dans l'ordre suivant :

- (1) Stabilisation dans PBS/EtOH pendant 10 à 15 min ;
- (2) Injection de l'anticorps polyclonal anti-diclofénac (dilution au 1/500 dans PBS/EtOH) pendant 10 min ;
- (3) lavage PBS/EtOH.

2.3.2. Construction de l'immunocapteur anti-SEA

2.3.2.1. Réactifs utilisés

- 1,4-Phenylene diisothiocyanate (PDITC), 10 mM tampon phosphate salin (PBS), pH=7.4, sérum albumine bovine (BSA) et entérotoxine A de *S. aureus* (SEA) ont été achetés chez Sigma–Aldrich.
- Protéine A recombinante chez Pierce Chemicals. Solution stock à 5 mg/mL
- Anticorps anti-SEA de lapin (polyclonal) purifié par affinité (anti-SEA_{TT}, ref. LAI101) chez Toxin Technology (Sarasota, Floride). Solution stock à 1 mg/mL.
- Une solution stock de SEA a été préparée par reconstitution de l'échantillon avec 1 mL d'eau et sa concentration a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm avec $\epsilon_{280} = 38000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3.2.2. Immobilisation de la Protéine A

Les surfaces fonctionnalisées et post-fonctionnalisées NH₂ ont été immergées dans une solution de PDITC (200 mg/LL dans pyridine/DMF 1:9) pendant 30 min sous agitation. Les échantillons sont ensuite rincés à l'éthanol absolu trois fois puis séchées sous azote et montés directement en QCM. Après une étape de stabilisation au PBS, une solution de protéine A (20 mg/L dans PBS) a été injectée pendant 10 min suivie d'une étape de rinçage au PBS.

2.3.2.3. Immobilisation de l'anticorps anti-SEA

Après injection de la PrA en QCM, la construction du biocapteur est poursuivie avec l'injection de l'anticorps de capture anti-SEA_{TT} (10 mg/L dans PBS) pendant 10 min. Après une étape de lavage au PBS, une solution de PBS contenant 0,1 % BSA (w/v) (PBS-BSA) est injectée pendant 10 min afin de limiter l'adsorption non spécifique de la SEA.

2.3.2.4. Détection de la SEA par QCM

Les solutions étalons de SEA à 9,7 ; 48,5 ; 97 ; 194 ; 485 et 970 ng/mL ont été préparées en diluant la solution stock (0,1 mg/mL) avec PBS-BSA. Ces solutions ont été injectées pendant 10 min et lavées avec PBS-BSA. Le changement de fréquence ΔF pendant la stabilisation, l'injection et le lavage a été mesuré.

- Amplification par le format sandwich

Une solution d'anti-SEA_{TT} (10 mg/L dans PBS-BSA) a été injectée pendant 10-12 min, suivie d'une étape de lavage.

2.4. Bio-fonctionnalisation des GNPs

2.4.1. Réactifs utilisés

- 50 mM et 10 mM tampon phosphate salin (PBS) pH= 8 et 7,4 respectivement, 2-iminothiolane hydrochlorure (réactif de Traut), sérum albumine bovine (BSA) et entérotoxine A de *S. aureus* (SEA) ont été achetés de Sigma–Aldrich.
- Anticorps anti-SEA de lapin purifié par affinité (anti-SEA_{TT}, ref. LAI101) chez Toxin Technology (Sarasota, Floride).

2.4.2. Conjugaison des GNPs

L'anticorps anti-SEA a été conjugué aux GNPs par couplage covalent. Cette méthode permet de contrôler l'immobilisation des anticorps à la surface des particules tout en gardant leur orientation et activité.

L'anticorps anti-SEA a été modifié par le réactif de Traut qui permet de convertir une partie de ses fonctions amine (-NH₂) par des groupements sulfhydryls (-SH) susceptibles de se fixer aux GNPs par liaison covalente S-Au (Figure 42). Le protocole suivi a été établi à partir de celui décrit dans ¹³.

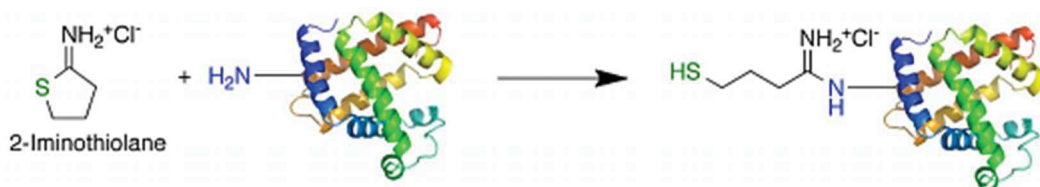


Figure 42 : Insertion d'un thiol par réaction d'une amine primaire avec le réactif de Traut.

La solution d'anticorps a été diluée dans un tampon phosphate de sodium (50 mM) contenant 0,15 M de NaCl à pH=8. La concentration finale de l'anti-SEA vérifiée par UV-vis à 280 nm est 0,32 mg/mL. Afin d'atteindre un nombre substantiel de fonctions thiol, 40 équivalents de réactif de Traut ont été ajoutés à la solution d'anticorps. Le mélange est laissé sous agitation une heure à température ambiante ensuite purifié avec une colonne HiTrap Desalting, 5 mL avec 10 mM PBS à pH=7,4. La concentration finale d'anticorps thiolé récupéré est de 82µg/mL. La solution de GNPs a été centrifugée à 10000g pendant 30 min à 4°C, le surnageant est éliminé et remplacé par un volume équivalent d'eau ultra-pure et mélangé à un volume identique de solution d'anticorps thiolé. Une solution de BSA (0,25% w/v) est ensuite ajoutée pour bloquer

les sites d'interaction non spécifique sur les nanoparticules. Finalement, les GNPs fonctionnalisées sont lavées par centrifugation et re-dispersées dans le PBS. Le surnageant est récupéré pour doser la quantité d'anticorps n'ayant pas été conjugué aux GNPs en ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) afin d'estimer par différence la quantité d'anticorps conjugué aux GNPs. Le même protocole a été suivi pour la conjugaison de la SEA aux GNPs avec une concentration finale après purification de 24 $\mu\text{g/mL}$.

2.4.3. Caractérisation et quantification

Les résultats d'ELISA montrent une faible quantité d'anticorps dans le surnageant ($< 1\mu\text{g/mL}$) donc la concentration finale d'anticorps conjugués aux GNPs est de 40 $\mu\text{g/ml}$. Pour la SEA, les résultats d'ELISA n'étaient pas concluants et donc on suppose que toute la quantité de SEA a été conjuguée aux GNPs c'est-à-dire une concentration maximale de 12 $\mu\text{g/mL}$. Cette hypothèse évite une surestimation de la limite de détection de la SEA par la suite.

Chaque étape de la conjugaison des GNPs a été suivie par spectroscopie UV-visible (spectromètre Varian Cary 50). Un déplacement de la bande d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde a été observé pour les échantillons de nanoparticules conjuguées par rapport aux nanoparticules seules. Afin de vérifier la stabilité des GNPs après conjugaison, les solutions ont été analysées par Cryo-MET. Par rapport à la MET classique, l'échantillon est congelé et maintenu à une température très basse au sein du microscope électronique; ceci assure l'observation des nanoparticules en équilibre dans la solution et évite la transition de phase et l'accumulation possible de particules résultant des procédures de séchage¹⁴.

Les solutions de conjugués avant et après interaction ont été aussi caractérisées par diffusion dynamique de la lumière DLS et par mesure de leur potentiel zêta afin d'analyser l'évolution du diamètre hydrodynamique des particules ainsi que leur charge en surface. Les mesures ont été effectuées avec un LitesizerTM 500 (Anton Paar) équipé d'un laser 40 mW, 658 nm. Chaque échantillon a été analysé en triple et chaque mesure était une moyenne de trois scans de 30 s.

Références bibliographiques

1. (a) Greenler, R. G., Infrared Study of Adsorbed Molecules on Metal Surfaces by Reflection Techniques. *The Journal of Chemical Physics* **1966**, *44* (1), 310-315; (b) Greenler, R. G., Reflection Method for Obtaining the Infrared Spectrum of a Thin Layer on a Metal Surface. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *50* (5), 1963-1968.
2. (a) Boujday, S.; Chapelle, M. L.; Srajer, J.; Knoll, W., Enhanced Vibrational Spectroscopies as Tools for Small Molecule Biosensing. *Sensors (Basel)* **2015**, *15* (9), 21239-64; (b) Hoffmann, F. M., Infrared reflection-absorption spectroscopy of adsorbed molecules. *Surf. Sci. Rep.* **1983**, *3* (2), 107-192.
3. (a) Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Cornut, J. C.; Desbat, B.; Escafre, N.; Pezolet, M.; Turlet, J. M., Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47* (7), 869-874; (b) Blaudez, D.; Turlet, J.-M.; Dufourcq, J.; Bard, D.; Buffeteau, T.; Desbat, B., Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, *92* (4), 525-530.
4. (a) Buffeteau, T.; Desbat, B.; Turlet, J. M., Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis. *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45* (3), 380-389; (b) Barner, B. J.; Green, M. J.; Saez, E. I.; Corn, R. M., Polarization modulation Fourier transform infrared reflectance measurements of thin films and monolayers at metal surfaces utilizing real-time sampling electronics. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (1), 55-60.
5. (a) Mirabella, F. M., *Internal Reflection Spectroscopy: Theory and Applications*. Taylor & Francis: 1992; (b) Lefèvre, G., In situ Fourier-transform infrared spectroscopy studies of inorganic ions adsorption on metal oxides and hydroxides. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *107* (2-3), 109-123; (c) Chittur, K. K., FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* **1998**, *19* (4), 357-369.
6. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. In *Discuss Faraday Soc.*, 1951.
7. Frens, G., Particle size and sol stability in metal colloids. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **1972**, *250* (7), 736-741.
8. Seitz, O.; Chehimi, M. M.; Cabet-Deliry, E.; Truong, S.; Felidj, N.; Perruchot, C.; Greaves, S. J.; Watts, J. F., Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2003**, *218* (1-3), 225-239.
9. Slot, J. W.; Geuze, H. J., A method to prepare isodisperse colloidal gold sols in the size range 3-17 NM. *Ultramicroscopy* **1984**, *15* (4), 383.
10. Cras, J. J.; Rowe-Taitt, C. A.; Nivens, D. A.; Ligler, F. S., Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14* (8-9), 683-688.
11. Aissaoui, N.; Bergaoui, L.; Landoulsi, J.; Lambert, J. F.; Boujday, S., Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (1), 656-65.
12. Huebner, M.; Ben Haddada, M.; Methivier, C.; Niessner, R.; Knopp, D.; Boujday, S., Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 334-341.
13. (a) Hermanson, G. T., Chapter 24 - Preparation of Colloidal Gold-Labeled Proteins. In *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, Academic Press: New York, 2007; pp 924-935; (b) Hermanson, G. T., Chapter 1 - Functional Targets. In *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, Academic Press: New York, 2008; pp 1-168.
14. Monnier, C. A.; Thévenaz, D. C.; Balog, S.; Fiore, G. L.; Vanhecke, D.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A., A guide to investigating colloidal nanoparticles by cryogenic transmission electron microscopy: pitfalls and benefits. *AIMS Biophysics* **2015**, *2* (3), 245-258.

Chapitre 3 : Immobilisation des nanoparticules d'or sur des surfaces planes

Introduction

L'immobilisation des GNPs sur des surfaces planes est un préalable nécessaire à leur utilisation notamment pour le développement de plusieurs dispositifs, dont les biocapteurs ¹. Les propriétés physiques et chimiques de ces dispositifs dépendront non seulement de la taille et de la forme des nanoparticules d'or, mais aussi de leur arrangement spatial et de la nature de l'interaction avec la surface du substrat ².

Pour les biocapteurs, l'efficacité dépend fortement de l'exactitude de la mesure et sa reproductibilité ³. Ainsi, la réalisation d'une couche dense avec un arrangement régulier de nanoparticules, est cruciale pour assurer une amplification optimale tout en préservant une réponse reproductible et quantitative du capteur en présence de sa cible ⁴.

Une variété de méthodes existe pour incorporer des GNPs sur des substrats solides, elles peuvent être classées en deux catégories : formation directe de nanoparticules sur la surface, et dépôt de solutions colloïdales sur la surface. La formation directe de nanoparticules d'or sur la surface implique la croissance de nanoparticules par réduction ⁵, évaporation thermique ⁶, ou électrodéposition ⁷ ou par des techniques de fabrication comme la lithographie ⁸. Comparé à ces méthodes, la méthode de dépôt de solutions colloïdales pré-synthétisées offre une alternative peu coûteuse et n'exige aucun équipement spécialisé. En plus de la possibilité de sélectionner la taille et la forme des particules, elle fournit des degrés de liberté multiples pour créer une large variété de surfaces modifiées par des GNPs.

Cependant, le dépôt contrôlé de nanoparticules sur des surfaces n'est pas trivial. Si on procède à une déposition directe d'une solution de GNPs sur un substrat, il est possible que les particules s'agglomèrent et ne forment pas un dépôt uniforme. D'autre part, les GNPs sous forme colloïdale sont enrobées d'un agent stabilisant, ainsi la surface de l'or sur les GNPs n'est pas accessible pour une réaction chimique avec d'autres réactifs.

Plusieurs revues récentes sur les applications des surfaces modifiées par des nanoparticules pour les biocapteurs plasmoniques ⁹, électrochimiques ¹⁰ et la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS)¹¹ ont décrit des stratégies d'immobilisation de GNPs. Elles incluent généralement une couche intermédiaire de molécules organiques greffées sur la surface, comportant des groupes fonctionnels terminaux choisis pour leur affinité (électrostatique ou chimique) pour les nanoparticules ^{4,12}.

Ces plateformes doivent aussi être stables au fil du temps et l'interaction des nanoparticules avec la surface doit être assez forte afin que les nanoparticules restent attachées à la surface pendant leur utilisation.

Pour pouvoir étudier, réaliser et utiliser ces surfaces nanostructurées, les paramètres à contrôler pour les nanoparticules d'or sont donc :

- leur disposition sur la surface : l'idéal est d'obtenir un ordonnancement dispersé.
- leur densité : qui doit être importante pour pouvoir générer une amplification ;
- leur qualité : en particulier une distribution homogène en taille et en forme.

Avec des nanostructures morphologiquement proches, on a plus de chance de se rapprocher de la situation où leurs propriétés sont similaires. Il faut donc trouver un moyen de contrôler l'organisation spatiale des GNPs. Ceci est réalisable en maîtrisant la fonctionnalisation préalable de la surface.

La fonctionnalisation de surfaces planes se conçoit comme la fabrication de monocouches auto-assemblées (SAM, de l'anglais Self Assembled Monolayers). Ulman fut le premier à étudier les assemblages moléculaires formés par adsorption de molécules actives sur une surface solide¹³. Ils constituent une méthode simple et facile à mettre en œuvre pour fonctionnaliser un substrat et moduler ses propriétés de surface¹⁴.

Les molécules adsorbées s'assemblent spontanément en structures organisées grâce à des interactions intermoléculaires¹⁵. Par simplicité, et à défaut d'un meilleur terme, on parle souvent de la formation d'une SAM, bien qu'il soit important de garder à l'esprit que les couches organiques ainsi formées ne sont ni forcément complètes ou uniques (multi-couches) ni forcément cristallines (orientation des chaînes adjacentes plus ou moins déterminée).

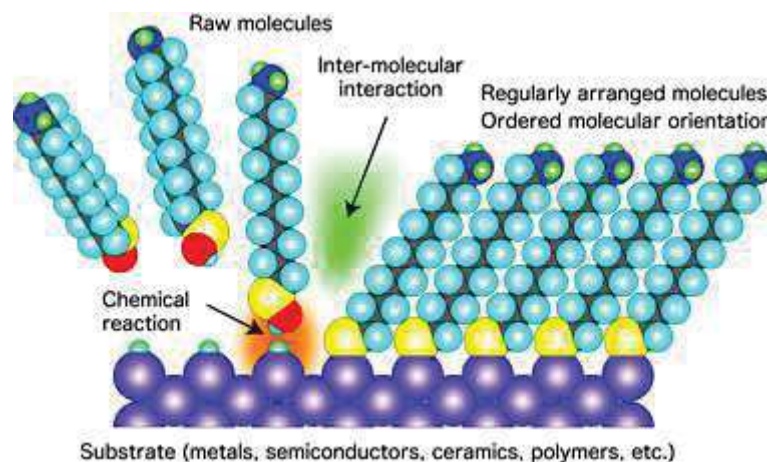


Figure 43 : Formation d'une monocouche auto-assemblée sur un substrat. Source : site web du Nanoscopic Surface Architecture Laboratory.

Pour parvenir à un contrôle au niveau moléculaire de la modification de l'interface, l'utilisation de SAMs ou des films minces est généralement requise. Cependant, il y a une myriade de molécules possibles pour les assemblages moléculaires sur des surfaces. Ce choix doit se faire à partir de la nature du support, qui va dicter le type du système d'auto-assemblage qui peut être employé. Le choix du système d'auto-assemblage dépend également du degré de stabilité et de l'ordre prérequis des molécules greffées. Les molécules formant les SAMs comprennent :

- une extrémité qui a une forte affinité pour la surface ;
- des chaînes alkyles ou aromatiques qui jouent un rôle crucial dans l'assemblage de la monocouche sur la surface ;
- un groupement terminal qui définit la fonctionnalité chimique de la surface.

L'utilisation de SAM permet aussi d'incorporer avec précision plus qu'un type de molécule, créant ainsi des surfaces multifonctionnelles. Ces surfaces multifonctionnelles permettent de comprendre la manière dont la surface interagit avec son environnement.

Pour les substrats d'or, le greffage se fait *via* les SAMs de thiols ¹⁶, tandis que les silanes sont choisis pour les surfaces siliciques (wafer de silicium, lame de verre,...) avec un large panel de fonctions terminales ^{12e, 17}.

Une fois les GNPs immobilisées sur les surfaces, une post-fonctionnalisation est requise pour pouvoir greffer des biomolécules ou des cibles. Pour cela les composés ayant des fonctions thiols ou amines représentent le moyen le plus largement utilisé ¹⁸.

Dans ce chapitre nous allons étudier l'immobilisation des GNPs sur des surfaces planes pour atteindre des architectures nanométriques qui seront utilisées comme plateformes de bio-détection.

On commencera dans les deux premières parties par l'étude de la fonctionnalisation des surfaces transductrices (de silicium et d'or) afin de créer des couches d'accroche pour les GNPs. Les surfaces résultantes seront caractérisées et vérifiées par mesure de l'angle de contact, spectroscopie IR (PM-IRRAS pour les surfaces d'or et ATR pour celles de silicium) et spectroscopie XPS. Les GNPs synthétisées après optimisation par la voie citrate/acide tannique seront ensuite déposées sur les surfaces fonctionnalisées. Plusieurs protocoles d'immobilisation seront testés et suivis par MEB dans la troisième partie de ce chapitre. Les meilleures conditions d'immobilisation des GNPs sont recherchées de façon à optimiser le recouvrement des surfaces transductrices par les nanoparticules. Après avoir établi les conditions optimales d'immobilisation des GNPs pour chaque surface, nous étudierons dans la dernière partie la post-fonctionnalisation des GNPs immobilisées et notamment l'influence de la nature des molécules utilisées sur leur organisation en surface.

Partie 1

Fonctionnalisation des surfaces de silicium

Cette partie sera consacrée à la fonctionnalisation des surfaces de silicium par greffage de molécules fonctionnelles sur les groupements silanols superficiels. Les SAMs formées seront étudiées par différentes techniques de caractérisation de surface, notamment mesure de l'angle de contact, ATR et XPS.

1.1. Introduction

Le matériau semi-conducteur le plus utilisé du point de vue technologique est le silicium. Il présente des avantages similaires à la silice à savoir : une grande variété d'agents de silanisation² permettant la fonctionnalisation des surfaces de silicium ; une bonne résistance aux solvants organiques et une haute résistance thermique¹⁹. Les SAMs sur l'oxyde de silicium recouvrant les wafers de silicium sont très étudiées. Cependant, ce type de SAMs nécessite de travailler dans des conditions opératoires contraignantes du fait de la réactivité des groupements superficiels impliqués.

La surface des matériaux siliciques est terminée par des ponts siloxanes (Si-O-Si) et des groupements silanols (Si-OH). La condensation entre les groupements silanols étant une réaction relativement facile, les monocouches à base d'organosilanes ($R_nSiX_{(4-n)}$, $n=1, 2, 3$) sont le système d'auto-assemblage le plus courant, X étant un groupement hydrolysable (chloro ou alkoxy généralement) et R désignant un groupement organique non hydrolysable pouvant être porteur d'une fonction réactive²⁰. Nous nous focaliserons dans cette étude sur les organoalkoxysilanes de formule ($R_nSiOR'_{4-n}$). La fonctionnalité de l'organosilane est relative au nombre de groupements hydrolysables présents sur la molécule. Comme l'illustre la Figure 44, en présence d'eau, l'organosilane subit une réaction d'hydrolyse des groupements alkoxy. Ensuite, le silane peut se condenser sur lui-même en formant des oligomères, c'est l'homo condensation, ou bien se greffer à la surface par la création de liaisons Si-O-Si entre les groupements Si-OH présents à la surface de silicium oxydé et les molécules de silane¹³.

² Traitement de la surface de silice par un silane, appelé aussi silanation et silylation.

Communément, la surface est activée avant l'auto-assemblage afin de la nettoyer et de maximiser le nombre de groupements silanols ²¹.

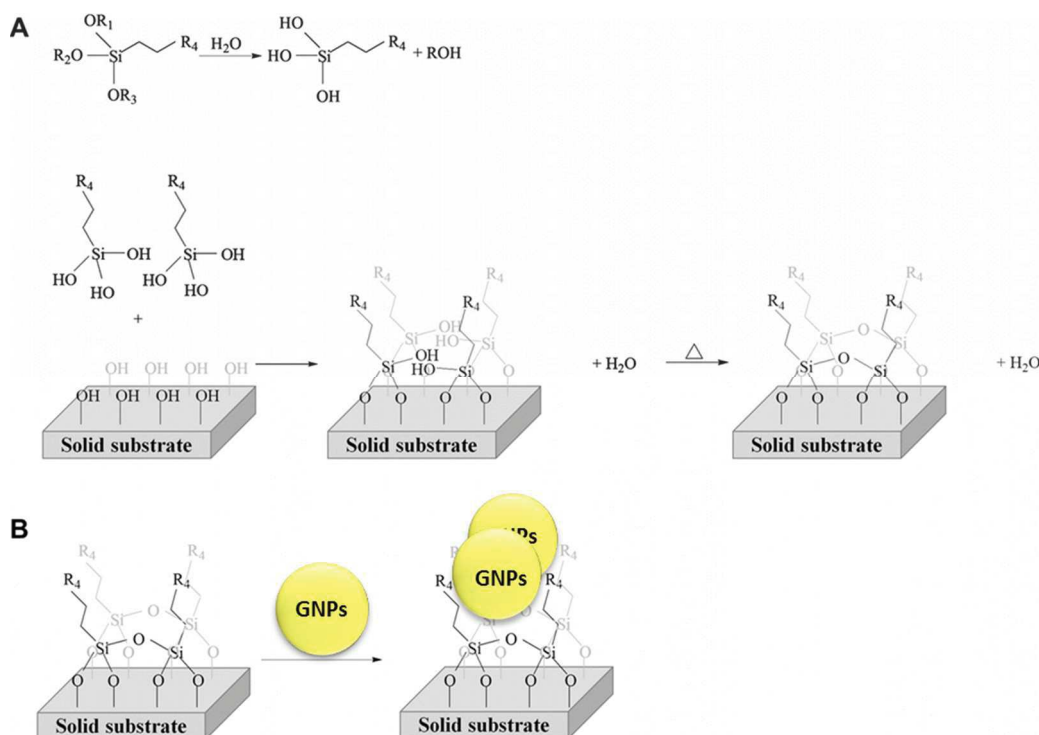


Figure 44 : (A) Modification de surfaces de SiO₂/Si par des molécules de silane (où R1, R2, R3 sont des groupements alkyl et R4 est un groupement fonctionnel qui peut interagir avec les GNPs) et immobilisation des GNPs (B), adaptée de ^{12e}.

Les propriétés des SAM formées, à savoir la composition chimique, l'épaisseur, l'orientation et l'ordre des chaînes alkyle ont fait l'objet de plusieurs travaux ²² qui montrent que la représentation précise de l'interface entre la SAM et la surface de silicium n'est pas anodine. En effet, divers processus interfaciaux peuvent avoir lieu lors de la déposition d'un organosilane ¹⁷, ils impliquent un certain nombre d'étapes et dépendent fortement de différents paramètres ²³ (la concentration des adsorbats ²⁴, la teneur en eau ²⁵, la durée et la température de réaction) ²⁶. Les traces d'eau sont essentielles pour la formation de ces monocouches ^{22a, 27}. Des études plus récentes ont montré que l'augmentation de la teneur en eau favorise fortement une croissance hétérogène sous forme d'agrégats ²⁸.

La réaction de silanisation est relativement simple à réaliser, mais la formation d'une monocouche reproductible et bien définie est extrêmement difficile ^{27, 29}. L'un des problèmes majeurs avec ce système est la formation accidentelle de silanes polycondensés résultant dans la formation de multicouches et d'agrégats. L'augmentation de la température de la réaction permet de limiter la formation d'agrégats produits par polycondensation des silanes ^{23, 30}. Les dépôts en phase gaz donneraient des monocouches et moins d'agrégats ³¹, néanmoins de

nombreux auteurs s'accordent à dire qu'il y a des dépôts d'oligomères mono ou polygreffés sur la surface³². Une autre contrainte avec les organosilanes est leur instabilité en milieu basique. Les organosilanes restent, cependant pour plusieurs substrats tels que les semi-conducteurs, les meilleurs systèmes de fonctionnalisation. En fait, ils permettent d'établir des plateformes moléculaires définies servant de boîte à outils pour les transformations chimiques en surface¹⁷. Pour avoir la fonctionnalité requise sur une surface, on peut procéder par une fonctionnalisation en plusieurs étapes. Il est important de trouver le groupe fonctionnel le mieux qualifié pour être l'extrémité distale de la couche de base.

Dans cette partie nous allons présenter les différentes stratégies de fonctionnalisation adoptées pour l'obtention de la fonctionnalité requise pour greffer les GNPs. Une vérification par différentes techniques de caractérisation de surface sera permettra de valider les différentes étapes de ce processus.

1.2. Sélection des SAMs

Le groupement fonctionnel (R) permet l'accrochage des nanoparticules à la surface de silicium. Le groupement d'accroche couramment utilisé dans la littérature est le groupement amine^{2a, 33}. En effet, les colloïdes d'or sont chargés négativement du fait de la présence d'ions citrate en périphérie, tandis que les groupes amines peuvent dans certaines conditions être chargés positivement. Donc, ici l'affinité spécifique découle des fortes interactions électrostatiques entre les GNPs chargées négativement et les groupements ammonium chargés positivement³⁴.

En vue de greffer des nanoparticules qui resteraient stables en présence d'une solution riche en ions (milieu tampon des composés biologiques), l'approche covalente est aussi explorée. Sachant que l'or sous forme de Au^+ (acide mou dans la théorie de Pearson) a une l'affinité particulière pour le soufre (base molle dans la théorie de Pearson), il est intéressant de greffer des silanes thiols sur les surface de silicium pour y immobiliser les GNPs par liaison covalente^{12b}. Ceci peut être réalisé en faisant réagir par exemple un thioalkylacide tel que le MUA sur la fonction amine. Cette réaction permettra en outre d'allonger la chaîne alkyle et, à défaut de l'ordonner par des liaisons inter-chaines, de réduire son repliement vers la surface.

Plus récemment, la fonctionnalisation de surfaces par des polymères a été utilisée avec succès pour immobiliser des nanoparticules d'or³⁵. Il a été démontré que le poly(éthylène glycol) (PEG) est particulièrement adapté aux biocapteurs en formant des films uniformes et lisses qui limitent l'adsorption non spécifique³⁶ et présentent une haute affinité aux nanoparticules d'or stabilisées par des ions citrate^{35c, 37}.

Trois chimies de surface ont été ainsi sélectionnées dans ce travail pour préparer des surfaces d'ancrage des GNPs. Les couches d'adhésion incluent des amines (NH_2) pour assurer une forte interaction électrostatique avec les GNPs, ou amine et thiols (NH_2/SH) pour en plus lier les GNPs par liaisons covalentes S-Au. De plus, nous utiliserons des **PEG** diamine afin de limiter l'adsorption non spécifique des protéines durant le processus de détection. Les trois modifications chimiques des surfaces de silicium sont illustrées dans la figure ci-dessous et détaillées dans le paragraphe qui suit.

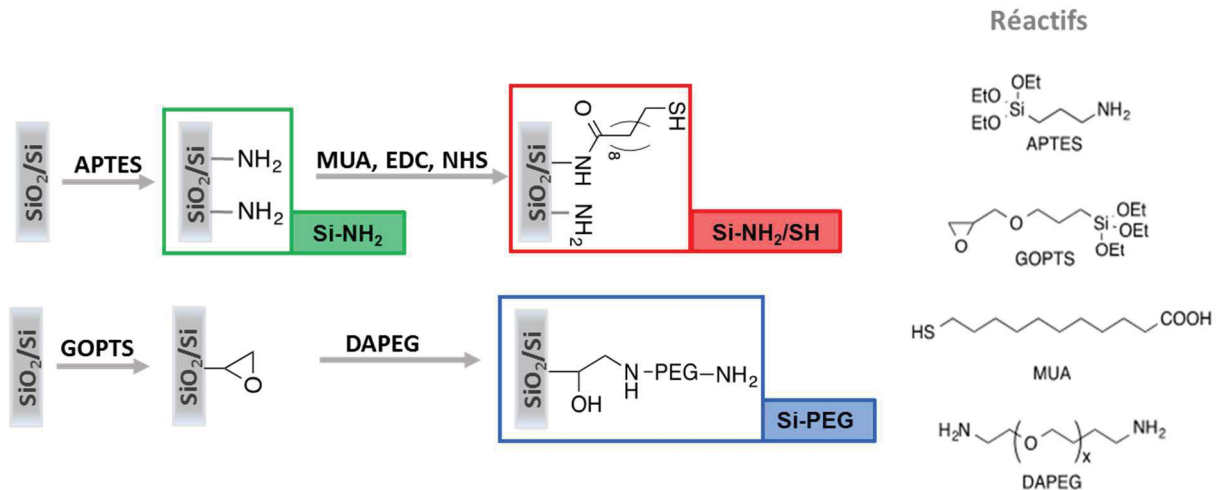


Figure 45 : Schéma des trois stratégies de fonctionnalisation des surfaces de silicium et nomenclature adoptée pour les différents types de substrats.

1.3. Assemblage des couches et caractérisation

Les wafers de silicium utilisés contiennent déjà une couche superficielle d'oxyde contenant des silanols formés par contact avec l'atmosphère. L'approche choisie pour ce travail est d'oxyder superficiellement la surface de silicium, augmentant ainsi la densité des fonctions silanols en surface. Nos protocoles débutent alors par une étape initiale de nettoyage et de prétraitement oxydant.

Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) a été choisi pour former des couches à terminaison amine sur la surface. L'obtention d'une SAM thiol à longue chaîne carbonée se fait par greffage de l'acide mercaptoundécanoïque (MUA) sur la SAM amine par la formation d'une liaison amide entre le groupement amine primaire de la SAM et le groupement carboxyle de l'acide (voir Figure 45). Cependant, cette réaction nécessite une étape d'activation. Sachant que les amines primaires réagissent avec les esters de N-HydroxySuccinimide (NHS) pour former des liaisons amide, l'activation de la fonction acide carboxylique en fonction ester de NHS avant son greffage est réalisée. Généralement, le N-éthyl-N-(diméthylaminopropyl) carbodiimide

(EDC) et le NHS sont utilisés ensemble formant un groupement intermédiaire stable et qui permet d'obtenir un bon rendement de réaction avec les groupements amines³⁸.

Le PEG diamine a été greffé de manière covalente sur les surfaces de silicium par l'intermédiaire du silane 3-glycidyloxypropyl-triméthoxysilane (GOPTS)³⁹. Nous avons utilisé un PEG diamine (DAPEG₄₅) avec un poids moléculaire de 2000 Da. Il a en effet été montré précédemment que cette taille moyenne permet d'avoir un recouvrement homogène sur les surfaces de silicium^{35c, 36a, 40}.

Les protocoles de nettoyage, activation et de fonctionnalisation des surfaces de silicium sont décrits dans le chapitre 2, paragraphe 2.2.2.1. Les SAMs sont ensuite analysées par mesure de l'angle de contact, par spectroscopie IR en mode ATR et par XPS. Pour plus de clarté, les résultats des caractérisations des différentes surfaces sont regroupés et discutés par technique d'analyse.

1.3.1. Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau est une méthode fiable et rapide pour estimer le caractère hydrophile des surfaces. Elle est très utilisée pour la caractérisation de surfaces fonctionnalisées, notamment pour la silanisation³².

Le Tableau 4 récapitule les valeurs d'angle de contact mesurées pour les étapes de prétraitement et de fonctionnalisation des surfaces de silicium.

Tableau 4: Résultats de mesure de l'angle de contact des surfaces de silicium.

<i>Si</i>	<i>nettoyé</i>	<i>APTES</i>	<i>APTES-MUA</i>	<i>GOPTS</i>	<i>GOPTS-DAPEG</i>
<i>Angle de contact (°)</i>	<10°	83±2°	40±4°	51±1°	43±2°

Les surfaces de silicium nettoyées ont un angle de contact inférieur à 10°. Elles sont très hydrophiles. Cela prouve l'efficacité du protocole de nettoyage qui permet d'éliminer tout contaminant organique indésirable⁴¹ et de générer des groupements hydroxyles en surface^{36b}.

La silanisation de la surface avec APTES donne un angle de contact de 83°. Cette valeur correspondant à une surface peu hydrophile indique un désordre dans les couches d'APTES assemblées sur la surface de silicium^{23, 42}. Ceci peut être expliqué par le repliement de l'organosilane APTES immobilisé par formation de liaisons hydrogène entre la fonction amine de ce dernier et les groupements OH des silanols qui ont un caractère acide assez prononcé⁴² (voir Figure 46).

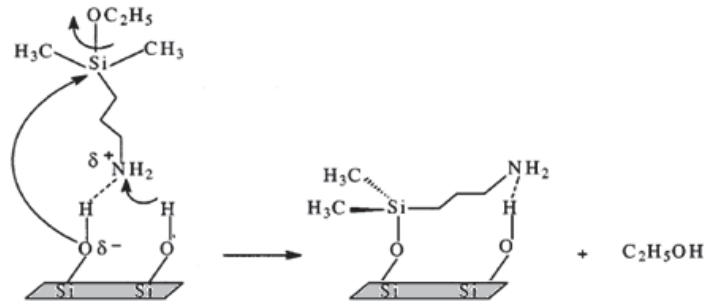


Figure 46 : Phénomène de repliement de l'APTES par formation de liaison H d'après ⁴².

Le couplage du MUA aux fonctions amine de la couche d'APTES aboutit à une baisse de l'angle de contact à 40°. Cette augmentation du caractère hydrophile résulterait d'un meilleur arrangement de la couche organique par interactions de Van der Waals étendues entre les chaînes d'hydrocarbures plus longues du MUA ¹⁵. Les SAM sont en effet mieux ordonnées pour des monocouches formées à partir des thiols ayant 10 atomes de carbone ou plus ¹³.

La silanisation avec GOPTS a également mené à une augmentation de l'angle de contact de 10 à 51° du fait de la présence de la couche organique à la surface ⁴³. Le traitement avec DAPEG a légèrement diminué l'angle de contact à 43° ce qui est en accord avec le caractère hydrophile des PEG ^{35c}.

1.3.2. Analyse par ATR-IR

La spectroscopie infrarouge en mode ATR a été utilisée pour caractériser la composition moléculaire des différentes couches déposées sur les surfaces. Les spectres sont présentés en Figure 47.

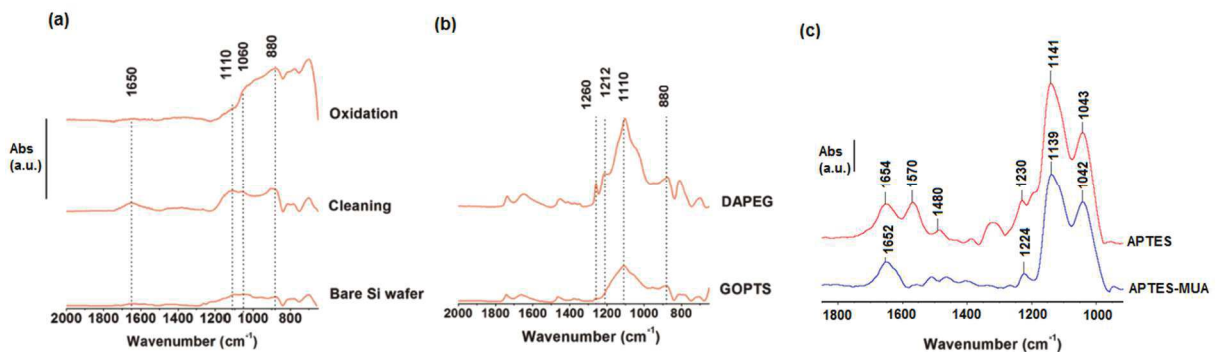


Figure 47 : Spectres ATR-IR obtenus après le nettoyage et l'oxydation (a) et fonctionnalisation (b : GOPTS/GOPTS-DAPEG, (c) : APTES/APTES-MUA).

Le spectre (a) montre la caractérisation des surfaces après l'étape de nettoyage et d'oxydation. Les bandes 1060 et 1110 cm^{-1} sont attribuées à la couche continue de Si-O-Si ²⁹. La bande à

880 cm^{-1} est attribuée aux groupements silanol en surface ⁴⁴. Après traitement par l'acide sulfurique concentré lors de l'étape d'oxydation, la bande des Si-O-Si à 1060 cm^{-1} décroît et celle à 880 cm^{-1} (Si-OH) augmente. Ceci montre l'étape d'oxydation a permis de créer davantage de groupements hydroxyles en surface.

La fonctionnalisation des surfaces de silicium par le GOPTS suivie du greffage du DAPEG est également caractérisée par ATR-IR (spectres (b)). Après greffage du GOPTS, on a apparition d'une bande à 1110 cm^{-1} , attribuée à la fonction éther C-O-C du silane. La diminution de l'intensité de la bande à 880 cm^{-1} indique la réaction des groupements silanols avec le silane.

Le greffage du DAPEG à la surface Si-GOPTS est mis en évidence par l'augmentation de l'intensité de la bande à 1110 cm^{-1} , attribuée à l'élongation des liaisons C-O-C des PEG ⁴⁵.

Pour Si-NH₂, le spectre obtenu après greffage de l'APTES (Figure 47-c) est en parfait accord avec les données de la littérature ⁴⁶. Les bandes à 1140 cm^{-1} et 1040 cm^{-1} sont attribuées aux modes de vibration longitudinal (Si-O-Si LO) et transverse (Si-O-Si TO), respectivement ^{26, 29}. Les bandes à 1230 et 1043 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration LO et TO de la silice ⁴⁷. Les bandes à 1480, 1571 and 1654 cm^{-1} sont à l'origine de la présence des groupements amine et ammonium (NH₂/NH₃⁺) à la surface ⁴⁶. Après réaction avec le MUA, la disparition de la bande à 1571 cm^{-1} , attribuée aux groupements NH₃⁺, prouve la conjugaison de l'acide activé aux fonctions amine de surface ²⁶. Par ailleurs, les bandes entre 1500 et 1700 cm^{-1} , pourraient être attribuées aux bandes amide I et II suite à la liaison du MUA à l'APTES.

1.3.3. Caractérisation par XPS

Les surfaces modifiées ont été aussi analysées par spectroscopie de photoélectrons X. Dans un premier temps, les spectres globaux ont permis d'observer la présence des différents éléments, Si, O, C et, en fonction de la terminaison de la SAM, S et/ou N.

Les résultats obtenus pour le photo-pic du silicium sont représentés sur la Figure 48-a. On y voit deux contributions : une première vers 99 eV attribuée au silicium au degré d'oxydation 0 (Si⁰) du support silicique, et une seconde vers 103 eV attribuée au silicium oxydé (Si^{ox}) et aux silanes. Le rapport entre ces deux contributions (Si^{ox}/Si⁰) permet d'estimer le taux de recouvrement de la surface en estimant que la couche de silice est la même pour toutes les surfaces. Pour les surfaces fonctionnalisées APTES et APTES/MUA, ils sont quasi équivalents (64 et 56 %).

A partir des intensités des pics Si 2p, l'épaisseur de la couche GOPTS a été estimée à 0,53 nm. Cette valeur est inférieure à l'épaisseur d'une monocouche (0,76 nm) ⁴⁸. Après réaction avec le

DAPEG, cette épaisseur augmente à 1,7 nm. Cette épaisseur a été aussi vérifiée par AFM (voir annexe 2-1) donnant une valeur de 1,6 nm. A noter que ces mesures d'épaisseur ont été effectuées sur des échantillons secs, et un gonflement de la couche induit par le piégeage des molécules d'eau dans les PEG est attendu en solution pouvant atteindre 10 fois la valeur calculée ⁴⁹.

La présence de pics N 1s (Figure 48-b) montre la présence d'azote pour les surfaces fonctionnalisées DAPEG, APTES et APTES-MUA. Après greffage du DAPEG sur les surfaces avec le GOPTS, on observe l'apparition de deux bandes à 401 (NH, NH₂) et 403 eV (NH₃⁺). Pour l'APTES et l'APTES-MUA, on observe aussi deux types de contributions : [C-NH₂] à 399,8 eV, [C-NH₃⁺] à 401,6 eV. Les photo-pics de ces deux surfaces sont différents en forme et en intensité. Cependant, il est difficile de différencier la contribution de l'azote dans C-NH₂ ou [C=O)-NH] de la liaison amide ⁵⁰.

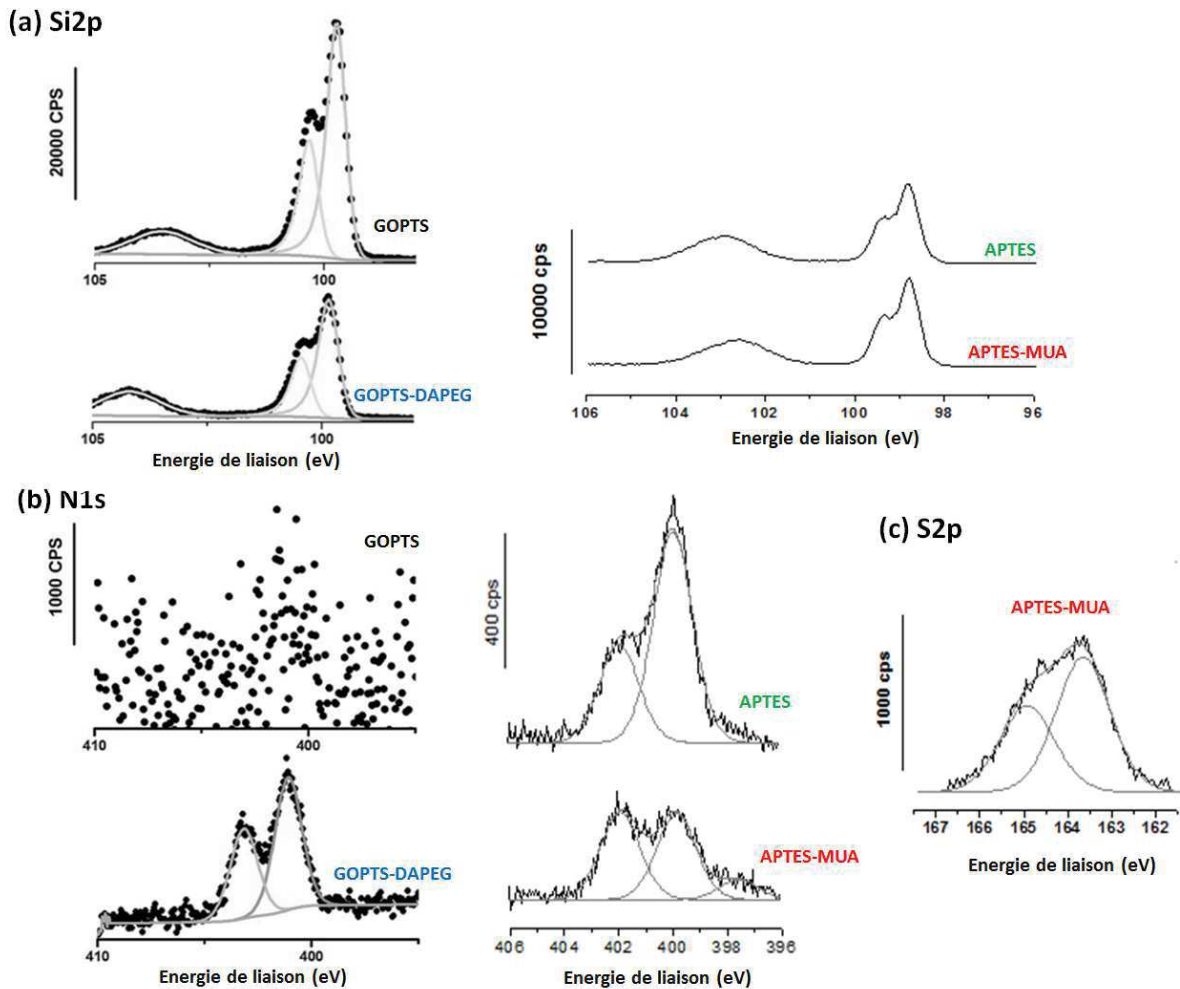


Figure 48 : Spectre XPS des pics Si 2p (a), N 1s (b) et S 2p (c) obtenus après fonctionnalisation GOPTS+DAPEG ^{36b} et APTES+MUA ^{50b} des surfaces de silicium.

Pour le pic S2p de la surface APTES-MUA (Figure 48-c), on observe un doublet correspondant

au S 2p_{3/2} et S 2p_{1/2} respectivement à 163,6 et 164,9 eV caractéristique du SH. Le ratio S/N calculé à partir des pics S 2p et N 1s est de 0,24 et montre que la réaction du MUA sur les amines est partielle. La surface APTES offre donc des fonctions amines et thiols dans un rapport 4 :1, et avec des longueurs de chaînes différentes.

1.4. Conclusion

La fonctionnalisation des surfaces transductrices de silicium a été réalisée par des groupements différant par leur fonction terminale et la longueur de la chaîne carbonée (APTES, APTES-MUA et GOPTS-DAPEG). Les SAMs formées ont été ensuite caractérisées par des techniques complémentaires.

La mesure de l'angle de contact a permis de vérifier les différentes étapes de fonctionnalisation de surface à partir de la variation de leur hydrophilie. Ces mesures ont aussi montré que le protocole de nettoyage et d'oxydation suivi est efficace et permet de générer des groupement silanols en surface.

La spectroscopie IR en mode ATR a confirmé la présence des différentes fonctions caractéristiques des molécules greffées validant ainsi les protocoles de greffage et d'activation. Cette analyse a été encore attestée par XPS qui a permis de vérifier la composition chimique des monocouches et d'estimer leur taux de recouvrement en surface.

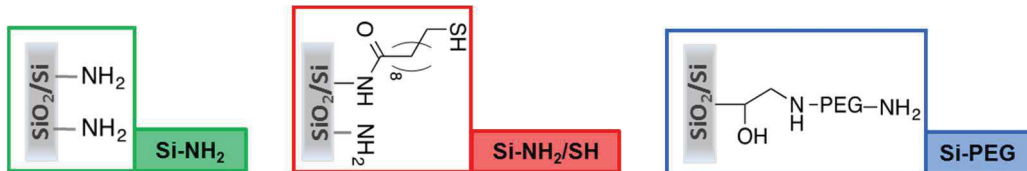
Ces modifications sont des preuves de la réussite du greffage moléculaire en surface qui est une étape clé dans l'élaboration des biocapteurs.

Les principales conclusions de cette partie sont résumées dans le bilan ci-dessous :

Bilan

Trois types de surfaces de silicium fonctionnalisées ont été préparées et caractérisées :

- **Si-NH₂** : avec une couche de silanes amines incomplète et des repliements de la chaîne carbonée sur la surface ;
- **Si-NH₂/SH** : avec un taux de recouvrement proche de celui de l'APTES et 24 % d'amine ayant réagi avec la fonction acide du MUA soit un rapport NH₂/SH en surface de 1/4.
- **Si-PEG** : la surface n'était pas totalement recouverte par le silane (GOPTS) mais a permis d'obtenir une couche dense et homogène de DAPEG.



La fonctionnalisation des surfaces de silicium étant établie, son incidence sur le dépôt des GNPs sera étudiée dans la partie 3 de ce chapitre.

Partie 2

Fonctionnalisation des surfaces d'or

Cette partie traite de la fonctionnalisation des surfaces de d'or par greffage de thioalkanes. Les SAMs formées seront étudiées par deux techniques de caractérisation de surface : la mesure de l'angle de contact et le PM-IRRAS.

2.1. Introduction

Les surfaces d'or ont des propriétés intéressantes pour l'étude d'interfaces fonctionnalisées par des biomolécules. Ce métal est très utilisé dans l'élaboration de biocapteurs puisqu'il est compatible avec de nombreuses techniques de transduction. Il présente l'avantage d'être stable, inerte dans les conditions ambiantes, de ne pas réagir avec l'oxygène et de se lier au soufre avec une constante d'affinité élevée ⁵¹. Ainsi, de nombreux travaux ont été consacrés à la modification de surfaces d'or par des SAMs de thiols.

Comme pour le silicium, la fonctionnalisation de surface est nécessaire car il est indispensable de recouvrir la surface du transducteur par des fonctions réactives pour pouvoir greffer les GNPs.

Les SAMs de thiols et disulfures sur des métaux et particulièrement sur l'or, ont attiré une attention considérable en raison de leur préparation facile en phase gazeuse ou en solution et leur haute stabilité et reproductibilité ⁵². Cette stabilité provient de la forte liaison Au-S et des interactions Van der Waals entre les chaînes alkyles ⁵³. L'examen de la littérature montre que les alcanethiols sont de loin les plus étudiés ¹⁶, notamment dans le design de biocapteurs ⁵⁴.

La nature de la liaison Au-S n'est pas complètement élucidée. Le mécanisme de formation des SAMs de thiols sur l'or est encore sujet à controverse dans la communauté scientifique. Les premiers travaux de Nuzzo en 1987 pour comprendre la nature de cette liaison, ont montré que cette liaison est homolytique et son énergie est de l'ordre de 50 kcal/mol ⁵⁵. Cependant, ceci ne n'explique ni comment l'or se lie au soufre, ni ce que devient l'hydrogène. S'il est à présent admis que le thiol s'adsorbe de manière individuelle, sous forme de thiolate (S⁻), cette question a été longement discutée. La réaction communément admise entre les thiols et l'or est la suivante ¹³:



Une étude expérimentale effectuée par Kankate *et al.*,⁵⁶ a prouvé que du dihydrogène est produit après adsorption du thiol sur la surface, mettant en évidence la coupure de la liaison S-H et la formation de thiolate (S⁻) énoncé par la réaction précédente.

En ce qui concerne la formation d'une SAM, de nombreux auteurs s'accordent sur le fait que le processus d'adsorption de thiols à la surface d'une couche d'or se fait en 2 étapes. La première étape est déterminée par la chimisorption des chaînes *via* les atomes de soufre sur le substrat d'or suivie rapidement par le redressement des chaînes. Cette étape, pendant laquelle 80 à 90 % de la couche SAM est formée, dure quelques minutes. Ensuite, il s'agit de la phase d'organisation avec redressement du groupement terminal. L'ordonnement des chaînes par les interactions de Van der Waals est beaucoup plus lent, le phénomène peut durer plusieurs heures. L'organisation des chaînes alkyles dépend de leur longueur⁵⁷ et la cinétique est plus rapide pour des chaînes longues (> 9C), et pour des chaînes sans substituants stériquement encombrants⁵⁸.

Dans cette partie, nous allons étudier la fonctionnalisation des surfaces d'or par des fonctions chimiques analogues à celle utilisées pour le silicium afin de greffer les GNPs par la suite. La fonctionnalisation sera ensuite validée par les techniques de caractérisation de surfaces.

2.2. Sélection des SAMs

Pour l'élaboration de biocapteurs sur des surfaces d'or, on a souvent recouru aux SAMs à base de thiolamines, telle que la cysteamine (CEA)⁵⁹. Ces molécules présentent une extrémité thiol et une fonction amine (NH₂), protonée en milieu acide, permettent à la fois d'immobiliser des biomolécules sur l'or et à l'ancrage des GNPs chargées négativement^{12c}.

Plusieurs travaux utilisent des dithiols pour immobiliser des GNPs sur des surfaces d'or^{4b, 60}. Cependant, ce type de SAMs présente l'inconvénient du pontage des molécules lors de l'adsorption sur les surfaces d'or⁶¹. Afin de favoriser une conformation étendue des SAMs, la fonctionnalisation de la surface avec des SAMs thiols a été établie en deux étapes en faisant réagir une SAM de CEA avec un thiolacide, l'acide 11-mercaptopundecanoïque (MUA). Une activation préalable de la fonction acide du MUA par EDC/NHS est indispensable pour le couplage entre ces deux molécules. Cette approche permet aussi d'allonger la chaîne alkyle et d'assurer une meilleure organisation de la SAM. La SAM résultante sera dénommée **NH₂/SH**.

Comme pour le silicium, les SAMs de **PEG** sont aussi un choix pertinent pour immobiliser les GNPs sur des surfaces d'or. Le PEG diamine (DAPEG₄₅) a été immobilisé par couplage covalent avec une SAM de MUA activée par EDC/NHS.

Les 3 surfaces préparées sont représentées ci-dessous.

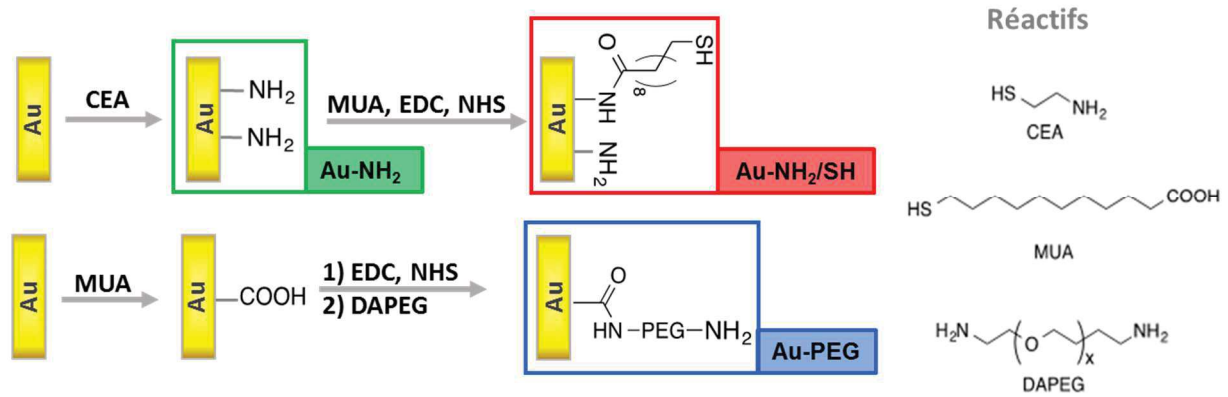


Figure 49 : Schéma des trois stratégies de fonctionnalisation des surfaces d'or et nomenclature adoptée pour les différents types de substrats.

2.3. Assemblage des couches et caractérisation

La méthode de préparation la plus courante d'une SAM de thiol est tout simplement l'immersion de la surface propre dans une solution de thiol. Le solvant est généralement l'éthanol. Toutefois, d'autres solvants tels que l'hexane, le toluène et le dichlorométhane sont aussi utilisés dans certaines études.

Plusieurs paramètres influencent la formation de monocouches de thioalcanes à la surface de l'or tels que la concentration, le temps d'immersion, la température, la polarité et la viscosité du solvant.

La première étape est le recuit et le nettoyage de la surface d'or (protocole détaillé 2.2.2.2 du chapitre 2), car la cristallinité et la propreté des couches minces d'or jouent un rôle crucial dans la détermination de la compacité des couches SAMs. Les protocoles expérimentaux de préparation des différentes SAMs sont aussi détaillés dans le même paragraphe du chapitre 2. Les surfaces ont été ensuite analysées par mesure de l'angle de contact et PM-IRRAS.

2.3.1. Mesure de l'angle de contact

Le Tableau 5 récapitule les mesures d'angle de contact des différentes surfaces avant et après fonctionnalisation.

Tableau 5: Résultats de mesure de l'angle de contact des surfaces d'or.

<i>Au</i>	<i>nettoyé</i>	<i>CEA</i>	<i>CEA-MUA</i>	<i>MUA</i>	<i>MUA-DAPEG</i>
<i>Angle de contact (°)</i>	46±2°	51±2°	48±1°	59±2°	40±4°

Ces valeurs montrent une tendance similaire à celle observée pour les SAMs sur silicium. En effet, le nettoyage permet d'enlever les impuretés organiques et de rendre la surface plus hydrophile. Ensuite, l'angle de contact augmente après greffage de la CEA et du MUA ⁶² du fait de la présence des chaînes carbonées et décroît après ajout du DAPEG de part son caractère hydrophile. Les angles de contact des surfaces Au-PEG et Si-PEG sont équivalents, ~ 40°.

2.3.2. Analyse par PM-IRRAS

Les surfaces d'or ont été analysées par spectroscopie IR en mode PM-IRRAS ⁶³. Les spectres obtenus sont montrés Figure 50 et Figure 51. Ces spectres sont composés de deux parties : la région des hautes fréquences entre 2500 et 3500 cm⁻¹, et la région des basses fréquences entre 1200 et 1900 cm⁻¹.

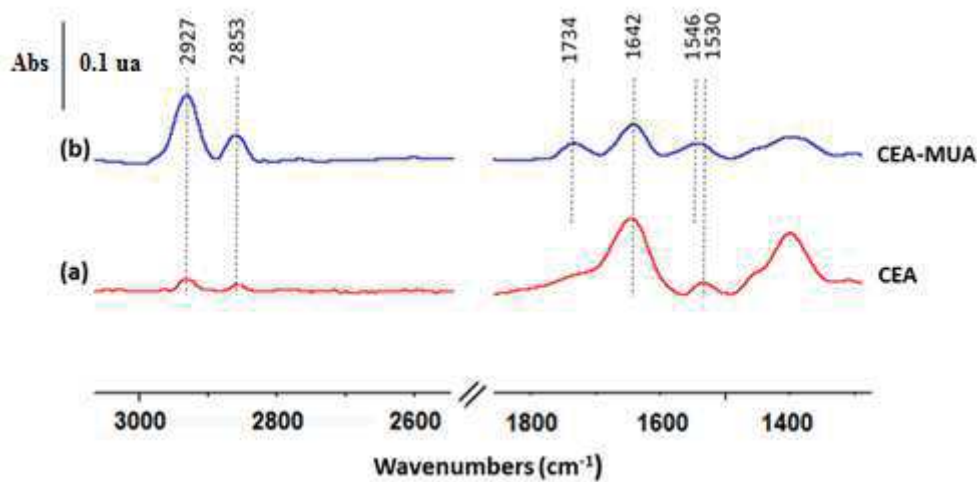


Figure 50 : Spectres PM-IRRAS des surfaces d'or après fonctionnalisation CEA (a) suivie par le greffage du MUA activé (b).

Les deux bandes qui apparaissent dans la région des hautes fréquences à 2853 et 2927 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations d'élongation symétriques ν_s et asymétrique ν_{as} des méthylènes ^{3b, 47, 57d, 64}. On retrouve ces bandes dans le spectre de la CEA (Figure 50-a) et après son interaction avec le MUA (spectre b) mais avec une intensité plus importante, en raison de l'augmentation du nombre de méthylènes (de 2 à 12) confirmant la présence du MUA ^{57b}. Dans la région des basses fréquences, on retrouve les modes vibrationnels correspondant aux déformations

symétriques et asymétriques des liaisons N-H des groupements amine et ammonium ($\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$) de la CEA à 1530 et 1642 cm^{-1} ^{57b}. Suite au greffage du MUA activé par EDC/NHS sur ces surfaces, la bande à 1642 cm^{-1} relative aux fonctions amine de la CEA est toujours présente mais diminue d'intensité. Cette bande avec celle à 1546 cm^{-1} , est attribuée aux bandes amide I et II. Elles correspondent respectivement à la vibration d'élongation des C=O, puis la déformation des N-H et l'élongation C-N, caractéristiques de la liaison amide qui se crée entre l'amine de la CEA et l'acide du MUA. A noter qu'il est difficile de différencier les bandes des fonctions amines résiduelles des bandes amide 1. Enfin la bande à 1734 cm^{-1} est assignée à la vibration d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ de l'ester montrant qu'une partie des molécules de MUA adsorbées n'ont pas réagi avec les fonctions amines⁶⁵. En effet, possédant une fonction thiol, le MUA peut se greffer à la surface d'or non fonctionnalisée par la CEA, laissant le groupement ester de NHS (produit de l'activation du MUA) à la surface ou simplement être en interaction électrostatique avec la surface.

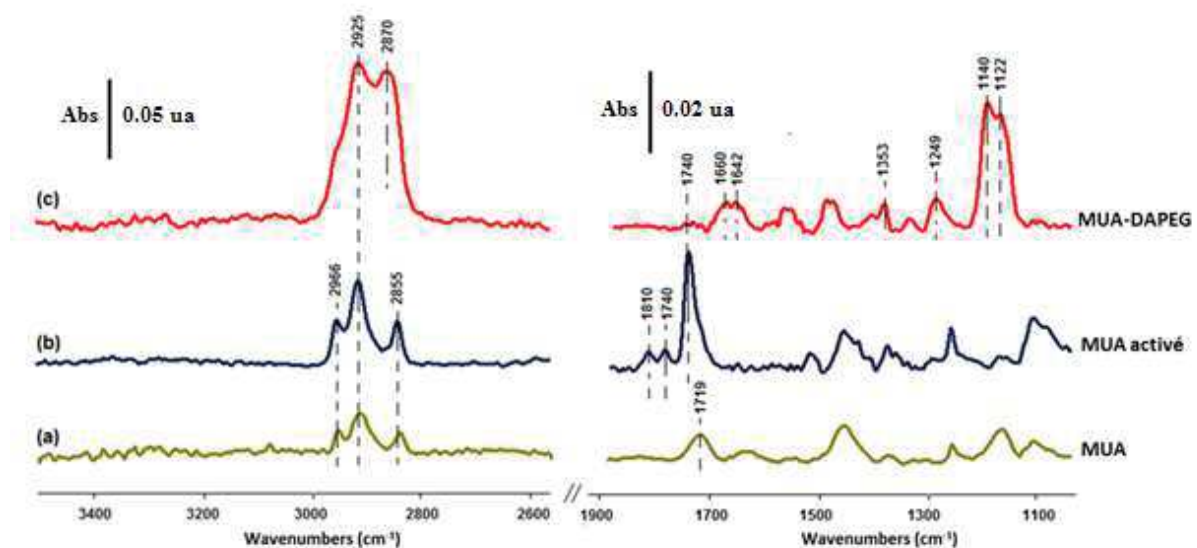


Figure 51 : Spectres PM-IRRAS des surfaces d'or après fonctionnalisation par le MUA (a), activation (b) et greffage du DAPEG (c).

Le suivi par PM-IRRAS de l'assemblage des surfaces Au-PEG est représenté sur la Figure 51. Après greffage du MUA (spectre a), on observe l'apparition de deux bandes intenses à 2850 et 2925 cm^{-1} attribuées aux modes de vibration d'élongation symétrique et asymétriques $\nu(\text{C}-\text{H})$ de la longue chaîne carbonée du MUA. L'activation des fonction acides terminales a été prouvée par la disparition de la bande à 1719 cm^{-1} et l'apparition simultanée de trois bandes à 1740 , 1780 et 1810 cm^{-1} caractéristiques de l'ester de NHS. Après interaction avec le DAPEG (spectre c), on observe la disparition de ces bandes, tandis que deux bandes partiellement chevauchées à 1122 et 1148 cm^{-1} apparaissent, assignées aux vibrations d'élongation C-O-C

des PEG. Les bandes de faible intensité à 1353 et 1249 cm^{-1} , attribuées respectivement aux modes de balancement (wagging) et torsion (twisting) des CH_2 des éthers, dénote le caractère amorphe des molécules de PEG à la surface ⁶⁶.

2.4. Discussion

Dans cette partie, nous avons présenté différentes stratégies de fonctionnalisation de surfaces d'or afin d'avoir les mêmes terminaisons chimiques que sur les surfaces de silicium : **NH₂**, **NH₂/SH** et **PEG**. A l'instar de la fonctionnalisation des surfaces de silicium, ces surfaces ont été ensuite caractérisées par deux techniques : la mesure de l'angle de contact et le PM-IRRAS. Les résultats obtenus par la première technique sont en parfait accord avec ceux observés pour les surfaces de silicium.

Les spectres PM-IRRAS confirment que la SAM de CEA est bien formée sur l'or et qu'il y a probablement coexistence des formes protonées et neutres des amines au sein de la SAM. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui stipule que la CEA conduit à la formation d'une monocouche de thiolamines ancrées par le soufre et qui expose la fonction amine à la surface ^{59c, 67}. Même si les chaînes courtes de CEA sont moins ordonnées, elles interagissent plus fortement avec la surface ^{57b}.

Le greffage du MUA sur la monocouche de CEA conduit à la formation d'une SAM composée de thiols et amines. La position des bandes de vibration d'élongation $\nu(\text{CH}_2)$ à 2850 et 2923 cm^{-1} indique que les couches de MUA forment une SAM de structure ordonnée ^{3b, 57d}.

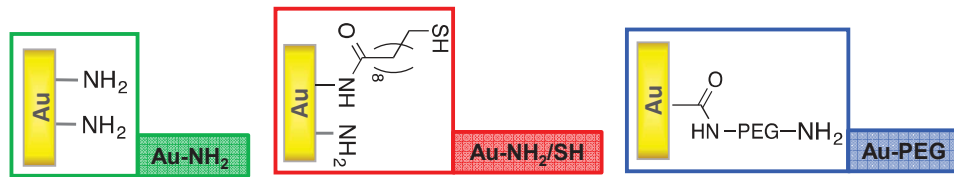
D'autre part, l'activation de la SAM de MUA est confirmée par la présence du NHS greffé de façon covalente au MUA. Après greffage du DAPEG sur ces SAMs activées, le spectre PM-IRRAS montre que les SAM de PEG sont bien formés.

La caractérisation de ces surfaces par XPS a été faite mais les données n'ont pas pu être traitées à temps pour être intégrées dans ce manuscrit. Pour la suite, on considère que la quantité de MUA ayant réagi sur les amines est la même que pour Si.

Bilan

Trois types de surfaces de d'or fonctionnalisées ont été préparées :

- **Au-NH₂** : avec coexistence des formes protonées et neutres des amines ;
- **Au-NH₂/SH** : présence des fonctions amine de la CEA et thiol du MUA. Cette SAM peut être qualifiée de mixte et présente des fonctions amine et des fonctions thiol.
- **Au-PEG** : Le greffage du DAPEG sur le MUA conduit à des SAMs à longues chaînes hydrocarbonées exposant la fonction amine



L'apport de ces différentes fonctions chimiques pour le greffage des GNPs sur les surfaces d'or sera étudié dans la partie suivante.

Partie 3

Greffage des nanoparticules d'or

Dans cette partie, les GNPs sont immobilisées sur les surfaces d'or et de silicium fonctionnalisées dans les parties précédentes (voir les deux bilans). Différentes conditions de dépôt ont été testées et évaluées principalement par MEB.

3.1. Introduction

L'augmentation du nombre d'applications utilisant des GNPs immobilisées sur des surfaces planes a mené à une demande croissante de développement de nouveaux protocoles de dépôt maîtrisés de GNPs. Le challenge est de positionner des GNPs sur des surfaces avec une densité maximale tout en préservant leur dispersion.

Cependant, malgré cette vaste gamme d'applications, relativement peu de travaux ont été consacrés à l'étude expérimentale des paramètres régissant ce processus. Il s'agit souvent d'une optimisation du dépôt par modification des propriétés chimiques des surfaces.

Les protocoles souvent rencontrés dans la littérature reposent sur l'immersion de la surface dans la solution de GNPs⁶⁸ ou le dépôt d'une goutte de la solution sur la surface (drop casing)⁶⁹. Par exemple, Wang *et al.*,⁷⁰ ont immobilisé des nanoparticules d'or (12 nm) stabilisées par des citrates sur des SAMs du silane aminé APTES. Dans ce travail, les nanoparticules ont été assemblées en trempant le substrat fonctionnalisé APTES dans la suspension colloïdale de nanoparticules d'or pendant 6 h. Kaminska *et al.*⁷¹ ont préparé des substrats actifs en Raman, par dépôt d'une goutte d'une solution de nanobâtiments sur des surfaces de silicium fonctionnalisées APTES-MUA pendant une nuit. Les surfaces résultant de ces deux travaux montrent une hétérogénéité du film de GNPs déposé avec la présence d'agrégats⁷⁰⁻⁷¹. Les auteurs ne s'attardent pas sur l'analyse des données de caractérisation (AFM ou MEB) et passent directement à l'utilisation de ces plateformes dans l'application souhaitée. En outre, ces protocoles sont qualifiés de faciles et reproductibles malgré le rendu hétérogène.

Dans cette partie, nous allons donc étudier le dépôt des GNPs sur les différentes surfaces d'or et de silicium fonctionnalisées. Cette étape sera aussi optimisée par variation des conditions expérimentales de dépôt (décrites au paragraphe 2.2.3. du chapitre 2) avec un suivi qualitatif et

quantitatif en MEB. Les résultats seront discutés par protocole de dépôt à savoir sous agitation, sous sonication et sous flux.

3.2. Dépôt des GNPs sous agitation

Les premiers essais ont été réalisés sur les surfaces de silicium et d'or fonctionnalisées NH_2 (APTES et CEA) et NH_2/SH (APTES-MUA et CEA-MUA). La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour évaluer le recouvrement et la dispersion des GNPs sur les surfaces fonctionnalisées. Elle donne une image précise de la surface et permet d'obtenir des informations topographiques à savoir comment les nanoparticules sont disposées à la surface. La Figure 52 présente les clichés de microscopie obtenus sur les différentes surfaces.

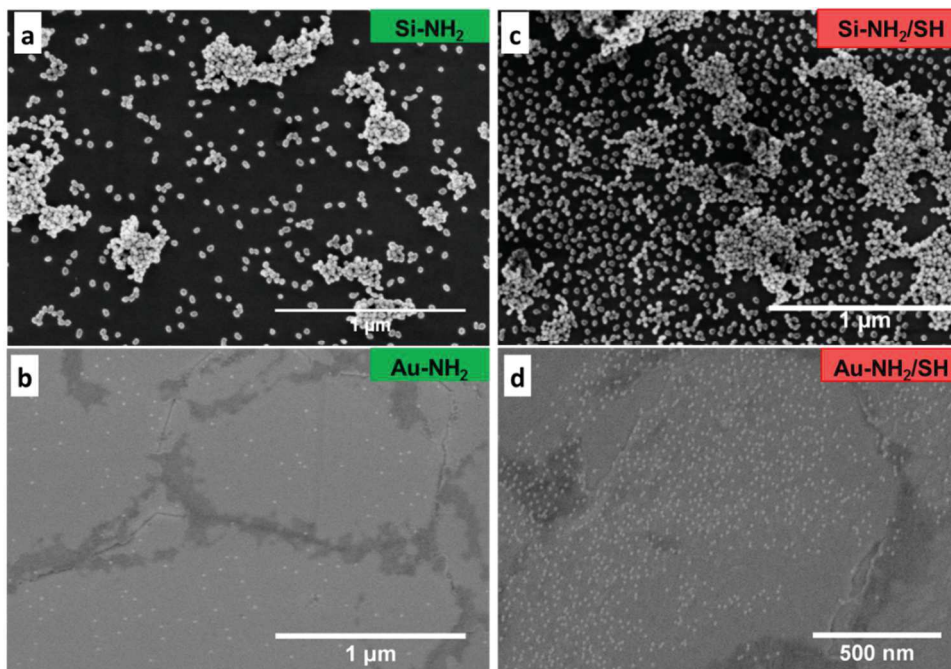


Figure 52 : Clichés de MEB obtenus après greffage des GNPs sur les surfaces de silicium (a,c) et d'or (b,d) fonctionnalisées NH_2 (a, b) et NH_2/SH (c et d) sous agitation.

Les images obtenues montrent clairement que nous avons une faible densité de GNPs pour les deux surfaces à terminaison NH_2 (APTES et CEA) avec la présence d'agrégats sur le silicium. Les surfaces à terminaison NH_2/SH donnent une densité plus importante de GNPs avec la formation de couches d'agrégats importantes sur le silicium. Cette différence de recouvrement en GNPs est due à la grande affinité de l'or pour les thiols ^{50b}.

Afin de limiter cette formation d'agrégats, nous avons choisi de déposer les GNPs dans des conditions d'agitation plus drastiques, c'est-à-dire sous sonication.

3.3. Dépôt des GNPs sous sonication

Le greffage des GNPs à la surface doit être robuste pour éviter leur désorption pendant les étapes successives d'élaboration et de régénération du biocapteur. Le dépôt sous sonication permettrait de casser les agrégats formés et améliorerait par conséquent la dispersion des GNPs en surface. De plus, il permettrait d'enlever les particules faiblement liées à la surface. Ainsi nous avons déposé les GNPs issues de la synthèse citrate/acide tannique sous ultra-sons³.

3.3.1. Caractérisation par MEB

Les six surfaces obtenues ont été caractérisées par MEB. Les clichés obtenus sont regroupés dans la Figure 53.

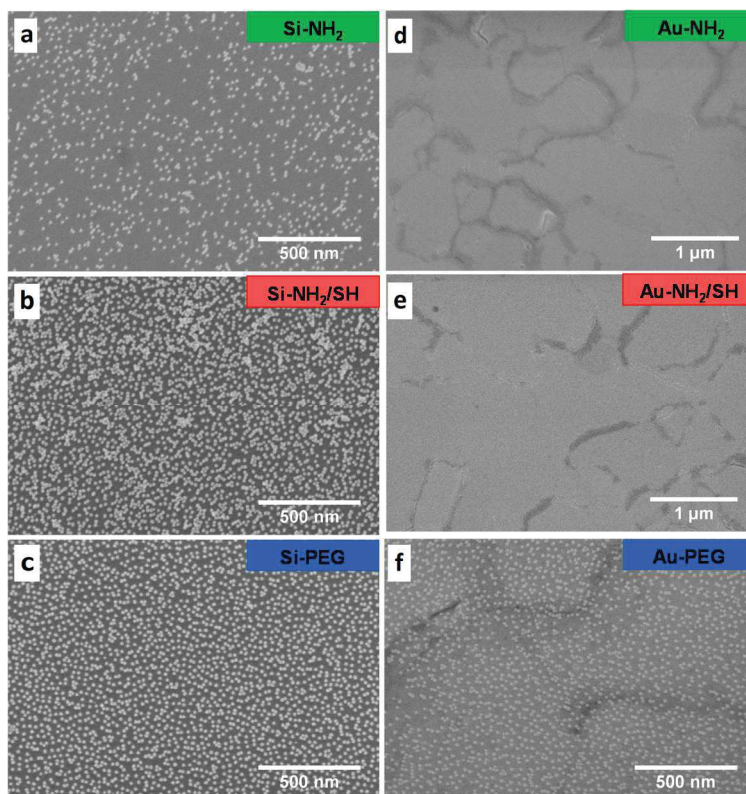


Figure 53 : Clichés de MEB obtenus après greffage des GNPs sur les surfaces de silicium (a,b,c) et d'or (d, e, f) fonctionnalisées NH₂ (a, d), NH₂/SH (b et e) et PEG (c, f) sous sonication.

³ Cette partie du travail a démarrée lors de mon stage de M2 et a donné lieu à une publication au Gold bulletin. 36(b) Ben Haddada, M.; Blanchard, J.; Casale, S.; Krafft, J.-M.; Vallée, A.; Méthivier, C.; Boujday, S., Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane. *Gold bulletin* **2013**, *46* (4), 335-341.

Les résultats montrent clairement une différence entre les surfaces fonctionnalisées de silicium et d'or pour le même type de fonction chimique en surface.

En comparant les résultats obtenus sur des terminaisons NH_2 et NH_2/SH (les 4 premières surfaces) avec ceux obtenus lors du dépôt sous agitation, on note que la sonication a bien amélioré la dispersion des particules sur les surfaces de silicium. Cependant sur les surfaces d'or, elle a entraîné le départ de l'ensemble des particules.

Les images MEB présentées (ci-dessus) décrivent clairement la dispersion et la densité des GNPs en surface, mais pour obtenir des estimations quantitatives, un traitement statistique des clichés de microscopie est nécessaire.

3.3.2. Dénombrement des particules et état d'agrégation

La densité des particules a été calculée en comptant les particules dans les différentes images MEB (isolées et ensembles de 2, 3, 4, 5, 6 et > 6 particules) sur une surface représentative de $2.3 - 2.5 \mu\text{m}^2$. Les résultats sont regroupés dans la Figure 54. Les surfaces Au-NH_2 et $\text{Au-NH}_2/\text{SH}$ ne sont pas représentées sur cette figure du fait de l'absence de particules.

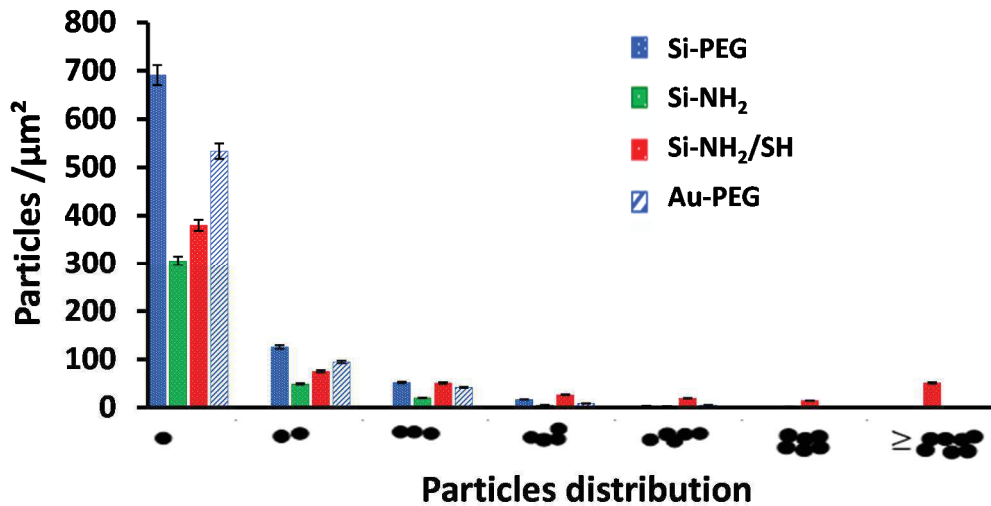


Figure 54 : Histogrammes représentant les densités de GNPs sur les différentes surfaces d'or et de silicium fonctionnalisées.

Le taux de recouvrement est calculé en divisant la densité des GNPs (particules / μm^2) par le nombre de particules ($r \sim 7 \text{ nm}$) que peut contenir une surface de $1 \mu\text{m}^2$ (*i.e.* 6500 particules). Le Tableau 6 récapitule les valeurs obtenues pour les surfaces présentant des GNPs.

Tableau 6: Densité et dispersion des GNPs calculées à partir des images de MEB.

<i>Surfaces</i>	GNPs isolées (%)	Densité des GNPs (particules / μm^2)	Taux de recouvrement (%)
<i>Si-NH₂</i>	77	510 \pm 20	8
<i>Si-NH₂/SH</i>	62	1324 \pm 40	20
<i>Si-PEG</i>	78	1186 \pm 40	18
<i>Au-PEG</i>	78	905 \pm 30	14

Le recouvrement des GNPs dépend fortement de la nature du film d'adhésion. Sur les surfaces Au-NH₂ (Figure 10-d), l'absence des GNPs est due à l'application des ultrasons durant le dépôt puisque sous agitation on obtient des particules en surface (29 particules/ μm^2) selon la Figure 52-b. Ceci peut être expliqué par la faible interaction entre les GNPs et les surfaces Au-NH₂. A l'opposé, une densité relativement importante (510 \pm 20 particules/ μm^2) est atteinte pour les surfaces Si-NH₂ (Figure 53-a). Cette différence observée entre le silicium et l'or peut être interprétée en considérant la différence de recouvrement en fonctions amine sur les deux surfaces : la CEA forme une monocouche de thiols plus ou moins ordonnée sur l'or⁷², tandis que la condensation de l'APTES sur les surfaces de silicium donne un faible taux de recouvrement en amine^{23, 50b}. En outre, sur les substrats Au-NH₂, seuls les groupements amine sont présents en surface alors que pour Si-NH₂, les silanols (Si-OH) et les amines coexistent. De plus, au pH acide de la solution de GNPs (pH=5,4), les groupements amine sur Au-NH₂ sont chargés positivement, (pK_a (CEA) = 8,3⁷³), donc, leur interaction avec les GNPs est principalement électrostatique avec les citrates chargés négativement. Pour les surfaces de silicium modifiées avec l'APTES, pK_a (APTES) = 7,6⁷⁴, les groupements ammonium dominant, avec la présence de silanols qui sont chargés négativement à ce pH (PZC (silice) = 2⁷⁵). Les silanolates peuvent être donc impliqués dans l'interaction des GNPs avec la surface puisqu'ils sont aptes à remplacer les ligands citrate et interagir directement avec les GNPs. Ainsi, ces interactions coopératives sur les surfaces Si-NH₂ peuvent justifier cette large différence observée par rapport aux surfaces Au-NH₂. Malgré ces interactions, la densité observée sur Si-NH₂ est la plus faible de toutes les surfaces de silicium étudiées (Figure 53 et Tableau 6).

Après greffage du MUA sur les surfaces amine, les surfaces Si-NH₂/SH présentent un recouvrement plus important en GNPs (Figure 53-b). Pour Au-NH₂/SH, la densité est clairement augmentée comparé à Au-NH₂. Cette amélioration peut être observée à la Figure 52, quand le dépôt est effectué sous agitation. Ce résultat corrobore encore l'efficacité d'interactions coopératives, ici par les interactions soufre-or et ammonium-citrate pour immobiliser les GNPs. Pour Si-NH₂/SH, le taux de recouvrement en GNPs atteint 20% (voir Tableau 6). Cependant,

cette augmentation de la densité se fait au détriment de leur dispersion, le pourcentage des particules isolées passe de 77 à 62% avec l'apparition de quelques agrégats (Figure 54 et Tableau 6).

Le meilleur recouvrement en termes de densité et dispersion des GNPs est atteint pour les surfaces fonctionnalisées PEG (Figure 53-c et f). Ces deux surfaces montrent 78% de particules isolées avec un taux de recouvrement de 14 et 18% respectivement (Tableau 6). Cette différence par rapport aux autres surfaces peut provenir des propriétés des couches PEG qui ont tendance à gonfler en présence d'eau ce qui les rend aptes à capturer les GNPs stabilisées par des citrates³⁷ et les piéger par déplacement des citrates faiblement liés et création d'interactions multidentées entre les chaînes PEG et les atomes d'or des GNPs^{35c}. L'étude des paramètres influençant ce phénomène a montré que cette infiltration des GNPs dans les chaînes de PEG dépendait de leur taille⁷⁶ et que les particules inférieures à 5 nm sont capables de pénétrer dans les 'brosses' de PEG par simple immersion, alors que les particules plus larges (≥ 13 nm) ont plutôt tendance à rester en surface^{35d}. Cet effet s'associe avec la fonction amine terminale des chaînes PEG qui se lie aux GNPs par interaction électrostatique avec les ligands citrate qui stabilisent les GNPs. Malgré la couche épaisse de PEG (1,7 nm avant gonflement par l'eau^{36b}), la nature du substrat et/ ou la SAM sous-jacente (GOPTS ou MUA) influence étonnement le recouvrement des GNPs. En effet, cette valeur est diminuée de 24% pour Au-PEG par rapport à Si-PEG.

Il faut noter enfin, que, même si les valeurs regroupées dans le Tableau 6 semblent faibles, elles sont très proches de celles reportées dans la littérature (15 -25 %) où les conditions de dépôt sont moins drastiques et le temps de dépôt souvent plus long^{34, 77}. Cette limite est fixée par les ligands citrate stabilisant les GNPs qui maintiennent une répulsion électrostatique entre les GNPs et empêchent la formation d'une monocouche de GNPs plus dense^{34, 78}.

3.4. Dépôt des GNPs sous flux

La caractérisation des surfaces nanostructurées s'effectue souvent *a posteriori* de l'étape de dépôt. Les techniques utilisées sont des techniques d'imagerie de surface telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie à force atomique (AFM). Afin d'obtenir des données quantitatives fiables, quelques travaux ont associé ces techniques à des techniques spectroscopiques comme l'UV-vis, la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) et la diffusion des rayons X (DRX)^{34,79}. Cependant, dans ces études, aucune information sur la cinétique de dépôt des GNPs et la structure des monocouches formées n'a été

fournie.

La microbalance à cristal de quartz (QCM) est fréquemment utilisée pour examiner l'adsorption d'objets de taille nanométrique comme des protéines, des virus, ou les nanoparticules. Malgré l'attention considérable portée à l'incorporation des GNPs dans les biocapteurs comme amplificateurs de signal en QCM, rares sont les études qui portent sur le suivi du greffage de GNPs sur différentes surfaces par QCM. Une étude récente a utilisé cette technique pour étudier la structure des couches de GNPs formées sur des surfaces d'or selon la force ionique du milieu ⁸⁰. Grunewald *et al.* ⁸¹ ont réussi à corréler les résultats d'adsorption de nanoparticules de silice sur des surfaces d'or par QCM aux informations obtenues par MEB.

Etant donné que les GNPs sont assez denses et présentent une bonne stabilité en solution, on a envisagé de suivre leur cinétique de dépôt par QCM-D. Pour ce faire, des quartz d'or et de silicium ont été fonctionnalisés par les SAMs étudiées en suivant les mêmes protocoles de fonctionnalisation. Les conditions de dépôt sous flux sont décrits dans le chapitre 2.

3.4.1. Caractérisation par QCM-D

Le dépôt sous flux sur les six surfaces précédemment fonctionnalisées a été suivi par QCM-D. La variation de la fréquence de résonance des quartz et la perte d'énergie de vibration par dissipation résultant de l'adsorption des GNPs sur les surfaces d'or et de silicium sont présentées dans la Figure 55 pour la 5^{ème} harmonique.

On rappelle que l'injection de la solution de GNPs a été effectuée en même temps sur les 3 substrats de silicium (A) ou d'or (B) pendant 50 min et que la solution de GNPs utilisée est 10 fois plus diluée (0,33 nM) que celle utilisée pour le dépôt sous agitation et sous sonication. La stabilisation et le lavage sont effectués par injection d'eau ultra-pure.

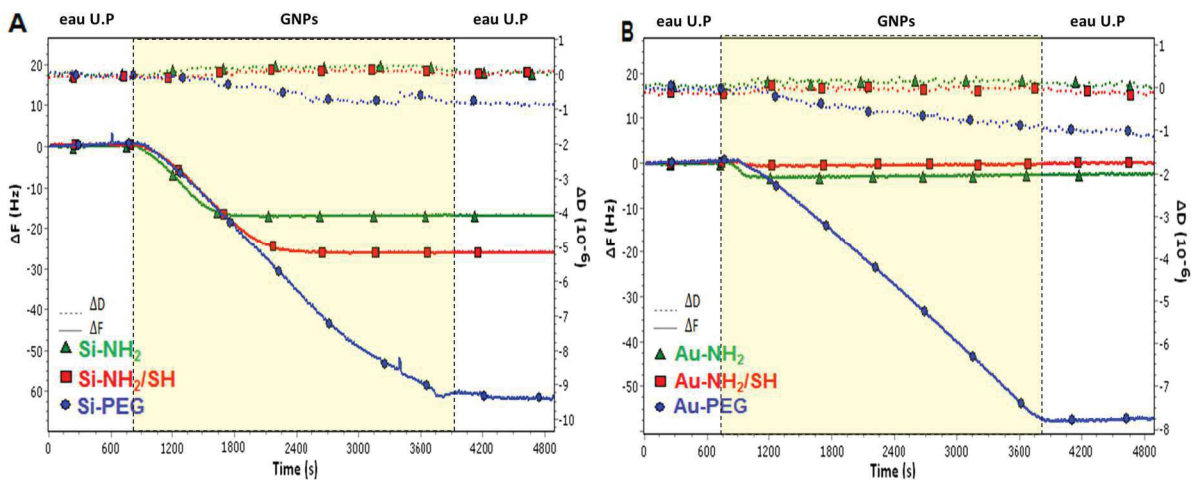


Figure 55 : Suivi de l'adsorption des GNPs (13,5 nm, 0,33nM) par QCM-D sur les surfaces de silicium (A) et d'or (B) fonctionnalisées.

La déposition des GNPs sur les différentes surfaces entraîne une diminution de la fréquence ($\Delta F < 0$) pour l'ensemble des substrats indiquant leur présence sur la surface. Le Tableau 7 récapitule les valeurs de ΔF obtenues après lavage pour les différentes surfaces. On remarque que cette variation dépend des fonctions chimiques en surface.

On note aussi que le lavage ne fait pas varier la fréquence montrant le greffage irréversible des GNPs sur toutes les surfaces.

Les faibles valeurs de dissipation (ΔD) obtenues, correspondant à des faibles variations des propriétés viscoélastiques du film lors du dépôt des GNPs, permettent l'application de l'équation de Sauerbrey pour calculer la masse adsorbée (Δm) correspondante à partir des valeurs de (ΔF). A l'obtention de ces valeurs de (Δm) et connaissant la masse d'une particule unique, on peut estimer la densité des particules en surface (Tableau 7). De la même manière que précédemment on a calculé le taux de recouvrement pour les différentes surfaces.

Tableau 7: Données QCM relatives au dépôt des GNPs sous flux sur les surfaces de silicium et d'or fonctionnalisées.

<i>Surfaces</i>	GNPs [0,33 nM]				
	$-\Delta F$ (Hz)	ΔD (10^{-6})	Δm (ng/cm ²)	Densité (particules/ μm^2)*	Taux de recouvrement (%)
<i>Si-NH₂</i>	17	0,06	300,9	121	1,9
<i>Si-NH₂/SH</i>	26	0,1	460,2	185	2,8
<i>Si-PEG</i>	62	-0,85	1097,4	442	6,8
<i>Au-NH₂</i>	2,5	0,12	44,25	18	0,3
<i>Au-NH₂/SH</i>	0,3	0,06	5,31	2	0,03
<i>Au-PEG</i>	57	-1	1008,9	406	6,3

* masse d'une particule de diamètre 13,5 nm = 2,485 ng.

Les taux de recouvrement obtenus sont plus faibles que ceux où le dépôt des GNPs a été effectué sous sonication. Ceci peut être lié à la faible concentration de GNPs dans les solutions injectées et déposées sous sonication (0.33 nM vs 3.3 nM). Malgré les différences dans les concentrations des GNPs utilisées et le temps d'interaction entre la surface et les GNPs, les résultats montrent globalement la même tendance en comparaison avec les protocoles de dépôt précédents.

Sur les surfaces d'or, à l'exception des surfaces PEG, la densité reste très faible. Contrairement aux résultats précédents, la surface Au-NH₂/SH est moins dense par rapport à Au-NH₂ mais les deux valeurs demeurent très faibles.

En comparant les différentes allures des sensogrammes obtenus, on remarque que la saturation est atteinte plus rapidement (entre 5 et 10 min) pour les surfaces les moins denses, à terminaisons NH₂ et NH₂/SH. Pour les surfaces PEG, les particules continuent à s'adsorber jusqu'à l'étape de lavage.

Concernant les terminaisons NH₂ et NH₂/SH, la dissipation augmente très légèrement et ne

dépasse pas $0,2 \cdot 10^{-6}$ lors de l'adsorption des nanoparticules, ce qui est en accord avec la création d'une couche supplémentaire et donc l'accroissement de la flexibilité de l'ensemble. Pour les surfaces PEG, contrairement aux autres systèmes, il y a diminution de la dissipation au cours de l'adsorption des GNPs. Ce résultat surprenant est observé à la fois pour l'or et pour le silicium et indique que la couche moléculaire se rigidifie lors de l'adsorption des nanoparticules d'or. Cette rigidification pourrait résulter de l'incorporation partielle des nanoparticules d'or dans la couche de PEG au lieu de s'y déposer en surface. Ceci est en accord avec le mécanisme proposé précédemment (paragraphe 3.3.2)^{35c, 37}. Pour vérifier cette hypothèse, des images AFM en mode spectroscopie de force ont été réalisées sur les surfaces PEG, elles sont représentées en annexe 2-1. Le traitement approfondi de ces images n'a pu être réalisé à temps pour être inclus dans le manuscrit, mais les mesures de topographie montrent pour les GNPs des hauteurs bien plus faibles que le diamètre moyen. Les images d'adhésion indiquent une différence certaine entre l'environnement des GNPs sur les surfaces PEG et sur celles à terminaisons NH_2 ou NH_2/SH en accord avec une intégration partielle des GNPs dans la couche de PEG.

En traçant $\Delta D = f(\Delta F)$ pour les surfaces de silicium (voir annexe 2-2), on voit clairement que le processus d'adsorption n'est pas le même sur les trois surfaces. La rigidification du film déposé sur les électrodes QCM se traduit par une diminution de la dissipation lors de l'adsorption des nanoparticules alors que les films de PEG sont par nature viscoélastiques⁸².

3.4.2. Caractérisation par MEB

La QCM a permis de déterminer la densité des GNPs sur les différentes surfaces après dépôt sous flux. Cependant elle ne donne pas une idée sur l'état d'agrégation des GNPs. Afin de répondre à cette question nous avons analysé ces surfaces par MEB.

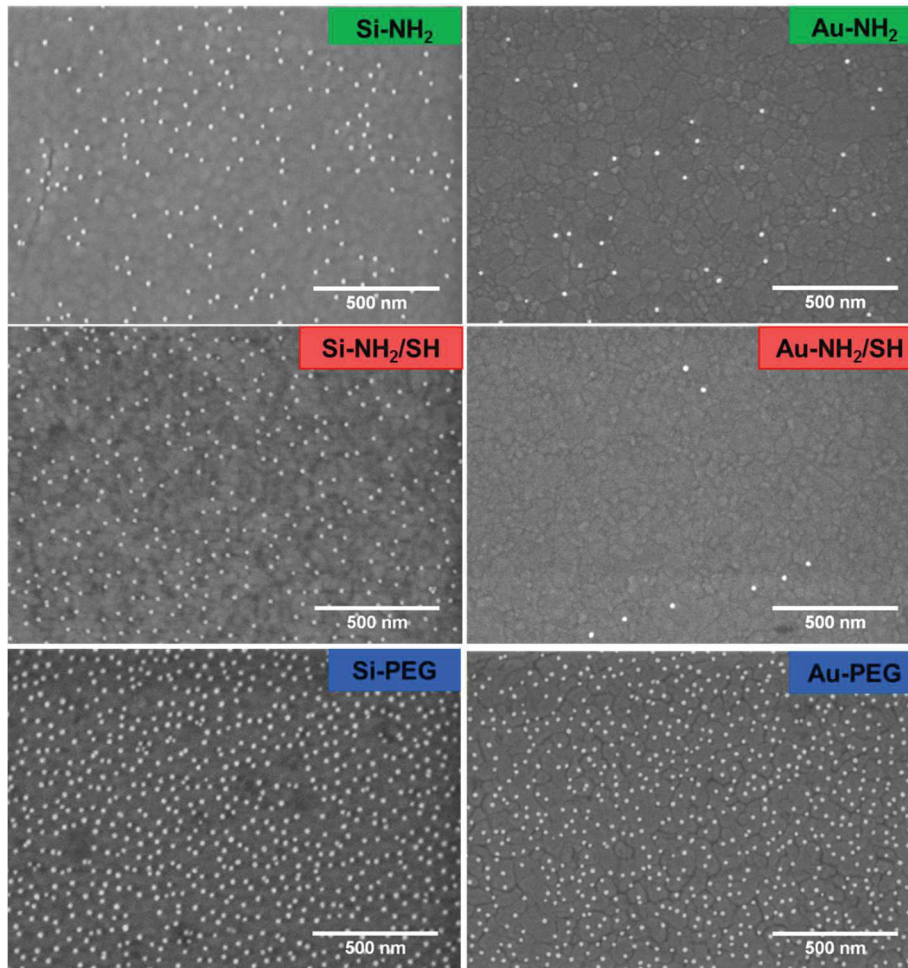


Figure 56 : Clichés de MEB obtenus après greffage des GNPs sur les surfaces de silicium (a,b,c) et d'or (d, e, f) fonctionnalisées NH₂ (a, d), NH₂/SH (b et e) et PEG (c, f) sous flux.

Comme l'illustre la Figure 56, la première chose qu'on remarque c'est l'absence d'agrégats sur les six surfaces ainsi qu'une plus faible densité en GNPs que pour les protocoles précédents. Les images obtenues ont été traitées pour déterminer les densités et dispersions en GNPs.

3.4.3. Dénombrement des particules

L'absence d'agrégats et la bonne dispersion des GNPs en surface ont permis de les quantifier par un comptage automatique avec un logiciel de traitement d'image (ImageJ) (annexe 1-2). Les valeurs de densité et de variation de masse correspondantes sont groupées ci-dessous.

Tableau 8: Données MEB relatives au dépôt des GNPs sous flux sur les surfaces de silicium et d'or fonctionnalisées.

Surfaces	Densité (particules/ μm^2)	Δm (ng/ cm^2)*	Taux de recouvrement (%)
Si-NH ₂	86 ± 3	213 ± 7	1,3
Si-NH ₂ /SH	175 ± 10	435 ± 25	2,6
Si-PEG	470 ± 90	1168 ± 223	7,2
Au-NH ₂	18 ± 1	48 ± 2	0,3
Au-NH ₂ /SH	2 ± 1	5 ± 2	0,03
Au-PEG	418 ± 80	1039 ± 199	6,4

* masse d'une particule de diamètre 13,5 nm = 2,48506×10⁻⁸ ng

Afin de comparer les résultats obtenus par QCM et MEB, nous avons tracé (Δm) calculée à partir des images MEB en fonction de (ΔF) mesurée en QCM (en rouge). Sur le même graphe de la Figure 57, nous avons tracé les valeurs obtenues selon la relation de Sauerbrey (en bleu).

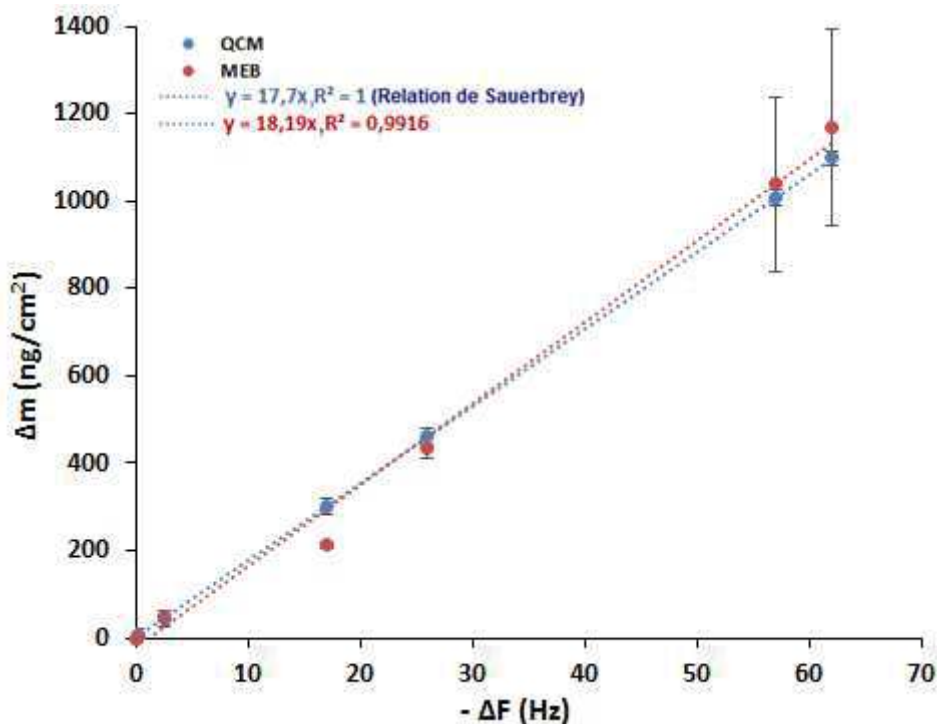


Figure 57: Variation de la masse (Δm) en fonction de la variation de la fréquence de résonance des quartz (ΔF) après dépôt des GNPs sous flux sur les différentes surfaces fonctionnalisées. En rouge les valeurs de (Δm) calculées à partir des données MEB et en bleu celles déduites à partir de la relation de Sauerbrey en QCM.

Une régression linéaire des données révèle une droite, qui est très proche des valeurs basées sur l'équation de Sauerbrey. Ces résultats obtenus *in situ* (QCM) et *ex-situ* (MEB) de l'étape de dépôt des GNPs, montrent une corrélation parfaite entre ces deux techniques.

3.5. Discussion

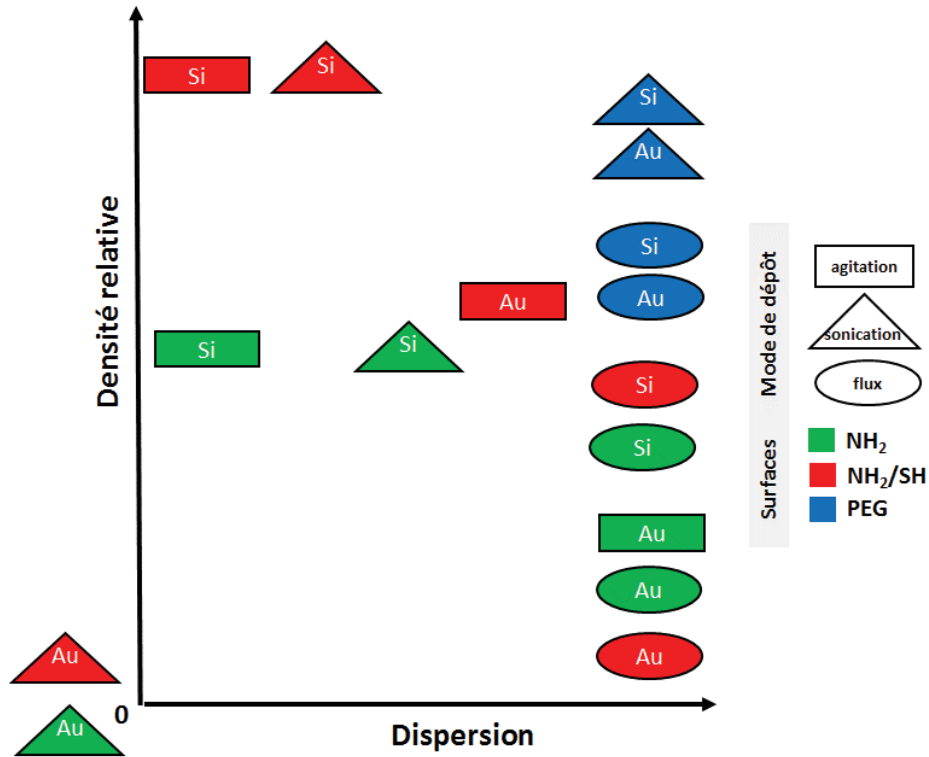
Dans cette partie, nous avons montré qu'il est possible d'optimiser le greffage des GNPs sur des surfaces planes non seulement par la création de fonctions réactives en surface, mais aussi par changement des conditions de dépôt. Ainsi les résultats obtenus pour les trois protocoles de dépôt (sous agitation, sous sonication et sous flux) sont différents en termes de densité et dispersion des GNPs en surface mais on obtient les mêmes tendances relatives aux fonctions chimiques mises en jeu :

- Pour les surfaces d'or et de silicium, la densité des GNPs a globalement augmenté sur les surfaces NH_2/SH par rapport aux surfaces NH_2 . En offrant des points d'ancrage multiples et des interactions coopératives, la densité et la dispersion des GNPs à la surface des surfaces planes d'or et de silicium a été améliorée.
- Les couches de PEG donnent les meilleurs résultats en densité (18%) et en dispersion (78 % sous sonication et 100% sous flux). Cette excellente plateforme d'accroche des GNPs proviendrait de l'incorporation de ces derniers dans les chaînes longues du PEG. L'interaction électrostatique entre les citrates et fonctions amines du PEG attire les GNPs à la surface où ils seront ensuite partiellement piégés par les brosses de PEG qui se gonflent et se replient en fonction de leur état d'hydratation³⁷. Ce phénomène a été confirmé par la diminution de la dissipation en QCM et des mesures de la rugosité et des forces d'adhésion en AFM effectuées lors de la rédaction de ce manuscrit et qui n'ont pas été exploitées à temps pour les y inclure (voir annexe 2-1).

Un autre résultat probant de cette partie est le suivi du processus de greffage des GNPs in situ par QCM. Cette technique a permis de déterminer la densité des GNPs en surface à partir de la variation de fréquence induite grâce à la relation de Sauerbrey. De plus, on obtient une parfaite corrélation entre ces résultats et ceux obtenus par MEB. Ainsi, le dépôt des GNPs sous flux a permis d'obtenir des surfaces nanostructurées présentant un ordre et une périodicité assez remarquables.

Bilan

Une comparaison des résultats du greffage des GNPs en termes de dispersion et densité sur les différentes surfaces d'or et de silicium fonctionnalisées en fonction du protocole de dépôt permet de dresser le diagramme suivant :



Ainsi, nous avons sélectionné les surfaces d'or et de silicium avec une fonctionnalisation PEG pour la suite des étapes d'élaboration du biocapteur nanostructuré.

Partie 4

Post-fonctionnalisation des nanoparticules d'or immobilisées

Cette partie traite de la post-fonctionnalisation des GNPs greffées sur des surfaces Si-PEG et Au-PEG pour leur conférer une fonction amine terminale permettant la construction des biocapteurs. L'influence de cette étape sur la dispersion et stabilité de la couche de nanoparticules y est explorée pour deux agents de fonctionnalisation, un PEG diamine et la cystéamine.

4.1. Introduction

Les GNPs immobilisées précédemment sur les surfaces d'or et de silicium, sont recouvertes d'une couche de citrates qui assure leur stabilité et leur greffage sur les fonctions amines par interactions électrostatiques. L'utilisation de ces surfaces nanostructurées pour les biocapteurs nécessite l'échange des citrates (stabilisants) par des fonctions réactives qui seront indispensables pour lier le biorécepteur ou la cible. La maîtrise de cette étape n'est pas triviale puisque la couche de GNPs est mobile et l'échange de ligands peut entraîner l'agrégation des particules ou leur désorption de la surface⁸⁰. Les molécules de post-fonctionnalisation doivent avoir une extrémité ayant une affinité pour l'or (thiol ou amine) et une autre pour les biomolécules (amine ou acide généralement). Ainsi deux réactifs ont été choisis pour la post-fonctionnalisation :

- Un thiolamine à courte chaîne carbonée : la **CEA**,
- et une diamine à longue chaîne carbonée : le **DAPEG₆₈** (3000 Da).

Tous les deux présentent des groupes amine pour le nouvel ancrage des anticorps/cible par la suite. La post-fonctionnalisation a été appliquée aux GNPs déposées sur des substrats de silicium et d'or recouverts par des PEG (Si-PEG et Au-PEG). La densité et la dispersion des GNPs ont été alors évaluées par MEB et discutées à la fin de cette partie du chapitre.

4.2. Post-fonctionnalisation par la CEA

La CEA est une molécule bifonctionnelle possédant un groupement thiol et amine. Selon la différence d'affinité entre ces deux fonctions pour l'or, on s'attend à ce qu'elle se fixe par sa fonction thiol sur les GNPs, laissant ainsi sa fonction amine en surface. Le protocole de post-

fonctionnalisation par la CEA est décrit au paragraphe 2.2.4 du chapitre 2. L'effet de cette étape sur l'organisation des GNPs en surface a été examinée par MEB par comparaison de l'état de surface avant et après post-fonctionnalisation.

4.2.1. Caractérisation par MEB

La Figure 58 illustre les résultats de caractérisation des surfaces Si-PEG et Au-PEG nanostructurées avant et après traitement avec la CEA.

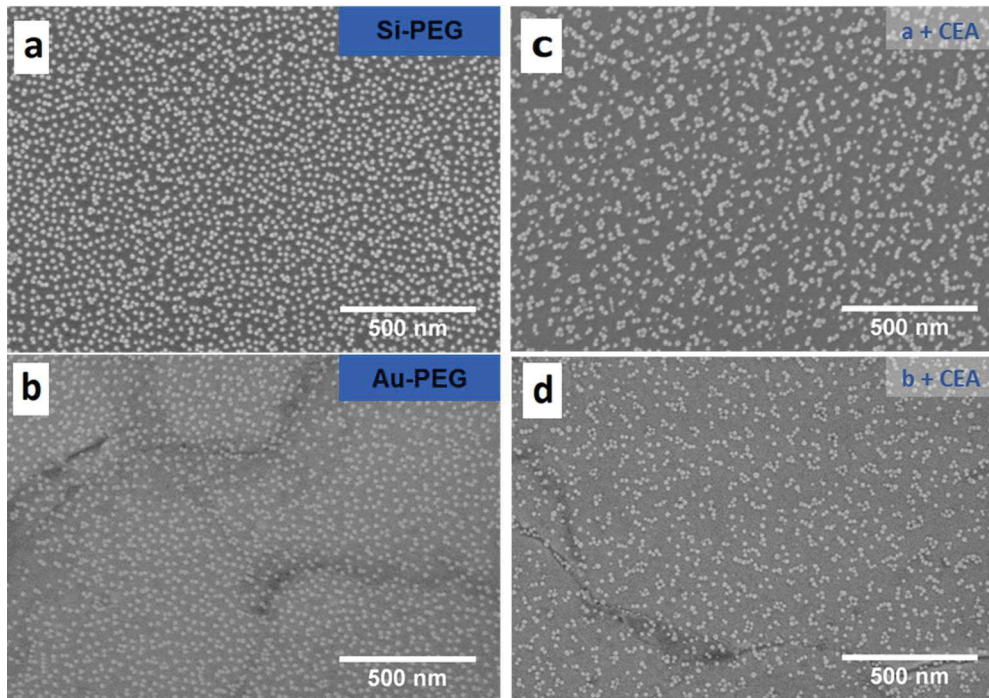


Figure 58 : Clichés de MEB obtenus après traitement des surfaces nanostructurées Si-PEG (a) et Au-PEG (b) par la CEA (c et d respectivement).

Par comparaison visuelle des surfaces deux à deux (a et c, b et d), on remarque un léger changement dans la dispersion des GNPs. Afin de mieux quantifier cet effet, nous avons complété cette caractérisation par un dénombrement des particules isolées et agrégées par ensembles de 2, 3, 4, 5 particules ou plus.

4.2.2. Dénombrement des particules et état d'agrégation

Le résultat du dénombrement des particules de la figure ci-dessus, est présenté dans la Figure 59. Chaque segment de l'histogramme affiche la densité relative des particules selon leur état d'agrégation pour chaque surface.

Comme attendu et comme le montrent les images de MEB, la post-fonctionnalisation par CEA a modifié les couches de GNPs :

- La densité des particules est plus faible notamment pour le silicium pour lequel environ 25 % des particules sont désorbées ;
- La dispersion, évaluée par la proportion relative des particules isolées a nettement décliné après traitement avec la CEA pour les deux substrats. En contrepartie, il y a augmentation de la densité des particules agrégées (≥ 5 particules).

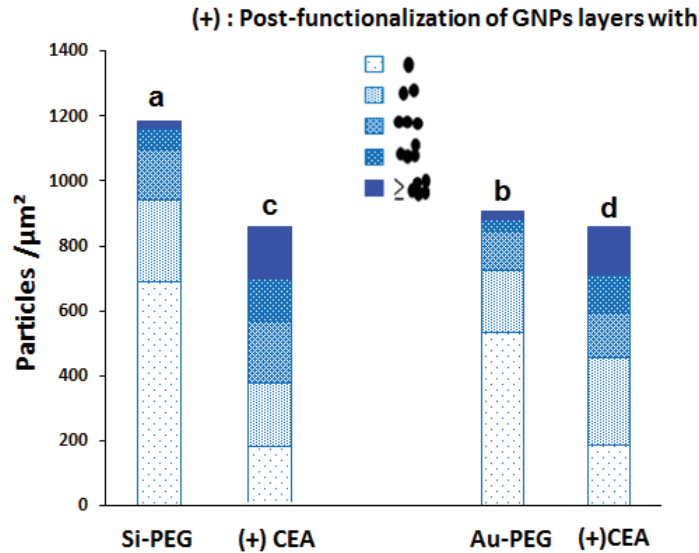


Figure 59 : Histogrammes représentant les densités de GNPs sur les différentes surfaces de silicium (a) et d'or (b) nanostructurées après post-fonctionnalisation par la CEA (c et d).

Ainsi, le recouvrement en GNPs a été abaissé après post-fonctionnalisation sur les deux surfaces nanostructurées.

4.3. Post-fonctionnalisation par le DAPEG

Le DAPEG est un PEG avec deux groupements amine équivalents vis-à-vis de l'interaction avec les GNPs. Le protocole de post-fonctionnalisation par le DAPEG est décrit au chapitre 2, paragraphe 2.2.4.

4.3.1. Caractérisation par MEB

Afin de vérifier si la fonctionnalisation des GNPs a une incidence sur leur dispersion, nous avons analysé les surfaces par MEB. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la Figure 60. Les images montrent une densité similaire avant et après traitement avec une diminution de la densité des particules isolées en particulier sur la surface de silicium (c). A l'avenant de la post-fonctionnalisation par la CEA, une analyse quantitative est nécessaire pour recenser ces observations.

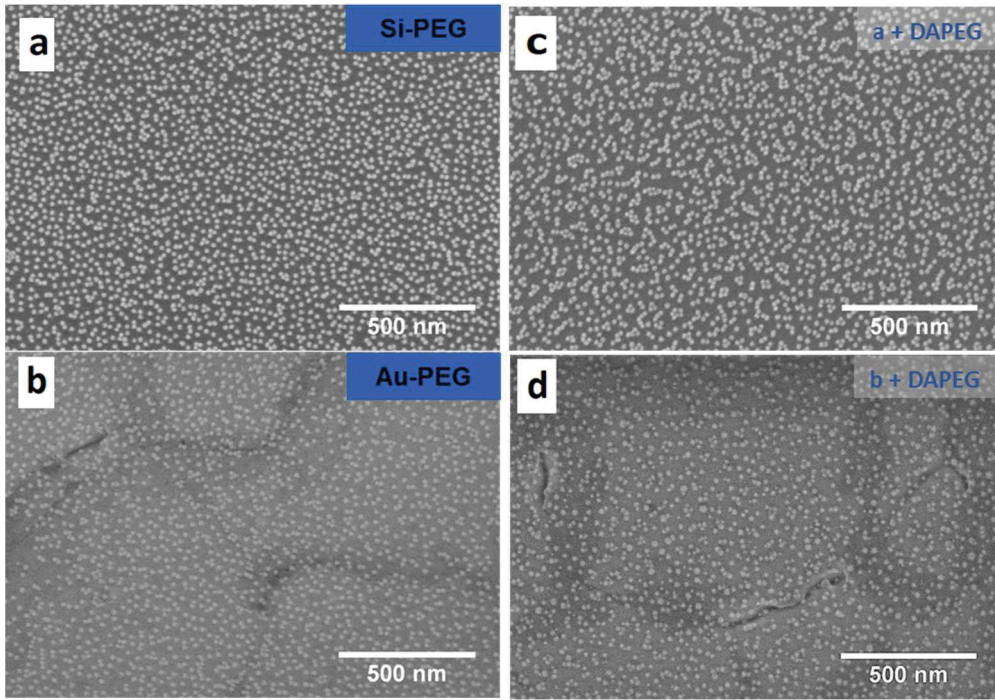


Figure 60: Clichés de MEB obtenus après traitement des surfaces nanostructurées Si-PEG (a) et Au-PEG (b) par le DAPEG (c et d respectivement).

4.3.2. Dénombrement des particules et état d'agrégation

L'histogramme ci-dessous montre l'évolution de la distribution des GNPs individuelles et des agrégats après la post-fonctionnalisation par DAPEG.

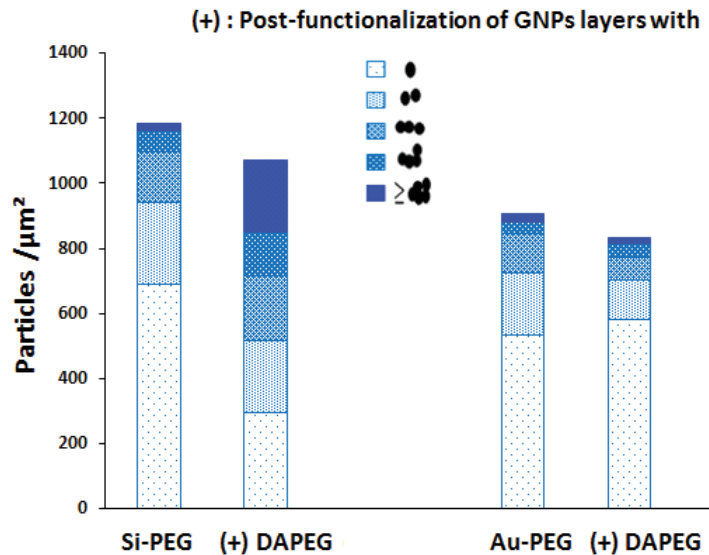


Figure 61 : Histogrammes représentant les densités de GNPs sur les différentes surfaces de silicium (a) et d'or (b) nanostructurées après post-fonctionnalisation par le DAPEG (c et d).

L'histogramme de la Figure 61 montre que sur silicium, la fonctionnalisation des GNPs a conduit à une forte diminution de la densité de GNPs individuelles après greffage du DAPEG. Par contre, on remarque que pour l'or, la fonctionnalisation des GNPs par le DAPEG n'a pas

affecté le recouvrement des nanoparticules. La densité de GNPs individuelles reste inchangée voire améliorée. Malgré cette diminution la qualité globale de la couche de GNPs semble préservée avec une densité et une dispersion toujours très bonnes pour les deux substrats.

4.4. Discussion

Le post-traitement des substrats Si-PEG-GNPs par CEA ou DAPEG entraîne dans les deux cas une désorption de particules (jusqu'à 25 % avec CEA) et une diminution de la densité de nanoparticules isolées. On peut expliquer ce comportement par le fait que le taux de recouvrement en GNPs sur la surface Si-PEG dépassait 15% (voir Tableau 6) qui la limite supérieure établie par Grabar *et al.*³⁴ pour des GNPs de 15 nm de diamètre stabilisées par des citrates. Ainsi, l'excès de GNPs, faiblement liées et /ou mobiles, s'agglomèrent légèrement avec un traitement par un ligand faible (fonction amine) comme le DAPEG et s'agrègent et se désorbent avec un ligand fort (fonction thiol) tel que la CEA.

Cet effet a été précédemment reporté sur des surfaces de silicium fonctionnalisées APTES. Le traitement de ces surfaces par la CEA a causé la désorption des GNPs immobilisées sur ces surfaces. Ceci a été expliqué par la répulsion entre la charge positive des GNPs, induite par le changement des ions citrates par la CEA, et la charge positive de l'APTES^{78a, 83}.

A l'inverse, les densités des GNPs sur les surfaces Au-PEG-GNPs n'ont pas été affectées par la post-fonctionnalisation CEA ou DAPEG. Ceci est en accord avec le taux de recouvrement qui n'excède pas 15% et donc l'absence probable de particules faiblement attachées sur cette surface. Pour ces surfaces, l'agrégation est seulement induite par la CEA. Ceci est dû au fait que les charges négatives des citrates ne sont plus effectives ce qui entraîne la formation d'agrégats^{78b}.

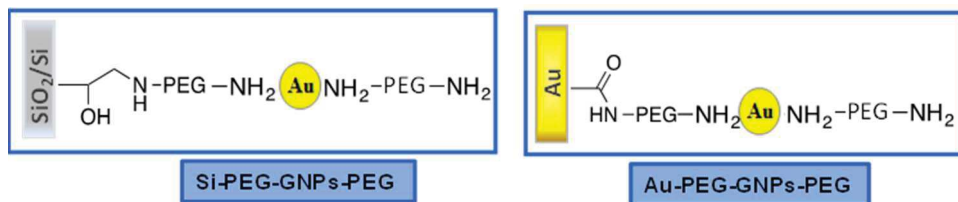
Bilan

Le recouvrement des surfaces nanostructurées par les GNPs après la post-fonctionnalisation dépend à la fois de la nature du ligand utilisé et de la force de liaison des particules avec la surface.

En effet, il existe une limite du taux de recouvrement (~15%) au-delà de laquelle l'excès des particules devient labile et faiblement lié à la surface. Ainsi, la post-fonctionnalisation peut entraîner leur désorption et/ou une diminution de la quantité de particules isolées selon la force du ligand utilisé.

Une post-fonctionnalisation par un PEG diamine permet de maintenir à la fois une haute densité et une bonne dispersion des particules notamment pour les surfaces d'or où toutes les particules sont fortement liées à la surface.

Les deux surfaces sélectionnées comme plateformes de détection nanostructurées sur silicium et or sont représentées ci-dessous :



L'efficacité de la post-fonctionnalisation sera évaluée dans le chapitre suivant lors du greffage de la cible ou du biorécepteur.

Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'immobilisation des nanoparticules d'or sur les surfaces transductrices préalablement fonctionnalisées ainsi que leur post-fonctionnalisation. Afin d'y parvenir, nous avons entrepris une étude minutieuse des paramètres qui peuvent influencer les interactions entre ces particules et les fonctions chimiques greffées en surface. Dès lors, nous avons fonctionnalisé de manière contrôlée des surfaces d'or et de silicium par greffage de silanes et de thiols pour aboutir à des fonctions amine et thiol terminales avec des longueurs de chaînes variées. Ainsi, trois types de surfaces ont été étudiées pour chaque substrat : NH_2 , NH_2/SH et PEG. Les GNPs d'or y ont été déposées selon différents protocoles (sous agitation, sous sonication et sous flux), puis post-fonctionnalisées pour la construction des biocapteurs.

La fonctionnalisation des surfaces transductrices d'or et de silicium a été suivie par mesure de l'angle de contact, PM-IRRAS, ATR-IR et XPS. La caractérisation des surfaces a montré la présence des groupements fonctionnels escomptés en surface (NH_2 , SH, PEG) attestant de l'efficacité des protocoles de nettoyage, d'activation et de greffage choisis.

Ces surfaces ont ensuite été utilisées pour immobiliser les nanoparticules d'or synthétisées par voie chimique selon la méthode citrate/acide-tannique. Les images MEB des surfaces après l'étape de greffage des nanoparticules ont montré que la nature de la SAM influençait grandement l'immobilisation des GNPs, en l'occurrence les surfaces fonctionnalisées par le DAPEG ont conduit à des taux de recouvrement élevés tout en préservant une densité importante de particules isolées. Cette excellente plateforme d'accroche des GNPs provient de l'incorporation de ces derniers dans les chaînes longues du PEG.

La coexistence de fonctions chimiques d'ancrage multiples (amine et thiols) et des interactions coopératives permet aussi d'améliorer la densité et la dispersion des GNPs à la surface des surfaces planes d'or et de silicium.

Par ailleurs, la densité et la dispersion des GNPs varient en fonction des conditions de dépôt. Les dépôts sous sonication et sous flux permettent d'améliorer la dispersion des GNPs et limitent l'agrégation des GNPs. De plus, le dépôt sous flux en QCM offre un moyen supplémentaire de caractérisation des couches de GNPs.

Afin d'avoir à la fois un recouvrement de particules optimal, tout en assurant une robustesse de la couche de GNPs formées, nous avons sélectionné les surfaces PEG avec un dépôt sous

sonication pour l'étude de la post-fonctionnalisation. Deux molécules différentes ont été utilisées pour cela : la CEA et le DAPEG. Les analyses MEB ont montré que l'influence de la post-fonctionnalisation sur le taux de recouvrement dépend à la fois de la nature du ligand utilisé et de la force de liaison des particules avec la surface. En effet, le DAPEG modifie très peu la couche de nanoparticules d'or tandis que la cysteamine conduit à la désorption des particules en excès et une augmentation du taux d'agrégats.

Cette étude fournit non seulement des données précieuses sur les GNPs immobilisées sur les surfaces, mais permet aussi de proposer des protocoles de dépôt spécifiques, adaptables en terme de densité et dispersion aux besoins de l'application. De plus, la polyvalence du substrat permet à ces plateformes nanostructurées d'être associées à des techniques de transduction variées.

Références bibliographiques

1. (a) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W., Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2009**, *25* (24), 13840-13851; (b) Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M., Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (2), 151-60; (c) Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*; (d) Li, Y.; Schluesener, H. J.; Xu, S., Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin* **2010**, *43* (1), 29-41.
2. (a) Zheng, J.; Zhu, Z.; Chen, H.; Liu, Z., Nanopatterned Assembling of Colloidal Gold Nanoparticles on Silicon. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2000**, *16* (10), 4409-4412; (b) Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379* (7), 920-930; (c) Ghosh, S. K.; Pal, T., Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4797-4862.
3. (a) Lippa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *314* (1-2), 1-26; (b) Briand, E.; Salmain, M.; Herry, J.-M.; Perrot, H.; Compère, C.; Pradier, C.-M., Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22* (3), 440-448.
4. (a) Morel, A.-L.; Boujday, S.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.; Pradier, C.-M., Biosensors elaborated on gold nanoparticles, a PM-IRRAS characterisation of the IgG binding efficiency. *Talanta* **2011**, *85* (1), 35-42; (b) Morel, A.-L.; Volmant, R.-M.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2010**, *81* (1), 304-312.
5. Hadano, S.; Handa, H.; Nagai, K.; Iyoda, T.; Li, J.; Watanabe, S., Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) Effect of Hexagonally Arranged Gold Nanoparticle Array with 29-nm Particles and 23-nm Gaps Using Liquid-crystalline Block-copolymer Template. *Chem. Lett.* **2013**, *42* (1), 71-73.
6. De Rosa, C.; Auriemma, F.; Diletto, C.; Di Girolamo, R.; Malafronte, A.; Morvillo, P.; Zito, G.; Rusciano, G.; Pesce, G.; Sasso, A., Toward hyperuniform disordered plasmonic nanostructures for reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy. *PCCP* **2015**, *17* (12), 8061-8069.
7. Park, B.-W.; Kim, D.-S.; Yoon, D.-Y., Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. *Korean J. Chem. Eng.* **2011**, *28* (1), 64-70.
8. Kahl, M.; Voges, E.; Kostrewa, S.; Viets, C.; Hill, W., Periodically structured metallic substrates for SERS. *Sensors Actuators B: Chem.* **1998**, *51* (1-3), 285-291.
9. (a) Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V., Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors Actuators B: Chem.* **2014**, *195*, 332-351; (b) Vikholm-Lundin, I.; Rosqvist, E.; Ihalainen, P.; Munter, T.; Honkimaa, A.; Marjomäki, V.; Albers, W. M.; Peltonen, J., Assembly of citrate gold nanoparticles on hydrophilic monolayers. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *378*, 519-529.
10. Putzbach, W.; Ronkainen, N., Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* **2013**, *13* (4), 4811.
11. (a) Fan, M.; Andrade, G. F.; Brolo, A. G., A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693* (1-2), 7-25; (b) Shiohara, A.; Wang, Y.; Liz-Marzán, L. M., Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2014**, *21*, 2-25.
12. (a) Khire, V. S.; Lee, T. Y.; Bowman, C. N., Surface Modification Using Thiol-Acrylate Conjugate Addition Reactions. *Macromolecules* **2007**, *40* (16), 5669-5677; (b) McNally, H.; Janes, D. B.; Kasibhatla, B.; Kubiak, C. P., Electrostatic investigation into the bonding of poly(phenylene) thiols to gold. *Superlattices Microstruct.* **2002**, *31* (5), 239-245; (c) Zhong, Z.; Patskovskyy, S.; Bouvrette, P.; Luong, J. H. T.; Gedanken, A., The Surface Chemistry of Au Colloids and Their Interactions with

- Functional Amino Acids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (13), 4046-4052; (d) Aureau, D.; Varin, Y.; Roodenko, K.; Seitz, O.; Pluchery, O.; Chabal, Y. J., Controlled Deposition of Gold Nanoparticles on Well-Defined Organic Monolayer Grafted on Silicon Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (33), 14180-14186; (e) Pena-Pereira, F.; Duarte, R. M. B. O.; Duarte, A. C., Immobilization strategies and analytical applications for metallic and metal-oxide nanomaterials on surfaces. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *40*, 90-105.
13. Ulman, A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (4), 1533-1554.
14. (a) Chaki, N. K.; Vijayamohan, K., Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17* (1-2), 1-12; (b) Wink, T.; J. van Zuilen, S.; Bult, A.; P. van Bennekom, W., Self-assembled Monolayers for Biosensors. *Analyst* **1997**, *122* (4), 43R-50R.
15. Vericat, C.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. *PCCP* **2005**, *7* (18), 3258-3268.
16. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1103-1170.
17. Onclin, S.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N., Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-Assembled Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (39), 6282-6304.
18. (a) Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 293-346; (b) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C., Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *0* (16), 1655-1656.
19. Jal, P. K.; Patel, S.; Mishra, B. K., Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Talanta* **2004**, *62* (5), 1005-1028.
20. Sagiv, J., Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (1), 92-98.
21. Zhuravlev, L. T., Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1987**, *3* (3), 316-318.
22. (a) Bierbaum, K.; Kinzler, M.; Woell, C.; Grunze, M.; Haehner, G.; Heid, S.; Effenberger, F., A Near Edge X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy and X-ray Photoelectron Spectroscopy Study of the Film Properties of Self-Assembled Monolayers of Organosilanes on Oxidized Si(100). *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1995**, *11* (2), 512-518; (b) Wasserman, S. R.; Tao, Y. T.; Whitesides, G. M., Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1989**, *5* (4), 1074-1087; (c) Tillman, N.; Ulman, A.; Schildkraut, J. S.; Penner, T. L., Incorporation of phenoxy groups in self-assembled monolayers of trichlorosilane derivatives. Effects on film thickness, wettability, and molecular orientation. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (18), 6136-6144.
23. Aissaoui, N.; Bergaoui, L.; Landoulsi, J.; Lambert, J. F.; Boujday, S., Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (1), 656-65.
24. Rozlosnik, N.; Gerstenberg, M. C.; Larsen, N. B., Effect of Solvents and Concentration on the Formation of a Self-Assembled Monolayer of Octadecylsiloxane on Silicon (001). *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2003**, *19* (4), 1182-1188.
25. Wang, Y.; Lieberman, M., Growth of Ultrasooth Octadecyltrichlorosilane Self-Assembled Monolayers on SiO₂. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2003**, *19* (4), 1159-1167.
26. Pasternack, R. M.; Rivillon Amy, S.; Chabal, Y. J., Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24* (22), 12963-12971.
27. Le Grange, J. D.; Markham, J. L.; Kurkjian, C. R., Effects of surface hydration on the deposition of silane monolayers on silica. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1993**, *9* (7), 1749-1753.
28. Vallant, T.; Brunner, H.; Mayer, U.; Hoffmann, H.; Leitner, T.; Resch, R.; Friedbacher, G., Formation of Self-Assembled Octadecylsiloxane Monolayers on Mica and Silicon Surfaces Studied by

- Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (37), 7190-7197.
29. Tian, R.; Seitz, O.; Li, M.; Hu, W.; Chabal, Y. J.; Gao, J., Infrared Characterization of Interfacial Si–O Bond Formation on Silanized Flat SiO₂/Si Surfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26* (7), 4563-4566.
30. Halliwell, C. M.; Cass, A. E., A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (11), 2476-83.
31. Zhu, M.; Lerum, M. Z.; Chen, W., How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (1), 416-23.
32. Fadeev, A. Y.; McCarthy, T. J., Self-Assembly Is Not the Only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces: Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2000**, *16* (18), 7268-7274.
33. Felicia, T.; Monica, B.; Lucian, B.; Simion, A., Controlling gold nanoparticle assemblies for efficient surface-enhanced Raman scattering and localized surface plasmon resonance sensors. *Nanotechnology* **2007**, *18* (25), 255702.
34. Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J., Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (4), 735-743.
35. (a) Christau, S.; Moller, T.; Yenice, Z.; Genzer, J.; von Klitzing, R., Brush/Gold Nanoparticle Hybrids: Effect of Grafting Density on the Particle Uptake and Distribution within Weak Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir* **2014**, *30* (43), 13033-13041; (b) Christau, S.; Thurandt, S.; Yenice, Z.; von Klitzing, R., Stimuli-Responsive Polyelectrolyte Brushes As a Matrix for the Attachment of Gold Nanoparticles: The Effect of Brush Thickness on Particle Distribution. *Polymers* **2014**, *6* (7), 1877-1896; (c) Diamanti, S.; Arifuzzaman, S.; Genzer, J.; Vaia, R. A., Tuning Gold Nanoparticle–Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Brush Interactions: From Reversible Swelling to Capture and Release. *ACS Nano* **2009**, *3* (4), 807-818; (d) Ferhan, A. R.; Kim, D.-H., In-stacking: a strategy for 3D nanoparticle assembly in densely-grafted polymer brushes. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (4), 1274-1277; (e) Ferhan, A. R.; Guo, L.; Zhou, X.; Chen, P.; Hong, S.; Kim, D. H., Solid-phase colorimetric sensor based on gold nanoparticle-loaded polymer brushes: lead detection as a case study. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (8), 4094-9; (f) Onses, M. S., Fabrication of Nanopatterned Poly(ethylene glycol) Brushes by Molecular Transfer Printing from Poly(styrene-block-methyl methacrylate) Films to Generate Arrays of Au Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2015**, *31* (3), 1225-1230; (g) Liu, Z.; Pappacena, K.; Cerise, J.; Kim, J.; Durning, C. J.; O'Shaughness, B.; Levicky, R., Organization of Nanoparticles on Soft Polymer Surfaces. *Nano Lett.* **2002**, *2* (3), 219-224; (h) Rajendra, R. B.; Jan, G.; Bryce, N. C.; Harry, W. S.; Andrea, L.-V., Controlling the assembly of nanoparticles using surface grafted molecular and macromolecular gradients. *Nanotechnology* **2003**, *14* (10), 1145; (i) Oren, R.; Liang, Z.; Barnard, J. S.; Warren, S. C.; Wiesner, U.; Huck, W. T. S., Organization of Nanoparticles in Polymer Brushes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (5), 1670-1671; (j) Onses, M. S.; Liu, C.-C.; Thode, C. J.; Nealey, P. F., Highly Selective Immobilization of Au Nanoparticles onto Isolated and Dense Nanopatterns of Poly(2-vinyl pyridine) Brushes down to Single-Particle Resolution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (18), 7299-7307; (k) Roiter, Y.; Minko, I.; Nykypanchuk, D.; Tokarev, I.; Minko, S., Mechanism of nanoparticle actuation by responsive polymer brushes: from reconfigurable composite surfaces to plasmonic effects. *Nanoscale* **2012**, *4* (1), 284-292; (l) Fang, L.; Li, Y.; Chen, Z.; Liu, W.; Zhang, J.; Xiang, S.; Shen, H.; Li, Z.; Yang, B., Tunable polymer brush/Au NPs hybrid plasmonic arrays based on host-guest interaction. *ACS applied materials & interfaces* **2014**, *6* (22), 19951-7.
36. (a) Mehne, J.; Markovic, G.; Pröll, F.; Schweizer, N.; Zorn, S.; Schreiber, F.; Gauglitz, G., Characterisation of morphology of self-assembled PEG monolayers: a comparison of mixed and pure coatings optimised for biosensor applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (5), 1783-1791; (b) Huebner, M.; Ben Haddada, M.; Methivier, C.; Niessner, R.; Knopp, D.; Boujday, S., Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 334-341.
37. Meyerbröker, N.; Kriesche, T.; Zharnikov, M., Novel Ultrathin Poly(ethylene glycol) Films as Flexible Platform for Biological Applications and Plasmonics. *ACS applied materials & interfaces* **2013**, *5* (7), 2641-2649.

38. 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., Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2009**, *26* (2), 809-814.
39. Piehler, J.; Brecht, A.; Valiokas, R.; Liedberg, B.; Gauglitz, G., A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15* (9-10), 473-481.
40. Onses, M. S.; Nealey, P. F., Tunable Assembly of Gold Nanoparticles on Nanopatterned Poly(ethylene glycol) Brushes. *Small* **2013**, *9* (24), 4168-4174.
41. Mittal, K. L., Surface Contamination: An Overview. In *Surface Contamination*, Mittal, K. L., Ed. Springer US: 1979; pp 3-45.
42. Kanan, S. M.; Tze, W. T. Y.; Tripp, C. P., Method to Double the Surface Concentration and Control the Orientation of Adsorbed (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane on Silica Powders and Glass Slides. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2002**, *18* (17), 6623-6627.
43. Tsukruk, V. V.; Luzinov, I.; Julthongpipit, D., Sticky Molecular Surfaces: Epoxysilane Self-Assembled Monolayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1999**, *15* (9), 3029-3032.
44. Yim, H.; Kent, M. S.; Tallant, D. R.; Garcia, M. J.; Majewski, J., Hygrothermal Degradation of (3-Glycidioxypropyl)trimethoxysilane Films Studied by Neutron and X-ray Reflectivity and Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21* (10), 4382-4392.
45. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (2), 426-436.
46. Joonyeong, K., Formation, Structure, and Reactivity of Amino-Terminated Organic Films on Silicon Substrates. In *Interfaces and Interphases in Analytical Chemistry*, American Chemical Society: 2011; Vol. 1062, pp 141-165.
47. Socrates, G. Infrared Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 2nd ed. 2nd ed.; John Wiley and Sons: 1994.
48. Dinh, D. H.; Vellutini, L.; Bennetau, B.; Dejous, C.; Rebière, D.; Pascal, É.; Moynet, D.; Belin, C.; Desbat, B.; Labrugère, C.; Pillot, J.-P., Route to Smooth Silica-Based Surfaces Decorated with Novel Self-Assembled Monolayers (SAMs) Containing Glycidyl-Terminated Very Long Hydrocarbon Chains. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2009**, *25* (10), 5526-5535.
49. Zdyrko, B.; Varshney, S. K.; Luzinov, I., Effect of Molecular Weight on Synthesis and Surface Morphology of High-Density Poly(ethylene glycol) Grafted Layers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, *20* (16), 6727-6735.
50. (a) Mercier, D.; Boujday, S.; Annabi, C.; Villanneau, R.; Pradier, C.-M.; Proust, A., Bifunctional Polyoxometalates for Planar Gold Surface Nanostructuring and Protein Immobilization. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (24), 13217-13224; (b) Ben Haddada, M.; Blanchard, J.; Casale, S.; Krafft, J.-M.; Vallée, A.; Méthivier, C.; Boujday, S., Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane. *Gold bulletin* **2013**, *46* (4), 335-341.
51. Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C., The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1183-1192.
52. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (1), 321-335.
53. Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C., Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (5), 1805-1834.
54. (a) Boujday, S.; Briandet, R.; Salmain, M.; Herry, J.-M.; Marnet, P.-G.; Gautier, M.; Pradier, C.-M., Detection of pathogenic *Staphylococcus aureus* bacteria by gold based immunosensors. *Microchimica Acta* **2008**, *163* (3-4), 203-209; (b) Salmain, M.; Ghasemi, M.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sensors Actuators B: Chem.* **2012**, *173*, 148-156; (c) Salmain,

- M.; Ghasemi, M.; Boujday, S.; Spadavecchia, J.; Técher, C.; Val, F.; Le Moigne, V.; Gautier, M.; Briandet, R.; Pradier, C.-M., Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *29* (1), 140-144.
55. Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L., Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (8), 2358-2368.
56. Kankate, L.; Turchanin, A.; Götzhäuser, A., On the Release of Hydrogen from the S-H groups in the Formation of Self-Assembled Monolayers of Thiols. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2009**, *25* (18), 10435-10438.
57. (a) Fukushima, H.; Seki, S.; Nishikawa, T.; Takiguchi, H.; Tamada, K.; Abe, K.; Colorado, R.; Graupe, M.; Shmakova, O. E.; Lee, T. R., Microstructure, Wettability, and Thermal Stability of Semifluorinated Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Gold. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (31), 7417-7423; (b) Bedford, E.; Humblot, V.; Methivier, C.; Pradier, C.-M.; Gu, F.; Tielens, F.; Boujday, S., An Experimental and Theoretical Approach to Investigate the Effect of Chain Length on Aminothiols Adsorption and Assembly on Gold. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (41), 14555-14561; (c) Ito, E.; Konno, K.; Noh, J.; Kanai, K.; Ouchi, Y.; Seki, K.; Hara, M., Chain length dependence of adsorption structure of COOH-terminated alkanethiol SAMs on Au(111). *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *244* (1-4), 584-587; (d) Nuzzo, R. G.; Dubois, L. H.; Allara, D. L., Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (2), 558-569.
58. Evans, S. D.; Urankar, E.; Ulman, A.; Ferris, N., Self-assembled monolayers of alkanethiols containing a polar aromatic group: effects of the dipole position on molecular packing, orientation, and surface wetting properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (11), 4121-4131.
59. (a) Boujday, S.; Methivier, C.; Beccard, B.; Pradier, C. M., Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: comparing the efficiency of Fourier transform-surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance with dissipation measurements, and polarization modulation-reflection absorption infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* **2009**, *387* (2), 194-201; (b) Cai, H.; Xu, C.; He, P.; Fang, Y., Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *510* (1-2), 78-85; (c) Spadavecchia, J.; Moreau, J.; Hottin, J.; Canva, M., New cysteamine based functionalization for biochip applications. *Sensors Actuators B: Chem.* **2009**, *143* (1), 139-143; (d) Mercier, D.; Ben Haddada, M.; Huebner, M.; Knopp, D.; Niessner, R.; Salmain, M.; Proust, A.; Boujday, S., Polyoxometalate nanostructured gold surfaces for sensitive biosensing of benzo[a]pyrene. *Sensors Actuators B: Chem.* **2015**, *209*, 770-774; (e) Tichoniuk, M.; Ligaj, M.; Filipiak, M., Application of DNA Hybridization Biosensor as a Screening Method for the Detection of Genetically Modified Food Components. *Sensors* **2008**, *8* (4), 2118.
60. (a) Nam, E. J.; Kim, E. J.; Wark, A. W.; Rho, S.; Kim, H.; Lee, H. J., Highly sensitive electrochemical detection of proteins using aptamer-coated gold nanoparticles and surface enzyme reactions. *Analyst* **2012**, *137* (9), 2011-2016; (b) Hongqiu, Z.; Lin, L.; Ji'an, T.; Mingxing, D.; Long, J., Enhancement of the immobilization and discrimination of DNA probe on a biosensor using gold nanoparticles. *Chin. Sci. Bull.* **2001**, *46* (13), 1074-1077; (c) Xu, Y. Y.; Bian, C.; Chen, S.; Xia, S., A microelectronic technology based amperometric immunosensor for α -fetoprotein using mixed self-assembled monolayers and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *561* (1-2), 48-54.
61. Qu, D.; Kim, B.-C.; Lee, C.-W. J.; Ito, M.; Noguchi, H.; Uosaki, K., 1,6-Hexanedithiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) Investigated by Electrochemical, Spectroscopic, and Molecular Mechanics Methods. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (1), 497-505.
62. Vallée, A.; Humblot, V.; Al Housseiny, R.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., BSA adsorption on aliphatic and aromatic acid SAMs: Investigating the effect of residual surface charge and sublayer nature. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2013**, *109* (0), 136-142.
63. Hoffmann, F. M., Infrared reflection-absorption spectroscopy of adsorbed molecules. *Surf. Sci. Rep.* **1983**, *3* (2), 107-192.
64. Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D., Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (12), 3559-3568.

65. Chen, C.; Tripp, C. P., An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778* (10), 2266-2272.
66. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (2), 426-436.
67. Yam, C.-M.; Pradier, C.-M.; Salmain, M.; Marcus, P.; Jaouen, G., Binding of Biotin to Gold Surfaces Functionalized by Self-Assembled Monolayers of Cystamine and Cysteamine: Combined FT-IRRAS and XPS Characterization. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *235* (1), 183-189.
68. (a) He, H. X.; Zhang, H.; Li, Q. G.; Zhu, T.; Li, S. F. Y.; Liu, Z. F., Fabrication of Designed Architectures of Au Nanoparticles on Solid Substrate with Printed Self-Assembled Monolayers as Templates. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2000**, *16* (8), 3846-3851; (b) Gotesman, G.; Naaman, R., Selective surface patterning for the coadsorption of self-assembled gold and semiconductor nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24* (12), 5981-3; (c) Zhu, T.; Zhang, X.; Wang, J.; Fu, X.; Liu, Z., Assembling colloidal Au nanoparticles with functionalized self-assembled monolayers. *Thin Solid Films* **1998**, *327-329*, 595-598.
69. O'Reilly, A. J.; Francis, C.; Quitarano, N. J., Gold nanoparticle deposition on Si by destabilising gold colloid with HF. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *370* (1), 46-50.
70. Wang, J.; Zhu, T.; Song, J.; Liu, Z., Gold nanoparticulate film bound to silicon surface with self-assembled monolayers. *Thin Solid Films* **1998**, *327-329*, 591-594.
71. Kaminska, A.; Inya-Agha, O.; Forster, R. J.; Keyes, T. E., Chemically bound gold nanoparticle arrays on silicon: assembly, properties and SERS study of protein interactions. *PCCP* **2008**, *10* (28), 4172-4180.
72. Bedford, E.; Humblot, V.; Methivier, C.; Pradier, C.-M.; Gu, F.; Tielens, F.; Boujday, S., An Experimental and Theoretical Approach to Investigate the Effect of Chain Length on Amino-thiol Adsorption and Assembly on Gold. *Chemistry-A European Journal* **2015**, *21* (41), 14555-14561.
73. Riauba, L.; Niaura, G.; Eicher-Lorka, O.; Butkus, E., A Study of Cysteamine Ionization in Solution by Raman Spectroscopy and Theoretical Modeling. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (50), 13394-13404.
74. Bhat, R. R.; Genzer, J., Tuning the number density of nanoparticles by multivariate tailoring of attachment points on flat substrates. *Nanotechnology* **2007**, *18* (2).
75. Iler, R. K., *The Chemistry of Silica*. Wiley-Interscience: New York, 1979.
76. Kim, J. U.; O'Shaughnessy, B., Nanoinclusions in Dry Polymer Brushes. *Macromolecules* **2006**, *39* (1), 413-425.
77. (a) Nath, N.; Chilkoti, A., Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5370-5378; (b) Morel, A.-L.; Volmant, R.-M.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. *Colloids Surf., B* **2010**, *81* (1), 304-312.
78. (a) Enders, D.; Nagao, T.; Pucci, A.; Nakayama, T., Reversible adsorption of Au nanoparticles on SiO₂/Si: An in situ ATR-IR study. *Surf. Sci.* **2006**, *600* (6), L71-L75; (b) Sato, T.; Ahmed, H.; Brown, D.; Johnson, B. F. G., Single electron transistor using a molecularly linked gold colloidal particle chain. *J. Appl. Phys.* **1997**, *82* (2), 696-701.
79. Schmitt, J.; Mächtle, P.; Eck, D.; Möhwald, H.; Helm, C. A., Preparation and Optical Properties of Colloidal Gold Monolayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **1999**, *15* (9), 3256-3266.
80. Kubiak, K.; Adamczyk, Z.; Maciejewska, J.; Oćwieja, M., Gold Nanoparticle Monolayers of Controlled Coverage and Structure. *The Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120* (22), 11807-11819.
81. Grunewald, C.; Schmutte, M.; Noufele, C. N.; Graf, C.; Risse, T., Ordered Structures of Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces: Correlation of Quartz Crystal Microbalance with Structural Characterization. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (20), 10642-10649.
82. Irwin, E. F.; Ho, J. E.; Kane, S. R.; Healy, K. E., Analysis of Interpenetrating Polymer Networks via Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21* (12), 5529-5536.

83. Enders, D.; Nagao, T.; Nakayama, T.; Aono, M., In situ Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy for the Analysis of the Adsorption and Desorption Process of Au Nanoparticles on the SiO₂/Si Surface. *Langmuir* **2007**, *23* (11), 6119-6125.

Chapitre 4 : Elaboration d'immunocapteurs piézoélectriques sur des surfaces nanostructurées pour la détection de cibles d'intérêt

Introduction

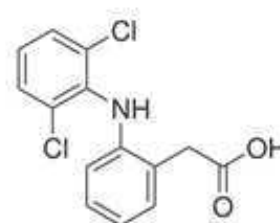
Dans le chapitre précédent, nous avons optimisé les conditions opératoires de nanostructuration de surfaces d'or et de silicium par les nanoparticules d'or avec l'objectif final de développer des immunocapteurs piézoélectriques pour la détection de cibles d'intérêt. Nous nous sommes intéressé à deux cibles différentes de par leur taille et leur nature mais représentatives chacune d'une classe d'analytes, les antigènes protéiques pour l'entérotoxine A de *Staphylococcus aureus* (SEA) et les haptènes pour le diclofénac. Pour la SEA, le format d'immunodétection direct classique, dans lequel l'anticorps est immobilisé sur la surface pour la détection de la cible, sera adopté. Cependant, ce format de détection est dicté par le poids moléculaire des cibles et pour le cas des haptènes (< 2 kD, paragraphe 1.3.2 du chapitre 1) ce format ne peut être appliqué. Pour la seconde cible, le diclofénac, nous adopterons le format compétitif. Nous explorerons la détection de ces deux cibles avec l'idée de les utiliser comme modèles pour les antigènes protéiques et les haptènes. Néanmoins, au-delà de cet aspect modèle, les cibles choisies présentent un réel intérêt analytique qui nécessite le développement de biocapteurs comme présenté ci-dessous.

- **Le diclofénac, un polluant pharmaceutique**

Au cours des dernières décennies, la présence d'agents pharmaceutiques dans des matrices environnementales, particulièrement dans les eaux, a été démontrée à des concentrations allant du ppt au ppb (ng - µg/L). Ces composés sont ainsi considérés comme une nouvelle classe de polluants ¹. En conséquence, de nouvelles directives pour la réglementation de nombreux composés chimiques et la réduction des pollutions

toxiques sont apparues. Parmi celles-ci, la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE), transposée en droit français (Loi 2004-338 du 21 avril 2004). L'arrêté du 8 Juillet 2010 établit une liste de 33 substances prioritaires et fixe les modalités et délais de réduction progressive et d'élimination. Cette liste contient 45 substances en 2015, et a été complétée par une liste dite « de vigilance » visant 3 substances pharmaceutiques : un anti-inflammatoire non stéroïdien le diclofénac (DCF) ; et deux hormones estrogéniques, l'une naturelle : le 17-bêta-estradiol (E2), et l'autre synthétique : le 17-alpha éthinylestradiol (EE2).

Le diclofénac est une molécule bien décrite dans la littérature ². Il s'agit de l'anti-inflammatoire non stéroïdien le plus prescrit au monde et le plus détecté dans le cycle de l'eau en Europe. Il



Le diclofénac (DCF)
(MM : 296,148 g/mol)

est commercialisé en France sous le nom de Voltarène[®], et est utilisé pour soulager les douleurs articulaires.

Le diclofénac est consommé en grande quantité et se retrouve dans les rejets urbains. Il est faiblement éliminé au niveau des stations d'épuration, ce qui entraîne une pollution diffuse, difficile à traiter. Il est ainsi présent dans les eaux à des concentrations très basses entre 1 et 10 µg/L³. Les effets néfastes de cette molécule sont avérés, l'observation la plus catastrophique a été rapportée dans le sud de l'Asie où l'utilisation vétérinaire du DCF a été identifiée comme la cause principale du déclin de la population de trois espèces de vautours depuis les années 1990^{2a, 4}.

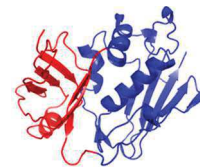
Les chromatographies liquides ou gaz et la spectroscopie de masse, équipées de détecteurs sensibles et sélectifs sont les techniques de choix pour la détection et la quantification de ce composé et de ses métabolites⁵. Cependant, ces techniques sont chronophages et onéreuses. Elles nécessitent en outre des laboratoires équipés et du personnel qualifié. De plus, ces méthodes atteignent leur limite lorsqu'il s'agit d'analyser des centaines ou des milliers d'échantillons. Ceci motive la recherche de techniques de détection rapides (de préférence sans aucune étape de concentration ou de prétraitement), abordables, simples et fiables qui pourraient aussi être automatisées ou effectués sur place⁶. Les immunocapteurs sont donc une alternative appropriée.

Tandis qu'un grand nombre d'immunoessais ont été développés et utilisés pour l'analyse des pesticides⁷, présents à des niveaux semblables dans l'écosystème aquatique, très peu de tests ont été appliqués pour des composés pharmaceutiques⁸. Pour le DCF, un test type ELISA basé sur un anticorps polyclonal anti-DCF permet la sa détection dans la gamme du ng/L^{8c}. Malgré cette sensibilité le test est long et requiert plusieurs heures avant la visualisation de la réponse. Le développement d'outils de détection rapides et sensibles demeure donc un défi pour ces analyses. .

- **L'entérotoxine bactérienne *S. aureus* A (SEA) :**

La contamination d'aliments (des produits laitiers, la viande) par la bactérie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une des causes le plus répandues de gastro-entérite⁹. L'intoxication est causée par les entérotoxines de staphylocoques (SEs) produites par certaines souches de *S. aureus*.

Au cours de la dernière décennie, un nombre important de travaux ont porté sur les dispositifs immunologiques sans marquage pour la détection de toxines alimentaires¹⁰. Comparé aux essais type ELISA, ces dispositifs de détection peuvent fournir



**L'entérotoxine *S.aureus* A
(SEA)**

(MM : 28000 g/mol)

une réponse quantitative dans un temps beaucoup plus court. Dans le cas de SEs, les immunocapteurs avec des modes de transduction optique ¹¹, piézoélectrique ¹² et électrochimique ¹³ ont été décrits avec des gammes de sensibilité variables.

Bien qu'il y ait plus de 21 entérotoxines de staphylocoques distinctes ¹⁴, seulement quelques-unes d'entre elles ont été étudiées de façon approfondie. Les entérotoxines les plus connues sont la SEA et la SEB.

La SEA est une petite protéine monomérique (28 kDa) avec une haute stabilité thermique et protéolytique. C'est la toxine la plus couramment rencontrée dans les cas d'intoxication alimentaire par *S. aureus* ^{11b, 15}. Il est généralement admis que l'ingestion de 100 ng de cette toxine est suffisante pour causer des symptômes d'intoxication.

Des kits commerciaux sont disponibles pour détecter les SEs dans les produits alimentaires ¹⁶. Ces essais immunologiques, de type ELISA, quoique sensibles, prennent au moins 3 h 30 (excluant l'étape d'extraction) à cause de leur procédure multi-étapes. Dans le cas de la SEA, les immunocapteurs décrits dans la littérature ont employé une transduction optique ^{11h, 11j} et ampérométrie avec une limite de détection aux alentours de 100 ng.mL⁻¹. Dans des travaux précédents de l'équipe, le contrôle de chaque étape de construction de la couche de d'accroche a permis de construire un immunocapteur piézoélectrique avec une limite de détection de 7 ng/mL ¹⁷.

Ce chapitre porte sur la construction et le test des immunocapteurs piézoélectriques nanostructurés pour les deux types de cibles. Les surfaces nanostructurées ayant donné une densité et dispersion optimale de GNPs ont été retenues pour cette étude. Il se décompose en deux parties : Dans la première, consacrée au diclofénac, la nanostructuration de surface est utilisée pour améliorer l'accessibilité et la fiabilité de la couche de ligands pour une détection en format indirect. Dans la seconde partie, portant sur la SEA, nous allons étudier l'apport de la nanostructuration par les GNPs pour les performances des immunocapteurs directs en les comparant notamment à celles obtenues sur des surfaces planes sans nanostructuration.

Partie 1

Elaboration d'immunocapteurs nanostructurés pour la détection du diclofénac

Dans cette partie sont présentés les résultats obtenus lors de la construction, sur des surfaces planes et nanostructurées, d'immunocapteurs opérant au format indirect pour détecter le diclofénac ainsi que les données obtenues par QCM-D pour le suivi de la reconnaissance anticorps/diclofénac et de la spécificité de l'interaction. Elle se termine par l'étude de la régénération des immunocapteurs et de la stabilité de la couche de nanoparticules au cours de ce cycle.

1.1. Principe de détection

L'immunodétection de molécules de faible poids moléculaire telles que le diclofénac est sujette à de multiples défis. Le premier concerne la production d'anticorps spécifiques. En effet, les anticorps d'haptènes sont moins affins que les anticorps des cibles protéiques et présentent souvent des réactivités croisées vis-à-vis de molécules de structures voisines. Cette partie du travail ayant été conduite dans le cadre d'une ANR franco-allemande, (NArBioS, Nanoscaled architectures for sensitive biosensing of small molecules) nous avons pu bénéficier des anticorps polyclonaux (anti-DCF) spécifiques et affins produits et testés par nos collaborateurs^{8c}. Ces anticorps ont été utilisés pour l'analyse de ce composé dans l'eau de surface et des eaux usées en Allemagne et en Autriche et montrent une haute sensibilité en ELISA (6 ng/L pour l'eau du robinet et 60 ng/L pour eaux usées)^{8c}. De plus, pour une détection dans les eaux usées, la préparation d'échantillons est minimale ; seules la filtration et la dilution sont requises^{4a}. Le second défi concerne la sensibilité des techniques de transduction. En effet, le signal de la plupart de ces techniques est souvent lié au poids moléculaire de la cible. Il est donc difficile, sans amplification, d'être dans une gamme raisonnable de sensibilité. Enfin, le format indirect adapté à ce type de cible, est basé sur une détection par compétition, il nécessite donc une excellente accessibilité de la cible et une reproductibilité parfaite. Ainsi, l'immobilisation contrôlée d'un ligand de structure analogue de celle de l'analyte sur les surfaces nanostructurées est une étape clé dans le développement du biocapteur indirect, et sera optimisée en premier dans ce qui suit. Au vu des résultats du chapitre précédent, les surfaces d'or et de silicium

nanostructurées fonctionnalisées et post-fonctionnalisées PEG présentent la densité et la dispersion de GNPs optimales. A ce titre, elles seront sélectionnées pour développer l'immunocapteur piézoélectrique nanostructuré pour le diclofénac et pour le suivi en QCM-D de la reconnaissance anticorps anti-DCF/ DCF. L'apport de la nanostructuration sera estimé en comparant avec des surfaces planes (sans GNPs) équivalentes : Si-PEG pour le silicium et Au-PEG pour l'or comme schématisé sur la Figure 62. Enfin, la régénération de l'immunocapteur sera explorée ainsi que la stabilité de la couche de nanoparticules pendant ce cycle.

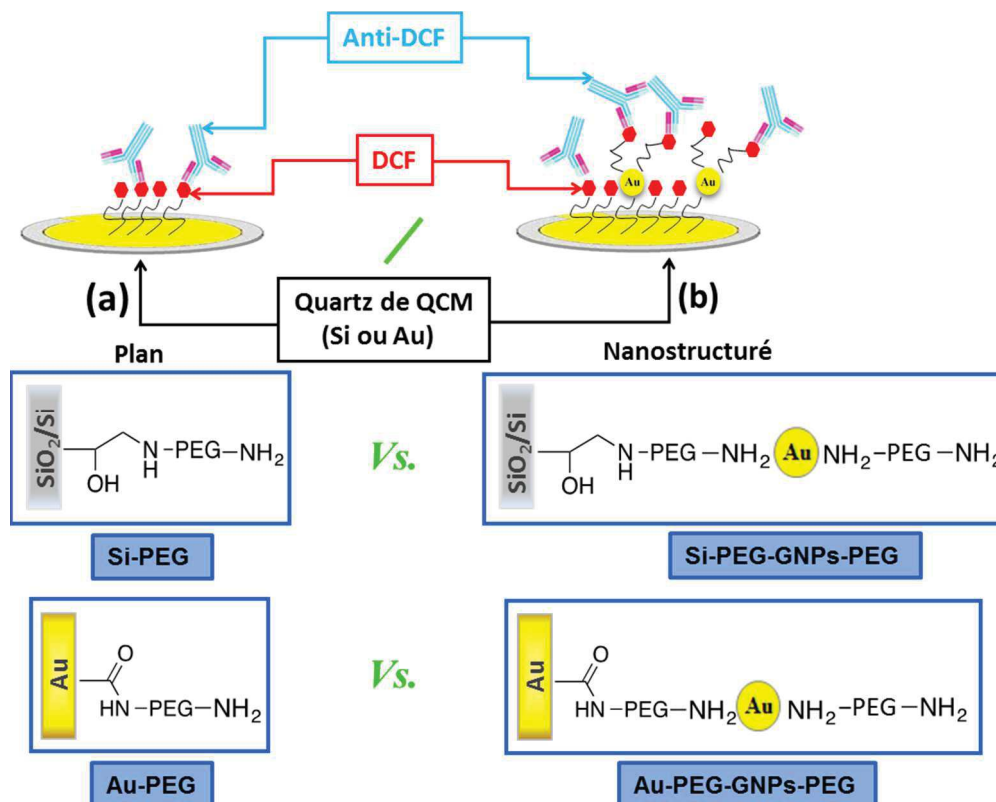


Figure 62 : Schéma récapitulatif de la construction de l'immunocapteur du diclofénac (DCF) sur des surfaces planes (a) et nanostructurées (b).

1.2. Greffage et caractérisation du diclofénac §

Le diclofénac est immobilisé de manière covalente ce qui permet en premier lieu d'éviter sa désorption lorsqu'il est impliqué dans une reconnaissance moléculaire avec l'anticorps et en second lieu la régénération du biocapteur par rupture de l'interaction Ab/Ag et décrochage de l'anticorps.

§ Ces travaux ont donné lieu à une publication commune avec les partenaires allemands sur les surfaces planes, jointe au manuscrit 18. Huebner, M.; Ben Haddada, M.; Methivier, C.; Niessner, R.; Knopp, D.; Boujday, S., Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes. Biosens. Bioelectron. 2015, 67, 334-341.

Le greffage du diclofénac sur les films de nanoparticules d'or post-fonctionnalisées fait intervenir sa fonction acide carboxylique (activé en solution) qui réagit avec les fonctions amines terminales du PEG en formant une fonction amide¹⁸ (voir Figure 63). Le protocole expérimental auquel nous avons eu recours est détaillé dans le chapitre 2.

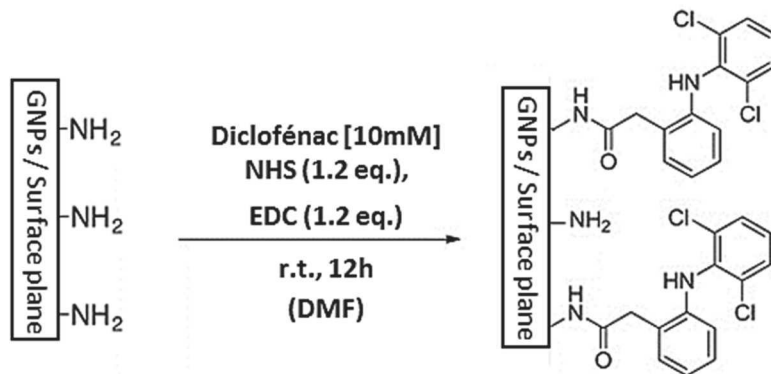


Figure 63 : Greffage du diclofénac sur les surfaces planes et nanostructurées.

Après greffage du DCF, les substrats plans ont été caractérisés par PM-IRRAS, GA-ATR, XPS et mesure de l'angle de contact. La taille de la molécule de diclofénac ainsi que les faibles quantités utilisées n'ont pas permis d'observer des bandes caractéristiques attestant le greffage de cette molécule sur les surfaces PEG-ylées. Les mesures d'angle de contact donnent également une valeur comparable avant et après greffage du DCF (43 et 45°). Le recours aux analyses par XPS a été nécessaire pour vérifier le greffage du diclofénac grâce à la présence du chlore sur les surfaces. L'intégration des données a permis d'estimer la quantité de chlore présent à 0,2% en pourcentage massique (Tableau 9). Le pic de l'azote (N1s) confirme également le greffage du diclofénac. Si la réaction du greffage était totale, on obtiendrait 3 atomes d'azote (2 du DAPEG et 1 du DCF) pour 2 atomes de chlore, ce qui correspond à un rapport Cl/N de 0,67. Le rapport obtenu de 0,25 indique que seule une fraction des fonctions amines du DAPEG a réagi avec le DCF. On observe aussi une diminution de l'intensité de la contribution des NH_3^+ des amines terminales à 403 eV et augmentation de la contribution à 401 eV correspondant à la fonction NH ou NH_2 du fait de la formation des liaisons amides entre le diclofénac et les fonctions amines du PEG en surface.

Tableau 9 : Composition atomique des surfaces de Si planes avant et après immobilisation du diclofénac ¹⁸.

ENERGIE DE LIAISON (EV)	ATTRIBUTION	AIRE DU PIC (%)	
		Si-PEG	Si-PEG+ DCF
533	O 1s	26	26
403	NH ₃ ⁺	0,3	0,1
401	NH, NH ₂	0,5	0,7
290	C 1s	-	0,7
287	C-O, C-N	22	21
286	C-C	15	6,6
274	Cl 2s	-	0,2
104	SiO ₂	6,4	7,8
101	Si 2p 1/2	15	18
100	Si 2p 3/2	15	19

Ces résultats permettent donc de valider le protocole de greffage du DCF qui sera appliqué pour l'ensemble des surfaces planes et nanostructurées utilisées dans la suite pour construire les immunocapteurs.

1.3. Suivi de la reconnaissance par l'anti-DCF par QCM

Après greffage du diclofénac sur les quatre substrats représentés sur la Figure 62, la reconnaissance moléculaire par l'anticorps anti-DCF a été suivie par QCM-D avec quatre modules (E4), permettant l'analyse simultanée des quatre substrats et donc une étude comparative en temps réel.

Les variations de fréquence de résonance et de dissipation sont présentées dans la Figure 64 pour la 5^{ème} harmonique.

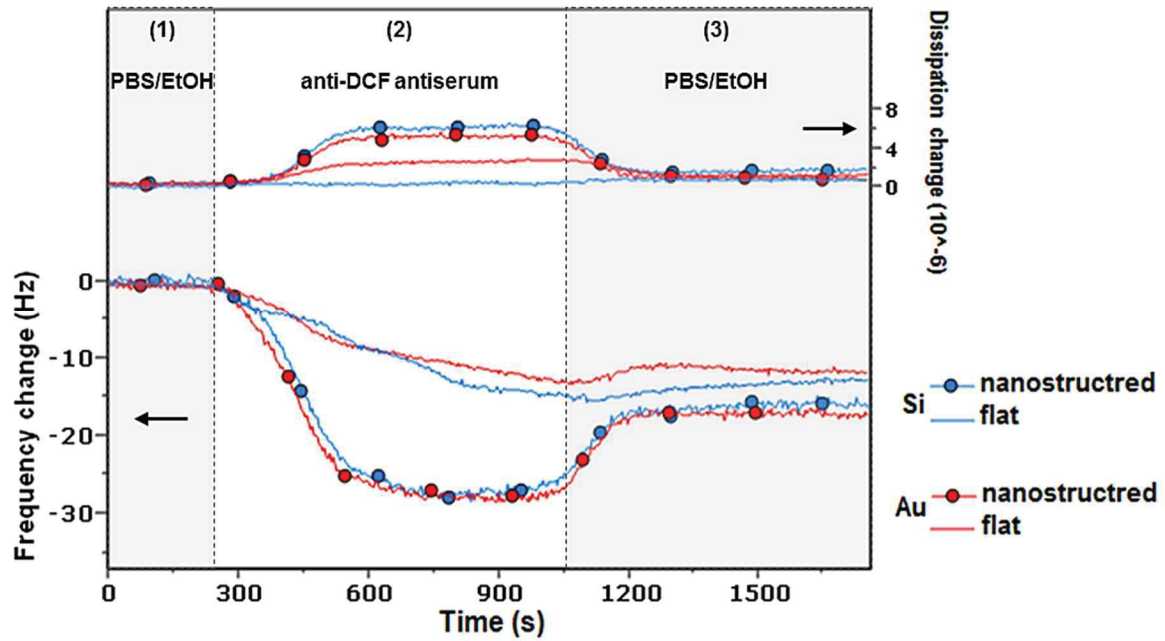


Figure 64 : Variation de la fréquence de résonance normalisée par le numéro de l'harmonique (en bleu) et dissipation (en rouge) pendant la capture d'anticorps sur les quatre immunocapteurs.

Sur les quatre substrats étudiés, l'injection de l'anticorps anti-diclofénac entraîne une diminution progressive de la fréquence de résonance jusqu'à la stabilisation, indiquant la capture d'une quantité définie d'anticorps. Lors du rinçage par le même solvant, (PBS/EtOH (9:1)), la fréquence augmente sans revenir à sa valeur initiale, montrant la désorption d'une partie des anticorps, probablement ceux faiblement liés, à cette étape. La capture des anticorps s'accompagne d'une augmentation de la dissipation ΔD , mais cette variation demeure faible ($\Delta D / \Delta F \ll 4.10^{-7}$) permettant l'application de l'équation de Sauerbrey ¹⁹.

Le Tableau 10 rassemble les variations de fréquence (ΔF) avant et après rinçage pour les quatre substrats ainsi que les augmentations de masse (Δm) et le taux de recouvrement (Γ) obtenus par application de l'équation de Sauerbrey. Les variations de fréquence et de dissipation ont été déterminées mathématiquement sur les parties linéaires des courbes.

Tableau 10 : Données QCM pour la reconnaissance par l'anti-DCF sur les substrats plan et nanostructurés.

	Or		Silicium	
	Plan	Nanostructuré	Plan	Nanostructuré
$-\Delta F_5$ (Hz)	11,8	$17,5 \pm 1$	12,5	$16,5 \pm 0,5$
$\Delta m/A$ (ng/cm ²)	208	310 ± 18	222	293 ± 9
$\Gamma(\text{exp})$ (pmol.cm ⁻²)*	1,4	2,2	1,5	1,9
Augmentation avant rinçage (%)	128		124	
Augmentation après rinçage (%)	48		32	
$-d\Delta F/dt$ (Hz.s ⁻¹)	0,016	0,077	0,019	0,088

* avec MM=150 KDa pour l'anticorps

Pour les deux substrats, or et silicium, la quantité d'anticorps capturés après nanostructuration par les GNPs est clairement supérieure à celle des surfaces planes. Les GNPs ont donc manifestement amélioré l'accessibilité des anticorps aux ligands immobilisés. Avant le lavage avec le tampon, l'augmentation était plus de 120 % pour les deux substrats, c'est-à-dire 6 fois plus grande que sur des surfaces planes. Après le lavage, l'apport des GNPs reste toujours important, 30 et 60 % pour l'or et le silicium, respectivement. Afin de vérifier que cette accessibilité n'est pas le fait d'une adsorption non spécifique des anticorps, la spécificité a été explorée en injectant une solution contenant un anticorps non spécifique au diclofénac (un IgG anti-souris de chèvre) et en suivant les interactions éventuelles par QCM-D (Figure 65).

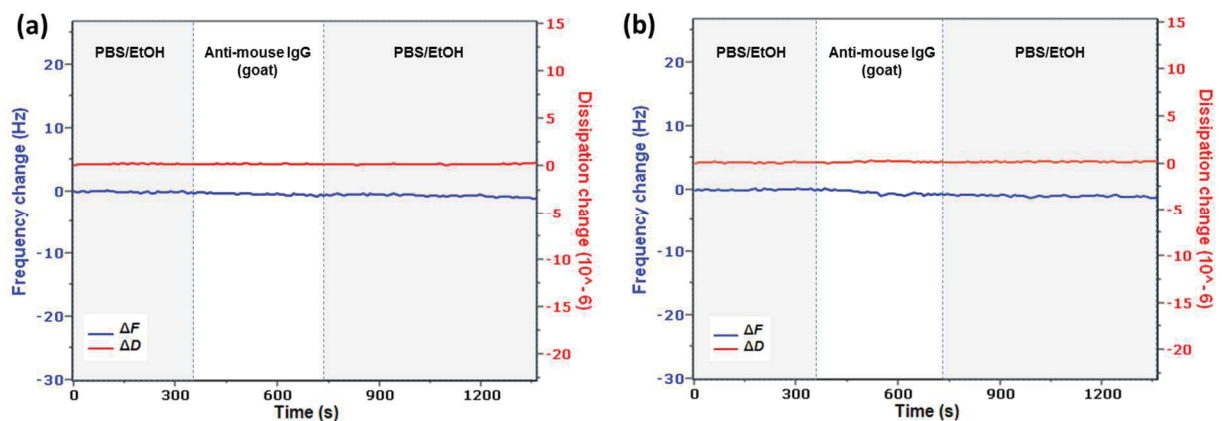


Figure 65 : Test de spécificité sur les surfaces de silicium (a) et d'or (b) nanostructurées.

Les résultats des mesures effectuées montrent que la fréquence de résonance des quartz reste inchangée lors de l'injection de la solution d'anticorps non spécifique ce qui prouve clairement que ces anticorps ne sont pas capturés par les couches fonctionnalisées par le diclofénac. Ce résultat est probablement dû aux molécules de PEG qui empêchent les adsorptions non spécifiques et confirme que les données de la Figure 64 sont le résultat d'une adsorption spécifique sur les analytes.

L'augmentation de la dissipation lors de l'injection de l'anticorps dans le cas des surfaces nanostructurées ($\sim 6 \cdot 10^{-6}$) est caractéristique de la formation d'une couche flexible.

En outre, la vitesse de la variation de la fréquence ($d\Delta F/dt$) est fortement dépendante de la nature de la surface (nanostructurée/plane). Cette différence de cinétique de capture des anticorps peut résulter d'une meilleure accessibilité des sites de reconnaissance à la surface.

La densité surfacique des anticorps calculée après rinçage dans le Tableau 10 représente 90% et 77% d'une monocouche saturée d'anticorps (370 ng/cm^2 pour une orientation verticale ('end on'²⁰) pour les surfaces d'or et de silicium nanostructurées.

L'amélioration de la réponse des immunocapteurs peut être expliquée par des considérations géométriques puisque la nanostructuration augmente la surface spécifique des substrats. Connaissant la densité superficielle des GNPs et leur taille moyenne, l'augmentation de la surface accessible peut être estimée en tenant compte de la surface exposée, qui dépend aussi de l'enfoncement des GNPs dans la couche organique, exposant une aire supplémentaire comprise entre πr^2 et $2\pi r^2$. L'augmentation obtenue est comprise entre 16 et 32% pour les surfaces de Si (pour une densité superficielle de GNPs égale à 1073 particules/ μm^2) et de 13 à 26 % pour le capteur d'or (avec 833 particules/ μm^2). Cette augmentation de la surface est en deçà de l'amélioration observée en QCM et n'en est donc pas l'unique raison. La modification de la topologie de la surface favorise assurément l'accessibilité du diclofénac immobilisé et limite également la gêne stérique entre les anticorps reconnaissant les ligands en surface.

1.4. Régénération stabilité de la couche de nanoparticules

Le terme régénération décrit la dissociation des complexes anticorps / ligand (diclofénac) en surface, permettant ainsi de réutiliser l'immunocapteur pour la reconnaissance par de nouveaux anticorps. Cela se fait par exemple en modifiant fortement le pH. Le protocole de régénération a été optimisé en un premier temps sur les surfaces de silicium planes. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant une solution de 2% SDS, pH = 2 (HCl), 10% EtOH, après l'étape (3) (lavage PBS/EtOH), suivie d'une étape de lavage et re-stabilisation dans PBS/EtOH avant de commencer le cycle suivant.

Le suivi par QCM-D de plusieurs cycles reconnaissance/régénération sur un substrat silicium PEG-ylé est observable sur la Figure 66. Il a été possible de procéder à 10 cycles successifs, en gardant, au moins pour les neuf premières mesures une réponse parfaitement reproductible. A la 10^{ème} mesure, la variation de fréquence était moins importante (< 12 Hz), montrant la limite, très satisfaisante, des cycles de régénération.

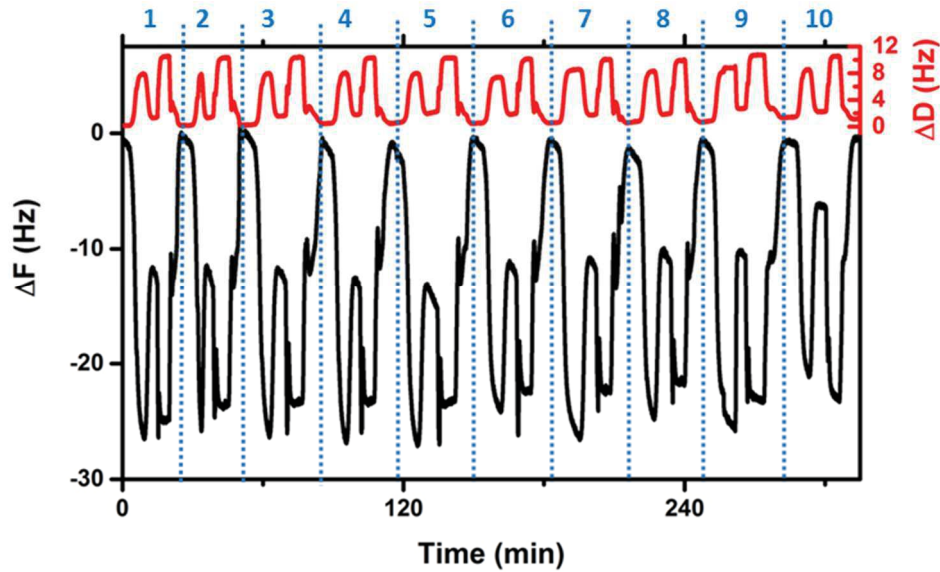


Figure 66 : Variation de fréquence et dissipation durant les 10 cycles de régénération effectués sur le même quartz de silicium (sans GNPs).

Ce protocole a été adopté pour les surfaces nanostructurées. La courbe illustrée dans la Figure 67 montre le suivi par QCM-D d'un cycle reconnaissance/régénération pour une surface de silicium nanostructurée. Comme pour les surfaces planes, l'application de la solution acide+détergent a permis de dissocier les anticorps capturés et de revenir à la fréquence initiale.

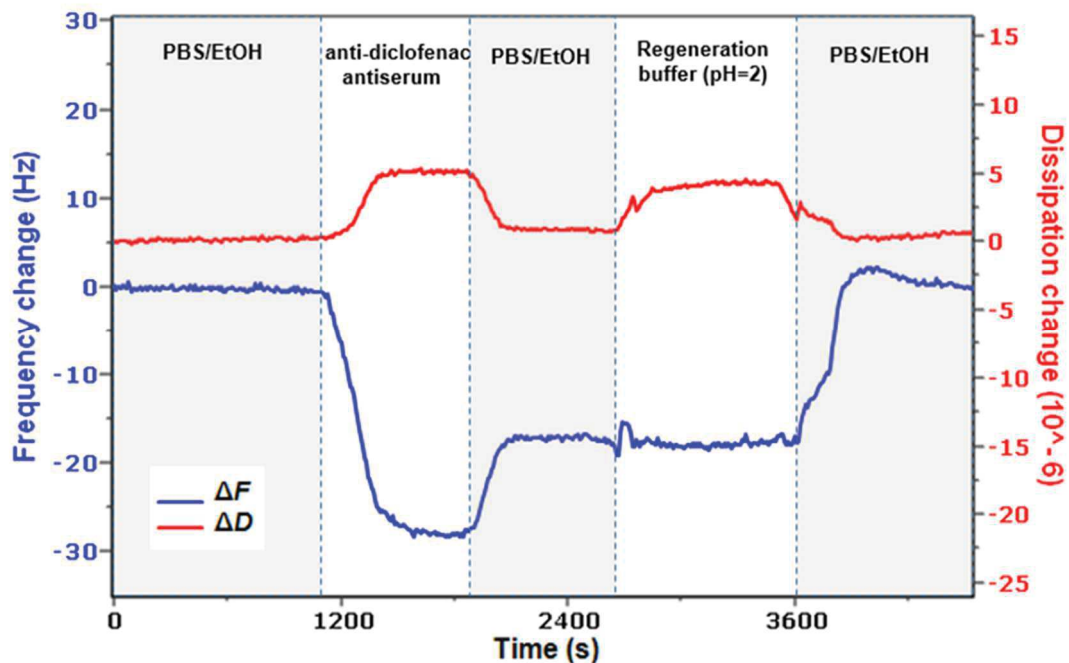


Figure 67 : Protocole de régénération sur une surface d'or nanostructurée.

Ces cycles, particulièrement la reconnaissance et les conditions drastiques de régénération peuvent affecter la qualité de la couche de nanoparticules. Pour étudier ces effets potentiels,

nous avons analysé les couches de GNPs par MEB. Les images obtenues ainsi que leur traitement mathématique sont représentés sur la Figure 68.

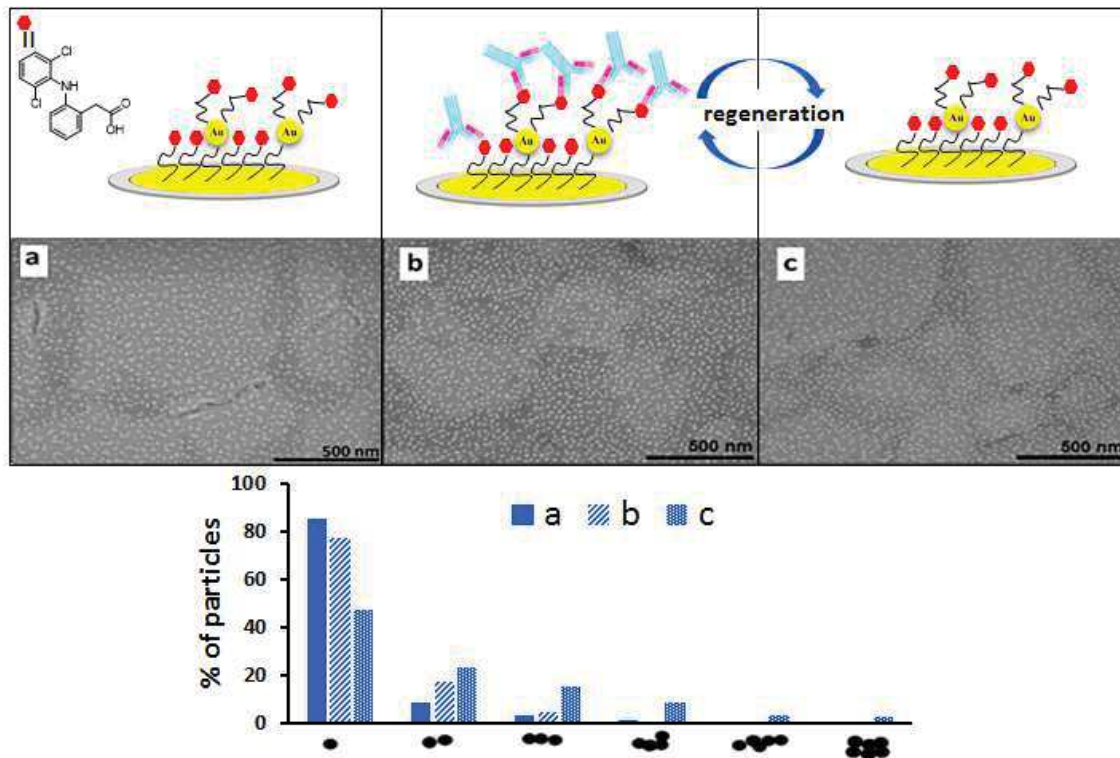


Figure 68 : Schéma d'immuno-reconnaissance réversible sur les surfaces d'or nanostructurées et clichés MEB correspondants avant (a) et après (b) injection de l'anticorps et après régénération (c).

Les résultats obtenus montrent que la couche de GNPs demeure remarquablement stable après reconnaissance et même après la régénération à pH acide. Les histogrammes de distribution indiquent une très légère modification de la distribution des nanoparticules après capture des anticorps anti-diclofénaç, avec une petite augmentation des dimères de particules. Après régénération, les conditions astringentes ont mené à une modification plus perceptible de la dispersion des GNPs, en particulier une diminution des particules isolées en faveur d'amas de deux à quatre particules. Néanmoins, peu d'agrégats de plus que 4 particules ont été formés (ces ensembles représentent moins de 15% des particules). Le processus de régénération affecte donc peu la couche de nanoparticules mais pourrait être davantage optimisé pour limiter son impact sur la dispersion des GNPs.

1.5. Discussion

La comparaison des performances des immunocapteurs classiques (plans) et nanostructurés a permis de mettre en évidence l'apport positif des nanoparticules d'or. Les quantités d'anticorps capturés sur les surfaces nanostructurées sont 6 fois supérieures à celles enregistrées pour les

surfaces sans nanostructuration avant rinçage et entre 32 et 48 % supérieures après le rinçage respectivement pour l'or et le silicium. L'absence de capture d'anticorps non dirigé contre le DCF nous a permis de vérifier la spécificité de l'interaction probablement du fait de l'action répulsive des PEG en surface. Cette amplification résulte assurément en partie de l'accroissement de la surface spécifique mais également d'une meilleure accessibilité des ligands et d'une moindre gêne stérique entre les anticorps capturés du fait de la modification de la topologie de la surface par la présence des nanobilles d'or.

Néanmoins, ces conclusions sont établies avec l'hypothèse que la concentration surfacique de diclofénac est identique sur les surfaces nanostructurées et planes, ce qui est une approximation vu que la surface spécifique est plus grande en présence des GNPs. La détermination avec exactitude de la concentration surfacique de diclofénac sur les surfaces nanostructurées n'a pas pu être réalisée du fait de la très faible densité superficielle. Une analyse XPS est envisagée pour compléter ce travail, mais la présence des nanoparticules peut interférer dans la quantification des mesures. Il n'en demeure pas moins que, même si l'amélioration a eu lieu dès l'immobilisation du DCF, elle est importante et perceptible.

Par ailleurs, les surfaces nanostructurées sur un substrat silicium ou or ont donné des réponses très proches en QCM. La quantité d'anticorps anti-diclofénac capturée par les ligands diffère peu malgré une différence dans la densité totale de nanoparticules supérieure d'environ 20% pour le silicium. Ceci suggère que l'augmentation de la surface spécifique n'est pas au cœur de l'amélioration des performances des immunocapteurs nanostructurés et abonde vers un apport plus important conféré par la nouvelle topologie et l'accessibilité accrue des cibles. Ce résultat montre ainsi, qu'à ce stade, l'influence du substrat est minime, et permet d'envisager une généralisation de cette chimie de surface à d'autres substrats en escomptant des résultats identiques.

Enfin la régénération de l'immunocapteur a été réalisée *in situ*, et malgré les conditions drastiques utilisées, la couche de nanoparticules a été peu altérée permettant de vérifier la possibilité de réutiliser l'immunocapteur et de valider les travaux effectués au chapitre 3 pour construire une couche stable et fiable de nanoparticules.

Partie 2

Immunocapteur pour la détection de la SEA

L'objectif de cette partie est la construction d'immunocapteurs piézoélectriques sur des surfaces nanostructurées pour détecter la SEA. Les résultats des immunocapteurs nanostructurés et classiques sur or et silicium seront comparés afin d'étudier l'apport des nanoparticules.

2.1. Présentation des étapes d'élaboration de l'immunocapteur

L'évaluation de l'apport éventuel de la nanostructuration par des GNPs sur les performances d'un immunocapteur opérant au format direct, nécessite un contrôle et une maîtrise des différentes étapes de préparation. Nous sommes donc parties d'un système bien maîtrisé au laboratoire, l'immunocapteur piézoélectrique pour la détection de SEA. Des travaux précédents¹⁷ ont en effet permis d'établir les conditions optimales pour l'élaboration d'un immunocapteur de SEA sur une surface plane, opérant au format direct. Différents paramètres ont été explorés : la nature de l'anticorps de capture, le mode de liaison à la surface et la présence ou non d'une protéine de liaison²¹. La comparaison de quatre anticorps anti-SEA différents, (deux monoclonaux et deux polyclonaux, un produit chez le lapin et trois de souris) a permis de sélectionner le plus efficace en termes de détection de la SEA, il s'agit de l'anticorps polyclonal de lapin (anti-SEA_{TT})²². Cet anticorps sera choisi comme anticorps de capture dans ce qui suit. La comparaison de plusieurs stratégies d'immobilisation a permis de définir la configuration la plus efficace, en termes de quantité d'anticorps immobilisés et d'efficacité de ces anticorps dans la reconnaissance de la SEA.

Dans cette configuration, illustrée à la Figure 69, l'anti-SEA_{TT} est immobilisé par bioaffinité *via* une protéine de liaison, la protéine A qui est préalablement greffée sur une SAM amine par un cross-linker, le 1,4-phenylene diisothiocyanate (PDITC)¹⁷. Par ailleurs, afin de prévenir les adsorptions non spécifiques les sites éventuellement vacants sur la surface sont saturés par adsorption de la BSA (albumine de sérum bovin). Cette protéine présente une forte affinité pour diverses surfaces mais ne s'adsorbe pas sur les anticorps.

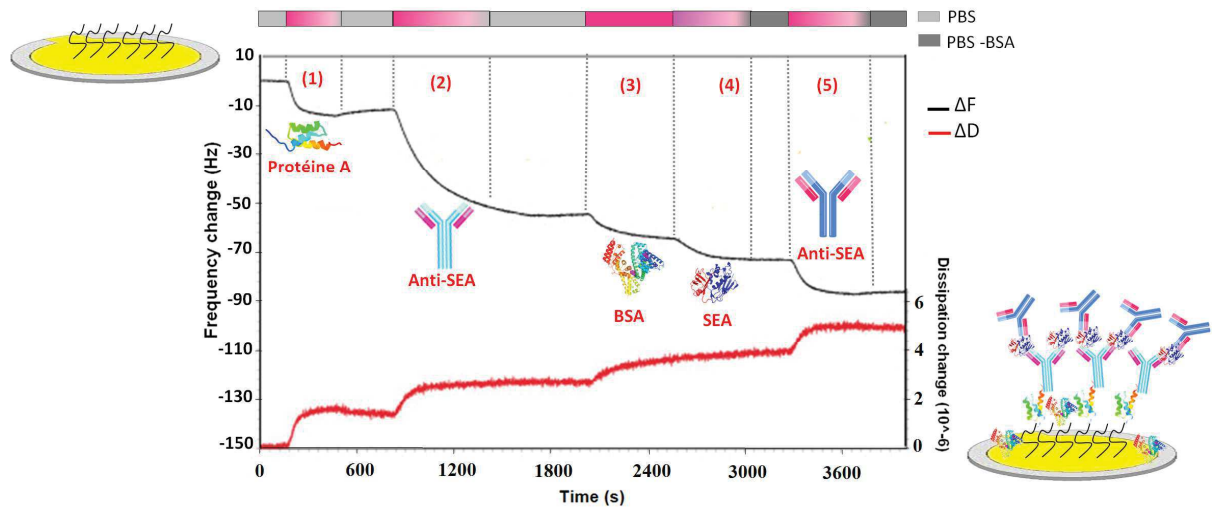


Figure 69 : Sensogramme obtenu lors de la construction d'un immunocapteur plan anti-SEA, de la détection de l'entérotoxine cible (970 ng/mL) et de l'amplification en format "sandwich". Les illustrations schématisent les différentes étapes ²².

Ces conditions ont permis de construire un immunocapteur piézoélectrique avec une limite de détection de 20 ng.mL^{-1} et un temps d'analyse de 15 min. La sensibilité a été améliorée en amplifiant le signal par ajout d'un deuxième anticorps (anticorps de révélation) formant un « sandwich » avec le premier autour de la toxine, comme montré sur la Figure 69. Dans ce format sandwich, la limite de détection était de 7 ng.mL^{-1} pour un temps d'analyse total de 25 min dans un milieu modèle.

Dans cette partie, ces conditions serviront de base pour la construction d'immunocapteurs nanostructurés. Dans ce qui suit sont présentés les résultats obtenus lors de l'optimisation de la première étape, l'immobilisation de la protéine A, sur les surfaces nanostructurées.

2.2. Immobilisation de la protéine A

L'immobilisation de l'anticorps de capture par bio-affinité présente l'avantage d'espacer les anticorps de la surface et de contrôler leur orientation sur le support. L'anticorps de capture sélectionné (anti-SEA_{TT}) est produit chez le lapin, la protéine A (PrA) qui reconnaît le fragment constant de cette famille d'IgG est bien adaptée (paragraphe 1.5.2. du chapitre 1).

Les surfaces précédemment sélectionnées (planes et nanostructurées) sont terminées par des fonctions amines. Ces fonctions sont dérivées en utilisant le 1,4-phenylene diisothiocyanate (PDITC). Ce « cross-linker » homobifonctionnel possède deux groupes isothiocyanate pouvant réagir avec les fonctions NH_2 de la protéine et de la surface comme illustré sur la Figure 70. De plus, son noyau aromatique lui confère une rigidité qui permet d'éviter les pontages et

d'augmenter la quantité de groupements isothiocyanates disponibles pour greffer la protéine A via ses résidus amines.

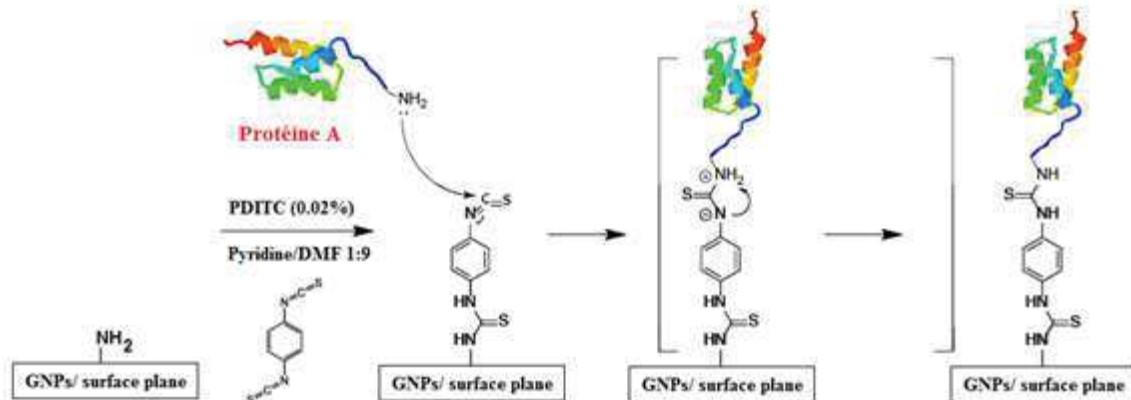


Figure 70: Mécanisme d'immobilisation de la protéine A sur des surfaces amine activées par PDITC.

L'immobilisation de la protéine A sur les surfaces planes et nanostructurées a été suivie par QCM, le protocole expérimental est détaillé chapitre 2. Dans le Tableau 11 sont regroupées les variations de fréquence (ΔF) ainsi que les augmentations de masse (Δm) et le taux de recouvrement (Γ) obtenus par application de l'équation de Sauerbrey.

Tableau 11 : Résultats QCM après injection de la protéine A sur les différentes surfaces testées.

Surfaces	20 mg/L Protéine A			
	$-\Delta F_5$ (Hz)	ΔD_5 (10^{-6})	Δm (ng/cm ²)	Γ (pmol/cm ²)*
Si-PEG	0	0	0	0
Au-PEG	0	0	0	0
Si-PEG-GNPs-PEG	0,6	0,1	11	0,2
Au-PEG-GNPs-PEG	1,7	0,3	30	0,7
Au-PEG-GNPs-CEA	1	0,2	18	0,4
Si-NH ₂ /SH-GNPs	1	0,1	18	0,4
Au-NH ₂ **	$6,9 \pm 2,7$ (n=16)	1,5	122 ± 47	$2,7 \pm 1$
Si-NH ₂	$7,0 \pm 1,3$ (n=2)	$0,3 \pm 0,1$	124 ± 23	$2,7 \pm 0,5$
Au-NH ₂ /SH-GNPs-CEA	$7,0 \pm 1,2$ (n=17)	$0,5 \pm 0,1$	124 ± 21	$2,7 \pm 0,5$
Si-NH ₂ /SH-GNPs-CEA	$9,4 \pm 2,2$ (n=8)	$0,9 \pm 0,2$	166 ± 39	$3,7 \pm 0,8$

*avec MM=44,6 KDa pour la Protéine A, **²²

En un premier temps, comme pour la partie précédente, les surfaces ayant les densités et dispersions optimales en GNPs ont été envisagées, à savoir Si-PEG-GNPs-PEG et Au-PEG-GNPs-PEG. Malgré l'utilisation du PDITC, très peu de molécules de protéine A se sont greffées sur la surface comme en témoignent les faibles variations de fréquence enregistrées, 0,6 et 1,7 Hz pour le silicium et l'or, respectivement. Ces faibles quantités sont fort probablement le résultat des propriétés répulsives des PEG pour les protéines, hypothèse que corrobore l'absence totale d'adsorption de la protéine A sur les surfaces planes Au et Si terminées par des PEG. Cet effet serait dû à une forte interaction entre les molécules d'eau piégées dans la couche

de PEG qui entraîne un gonflement de la longue chaîne carbonée et la création d'une sphère de solvation inaccessible aux protéines²³. Nous avons donc opté, en un second temps, pour les surfaces nanostructurées pour lesquelles la post-fonctionnalisation a été réalisée avec la CEA et non le PEG en espérant que la présence de PEG dans la couche d'accroche ne limite pas le greffage de la protéine A. Mais dans ce cas également, le greffage des protéines A n'a pas été possible (voir Tableau 11), montrant que même lorsqu'ils sont utilisés pour la couche d'accroche des GNPs, les PEG continuent d'exercer un effet répulsif important vis-à-vis des protéines. Nous sommes donc arrivés à la conclusion que ces surfaces ne sont pas adaptées pour la construction d'immunocapteurs directs.

D'autre part, la faible variation de fréquence pour la surface Si-NH₂/SH-GNPs prouve la nécessité de post-fonctionnaliser les GNPs afin d'accrocher la PrA.

Notre choix s'est donc porté sur les surfaces nanostructurées construites sans PEG pour lesquelles la densité et la dispersion des nanoparticules étaient optimales, à savoir celles déposées sur les SAMs NH₂/SH (APTES-MUA pour le silicium et CEA-MUA pour l'or, voir diagramme bilan de la partie 3 du chapitre 3) avec une post-fonctionnalisation CEA (Figure 71-b). En se basant sur ce diagramme et afin d'avoir un juste équilibre entre la dispersion et la densité des GNPs, le dépôt des GNPs a été effectuée sous flux pour les surfaces de silicium et sous agitation pour les surfaces d'or. Ces surfaces ont été comparées à des surfaces planes équivalentes terminées par des fonctions amines (APTES pour le Si et CEA pour l'or (Figure 71-a)).

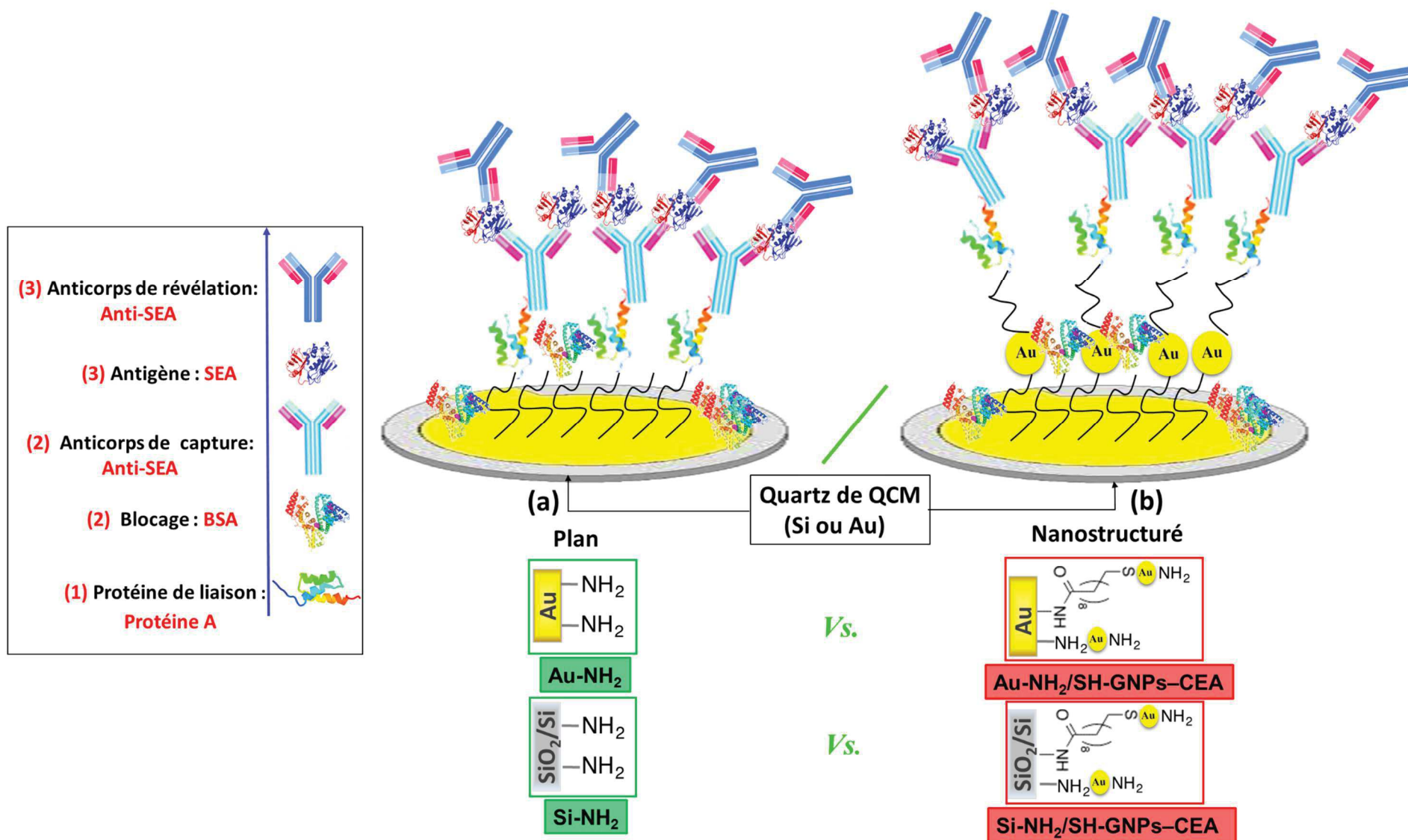


Figure 71 : Schéma récapitulatif de la construction d'un immunocapteur piézoélectrique de SEA sur les surfaces (a) planes et (b) nanostructurées.

En comparant les valeurs obtenues pour les surfaces planes à celles des surfaces nanostructurées, on constate de faibles différences dans la quantité de PrA greffée pour les surfaces d'or alors que pour le silicium on obtient une augmentation de 1,4 fois par rapport à la quantité obtenue sur les deux immunocapteurs classiques (plan). Cette singularité pour le silicium est probablement due à la différence de dispersion de GNPs avec les surfaces d'or (voir diagramme bilan partie 3 du chapitre 3). Les faibles variations observées lors de l'adsorption de PrA sur les différents substrats peuvent résulter du fait que l'augmentation de la surface spécifique localisée autour des nanoparticules ne permet pas aux protéines A, de taille nanométrique, d'en bénéficier. Les recouvrements équivalents obtenus suggèrent que la quantité maximale adsorbée est davantage dépendante de la protéine et des répulsions entre protéines que de la nature de la sous-couche.

Les résultats obtenus pour les surfaces planes sont quasiment les mêmes montrant une reproductibilité des mesures dans le temps et une efficacité de l'étape d'activation quelle que soit la nature du substrat et la molécule réactive en surface.

2.3. Immobilisation de l'anticorps anti-SEA

L'anticorps de capture anti-SEA_{TT} a été immobilisé par bioaffinité sur la PrA dans un tampon PBS (protocole expérimental détaillé au chapitre 2). Cette étape a également été suivie par QCM. Le Tableau 12 regroupe les variations de fréquence résultant de l'immobilisation de l'anticorps anti-SEA sur les surfaces planes et nanostructurées. Pour les masses calculées Δm , il faut garder à l'esprit que l'eau hydrodynamiquement piégée dans le film n'est pas prise en compte dans ce calcul. Ceci peut expliquer pourquoi la densité d'anticorps calculée est le double d'une monocouche saturée d'anticorps (370 ng/cm^2). Au vu des valeurs comparables de dissipation, ceci n'empêche pas la validité de la comparaison relative des données QCM obtenues pour l'adsorption d'anticorps sur les différentes surfaces.

Tableau 12 : Résultats QCM après injection de l'anti-SEA.

Surfaces	10 mg/L anti-SEA _{TT}				Anti – SEA PrA
	- ΔF_5 (Hz)	ΔD_5 (10^{-6})	Δm (ng/cm ²)	Γ (pmol/cm ²)*	
Au-NH ₂ **	33,0 ± 6,0	1,0 ± 0,2	584 ± 106	3,9 ± 0,7	1,45
Si-NH ₂	33,7 ± 1,0	1,4 ± 0,3	596 ± 18	4,0 ± 0,1	1,5
Au-NH ₂ /SH-GNPs-CEA	33,9 ± 5,9	1,3 ± 0,1	600 ± 104	4,0 ± 0,7	1,5
Si-NH ₂ /SH-GNPs-CEA	32,6 ± 1,8	1,3 ± 0,1	577 ± 32	3,8 ± 0,2	1,0

*avec MM=150 kDa pour l'anti-SEA, **²²

Le Tableau 12 ne montre aucune différence significative dans les quantités d'anticorps de capture immobilisés sur les surfaces nanostructurées en comparaison des surfaces planes. Les surfaces de silicium nanostructurées pour lesquelles la quantité de protéine A fixée est plus grande donnent également le même recouvrement en anticorps. Ceci se traduit par un rapport anti-SEA/PrA constant dans le cas de des surfaces d'or et légèrement en baisse pour le silicium nanostructuré. Ce faible rapport observé pour les surfaces de silicium nanostructurées, est probablement dû à un encombrement stérique qui limiterait l'accessibilité des sites de reconnaissance des PrA adsorbées aux anticorps.

A ce stade, la densité de récepteurs est quasiment la même pour l'ensemble des substrats étudiés (plans et nanostructurés). Cette donnée va permettre une comparaison quantitative des réponses des biocapteurs dans ce qui suit et une estimation fiable de l'apport de la topologie pseudo-tridimensionnelle induite par les nanoparticules d'or.

2.4. Réponse des biocapteurs

Comme mentionné ci-dessus, deux formats de détection seront explorés, un format direct et un format sandwich amplifié (cf. Figure 71).

2.4.1. Détection en format direct

Les tests de détection de la SEA ont été réalisés dans la gamme de concentration 9,7 à 970 ng/mL. Le changement de fréquence ΔF entre le début d'injection et la fin du lavage a été mesuré pour les quatre surfaces. Les valeurs de (ΔF) correspondant à l'étape d'injection de SEA à une concentration de 485 ng/mL sont regroupées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Résultats QCM après injection de SEA à 485 ng/mL dans PBS-BSA sur les surfaces planes (a) et nanostructurées (b).

Surfaces	485 ng/mL SEA				
	$-\Delta F_5$ (Hz)	ΔD_5 (10^{-6})	Δm (ng/cm ²)	Γ (pmol/cm ²)*	$\frac{\text{SEA}}{\text{Anti - SEA}}$
Au-NH ₂ **	6,2	0,7	110	3,9	1
Si-NH ₂	5,3	0,5	94	3,4	0,8
Au-NH ₂ /SH-GNPs-CEA	8,2 ± 0,5	0,6 ± 0,1	145 ± 9	5,2 ± 0,3	1,3
Si-NH ₂ /SH-GNPs-CEA	8,3 ± 0,9	1,1 ± 0,2	147 ± 16	5,2 ± 0,6	1,4

*avec MM=150 kDa pour l'anti-SEA et 28 kDa pour la SEA,**22

La réponse à la SEA est plus grande dans le cas des surfaces nanostructurées et en particulier les surfaces de silicium avec une quantité de SEA 1,5 fois plus élevée après nanostructuration de la surface.

Dans l'ensemble, bien que la quantité de sites de liaison d'anticorps soit la même pour toutes les configurations, la réponse de l'immunocapteur à l'analyte exprimée par le rapport (SEA/anti-SEA) a été améliorée dans le cas des surfaces nanostructurées comparées aux surfaces planes. On a une augmentation de 32 % et 56 % du nombre de sites occupés par la SEA après nanostructuration des surfaces d'or et de silicium respectivement.

Une courbe dose-réponse est établie en traçant (ΔF) en fonction de la concentration de SEA (Figure 72) afin de déterminer la limite de détection (LOD) pour les surfaces nanostructurées.

Les données expérimentales ont été modélisées selon le modèle de Langmuir (décrit en annexe 1-3) en considérant que les sites de liaison superficiels sont indépendants et équivalents :

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \times [\text{SEA}] / ([\text{SEA}] + K), \text{ avec } K \text{ la constante apparente de dissociation.}$$

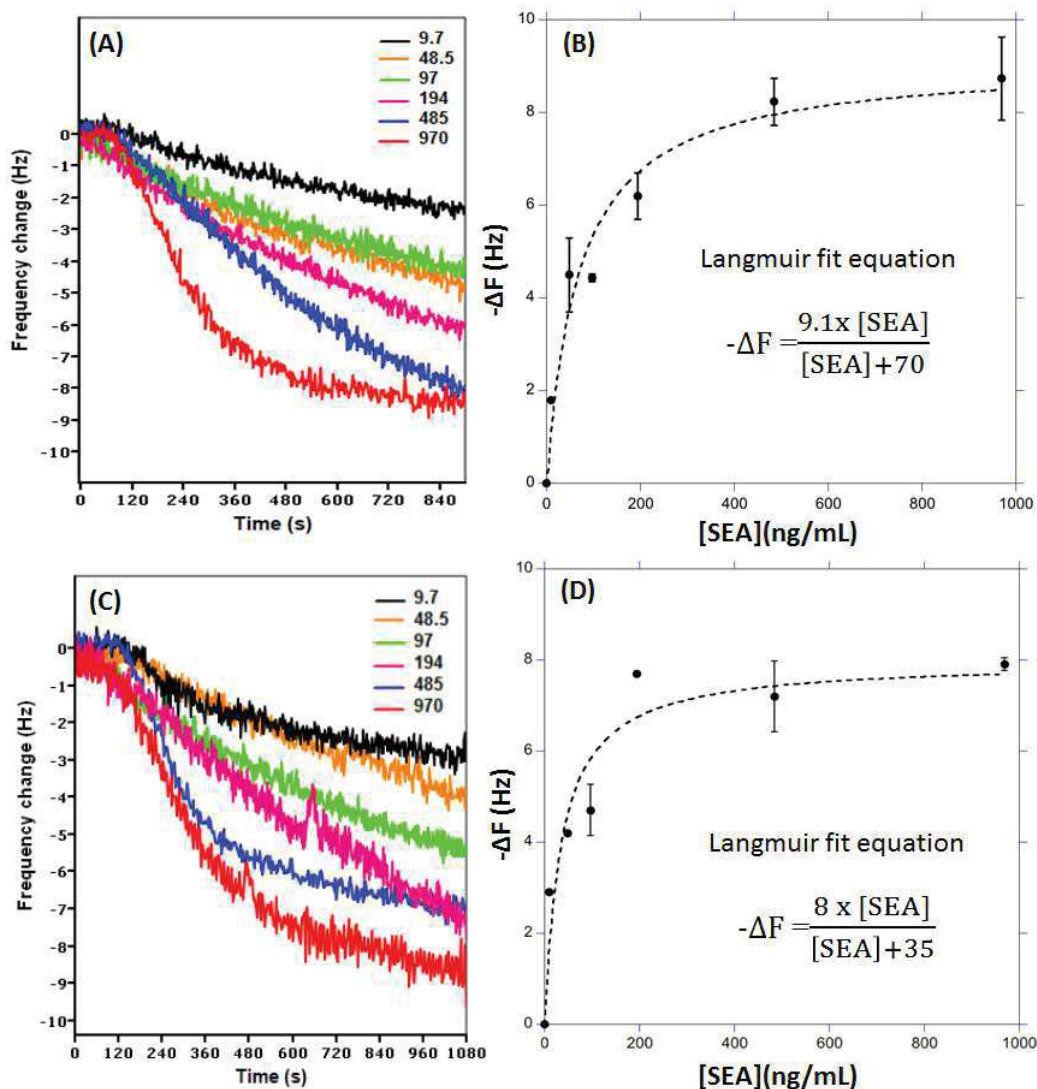


Figure 72 : Détection de la SEA à différentes concentrations par QCM sur les immunocapteurs d'or (A) et de silicium (C) nanostructurés ainsi que les courbes et les équations obtenues selon le modèle de Langmuir (B et D respectivement).

Les courbes de la Figure 72 montrent une corrélation entre la concentration de SEA injectée et la variation de la fréquence ΔF . Les immunocapteurs nanostructurés s'avèrent ainsi efficaces pour détecter la SEA dans une gamme de concentration entre 0,05 et 0,5 mg/L avec un temps d'analyse de 15-20 min (temps d'injection + lavage). Au-dessus d'une concentration de SEA de 0,5 mg/L, la fréquence ne varie pratiquement plus suite à la saturation du biocapteur. La limite de détection a été calculée sur la base d'une réponse $\Delta F = -1$ Hz, elle est égale à 8 et 5 ng/mL pour l'or et le silicium respectivement (Tableau 14). Cette LOD est clairement améliorée en comparaison aux données obtenues sur des surfaces planes pour lesquelles elle était de 20 ng.mL⁻¹.

2.4.2. Amplification par le format sandwich

Le même anticorps anti-SEA_{TT} a été utilisé pour amplifier la réponse du biocapteur comme schématisé sur la Figure 71. Le changement de fréquence cumulé entre le début d'injection de la SEA et la fin du deuxième lavage a été mesuré pour chaque concentration de SEA pour les surfaces de silicium nanostructurées (voir la Figure 73).

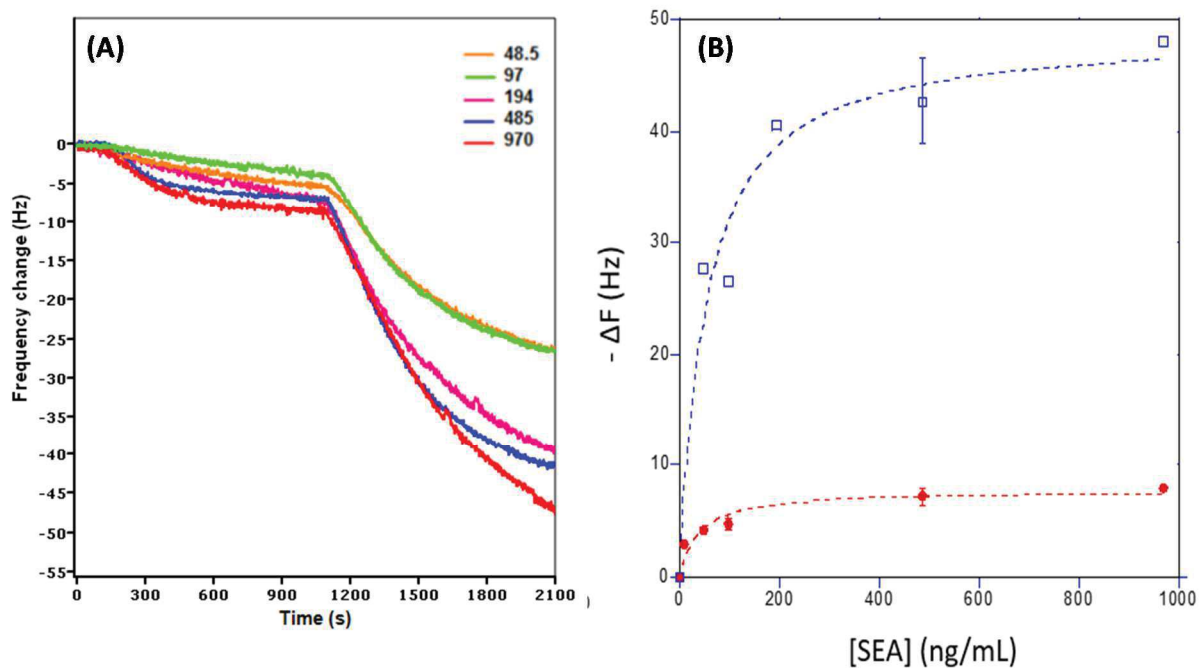


Figure 73 : Réponse de l'immunocapteur nanostructuré de silicium après injection de la SEA à différentes concentrations suivie de l'anticorps de révélation (anti-SEA_{TT} à 10 mg/L). ΔF en fonction de la concentration de la SEA en format direct (\bullet) ($-\Delta F = 8 \times [SEA]/([SEA] + 35)$, $r = 0.96$) et sandwich (\square) ($-\Delta F = 49 \times [SEA]/([SEA] + 51)$, $r = 0.982$)

La Figure 73-A montre que l'anticorps vient se fixer également sur la SEA et entraîne une diminution de la fréquence de résonance plus importante que celle obtenue pour la SEA. Ceci est dû à la masse molaire de l'anticorps (150 kDa) qui est 5 fois plus grande que celle de la cible (28 kDa). La courbe ΔF

en fonction de la concentration de la SEA montre que la réponse de l'anticorps de révélation est proportionnelle à la concentration de la SEA en surface. Ceci permet d'avoir des variations de fréquence plus grandes et d'amplifier la réponse du biocapteur.

Le Tableau 14 récapitule les paramètres des courbes de calibrage obtenues représentées dans les Figure 72Figure 73. Bien que la réponse maximale à la SEA soit toujours la même (autour de -9 Hz), la valeur de K est inférieure dans le cas des biocapteurs nanostructurés au format direct.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des paramètres calculés à partir des courbes $\Delta F=f([SEA])$ pour les surfaces d'or et de silicium planes et nanostructurées.

Configuration de l'immunocapteur	$-\Delta F_{\max}(\text{Hz})$	K(ng/mL)	R	LOD (ng/mL)*
Au-NH₂, format direct **	9,8 ± 0,6	183 ± 37	0,991	20,8 ± 4,2
Au-NH₂/SH-GNPs-CEA, format direct	9,1 ± 0,7	70 ± 19	0,982	8,6 ± 2,3
Si-NH₂/SH-GNPs-CEA, format direct	8,0 ± 0,7	35 ± 15	0,961	5 ± 2,1
Si-NH₂/SH-GNPs-CEA, format sandwich	49 ± 4	51 ± 16	0,982	1,1 ± 0,3

**22 ; * calculée pour $\Delta F = -1$ Hz

Dans le format sandwich amplifié, la réponse est à peu près 5 fois plus élevée que dans le format direct et par conséquent la concentration mesurable la plus basse atteinte est de 1 ng/mL pour un temps d'essai total de 35 min.

2.5. Discussion

Des quartz de silicium et d'or ont été décorés de nanoparticules d'or afin d'augmenter leur surface spécifique et d'améliorer la sensibilité d'un biocapteur existant pour la SEA.

Les premiers essais sur les surfaces PEG-ylées ayant la densité et la dispersion optimales en GNPs, ont montré que la présence du PEG inhibe l'adsorption de protéines et fait que ces surfaces ne sont pas adaptées pour la construction d'immunocapteurs pour lesquels le biorécepteur est une protéine.

Ainsi, une interface de détection comprenant l'anticorps anti-SEA immobilisé par affinité à la protéine A a été développée sur les surfaces NH₂/SH nanostructurées et les surfaces résultantes ont été utilisées comme immunocapteurs piézoélectriques pour quantifier la SEA dans un milieu tampon. Bien que le nombre de sites de liaison déterminé en QCM soit le même pour les surfaces planes et nanostructurées, la détection de la SEA a été significativement améliorée avec les capteurs nanostructurés. Une explication possible de cette amélioration pourrait être une meilleure bioactivité de l'anticorps quand il est lié aux nanoparticules et / ou une meilleure accessibilité des sites de reconnaissance pour l'antigène.

L'amplification de la réponse du biocapteur a été réalisée en appliquant l'anticorps anti-SEA polyclonal après l'étape de capture d'analyte qui a permis de diminuer le LOD à 1 ng/mL.

La régénération des biocapteurs plans a été auparavant prouvée. Dès lors, le même protocole devait fonctionner étant donné que la couche de GNPs a montré une bonne résistance lors de la régénération du biocapteur de diclofénac.

L'immunocapteur piézoélectrique existant a permis la détection directe de la SEA dans des échantillons de lait avec le compromis limité sur la sensibilité d'essai mais sans le besoin d'une étape d'extraction¹⁷. Les immunocapteurs nanostructurés pourraient donc être un moyen d'amélioration de cette sensibilité. Des tests en QCM-D devront être réalisés en utilisant des surfaces de silicium nanostructurées avec une détection amplifiée par le format sandwich.

Conclusion

Les surfaces d'or et de silicium nanostructurées par des GNPs dans le chapitre précédent ont été utilisées comme plateformes pour la détection d'une cible de faible poids moléculaire, le diclofénac et d'une cible protéique, la SEA.

Bien que les surfaces nanostructurées PEG aient été utilisées avec succès pour la construction d'un biocapteur indirect pour le diclofénac, il n'a pas été possible de les appliquer à la construction d'un immunocapteur direct pour la SEA. La différence principale réside dans le fait que dans le format direct, les protéines sont immobilisées sur le substrat contrairement au format indirect où les cibles le sont. Les propriétés répulsives des PEG ont donc été un frein à l'utilisation de ces couches pour les immunocapteurs directs et nous avons utilisé les couches alkyles pour la SEA.

L'augmentation de la surface et l'amélioration de l'accessibilité ont été constatées sur les surfaces nanostructurées pour chacune des cibles. La corrélation des résultats obtenus aux les recouvrements (densité et dispersion) respectifs de particules sur les surfaces utilisées a montré l'importance de l'accessibilité des récepteurs/ligands sur les systèmes. Ainsi, malgré la petite taille des nanoparticules (13 nm), l'effet stérique est important puisque résultant à la fois d'une augmentation de la surface et d'une organisation et orientation favorable à la multiplication des récepteurs/ligands. Ceci est probablement aussi combiné à une plus grande flexibilité de la couche offerte par la nanostructuration.

Donc, l'utilisation des GNPs fournit une plateforme universelle, à adapter à la nature des molécules greffées, pour améliorer la détection de petites molécules et de protéines, de façon sensible et efficace.

Ces analytes modèles peuvent être remplacés par d'autres haptènes ou antigènes et, les expériences en QCM-D montrent que la chimie de surface peut être utilisée pour une détection avec ou sans marquage. Donc, ces constructions peuvent être utilisées comme plateformes universelles pour différentes tailles d'analytes.

Notons également que ces biocapteurs sont dotés de critères qui remplissent bien le cahier de charge d'un biocapteur performant à savoir :

- ✓ leur sélectivité grâce aux anticorps choisis et judicieusement immobilisés avec une reconnaissance optimisée grâce à la nanostructuration de la surface ;
- ✓ une ultra-sensibilité par amélioration de l'accessibilité des récepteurs tout en conservant leurs bioactivité ;

- ✓ leur capacité de régénération par la fixation réversible moyennant des traitements qui n'altèrent pas la couche de nanoparticules ;
- ✓ une rapidité d'analyse avec un temps de mesure qui ne dépasse pas les 35 min ;
- ✓ la miniaturisation avec des supports universels que sont l'or et le silicium qui sont aussi compatibles avec d'autres techniques de transduction.

Références bibliographiques

1. (a) Halling-Sorensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lutzhoft, H. C.; Jorgensen, S. E., Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review. *Chemosphere* **1998**, *36* (2), 357-93; (b) Ternes, T., Pharmaceuticals and Metabolites as Contaminants of the Aquatic Environment. In *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*, American Chemical Society: 2001; Vol. 791, pp 39-54; (c) Richardson, S. D.; Ternes, T. A., Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (6), 2813-2848; (d) Mompelat, S.; Le Bot, B.; Thomas, O., Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* **2009**, *35* (5), 803-814; (e) Kumar, A.; Xagorarakis, I., Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S. surface and finished drinking waters: A proposed ranking system. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408* (23), 5972-5989; (f) Rodriguez-Mozaz, S.; Weinberg, H. S., Meeting report: pharmaceuticals in water-an interdisciplinary approach to a public health challenge. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118* (7), 1016-20.
2. (a) Oaks, J. L.; Gilbert, M.; Virani, M. Z.; Watson, R. T.; Meteyer, C. U.; Rideout, B. A.; Shivaprasad, H. L.; Ahmed, S.; Chaudhry, M. J.; Arshad, M.; Mahmood, S.; Ali, A.; Khan, A. A., Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* **2004**, *427* (6975), 630-3; (b) Naidoo, V.; Wolter, K.; Cromarty, D.; Diekmann, M.; Duncan, N.; Meharg, A. A.; Taggart, M. A.; Venter, L.; Cuthbert, R., Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs to Gyps vultures: a new threat from ketoprofen. *Biol. Lett.* **2010**, *6* (3), 339-341.
3. Reemtsma, T.; Weiss, S.; Mueller, J.; Petrovic, M.; González, S.; Barcelo, D.; Ventura, F.; Knepper, T. P., Polar Pollutants Entry into the Water Cycle by Municipal Wastewater: A European Perspective. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (17), 5451-5458.
4. (a) Knopp, D.; Deng, A.; Letzel, M.; Taggart, M.; Himmelsbach, M.; Zhu, Q.-Z.; Peröbner, I.; Kudlak, B.; Frey, S.; Sengl, M.; Buchberger, W.; Hutchinson, C.; Cunningham, A.; Pain, D.; Cuthbert, R.; Raab, A.; Meharg, A.; Swan, G.; Jhala, Y.; Prakash, V.; Rahmani, A.; Quevedo, M.; Niessner, R., Immunological Determination of the Pharmaceutical Diclofenac in Environmental and Biological Samples. In *Rational Environmental Management of Agrochemicals*, American Chemical Society: 2007; Vol. 966, pp 203-226; (b) Saini, M.; Taggart, M. A.; Knopp, D.; Upreti, S.; Swarup, D.; Das, A.; Gupta, P. K.; Niessner, R.; Prakash, V.; Mateo, R.; Cuthbert, R. J., Detecting diclofenac in livestock carcasses in India with an ELISA: a tool to prevent widespread vulture poisoning. *Environ. Pollut.* **2012**, *160* (1), 11-6.
5. (a) Zhou, Z.; Jiang, J.-Q., Simultaneous Detection of Sulfamethoxazole, Diclofenac, Carbamazepine, and Bezafibrate by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *J. Appl. Spectrosc.* **2014**, *81* (2), 273-278; (b) Richards, N. L.; Cook, G.; Simpson, V.; Hall, S.; Harrison, N.; Scott, K. S., Qualitative detection of the NSAIDs diclofenac and ibuprofen in the hair of Eurasian otters (*Lutra lutra*) occupying UK waterways with GC-MS. *European Journal of Wildlife Research* **2011**, *57* (5), 1107-1114.
6. Tschmelak, J.; Proll, G.; Gauglitz, G., Improved strategy for biosensor-based monitoring of water bodies with diverse organic carbon levels. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (6), 979-983.
7. (a) Fang, S.; Zhang, B.; Ren, K. W.; Cao, M. M.; Shi, H. Y.; Wang, M. H., Development of a sensitive Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA) based on the monoclonal antibody for the detection of the imidacloprid residue. *J. Agric. Food. Chem.* **2011**, *59* (5), 1594-7; (b) Jiang, X.; Li, D.; Xu, X.; Ying, Y.; Li, Y.; Ye, Z.; Wang, J., Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23* (11), 1577-87; (c) Xu, Z. L.; Wang, Q.; Lei, H. T.; Eremin, S. A.; Shen, Y. D.; Wang, H.; Beier, R. C.; Yang, J. Y.; Maksimova, K. A.; Sun, Y. M., A simple, rapid and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for simultaneous detection of organophosphorus pesticides in vegetable and environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *708* (1-2), 123-9.
8. (a) Sherry, J. P.; Clement, R. E., Environmental Chemistry: The Immunoassay Option. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1992**, *23* (4), 217-300; (b) Dolliver, H.; Kumar, K.; Gupta, S.; Singh, A., Application of enzyme-linked immunosorbent assay analysis for determination of monensin in environmental samples. *Journal of Environmental Quality* **2008**, *37* (3), 1220-1226; (c) Deng, A.; Himmelsbach, M.; Zhu, Q.

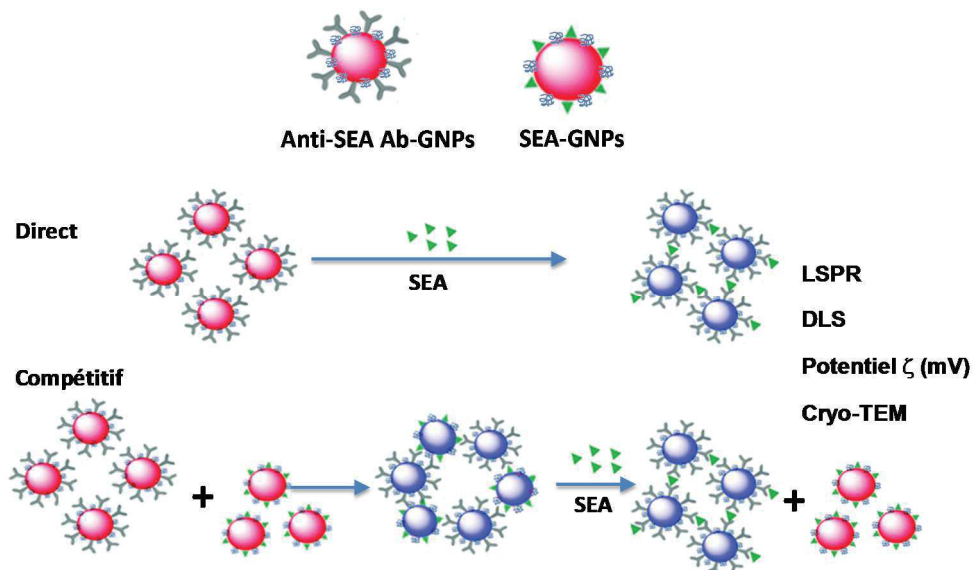
- Z.; Frey, S.; Sengl, M.; Buchberger, W.; Niessner, R.; Knopp, D., Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37* (15), 3422-9.
9. Archer, D. L.; Young, F. E., Contemporary issues: diseases with a food vector. *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1* (4), 377-398.
10. (a) Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G., A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *605* (2), 111-29; (b) Patel, P. D., (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, *21* (2), 96-115; (c) Sapsford, K. E.; Taitt, C. R.; Loo, N.; Ligler, F. S., Biosensor Detection of Botulinum Toxoid A and Staphylococcal Enterotoxin B in Food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (9), 5590-5592; (d) Rasooly, A.; Herold, K. E., Biosensors for the analysis of food- and waterborne pathogens and their toxins. *J. AOAC Int.* **2006**, *89* (3), 873-83; (e) Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (2), 232-254.
11. (a) Medina, M. B., A Biosensor method for a competitive immunoassay detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) in milk. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **2005**, *13* (1), 37-55; (b) Medina, M. B., A biosensor method for detection of staphylococcal enterotoxin A in raw whole egg. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **2006**, *14* (2), 119-132; (c) Naimushin, A. N.; Soelberg, S. D.; Nguyen, D. K.; Dunlap, L.; Bartholomew, D.; Elkind, J.; Melendez, J.; Furlong, C. E., Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17* (6-7), 573-584; (d) Homola, J.; Dostálek, J.; Chen, S.; Rasooly, A.; Jiang, S.; Yee, S. S., Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *75* (1-2), 61-69; (e) Tsai, W.-C.; Pai, P.-J. R., Surface plasmon resonance-based immunosensor with oriented immobilized antibody fragments on a mixed self-assembled monolayer for the determination of staphylococcal enterotoxin B. *Microchimica Acta* **2009**, *166* (1), 115-122; (f) Gupta, G.; Singh, P. K.; Boopathi, M.; Kamboj, D. V.; Singh, B.; Vijayaraghavan, R., Surface plasmon resonance detection of biological warfare agent Staphylococcal enterotoxin B using high affinity monoclonal antibody. *Thin Solid Films* **2010**, *519* (3), 1171-1177; (g) Rasooly, A., Surface plasmon resonance analysis of staphylococcal enterotoxin B in food. *J. Food Prot.* **2001**, *64* (1), 37-43; (h) Rasooly, L.; Rasooly, A., Real time biosensor analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *49* (3), 119-127; (i) Soelberg, S. D.; Stevens, R. C.; Limaye, A. P.; Furlong, C. E., Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (6), 2357-63; (j) Tsai, W.-C.; Li, I.-C., SPR-based immunosensor for determining staphylococcal enterotoxin A. *Sensors Actuators B: Chem.* **2009**, *136* (1), 8-12.
12. (a) Campbell, G. A.; Medina, M. B.; Mutharasan, R., Detection of Staphylococcus enterotoxin B at picogram levels using piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever sensors. *Sensors Actuators B: Chem.* **2007**, *126* (2), 354-360; (b) Maraldo, D.; Mutharasan, R., Detection and Confirmation of Staphylococcal Enterotoxin B in Apple Juice and Milk Using Piezoelectric-Excited Millimeter-Sized Cantilever Sensors at 2.5 fg/mL. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (20), 7636-7643; (c) Liu, N.; Li, X.; Ma, X.; Ou, G.; Gao, Z., Rapid and multiple detections of staphylococcal enterotoxins by two-dimensional molecularly imprinted film-coated QCM sensor. *Sensors Actuators B: Chem.* **2014**, *191*, 326-331; (d) Gao, Z.; Chao, F.; Chao, Z.; Li, G., Detection of staphylococcal enterotoxin C2 employing a piezoelectric crystal immunosensor. *Sensors Actuators B: Chem.* **2000**, *66* (1-3), 193-196; (e) Hartevelde, J. L. N.; Nieuwenhuizen, M. S.; Wils, E. R. J., Detection of Staphylococcal Enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12* (7), 661-667.
13. (a) Tang, D.; Tang, J.; Su, B.; Chen, G., Ultrasensitive Electrochemical Immunoassay of Staphylococcal Enterotoxin B in Food Using Enzyme-Nanosilica-Doped Carbon Nanotubes for Signal Amplification. *J. Agric. Food. Chem.* **2010**, *58* (20), 10824-10830; (b) Sharma, A.; Rao, V. K.; Kamboj, D. V.; Gaur, R.; Upadhyay, S.; Shaik, M., Relative efficiency of zinc sulfide (ZnS) quantum dots (QDs) based electrochemical and fluorescence immunoassay for the detection of Staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Biotechnology Reports* **2015**, *6*, 129-136; (c) Dong, S.; Luo, G.; Feng, J.; Li, Q.; Gao, H., Immunoassay of Staphylococcal Enterotoxin C1 by FTIR Spectroscopy and Electrochemical Gold Electrode. *Electroanalysis* **2001**, *13* (1), 30-33; (d) Yang, M.; Sun, S.; Bruck, H. A.; Kostov, Y.; Rasooly,

- A., Electrical percolation-based biosensor for real-time direct detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25* (12), 2573-2578.
14. Cretenet, M.; Even, S.; Le Loir, Y., Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology* **2011**, *91* (2), 127-150.
15. Pinchuk, I. V.; Beswick, E. J.; Reyes, V. E., Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* **2010**, *2* (8), 2177-97.
16. Brett, Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *84* (S1), 110S-118S.
17. Salmain, M.; Ghasemi, M.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sensors Actuators B: Chem.* **2012**, *173*, 148-156.
18. Huebner, M.; Ben Haddada, M.; Methivier, C.; Niessner, R.; Knopp, D.; Boujday, S., Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 334-341.
19. Reviakine, I.; Johannsmann, D.; Richter, R. P., Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (23), 8838-8848.
20. Buijs, J.; Lichtenbelt, J. W. T.; Norde, W.; Lyklema, J., Adsorption of monoclonal IgGs and their F(ab')₂ fragments onto polymeric surfaces. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **1995**, *5* (1), 11-23.
21. Lian, W.; Wu, D.; Lim, D. V.; Jin, S., Sensitive detection of multiplex toxins using antibody microarray. *Anal. Biochem.* **2010**, *401* (2), 271-279.
22. Salmain, M.; Ghasemi, M.; Boujday, S.; Spadavecchia, J.; Técher, C.; Val, F.; Le Moigne, V.; Gautier, M.; Briandet, R.; Pradier, C.-M., Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *29* (1), 140-144.
23. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (2), 426-436.

Chapitre 5 : Biocapteurs plasmoniques pour la détection de la SEA

Avant-propos

Ce chapitre traite de l'élaboration d'un biocapteur plasmonique pour la détection de la SEA. Il s'agit donc de la deuxième stratégie d'utilisation des nanoparticules d'or, dans laquelle ils assurent la transduction du signal. Cette transduction est basée sur les propriétés plasmoniques des GNPs, sensibles à l'environnement immédiat. Deux formats de détection schématisés sur la figure ci-dessous ont été étudiés : un format direct et un format compétitif. Une partie importante de ce travail a été consacrée à la l'optimisation d'un protocole permettant de coupler les biomolécules (anticorps et SEA) aux surfaces des nanoparticules de manière covalente caractérisé par LSPR, DLS, mesures de potentiel zêta et cryo-TEM. Ensuite, la détection a été suivie par LSPR.



Ce travail a été réalisé au laboratoire CBSS (Centre for Biomimetic Sensor Science, NTU, Singapour) et sera présenté sous forme d'article (avec une section supplémentaire) soumis au journal scientifique Biosensors&Bioelectronics.

**Gold Nanoparticle-Based localized surface plasmon
immunosensor for Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) detection
at the ng level**

Maroua Ben Haddada^{1,2}, Michèle Salmain², Yi Wang³, Bo Liedberg³, Souhir Boujday^{1,3,}*

¹ *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), F75005 Paris, France*

² *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 4 place Jussieu F-75005 Paris, France*

³ *Centre for Biomimetic Sensor Science, Nanyang Technological University, 637553 Singapore*

RECEIVED DATE ()

Figures (3)

Tel: +33144276001, Fax: +33144276033, souhir.boujday@upmc.fr

ABSTRACT: We describe the engineering of stable gold nanoparticle-antibody bioconjugates (AuNP-Ab) and their use in biosensing of Staphylococcal enterotoxin A (SEA) by localized surface plasmon resonance (LSPR) at the ng level. Two types of AuNPs bioconjugates were prepared by covalent immobilization of anti-SEA antibody (Ab) or SEA to AuNPs. These bioconjugates were deeply characterized by UV-Visible spectroscopy, Cryo-Transmission Electron Microscopy (CryoTEM), Dynamic Light Scattering (DLS), and zeta potential (ELS) measurements. Their stability over time was assessed after one year storage in the refrigerator at 4°C. Two formats of homogeneous binding assays were set up based on the LSPR peak shift in the extinction spectrum resulting from the immunological reaction between the immobilized antibody and either free SEA, in the direct assay strategy, or immobilized SEA, in the competitive assay. In both formats, a correlation between the plasmon shift and SEA concentration could be established. Though the competitive format did not lead to workable outcomes in the analytical performances of the biosensor, the direct format, which implementation was very simple, led to a very specific and sensitive response with a broad working range from the ng/mL to the µg/mL. The limit of detection of SEA was lowered to 5 ng/mL compared to the previously established limits obtained using quartz crystal microbalance and requiring the use of expensive substrates and skilled staff. Moreover, the biosensing performances of AuNP-Ab bioconjugates were perfectly preserved after one year storage evidencing a remarkable stability and reliability of these biosensing devices. The nanoplasmonic immunosensor described herein provides an attractive alternative for the detection of SEA and other toxins in the ng/mL range and a promising avenue for fast, easy to implement, and sensitive samples analysis.

KEYWORDS: immunosensor, LSPR, Staphylococcal Enterotoxin A, DLS, gold nanoparticles.

INTRODUCTION

Biotoxins are species produced by microorganisms (bacteria, microalgae) for various purposes. Ingestion of food contaminated by these microorganisms causes various diseases that can in the worst case be fatal to humans. For instance, some strains of *Staphylococcus aureus* produce enterotoxins that, when ingested, induce severe gastroenteritis mainly caused by the most frequently encountered enterotoxin serotype, namely staphylococcus enterotoxin A (SEA) (Hennekinne et al. 2012; Le Loir et al. 2003). Therefore, control of food innocuity all along the production chain is necessary to prevent food poisoning outbreaks. Classical analytical methods to detect biotoxins in food samples are generally time-consuming, require highly trained operatives and special equipment and are therefore carried out in dedicated laboratories. Clearly, there is a need for fast, specific and sensitive analytical methods to detect and quantify these biotoxins in food matrices.

The unique optical properties of gold nanoparticles (AuNPs) make them very attractive as colorimetric biosensing platforms due to their localized surface plasmon resonance (LSPR) (Jans and Huo 2012; Mayer and Hafner 2011; Sepulveda et al. 2009) . The extremely high extinction coefficient of these nanoparticles in the visible spectral range prompted the development of lateral flow immunoassays to visually detect staphylococcal enterotoxins (Rong-Hwa et al. 2010; Wang et al. 2016). The LSPR band of gold nanoparticles is also sensitive to local changes of the dielectric environment around them and this property led to the design of homogeneous and solid-phase assays (Englebienne 1998; Mayer et al. 2008; Nath and Chilkoti 2004). Another family of AuNP-based biosensing assays relies on the large color change arising from interparticle plasmon coupling during particle aggregation and redispersion of the particle aggregates (Liu et al. 2014; Zhao et al. 2008) . All these strategies require to graft bioreceptors onto AuNPs.

Various approaches have been devised to conjugate antibodies to gold nanoparticles. These approaches have been rationalized into 4 different concepts, namely physical adsorption, covalent binding, use of adapter molecules and combined ionic and covalent adsorption (Montenegro et al. 2013). While the physical adsorption approach is straightforward, immobilization of biomolecules by covalent binding should ensure the best possible stability to the AuNP bioconjugates because of the much stronger bonds created between both species (Wang and Ma 2009) .

Herein, we report the setup of homogeneous, washing-free immunosensing assays to detect and quantify SEA based on the change of local refractive index of AuNP anti-SEA antibody conjugate upon binding of target SEA. Gold nanoparticles-antibody bioconjugates (AuNP-Ab) were engineered by covalent attachment of antibodies through sulfur-gold bonds then deeply characterized by UV-Visible spectroscopy, Cryo-Transmission Electron Microscopy (CryoTEM), Dynamic Light Scattering (DLS), and zeta potential (ELS) measurements. We also assessed the stability of these bioconjugates over time (one year storage in the refrigerator at 4°C). Two formats of homogeneous binding LSPR assays were set up: a direct assay strategy where AuNP-Ab were reacted with SEA, and a competitive assay starting from a mixture AuNP-Ab and AuNP-SEA bioconjugates (see Figure 1).

EXPERIMENTAL SECTION

Materials : Sodium citrate, gold(III) chloride trihydrate, tannic acid, 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH=7.4, Bovine Serum Albumin (BSA), β -Lactoglobulin B from bovine milk, 2-Iminothiolane hydrochloride (Traut's reagent) and staphylococcal enterotoxin A (SEA) were purchased from Sigma–Aldrich. Affinity-purified rabbit anti-SEA antibody (anti-SEA_{TT}, ref. LAI101) was purchased from Toxin Technology (Sarasota, FL, www.toxintechnology.com).

Gold nanoparticles preparation and characterization Colloidal gold particles were prepared according to the citrate / tannic acid reduction method [1]. Transmission Electron Microscopy images of the gold colloids were obtained using a JEOL JEM 1011 microscope operating at an accelerating voltage of 100 kV. Cryo-Transmission Electron Microscopy images were recorded at low temperature (-180 C) on ultrascan 2 K CCD camera (Gatan, USA), using a LaB6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japan) cryo microscope operating at 200 kV with a low dose system (Minimum Dose System, MDS). Dynamic Light Scattering (DLS) and zeta potential (ELS) measurements were performed using Litesizer™ 500 apparatus (Anton Paar) equipped with a 658 nm laser operating at 40 mW. The backscattered light collection angle was set at 90° . The zeta-potential cuvette has a Ω -shaped capillary tube. The same solutions were used for DLS and ELS measurements. Each sample was analyzed in triplicate and each measurement was an average of three 30 s runs.

Preparation of AuNPs bioconjugates Anti-SEA Ab-AuNPs conjugates were engineered using a covalent approach (Sule et al. 2011a). First, Traut's reagent (40 eq) was reacted with anti-SEA Ab (1 eq) in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 to generate sulfhydryl groups (Hermanson 2007, 2008). After purification by gel desalting (Hitrap desalt 5 ml, GE Healthcare) using PBS as eluent, the thiolated Ab was covalently linked to AuNPs through S-Au bonds. A 0.25% w/v BSA solution was added to the bioconjugate to block non-specific binding sites. Finally, the biofunctionalized AuNPs were pelleted by centrifugation, washed several times to remove unbound and loosely bound Ab and finally re-suspended in PBS. The amount of antibody in the first supernatant was quantified by ELISA to estimate by difference the number of Ab bound to AuNPs. The same procedure was applied to prepare SEA-AuNP bioconjugates

SEA immunosensing: In the direct assay, an aliquot of SEA stock solution (0.1 mg/mL) was diluted and added to the AuNP-Ab bioconjugate solution. UV-Vis spectra of the mixtures were

measured in real time (millisecond temporal resolution) and with 10^{-2} nm spectral resolution using Insplorion XNano II instrument until equilibrium was reached (60 min). The same procedure was used for the competitive assay except that SEA was replaced by AuNP-SEA conjugate. The position of the LSPR band was plotted as a function of time using the software provided with the instrument.

RESULTS AND DISCUSSION

Bioconjugates engineering: Citrate-capped gold nanoparticles were first characterized by UV-visible spectroscopy and Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses. The resulting data, depicted in the supplementary material section (Figure S1), show a homogeneous distribution with an average particle size of 13.5 ± 1 nm. The hydrodynamic diameter D_H estimated by DLS was slightly larger, 18 ± 1 nm and the zeta potential equal to -45.3 ± 1 mV in agreement with previously published data for citrate-capped AuNP (Xia et al. 2016). AuNP-Ab and AuNP-SEA bioconjugates were engineered according to an original procedure schematized in Figure 74. This coupling method ensures a controlled immobilization of the antibody molecules on the surface of the gold nanoparticles (Sule et al. 2011b). After reaction and separation of the AuNP by centrifugation, the amount of unbound Ab in the supernatant was found to be very small (below 1 μ g) as assayed by ELISA, confirming the successful conjugation of Ab to AuNP. The final concentration of anti-SEA antibody in the AuNP-Ab solution was estimated $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and the Ab to AuNP ratio was estimated around 7 which is in agreement with antibody size *versus* nanoparticle size (see Figure S2 and reference (Sperling and Parak 2010)).

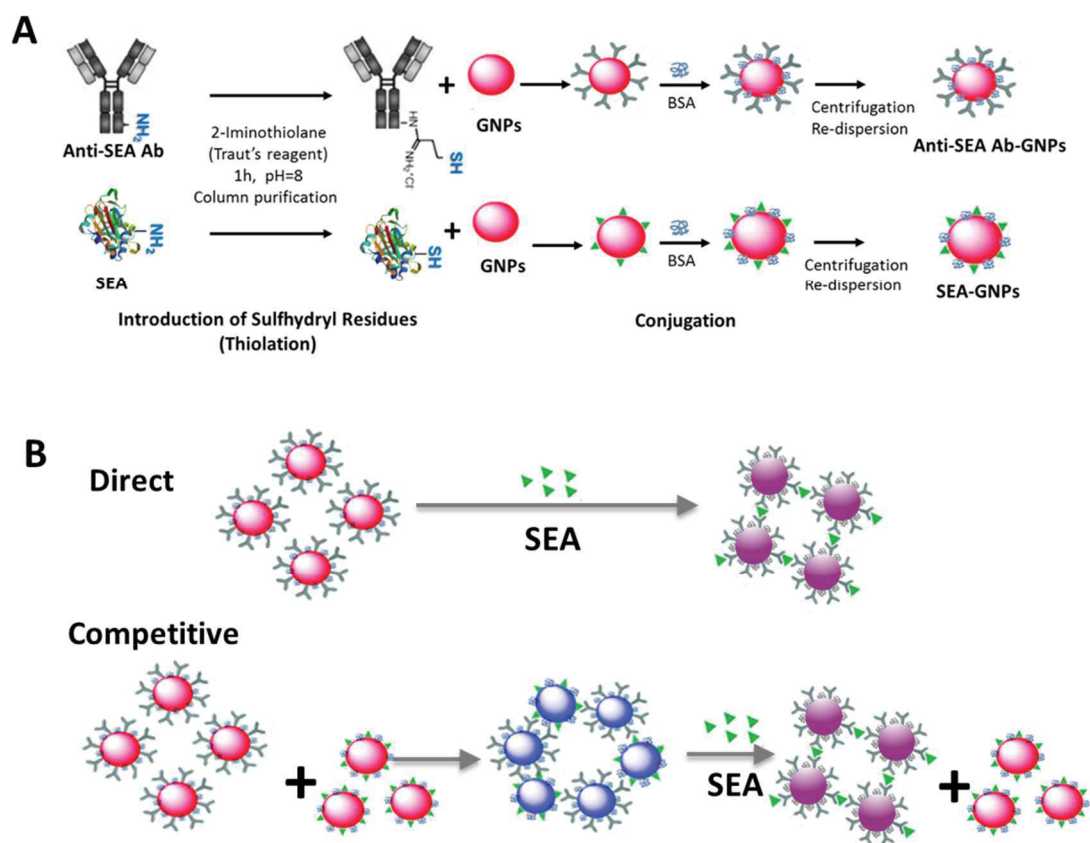


Figure 74 A: Adopted strategy for bioconjugates elaboration **B:** Principle of direct and competitive assays.

Upon covalent attachment of anti-SEA Ab to AuNP, the LSPR band was red-shifted by 8 nm and 9 nm upon further blocking by BSA (Figure 75). The same trend was observed upon SEA grafting to the nanoparticles. These results are in agreement with previously published data (Thobhani et al. 2010)). The shape and width of the LSPR bands indicate a homogeneous distribution of the particle size. This was confirmed by cryo-TEM images (see inserts in Figure 75-A), mathematical treatment of cryo-TEM images showed an average size of 13.3 ± 0.7 nm ($n=15$) for AuNP-SEA and 14.2 ± 0.7 ($n=15$) nm for AuNP-Ab. The hydrodynamic diameter of AuNP-Ab and AuNP-SEA increased to 76 ± 1 and 54.6 ± 0.5 nm, respectively (Figure 2; table S1). Again, the hydrodynamic diameter is larger than expected from the maximum increase compared to the bare gold nanoparticles' size; considering IgG structure (ref (Klein et al. 2009) and Figure S2), if more than two antibodies are chemisorbed on the surface the measured diameter should be around 50 nm. The zeta potential of AuNP-Ab

bioconjugate in PBS pH 7.4 also increased compared to the original AuNPs to -18.9 mV (see Figure 75-B and Table S1) in agreement with previously observed data (Hinterwirth et al. 2013). The increase was even larger for AuNP-SEA bioconjugate, -6.3 mV. If the surface of gold particles is fully covered with proteins, it is expected that the net charge of the conjugate be close to that of the protein itself (Yang et al. 2001). The calculated isoelectric point (pI) of SEA is 6.6 according to the ExPASy database, meaning that the protein should be slightly negatively charged at pH 7.4 in accordance with the Z-potential value given above. The pI of rabbit anti-SEA IgG is unknown, but the purification of rabbit IgG from serum by anion exchange chromatography gave 2 IgG fractions with pI 5.65-8.7 and 5.5 – 7.1, respectively (Geoghegan 1988). The Z-potential value of the AuNP-Ab conjugate indicates that this antibody is more negatively charged than SEA at pH 7.4, meaning that its pI is probably below 6, in the lower range of the interval given above.

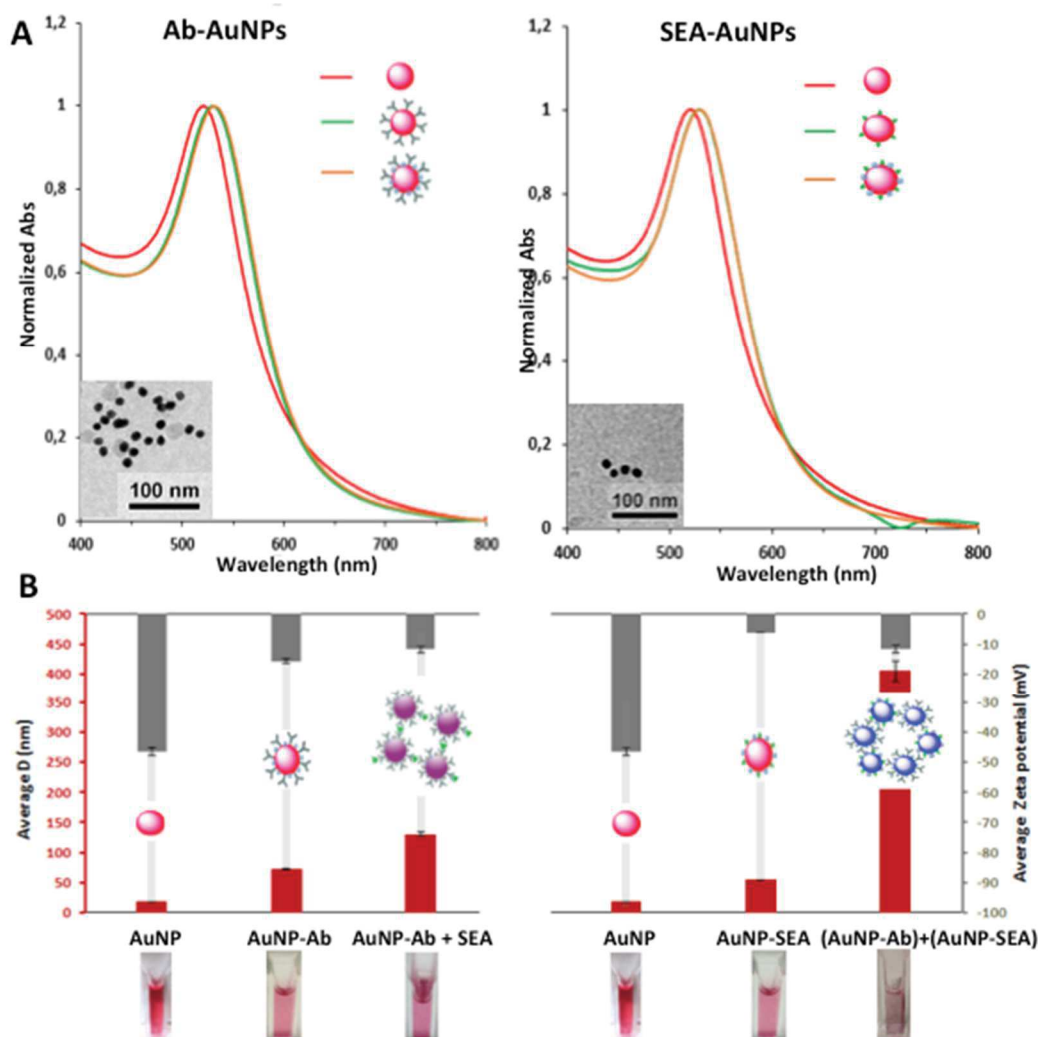


Figure 75 A: LSPR band change upon conjugation of anti-SEA Ab (left) and SEA (right) to AuNPs. The inserts show cryo-TEM images of AuNP-Ab and AuNP-SEA bioconjugates. **B:** hydrodynamic diameter and zeta potential of citrate-coated AuNP, AuNP conjugates and mixtures of AuNP-Ab and free SEA or AuNP-SEA conjugate (5 $\mu\text{g/mL}$)

In a preliminary experiment, the position of the LSPR band of the colloidal solution of AuNP-Ab was monitored over time upon addition of SEA (1 $\mu\text{g/mL}$). Progressive shift of the LSPR band to the red was seen to $\Delta\lambda = 5$ nm after 1 h (Figure 3A). Additional amounts of SEA at higher concentration led to further shifts of the LSPR band which reached a $\Delta\lambda$ of 11 nm on the whole for 3 $\mu\text{g/mL}$ SEA; no further shift was observed for higher SEA concentrations (Figure 3A and insert therein). In parallel, the hydrodynamic diameter reached 131 nm and the Z-potential further shifted to -11.8 mV (Figure 2B and table S1).

The same experiment was carried out with AuNP-SEA instead of free SEA. Similarly, progressive shift of the LSPR band to the red was noticed reaching $\Delta\lambda = 7$ nm at saturation (Figure 3B). In this case, a perceptible change in color from pink to purple was observed (Figure 2B, right) as well as a significant increase of the absorbance between 600 and 700 nm (Figure S3) and a measured average D_H of 404 nm by DLS (Figure 2B and table S1). All these data are consistent with the formation of aggregates resulting from interparticle crosslinking. Unfortunately, addition of free SEA to the mixture of AuNP-Ab and AuNP-SEA did not lead to particle dispersion as expected (Liu and Huo 2009; Tsai et al. 2005). Instead, further shifts of the LSPR band to the red occurred (2 nm for $[SEA] = 1$ $\mu\text{g/mL}$ and 3.7 nm for $[SEA] = 2$ $\mu\text{g/mL}$) possibly because all the available antibody binding sites were not occupied by SEA in the first place. Extension of the incubation time or change of the AuNP-Ab / AuNP-SEA proportion did not improve the results. We thus conclude that the competitive format is not adapted to SEA assay. In what follows, we explore the efficiency of AuNP-Ab in the one-step colorimetric assay of SEA in the direct format depicted in **Figure 74**.

Optimizing the homogeneous assay of Staphylococcal Enterotoxin A (SEA): Since the instrument employed to make the LSPR measurements displays high spectral resolution, we anticipated that much lower band shifts corresponding to lower analyte concentrations could be monitored. Therefore, the experiment consisting in adding increasing amounts of SEA to the solution of AuNP-Ab with real-time monitoring of the LSPR band position was repeated in the 10 to 250 ng/mL range (Figure 3C). In the same manner, a progressive shift of the LSPR band was observed and a dose-curve was established by plotting the band shift $\Delta\lambda$ measured after 1 h versus the concentration of analyte (Figure 3D). We also ran the same experiments by DLS to see whether this technique can provide analytical data on SEA detection. DLS results are shown in the supplementary material section Figure S4. Though the addition of SEA to the bioconjugates led to a perceptible increase in their hydrodynamic diameter starting from low

SEA concentrations ($\Delta D_H = 50$ nm for 10 ng/mL) no workable outcome arose from adding higher amounts of SEA; the average hydrodynamic diameter was barely modified after the first addition.

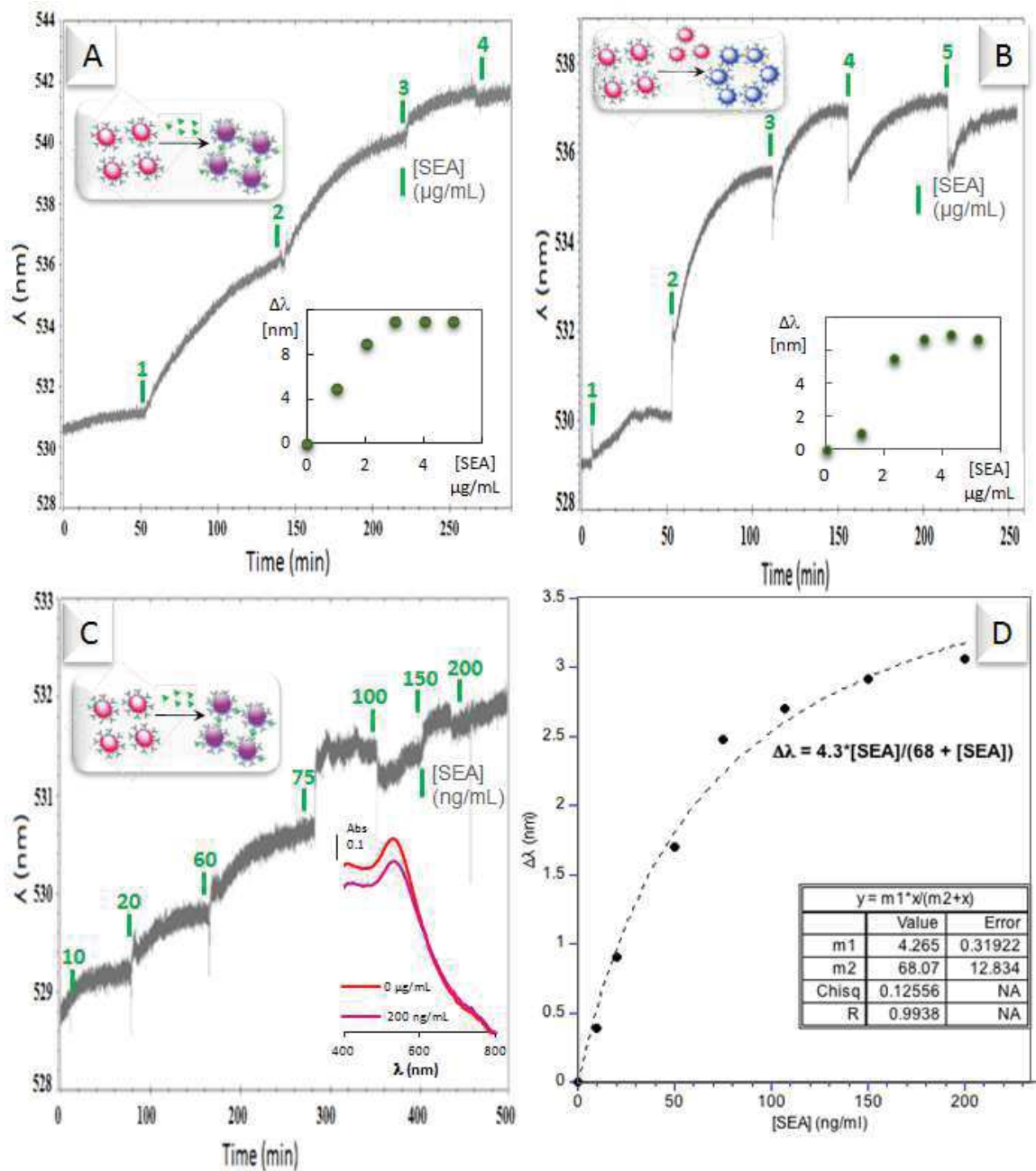


Figure 76 **A** and **B**: LSPR curves obtained by reacting AuNP-Ab conjugates with increasing concentrations in the μg range of free SEA (**A**) and AuNP-SEA (**B**), the inserts show the dose-response curves obtained by plotting the LSPR band shift $\Delta\lambda$ as a function of SEA concentration measured after 1 h incubation. **C**: LSPR curve obtained by reacting AuNP-Ab conjugates with increasing concentrations in the ng range of free SEA. The insert shows the LSPR peak for the initial and final AuNP-Ab conjugates. **D**: Dose-response curve obtained by plotting the LSPR band shift $\Delta\lambda$ from **C** as a function of SEA concentration measured after 1 h incubation.

Mathematical fitting of LSPR data points using the Langmuir isotherm equation (Figure 3D) was done and gave an apparent dissociation constant K of $68 \pm 13 \text{ ng/mL} = 2.5 \pm 0.5 \text{ nM}$ and a limit of detection of $5 \text{ ng/mL} = 0.2 \text{ nM}$ calculated from 3x the response of a blank sample ($\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$). The dynamic range and the assay sensitivity were improved as compared to the piezoelectric immunosensor for SEA we previously setup using the same antibody reagent and for which the LOD was 4 times higher, 20 ng/mL , in the direct format but required the use of an expensive quartz crystal microbalance at controlled temperature to carry out the measurements (Salmain et al. 2012; Salmain et al. 2011) We expect that the limit of detection may be further decreased by replacing the gold nanospheres by nonspherical gold nanoparticles that show higher refractive index sensitivity (Mayer and Hafner 2011).

The same binding experiment performed by addition of 100 up to 2300 ng/mL bovine β -lactoglobulin (a protein present in high concentration in the whey fraction of cow's milk) to the colloidal solution of AuNP-Ab did not lead to any significant change of the LSPR band (Figure S5), indicating that previous band shifts were indeed related to the high affinity binding of SEA to anti-SEA conjugated to AuNP which behaved as an efficient transducer of this biomolecular association.

We finally assessed the stability overtime of the AuNP-Ab bioconjugates. To this aim, we used the same batch of AUNP-Ab bioconjugates, stored in the refrigerator at 4°C for a year to reproduce the LSPR experiments of the direct detection of SEA. The suspension was visibly stable under this long storage paper and the UV-Visible spectra were identical to the original ones confirming that no aggregation occurred. Note that when antibodies are simply physisorbed on gold nanoparticles, aggregation showed to occur within less than 2 weeks. The results of LSPR assay of SEA are shown in the supplementary information section, Figure S6. The response of the sensor was identical to the freshly prepared bioconjugates showing a remarkable stability over time paving the way for a commercial use of the so-built biosensor.

CONCLUSIONS

Stable Gold nanoparticles-antibody bioconjugates (AuNP-Ab) were engineered by covalently linking anti-SEA antibodies to citrate-capped gold nanoparticles using the Traut reagent. These bioconjugates were deeply studied by several characterization techniques and were remarkably stable after one year storage in the refrigerator at 4°C. Two formats of homogeneous binding assays of Staphylococcal enterotoxin A (SEA) by localized surface plasmon resonance (LSPR) were set up based a direct assay strategy, in which AuNP-Ab were reacted with SEA, and a competitive assay starting from a mixture AuNP-Ab and AuNP-SEA bioconjugates. Correlation between Plasmon shift and SEA concentration was established when the AuNP conjugated to anti-SEA antibodies were mixed with SEA in the free form or conjugated to AuNP. In the case of mixtures AuNP-Ab and AuNP-SEA bioconjugates (competitive format), a significant red shift of the plasmon peak as well as nanoparticle aggregation were observed. However, the addition of free SEA to the mixture of AuNP-Ab and AuNP-SEA did not lead to particle dispersion showing that this competitive format is not adapted to SEA assay. In the one-step LSPR assay of SEA following the direct format AuNP-Ab conjugates afforded remarkable analytical performances in the efficient and specific LSPR biosensing of SEA at the ng level. SEA was assayed in both μg and ng working ranges with a calculated limit of detection (LOD) of 5 ng/mL. Moreover, the response of the sensor after one year storage at 4°C was identical to the freshly prepared bioconjugates showing a remarkable stability over time and paving the way for a commercial use of the so-built biosensors. The nanoplasmonic immunosensor described herein requires rather simple optical equipment and straightforward manipulations and provides an attractive alternative for the detection of SEA and other toxins in the ng/mL range providing therefore a promising avenue for fast and sensitive samples analysis.

REFERENCES

- Englebienne, P., 1998. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. *Analyst* 123(7), 1599-1603.
- Geoghegan, W.D., 1988. The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 36(4), 401-407.
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., Dragacci, S., 2012. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 815–836.
- Hermanson, G.T., 2007. Chapter 24 - Preparation of Colloidal Gold-Labeled Proteins. *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, pp. 924-935. Academic Press, New York.
- Hermanson, G.T., 2008. Chapter 1 - Functional Targets. *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, pp. 1-168. Academic Press, New York.
- Hinterwirth, H., Stübiger, G., Lindner, W., Lämmerhofer, M., 2013. Gold Nanoparticle-Conjugated Anti-Oxidized Low-Density Lipoprotein Antibodies for Targeted Lipidomics of Oxidative Stress Biomarkers. *Anal. Chem.* 85(17), 8376-8384.
- Jans, H., Huo, Q., 2012. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis. *Chem. Soc. Rev.* 41(7), 2849-2866.
- Klein, J.S., Gnanapragasam, P.N.P., Galimidi, R.P., Foglesong, C.P., West, A.P., Bjorkman, P.J., 2009. Examination of the contributions of size and avidity to the neutralization mechanisms of the anti-HIV antibodies b12 and 4E10. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(18), 7385-7390.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2(1), 63-76.
- Liu, X., Huo, Q., 2009. A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering. *J. Immunol. Methods* 349(1-2), 38-44.
- Liu, X.H., Wang, Y., Chen, P., Wang, Y.S., Mang, J.L., Aili, D., Liedberg, B., 2014. Biofunctionalized Gold Nanoparticles for Colorimetric Sensing of Botulinum Neurotoxin A Light Chain. *Anal. Chem.* 86(5), 2345-2352.
- Mayer, K.M., Hafner, J.H., 2011. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chem. Rev.* 111(6), 3828-3857.
- Mayer, K.M., Lee, S., Liao, H., Rostro, B.C., Fuentes, A., Scully, P.T., Nehl, C.L., Hafner, J.H., 2008. A Label-Free Immunoassay Based Upon Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanorods. *ACS Nano* 2(4), 687-692.
- Montenegro, J.-M., Grazu, V., Sukhanova, A., Agarwal, S., de la Fuente, J.M., Nabiev, I., Greiner, A., Parak, W.J., 2013. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 65(5), 677-688.
- Nath, N., Chilkoti, A., 2004. Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size. *Anal. Chem.* 76(18), 5370-5378.
- Rong-Hwa, S., Shiao-Shek, T., Der-Jiang, C., Yao-Wen, H., 2010. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Food Chem.* 118(2), 462-466.
- Salmain, M., Ghasemi, M., Boujday, S., Pradier, C.M., 2012. Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sens. Actuator B-Chem.* 173, 148-156.
- Salmain, M., Ghasemi, M., Boujday, S., Spadavecchia, J., Techer, C., Val, F., Le Moigne, V., Gautier, M., Briandet, R., Pradier, C.M., 2011. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid

- detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. *Biosensors & Bioelectronics* 29(1), 140-144.
- Sepulveda, B., Angelome, P.C., Lechuga, L.M., Liz-Marzan, L.M., 2009. LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* 4(3), 244-251.
- Sperling, R.A., Parak, W.J., 2010. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 368(1915), 1333-1383.
- Sule, Shantanu V., Sukumar, M., Weiss Iv, William F., Marcelino-Cruz, Anna M., Sample, T., Tessier, Peter M., 2011a. High-Throughput Analysis of Concentration-Dependent Antibody Self-Association. *Biophys. J.* 101(7), 1749-1757.
- Sule, Shantanu V., Sukumar, M., Weiss, William F., Marcelino-Cruz, Anna M., Sample, T., Tessier, Peter M., 2011b. High-Throughput Analysis of Concentration-Dependent Antibody Self-Association. *Biophys. J.* 101(7), 1749-1757.
- Thobhani, S., Attree, S., Boyd, R., Kumarswami, N., Noble, J., Szymanski, M., Porter, R.A., 2010. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods* 356(1-2), 60-69.
- Tsai, C.S., Yu, T.B., Chen, C.T., 2005. Gold nanoparticle-based competitive colorimetric assay for detection of protein-protein interactions. *Chem. Commun.*(34), 4273-4275.
- Wang, W.B., Liu, L.Q., Xu, L.G., Kuang, H., Zhu, J.P., Xu, C.L., 2016. Gold-Nanoparticle-Based Multiplexed Immunochromatographic Strip for Simultaneous Detection of Staphylococcal Enterotoxin A, B, C, D, and E. *Part. Part. Syst. Charact.* 33(7), 388-395.
- Wang, Z., Ma, L., 2009. Gold nanoparticle probes. *Coord. Chem. Rev.* 253(11-12), 1607-1618.
- Xia, H., Xiahou, Y., Zhang, P., Ding, W., Wang, D., 2016. Revitalizing the Frens Method To Synthesize Uniform, Quasi-Spherical Gold Nanoparticles with Deliberately Regulated Sizes from 2 to 330 nm. *Langmuir* 32(23), 5870-5880.
- Yang, W.J., Trau, D., Renneberg, R., Yu, N.T., Caruso, F., 2001. Layer-by-layer construction of novel biofunctional fluorescent microparticles for immunoassay applications. *J. Colloid Interface Sci.* 234(2), 356-362.
- Zhao, W., Brook, M.A., Li, Y., 2008. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays. *ChemBioChem* 9(15), 2363-2371.

Supplementary material

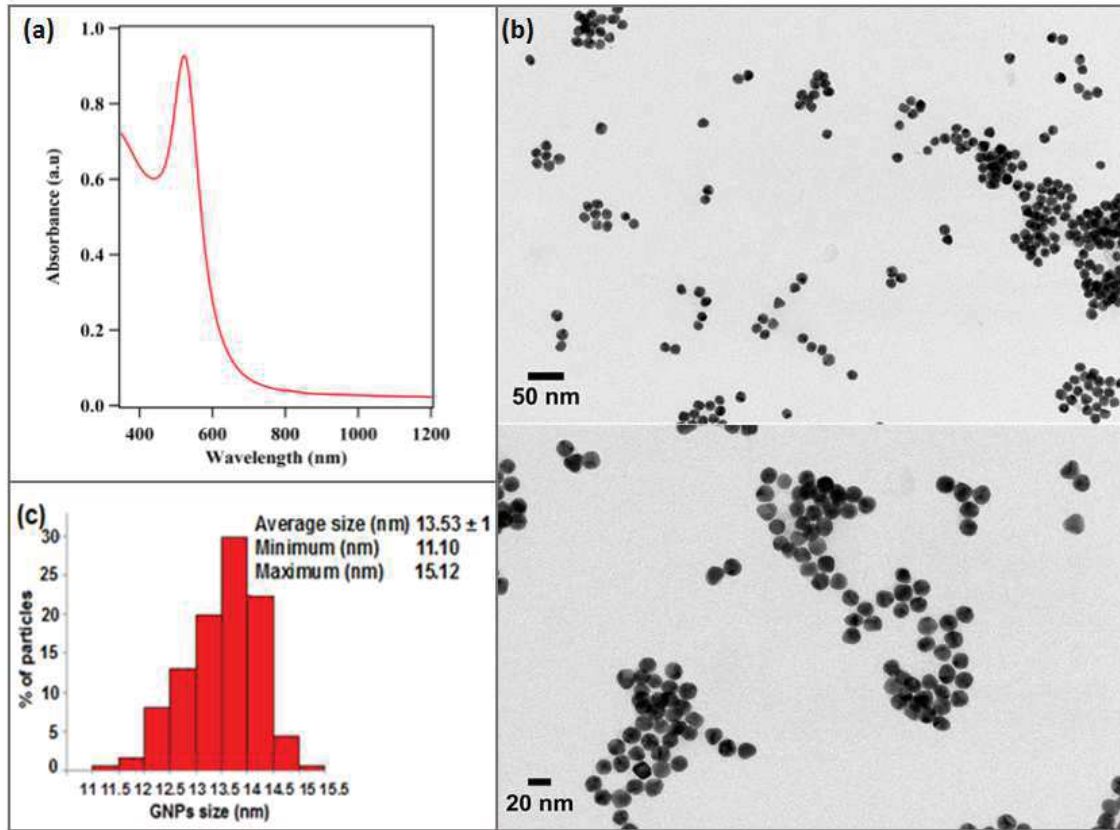


Figure S 1: Gold nanoparticles characterizations (a) UV-vis spectrum, (b) TEM image of gold nanoparticles and (c) size distribution

Table 1: DLS and zeta potential data for AuNP and bioconjugates

	ZP (mV)	delta ZP	Z-Average (d.nm)	delta Z
AuNP	-45.3	1	18.1	0.4
AuNP-Ab	-19.8	1	75.8	1
AuNP-Ab + SEA	-11.8	1	131	3
AuNP	-45.3	1	18.1	0.4
AuNP-SEA	-6.3	1	54.6	0.5
(AuNP-Ab) + (AuNP-SEA)	-11.7	1	404.5	17

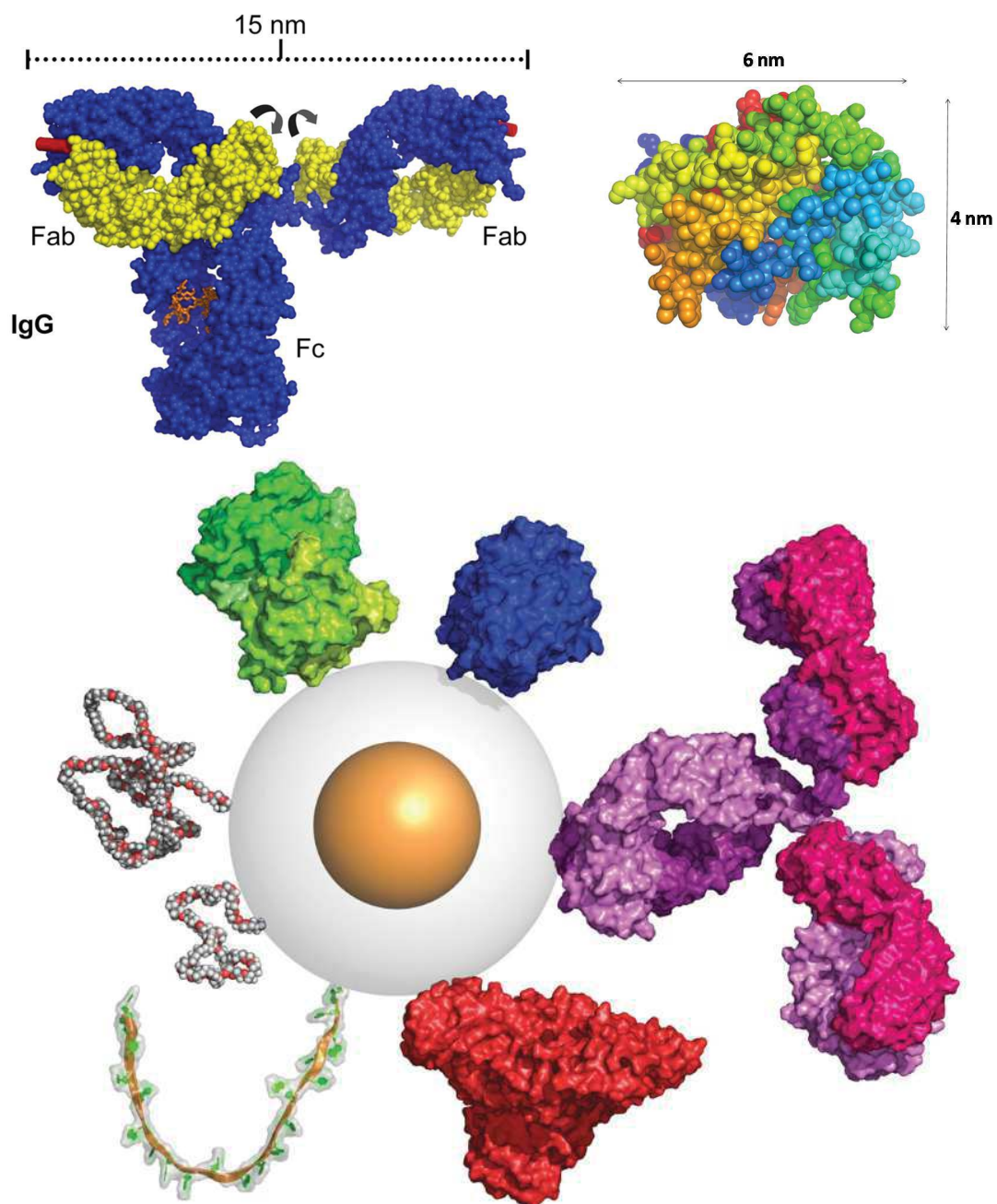


Figure S 2: IgG structure and size from reference (Klein et al. 2009), SEA structure and size from PDB 1ESF, and Relative size of nanoparticles and biomolecules, drawn to scale. Schematic representation of a nanoparticle with 5 nm core diameter, 10 nm shell diameter from reference (Sperling and Parak 2010)

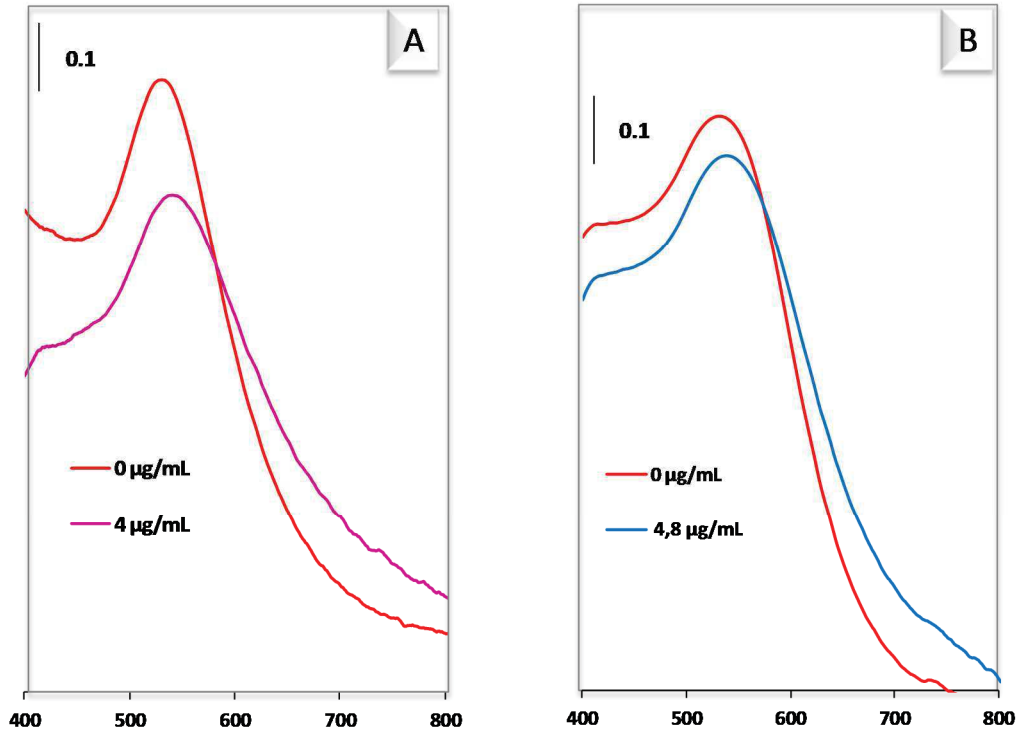


Figure S 3: LSPR bands obtained by reacting AuNP-Ab conjugates with free SEA (A) and AuNP-SEA (B)

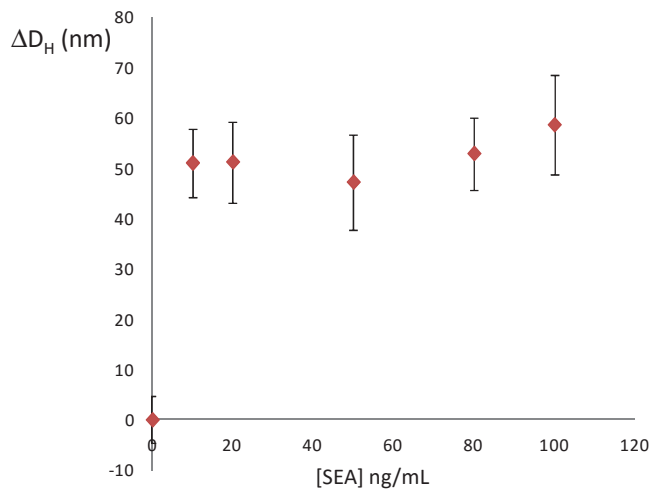


Figure S 4: Dose-response curve obtained by plotting the hydrodynamic diameter ΔD_H measured by DLS as a function of SEA concentration measured after 1 h incubation

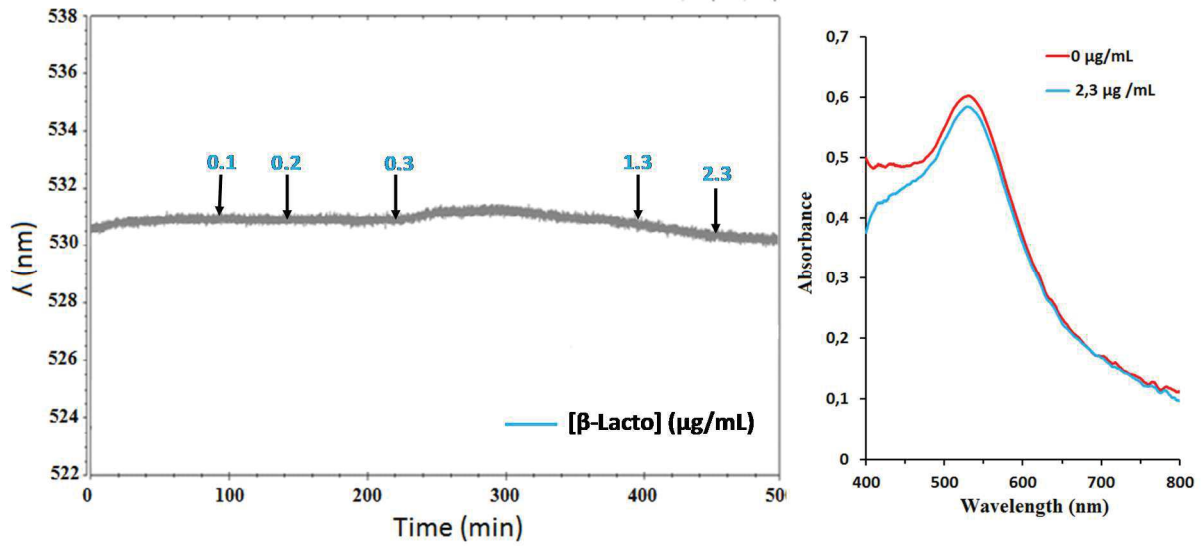


Figure S 5: LSPR monitoring of the specificity of the interaction using increasing concentration of β -lactoglobulin

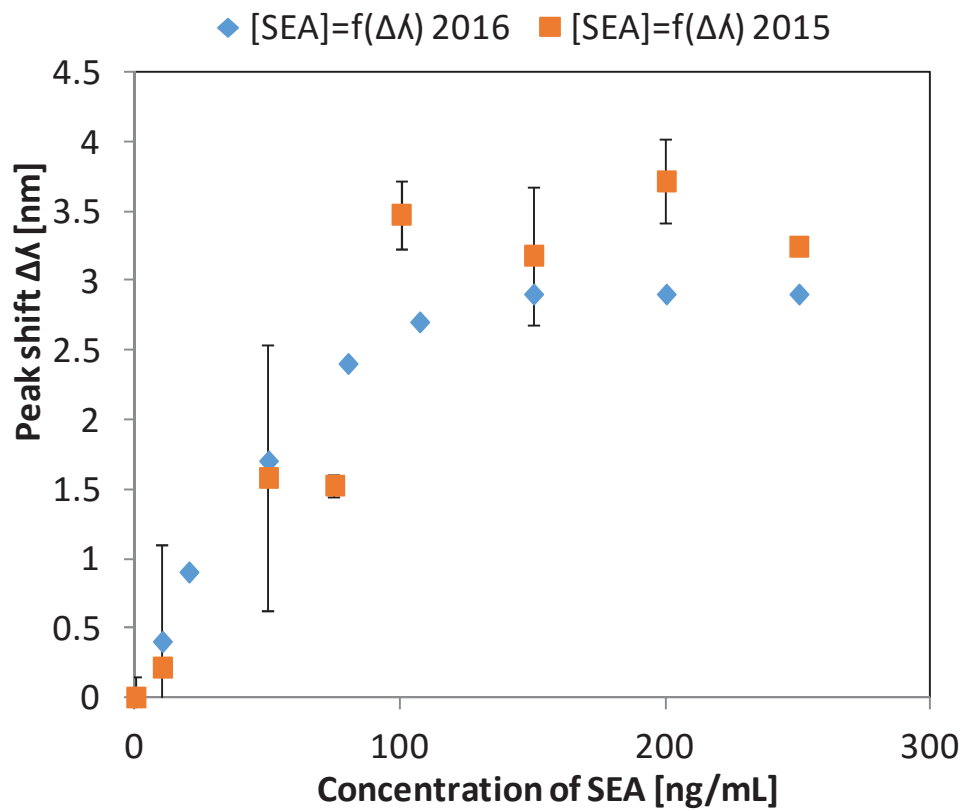


Figure S 6: Stability tests showing the response of the same bench of AuNP-Ab conjugates upon their synthesis (2015) and after a year storage in the refrigerator at 4°C (2016)

REFERENCES

- Klein, J.S., Gnanapragasam, P.N.P., Galimidi, R.P., Foglesong, C.P., West, A.P., Bjorkman, P.J., 2009. Examination of the contributions of size and avidity to the neutralization mechanisms of the anti-HIV antibodies b12 and 4E10. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(18), 7385-7390.
- Sperling, R.A., Parak, W.J., 2010. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 368(1915), 1333-1383.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette étude était de mettre au point une nouvelle stratégie d'élaboration d'immunocapteurs intégrant des nanoparticules d'or, dans le but d'améliorer leur sensibilité de détection. Afin d'y parvenir, deux voies ont été mises en œuvre. La première repose sur l'immobilisation des nanoparticules d'or sur les surfaces transductrices préalablement fonctionnalisées et la deuxième consiste à utiliser les nanoparticules d'or comme transducteurs pour les biocapteurs plasmoniques. Ces études ont été appliquées à la détection de deux cibles d'intérêt analytique différant par leurs poids moléculaire : le diclofénac, un polluant pharmaceutique, et l'entérotoxine A produite par la bactérie *S. aureus* (SEA).

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à la nanostructuration des biocapteurs piézoélectriques. L'immobilisation des GNPs sur des surfaces planes a été étudiée afin d'atteindre des architectures nanométriques utilisées comme plateformes d'immunodétection. L'enjeu, a été d'optimiser la densité et la dispersion des nanoparticules sur les surfaces fonctionnalisées pour former des couches reproductibles et stables. Nos travaux se sont alors articulés autour de deux axes : le premier concerne la synthèse de GNPs sphériques de forme homogène et de taille monodisperse et le second se rapporte à leur immobilisation sur des surfaces planes.

Dans un premier temps, la préparation de nanoparticules d'or a été réalisée suivant deux protocoles. Leur caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-visible et par MET a permis de comparer les deux synthèses et choisir le protocole permettant d'obtenir un contrôle fin de la taille et la forme des GNPs. Il s'agit du protocole combinant l'action des ions citrates et de l'acide tannique.

Ensuite, la fonctionnalisation des surfaces transductrices de silicium et d'or, une étape clé dans notre démarche, a été effectuée à l'aide silanes et de thiolalkyls possédant des longueurs de chaînes hydrocarbonées et des fonctions terminales différentes. Ainsi, trois surfaces ont été préparées pour chaque substrat avec les fonctions terminales suivantes : NH₂, NH₂/SH et PEG-NH₂. Cette étape a été vérifiée par différentes techniques de caractérisation de surface (angle de contact, PM-IRRAS/ATR, et XPS).

Ces surfaces ont ensuite été utilisées pour immobiliser les nanoparticules d'or d'environ 14 nm synthétisées par voie chimique selon la méthode citrate/acide-tannique. Les conditions de dépôt ont également été variées afin d'optimiser la dispersion des GNPs en surface.

Le suivi qualitatif et quantitatif en MEB a montré que la nature des fonctions chimiques exposées avait une influence sur le taux de recouvrement des surfaces par les GNPs. La création de points d'ancrage multiples (NH_2 et SH) permet d'obtenir un taux de recouvrement supérieur à celui observé pour les surfaces NH_2 . Les meilleurs résultats en termes de densité et dispersion ont été obtenus sur les couches PEG. Cette différence par rapport aux autres surfaces provient des propriétés des couches PEG qui piègent les GNPs par la création d'interactions multidentates entre les chaînes PEG et les atomes d'or des GNPs. Ce phénomène a été confirmé par la diminution de la dissipation en QCM lors du dépôt des GNPs sous flux du fait de la rigidification de la couche flexible de PEG suite à l'incorporation partielle des GNPs.

Par ailleurs, le dépôt des GNPs sous sonication et sous flux a permis d'améliorer la dispersion des GNPs et de limiter la formation d'agrégats de GNPs par rapport au dépôt sous agitation. Le dépôt des GNPs sous flux permet non seulement d'obtenir des surfaces nanostructurées ordonnées et de périodicité remarquable, mais il permet aussi de suivre cette étape *in situ* par QCM. Ainsi, le recouvrement des GNPs en surface peut être quantifié à la fois par MEB et par QCM. La maîtrise du dépôt des nanoparticules et la mise au point de protocoles reproductibles et quantifiables était un préalable nécessaire à l'élaboration de biocapteurs et à l'investigation de l'apport de la nanostructuration pour ces systèmes.

L'étape suivante a consisté à fonctionnaliser les GNPs immobilisées sur les surfaces en vue de pouvoir y greffer les biomolécules. Deux molécules différentes ont été utilisées pour la fonctionnalisation des nanoparticules : la cystéamine qui se lie aux GNPs *via* des groupements thiols, et le PEGdiamine (DAPEG) pour lequel la liaison est assurée par des fonctions amines. Les analyses MEB réalisées pour déterminer le taux de recouvrement après traitement par ces molécules ont montré que le DAPEG modifiait très peu la couche de nanoparticules d'or tandis que la cystéamine conduisait à la désorption des particules en excès et à une augmentation du taux d'agrégats.

Enfin, la construction des immunocapteurs piézoélectriques pour les deux cibles a été effectuée sur les surfaces ayant une dispersion et une densité de GNPs optimales. Pour le diclofénac, les surfaces avec une couche d'accroche et une post-fonctionnalisation PEG ont été utilisées. Cependant, ces surfaces ne sont pas avérées adaptées à des cibles protéiques comme la SEA à cause de l'effet répulsif des chaînes de PEG vis-à-vis des protéines qui a empêché le greffage des biorécepteurs sur les surfaces. Ainsi, pour la SEA, l'interface de détection a été développée sur les surfaces NH_2/SH avec une post-fonctionnalisation CEA.

La comparaison des performances des immunocapteurs classiques (plans) et nanostructurés pour les deux cibles a mis en évidence l'apport positif des GNPs. Les mesures par QCM ont

montré que la quantité d'anticorps (anti-DCF) capturé par les surfaces nanostructurées est jusqu'à 6 fois supérieure à celle mesurée pour les surfaces planes. Pour la SEA, la nanostructuration de surfaces a permis de diminuer la LOD à 5 ng/mL dans le format direct et 1 ng/mL pour le format sandwich, soit une amélioration de 60 % pour le format direct et 85 % dans le format sandwich.

Pour les deux immunocapteurs, cette amélioration ne semble pas dépendre uniquement de l'augmentation de la surface spécifique directement proportionnelle à la densité des GNPs en surface, mais résulterait davantage d'un gain en accessibilité des cibles et/ou biorécepteurs greffés du fait de la modification de la topographie de la surface.

Cette démarche analytique à l'échelle moléculaire a permis de montrer l'apport géométrique des GNPs et ouvre la voie à la réalisation de systèmes de détection spécifiques de sensibilité améliorée par rapport aux biocapteurs classiques. Le dépôt contrôlé de GNPs sur des surfaces planes présente également de nombreuses perspectives autres que l'amélioration de la sensibilité des biocapteurs. Les propriétés plasmoniques particulières des substrats plans décorés par des nanoparticules d'or sont aussi prometteuses si on les associe à des techniques optiques comme la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS).

Dans le prolongement des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, des essais de détection du diclofénac en format compétitif utilisant ces surfaces nanostructurées devront être effectués. Pour la SEA, des essais sur des échantillons alimentaires doivent être réalisés.

Il serait aussi intéressant de faire varier la concentration des GNPs déposées sous flux afin d'atteindre une densité maximale sans agrégation. Dans la même optique, la taille et la forme des nanoparticules pourrait être variée afin d'observer une éventuelle incidence sur l'accessibilité des deux cibles.

Dans une deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'utilisation des GNPs comme transducteurs dans les biocapteurs plasmoniques. Cette approche est basée sur les propriétés plasmoniques des GNPs, sensibles à l'environnement immédiat. Nous l'avons explorée pour deux stratégies, la première est dite «directe» et est basée sur la mesure du déplacement de la bande plasmon induit par la réaction immunologique entre la SEA et l'anticorps immobilisé sur les nanoparticules, et la seconde, «compétitive», est basée sur une stratégie d'agrégation/désagrégation d'un mélange de GNPs fonctionnalisés par des anticorps avec des GNPs fonctionnalisés par leur cible. La première partie de ce travail a été consacrée à la mise au point d'un protocole permettant de conjuguer les GNPs à l'anticorps (anti-SEA-GNPs) utilisant une immobilisation covalente. Il a aussi été appliqué à la cible pour former des SEA-

GNPs. Cette méthode assure une immobilisation contrôlée des molécules d'anticorps et d'analyte à la surface des GNPs. Cette étape a été vérifiée par le déplacement de la bande plasmon vers le rouge en UV-vis et une augmentation du diamètre des particules en DLS. La stabilité des bioconjugués formés a été étudiée et validée sur une période d'un an.

Ensuite, la réaction immunologique entre la SEA (libre/ immobilisée) et l'anti-SEA-GNPs a été suivie par LSPR. Dans les deux cas, une corrélation directe entre la variation de la position de la bande plasmon et la concentration de SEA a été établie.

Le biocapteur plasmonique opérant au format direct a permis la détection spécifique de la SEA en une seule étape et avec une limite de détection de 5 ng/mL. Ces résultats très prometteurs nous encouragent à persévérer dans cette voie afin d'abaisser encore le seuil de détection. Dans cette optique, on peut remplacer les GNPs sphériques par des nano-bâtonnets qui sont plus sensibles au changement local de l'indice de réfraction avec une variation de la bande LSPR longitudinale sur une gamme spectrale plus étendue. Vu que l'effet SPR est localisé, la diminution de la taille du biorécepteur cible permettrait d'accroître la sensibilité de la réponse plasmonique. Dans cette optique, les fragments d'anticorps sont d'excellents candidats qui permettraient de réduire la taille du récepteur tout en préservant l'excellente affinité des anticorps pour leur cible. Au cours de ce travail de thèse, nous avons entrepris une étude minutieuse de la fragmentation d'anticorps anti-SEA. Les premiers résultats que nous avons obtenus sont encourageants et ont abouti à l'obtention des fragments d'anticorps actifs (non dénaturés par le processus de fragmentation). Ces résultats n'ont pas été inclus dans le manuscrit mais ils ouvrent la perspective d'augmenter considérablement la réponse du biocapteur plasmonique direct. Ils permettraient également d'approfondir les travaux sur les biocapteurs plasmoniques compétitifs pour lesquels l'agrégation est fortement dépendante de la distance interparticulaire qui se trouverait fortement réduite.

Au-delà des biocapteurs plasmoniques, l'étude des biocapteurs piézoélectriques dans la première partie de ce travail, a montré l'importance capitale de l'accessibilité pour leurs performances. L'utilisation de fragments d'anticorps serait donc, là également, un moyen d'améliorer la réponse et d'augmenter la densité des cibles sur la surface.

Pour conclure, la compréhension des mécanismes inhérents à la biofonctionnalisation des nanoparticules d'or et la mise au point de protocoles de dépôt sur surface et en solution qui ont fait l'objet de ce travail bien qu'appliqués ici uniquement au domaine des biocapteurs sont extrapolables à tous les domaines d'applications nécessitant l'intégration maîtrisée de nanoparticules d'or en interaction ou non avec des biomolécules.

Annexes

Annexe 1

Méthodes de calcul

1- Calcul de la concentration des GNPs

Deux méthodes pour calculer C(GNPs) :

Théorique

Connaissant la concentration initiale de la solution de sels d'or et en supposant que la réduction de l'or (III) en atomes d'or est complète, la concentration des GNPs peut être déduite du rapport du nombre total d'atomes d'or sur le nombre d'atomes d'or par particules :

$$C(\text{GNPs}) = \frac{N_{\text{Total}}}{N_{\text{pp}} \cdot V \cdot N_A}$$

N_{Total} : nombre total d'atomes d'or dans la solution de 100 mL.

$$= n(\text{Au})_{\text{final}} \times N_A = 2.539 \cdot 10^{-5} N_A \text{ atomes.}$$

$$\Rightarrow C(\text{GNP}) = \frac{n_{\text{Au final}}}{N_{\text{pp}} \cdot V} = \frac{[\text{Au}]_{\text{final}}}{N_{\text{pp}}} = \frac{2,539 \cdot 10^{-4}}{N_{\text{pp}}}$$

N_{pp} : nombre d'atomes d'or par particule

$$= \frac{V_{\text{GNP}}}{V_{\text{atome Au}}} = 30,8967 D^3$$

$$V_{\text{GNP}} = \frac{\pi D^3}{6} \text{ avec } D = \text{diamètre moyen en nm} = 13,5 \text{ nm}$$

$$V_{\text{atome Au}} = \frac{M_{\text{Au}}}{N_A \cdot \rho_{\text{Au}}} = 1.695 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^3; M_{\text{Au}} = 197,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}; \rho_{\text{Au}} = \text{volumique de l'or} = 19,31 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3} = 19,31 \cdot 10^{-21} \text{ g} \cdot \text{nm}^{-3}; N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ atomes} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Rightarrow N_{\text{pp}} = 76017,47 \text{ atomes dans } 13,5 \text{ nm de diamètre}$$

$$\Rightarrow C(\text{GNP}) = 3,34 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Expérimentale

En se basant sur le plasmon des GNP [1] :

$$N = \frac{A(450)10^{14}}{D^2[-0,295 + 1,36 \exp(-(\frac{D-96,8}{78,2})^2)]}$$

Nous avons $A(450) = 0,60477$; $D = 13,5 \text{ nm}$

$$\Rightarrow N = 2,330 \cdot 10^{12} \text{ NP.mL}^{-1} = 3,874 \cdot 10^{-12} \text{ mol.mL}^{-1}$$

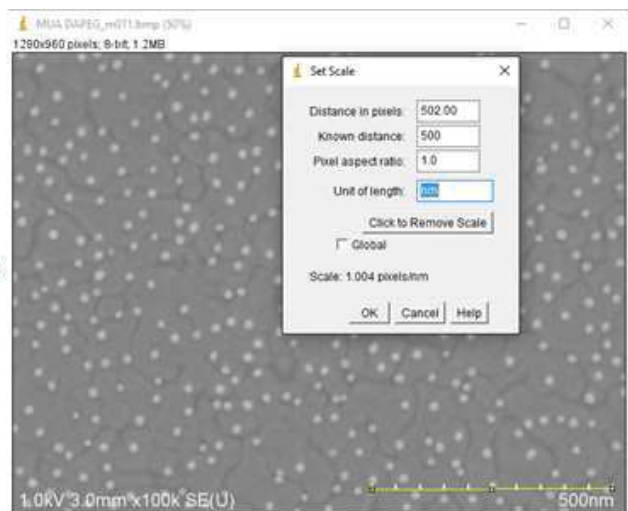
$$\Rightarrow (\text{GNP}) = 3,874 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$$

[1] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Analytical Chemistry 79 (2007) 4215-4221.

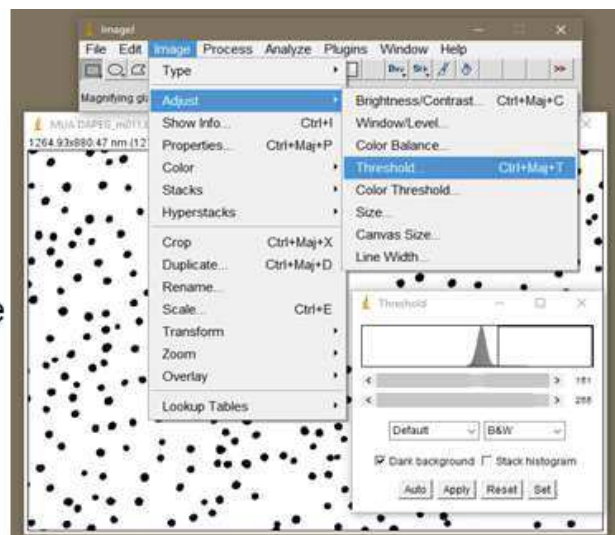
2- Traitement des clichés MEB et TEM par imageJ

Le traitement des clichés MEB et TEM, a été réalisé à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ. Une démonstration sur un échantillon de MEB est présentée ci-dessous afin de mieux comprendre la démarche suivie pour quantifier les nanoparticules d'or.

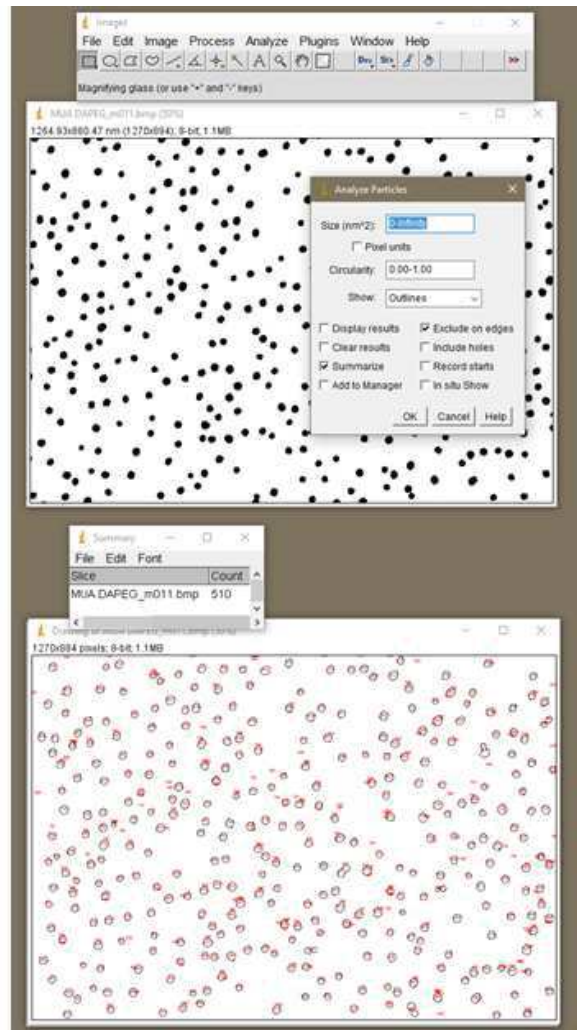
1- Correspondance pixel distance



2- Conversion de l'image en binaire



3- Choix des paramètres de mesure et analyse des images



3- Modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir représente le cas idéal de l'adsorption réversible d'une monocouche de molécules sans interactions entre elles sur des sites de fixation identiques. L'adsorption des protéines sur une surface est le plus souvent représentée par ce modèle. L'équation proposée pour décrire l'isotherme de Langmuir est de la forme :

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e}$$

Où q_e : capacité d'adsorption à l'équilibre ;

q_m : capacité d'adsorption de saturation ;

K_L : constante de Langmuir.

La transformée linéaire de Langmuir s'écrit :

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} C_e + \frac{1}{K_L q_m}$$

L'expression mathématique du modèle de Langmuir, appliquée à la variation de la fréquence en QCM est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{C}{\Delta f_{max}} + \frac{1}{K_a \Delta f_{max}}$$

Avec Δf la variation de fréquence, C la concentration de la solution injectée, Δf_{max} est la fréquence maximale, et K_a est la constante d'affinité.

Annexe 2

Données de caractérisation complémentaires

1- Caractérisation des surfaces par AFM

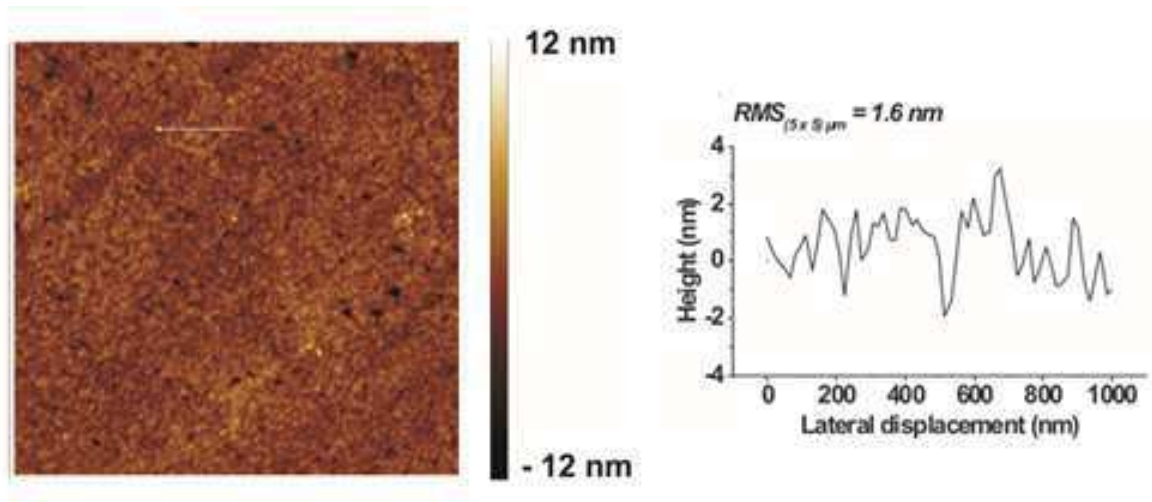


Figure 77 : Image AFM ($5 \times 5\text{-}\mu\text{m}$) et profil topographique sur une surface de silicium fonctionnalisée GOPTS-DAPEG.

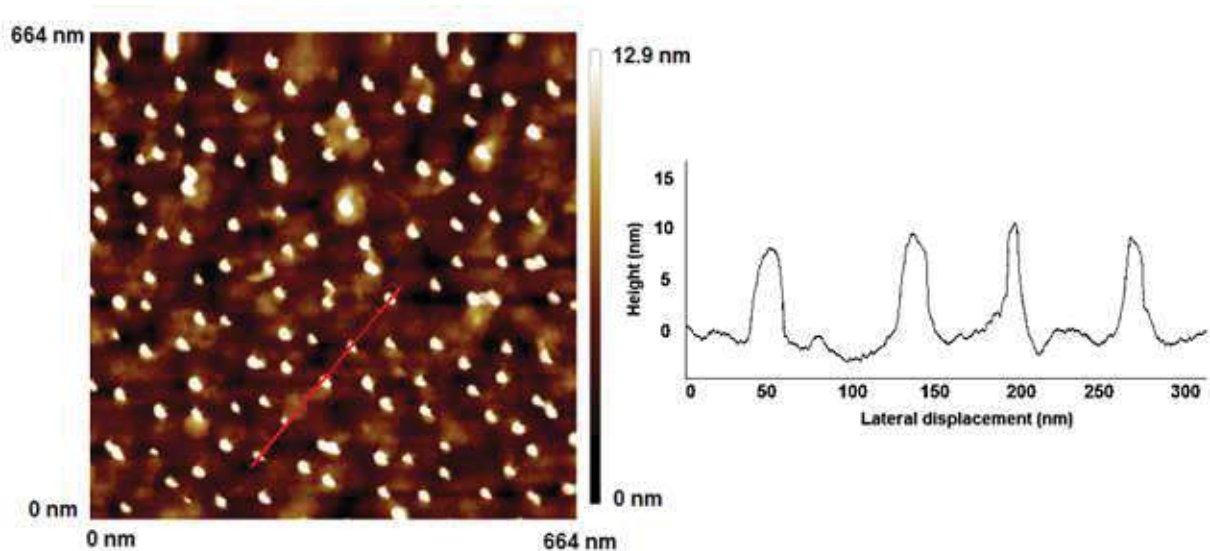


Figure 78 : Image AFM et profil topographique sur une surface de silicium fonctionnalisée GOPTS-DAPEG après dépôt des GNPs sous flux.

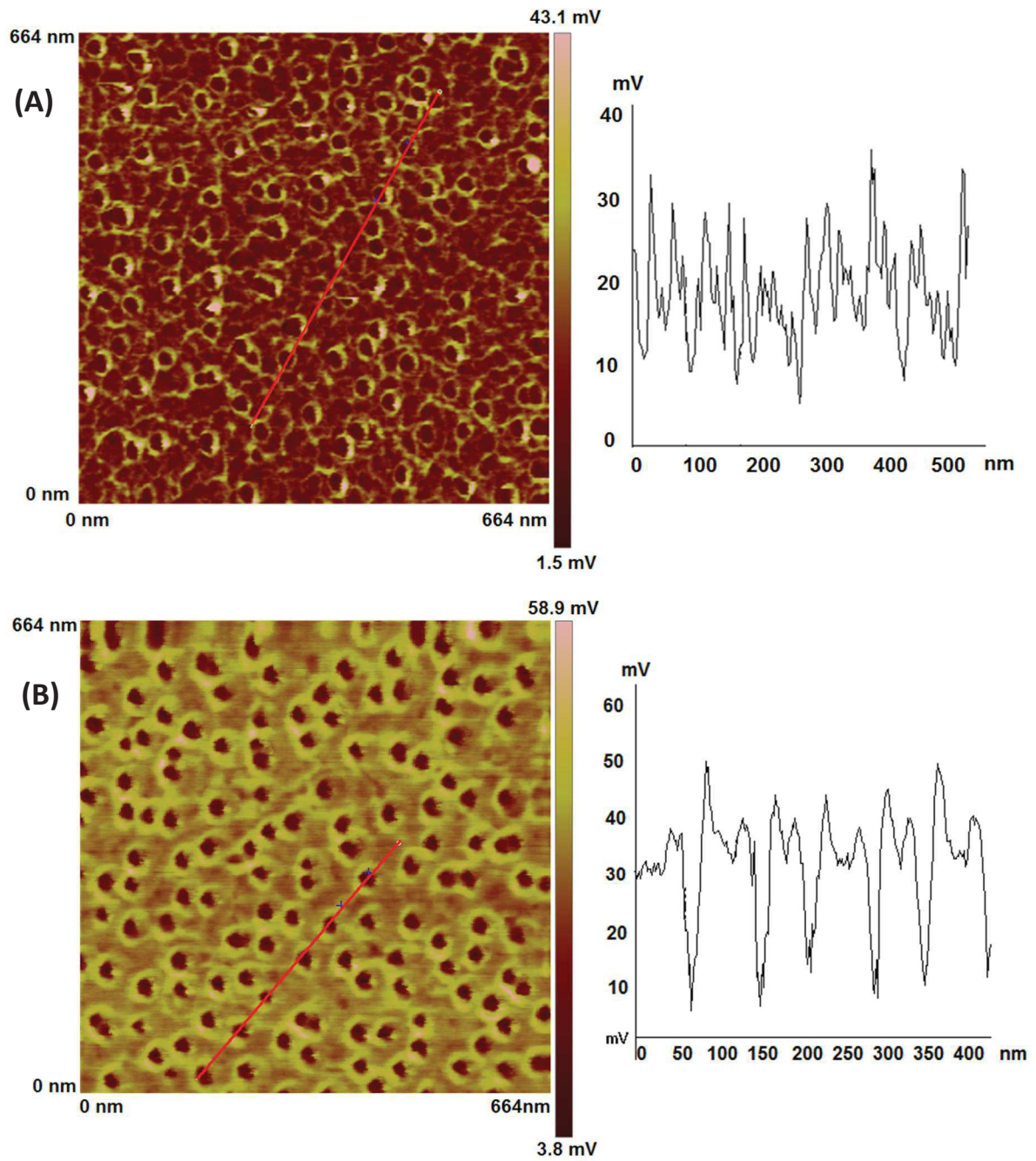


Figure 79 : Image AFM et profil d'adhésion sur une surface de silicium fonctionnalisée (A) APTES et (B) GOPTS-DAPEG après dépôt des GNPs sous flux.

2- $\Delta D = f(\Delta F)$

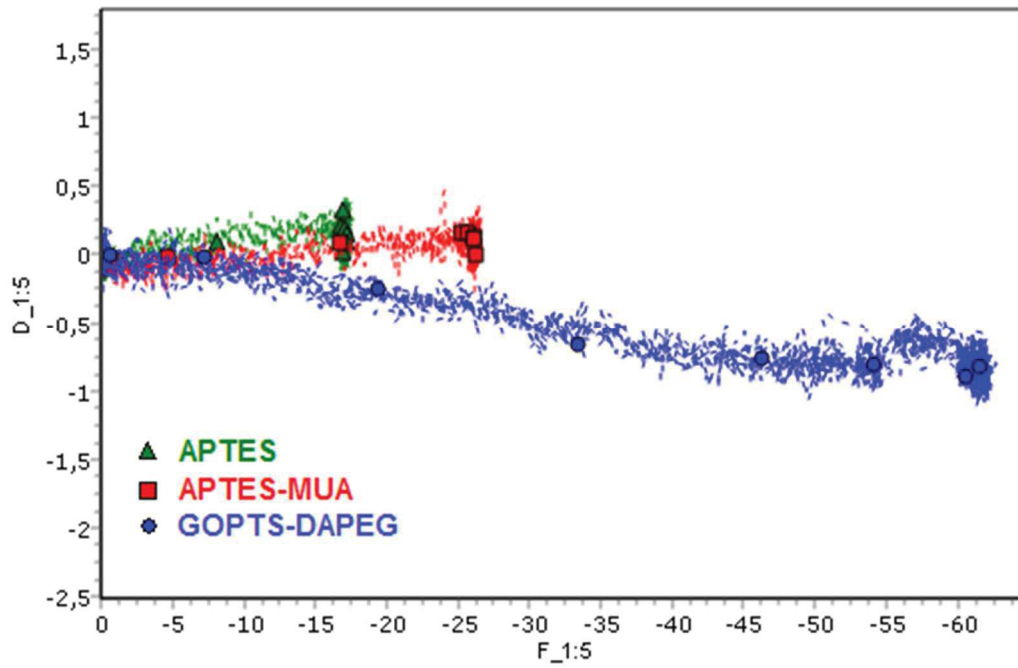


Figure 80 : Variation de la dissipation en fonction de la variation de fréquence de résonance lors du dépôt des GNPs sous flux sur les surfaces de silicium.

Publications

1. Ben Haddada, M.; Blanchard, J.; Casale, S.; Krafft, J.-M.; Vallée, A.; Méthivier, C.; Boujday, S., Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane. *Gold bulletin* 2013, 46 (4), 335-341. (Published)

Cette publication est issue de mon stage de M2 au LRS. Il s'agit des premières optimisations de l'immobilisation de nanoparticules sur les surfaces de silicium fonctionnalisées. En plus des techniques de caractérisation utilisées dans ce manuscrit, ces surfaces ont été aussi caractérisées par la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS).

2. Ben Haddada, M.; Huebner, M.; Casale, S.; Knopp, D.; Niessner, R.; Salmain, M.; Boujday, S., Gold nanoparticles assembly on silicon and gold surfaces: Mechanism, stability and efficiency in diclofenac biosensing. *Langmuir* 2016. (Submitted)

Cette publication englobe une partie des résultats de la thèse. Elle correspond à la construction de l'immunocapteur piézoélectrique nanostructuré pour la détection du Diclofénac.

3. Huebner, M.; Ben Haddada, M.; Methivier, C.; Niessner, R.; Knopp, D.; Boujday, S., Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 67, 334-341. (Published)

Cette publication est en collaboration avec les partenaires allemands sur les surfaces planes pour la détection du Diclofénac.

4. Dalstein, L.; Ben Haddada, M.; Barbillon, G.; Humbert, C.; Tadjeddine, A.; Boujday, S.; Busson, B., Revealing the Interplay between Adsorbed Molecular Layers and Gold Nanoparticles by Linear and Nonlinear Optical Properties. *The Journal of Physical Chemistry C* 2015, 119 (30), 17146-17155. (Published)

Cette publication est le fruit d'une collaboration avec l'équipe SFG du Laboratoire de Chimie Physique (LCP) de l'université Paris-Sud. Dans ce travail, j'ai optimisé la réalisation d'interfaces composées de nanoparticules d'or sur des substrats de silicium fonctionnalisés par des silanes qui devait être extrêmement fiable et reproductible pour permettre des analyses exploitables en SFG. Cette étude illustre donc le potentiel des surfaces préparées pour la spectroscopie optique non linéaire par génération de fréquence somme (SFG).

5. Mercier, D.; Ben Haddada, M.; Huebner, M.; Knopp, D.; Niessner, R.; Salmain, M.; Proust, A.; Boujday, S., Polyoxometalate nanostructured gold surfaces for sensitive biosensing of benzo[a]pyrene. *Sensors Actuators B: Chem.* 2015, 209, 770-774. (Published)

Dans cette publication nous nous sommes intéressés à la détection piézoélectrique d'un autre haptén, le benzo[a]pyrène (BaP), qui était une des cibles de faible poids moléculaire que j'ai explorées avant de me concentrer sur le diclofénac. La nanostructuration y est assurée par les polyoxométallates (POMs) et nous avons fait des essais pour y inclure également des nanoparticules d'or mais ils n'ont pas été concluants. J'ai aussi participé aux mesures par QCM.

Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane

Maroua Ben Haddada · Juliette Blanchard ·
Sandra Casale · Jean-Marc Krafft · Anne Vallée ·
Christophe Méthivier · Souhir Boujday

Published online: 17 November 2013

© The Author(s) 2013. This article is published with open access at SpringerLink.com

Abstract Immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces is of great interest to many scientific communities; chemists, physicists, biologists, and the various communities working at the interfaces between these disciplines. Controlling the immobilization step, especially nanoparticles dispersion and coverage, is an important issue for all of these communities. We studied the parameters that can influence this interaction, starting with the nature of the terminal chemical function. Thus, we have carefully grafted silanes terminated by either amine or thiol groups starting from aminopropyltriethoxysilane (APTES) or mercaptopropyltriethoxysilane. We also changed the chain length for thiol-terminated layers through covalent grafting of mercaptoundecanoic acid (MUA) on APTES-modified layers, and the protocol of nanoparticles deposition to evaluate whether other factors must be taken into consideration to rationalize this interaction. The formed layers were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy and gold nanoparticles deposition was monitored by scanning electron microscopy and surface-enhanced Raman scattering. We observed significant differences in terms of nanoparticles dispersion and density depending on the nature of the chemical layer on silicon. The use of ultrasounds during the deposition process

was very efficient to limit aggregates formation. The optimal deposition procedures were obtained through the use of APTES and APTES/MUA functionalization. They were compared in terms of coverage, dispersion, and densities of isolated nanoparticles. The APTES/MUA surfaces clearly showed better results that may arise from both the longer chain and the dilution of thiol end groups.

Keywords Gold nanoparticles · Silicon surface · Silane grafting · Surface functionalization · XPS · Scanning electron microscopy

Introduction

The fabrication of solid substrates with gold nanoparticles assemblies immobilized on their surface is currently the subject of growing interest because of the key role these substrates could play in the development of several devices [1–3]. The physical and chemical properties of these devices will depend not only on the size and shape of the gold nanoparticles but also on their spatial arrangement and on the nature of their interaction with the substrate surface [4–6]. Biosensors represent one of the areas for which the use of nanoparticles is booming. Indeed, biosensors are analytical tools whose effectiveness is highly dependent on the accuracy of the measurement and thus on its reproducibility [7, 8]. Input from gold nanoparticles in this area is twofold: on the one hand, they allow amplification of the signal transduction for many techniques and, on the other hand, they can provide surface nanostructuration [9, 10]. In both cases, achieving a densely packed layer and a regular arrangement is crucial to ensure an optimal amplification while preserving a reproducible and quantitative response of transduction techniques [11, 12].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13404-013-0120-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Ben Haddada · J. Blanchard · S. Casale · J.-M. Krafft ·
A. Vallée · C. Méthivier · S. Boujday
UPMC Univ Paris 6, UMR CNRS 7197, Laboratoire de Réactivité de
Surface, 75005 Paris, France

M. Ben Haddada · J. Blanchard · S. Casale · J.-M. Krafft ·
A. Vallée · C. Méthivier · S. Boujday (✉)
Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR CNRS 7197, Université
Pierre et Marie Curie-Paris VI, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05,
France
e-mail: souhir.boujday@upmc.fr

Usually, the anchoring of gold nanoparticles on the solid substrates is carried out by using an intermediate layer of organic molecules grafted on the solid surface, whose terminal functional groups are selected for their electrostatic or chemical interactions with the nanoparticles [11–16]. These platforms should also be stable over time and the interaction of the nanoparticles with the surface should be strong enough to ensure that the nanoparticles remains attached to the surface during further functionalization and upon utilization. The molecules commonly used for the functionalization of oxidized silicon wafer or glass slides are organosilane with up to three hydrolysable groups (either –OR or –Cl) that would react with the silanols groups from the substrate surface and (at least) a nonhydrolysable group bearing the terminal function responsible for the interaction with the gold nanoparticles [17]. Among the large variety of available organosilanes, aminopropyltriethoxysilane (APTES; $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$) is, by far, the most studied surface modifier (references [18–21] and references therein). APTES is relatively easy to handle thanks to its moderate reactivity. Its three hydrolysable ethoxy groups ensure a robust anchoring of the silane to the surface (silanization step), whereas the amine function of the aminopropyl group remains available for further reaction. Terminal amine functions are extensively used for surface functionalization because they easily react with acid, aldehyde, or thiocyanates through covalent bond. Moreover, amine groups have affinity to gold nanoparticles and are widely used to immobilize them through electrostatic interactions [4, 11, 14].

The numerous studies dealing with the functionalization of silica/oxidized silicon surface with APTES have shown that the silanization step is very sensitive toward experimental conditions and that the final surface state of the modified substrate depends strongly on temperature, presence of water, concentration of APTES, and the duration of the grafting step [18].

In this work, we studied the organic layer influence on the grafting of gold nanoparticles on functionalized silicon substrates. Our aim was to find the optimal experimental conditions for both an optimal density and dispersion of gold nanoparticles on silicon surfaces. For this purpose, we explored some of the parameters that can influence this interaction, starting with the nature of the terminal chemical function. In a first step, APTES was used to form amine-terminated silane layers. Then, starting from mercaptopropyltriethoxysilane (MPTES), thiol-terminated silane layers were constructed. We also changed the chain length for thiol-terminated layers through covalent grafting of mercaptoundecanoic acid (MUA) on APTES-modified layers. This latter functionalization procedure was successfully used by Kaminska et al. to immobilize CTAB-covered nanoparticles on silicon and reach a densely packed layer [22]. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and contact angle measurements were used to characterize the formed layers and the protocol of nanoparticle deposition was

modified, particularly using ultrasonication during the deposition of the spherical gold nanoparticles. The grafting of nanoparticles was monitored by surface-enhanced Raman scattering (SERS). Finally, scanning electron microscopy (SEM) was used to compare gold nanoparticles coverage and dispersion for the considered surface functionalizations.

Experimental section

Materials

N-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino) propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC; 98 %), sodium citrate ($\text{HO}(\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 99 %), and gold(III)chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\geq 99.9\%$) were purchased from Sigma Aldrich. *N*-hydroxysuccinimide (NHS; 97 %), 11-mercaptoundecanoic acid (MUA; 95 %), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES; 99 %) and (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTES; 95 %) were purchased from Aldrich and ethylenediamine (EDA; $\geq 99.5\%$) from Fluka. Silicon wafer <100> from Sigma Aldrich was cut into $1 \times 1 \text{ cm}^2$ pieces. Sulfuric acid, 96 % (H_2SO_4) and hydrogen peroxide, 30 % in water (H_2O_2) were supplied by Carlo Erba. Toluene, acetone, and ethanol were purchased from Analar Normapur. MilliQ water (18 M Ω , Millipore, France) was used for the preparation of the solutions and for all rinses. All chemicals were reagent grade or higher and were used without further purification.

Surface chemistry

First, silicon surfaces were cleaned following a procedure which includes several washing step, a treatment with a piranha solution, and finally a treatment with UV ozone. A detailed description of this procedure is given in reference [18].

The same experimental conditions were applied for silane grafting for the amine-terminated silane (APTES) and for the thiol-terminated one (MPTES): the surface oxidized and cleaned silicon wafer was immersed in a 50 mM solution of silane in anhydrous toluene at 75 °C for 24 h. After silanization step, the samples were washed twice, sonicated for 10 min in anhydrous toluene, dried under nitrogen, and heated at 90 °C for 2 h.

The MUA grafting was achieved after APTES deposition on silicon surfaces. First, MUA solution was activated using a mixture of EDC and NHS in ethanol during 90 min and then the APTES-modified silicon surfaces were placed in the activated solution of MUA for 90 min, then washed twice in ethanol and dried under nitrogen.

Gold nanoparticles preparation and deposition

Citrate-stabilized gold nanoparticles (GNPs) were prepared according to the standard method developed by J. Turkevich and co-workers and refined by G. Frens. Details on solution storage and particles dispersion are given in references [11, 12].

Freshly synthesized Au NPs were then deposited, with no further dilution, on the modified silicon surfaces for 2 h either using a gentle agitation or using a sonication bath (Elma, 90 W, 45 kHz). Silicon substrates were then washed twice in water and dried under nitrogen.

Characterization techniques

TEM Transmission electron microscopy measurements were performed using a JEOL JEM 1011 microscope operating at an accelerating voltage of 100 kV. The transmission electron microscopy (TEM) grids were prepared as follows: typically 1.5 mL of the solution was centrifuged at 10,000 rpm (equivalent to 11,200 relative centrifugal forces) for 10 min to precipitate the particles. The colorless supernatant was discarded. The heavy residue was redispersed in a suitable volume of deionized water depending on the quantity of the residue. Of this redispersed particle suspension, 2 μL was placed on a carbon-coated copper grid and dried at room temperature.

SEM Scanning electron microscopy images of the gold nanoparticles on the modified silicon wafers were obtained using a SEM FEG Hitachi SU-70 scanning electron microscope with a low voltage of 1 kV and distance of 1.9–2.3 mm; the secondary electron detector “in Lens” was used. The distribution of gold nanoparticles on the surfaces was established considering 1,000–1,500 particles.

Contact angle measurements Static water contact angles were measured at room temperature using the sessile drop method and image analysis of the drop profile. The instrument, which uses a CCD camera and an image analysis processor, was purchased from Krüss (Germany). The water (Milli-Q) droplet volume was 1 μL and the contact angle (θ) was measured 5 s after the drop was deposited on the sample. For each sample, the reported value is the average of the results obtained on three droplets and the overall accuracy in the measurements was better than $\pm 5^\circ$.

XPS XPS analyses were performed with a PHOIBOS 100 X-ray photoelectron spectrometer from SPECS GmbH (Germany) with an monochromated Al K α X-ray source ($h\nu=1,486.6$ eV), operating at 10^{-10} Torr or less, in a “fixed analyzer transmission” analysis mode with a 7×20 mm entrance slit, leading to a resolution of 0.1 eV. A 10 eV pass

energy for the survey scan and 10 eV pass energy for the small regions were applied. The spectra were fitted using Casa XPS software (version 2.3.13, Casa Software, UK).

SERS Surface-enhanced Raman scattering spectra were recorded in the $500\text{--}1,900$ cm^{-1} range on a modular Raman spectrometer (Model HL5R of Kaiser Optical Systems, Inc.) equipped with a high-powered near-IR laser diode working at 785 nm. Before spectra acquisition, an optical microscope (Olympus; objective, $\times 50$) was used to focus the laser beam. Measurements were carried using an objective $\times 100$. The laser output power was 10 mW, which corresponds to ~ 1 mW on samples. For each spectrum, 30 acquisitions of 5 s were recorded to improve the signal-to-noise ratio. To ensure a representative characterization of surfaces, a minimum of three measurements were taken on different parts of the surface.

Results and discussion

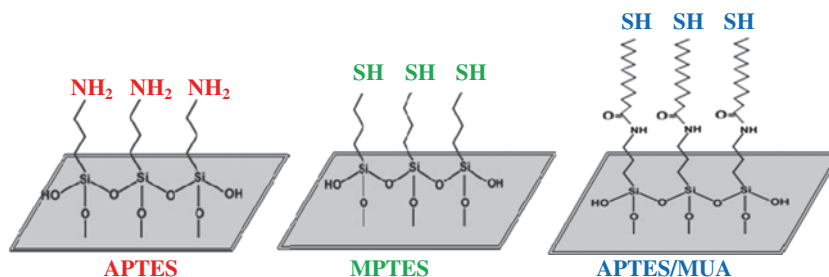
Silane grafting and surface characterization

Gold nanoparticles are commonly immobilized on amine-terminated layers, through electrostatic interaction or on thiol-terminated layers through covalent bonds. These two terminations were compared herein through the use of APTES or MPTES for silanization. Adding MUA on the APTES layer would lead to a longer chain terminated also by a thiol function, and thus enabling us to establish the influence of an additional parameter, namely, the hydrocarbon chain length. The three chemical modification of silicon surfaces are shown in Fig. 1. In a first stage, the efficiency of silane binding and further chemical grafting was investigated through contact angle measurements and XPS analysis of the functionalized silicon surfaces.

Contact angle measurements were performed to investigate the hydrophilic character of the three functionalized silicon surfaces. The pictures obtained with the CCD camera and the corresponding angles are shown in Fig. 2.

The initial clean silicon surface (Fig. 2a) was very hydrophilic and the contact angle ($<10^\circ$) could not be measured due to drop spreading. This result confirms the efficiency of the applied cleaning procedure to remove the organic contaminants from the surface [23]. Upon APTES grafting (Fig. 2b), the measured contact angle was 83° , indicating a hydrophobic layer. This result is in agreement with previously observed values [18], the hydrophobic character, in apparent contradiction with the hydrophilic terminal amine functions, is probably due to the folding of amine terminal function to form H bonds with free silanol groups [24]. For the MPTES functionalization, the contact angle was lower than for

Fig. 1 Schematic description of the three functionalized surfaces

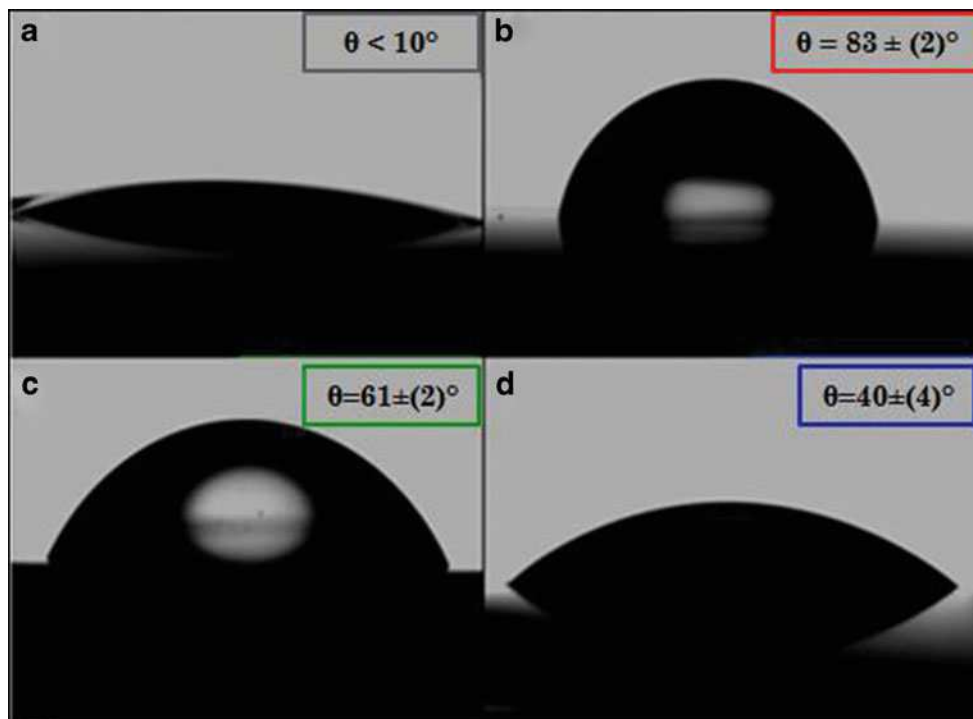


APTES-modified surfaces ($\sim 61^\circ$). This higher hydrophilicity may be due to the lower tendency of sulfur to form hydrogen bonds; which could induce less folding of the silane chains. But another possibility, that will be discussed hereafter, on XPS data basis, is the incomplete coverage of silicon surface by MPTES; this would indeed lower contact angle values as the measured value will include a contribution of the hydrophilic-bare silicon oxide. Finally, upon grafting MUA on the APTES-modified layer, an even lower contact angle was recorded, $\sim 40^\circ$, suggesting a higher hydrophilic character of the resulting surfaces. The increase of hydrophilic character with chain length was observed likewise by Wasserman et al. upon assembling chloroalkylsilanes on silicon surfaces [25]. The most likely explanation is the increase of the layer crystallinity and organization due to the increase of Van der Waals interactions between alkyl chains [26]. This higher crystallinity would reduce the folding of the terminal groups, thus exhibiting the hydrophilic part of the grafted molecule on the upmost of the surface [27].

The modified silicon surfaces were also characterized by XPS analysis. The main XPS spectra are shown in Fig. 3. On all the survey spectra, in addition to the silicon and oxygen peaks arising from silicon wafers and the silica layer, carbon, nitrogen, and sulfur for APTES/MUA- and MPTES-modified surfaces were present. On the Si 2p peaks, shown in Fig. 3, two contributions were observed; the first one at ~ 99 eV, arises from bulk silicon wafer Si^0 , and the second contribution at higher binding energy, ~ 103 eV is attributed to Si^{IV} in both oxide layer and grafted silanes. The ratio $\text{Si}^{\text{ox}}/\text{Si}^0$ was calculated to compare silane coverage, assuming the silica layer was similar in all cases. For the three surfaces, the values were very close, 0.64, 0.62, and 0.56, for APTES, MPTES, and APTES/MUA, respectively, suggesting similar average coverages with silanes, and not enabling a precise comparison of the amounts of grafted silanes.

The N 1s peaks included two contributions attributed to amine groups $[\text{C}-\text{NH}_2]$ (at 399.8 eV) and protonated amines $\text{C}-\text{NH}_3^+$ (at 401.6 eV). The shape of this peak was modified

Fig. 2 Static water contact angles pictures, and corresponding angles; **a** cleaned (oxidized) silicon wafer, **b** silicon-grafted APTES, **c** silicon-grafted MPTES, and **d** silicon-grafted APTES/MUA



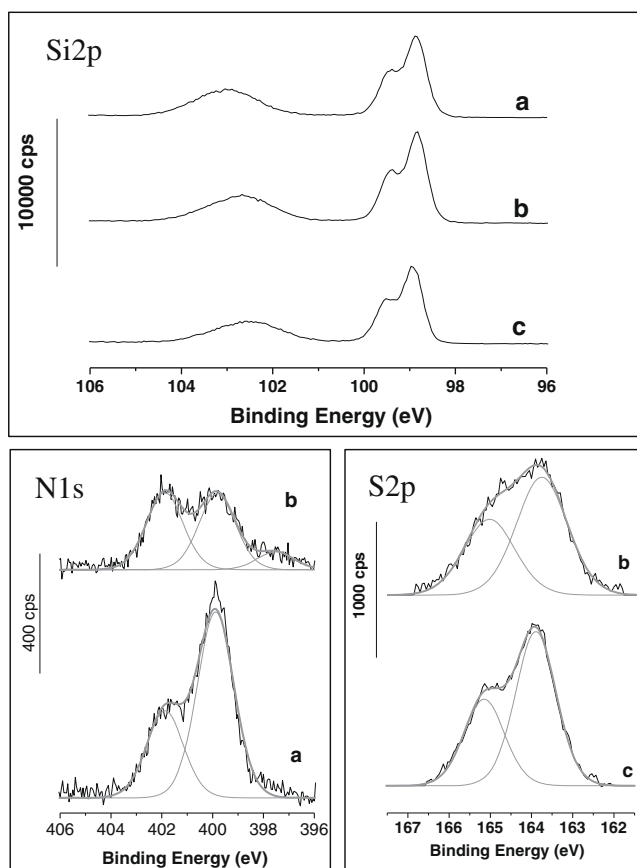


Fig. 3 XP spectra Si 2p, N 1s, and S 2p signals after APTES (a), APTES/MUA (b), and MPTES (c) grafting on silicon surfaces

upon grafting MUA, but it is difficult to discriminate the contribution of amide nitrogen [C=O)-NH] from the amine one [28]. The S 2p spectra showed the S 2p doublet at 163.6 and 164.9 eV for S 2p_{3/2} and 2p_{1/2}, respectively, corresponding to the sulfur in the SH groups.

For the APTES/MUA-modified surface, the ratio S/N calculated using S 2p and N 1s peak was 0.24. Thus, despite the

large excess of MUA in solution, only ca. 24 % of amine groups have reacted with the acid function of MUA. Therefore, thiol-end groups on these surfaces are “diluted” and four times less numerous than amine functions on APTES-modified surfaces. In addition, the integration of the S 2p for both APTES/MUA and MPTES led to similar amounts of sulfur. Therefore, the use of MPTES would have led to a silane coverage four times lower than the use of APTES. This low value is not surprising as it was established that the terminal amine groups of APTES act as catalysts for silane reaction with silanols, thus enhancing the efficiency of grafting [24, 29]. We confirmed these observations by performing the MPTES grafting using a small amount of ethylenediamine as catalyst. The XPS results (see Electronic supplementary material (ESM) 1) showed an increase of sulfur amount by a factor of 3.7, indicating a silane cover close to that obtained for APTES.

Gold nanoparticles deposition and characterization

Before interacting with the silane layers, the solution of gold nanoparticles was characterized by UV–visible spectroscopy. On this spectrum (see ESM), a narrow plasmon band was present at 525 nm, indicating a homogeneous particle size of ~13 nm [30, 31]. Gold nanoparticles size and distribution were also confirmed by TEM images (see ESM 1).

Figure 4 shows the Raman spectra of functionalized silicon surfaces before and after gold nanoparticles deposition. On the Raman spectrum of the functionalized silicon surface before the deposition of GNPs, the vibration bands of silanes could not be seen and only silicon signal was observed around 500 and 1,000 cm⁻¹ for the silica layer. After gold nanoparticles deposition, a SERS effect is expected [32, 33]. For the three functionalized surfaces, a Raman signal was observed, evidencing the grafting of gold nanoparticles [34, 35].

Fig. 4 Raman spectra obtained for gold nanoparticles deposited on silicon surfaces modified by APTES/MUA (a), APTES (b), and MPTES (c). **d** Silane layers prior to gold nanoparticles deposition

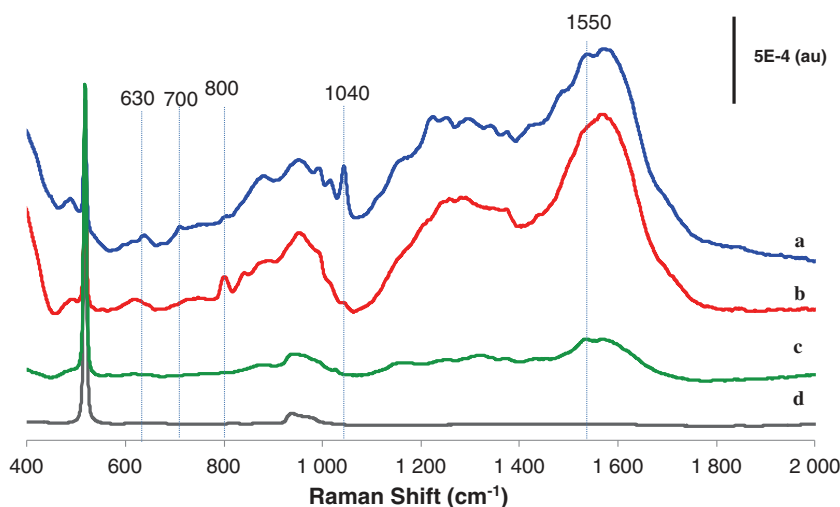
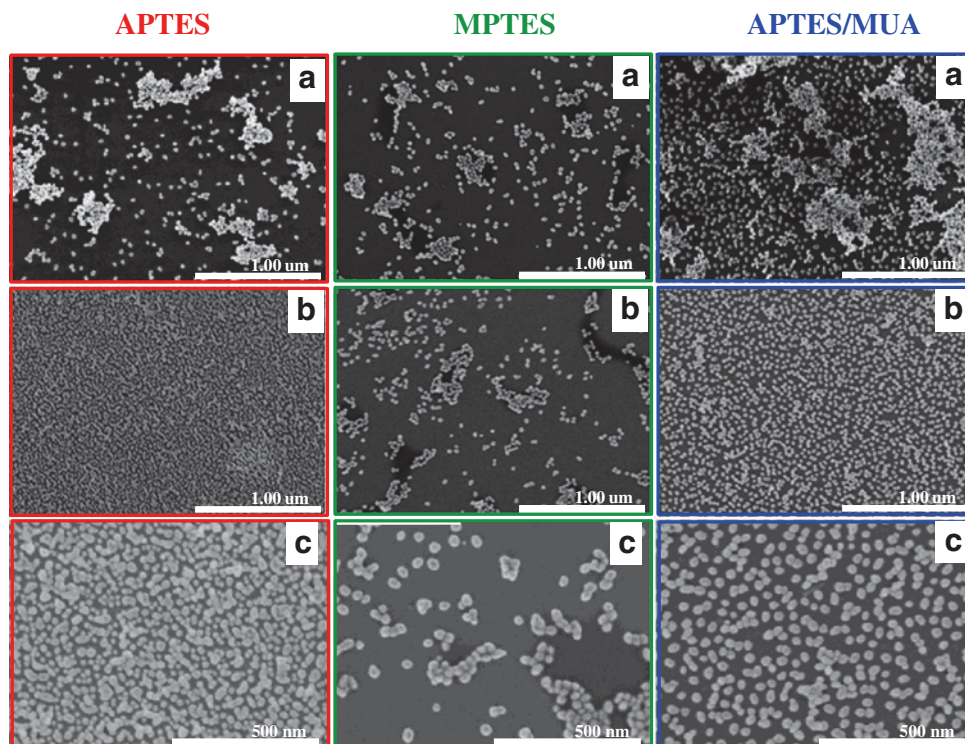


Fig. 5 SEM images of silicon surfaces after nanoparticle deposition without (a) and with (b and c) sonication on APTES, MP TES, and APTES/MUA



The main bands observed on SERS spectra arise from the characteristic bands of citrates and mainly of the carboxylate groups between 1,200 and 1,600 cm^{-1} [11, 36]. The ν (C–C) arising from citrates and silane carbon chain formed massif of bands in the region 900–1,100 cm^{-1} . Some differences, related to the different underlayer compositions, were observed and highlighted on the figure. On APTES/MUA, bands were present corresponding to ν (C–S)_G at 630 cm^{-1} and ν (C–S)_T at 700 cm^{-1} , which is absent from the APTES spectrum. The intensities of the bands at 800 and 1,040 cm^{-1} arising from amine functions were modified upon MUA grafting on APTES and an additional band, amide II, appeared at 1,552 cm^{-1} [37].

Considering the citrates bands, the intensity of the signal was dependent on the system: While APTES- and APTES/MUA-modified surfaces led to similar intensities; the MP TES-modified surfaces exhibited lower exaltation. This may be due to a lower coverage of GNPs as discussed below.

Figure 5 shows SEM images recorded after deposition of gold nanoparticles on APTES-, APTES/MUA-, and MP TES-modified silane surfaces. In Fig. 5a, the images obtained when nanoparticle deposition was carried out with a gentle agitation are shown. The highest coverage in gold nanoparticles was clearly observed on APTES/MUA-modified surfaces. However, for the three surface functionalization nanoparticles, aggregates are clearly observable with this deposition procedure.

When gold nanoparticles deposition was done under sonication, the largest nanoparticles aggregates were removed on both APTES and APTES/MUA surfaces. On these two systems, the dispersion was also clearly improved. The GNPs

coverage on APTES was considerably increased. On MP TES layers, no significant improvement was observed using the sonication bath. The same results were obtained upon depositing the nanoparticles on the MP TES catalyzed by ethanediamine with or without sonication (images in the ESM 1). The sulfur density at silicon surface is therefore not a determining factor for this system.

Despite the improved dispersion and the removal of the largest aggregates, a closer inspection of the SEM images at higher magnification (Fig. 5c) showed the presence of small aggregates especially on APTES layers. To compare efficiently the dispersion on APTES and APTES/MUA layers, particle distributions were quantified for these two functionalizations and are presented as histograms in Fig 6.

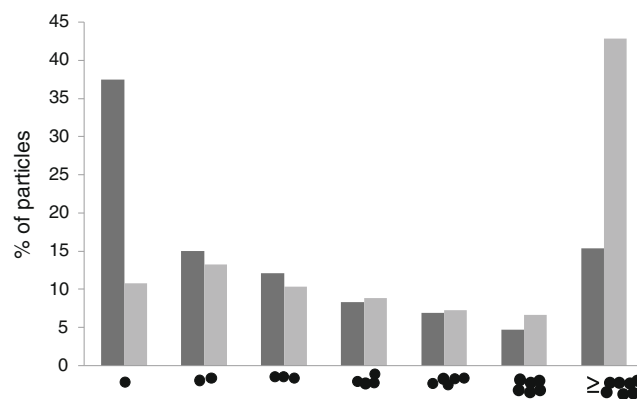


Fig. 6 Gold nanoparticles distribution on APTES/MUA (dark) and on APTES (bright)-modified layers

The comparison of the aggregate size distribution for the two functionalized surfaces clearly showed that the APTES/MUA functionalization allowed a better dispersion of the gold nanoparticles with a large fraction of isolated particles whereas, on the APTES functionalized surface, the nanoparticles formed higher amount of large aggregates. This better dispersion of gold nanoparticles on the MUA/APTES layer may result from the dilution of terminal functions on this system, 24 % SH on MUA/APTES vs 100 % NH₂ on APTES. Indeed, similar behavior was observed using mixed thiol self-assembled monolayers to immobilize proteins: the dispersion was better when the terminal functions were diluted [38, 39]. The length of the alkyl chain induces also a better flexibility of the organic layer that probably favors nanoparticles binding compared to the MPTES layer [8].

Conclusion

We studied the organic layer influence on the grafting of gold nanoparticles on functionalized silicon substrates. To this aim, we grafted silanes terminated by either amine or thiol groups starting from APTES or MPTES. A third layer, also terminated by a thiol function, was constructed by covalent attachment of MUA on APTES-modified layers. XPS characterizations confirmed the successful grafting of APTES and MPTES on silicon surfaces. Upon adding MUA to the APTES-modified layers, only 24 % of the amine functions reacted. Spherical gold nanoparticles were then deposited on these layers. SEM revealed that sonication during the deposition procedure limited the presence of aggregates on the surfaces. The higher coverage in gold nanoparticles was observed on APTES and APTES/MUA layers. SEM images also showed that gold nanoparticles dispersion was better on APTES/MUA than on APTES, with a larger fraction of isolated particles and few aggregates. This system likely benefits from both the dilution of terminal functions, 24 % SH, and the flexibility of the organic layer.

Acknowledgments This work financially supported by the Agence Nationale de la Recherche “NArBioS” project (ANR-DFG program; grant number: ANR-11-INTB-1013). The authors are grateful to Claire-Marie Pradier for her interest in the work.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Sardar R, Funston AM, Mulvaney P, Murray RW (2009) *Langmuir* 25:13840–13851
- Hoa XD, Kirk AG, Tabrizian M (2007) *Biosens Bioelectron* 23:151–160
- Daniel MC, Astruc D (2004) *Chem Rev* 104:293–346
- Zheng J, Zhu Z, Chen H, Liu Z (2000) *Langmuir* 16:4409–4412
- Haes AJ, Van Duyne RP (2004) *Anal Bioanal Chem* 379:920–930
- Ghosh SK, Pal T (2007) *Chem Rev* 107:4797–4862
- Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW (2001) *Clin Chim Acta* 314:1–26
- Boujday S, Bantegnie A, Briand E, Marnet P-G, Salmain M, Pradier C-M (2008) *J Phys Chem B* 112:6708–6715
- Hutter E, Fendler JH (2004) *Adv Mater* 16:1685–1706
- Lalander CH, Zheng Y, Dhuey S, Cabrini S, Bach U (2010) *ACS Nano* 4:6153–6161
- Morel A-L, Boujday S, Méthivier C, Krafft J-M, Pradier C-M (2011) *Talanta* 85:35–42
- Morel A-L, Volmant R-M, Méthivier C, Krafft J-M, Boujday S, Pradier C-M (2010) *Colloids Surf B Biointerfaces* 81:304–312
- Zhong Z, Patskovskyy S, Bouvrette P, Luong JHT, Gedanken A, Phys J (2004) *Chem B* 108:4046–4052
- Aureau D, Varin Y, Roodenko K, Seitz O, Pluchery O, Chabal YJ (2009) *J Phys Chem C* 114:14180–14186
- Khire VS, Lee TY, Bowman CN (2007) *Macromolecules* 40:5669–5677
- McNally H, Janes DB, Kasibhatla B, Kubiak CP (2002) *Superlattice Microst* 31:239–245
- Gooding JJ, Ciampi S (2011) *Chem Soc Rev* 40:2704–2718
- Aissaoui N, Bergaoui L, Landoulsi J, Lambert JF, Boujday S (2012) *Langmuir* 28:656–665
- Kim J, Cho J, Seidler PM, Kurland NE, Yadavalli VK (2010) *Langmuir* 26:2599–2608
- Pasternack RM, Rivillon Amy S, Chabal YJ (2008) *Langmuir* 24:12963–12971
- Howarter JA, Youngblood JP (2006) *Langmuir* 22:11142–11147
- Kaminska A, Inya-Agha O, Forster RJ, Keyes TE (2008) *Phys Chem Chem Phys* 10:4172–4180
- Mittal KL (1979) *Surface contamination*. In: Mittal KL (ed). Springer, New York, pp 3–45
- Kanan SM, Tze WTY, Tripp CP (2002) *Langmuir* 18:6623–6627
- Wasserman SR, Tao YT, Whitesides GM (1989) *Langmuir* 5:1074–1087
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM (2005) *Chem Rev* 105:1103–1169
- Vallée A, Humblot V, Al Housseiny R, Boujday S, Pradier C-M (2013) *Colloids Surf B Biointerfaces* 109:136–142
- Mercier D, Boujday S, Annabi C, Villanneau R, Pradier C-M, Proust A (2012) *J Phys Chem C* 116:13217–13224
- Blitz JP, Murthy RSS, Leyden DE (1987) *J Am Chem Soc* 109:7141–7145
- Turkevich J, Hillier J, Stevenson PC (1951) *Discuss Faraday Soc* 11: 55
- Seitz O, Chehimi MM, Cabet-Deliry E, Truong S, Felidj N, Perruchot C, Greaves SJ, Watts JF (2003) *Coll Surf A: Physicochem Eng Aspects* 218:225–239
- Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ (1995) *Anal Chem* 67:735–743
- Chumanov G, Sokolov K, Gregory BW, Cotton TM (1995) *J Phys Chem* 99:9466–9471
- Moskovits M (2005) *J Raman Spectrosc* 36:485–496
- Tian ZQ (2005) *J Raman Spectrosc* 36:466–470
- Bantz KC, Nelson HD, Haynes CL (2012) *J Phys Chem C* 116:3585–3593
- Richard Allen N (2001) *Interpreting infrared, Raman, and nuclear magnetic resonance spectra*. Academic, San Diego, pp 143–148
- Briand E, Gu C, Boujday S, Salmain M, Herry JM, Pradier CM (2007) *Surf Sci* 601:3850–3855
- Thébault P, Boujday S, Sénéchal H, Pradier C-M (2010) *J Phys Chem B* 114:10612–10619

Gold nanoparticles assembly on silicon and gold surfaces: Mechanism, stability and efficiency in diclofenac biosensing

Maroua Ben Haddada^{1,3}, Maria Huebner², Sandra Casale¹, Dietmar Knopp², Reinhard Niessner², Michèle Salmain³, and Souhir Boujday^{1,}*

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), F75005 Paris, France

² Chair for Analytical Chemistry and Institute of Hydrochemistry, Technical University Munich, Marchioninstr. 17, Munich, Germany

³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 4 place Jussieu F-75005 Paris, France

Figures (5), Tables (3)

Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR CNRS 7197, *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, case 178, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France*

Tel: +33144276001, Fax: +33144276033, souhir.boujday@upmc.fr

ABSTRACT. We investigated the nanostructuring of Gold and Silicon sensors by Gold nanoparticles (AuNPs) with the final objective of building up a piezoelectric immunosensor for diclofenac, a small-sized pharmaceutical pollutant. Different surface chemistries were devised to generate a layer of AuNPs on the planar substrates. These surface chemistries included amines to immobilize AuNPs *via* electrostatic interaction, or a mixture of amines and thiols to covalently attach the AuNPs. We also generated PEG-amine terminated surfaces to benefit from the well-known non-biofouling properties of PEG-coated surfaces. The functional substrates and the resulting gold nanoparticle layers were characterized in detail by Surface IR, contact angle measurements and Scanning Electron Microscopy (SEM). The coverage and the dispersion of AuNPs were strongly dependent on the anchoring points on the surfaces. The mechanism of adsorption is discussed herein considering the terminal groups and their charge at the pH of AuNPs adsorption. The results show that the best coverage and dispersion were reached when the attachment layer offered multiple interaction points. PEG-coated surfaces led to a stable AuNPs layer resistant to ultrasounds and to further functionalization of the immobilized nanoparticles. These surfaces were used to engineer quartz crystal microbalance (QCM) biosensors for diclofenac detection. The AuNPs nanostructured substrates significantly enhanced the biosensor sensitivity as compared to planar substrates (up to 6 times higher). This enhancement presages a higher sensitivity in the competitive detection of diclofenac on these systems. More importantly, despite the biorecognition and the drastic regeneration conditions, SEM images show that gold nanoparticles layers are stable and reliable, which paves the way for their use as nanostructured platforms for multiple applications.

KEYWORDS. Gold nanoparticles, silicon, silane grafting, surface functionalization, Scanning electron microscopy, immunosensor

INTRODUCTION

The assembly of gold nanoparticles (AuNPs) onto planar substrates has expanded tremendously over the last several decades, particularly in the biosensors field ¹. These nano-objects lead to dramatic improvements in the performance and sensitivity of biosensing devices owing to their plasmonic properties and to their efficiency as nanostructuring agents. The benefit from plasmonic properties of planar substrates decorated by gold nanoparticles is dramatic for techniques such as surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) now widely employed for biosensing². The interest in these nano-objects for signal enhancement in biosensors based on non optical techniques is more recent, yet it is growing fast. In the particular case of quartz crystal microbalance (QCM) biosensors, nanostructuring of the surface of the quartz crystal electrodes with AuNPs leads to an increase of the accessible surface area and by then the number of binding sites ³. For DNA biosensors, nanostructuring by AuNPs results in a better attachment of the oligonucleotides to the surface, up to 10 times higher than on planar substrates, and therefore an increased capacity for nucleic acid detection ⁴. The same trend was observed for antibody-based biosensors; despite the bigger size of these receptors, their density was improved while preserving affinity to their target ⁵. All the same, antibody fragment based biosensors benefit from AuNPs assembly; higher sensitivity and overall better immunosensing performances were evidenced ⁶.

Grafting of metallic particles on substrates is often done *a posteriori*, starting from colloidal solutions^{2a}. Commonly synthesized by the so-called “Turkevich Synthesis⁷,” –involving the reduction of Au ions by reducing agents such as citrate – gold nanoparticles are formed through a classical nucleation and growth process terminated by citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), which controls the nanoparticle size and morphology by acting as a surface functional layer or a capping agent, and

preventing inter-particle aggregation through electrostatic repulsion. Prior to AuNPs deposition, surfaces need to be covered with reactive functions, usually amines or thiols, to favour the interaction with AuNPs through electrostatic or covalent bonds. Molecules commonly used at this step are organothiols in the case of gold⁸ or organosilanes for oxidized silicon and glass surfaces⁹. More recently, polymer-based coating was applied to attach AuNP on planar substrates¹⁰. Poly(ethylene glycol) (PEG) is particularly adapted to biosensing applications by forming smooth and uniform PEG films that inhibit non specific adsorption¹¹ and provide a high affinity to citrate-stabilized gold nanoparticles¹². Once AuNPs are immobilized on a substrate, although the citrate capping agent is well-suited as a native functional layer during synthesis, substituting citrate, which is only bound loosely to the nanoparticle surface through weak van der Waals interactions, by a more tightly bound and well-defined capping layer is mandatory for further grafting of biomolecules or target and application in biosensing. For this post-functionalization the organosulfur compounds represent perhaps the most widely practiced route¹³. To withstand this post-functionalization, AuNP layers should also be stable over time and their interaction with the surface strong enough to ensure that the nanoparticles remain attached during further functionalization and upon utilization. Despite the huge interest in AuNP-nanostructured substrates, the assembly of gold nanoparticles on surfaces and their post-functionalization still relies on an approximate approach since the fundamentals of the chemistry involved in the adsorption process are poorly understood^{9a, 14}.

In this contribution, we investigated the mechanism of assembly and the stability of spherical gold nanoparticles on functionalized silicon and gold substrates. To this purpose, we devised different surface chemistries to establish the key-parameters in the attachment layer that dominate the interaction with gold nanoparticles. Both gold and oxidized silicon substrates were

modified by thiols and silanes to generate amine-terminated layers. Then, reaction of a thiol-terminated carboxylic acid with the grafted amines allowed us to generate mixed thiol/amine terminated layers. In addition, we utilized diamine-PEG cross-linked to acid and epoxy groups on gold and silicon, respectively, to compare the efficiency of these films to the previous ones. The assembly of gold nanoparticles on these platforms was examined in depth by Scanning Electron Microscopy (SEM), focusing on the coverage and dispersion, and the impact of the attachment layers is discussed. We also investigated the influence of the post-functionalization agent (either an organothiol or a PEG) on the AuNP layers. Finally, the stable and well-dispersed layers are used to build piezoelectric immunosensors for the anti-inflammatory drug diclofenac and their efficiency was compared to planar surfaces. The stability of AuNP layer upon biorecognition and regeneration processes was eventually investigated by SEM.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials: Sodium citrate, gold(III) chloride trihydrate, 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPTS), tannic acid, N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), cysteamine.HCl (CEA), diclofenac sodium salt, phosphate-buffered saline (PBS) pH= 7.4, poly(ethylene glycol) bis(amine) DAPEG₆₈ (MW= 3000 Da) , N-hydroxysuccinimide (NHS), 11-mercaptopundecanoic acid (MUA), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (99%), silicon wafers <111> and anti-mouse IgG (Fc specific) antibody produced in goat were purchased from Sigma–Aldrich. Poly(ethylene glycol) bis(amine) DAPEG₄₅ (MW = 2000 Da) was obtained from Huntsman (Rotterdam, Netherlands). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from Fisher Scientific. The rabbit polyclonal anti-diclofenac serum was prepared in-house¹⁵. Milli-Q water (18 MΩ, Millipore, France) was used for the preparation of the solutions and for all washes.

Experiments were carried out at room temperature unless otherwise stated.

Surface chemistry: Silicon wafers cut into 1 x 1 cm pieces were cleaned following a procedure including several washing steps and treatment by hydrochloric acid / methanol 1:1 (v/v) for 1 h. Reactive hydroxyl groups were generated by shaking wafers in sulfuric acid for 1 h. After washing with water, the substrates were dried under nitrogen flow ¹⁶. APTES was grafted by immersing the wafers in a solution of silane in anhydrous toluene (50 mM) and heating at 75°C for 24 h. Samples were washed twice, sonicated for 10 min in anhydrous toluene, dried under nitrogen flow, and heated at 90°C for 2 h ¹⁷. Surface sulfhydryl functions were generated by exposing the wafers to a solution of MUA (10 mM in EtOH previously activated with NHS (2.4 eq.) and EDC (1.2 eq.)). Grafting of GOPTS was carried out by covering wafers with GOPTS (100 µL) and avoiding exposure to the atmosphere by assembling two substrates face-to-face. After 3 h, the sandwiches were separated and sonicated first in ethanol, then in methanol and again in ethanol for 5 min each. They were dried under nitrogen flow and heated for 5 min at 85°C. Afterwards, the wafers were treated with molten DAPEG₄₅ (600 µL) and incubated at 98°C for 12 h in the sandwich format. The wafers were separated, sonicated in water for 15 min and dried under nitrogen flow ^{11b}.

Gold-coated sensors were immersed in a freshly prepared solution of CEA (10 mM in water) or MUA (10 mM in EtOH) for 18–24 h. After washing with the same solvent, the CEA-treated surfaces were dipped into a solution of MUA (10 mM in EtOH previously activated with NHS (2.4 eq.) and EDC (1.2 eq.)) for 2 h. The MUA-treated surfaces were exposed to 150 µL of an aqueous solution of NHS (2.4 eq.) and EDC (1.2 eq.) for 2 h to activate the carboxyl groups. The surfaces were rinsed with the same solvent and dried under nitrogen flow. DAPEG₄₅ immobilization was finally performed as described above.

Gold nanoparticles preparation and deposition: Colloidal gold particles were prepared according to the tannic acid method of Slot and Geuze¹⁸. To produce 100 mL of a 14 nm diameter colloid solution, two stock solutions were prepared: solution A: 1 mL 1% (w/v) HAuCl₄ and 79 mL water; solution B: 4 mL 1% sodium citrate, 0.025 mL 1% tannic acid and 16 mL water. Solutions A and B were heated to 60°C under stirring then mixed. When the solution turned red, the mixture was heated up to 95°C for a few minutes and cooled on ice. Modified substrates were dipped into the freshly prepared colloid solution, with no further dilution for 90 min under sonication (Elma, 90 W, 45 kHz), washed twice in water and dried under nitrogen. Surfaces were finally immersed in a solution of CEA or DAPEG₆₈ (1mM in EtOH) for 2 h to decorate the AuNPs with amino groups.

Covalent grafting of Diclofenac: Diclofenac (10 mM in dry DMF) was activated by treatment with NHS (1.2 eq.) and EDC (1.2 eq.) for 150 min at room temperature. Then, the substrates terminated by amino groups were dipped into the solution, shaken over night at room temperature, washed for 15 min in water and dried under nitrogen flow. They were stored in a desiccator.

Binding of anti-diclofenac antibody: The mixture of PBS and ethanol 9:1 was thoroughly degassed under vacuum (for 15 min) and used as carrier buffer in the flow system (flow rate 25 μ L min⁻¹). The sequence of injections was carried out as follows:

10-20 min flow of carrier buffer to stabilize the baseline signal; 10 min flow of 1/500 dilution of anti-diclofenac serum in PBS/EtOH; Washing with carrier buffer

The regeneration buffer was a solution of 2 w% sodium dodecyl sulfate (SDS) in water/ethanol (9/1=v/v) at pH=2 (HCl).

Characterization techniques: Transmission Electron Microscopy (*TEM*) measurements were performed using a JEOL JEM 1011 microscope operating at an accelerating voltage of 100 kV. The TEM grids were prepared as follows: Typically 1.5 mL of the colloid solution was centrifuged at 11200 g for 10 min to precipitate the particles. The colorless supernatant was discarded. The residue was re-dispersed in a suitable volume of water. 2 μ L of this particle suspension was dispensed on a carbon-coated copper grid and dried at room temperature. Gold nanoparticles size distribution was determined using ImageJ. Scanning Electron Microscopy (*SEM*) of the gold and silicon substrates covered with AuNPs was performed using a FEG SU-70 scanning electron microscope with a low voltage of 1 kV at a distance of 1.9 - 2.3 mm; the secondary electron detector "in Lens" was used. Images taken at different scales and in different regions of the samples were recorded. The particle densities were calculated by counting the particles in the SEM images (isolated and aggregates of 2, 3, 4, 5, 6, and > 6 particles) on a representative area of 2.3 – 2.5 μ m². For *Contact Angle measurements* static water contact angles were measured at room temperature using the sessile drop method and image analysis of the drop profile. The instrument, which uses a CCD camera and an image analysis processor, was purchased from Krüss Optronic GmbH (Hamburg, Germany). The water droplet volume was 1 μ L, and the contact angle (Θ) was measured 5 s after the drop was deposited on the sample. For each sample, the reported value is the average of the results obtained on 3 droplets and the overall accuracy in the measurements was better than $\pm 5^\circ$. *PM-IRRAS* spectra were recorded on a commercial NICOLET Nexus FT-IR spectrometer. Details on the experimental set-up are available in reference ¹⁹. Sensor chips were made of borosilicate glass substrates (11 mm \times 11 mm), coated successively with a 2.5 ± 1.5 nm thick layer of chromium and a 250 ± 50 nm thick layer of gold (Arrandee, Werther, Germany). They were annealed in a butane flame to ensure a

good crystallinity of the topmost layers and dipped in a bath of absolute ethanol during 15 min before adsorption. The Si wafers were analyzed by **GA-ATR-IR** immediately after their preparation. GA-ATR-IR spectra (256 scans, 4 cm⁻¹ resolution) were recorded on a Tensor 27 spectrometer (Bruker) equipped with a VariGATR accessory (Harrick Scientific, Pleasantville, NY) and incidence angle set at 60°. Quartz Crystal Microbalance with dissipation measurements (**QCM-D**) were carried out with a 4-channel dissipative quartz crystal microbalance (Q-Sense E4) using AT-cut 5 MHz quartz crystals (QCM sensors, 14 mm diameter) coated with a 3-100 nm layer of gold or a 50 nm SiO₂ film (Lot-oriel) at 22°C. Prior to use, they were cleaned by ethanol and dried under nitrogen flow. Experiments were carried out in flow-through conditions using a peristaltic pump. Data were simultaneously acquired at the fundamental frequency F of 5 MHz ($N = 1$) and several overtone frequencies (15, 25, 35, 45, and 55 MHz, i.e. $N = 3, 5, 7, 9$ and 11). Two physical parameters are discussed: the resonance frequency and the dissipation. The frequency change can be correlated to the mass of the adsorbed layer using the Sauerbrey equation²⁰: $\Delta F = -N \Delta m / C_f$, where C_f (= 17.7 ng cm⁻²·Hz⁻¹ at $F = 5$ MHz) is the mass-sensitivity constant, and N is the overtone number.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and characterization of AuNPs: The size and dispersion of the gold colloids were estimated from UV-visible spectroscopy and Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses. UV-Vis spectra and TEM images are given in the supplementary material section. On the UV-Vis spectrum (Figure S1-a), a narrow resonance plasmon band was present at 520 nm, typical of a particle size around 15 nm²¹. This was confirmed by TEM images (Figure S1-b), mathematical treatment of the images showed a homogeneous particle size distribution with an average size of

13.5 ± 1 nm. The AuNP concentration in the solution, estimated by two methods (see supplementary section) was 3.6±0.2 nmol L⁻¹.

Surface functionalization of Au and Si substrates: Six different surface chemistries were devised to generate a layer of AuNPs on gold and silicon planar substrates as schematized in Figure 1. Adhesion layers either included amines to ensure a strong electrostatic interaction with citrate-stabilized AuNPs²² or amines and thiols to covalently bind AuNPs through S-Au bonds. In addition, adhesion layers including NH₂-terminated poly(ethylene) glycol) were built up to benefit from the well-known anti-biofouling properties of PEG-coated surfaces and prevent non specific adsorption during the immunosensing process^{12b}. We used a diamine-PEG (DAPEG₄₅) with a molecular weight of 2,000 Da, since this medium size PEG has been previously shown to provide a homogeneous cover on Si wafers^{11a, 12a, 23}.

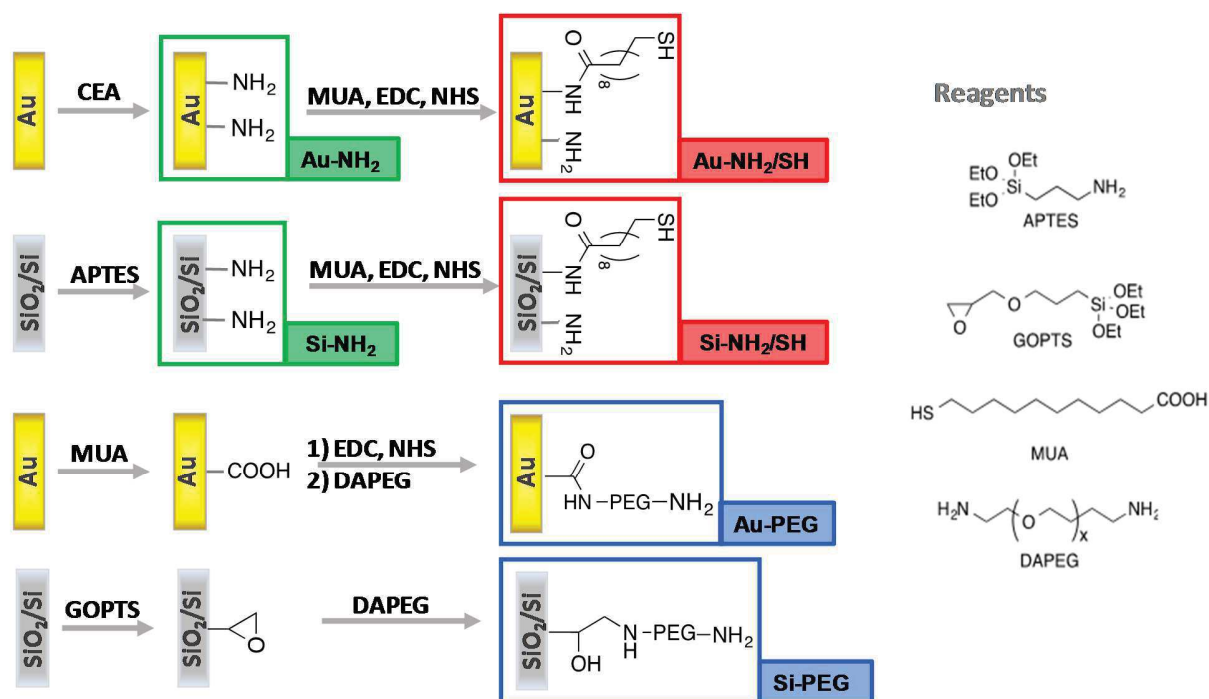


Figure 1 Surface functionalization strategies devised for immobilization of AuNPs on gold and silicon substrates and adopted nomenclature for substrates.

Amine-terminated surfaces were generated on gold and silicon using CEA and APTES, respectively. Mixed amine/thiol terminated layers were obtained by reacting MUA on the previous amine-terminated layers. MUA reacts with approx. 24 % of amine groups leading to layers with SH/NH₂ ratio ~1/4 ^{9a}. Amine-terminated PEG layers were built up by conjugating DAPEG to carboxy-decorated gold and epoxy-decorated silicon substrates that had been obtained by self-assembling of MUA and GOPTS, respectively (see Figure 1). The terminal carboxylic acid groups of MUA SAM on gold were converted into NHS esters by reaction with EDC and NHS prior to DAPEG grafting according to a previously published procedure ^{11b}. The resulting surfaces are named according to the following nomenclature: Substrate (Au or Si) – Terminal group (NH₂, NH₂/SH, or PEG) as depicted in Figure 1.

Prior to AuNPs immobilization, the functionalized substrates were characterized by contact angle measurements and surface IR. Table 1 summarizes the static water contact angle values measured for these substrates.

Table 1 Static water contact angle measurements

	Si		Au	
Clean	< 10°		46±2°	
1 st layer	APTES	GOPTS	CEA	MUA
	83±2°	51±1°	51±2°	59±2°
2 nd layer	APTES+MUA	PEG	CEA+MUA	PEG
	40±4°	43±2°	48±1°	40±4°

The initial clean (oxidized) silicon surface was very hydrophilic as expected by the strong oxidizing conditions applied to the samples before analysis to generate a high density of surface hydroxyl groups ^{11b}. Silanization with APTES resulted in a very large increase of the contact angle from 15° to 83° due to the presence of more or less ordered aminopropyl chains ^{17, 24}. Further covalent binding of MUA resulted in a drop of the contact angle to 40°. This increase of hydrophilic character may result from a better packing of the organic layer owing to Van der

Waals forces between the longer hydrocarbon chains of MUA²⁵. Silanization with GOPTS also led to an increase of contact angle from 15 to 51° as a result of organic group presence on the surface. Treatment with DAPEG slightly decreased the contact angle to 43° in agreement with the known hydrophilic character of PEG derivatives^{12a}. The same trend was observed for gold surfaces, i.e. an increase of the contact angle upon CEA or MUA grafting²⁶ and a decrease after DAPEG grafting consistent with the higher hydrophilic character expected for PEG-covered surfaces. The contact angle measured for Au-PEG was roughly the same as the one measured for Si-PEG, ~ 40°.

Surface IR, either in ATR mode for silicon substrates, or PM-IRRAS mode for gold substrates, was used to characterize the molecular composition of the thin films deposited on both surfaces. The recorded spectra are shown in the supplementary information section (Figures S2, 3, and 4) together with the detailed band attributions (table S2). Briefly, for both substrates the characteristic bands expected upon surface modification were observed. On Au-NH₂ and Si-NH₂ the primary amine bands were present in the range 1660–1640 cm⁻¹ the ammonium group bands around 1480 and 1571 cm⁻¹. Upon MUA grafting the intensity of these bands was lower and amide bands appeared giving evidence of the successful conjugation of activated acid to surface amine groups. All the same, successful grafting of DAPEG on Au-MUA and Si-GOPTS substrates was evidenced on both systems by the presence in the IR spectra of an intense band at 1110 cm⁻¹, assigned to the intense C-O-C stretching mode of the PEG chains^{11b,27}.

Gold nanoparticles immobilization on functionalized surfaces: The AuNPs layer attachment to the surface must be strong enough to prevent desorption/release during the successive steps of biosensor elaboration, test and regeneration. Therefore, ultrasounds were applied during AuNP deposition, to remove loosely bound nanoparticles. In addition, we have previously observed that

applying ultrasounds during deposition of AuNPs on Si surfaces prevented the formation of aggregates ^{9a}.

Scanning electron microscopy was used to estimate the coverage and dispersion of AuNP on the functionalized surfaces. SEM images and graphical estimation of AuNPs density and dispersion are shown in Figure 2. The fractional coverage was calculated by dividing the area covered by the 2D projection of the spherical AuNPs on the surface by the total area of the surface ²⁸, results are shown in table 2.

The coverage and dispersion of the nanoparticles layers were highly dependent on the structure of the organic adhesion film. On Au-NH₂ surfaces (Figure 2-d), AuNPs were barely detectable. Their absence is ascribable to the application of ultrasounds. Indeed, when the deposition was repeated under gentle stirring, SEM images (Supplementary information section, Figure S5) showed a small quantity (29 particles/ μm^2) of gold nanoparticles on the surface, which supports the hypothesis of weak interactions between AuNPs and Au-NH₂ surface. Conversely, a relatively high density of gold nanoparticles ($510 \pm 15 \text{ x NP}/\mu\text{m}^2$) was observed on Si-NH₂ substrates (Figure 2-a). This difference observed between Si and Au can be understood by considering the difference in amine coverage on the two substrates: while CEA forms a monolayer of more or less ordered thiols on gold ²⁹, APTES condensation on silica-like substrates leads to a low amine coverage ¹⁷. Therefore on Au-NH₂ substrates only amine groups are present whereas on Si-NH₂ both silanols (Si-OH) and NH₂ groups are present. Moreover, at the acidic pH of AuNPs solutions (pH=5.4), amino groups on Au-NH₂ are mostly positively charged, ($\text{pK}_a(\text{CEA}) = 8.3$ ³⁰), therefore, their interaction with AuNPs can be envisioned mainly through electrostatic bonds with negatively charged citrate ligands. Whereas on APTES modified surfaces, $\text{pK}_a = 7.6$ ³¹, and though ammonium species dominate, they coexist with silanol groups

that are negatively charged at this pH (silica PZC=2³²). Silanolates may be involved in AuNP interaction with the surface as they can replace citrate ligands and directly interact with gold. Therefore, these cooperative interactions on Si-NH₂ would explain the huge difference observed with Au-NH₂. Note that despite this cooperative interaction, the coverage observed on Si-NH₂ layers was the lowest of all the silicon substrates under study (Figure 2 and Table 2).

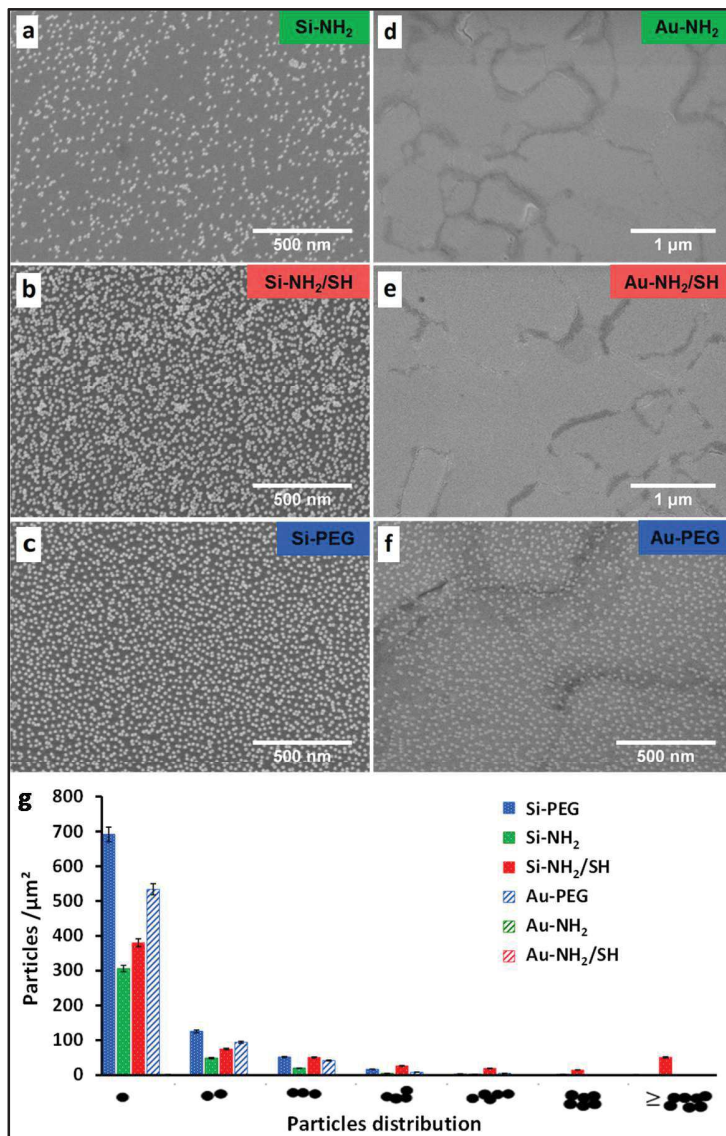


Figure 2 SEM images taken after AuNPs immobilization on the functionalized surfaces (a-f) and the resulting surface coverage (g)

After conjugation of MUA to the amine-terminated surfaces, the Si-NH₂/SH substrates exhibited a higher coverage of AuNPs (Figure 2-b). For Au-NH₂/SH the improvement could not be seen on Figure 2-e, but again when the deposition was done without applying ultrasounds (Figure S5, Supplementary section) AuNPs coverage was clearly improved compared to on Au-NH₂. This result corroborates the efficiency of cooperative interactions towards AuNPs immobilization, here through Sulfur/Gold and ammonium/citrate interactions. On Si-NH₂/SH, the fractional coverage in AuNPs reached 0.20 (see Table 2). However, the increase in AuNPs coverage on Si-NH₂/SH substrates slightly worsen their dispersion, the percentage of isolated particles was lowered to 62% and few aggregates were observed (Figure 2-b and g).

The best dispersion of AuNPs and the highest surface coverage were observed for the PEG-functionalized substrates, Si-PEG and Au-PEG (Figure 2- c and f). Both systems showed 78% of isolated particles and fractional coverage of 0.14 – 0.18 (Table 2). This difference with the previous substrates may result from the swelling properties of PEG films that make them capable of capturing citrate-stabilized AuNPs^{12b} and trapping them by displacement of loosely bound citrate ligands and creation of multidentate interactions between the PEG chains and the Au atoms of the AuNPs^{12a}. This effect cooperates with the terminal amino group of the PEG chains that acts by electrostatic interaction with citrate ligands to stabilize the nanoparticle layers. Surprisingly, despite the thick layer of PEG (1.7 nm ^{11b}), the substrates and/or the organic underlayers influence the coverage, as the value is 24% lower on Au-PEG than on Si-PEG. Nevertheless, though all the coverage reported in Table 2 may look low, one must keep in mind that they in the same range than the data reported in the literature where the deposition and washing conditions were less drastic, (0.15 -0.25) ^{8b, 22, 28}. This limit is determined by the citrate ligands co-adsorbed with AuNPs that maintain an electrostatic repulsion between adsorbed

citrate-coated AuNPs and prevent the formation of close-packed monolayer^{22,33}.

Table 2. AuNPs dispersion and coverage calculated from SEM images

Sample	Isolated AuNPs / %	Number of particles / μm^2	Fractional coverage
Si-NH ₂	77	510 \pm 20	0.08
Si-NH ₂ /SH	62	1324 \pm 40	0.20
Si-PEG	78	1186 \pm 40	0.18
Au-PEG	78	905 \pm 30	0.14

To summarize this part, offering multiple anchoring points and cooperative interactions improved the coverage and dispersion of gold nanoparticles at the surface of gold and silicon planar substrates. These systems also show a resistance to leaching upon sonication which should make them suitable for further functionalization. The PEG layers provided an excellent dispersion on both substrates (78%). In what follows, we investigate for Si-PEG and Au-PEG substrates the stability of the AuNP layers upon post-functionalization, diclofenac biosensing and under the drastic regeneration conditions.

Post-functionalization of gold nanoparticle layers: The use of the AuNPs-modified platforms for biosensing requires the exchange of the surrounding citrate ligands by reactive functions that will be used to further construct the biosensing layer. Mastering this step is important because the AuNPs layer is mobile and ligand exchange may lead to particle aggregation or leaching from the support³⁴. Two reagents were utilized for post-functionalization: CEA and PEG₆₈, both introduce primary amine groups for further anchoring of diclofenac *via* its carboxylic acid function (see molecular structure in **Figure 5**). These post-functionalization treatments were applied to AuNP arrays deposited on PEG-coated silicon and gold substrates. The density and dispersion of AuNPs was then estimated by SEM. Representative images and their mathematical treatment are shown in Figure 3. As expected, post-functionalization modified the AuNP dispersion and coverage. On both substrates, the overall coverage was slightly lowered.

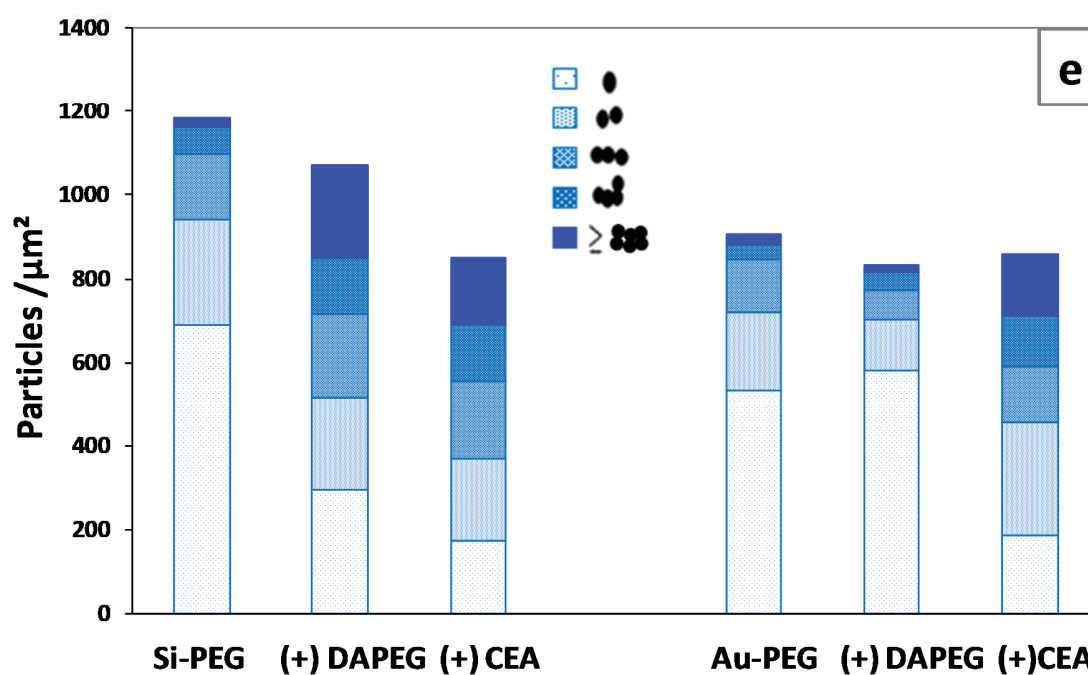
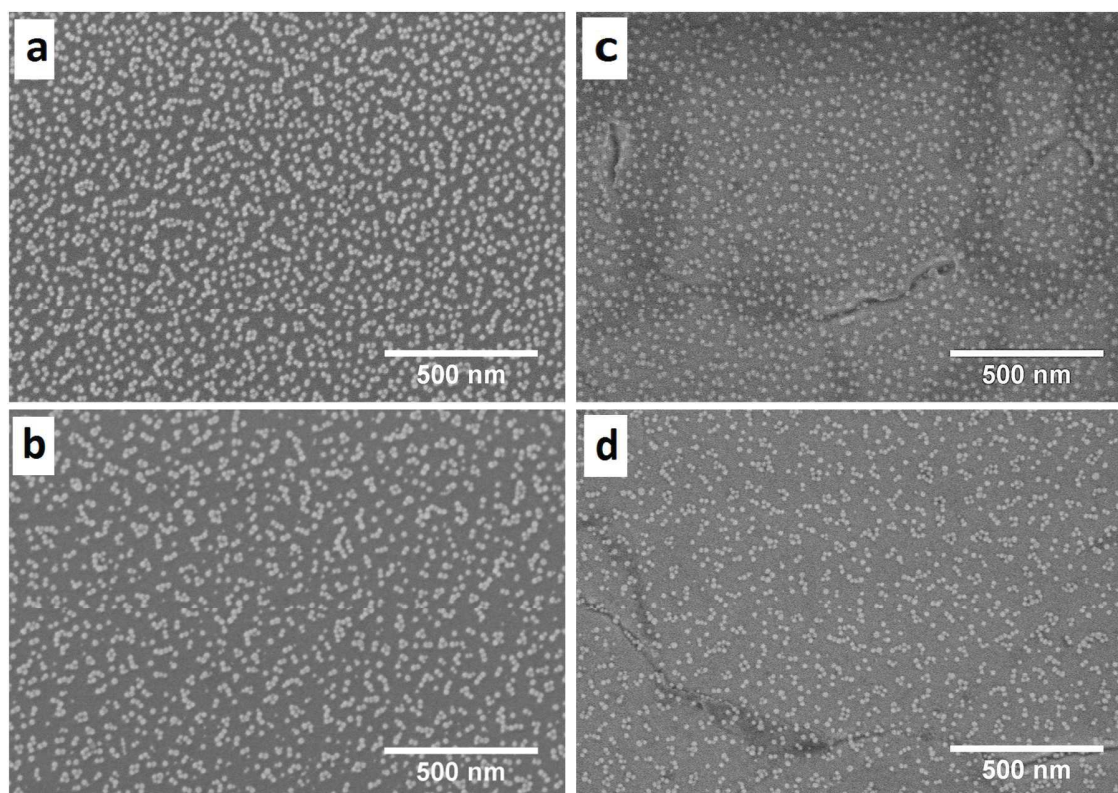


Figure 3 SEM images (a-c) and AuNP densities (e) for Si-PEG-AuNP post-functionalized by CEA (a) or PEG (b) and Au-PEG-AuNP post-functionalized by CEA (c) or PEG (d)

Post-treatment of Si-PEG-AuNP substrates by CEA or DAPEG induced both a significant desorption of particles (up to 30% with CEA) as well as aggregation. This behavior may be explained by the fact that, since the fractional coverage of AuNP on Si-PEG was higher than 0.15 established as the upper limit determined by Grabar et al.²² for 15-nm diameter citrate-capped AuNPs, the exceeding AuNPs were probably more loosely bound and/or mobile so that further treatment with a weak ligand like DAPEG favored aggregation whereas further treatment with a stronger adsorbate like CEA led to both aggregation and desorption. Similar desorption was previously reported on APTES-coated silicon upon treatment with CEA and explained by the positive charge of nanoparticles upon citrate ions replacement by CEA molecules that led to repulsion from the positively charged APTES-coated surface^{33a, 34b}. Conversely, post-functionalization of Au-PEG-AuNP by CEA or DAPEG did only marginally affect the overall particle density. This is in line with the fractional coverage being lower than 0.15, and therefore the probable absence of loosely bound particles on this surface. Furthermore, particle aggregation was only induced by CEA. In this situation, repulsion due to negative charges of citrates was no longer effective and aggregates formed^{33b}. On the whole, post-treatment on Au-PEG-AuNP by DAPEG allowed maintaining a high density of NP as well as a good dispersion. The nanostructured Si-PEG-AuNP and Au-PEG-AuNP substrates post-functionalized with DAPEG were further selected to build up a piezoelectric immunosensor for the anti-inflammatory drug diclofenac.

Anti-diclofenac antibody recognition, specificity and reversibility: Diclofenac was covalently bound through its carboxylic acid function to the PEG amino groups of the nanostructured gold and silicon sensors and recognition of anti-diclofenac antibody was investigated by QCM-D as depicted in Figure 4. QCM was also used to assess the specificity of recognition towards non

specific anti-mouse IgG (Supplementary section, Figure S6) as well as the reversibility of the hapten / antibody interaction (Supplementary section, Figure S7). In addition, to determine whether nanostructuration benefits to target recognition, the same experiment was run on flat silicon and gold substrates modified by GOPTS-PEG and MUA-PEG, respectively (**Figure 4**).

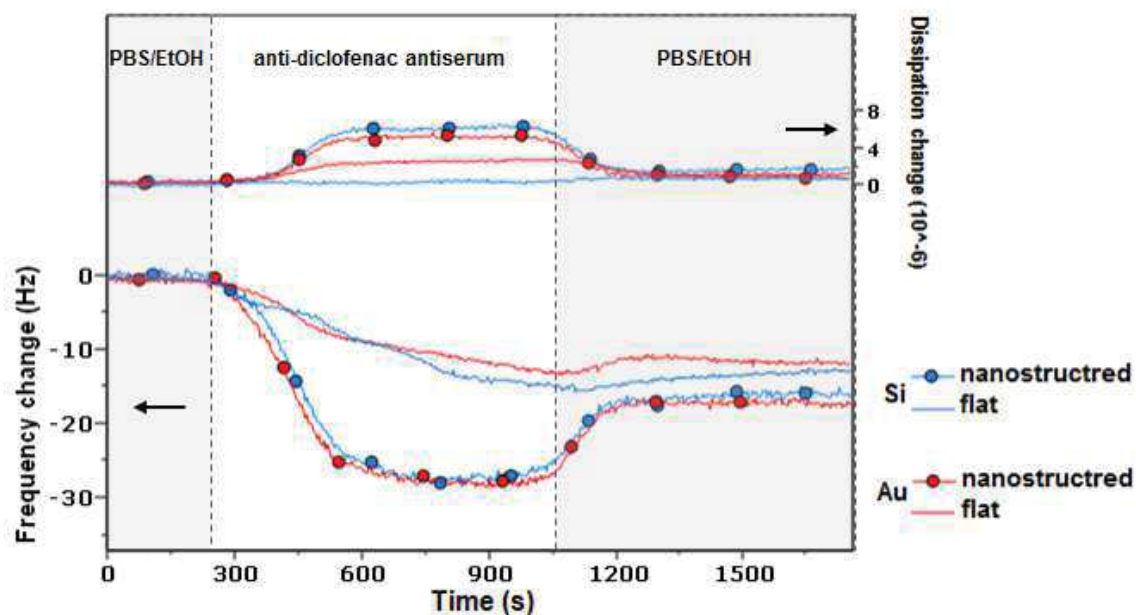


Figure 4 Frequency and dissipation shifts monitored during capture of anti-diclofenac antibody and washing with carrier buffer with the 4 different immunosensors

Injection of non-specific antibody had no influence on the resonance frequency (Figure S6). Conversely, injection of anti-diclofenac antibody resulted in an immediate decrease of the resonance frequency of the 4 sensors confirming the recognition of the specific anti-diclofenac antibody by the capture layer comprising diclofenac (**Figure 4**). The magnitude of the shift (ΔF) as well as the rate of frequency change $d\Delta F/dt$ were highly dependent on the nature of the sensing layer. On all systems, applying a regeneration buffer (pH=2) led to the release of the captured antibodies and return to the initial frequency (Figure S7).

We also analyzed the AuNPs layers by SEM to establish the possible effect of immunorecognition and regeneration on their dispersion and coverage. The SEM images in Figure 5 show that the gold nanoparticles layer was remarkably stable after the biorecognition step and even after the drastic regeneration conditions at acidic pH. No change was recorded upon anti-diclofenac binding to the surface. Upon regeneration, the drastic conditions applied led to a decrease in nanoparticle dispersion, yet, only small aggregates were formed and less than 15% of AuNP formed aggregates larger than 4 units. The regeneration process needs to be optimized to further limit its impact on AuNP dispersion.

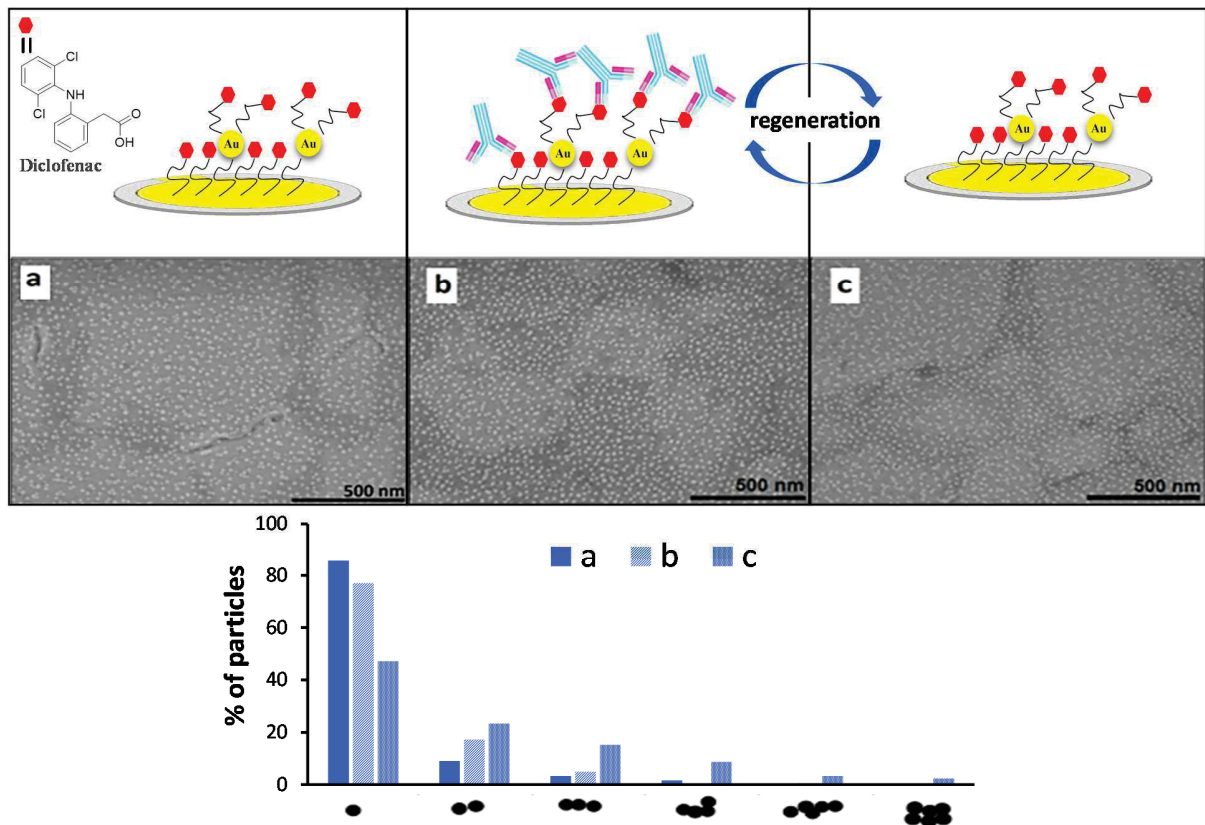


Figure 5 Reversible immunorecognition scheme and SEM images and data of Au-PEG gold nanoparticles platforms post-functionalized with PEG₆₈ at the successive stages of the immunoreaction

Mass uptakes Δm were calculated from the frequency shifts by applying the Sauerbrey equation since dissipation shifts were lower than 1×10^{-6} during antibody capture (Table 3). The QCM responses in terms of ΔF and $d\Delta F/dt$ were significantly larger for the 2 nanostructured sensor chips in agreement with the increase of specific surface brought by the layer of AuNPs. Clearly, the two flat sensors had lower antibody binding capacity than the nanostructured ones. Before washing with buffer, the increase was over 120% for both substrates, i.e. more than 6 times higher than on flat surfaces. After washing, the input of nanostructuring was still important, 32 and 48% for silicon and gold, respectively. The origin of this enhancement may be geometrical as the nanostructured sensors display a higher specific area than the flat ones. Knowing the surface coverage in AuNPs and their mean size, the increase of accessible surface area can be readily estimated. We have done these calculations depending on the exposed height of AuNPs (i.e. how the AuNPs are actually embedded in the organic film). The increase in area ranged from 17 to 33% for the Si sensor (with 1073 particles/ μm^2) and from 13 to 26% for the Au sensor (with 833 particles / μm^2). Alternatively, the surface topology of nanostructured sensors may also favor the accessibility of the immobilized diclofenac ligand towards its antibody further enhancing the geometric benefit of nanostructuring.

Table 3 QCM data for flat and AuNPs nanostructured surfaces

	Gold		Silicon	
	Flat	Nanostructured	Flat	Nanostructured
$-\Delta F_5$ (Hz)	11.8	17.5 ± 1	12.5	16.5 ± 0.5
$\Delta m/A$ (ng/cm ²)	208	310 ± 18	222	293 ± 9
$\Gamma(\text{exp})$ (pmol.cm ⁻²)*	1.4	2	1.5	1.95
Increase (%) before washing	---	128	---	124
Increase after washing (%)	---	48	---	32
$-d\Delta F/dt$ (Hz.s ⁻¹)	0.016	0.077	0.019	0.088

Furthermore, the nanostructured surfaces on a silicon or gold substrates gave very similar

responses in QCM. The amount of anti-diclofenac antibodies recognizing the target differs little despite a difference in the total density of AuNPs greater than 20% for silicon substrates. This result corroborates the assumption that increasing the surface area is the one and only reason of the improved performances of nanostructured immunosensors and abounds and towards a greater contribution granted by the new surface topology and the increased accessibility of the target. This result thus also proves that, at this stage, the influence of the substrate is limited which paves the way for a generalization of this surface chemistry to other substrates by expecting the same performances.

To conclude this part, AuNPs layers led to a significant enhancement in the biosensor sensitivity. This enhancement presages a higher sensitivity in the competitive detection of diclofenac on these systems. More importantly, despite the biorecognition and the drastic regeneration conditions, gold nanoparticle layers were stable and reliable, which paves the way for their use as nanostructured platforms for various applications.

CONCLUSION

Different surface chemistries were devised to generate layers of gold nanoparticles (AuNPs) on gold and silicon planar substrates. Adhesion layers either included alkyl chains or poly(ethylene glycol) (PEG) and were terminated by amines or mixed amine and thiol groups. The assembly of gold nanoparticles on the functionalized substrates was studied in depth by Scanning Electron Microscopy. The highest coverage and dispersion were reached when gold nanoparticles were deposited on adhesion layers offering multiple anchoring points and cooperative interactions. These systems showed a resistance to leaching upon sonication which made them suitable for further functionalization. Adhesion layers including PEG motifs provided an excellent coverage

and the best dispersion on both Si and Au substrates (78%). These layers were post-functionalized using either PEG-diamine or cysteamine to exchange the surrounding citrate ligands by reactive functions that will be used to further bind the bioreceptors. This step slightly decreased the coverage in gold nanoparticles, particularly on silicon substrates, but the use of PEG-diamine better preserved the dispersion of gold nanoparticles. The resulting layers were successfully used to build up a piezoelectric immunosensor for the anti-inflammatory drug diclofenac. They were sensitive and specific to diclofenac antibody. Compared to planar surfaces, they showed a significant enhancement in the biosensor sensitivity, up to 6 times the signal recorded for planar substrates. More importantly, despite the biorecognition and the drastic regeneration conditions, QCM sensors covered with gold nanoparticle layers were stable and reusable with a preserved coverage and dispersion, which paves the way for their use as nanostructured platforms for various applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the DIM Analytics and Region Ile-de-France for M. Ben Haddada PhD scholarship. This work was also co-financially supported by ANR (Agence Nationale de la Recherche) and DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), ANR-DFG program, project NArBioS, Grant no: ANR-11-INTB-1013.

REFERENCES

1. (a) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X. N.; Rotello, V. M., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (5), 2739-2779; (b) Nath, N.; Chilkoti, A., Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: Optimization of nanoparticle size. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5370-5378; (c) Sepulveda, B.; Angelome, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzan, L. M., LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, *4* (3), 244-251.
2. (a) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G., Nanostructured plasmonic sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 494-521; (b) Fan, M. K.; Andrade, G. F. S.; Brolo, A. G., A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693* (1-2), 7-25; (c) Felicia, T.; Monica, B.; Lucian, B.; Simion, A., Controlling gold nanoparticle assemblies for efficient surface-enhanced Raman scattering and localized surface plasmon resonance sensors. *Nanotechnology* **2007**, *18* (25), 255702.
3. (a) Fonseca, R. A. S.; Ramos-Jesus, J.; Kubota, L. T.; Dutra, R. F., A Nanostructured Piezoelectric Immunosensor for Detection of Human Cardiac Troponin T. *Sensors* **2011**, *11* (11), 10785-10797; (b) Kong, L.-J.; Pan, M.-F.; Fang, G.-Z.; He, X.-l.; Yang, Y.-k.; Dai, J.; Wang, S., Molecularly imprinted quartz crystal microbalance sensor based on poly(o-aminothiophenol) membrane and Au nanoparticles for ractopamine determination. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51* (0), 286-292.
4. (a) Cai, H.; Xu, C.; He, P.; Fang, Y., Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *510* (1-2), 78-85; (b) Liu, T.; Tang, J. a.; Jiang, L., The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *313* (1), 3-7; (c) Liu, S.-f.; Li, J.-R.; Jiang, L., Surface modification of platinum quartz crystal microbalance by controlled electroless deposition of gold nanoparticles and its enhancing effect on the HS-DNA immobilization. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, *257-258*, 57-62.
5. (a) Chu, P.-T.; Lin, C.-S.; Chen, W.-J.; Chen, C.-F.; Wen, H.-W., Detection of Gliadin in Foods Using a Quartz Crystal Microbalance Biosensor That Incorporates Gold Nanoparticles. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60* (26), 6483-6492; (b) Vidal, J. C.; Duato, P.; Bonel, L.; Castillo, J. R., Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz-crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394* (2), 575-582; (c) Wang, H.; Liu, Y. L.; Yang, Y. H.; Deng, T.; Shen, G. L.; Yu, R. Q., A protein A-based orientation-controlled immobilization strategy for antibodies using nanometer-sized gold particles and plasma-polymerized film. *Anal. Biochem.* **2004**, *324* (2), 219-226.
6. (a) Wang, H.; Wu, J.; Li, J.; Ding, Y.; Shen, G.; Yu, R., Nanogold particle-enhanced oriented adsorption of antibody fragments for immunosensing platforms. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20* (11), 2210-2217; (b) Makaraviciute, A.; Ruzgas, T.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A., Antibody fragment immobilization on planar gold and gold nanoparticle modified quartz crystal microbalance with dissipation sensor surfaces for immunosensor applications. *Analytical Methods* **2014**, *6* (7), 2134-2140.
7. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, (11), 55-&.
8. (a) Morel, A.-L.; Boujday, S.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.; Pradier, C.-M., Biosensors elaborated on gold nanoparticles, a PM-IRRAS characterisation of the IgG binding efficiency. *Talanta* **2011**, *85* (1), 35-42; (b) Morel, A.-L.; Volmant, R.-M.; Méthivier, C.; Krafft, J.-M.;

- Boujday, S.; Pradier, C.-M., Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors. *Colloids Surf., B* **2010**, *81* (1), 304-312.
9. (a) Ben Haddada, M., Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane. *Gold Bulletin* **2013**, 1-7; (b) Aissaoui, N.; Bergaoui, L.; Landoulsi, J.; Lambert, J.-F.; Boujday, S., Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 656-665.
10. (a) Christau, S.; Moller, T.; Yenice, Z.; Genzer, J.; von Klitzing, R., Brush/Gold Nanoparticle Hybrids: Effect of Grafting Density on the Particle Uptake and Distribution within Weak Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir* **2014**, *30* (43), 13033-13041; (b) Christau, S.; Thurandt, S.; Yenice, Z.; von Klitzing, R., Stimuli-Responsive Polyelectrolyte Brushes As a Matrix for the Attachment of Gold Nanoparticles: The Effect of Brush Thickness on Particle Distribution. *Polymers* **2014**, *6* (7), 1877-1896.
11. (a) Mehne, J.; Markovic, G.; Pröll, F.; Schweizer, N.; Zorn, S.; Schreiber, F.; Gauglitz, G., Characterisation of morphology of self-assembled PEG monolayers: a comparison of mixed and pure coatings optimised for biosensor applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (5), 1783-1791; (b) Huebner, M.; Ben Haddada, M.; Methivier, C.; Niessner, R.; Knopp, D.; Boujday, S., Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 334-341.
12. (a) Diamanti, S.; Arifuzzaman, S.; Genzer, J.; Vaia, R. A., Tuning Gold Nanoparticle–Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Brush Interactions: From Reversible Swelling to Capture and Release. *ACS Nano* **2009**, *3* (4), 807-818; (b) Meyerbröker, N.; Kriesche, T.; Zharnikov, M., Novel Ultrathin Poly(ethylene glycol) Films as Flexible Platform for Biological Applications and Plasmonics. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5* (7), 2641-2649.
13. (a) Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 293-346; (b) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C., Synthesis and Reactions of Functionalized Gold Nanoparticles. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1995**, (16), 1655-1656.
14. (a) Pena-Pereira, F.; Duarte, R. M. B. O.; Duarte, A. C., Immobilization strategies and analytical applications for metallic and metal-oxide nanomaterials on surfaces. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *40*, 90-105; (b) Lundgren, A.; Hulander, M.; Brorsson, J.; Hermansson, M.; Elwing, H.; Andersson, O.; Liedberg, B.; Berglin, M., Gold-Nanoparticle-Assisted Self-Assembly of Chemical Gradients with Tunable Sub-50 nm Molecular Domains. *Part. Part. Syst. Charact.* **2014**, *31* (2), 209-218.
15. Deng, A. P.; Himmelsbach, M.; Zhu, Q. Z.; Frey, S.; Sengl, M.; Buchberger, W.; Niessner, R.; Knopp, D., Residue Analysis of the Pharmaceutical Diclofenac in Different Water Types Using ELISA and GC-MS. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3422–3429.
16. Cras, J. J.; Rowe-Taitt, C. A.; Nivens, D. A.; Ligler, F. S., Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14* (8–9), 683-688.
17. Aissaoui, N.; Bergaoui, L.; Landoulsi, J.; Lambert, J. F.; Boujday, S., Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 656-65.
18. Slot, J. W.; Geuze, H. J., A method to prepare isodisperse colloidal gold sols in the size

range 3–17 NM. *Ultramicroscopy* **1984**, *15* (4), 383.

19. Boujday, S.; Gu, C.; Girardot, M.; Salmain, M.; Pradier, C.-M., Surface IR applied to rapid and direct immunosensing of environmental pollutants. *Talanta* **2009**, *78* (1), 165-170.

20. Sauerbrey, G., The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206-22.

21. (a) Seitz, O.; Chehimi, M. M.; Cabet-Deliry, E.; Truong, S.; Felidj, N.; Perruchot, C.; Greaves, S. J.; Watts, J. F., Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates. *Colloids Surf., A* **2003**, *218* (1–3), 225-239; (b) Link, S.; El-Sayed, M. A., Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (21), 4212-4217.

22. Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J., Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (4), 735-743.

23. Onses, M. S.; Nealey, P. F., Tunable Assembly of Gold Nanoparticles on Nanopatterned Poly(ethylene glycol) Brushes. *Small* **2013**, *9* (24), 4168-4174.

24. Kanan, S. M.; Tze, W. T. Y.; Tripp, C. P., Method to Double the Surface Concentration and Control the Orientation of Adsorbed (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane on Silica Powders and Glass Slides. *Langmuir* **2002**, *18* (17), 6623-6627.

25. Vericat, C.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C., Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. *PCCP* **2005**, *7* (18), 3258-3268.

26. Vallee, A.; Humblot, V.; Al Housseiny, R.; Boujday, S.; Pradier, C.-M., BSA adsorption on aliphatic and aromatic acid SAMs: Investigating the effect of residual surface charge and sublayer nature. *Colloids Surf., B* **2013**, *109*, 136-142.

27. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (2), 426-436.

28. Nath, N.; Chilkoti, A., Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5370-5378.

29. Bedford, E.; Humblot, V.; Methivier, C.; Pradier, C.-M.; Gu, F.; Tielens, F.; Boujday, S., An Experimental and Theoretical Approach to Investigate the Effect of Chain Length on Aminothiols Adsorption and Assembly on Gold. *Chemistry-A European Journal* **2015**, *21* (41), 14555-14561.

30. Riauba, L.; Niaura, G.; Eicher-Lorka, O.; Butkus, E., A Study of Cysteamine Ionization in Solution by Raman Spectroscopy and Theoretical Modeling. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (50), 13394-13404.

31. Bhat, R. R.; Genzer, J., Tuning the number density of nanoparticles by multivariant tailoring of attachment points on flat substrates. *Nanotechnology* **2007**, *18* (2).

32. Iler, R. K., *The Chemistry of Silica*. Wiley-Interscience: New York, 1979.

33. (a) Enders, D.; Nagao, T.; Pucci, A.; Nakayama, T., Reversible adsorption of Au nanoparticles on SiO₂/Si: An in situ ATR-IR study. *Surf. Sci.* **2006**, *600* (6), L71-L75; (b) Sato, T.; Ahmed, H.; Brown, D.; Johnson, B. F. G., Single electron transistor using a molecularly linked gold colloidal particle chain. *J. Appl. Phys.* **1997**, *82* (2), 696-701.

34. (a) Sato, T.; Brown, D.; Johnson, B. F. G., Nucleation and growth of nano-gold colloidal lattices. *Chem. Commun.* **1997**, (11), 1007-1008; (b) Enders, D.; Nagao, T.; Nakayama, T.; Aono, M., In situ Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy for the Analysis of the

Adsorption and Desorption Process of Au Nanoparticles on the SiO₂/Si Surface. *Langmuir* **2007**, 23 (11), 6119-6125.

Gold nanoparticles assembly on silicon and gold surfaces: Mechanism, stability and efficiency in diclofenac biosensing

Maroua Ben Haddada^{1,3}, Maria Huebner², Sandra Casale¹, Dietmar Knopp², Reinhard Niessner², Michèle Salmain³, and Souhir Boujday^{1,*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), F75005 Paris, France

² Chair for Analytical Chemistry and Institute of Hydrochemistry, Technische Universität München, Marchioninstr. 17, Munich, Germany

³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 4 place Jussieu F-75005 Paris, France

Supplementary information

Figures (7)

Table (1)

Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR CNRS 7197, Université Pierre et Marie Curie- Paris VI, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

Tel: +33144276001, Fax: +33144276033, souhir.boujday@upmc.fr

1. Gold nanoparticles characterizations

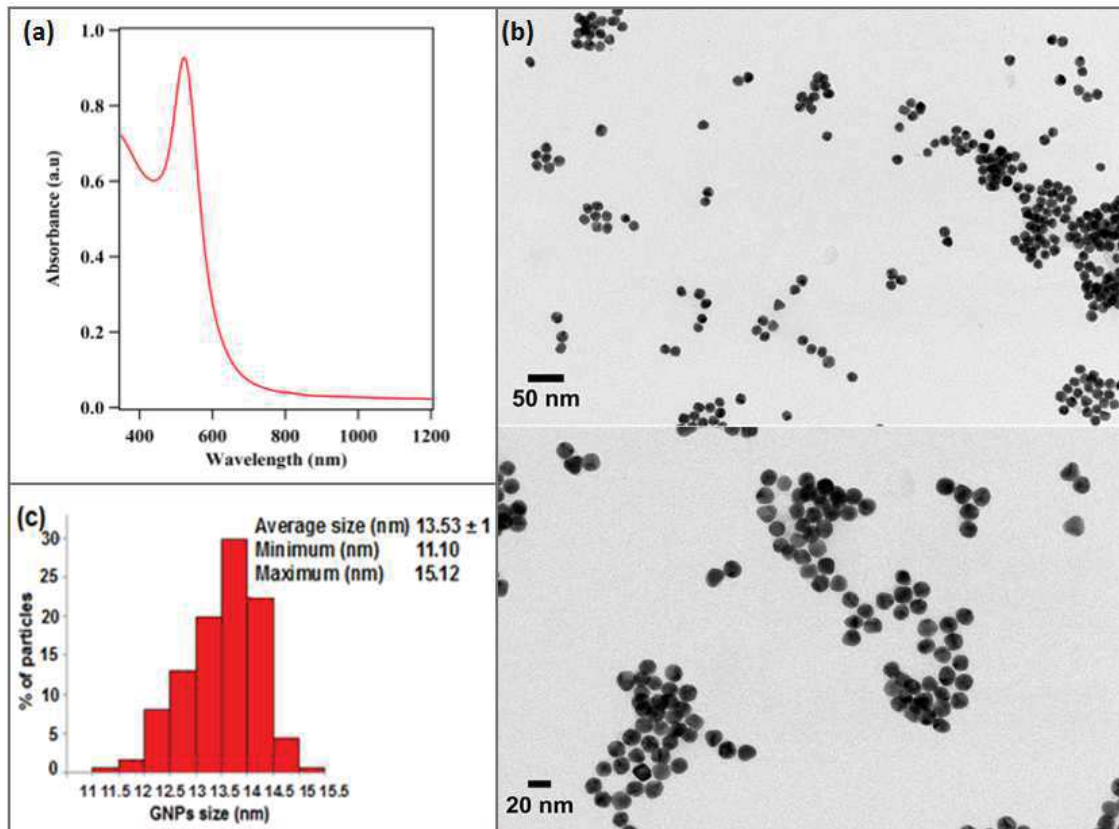


Figure S 1: (a) UV-vis spectrum, (b) TEM image of gold nanoparticles and (c) size distribution

Determination of GNPs concentration

Calculation method:

Starting from a known concentration and assuming that the reduction of the gold (III) is complete, the concentration can be deduced from the ratio number of Au atom/number of Au atoms per particle as follow:

$$C (AuNP) = \frac{N_{Au}}{N_{pp} \cdot V \cdot N_A}$$

N_{Au} = Total number of Au atoms = $n_{Au} \times N_A = 2.539 \cdot 10^{-5} N_A$ atoms

$$\Rightarrow C (AuNP) = \frac{n_{Au}}{N_{pp} \cdot V} = \frac{[Au]}{N_{pp}} = \frac{2.539 \cdot 10^{-4}}{N_{pp}}$$

$$N_{pp} = \text{Number of Au atoms/ particle} = \frac{V_{GNP}}{V_{Au}} = 30.8967 D^3$$

$$V_{AuNP} = \frac{\pi D^3}{6} \text{ with } D = \text{Average diameter (nm)} = 13.5 \text{ nm}$$

$$V_{Au} = \frac{M_{Au}}{N_A \cdot \rho_{Au}} = 1.695 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^3, M_{Au} = 197 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, \rho_{Au} = 19.31 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3} = 19.31 \cdot 10^{-21} \text{ g} \cdot \text{nm}^{-3}, N_A =$$

$$6.02 \cdot 10^{23} \text{ atoms} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Rightarrow N_{pp} = 76017.47 \text{ atoms}$$

$$\Rightarrow C (AuNP) = 3.34 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Experimental method:

Using the absorbance and the diameter [S1] :

$$N = \frac{A(450)10^{14}}{D^2[-0.295 + 1.36 \exp(-(\frac{D-96.8}{78.2})^2)}$$

$A(450) = 0.60477$. $D = 13.5 \text{ nm} \Rightarrow N = 2.330 \cdot 10^{12} \text{ NP.mL}^{-1} = 3.874 \cdot 10^{-12} \text{ mol.mL}^{-1}$

$\Rightarrow C(\text{AuNP}) = 3.874 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$

[S1] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4215-4221.

2. IR characterization of functionalized surfaces

We proceeded to the surface IR analysis of the silicon and gold substrates to get insight on the molecular composition of the organic thin films deposited at their surface.

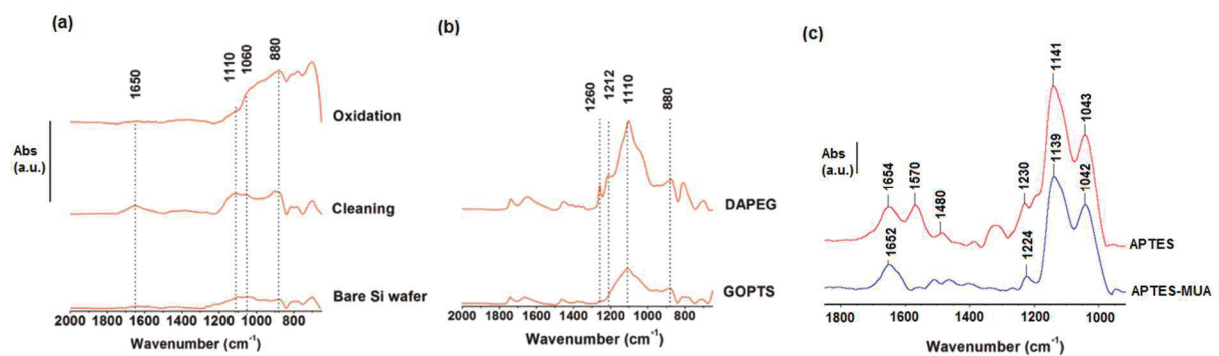


Figure S 2: Baseline corrected GA-ATR spectra of Si wafers, (a) after cleaning and oxidation; (b) after functionalization by GOPTS and DAPEG and (c) after functionalization by APTES and APTES-MUA

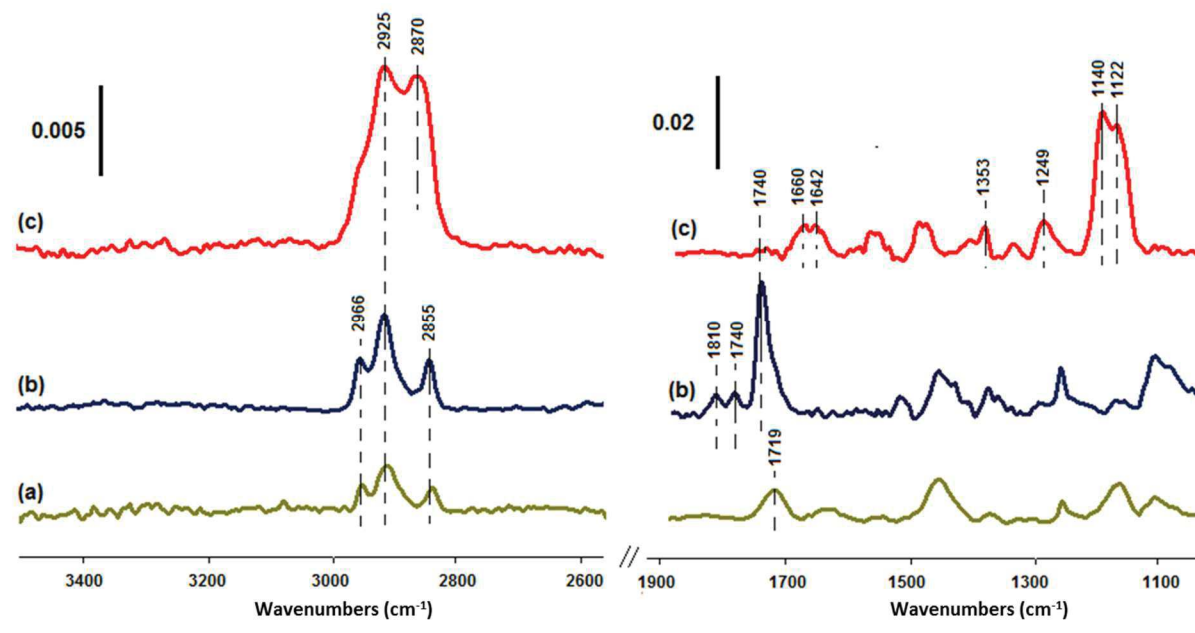


Figure S 3: PM-IRRAS spectra of the gold substrates after MUA functionalization (a), MUA activation (b), and DAPEG 2000 grafting (c).

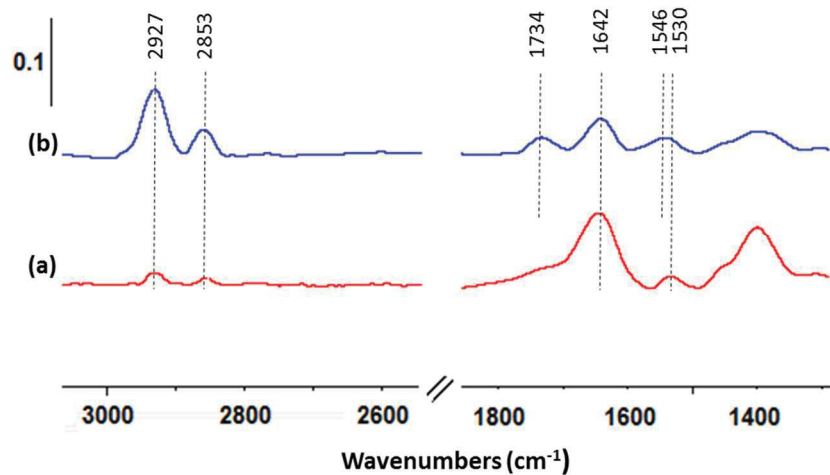


Figure S 4: PM-IRRAS spectra of the gold substrates after CEA (a) and MUA (c) functionalization.

Table S1: IR analysis of functionalized gold and silicon substrates

		Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
GA-ATR-IR	Si-GOPTS-DAPEG	1110	C-O-C stretching mode of the PEG chains
	Si-APTES	1040 and 1140	transverse optical (Si-O-Si TO and Si-O-Si longitudinal optical (Si-O-Si LO) stretching
		1042 and 1224	TO and LO mode of unfunctionalized silica surface
		1480, 1571 and 1654	ammonium and imine groups at the surface
	Si-APTES-MUA	disappearance of the band at 1571 cm ⁻¹ assigned to the NH ³⁺ groups	
1500 - 1700		amide I and amide II	
PM-IRRAS	Au-MUA	2850 and 2925	symmetric and asymmetric νC-H modes
	Au-MUA-DAPEG	1122 and 1148	C-O-C stretching mode of the PEG chains
		2850 and 2925	increase of symmetric and asymmetric νC-H
		1353	CH ₂ -wagging mode of the amorphous PEG
	Au-CEA	1530 and 1642	deformation symmetric and asymmetric vibration δNH of primary ammonium
	Au-CEA-MUA	2853 and 2927	symmetric and asymmetric νC-H modes
		1737	νCOOH
		1546 and 1642	amide I and amide II

3. Gold nanoparticles deposition

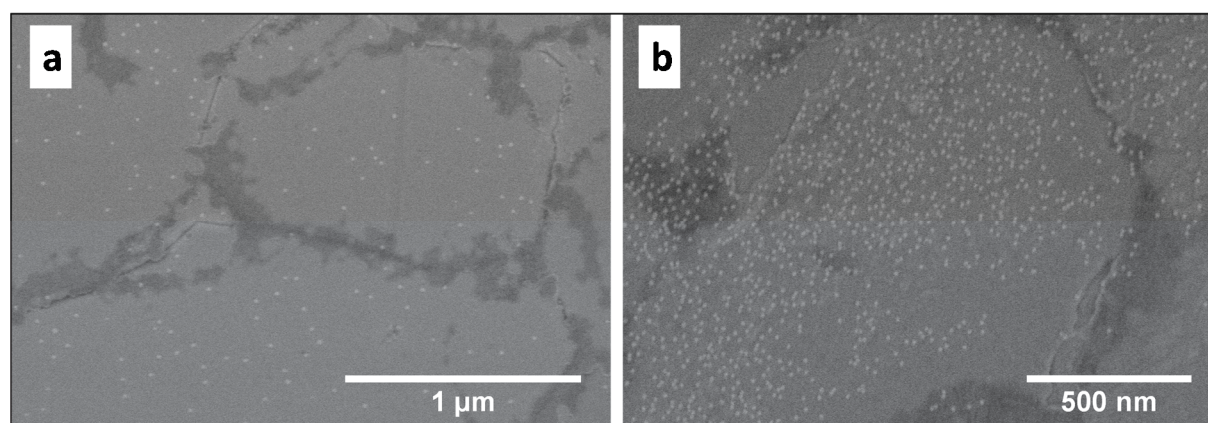


Figure S 5: SEM images of AuNPs deposition on Au-NH₂ (a) and Au-NH₂/SH (b) under agitation without using Ultrasounds.

4. QCM data

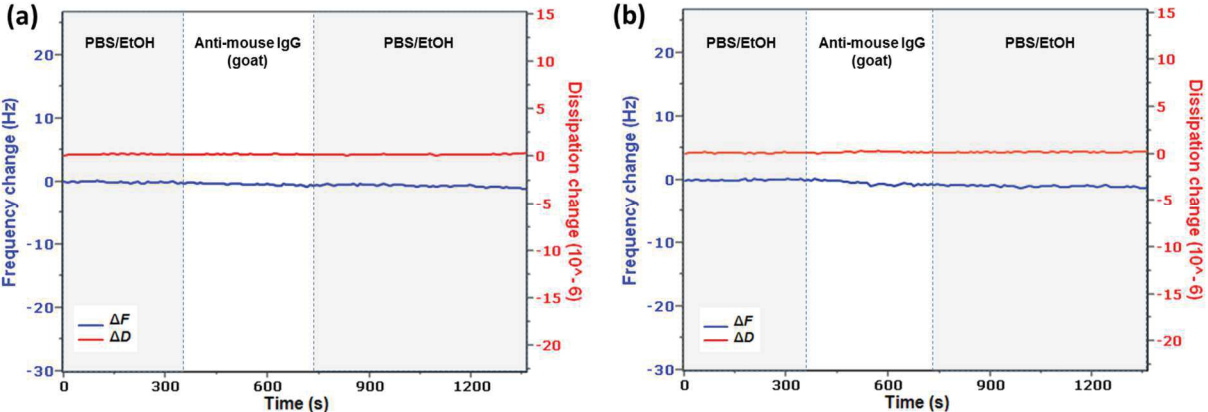


Figure S 6 : Specificity test on silicon (a) and gold (b) nanostructured surfaces

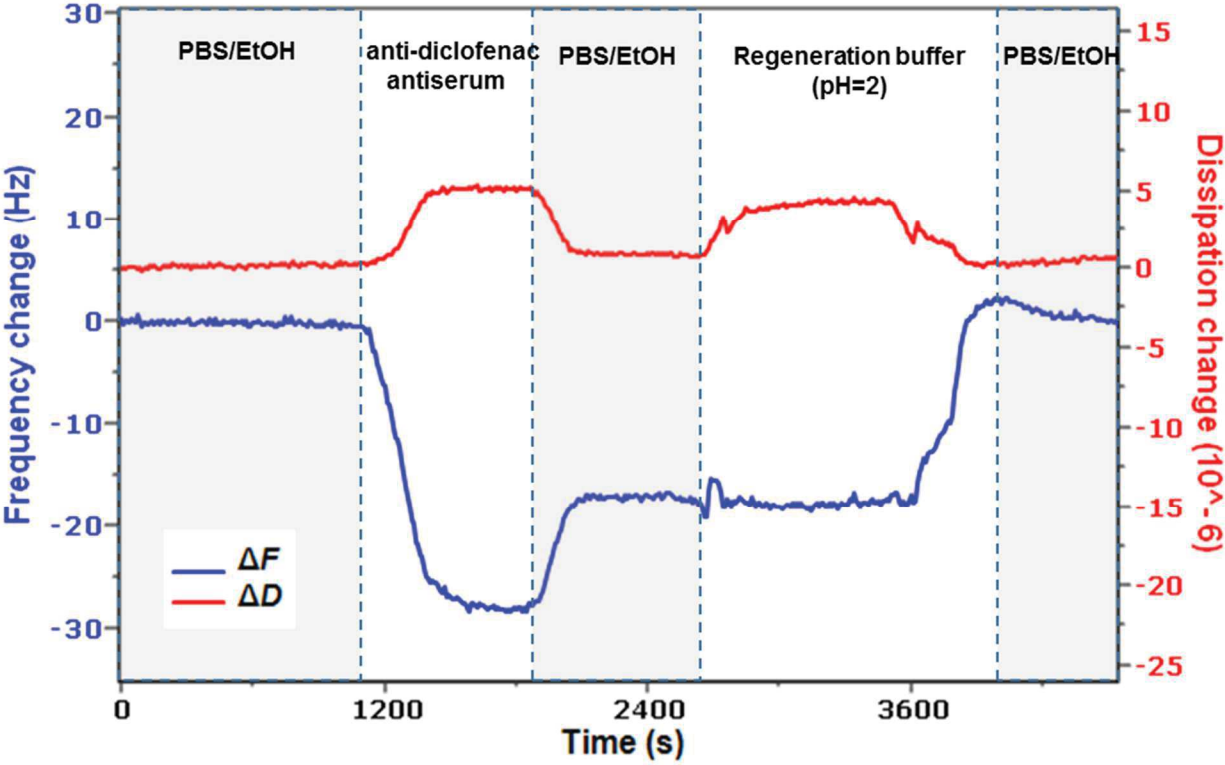


Figure S 7 : Regeneration protocol and reversibility for anti-diclofenac antibody binding to diclofenac immobilized on Au-PEG gold nanoparticles platforms post-functionalized with PEG₆₈



Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Layer-by-layer generation of PEG-based regenerable immunosensing surfaces for small-sized analytes

Maria Huebner^a, Maroua Ben Haddada^{b,c}, Christophe Méthivier^{b,c}, Reinhard Niessner^a, Dietmar Knopp^{a,*}, Souhir Boujday^{b,c,**}

^a Chair for Analytical Chemistry and Institute of Hydrochemistry, Technische Universität München, Marchioninstr. 17, Munich, Germany

^b Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, UMR CNRS 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F75005 Paris, France

^c CNRS, UMR 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2014

Received in revised form

18 August 2014

Accepted 20 August 2014

Keywords:

Immunosensor

Hapten

PEG coating

Regeneration

Microarray

QCM-D

ABSTRACT

Small molecules (haptens) like pharmaceuticals or peptides can serve as targets for antibody binding in competitive immunoassay-based flow-through assays. In this work, a strategy for preparing polyethylene glycol (PEG) coatings for subsequent hapten immobilization on glass-type silica surfaces is presented and characterized in detail. Two substrates bearing terminal silanol groups were utilized, a glass slide and a silicon wafer. First, surfaces were thoroughly cleaned and pretreated to generate additional silanol groups. Then, a silane layer with terminal epoxy groups was created using 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPTS). Epoxy groups were used to bind a layer of diamino-poly(ethylene glycol) (DAPEG) with terminal amino groups. Finally, the low molecular weight compound diclofenac was bound to the surface to be used as model ligand for competitive biosensing of haptens. The elementary steps were characterized using atomic force microscopy (AFM), water contact angle measurement, grazing-angle attenuated total reflection (GA-ATR) FT-IR spectroscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The data collected using these techniques have confirmed the successive grafting of the molecular species, evidencing, that homogeneous monolayers were created on the silica surfaces and validated the proposed mechanism of functionalization. The resulting surfaces were used to investigate polyclonal anti-diclofenac antibodies recognition and reversibility using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) measurements or an automated flow-through immunoassay with chemiluminescence (CL) read-out. For both techniques, recognition and reversibility of the antibody binding were observed. The stability of sensors over time was also assessed and no decrease in CL response was observed upon 14 days in aqueous solution. The herein presented strategy for surface functionalization can be used in the future as reproducible and reusable universal platform for hapten biosensors.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Immunosensors are analytical devices incorporating an antigen-specific immunoglobulin integrated within a physicochemical transducer (Luppa et al., 2001). They are employed to automate immunoassays in microfluidic systems also known as lab-on-a-chip (Han et al., 2013). These systems are sensitive analytical techniques for many applications in clinical diagnosis (Mohammed and Desmulliez, 2011; Shiddiky et al., 2012), as well as food

(Boujday et al., 2008; Rau et al., 2014; Salmain et al., 2012, 2011) and environmental analysis (Boujday et al., 2009a, 2010; Prieto-Simón and Campàs, 2009). There exist immunosensors for label-free and label-based competitive assay systems. In label-free assays, the antibody binding is detected directly by the transducer such as quartz crystal microbalance (QCM) sensors (Su et al., 2000). In label-based assays, labels can be introduced *via* tracers or secondary antibodies. For example, chemiluminescence (Mirasoli et al., 2014) (CL) labels can be used.

One of the greatest challenges in the field of immunosensors is the controlled and reliable surface functionalization (Piehler et al., 2000). This is particularly true in the case of small-sized target analyte (hapten) sensing, where the accessibility and reliability of the target molecules layer definitively impact the sensor response (Boujday et al., 2010; Shankarana et al., 2007). On silica

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, UMR CNRS 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F75005 Paris, France.

E-mail addresses: dietmar.knopp@ch.tum.de (D. Knopp), souhir.boujday@upmc.fr (S. Boujday).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.047>

0956-5663/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

and silica-like surfaces, various strategies, mostly involving silane grafting on silanol groups, were described (Gooding and Ciampi, 2011; Liebes et al., 2009; Ulman, 1996). The control of this process is crucial as the silane layer may be unstable in the aqueous media used for biological applications (Dekeyser et al., 2008). However, for high throughput analysis the substrate should be stable and regenerable. In this way, the biosensing devices become economical, reproducible and cost-efficient (Jiang et al., 2008; Su et al., 2000). In the present context, the term regeneration describes the dissociation of the immunocomplex and liberation of the ligand on the silica surface. Such surface regeneration procedures are already described for a surface plasmon resonance (SPR) (Shankarana et al., 2007) and QCM-D (March et al., 2009) immunosensing, as well as for microflow-based chemiluminescence immunoassay (Oswald et al., 2013). To immobilize the antigen on the transducer surface, a protein-hapten conjugate can be immobilized or the hapten can be coupled covalently direct to a shielding layer. The latter has been used successfully for reproducible mycotoxin determination in wheat extract (Oswald et al., 2013). For this application, a polyethyleneglycol (PEG) based coating was attached to the silane layer on silica glass slides. The PEG allows a high surface coverage by the hapten and low non-specific binding what makes the surface quite resistant to biofouling (Mehne et al., 2008; Piehler et al., 2000; Wolter et al., 2007).

The next step towards a reliable high throughput analysis with these silica glass slide modifications is the control and reproduction of the promising surface chemistry preparation. Moreover, it can be transferred to other silicate surfaces like silicon with native oxide layer and additional transduction techniques. In the present study, we investigate this surface chemistry in-depth, with a molecular approach to control every elementary step of the surface functionalization.

The first step for the silica surface modification (Fig. 1) is the cleaning and oxidation of the silica surface in order to produce silanol groups (Cras et al., 1999). Then, a 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) layer is grafted on the silica surface, followed by attachment of an epoxysilane and the diamino-poly (ethylene glycol) (DAPEG) with a molecular weight of ~2000 Da. The terminal amino groups are available to immobilize haptens or derivatives with appropriate chemical functions directly on the surface. These haptens may serve as competing analytes for free antibody binding sites using competitive immunoassays. They can be liberated from bound antibodies by using an appropriate regeneration buffer.

For the presented characterization of this surface preparation, two substrates bearing terminal silanol groups were utilized, glass slides and silicon wafers with a native silica layer on their polished surface. For the investigation of the roughness and morphology on these two types of silica surface, atomic force microscopy (AFM) was used in the peak force mode under air. Water contact angle measurements were carried out on both surface types (Si wafer and glass slides) to assess the interfacial properties of the resulting surface. The chemical composition of the surface was analyzed by grazing-angle attenuated total reflection FT-infrared spectroscopy (GA-ATR FT-IR) on silicon wafers (Lummerstorfer and Hoffmann, 2004), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) allowed ultimate analysis of the surface coating and enabled also estimating the layer thickness after each preparation step. Finally, the pharmaceutical diclofenac was used as a model ligand for the immobilization on DAPEG. A highly selective polyclonal antiserum (Deng et al., 2003) from rabbit was used for studying the regeneration procedure by a label-free QCM with dissipation measurement (QCM-D). Furthermore, an automated flow-through platform (Kloth et al., 2009) with chemiluminescence readout by a CCD camera was used to study the specificity, regenerability and stability of DAPEG-based diclofenac microarrays.

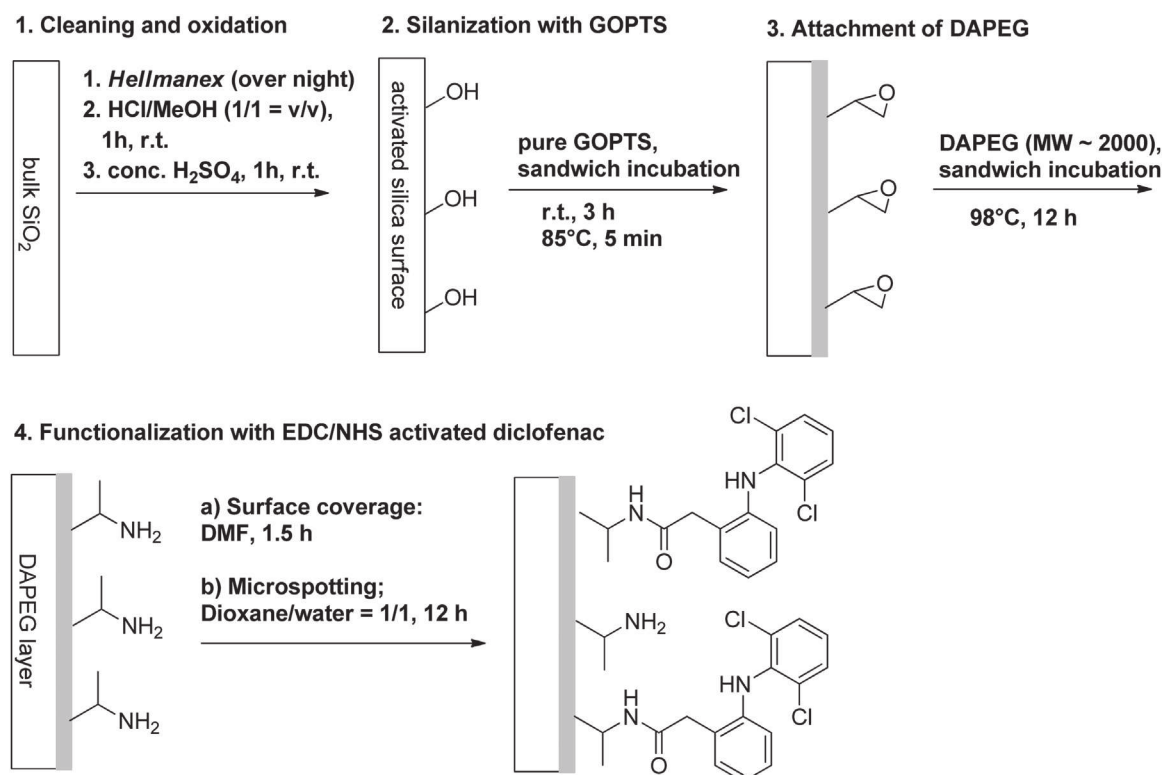


Fig. 1. Overall procedure for the preparation of a PEG based diclofenac biosensor chip or microarray.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Standard chemicals and materials were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Silicon wafers <100> were purchased from Sigma-Aldrich (France) and cut into 1–2 cm² pieces. Microscope glass slides (76 mm (±0.1 mm) × 26 mm × 1 mm) were obtained from Carl Roth. For QCM-D measurements, thin AT-cut quartz coated with a thin SiO₂ film (thickness ~50 nm) for QCM measurements were provided by Q-Sense (Stockholm, Sweden). *Hellmanex II* was purchased from Hellma Analytics (Müllheim, Germany). 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) was obtained from Sigma-Aldrich. Diamino-poly(ethylene glycol) (DAPEG) was a kind gift from Huntsman Holland (Rozenburg, The Netherlands). The chemiluminescence substrate solution Westar Supernova ELISA was purchased from Cyanagen (Bologna, Italy). The polyclonal anti-diclofenac serum was prepared in-house (Deng et al., 2003). The anti-rabbit IgG (whole molecule) labeled with peroxidase and diclofenac sodium salt were obtained from Sigma-Aldrich.

All solutions were prepared using purified water from a MilliQplus 185 system (Millipore, Schwalbach, Germany). Phosphate-buffered saline (PBS) was 70 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄ and 145 mM NaCl adjusted to pH 7.6. For PBST buffer, 0.05% Tween 20 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany) was added to PBS.

2.2. Surface chemistry

2.2.1. Cleaning and oxidation

To remove impurities, the glass slides, silicon wafers or quartz slides were cleaned in 200 mL of 2% *Hellmanex* solution for 1 h by sonication, for 15 h under mild shaking and for 1 h by sonication. After thoroughly rinsing with 5 × 200 mL of water, the slides were dried in nitrogen flow. For etching the silica surface, the slides or wafers were shaken for 1 h in 200 mL of a mixture of 37% hydrochloric acid and methanol (v/v=1/1) rinsed with 5 × 200 mL of concentrated sulfuric acid for 1 h. After rinsing with 5 × 200 mL water and drying them with nitrogen, they were immediately used for silanization or measurements with XPS, GA-ATR or water contact angle.

2.2.2. Grafting with GOPTS

One half of the number of activated slides or wafers was spread with 600 μL GOPTS and then covered with the remaining slides or wafers in a “sandwich” format. These sandwiches were incubated for 3 h. Afterwards, they were separated and sonicated successively in ethanol, methanol and again ethanol for 5 min. Finally, they were dried under nitrogen flow for 5 min, then at 85 °C and used for the DAPEG functionalization or were immediately submitted to measurements with XPS, GA-ATR or water contact angle.

2.2.3. DAPEG functionalization

The slides or wafers were incubated with 600 μL molten DAPEG in the sandwich format (see Section 2.2.2) for 12 h at 98 °C. The sandwiches were separated and sonicated in water for 2 × 15 min. After rinsing them thoroughly with water and drying them under nitrogen flow, they were stored in a desiccator, used for GA-ATR, XPS and water contact angle measurements or used for the immobilization of diclofenac.

2.2.4. Microspotting method

The solution of diclofenac in dry dioxane (2 mM) was activated by adding 1.2 eq. N-hydroxysuccinimide (NHS) and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC). The

reaction flask was shaken over night at room temperature. Then, the solution was diluted with dry dioxane and water (v/v=1/1) to give 100 μL of 0.5 mM activated diclofenac. For the dilution, a Greiner UV Star[®] 384 well plate (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany) was used. This plate was placed into the BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad, Munich, Germany). During the printing process, the air humidity was set to 50% and the temperature of the plates was 20–22 °C. The spotting pin SNS 12 (Arrayit, Sunnyvale, CA) places approximately 5 nL of the solution on the surface. For statistical purpose, 5 spots of the same composition were placed in one row. Finally, the glass surfaces were incubated at 25 °C for 15 h, washed by sonication for 15 min in PBST buffer (pH 8.5), for 15 min in water and dried under nitrogen flow. The prepared chips were stored in a desiccator under reduced pressure.

2.2.5. Attachment of diclofenac from solution phase

Alternatively to the microspotting method, the whole silicon wafer and quartz slide for the QCM experiments were functionalized with diclofenac. The solution of diclofenac sodium salt was activated in dry DMF (10 mM) by adding 1.2 eq. NHS and 1.2 eq. EDC. The reaction flask was shaken for 150 min at room temperature. Then, the silicon wafers and quartz slides were put into the solution. They were shaken over night at room temperature and washed for 15 min in 100 mL H₂O. They were stored in a desiccator.

2.3. Surface characterization techniques

The setup and experimental conditions used for atomic force microscopy, contact angle measurements, GA-ATR FT-IR spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy are described in detail in the [supplementary material](#) section.

2.4. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D)

Piezoelectric measurements were performed on AT-cut quartz silica-coated quartz crystals with nominal frequency F of 5 MHz (LOT-Oriel, Massy, France). The QCM-D (E1 model) was operated in flow-through mode at 22 ± 0.1 °C. The flow rate was adjusted by using a peristaltic pump. For the antiserum injections (diluted 1/1000 in PBS/EtOH (9/1=v/v)) and signal stabilization, it was 25 μL min⁻¹. The signal stabilization was carried out for 20 min in degassed PBS containing 10% EtOH. For the regeneration procedure, the flow rate was adjusted to 50 μL min⁻¹. The regeneration buffer was a solution of 2 w% sodium dodecyl sulfate (SDS) in water/ethanol (9/1=v/v) with pH=2 (HCl). The measurement procedure is described in the supplementary material (Table S2). For the interpretation of the QCM-D data, the dissipation must be observed. As long as no dissipation by energy exchange with the liquid occurs, the adsorbed layer can be regarded as rigid (Boujday et al., 2009b). According to the Sauerbrey equation (Sauerbrey, 1959), the measured frequency shifts are proportional to the mass uptake:

$$\Delta F = - \frac{N \Delta m}{C_f} \quad (1)$$

with the mass sensitivity constant ($C_f = 17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ at $f = 5 \text{ MHz}$) and the overtone number ($N = 5$).

2.5. Microarray-based chemiluminescence flow-through ELISA

The device for the microarray-based ELISA with chemiluminescence read-out in the flow-through mode (MCR 3, gwk Präzisionstechnik GmbH, München, Germany) was described in detail

elsewhere (Kloth et al., 2009). The stand-alone platform automatically delivers all the reagents for performing the immunoassay on hapten microarrays microspotted on the DAPEG modified glass slides. The slides are attached to a flow cell that is connected to the syringe pumps by PTFE tubing. The signal detection is carried out by a CCD camera placed on top of the flow cell. It records the chemiluminescence signal generated from the peroxidase catalyzed reaction of luminol with H_2O_2 . The running buffer was a 0.5 wt% solution of casein in PBS. The anti-diclofenac antiserum from rabbit was diluted 1/5000 in running buffer. The peroxidase labeled anti-rabbit IgG was diluted 1/1000 in running buffer. The regeneration buffer was an aqueous solution of 50 mM glycine, 100 mM NaCl and 0.1 wt% SDS with pH=3 (HCl). For the regeneration tests, a blank solution of water/MeOH (9/1=v/v) was used. For calibration, the same mixture was used to prepare diclofenac standards at concentrations of 100, 10, 5.0, 1.0, 0.50, 0.10, 0.05 and 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3. Results and discussion

3.1. Contact angle

In Fig. 2, the water contact angle values for the successive functionalization steps of the surface grafting on glass slide and Si wafer are shown. On the silicon wafer, the contact angle after the oxidation step was determined as $(7.5 \pm 3.3)^\circ$. This low angle indicates a hydrophilic character of the surface from a high yield of silanol groups on the silica surface. After GOPTS grafting, the mean contact angle was $(50 \pm 1.2)^\circ$ indicating a coverage of the surface with the silane in the range of a monolayer (Tsukruk et al., 1999). The subsequent steps, DAPEG grafting and coverage of diclofenac, lowered the contact angle to $(44 \pm 2.7)^\circ$ and $(45 \pm 1.8)^\circ$. This observation indicates that the hydrophilic DAPEG covers the surface densely and allows a moderate wettability of the silicon wafer. The diclofenac layer has not an apparent influence on the interfacial properties of the PEGylated wafer surface.

On the glass slide, the oxidation step creates a mean contact angle of less than 5° . It could not be determined more precisely, because the drops were not stable on the surface. Consequently,

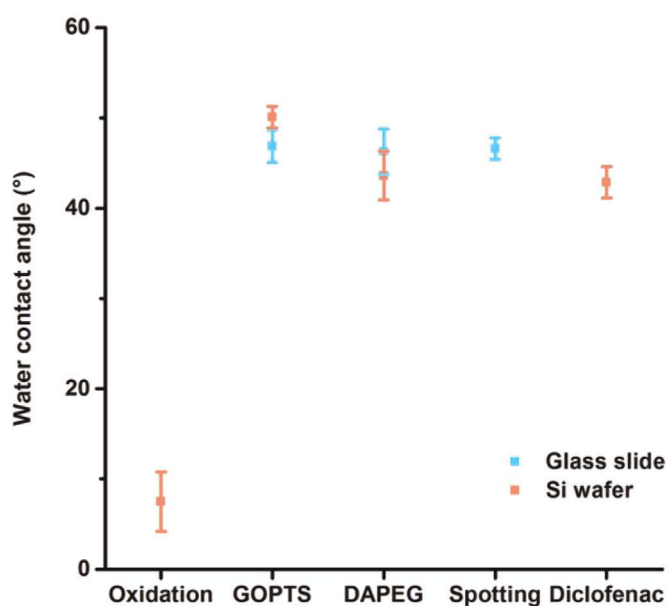


Fig. 2. The water contact angle for the different preparation steps. For the oxidation step on the glass slide, a contact angle could not be measured due to the low water drop stability on the surface.

the yield of silanol groups on the glass surfaces also is high. After the grafting with GOPTS, the contact angle is raised to $(47 \pm 2.0)^\circ$. The wettability did not change significantly after adding the DAPEG $(46 \pm 2.5)^\circ$ and after microspotting $(47 \pm 1.8)^\circ$. Apparently, the final water contact angles were very comparable between the glass slide microarray and the Si wafer covered with diclofenac.

3.2. AFM on PEG layers

The homogeneity of the DAPEG layer was also shown by AFM on both substrates (Fig. S1). The roughness of the DAPEG preparation is 1.6 nm on the Si wafer and 1.1 nm on the glass slides. After the functionalization with diclofenac, the roughness is 1.3 nm on the Si wafer and 1.2 nm on the glass slide. Consequently, the PEG creates a surface that is homogenous in the nm-range. In the Supplementary material, the corresponding result is shown and discussed in more detail (Fig. S1).

3.3. GA-ATR-FTIR on Si wafers

In Fig. 3a, the baseline-corrected spectra for a bare Si wafer after the cleaning in Hellmanex solution and with HCl/MeOH are shown. The bare silicon wafer was cleaned with ethanol only. It can be observed, that the surface has adsorbed more water (band at 1650 cm^{-1}) after the steps of the cleaning procedure. The bands at 1060 and 1110 cm^{-1} can be assigned to a continuous Si–O–Si layer (Tian et al., 2010). The band at 880 cm^{-1} can be assigned to silanol groups (Yim et al., 2005). After the treatment with concentrated sulfuric acid, the oxidation step, the band at 1060 cm^{-1} of Si–O–Si decreased. In the meantime, the band at 880 cm^{-1} (Si–OH) was raised by the treatment. This shows that the surface structure has changed from a Si–O–Si network to predominantly Si–OH groups. The band at 1650 cm^{-1} has disappeared suggesting the reaction or removal of adsorbed water.

The spectra for the following surface modifications are shown in Fig. 3b. After the incubation of the oxidized wafer with GOPTS, an intense band at 1110 cm^{-1} appears. It can be assigned to the –CO–C ether bonds in the silane. The band at 880 cm^{-1} was reduced which indicates a reaction of the silanol groups. On the GOPTS layer, adsorbed water can be measured (1650 cm^{-1}). At 1260 cm^{-1} , a weak epoxy band can be observed (Yim et al., 2005).

The bands for the DAPEG layer are more intense, because it is a much larger molecule (MW=1900 Da) than GOPTS (MW=236 Da). The bands are basically the same, because of the ether-type structure of both compounds. However, two additional bands arise at 1260 and 1210 cm^{-1} . The increase of the band at 1650 cm^{-1} can be attributed to the terminal amino groups of the DAPEG and also to a higher amount of trapped water, as the PEG is hydrophilic and adsorbs considerable amount of water molecules. The band at 1260 cm^{-1} has disappeared.

For diclofenac, no specific bands can be identified. The concentration is too low for obtaining characteristic bands of this compound on DAPEG. The decrease of the intensity can be explained by a shift of the chain orientation to a parallel alignment of the chains after the coverage with NHS activated diclofenac (Lummerstorfer et al., 2007). This effect is discussed in more detail in the supplementary material (Fig. S2).

3.4. XPS analysis of SI wafers

The XPS spectra for the different preparation steps deliver different intensities for each element. The signal intensities are summarized in Table 1. For the GOPTS layer, no nitrogen signal can be observed as expected (see also Fig. S3). The –CO/–CC ratio is 1.3 according to the data. According to the original molecular structure, the ratio should be 1.8. Consequently, the decrease of

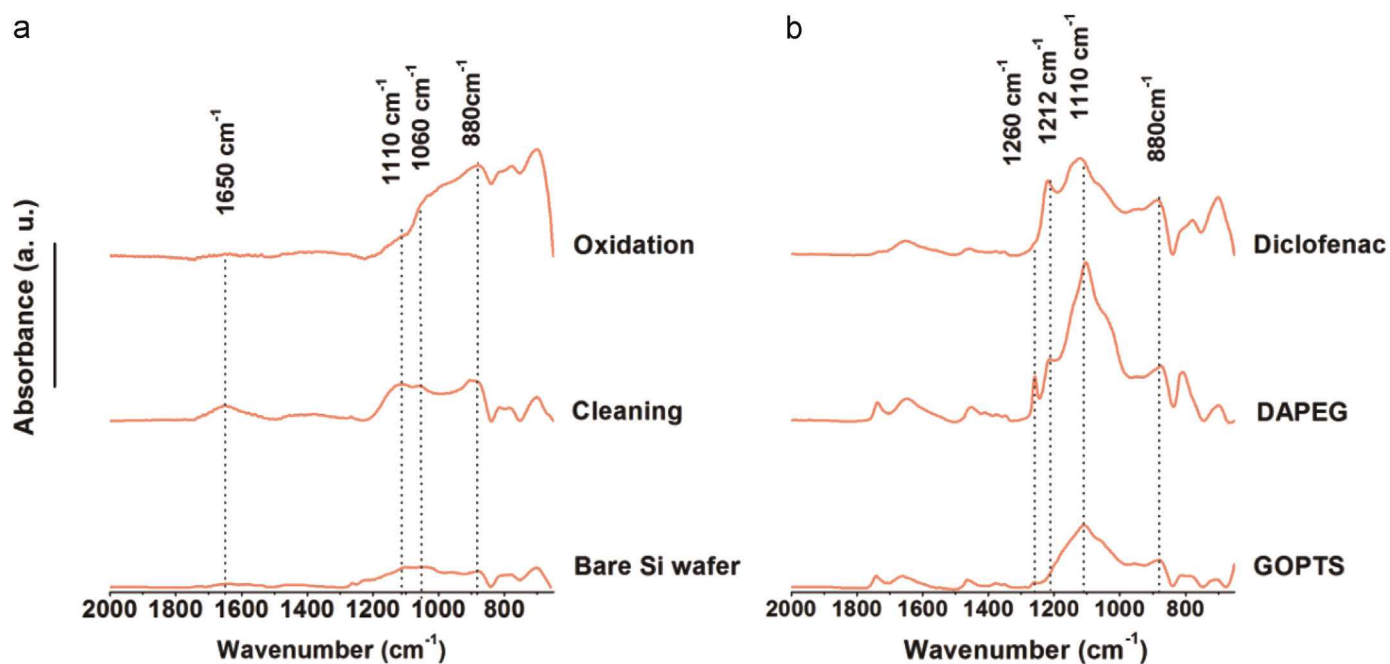


Fig. 3. (a) Baseline corrected GA-ATR FT-IR spectra of Si wafers after cleaning and oxidation and (b) after the functionalization steps.

Table 1

Atomic composition on the Si wafer surfaces after the different modification steps according to XPS spectra.

Binding energy (eV)	Assignment	Peak area (%)		
		GOPTS	DAPEG	Diclofenac
533	O 1s	22	26	26
403	NH ₃ ⁺	–	0.3	0.1
401	NH, NH ₂	–	0.5	0.7
290	C 1s	0.8	–	0.7
287	C–O or C–N	9.7	22	21
286	C–C	7.5	15	6.6
274	Cl 2s	–	–	0.2
104	SiO ₂	6.0	6.4	7.8
101	Si 2p1/2	27	15	18
100	Si 2p3/2	27	15	19

this ratio shows, that on average at least two of three methoxy groups have reacted.

On the DAPEG surface an amine terminus is present as NH₃⁺ as the band at 403 eV indicates. After the reaction with diclofenac, the band at 403 eV (NH₃⁺) has decreased and an increased band at 401 eV can be observed. The band is attributed to NH or NH₂ groups. This shift of the nitrogen band would correspond to a formation of amide bonds on the DAPEG surface. The peaks are shown in Fig. S3a.

With the intensities of the Si 2p bands (Fig. S3b), the layer thickness can be estimated according to Eq. (1) as described in the supplementary data (Table S1). For the GOPTS layer, the calculated thickness of 0.53 nm is below the range of a monolayer. A monolayer would be 0.76 nm (Dinh et al., 2009). The difference indicates that not the entire surface was covered with the silane. The thickness of the GOPTS–DAPEG layer was estimated to be 1.7 nm. After the addition of diclofenac, the thickness was slightly changed to 1.6 nm. This decrease is smaller than the PEG layer itself. Consequently, it is caused by a reorientation of the PEG chains after the attachment of diclofenac. This rearrangement was also shown by GA-ATR FT-IR measurements. The presence of diclofenac is notified by the chlorine signal which is 0.2% of the

overall surface coverage (Fig. S4, Table 1). This chlorine content corresponds to 0.8% of diclofenac on the PEGylated Si wafer.

3.5. Recognition and reversibility of modified surfaces on QCM-D

The recognition properties of the surface modified with diclofenac were assessed by QCM-D using injection of a diluted polyclonal anti-diclofenac antiserum (0.1%). For QCM-sensors, the PEGylated quartz surface was completely covered with diclofenac. The resulting measurement data for the frequency shift and the dissipation are shown in Fig. 4a. Before the antiserum injection, the frequency was stabilized in degassed PBS/EtOH (9/1=v/v). So the antiserum injection led to a decrease in the frequency, indicating the binding of antibodies. Then, the degassed PBS/EtOH solution was injected again to measure the frequency shift due to bound anti-diclofenac antibodies. Meanwhile, the dissipation increased when the diluted serum solution was injected and returned to its value when the buffer solution was added. After the stabilization of the signal, the measured frequency shift was ~12 Hz. As the dissipation at this step was very low, the Sauerbrey equation can be applied which leads to a surface coverage of 42 ng cm⁻². This protein density corresponds to a thickness less than a monolayer (Boujday et al., 2009b). After successive washing the surface with regeneration buffer and degassed PBS solution, the frequency returned to the initial value. This indicates that the bound protein was completely removed.

To evaluate the stability of the DAPEG surface and to investigate the reproducibility of the procedure, several regeneration cycles were carried out. The signal of the stabilization is averaged over 120 s. The resulting values and their standard deviations ($m=120$) are shown in Fig. 4b (original data in Fig. S5). They indicate that the bound protein can be removed from the surface for at least 9 times. The average values for the stabilization of the frequency shift after the injection stayed constant over the first three measurements at approximately 12 Hz. Afterwards, the signal varies within a range of ± 2 Hz with the exception of the 10th measurement which allowed only a very low frequency shift. This signal decrease is probably caused due to the long time (9 h) the piezoelectric device was running.

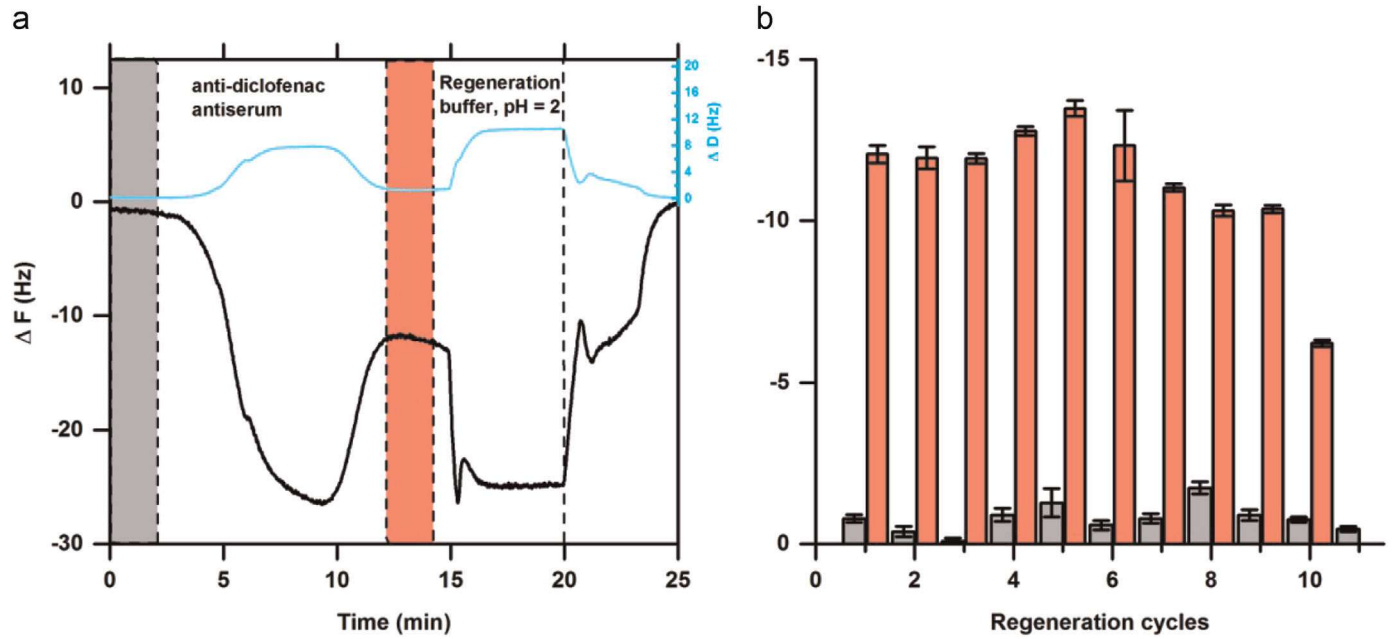


Fig. 4. (a) Regeneration protocol and reversibility for anti-diclofenac antiserum binding to diclofenac immobilized on the DAPEG modified quartz surface. (b) The frequency shift was measured before (gray bars) and after (red bars) the antiserum injection during the stabilization steps with degassed PBS/EtOH. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The stabilization of the signal after the regeneration step shows a deviation of ± 1 Hz for the 10 measurements. So the surface is regenerated after each cycle. However, the measurement conditions

were obviously not absolutely the same for each regeneration cycle. The deviation can be explained by changes of the composition of the PBS solution containing 10% EtOH in the beginning. During the

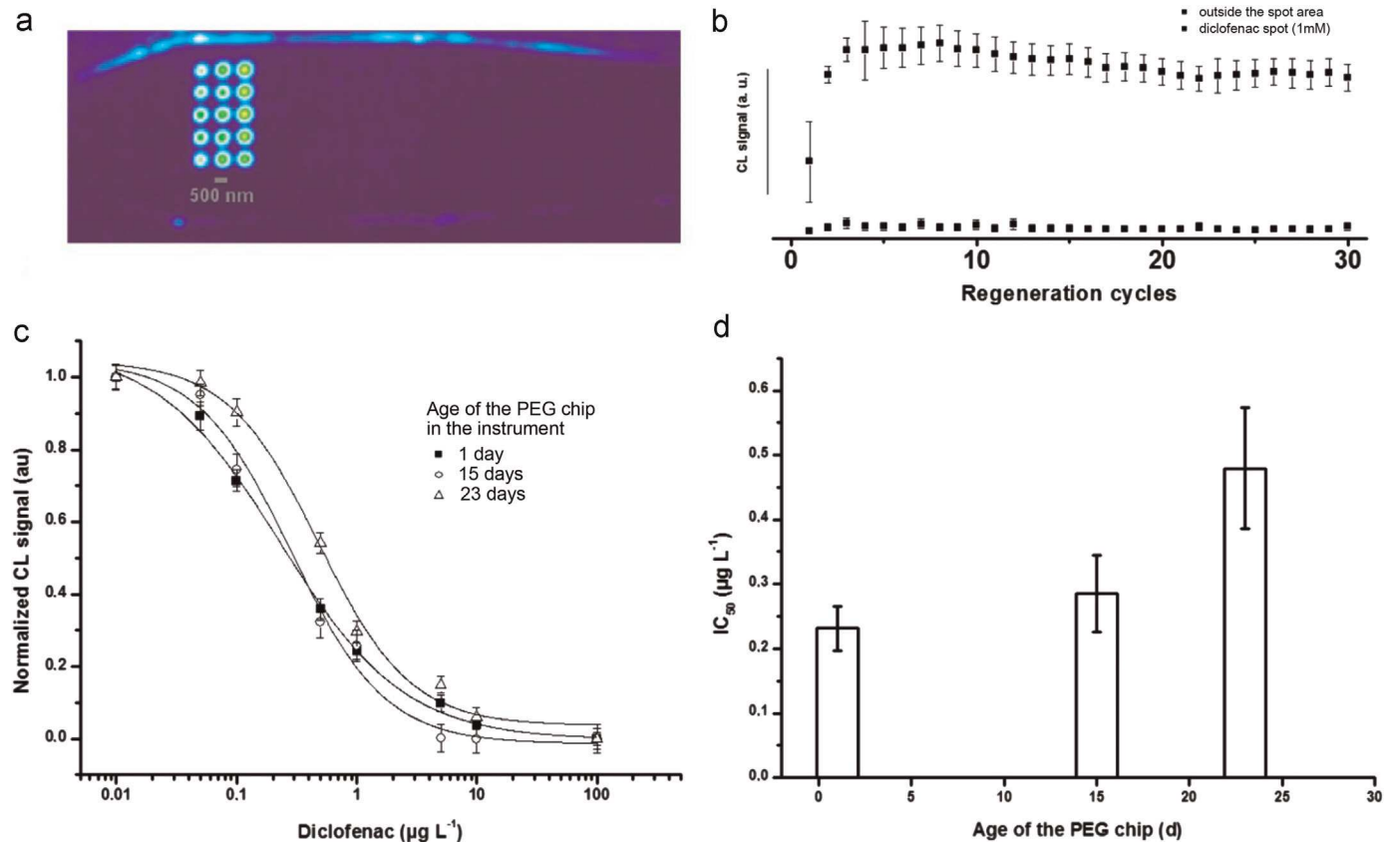


Fig. 5. (a) The CL image of the complete flow cell after performing the immunoassay with different spotted diclofenac concentrations per column. From the left: 0 mM (no spots visible), 0.1 mM, 0.5 mM, and 1 mM (Image was created by using ImageJ). (b) Consecutive cycles of measurement/regeneration using the same microarray with 1 mM diclofenac spotting concentration ($n=30$, $m=5$). (c) Calibration experiments ($n=8$, $m=5$) to estimate the shelf life of the microarray. (d) Assay sensitivities specified by IC_{50} values for the different calibration curves.

following 5 h of the measurement on air, the initially degassed running buffer can absorb air. The increased gas content can lead to an increase of the frequency shift of the zero value. In addition, a decreasing content of ethanol can decrease the signal as it occurs in the end for the injection signals. The data evaluation shows, that after the first three measurements, the conditions have notably changed. This corresponds to 1.5 h of measurement.

3.6. Reversible detection of diclofenac by an automated microflow-based ELISA with chemiluminescence readout

The preparation of a diclofenac microarray on a DAPEG modified glass slide was performed in order to test the non-specific binding, reversibility and lifetime of the spotted chip in the used instrument. In Fig. 5a, an image of the flow cell is shown. It was recorded after the binding of anti-diclofenac antibodies to the diclofenac microarray on the glass slide. The bound primary antibodies were detected with a secondary anti-rabbit IgG peroxidase conjugate and chemiluminescence (CL) readout after addition of substrate. The image shows, that outside the diclofenac spots, no antibodies were non-specifically adsorbed on the DAPEG surface. Moreover, the spot size and CL signal intensity are depending on the amount of diclofenac immobilized, because the spots with 0.1 mM diclofenac are smaller and less intense than with 1 mM diclofenac. The CL signal at the edges of the flow cell has been caused by the non-specific interaction of the secondary antibodies with the glue material which was used to assemble the flow cell.

In Fig. 5b, the average CL signals of 5 diclofenac spots and 5 blanks (no diclofenac spotted) over 30 consecutive cycles of antibody injections and regeneration steps are shown. During the first three regeneration cycles, the signals on the spots are raised which is caused by moistening and swelling of the PEG layer. After the following 27 cycles, the average signal, on 5 equal spots, decreases to 90% of the initial value.

For the investigation of long-term stability of the microarray on the glass slide in aqueous environment, a calibration experiment with aqueous diclofenac standards ($0.001\text{--}100\ \mu\text{g L}^{-1}$) was performed on the same glass chip after 14 and 23 days (Fig. 5c). Between the measurements, the glass slide was stored in water at room temperature within the flow cell of the instrument. The sensitivity of the immunoassay can be indicated by the inflection point of the sigmoidal calibration curve (IC_{50}). According to Fig. 5d, the assay sensitivity did not change significantly for 15 days. However, after the 23 day-period, the sensitivity dropped by about 50%, i. e., the IC_{50} shifted from initially $(0.23 \pm 0.034)\ \mu\text{g L}^{-1}$ to $(0.48 \pm 0.094)\ \mu\text{g L}^{-1}$. Hence, the shelf-life of the prepared microarray chips can be estimated roughly 14 days under the aqueous conditions in the flow-through device.

4. Conclusion and outlook

The presented PEG-surface coverage allows preparing homogeneous and stable surfaces for measuring antibody interaction with the corresponding hapten. Every surface preparation step could be analyzed in detail with the described methods.

GA-ATR FT-IR spectra showed that the initial cleaning method allows moistening the Si–O–Si framework on the silica surface. In addition, the oxidation with concentrated sulfuric acid works efficiently and generates a high yield of silanol groups on the silicon and glass slide surfaces. The following application of GOPTS yields a dense surface coverage on both substrates as observed by high contact angles. The XPS data showed that the silane reacts with the oxidized surface and leads to a surface coverage below the monolayer range. However, after the PEG attachment, uneven

spots on the silicon wafer have vanished indicating a homogeneous functionalized silica surface which can be observed in AFM images as well. The XPS analysis revealed that the chlorine of diclofenac can be detected, however, the amount of diclofenac is only about 0.8% and the layer thickness is not notably changed. Only rearrangements of the PEG chains can be seen in GA-ATR FT-IR as indicated by the decrease of intensity of the bands. The surfaces are densely covered by the diclofenac coupled to the PEG, because the RMS values (1.2 and 1.1 nm) are smaller than the layer thickness as determined by XPS (1.6 nm). This dense coverage prevents the antibody with a diameter of $\sim 10\text{--}12\ \text{nm}$ from non-specific interaction with the silica surface.

The recognition and response measurements by QCM-D showed that the created surface is stable over at least 10 regeneration cycles and all bound protein (antibodies) is removed during a regeneration cycle. Finally, the chemiluminescence measurements of a diclofenac microarray on a glass slide showed that the antibody binds only to diclofenac immobilized on the PEG surface. The primary antibody can be detected by a secondary anti-rabbit IgG peroxidase conjugate. One chip can be regenerated for at least 30 regeneration cycles without significant decrease of CL signal intensity. The chip area outside the spotted diclofenac did not adsorb proteins from the diluted antiserum during the whole measurement time ($\sim 6\ \text{h}$). Consequently, a stable and reliable surface for reversible immunorecognition has been created. This surface was also stable for several days when stored in the microflow device in aqueous solution. The model analyte diclofenac can be replaced by any other hapten or antigen and, the experiments on QCM-D and the MCR 3 show that the surface chemistry can be used for either label-free or label-based biosensing applications. Therefore, this sensing layer can be used as universal platform for small-sized analyte biosensing. The chip reusability and storage conditions will be tested with real sample applications consecutive to this work.

Acknowledgments

This work was co-financially supported by ANR, Agence Nationale de la Recherche and DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, ANR-DFG program, project NArBioS, Grant no.: ANR-11-INTB-1013. The DAPEG is a kind gift of the Huntsman Corporation (Rotterdam, The Netherlands).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.047>.

References

- Boujday, S., Briandet, R., Salmain, M., Herry, J.M., Marnet, P.G., Gautier, M., Pradier, C.M., 2008. *Microchim. Acta* 163 (3–4), 203–209.
- Boujday, S., Gu, C., Girardot, M., Salmain, M., Pradier, C.-M., 2009a. *Talanta* 78 (1), 165–170.
- Boujday, S., Methivier, C., Beccard, B., Pradier, C.-M., 2009b. *Anal. Biochem.* 387 (2), 194–201.
- Boujday, S., Nasri, S., Salmain, M., Pradier, C.-M., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 26 (4), 1750–1754.
- Cras, J.J., Rowe-Taitt, C.A., Nivens, D.A., Ligler, F.S., 1999. *Biosens. Bioelectron.* 14, 683–688.
- Dekeyser, C.M., Buron, C.C., Mc Evoy, K., Dupont-Gillain, C.C., Marchand-Brynaert, J., Jonas, A.M., Rouxhet, P.G., 2008. *J. Colloid Interface Sci.* 324, 118–126.
- Deng, A.P., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R., Knopp, D., 2003. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3422–3429.

- Dinh, D.H., Vellutini, L., Bennetau, B., Dejous, C., Rebière, D., Pascal, E.m., Moynet, D., Belin, C., Desbat, B., Labrugère, C., Pillot, J.-P., 2009. *Langmuir* 25, 5526–5535.
- Gooding, J.J., Ciampi, S., 2011. *Chem. Soc. Rev.* 40 (40), 2704–2718.
- Han, K.N., Li, C.A., Seong, G.H., 2013. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 6 (1), 119–141.
- Jiang, X., Li, D., Xu, X., Ying, Y., Li, Y., Ye, Z., Wang, J., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23 (11), 1577–1587.
- Kloth, K., Niessner, R., Seidel, M., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24 (7), 2106–2112.
- Liebes, Y., Amir, L., Marks, R.S., Banai, M., 2009. *Talanta* 80 (80), 338–345.
- Lummerstorfer, T., Hoffmann, H., 2004. *Langmuir* 20 (16), 6542–6545.
- Lummerstorfer, T., Kattner, J., Hoffmann, H., 2007. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (1), 55–64.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W., 2001. *Clin. Chim. Acta* 314, 1–26.
- March, C., Manclús, J.J., Jiménez, Y., Arnau, A., Montoya, A., 2009. *Talanta* 78 (3), 827–833.
- Mehne, J., Markovic, G., Pröll, F., Schweizer, N., Zorn, S., Schreiber, F., Gauglitz, G., 2008. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (391), 1783–1791.
- Mirasoli, M., Guardigli, M., Michelini, E., Roda, A., 2014. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 36–52.
- Mohammed, M.-I., Desmulliez, M.P.Y., 2011. *Lab Chip* 11 (4), 569–595.
- Oswald, S., Karsunke, X.Y.Z., Dietrich, R., Märtilbauer, E., Niessner, R., Knopp, D., 2013. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405.
- Piehler, J., Brecht, A., Valiokasb, R., Liedberg, B., Gauglitz, G., 2000. *Biosens. Bioelectron.* 15, 473–481.
- Prieto-Simón, B., Campàs, M., 2009. *Monatshefte Chem.* 140 (8), 915–920.
- Rau, S., Hilbig, U., Gauglitz, G., 2014. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406.
- Salmain, M., Ghasemi, M., Boujday, S., Pradier, C.-M., 2012. *Sens. Actuators B–Chem.* 173, 148–156.
- Salmain, M., Ghasemi, M., Boujday, S., Spadavecchia, J., Techer, C., Val, F., Le Moigne, V., Gautier, M., Briandet, R., Pradier, C.-M., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 29 (1), 140–144.
- Sauerbrey, G., 1959. *Z. Phys.* 155 (2), 206–222.
- Shankarana, D.R., Gobi, K.V., Miura, N., 2007. *Sens. Actuators B* 121 (1), 158–177.
- Shiddiky, M.J.A., Kithva, P.H., Kozak, D., Trau, M., 2012. *Biosens. Bioelectron.* 38 (1), 132–137.
- Su, X., Chew, F.T., Li, S.F.Y., 2000. *Anal. Sci.* 16, 107–114.
- Tian, R., Seitz, O., Li, M., Hu, W., Chabal, Y.J., Gao, J., 2010. *Langmuir* 26 (7), 4563–4566.
- Tsukruk, V.V., Luzinov, I., Julthongpiput, D., 1999. *Langmuir* 15 (9), 3029–3032.
- Ulman, A., 1996. *Chem. Rev.* 96, 1533–1554.
- Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., 2007. *Anal. Chem.* 79, 4529–4537.
- Yim, H., Kent, M.S., Tallant, D.R., Garcia, M.J., Majewski, J., 2005. *Langmuir* 21 (10), 4382–4392.

Revealing the Interplay between Adsorbed Molecular Layers and Gold Nanoparticles by Linear and Nonlinear Optical Properties

Laetitia Dalstein,[†] Maroua Ben Haddada,^{‡,||} Grégory Barbillon,[§] Christophe Humbert,[†] Abderrahmane Tadjeddine,[†] Souhir Boujday,^{‡,||} and Bertrand Busson*,[†]

[†]Univ. Paris-Sud, Laboratoire de Chimie Physique, CNRS, Bâtiment 201 Porte 2, 91405 Orsay, France

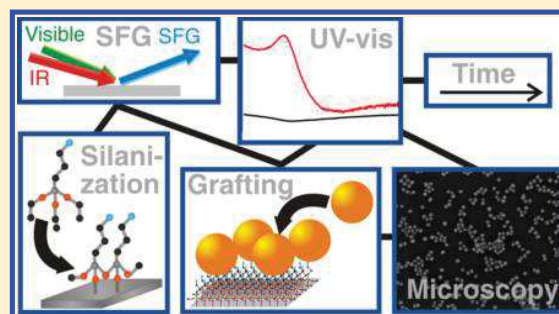
[‡]Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 6, UMR CNRS 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F75005 Paris, France

^{||}CNRS, UMR 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F75005 Paris, France

[§]Univ. Paris-Sud, Institut d'Electronique Fondamentale, CNRS UMR 8622, Bâtiment 220, 91405 Orsay, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Gold nanoparticles (AuNPs) chemically grafted on substrates are widely used as sensors due to their plasmonic properties. The efficiency and robustness of such sensors strongly depend on the molecular sublayer structure, which influences the distribution of AuNPs, and therefore the plasmonic properties of the layer. Few spectroscopic tools are able to sense the grafting layer both before and after particle deposition. Here, we use sum-frequency generation (SFG) spectroscopy to deeply investigate both the grafting layer and the immobilized AuNPs. We combine SFG with reflectance UV–visible spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) for 14 nm diameter AuNPs, dispersed on modified silicon surfaces with either amine or mixed amine/thiol terminated layers. SFG spectra show the specific vibrational fingerprint of each supporting layer through the amplitudes of methylene and methyl vibration modes and prove the presence of unreacted ethoxy groups from (3-aminopropyl) triethoxysilane. We establish a linear evolution of the absorbance amplitudes with AuNP surface coverage, a relationship valid up to the aggregation limit of 10^{11} AuNPs·cm⁻². In the same way, SFG amplitudes follow a quadratic dependence with the UV–vis absorbance amplitudes, showing the close correlation between nonlinear and linear optical properties. In addition, the optical properties of the AuNP layers are stable for several months (plasmon position and damping) despite their storage in ambient air and long exposure to visible laser light.



INTRODUCTION

Over the last several decades, the use of materials with plasmonic properties has been expanding rapidly.^{1–4} Among the various uses of plasmonics, surface sensing has greatly benefitted from the optical enhancements due to the interaction of light with surface plasmons.¹ The use of localized surface plasmon resonance, surface roughness, or metallic nanoparticles typically leads to dramatic improvements in the performance and sensitivity of devices. Using nano-objects on a substrate offers the advantage of a tailor-made production, with a large choice of sizes, shapes, and chemical composition, depending on the properties sought. Gold nanoparticles (AuNP) are routinely used because they associate a high chemical stability with plasmonic properties tunable in the visible and in the near-infrared ranges. Their asset lies in the localized surface plasmon resonance (LSPR) of the individual nano-objects. LSPR strongly depends on the shape, size, environment, and chemical composition of the nanoparticles. Gold nanospheres with 10–20 nm diameter are a textbook example, with one SPR in the green region of the spectrum, around 525 nm in aqueous solution.^{2,5–7} Plasmonic properties

are also modified upon interaction at the surface of a substrate. Controlling the distance between particles (average and distribution) grafted on a surface remains one of the challenges of such a synthesis of complex materials.^{8–11}

Metallic nanoparticles are usually grafted on surfaces through wet chemistry procedures where NPs are first synthesized in solution and then immobilized on prefunctionalized surfaces. On gold substrates, grafting is achieved through a self-assembled monolayer (SAM) of thiols, whereas silanes are chosen for silicon or silica-like materials, with a large choice of available terminal functional groups, providing a simple approach for adsorption of the nanoparticles with an amine group,^{12–14} as well as more elaborate chemical transformations (e.g., gold grafting through a thiol termination^{8–10} or bidentate ligands like lipid acid¹⁵). The quality of a substrate/SAM/AuNP assembly may be defined in terms of surface homogeneity (or designed heterogeneity¹⁶), structural quality,

Received: April 15, 2015

Revised: July 3, 2015

Published: July 6, 2015

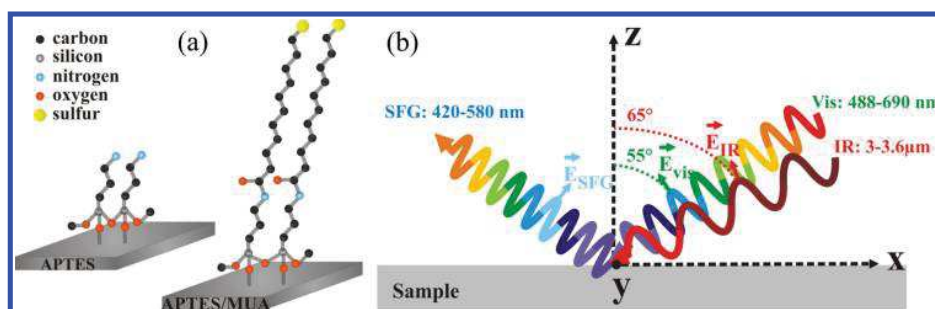


Figure 1. (a) Schematic of the expected silane layers; (b) SFG experimental configuration: XZ is the incidence plane of the SFG, vis, IR beams in a ppp polarization scheme.

and thickness of the silane layer, surface density and mean distance between the grafted particles, and plasmonic properties of the individual or aggregated particles. Reproducibility and simplicity of the chemical preparation also condition the large-scale use of the overall method. This makes it crucial to be able to control the quality of substrate/SAM/AuNP systems.

UV–visible spectroscopy, in transmission or reflection mode, is a reliable tool for investigating the absorption properties of AuNP layers. Coupling to atomic force or electron microscopy makes it possible to correlate plasmonic properties to the distribution of particles on the surface.^{12–17} X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) provides valuable data on SAMs; however, it does not support in situ analysis during self-assembly and grafting at the solid–liquid interface. The chemical and structural analysis of SAMs greatly benefits from enhanced vibrational spectroscopies. Surface enhanced Raman scattering (SERS) sensitivity can reach the single molecule level¹⁸ but can only be used to characterize the layer after deposition of gold nanoparticles. Surface infrared methods like IRRAS (infrared reflection absorption spectroscopy),¹⁹ ATR (attenuated total reflectance),²⁰ or multiple-reflection infrared spectroscopy²¹ allow for the characterization of a monolayer on silicon, but the addition of the gold objects adds significant complications to the analysis because of the presence of surfactants, and most of these techniques lack coupling to the plasmonic properties of the AuNPs. Sum-frequency generation spectroscopy (SFG) is sensitive enough to study the bare monolayer and benefits from an enhancement due to the SPR when gold nanospheres are present.²² In addition, it should be sensitive to the structures located under the gold layer.

Several kinds of SAMs have been studied by SFG, mostly thiols^{22–25} and silanes. Studies on silanes mostly concentrate on the adsorption on silicon and quartz and monitor layer growth and order through the CH stretches, in particular the terminal CH₃ groups from alkyl silanes.^{26–32} Aminoalkyl silanes have the additional advantage over alkylsilanes that they are provided with a free amine function, which can be used to attach AuNPs through electrostatic interaction, as mentioned above. Such films have also been investigated with SFG in pure³³ or mixed films.³⁴

In this work, we investigate, at each step, the chemical and optical properties of several types of Si/SAM/AuNP systems. The different chemical functions of the SAMs, amine and/or acid, led to various densities and aggregation states of the deposited particles, measured by scanning electron microscopy and UV–visible reflectance spectroscopy. SFG is used to investigate the structure of the SAM and the properties of the AuNP layers. We correlate the linear and nonlinear optical

properties of the AuNP layers and discuss them with respect to the local density of particles, whether aggregated or not, on silica surfaces.

EXPERIMENTAL DETAILS

Materials. *N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide hydro-chloride (EDC, 98%), sodium citrate (HOC(COONa)(CH₂COONa)₂·2H₂O, 99%), gold(III)chloride trihydrate (HAuCl₄, 3H₂O, 99.9%), tannic acid (C₇₆H₅₂O₄₆, 99%), dodecanethiol (CH₃(CH₂)₁₁SH, 98%), and thiophenol (C₆H₅SH, 99%) were purchased from Sigma-Aldrich. *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 97%), 11-mercaptoundecanoic acid (MUA, 95%), and (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES, 99%) were purchased from Aldrich. *N*-doped silicon wafer (100) from Siltronix was cut into 2 × 2 cm² pieces. Sulfuric acid (H₂SO₄), 96%, and hydrogen peroxide (H₂O₂), 30% in water, were supplied by Carlo Erba. Toluene, acetone, and ethanol were purchased from Analar Normapur. Milli-Q water (18 MΩ·cm, Millipore, France) was used for the preparation of aqueous solutions and for all rinses. All chemicals were reagent grade or higher and were used without further purification.

Surface Functionalization. First, silicon surfaces were cleaned following a procedure which includes several washing steps, a piranha solution treatment, and finally UV–ozone cleaning. A detailed description of this procedure is given in ref 20. The same experimental conditions were applied for silane grafting for the amine-terminated silane (APTES): oxidized and cleaned silicon wafers were immersed in a 50 mM solution of silane in anhydrous toluene at 75 °C for 24 h. After silanization, the samples were washed twice, sonicated for 10 min in anhydrous toluene, dried under nitrogen, and heated at 90 °C for 2 h. The MUA grafting was achieved after APTES deposition on silicon surfaces. First, MUA was activated in solution using a mixture of EDC and NHS in ethanol for 90 min. Then the APTES-modified silicon surfaces were placed in the activated solution of MUA for 90 min and then washed twice in ethanol and dried under nitrogen (Figure 1a). The corresponding interfaces will be referred to as Si/SAM.

Gold Nanoparticles Preparation and Deposition. Colloidal gold particles were prepared according to the tannic acid method of Slot and Geuze.³⁵ To produce 100 mL of a 14 nm diameter colloid, two stock solutions were prepared: solution A, 1 mL of 1% (w/v) HAuCl₄ and 79 mL of deionized water; solution B, 4 mL of 1% sodium citrate, 0.025 mL of 1% tannic acid, and 16 mL of deionized water. Solutions A and B were heated to 60 °C and mixed while stirring. Once the solution turned red, the mixture was heated up to 95 °C and

cooled on ice. Gold nanoparticle size was confirmed by transmission electron microscopy indicating an average size of 13.5 nm, and the concentration of AuNP in the solution is 3.34 nmol L⁻¹. Freshly synthesized AuNPs were then deposited, with no further dilution, on the Si/SAM surfaces for 30 or 60 min in a sonication bath (Elma, 90 W, 45 kHz). Finally, silicon substrates were washed twice in water and dried under nitrogen. The corresponding interfaces will be referred to as Si/SAM/AuNP in the following. Some samples were functionalized with dodecanethiol (DDT) or thiophenol (TP) by dipping them in an ethanol solution at 10 mM for 12 h. The corresponding interfaces are referred to as Si/SAM/AuNP/DDT (respectively Si/SAM/AuNP/TP) in the following.

Scanning Electron Microscopy. Images of the gold nanoparticles on the modified silicon wafers were obtained using a SEM FEG Hitachi SU-8000 scanning electron microscope (SEM) with a voltage of 15 kV and a working distance of 5.9–10.1 mm. Images were analyzed using the free software ImageJ³⁶ to measure the surface density of nanoparticles. We determine the number of nanoparticles by counting them individually for three different images at least in three different regions of the samples. As it is not possible to determine the exact number of particles present in clusters, we did not consider clusters and established estimated values. SEM images were all recorded after the DDT (respectively TP) functionalization step.

UV–Visible Spectroscopy. Silicon substrates are not transparent in the probed optical range (400–800 nm); thus, the transmission mode could not be used. UV–visible absorbance spectra were recorded in specular reflection geometry with a Cary-5000 spectrophotometer Agilent at an incidence angle of 55°. We used a UV–vis VeeMAX accessory from PIKE Technologies. Polarization was adjusted parallel (*p*) or perpendicular (*s*) to the plane of incidence, (*x*, *z*) in Figure 1 (more details in the Supporting Information). A reference spectrum of the bare silicon substrate was first recorded to obtain the optical signature of the grafted AuNPs by differential measurement. In these conditions, the measurement reproducibility is ensured at a level greater than 10⁻³ absorbance units.

Nonlinear Optical Vibrational Spectroscopy. Sum-frequency generation spectra were recorded by using a setup similar to the one described in ref 17. It is based on a 6.8 ps pulsed laser Nd:YVO₄ source coupled to an Acousto Optic Modulator (62.5 MHz micropulse repetition rate, 2 μs train, 25 Hz macropulse repetition rate). After amplification, one part of the beam is used to pump an infrared optical parametric oscillator (OPO) built around a LiNbO₃ crystal giving access to the 2500–4000 cm⁻¹ spectral range (10 μJ pulse energy, 3 cm⁻¹ OPO bandwidth). The other part is used to obtain a tunable visible beam (5 μJ pulse energy, 440–710 nm wavelength) by frequency conversion in an OPO built around a BBO crystal. The infrared and visible beams are then mixed in a copropagating geometry at the same point of the probed surface for each sample. The incidence angles are therefore 65° and 55° with respect to the surface normal, respectively. The infrared, visible, and SFG beams are *p*-polarized. All the SFG data are recorded in the same experimental conditions as depicted in Figure 1b with the same infrared (IR) and visible powers. A reference measurement on a ZnS crystal is performed simultaneously to take into account possible intensity fluctuations. For a fixed visible wavelength, the SFG spectra are recorded as a function of the IR wavelength in the 3.0–3.6 μm spectral range of the CH stretch to probe the alkyl

vibration of the APTES and APTES/MUA supporting layers. In these conditions, the SFG photons are detected by photomultipliers after spatial and spectral filtering through a monochromator.

The SFG intensity is directly proportional to the sample response:^{37,38} $I_{\text{SFG}} \propto |\chi_{\text{eff}}^{(2)}|^2 I_{\text{VIS}} I_{\text{IR}}$ with I_{VIS} , I_{IR} the intensities of the visible and IR incident beams, respectively. $\chi_{\text{eff}}^{(2)}$ is the effective nonlinear second order susceptibility of the interface, which can be written as $\chi_{\text{eff}}^{(2)} = \chi_{\text{Si/Au}}^{(2)} + \chi_{\text{m}}^{(2)}$. $\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)}$ is the second-order nonlinear susceptibility of silicon and gold nanoparticles (when the latter are present, and $\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)}$ is essentially constant in a vibrational spectrum and, hence, often called the nonresonant contribution to the SFG signal). $\chi_{\text{m}}^{(2)}$ is the second-order nonlinear susceptibility of the organic layers. The SFG signal is therefore modeled by the complex second order susceptibilities of gold nanoparticles ($\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)}$) and the organic molecular layer ($\chi_{\text{m}}^{(2)}$) by analogy with a metal–molecule interface:³⁹ $I_{\text{SFG}} \propto |\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)} + \chi_{\text{m}}^{(2)}|^2$, where $\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)}$ and $\chi_{\text{m}}^{(2)}$ ⁴⁰ are complex values, and interfere constructively or destructively depending on the modulus and phase of $\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)}$.^{41,42}

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Silane Layers before and after AuNP Immobilization. The Si/SAM samples were previously characterized by X-ray photoelectron spectroscopy and contact angle measurements.¹⁰ The results confirmed the successful grafting of APTES on silicon surfaces. Upon adding MUA to the APTES-modified layers, only 24% of the amine functions reacted leading to a mixed layer SH/NH₂ (24%/76%). In order to gain insight into the structure of the SAM, we acquired SFG spectra by tuning the IR source over the spectral range of CH₂ (*x* = 2, 3) stretching modes. The molecular response $\chi_{\text{m}}^{(2)}$ becomes resonant, and its complex amplitude increases, when the IR frequency matches that of a vibration mode fulfilling two conditions: the mode must be both IR and Raman active for one allowed combination of polarizations and must not violate symmetry rules, which essentially state that inversion symmetry leads to a vanishing $\chi_{\text{m}}^{(2)}$. This accounts for the very weak CH₂ stretch signals for an ordered alkyl chain, slightly increasing when gauche defects are present. Figure 2 shows a typical

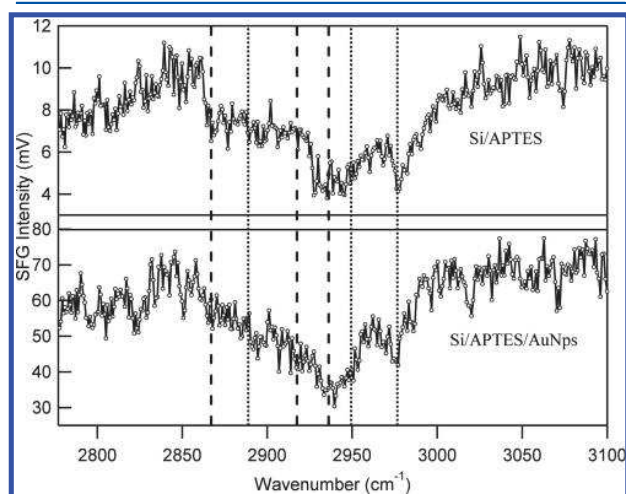


Figure 2. Typical SFG spectra recorded for APTES Si/SAM (top) and APTES Si/SAM/AuNP (bottom) at an excitation wavelength of 532 nm.

spectrum for the Si/APTES interface. This spectral region is rather crowded with vibration mode peaks (see also Figures 3

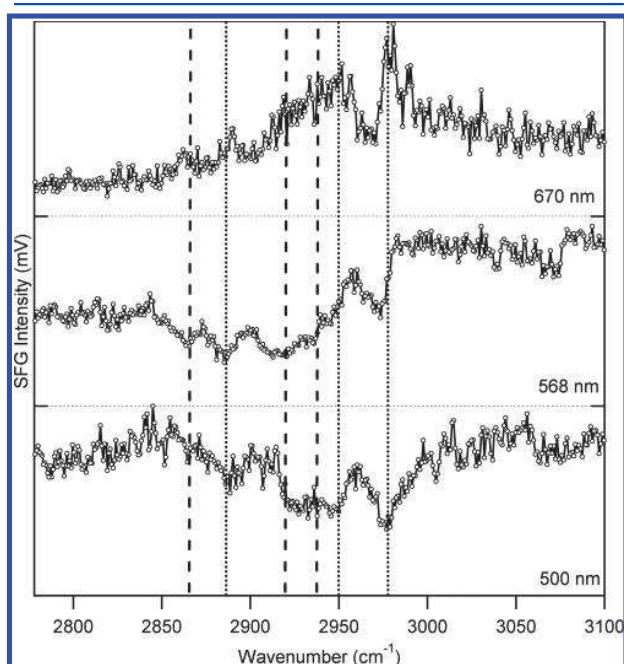


Figure 3. SFG spectra of the APTES Si/SAM/AuNP sample for different excitation wavelengths of the visible domain (670, 568, and 500 nm).

and 4). Signals from the SAM are weak; peaks overlap and interfere with each other, as well as with a weak nonresonant contribution arising from silicon. The first step is therefore to identify SFG peaks by acquiring additional spectra. Adding the gold nanoparticles (Figure 2, bottom) increases the signal-to-noise ratio but has two consequences: first, a new source of CH_x (the citrate molecular layer surrounding the particles) and second an increased nonresonant response mainly due to gold interband transitions (see the Y-scale, approximately 10 times more intense). However, AuNPs allow for the tuning of the visible wavelength of excitation involved in the SFG process (values used are the following: 500, 532, 568, 620, and 670 nm), leading to a phase change between resonant and nonresonant contributions (Figure 3). In this manner, we can observe dip or peak shapes for the molecular vibration modes in the experimental spectra,⁴³ especially when the phase difference between molecular and Si+AuNP contributions varies approximately from 0° to 90° together with an increase in absolute value, when changing color from red to blue as a consequence of gold response changing from weak intraband to strong interband origin.⁴⁴ This greatly facilitates peak attribution as it will be stated in Table 1.

On all spectra, we observe the expected CH_2 symmetric (2863 cm^{-1}) and antisymmetric (2933 cm^{-1}) stretching bands in the region ($2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$). The major concern is the presence, even in the spectra of Si/SAMs, of a band at higher wavelength (around 2978 cm^{-1}) where the antisymmetric CH_3 -stretch-like resonance is normally observed. The presence of unreacted ethoxy groups in APTES layers, still under debate in the literature, may explain this observation. We therefore tried to precisely establish the origin of this band. As a matter of fact, all the observed vibrations may have three different origins: the

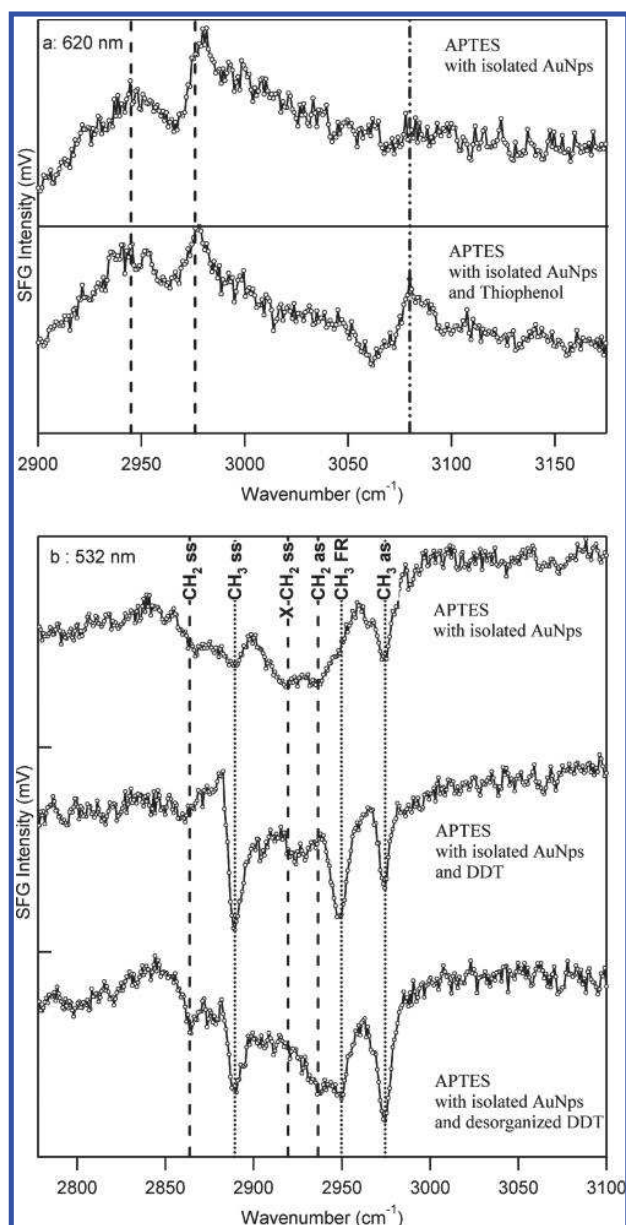


Figure 4. (a) SFG spectra for different samples at 620 nm and in the spectral range of $2900\text{--}3175\text{ cm}^{-1}$ for one sample with APTES and isolated AuNPs without (up) and with (down) thiophenol molecules. (b) In the spectral range of $2780\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ at 532 nm. Absolute scales vary from one spectrum to another.

Table 1. SFG Band Attribution Table for Si/APTES and Si/APTES/AuNP Interfaces

vibration position (cm^{-1})	vibration mode
2863	CH_2 , <i>ss</i>
2888	CH_3 , <i>ss</i>
2911	X- CH_2 , <i>ss</i>
2933	CH_2 , <i>as</i>
2945	CH_3 , <i>FR</i>
2978	CH_3 , <i>as</i>

silane layer, the organic molecules surrounding the AuNPs (when present), or some organic contaminants at the surface.

The 2978 cm^{-1} mode is present both with and without AuNPs, and the overall lineshapes in both spectra in Figure 2 look identical. If this band was due to some contaminant, it would disappear, at least partially, as a consequence of AuNP intake, contrary to what is observed in Figure 2. Therefore, this origin is not likely. Attributing this mode to the citrates surrounding the nanoparticles would not explain the signals measured on Si/SAM prior to AuNP adsorption. We therefore strongly favor the explanation of unreacted ethoxy groups in APTES layers. To confirm this attribution, we have performed a third set of SFG experiments, by functionalizing the particles with thiols, which remove citrate contribution and further suppress contaminant. When the CH_3 -terminated dodecanethiol (DDT) is grafted, the antisymmetric methyl stretch is observed at the same position as the signal from the SAM (Figure 4b). Whereas, upon thiophenol grafting (Figure 4a), the line shape does not change between 2900 cm^{-1} and 3000 cm^{-1} , and a distinctive peak from thiophenol ($\sim 3078\text{ cm}^{-1}$) appears, indicating that citrates have been replaced as expected by thiols.¹⁴ This observation provides additional evidence that the band at 2978 cm^{-1} arises from unreacted ethoxy groups in the APTES SAM, which is coherent with previous findings in the literature.^{33,45,46} Note that this signal is very weak, suggesting that the amount of remaining CH_3 is rather low and/or that these groups are poorly ordered. The ratio R of symmetric over antisymmetric stretching intensities is directly related to the average orientation of the CH_3 groups.²³ This relationship is valid for high index substrates, which favors electric field components along the z -axis (Figure 1). Given the refractive index of silicon in the visible and IR ranges,^{17,47} this approximation remains acceptable here. In the recorded spectra, this ratio is very small in the native SAMs, as symmetric contributions are hardly visible. This leads to favoring a mean geometry of CH_3 groups somewhat parallel to the surface, which is compatible with the hypothesis that some ethoxy groups remain unreacted, even in the first silane layer in contact with the silicon substrate.

Having ascribed the 2978 cm^{-1} band to CH_3 ethoxy groups, vibration mode attribution becomes easier. Using several visible wavelengths allows us to first separate the various peaks (Figure 3). It is worth noting that lineshapes evolve differently with the incident visible wavelengths (Figure 3). These differences between spectra allow several resonances to appear on some spectra and not on others, as a consequence of interferences between vibration modes and the nonresonant background⁴¹ or between neighboring vibration modes.⁴² We need at least three visible wavelengths to identify six vibration modes as depicted in Figures 3 and 4.

In order to attribute each mode, we used a differential approach by comparing native Si/SAM to Si/SAM/AuNP and Si/SAM/AuNP/DDT samples (Figures 3 and 4), in addition to data from the literature^{48,49} (see Table 1). In particular, we measured the SFG spectrum of a Si/SAM/AuNP/DDT sample left for 2 days in air, which induces some disorder in the layer, and therefore enhances the alkyl CH_2 response, helping to attribute CH_2 modes. The two vibrations located at 2863 cm^{-1} and 2933 cm^{-1} are ascribed to the symmetric and asymmetric CH stretching vibration modes of methylene with the carbon surrounded by two other carbon atoms.^{50,51} On the contrary, the vibration located at 2911 cm^{-1} corresponds to symmetric CH stretching vibration mode of methylene with the carbon linked to a heteroatom (Si or N in this case, denoted X- CH_2).⁴⁸ The modes located at 2888 , 2978 , and 2945 cm^{-1} are related to

symmetric (*ss*), asymmetric (*as*), and Fermi resonance (*FR*) CH stretching vibration modes of CH_3 methyl groups. In fact, the three close vibration modes (2911 , 2933 , and 2945 cm^{-1}) strongly interfere together, which makes their attribution difficult based solely on the spectra in Figure 2.

Characterization of the Gold Nanoparticle Deposition. AuNPs were deposited on two chemical layers: APTES or APTES modified by MUA (see Figure 1). The dipping time in AuNP solution was varied, either 30 or 60 min, to change the surface coverage. To ensure the reproducibility of our method, we repeated the protocol three times for each sample. AuNP surface coverage was determined by SEM. For the two Si/SAM, APTES and APTES/MUA, two types of surface coverage were observed: isolated (Figure 5a,c,e,g) and coupled (Figure

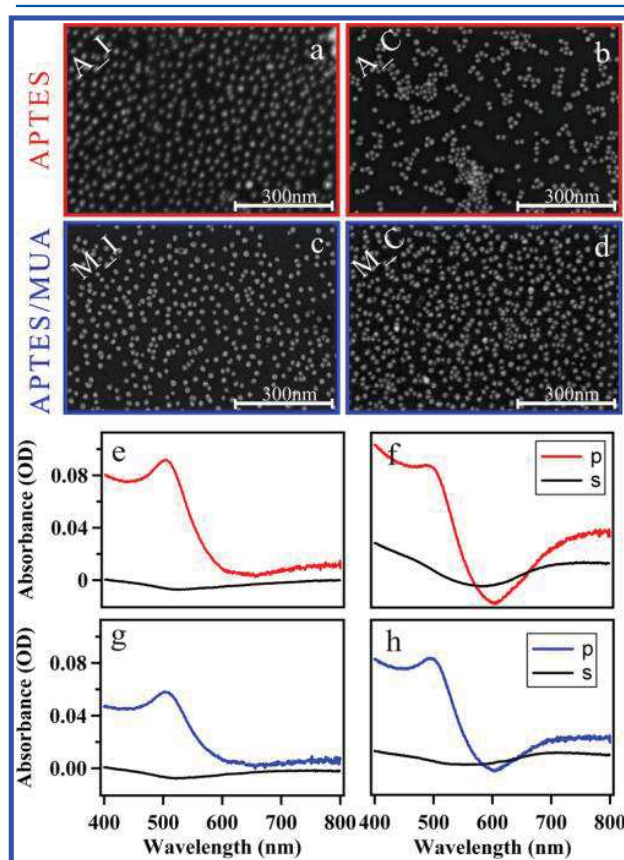


Figure 5. SEM images of silicon surfaces after nanoparticle deposition on APTES (red, top images) or APTES/MUA (blue, bottom images) for isolated AuNPs (left: a, c) and coupled AuNPs (right: b, d); UV-visible measurements of silicon surfaces after nanoparticle deposition on APTES (red, top graphs) or APTES/MUA (blue, bottom graphs) for isolated AuNPs (left: e, g) and coupled AuNPs (right: f, h).

5b,d,f,h) AuNPs. On the basis of AuNP coverages, samples were arranged into four categories (denoted A-I and A-C for isolated and coupled AuNPs on APTES and M-I and M-C for isolated and coupled AuNPs on APTES/MUA. See Supporting Information for SEM images and classification). Figure 5 shows typical SEM images and absorption spectra for each family (represented by the member with the highest surface density). Surface coverage and AuNP layer homogeneity measurements were performed in several regions of the samples. We determined from SEM images the average surface density of

AuNPs (ρ) and the corresponding mean center-to-center distance between particles $D_m = \rho^{-1/2}$. Results are summarized in Table 2 for the four samples of Figure 5. As expected,

Table 2. Surface Density and Mean Distance between Particles for Each Category of Samples (DT = Dipping Time, SC = Sample Category)

silane	DT (min)	SC	ρ (10^{10} AuNPs \cdot cm $^{-2}$)	D_m (nm)
APTES	30	A-I	9.86 ± 0.05	31.8 ± 0.1
APTES	60	A-C	11.6 ± 0.1	29.3 ± 0.1
APTES/MUA	60	M-I	9.63 ± 0.06	32.2 ± 0.1
APTES/MUA	60	M-C	14.1 ± 0.1	26.6 ± 0.1

increasing dipping time led to higher surface coverage, regardless of the nature of the SAM. After 30 min (Figure 5a), gold nanoparticles are well separated, whereas after 60 min (Figure 5b,c,d), the nanoparticles come closer to each other on the substrate and eventually interact (the distance between AuNP is in the same range as their size, Figure 5d) or even aggregate in small clusters (Figure 5b). The reproducibility depends on the nature of the SAM. Using APTES, the samples are rather poorly reproducible and fall into the A-I (1/3) and A-C (2/3) categories; the average surface density is high (more than 5×10^{10} AuNPs \cdot cm $^{-2}$); dispersion is homogeneous. For high densities, small clusters are present over the entire surface (Figure 5b); aggregates exist even for low densities. For APTES/MUA samples, reproducibility is better with only 1/6 falling into the M-C category and 5/6 into the M-I category (see Figure 5d). The average surface coverage is lower, but dispersion is more homogeneous than for APTES samples; high densities lead to particles interacting by being close together, but the number of clusters remains low; no aggregation is observed for low densities. We note that, for some samples, there is coexistence of isolated and clustered areas on various spots of the surface; these were assigned to a category based on their dominant character (Figure 5).

We performed UV–visible measurements at 55° incidence on the same set of samples in reflection for s and p polarizations. The typical responses of four representative samples are shown in Figure 5e,f,g,h. For isolated nanoparticles, the A-I and M-I categories, we observe a unique contribution around 505 nm for both p and s polarizations. This peak (p) or dip (s) originates from the localized surface plasmon resonance of AuNPs (LSPR), and its wavelength corresponds to nanoparticles in air as described by the dipolar approximation. The peak or dip shapes are explained by the differences in refractive indices between the silicon substrate and the adsorbed layers.²² For coupled nanoparticle layers, the A-C and M-C categories, a second feature appears as a pronounced dip around 600 nm, followed by a rise in absorbance for higher wavelengths, clearly visible with p -polarized light. This contribution is due to the aggregation of particles as a consequence of longitudinal coupling.¹³ In order to establish a correlation between UV–visible spectra in p -polarized light and AuNP surface coverage, we correlated two absorbance amplitudes to the AuNP coverage: A_{505} , corresponding to isolated AuNPs and measured by the difference between the local maximum (505 nm) and minimum, as depicted in Figure 6a, and the contribution of the interacting particles, A_{800} , measured as the difference in absorbance between the value at 800 nm and the minimum. In Figure 6b,c, these absorbance intensities are plotted as a function of the AuNP coverage.

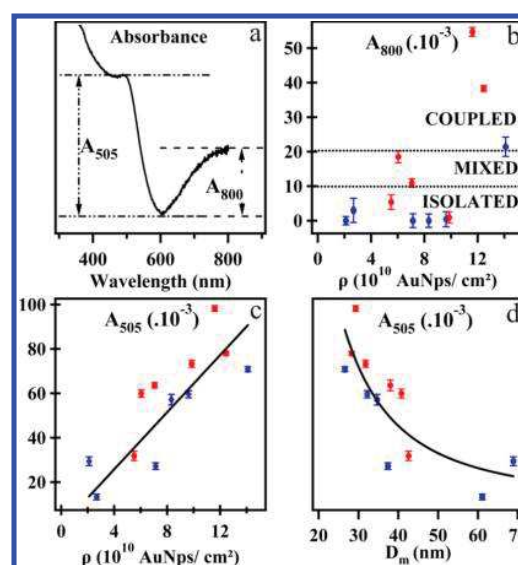


Figure 6. (a) Definition of A_{505} and A_{800} . (b) Absorbance amplitude at 800 nm (blue for APTES/MUA and red for APTES) versus surface density ρ . The coupled, mixed, and isolated characterization refers to the surface distribution of nanoparticles and is deduced from the SEM images. (c) Absorbance amplitude at 505 nm (blue for APTES/MUA and red for APTES) versus surface density ρ . (d) Absorbance amplitude at 505 nm versus mean particle distance $D_m = \rho^{-1/2}$.

When AuNPs are isolated (A-I and M-I categories), A_{800} is very low (less than 10^{-2}), whereas when coupling appears (for A-C and M-C), its intensity increases.

Below the value of 10^{-2} for A_{800} , all the samples can be associated with the isolated category. Above the value of 2×10^{-2} for A_{800} , all the samples can be classified in the clustered/coupled category. Between these two limits, the behavior of the samples shows a mixed character between isolated and interacting particles, depending on the zones probed by SEM. Partial aggregation may occur for rather low densities with APTES SAM, but only for the highest one with MUA (threshold around $\rho \approx 10^{11}$ AuNPs \cdot cm $^{-2}$). On the contrary, A_{505} increases approximately continuously with AuNP coverage, regardless of the aggregation state. Of course, heterogeneous dispersion induces a broad distribution of surface coverage values, which has an impact on the accuracy of the x -axis values in Figure 6a,b,c. The following shows that it is nevertheless possible to quantitatively analyze parameter A_{505} . To this end, we fit A_{505} as a function of D_m (Figure 6d). In this case, the relative uncertainty on the x -axis is divided by 3, making the adjustment more appropriate. The best fit is obtained using a power law, with an exponent close to -2 . This result confirms the linear fit of A_{505} with respect to the surface density ρ . Recording a full UV–visible spectrum takes less than 5 min, whereas a full SEM analysis requires more than 1 h, since several images must be recorded for each sample and then analyzed in order to estimate a density. The relationships shown here provide a fast and easy way to estimate the quality of a set of samples by UV–visible spectroscopy.

Stability in Time. We monitored the stability in time of the AuNP layers by UV–visible measurements. We prepared Si/SAM/AuNP samples with APTES and APTES/MUA SAMs and recorded their UV–visible spectra immediately after gold grafting (Figure 7). They were then stored in airtight boxes in the dark and at room temperature for several days. Then, the

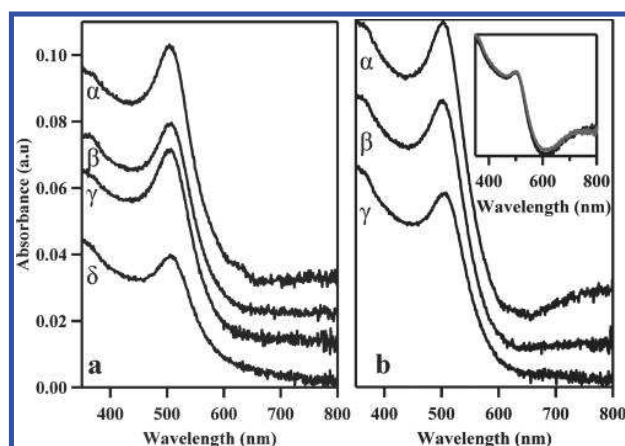


Figure 7. UV–visible spectra of two samples with (a) and without MUA (b) for 30 min dipping times at different experimental steps. For APTES/MUA: α , immediately after preparation; β , several days after preparation and with dodecanethiol functionalization; γ , several days later and exposed to laser sources for 15 h; δ , 11 months later. For APTES: α , immediately after preparation; β , several weeks after preparation, exposed to laser sources for 10 h, with thiophenol functionalization, and exposed again to the laser sources for 15 h; γ , 11 months later. Inset, sample with APTES immediately after preparation (black) and 11 months later (gray) with no laser exposure or functionalization. Each curve is shifted by 0.01 from the previous one for clarity.

aged substrates were functionalized by an alkanethiol and analyzed for several hours on the SFG setup (i.e., exposed for several hours to short, high intensity visible and infrared pulses). The samples were then checked on the UV–visible spectrophotometer several times over the following three months and 11 months later. Figure 7 shows that the samples remain very stable over this 11 month period in spite of the chemical and optical degradation they sustained. The APTES +MUA material (Figure 7a) shows no sign of aging (except for an insignificant baseline drift, intrinsic to the spectrophotometer alignment, which is suppressed by imposing a null minimum for each spectrum) after several months, and a small decrease for very long periods of time. As for the APTES SAM, a decrease of the A_{505} signal was observed over time, characteristic of the presence of the gold nanoparticles. Some of the particles (isolated and aggregated) may have been removed from the surface when the sample was handled or characterized. Nevertheless, the layers of isolated particles seem to remain quite stable over time. Moreover, if the sample suffers no degradation (see insert of Figure 7b), its absorbance remains identical even after 11 months. We may therefore conclude that these grafting methods enable the immobilization of a high density of AuNPs on silicon samples with a high stability.

Effect of Gold Nanoparticles on the Intensity of the SFG Signal. For the four samples described in Figure 5 (each representing one of the categories, A-I, A-C, M-I, and M-C), SFG spectra were recorded between 2780 cm^{-1} and 3330 cm^{-1} (Figure 8) at the visible wavelength of 670 nm. Spectra were normalized by absolute SFG intensities emitted by samples, because we cannot directly compare absolute SFG intensities from the samples when their compositions and structures differ.²² The 670 nm wavelength was chosen because the vibrations appear mostly as peaks with a rather high intensity and because it makes it possible to monitor the differences between isolated and aggregated AuNP layers. Four vibrations

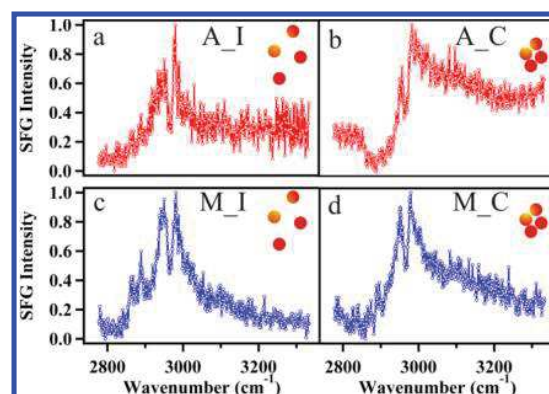


Figure 8. SFG spectra for an incident wavelength of 670 nm for APTES (red) and APTES/MUA (blue) where AuNPs are isolated (a,c) or coupled (b,d). All spectra are normalized to 1 in order to compare the different lineshapes.

among the six listed in Table 1 are clearly observed on all samples, but the central region is too crowded to observe the missing CH_2 modes. The four samples exhibit an essentially uniform vibrational response, with two small differences: the intensities of CH_2 vibration modes are higher for APTES/MUA SAMs, which stems from the additional methylene functions from the MUA. The CH_3 symmetric response is also a bit more intense, but at this stage it would seem to be a structural feature intrinsic to the SAM rather than a consequence of the gold grafting. To a first order approximation, the vibrational features before and after grafting of gold may be considered identical (see also Figure 2). Probing the samples at different points on their surfaces essentially produces the same results. This fact reinforces the hypothesis that the unreacted ethoxy groups from APTES are buried below the surface, are not significantly affected by the MUA postmodification, and do not participate in the gold grafting. More information could be gained from the monitoring of the end groups of the silane chains. Previous studies on alkylsilanes have shown that even the modifications of CH_3 moieties induced by interaction with deposited molecules or cells are rather small but measurable.^{52–54} In our case, we have verified experimentally that the SFG activity of terminal NH_2 groups in the NH stretching region is too weak to be measured effectively, which is consistent with its low infrared and Raman activities.⁵¹ Some SFG measurements indicate that this mode only becomes active after curing the APTES SAM at high temperature.³³

The major difference between the SFG spectra lies in the absolute intensities of the vibrations and of the nonresonant background (originating from the $\chi_{\text{Si/Au}}^{(2)}$ term as explained in the introduction). These contributions are small at 670 nm but nonetheless result in various lineshapes and interference patterns with vibration modes. Direct observation of SFG data shows that particle aggregation leads to an enhancement of the Si+Au background. In order to quantify this phenomenon, we must evaluate the different relevant contributions. We therefore measured the ratio of nonresonant to resonant intensities (NR/R), as directly extracted from the raw spectra. This helps to avoid several problems resulting from comparing absolute SFG intensities between different spectra: the reproducibility from sample to sample; the stability of the power, size, and focus of the incident beams; changes in the Fresnel factors and local field amplifications from the variability in composition and structure of the AuNP layer. The maximum

intensity of the antisymmetric CH_3 peak represents the resonant contribution, whereas the nonresonant contribution is calculated using the average value of the SFG intensity at 3100 cm^{-1} , i.e., far from any molecular resonance (Table 3).

Table 3. NR/R Ratio for the 670 nm Excitation and Surface Density for the Four Samples in Figure 8

sample	$(A_{505})^2$	ρ (10^{10} AuNPs· cm^{-2})	ρ^2	NR/R
A-I	0.537	9.86	97.22	0.308
A-C	0.964	11.6	135.49	0.636
M-I	0.355	9.63	92.74	0.201
M-C	0.502	14.1	150.06	0.413

Consistent with our data, we can make the following approximation: considering that constant factors in the SFG intensity will disappear after dividing the Si+Au intensity by the resonant intensity, the Si+Au intensity is proportional to the square of the nanoparticle surface density (ρ) and the resonant intensity to the square of the surface density of ethoxy groups (ρ_{mol}). The ratio NR/R should therefore be proportional to $(\rho/\rho_{\text{mol}})^2$. Considering that the structures of the ethoxy groups in all samples remain roughly constant as shown above, we hypothesize that ρ_{mol} is also essentially constant in all of the APTES layers, modified or not by MUA. Therefore, proportionality between NR/R and ρ^2 should be visible in Table 3, which is not the case. However, both parameters A_{505} and ρ are an expression of the surface density of nanoparticles. They incorporate the rather high surface heterogeneity into one macroscopic parameter. The discussion above shows that they perform it in a correlated way but with strong differences due to their specificities. Calculated based on electron microscopy images, ρ is the average value, in the various zones investigated on the surface, of a purely local parameter, for which the distribution function is at least as interesting as its mean value. A_{505} on the contrary is a macroscopic quantity, which directly integrates the various local values of surface density over the whole surface of the light spot. Thus, A_{505} seems more appropriate to quantify an effective surface density in an optical experiment. Figure 9 confirms that the NR/R ratio is in fact proportional to $(A_{505})^2$.

This point is worth noting, since we have observed in past studies that it is difficult to establish the proportionality between the SFG intensities and the square of the surface

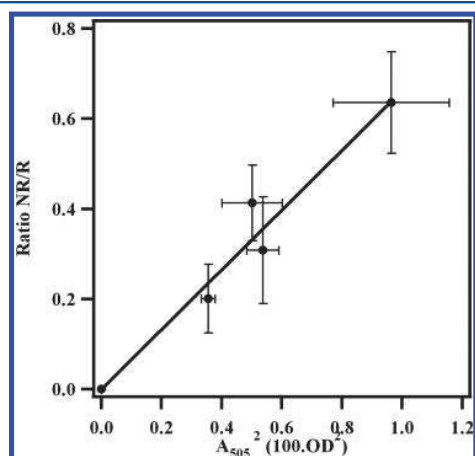


Figure 9. Ratio NR/R plotted as a function of $(A_{505})^2$.

nanoparticle density. We have shown that taking into account the reflectivity effect (Fresnel factors⁵⁵) in the SFG experiment produces results that are in better agreement with this law.¹⁷ Nevertheless, data show that this proportionality is sometimes rather approximate.¹⁴ Here, we propose an alternate method and show that the average surface density measured by SEM (or AFM) is too sensitive to fluctuations on the surface on a macroscopic scale. On the contrary, the A_{505} parameter is a first step in the integration of this surface heterogeneity and therefore constitutes a more reliable value of the actual density. In addition, as an optical measurement, A_{505} already encompasses the reflectivity contributions, making the link to SFG intensities more straightforward. Given the rather wide variety of surface distributions encountered in the set of films studied here, it is quite useful to have access to a single, easily measurable quantity, A_{505} , which accurately describes the state of the AuNP layer.

Finally, the proportionality shown in Figure 9 is additional evidence that the SFG response, both molecular and non-resonant, is enhanced by the plasmonic properties of the grafted gold particles. On the other hand, aggregation seems to have almost no effect on this enhancement. This would seem to contradict the spectra in Figure 8, in which the apparent rise of the NR signal of the A-C sample is essentially due to the high concentration of particles at the surface. This can be explained by the properties of SFG spectroscopy. As stated above, due to the high refractive index of silicon, SFG in a *ppp* polarization scheme mostly monitors the (*zzz*) coefficient of $\chi^{(2)}$, where *z* is the axis perpendicular to the surface.¹⁷ As a consequence, the plasmonic properties involved in SFG enhancement mostly derive from perpendicular surface plasmons. When aggregation occurs, longitudinal coupling between particles strongly affects the in-plane plasmonic properties, whereas the perpendicular ones are only modified through transverse coupling, which in principle results in a weak blueshift and damping,⁵⁶ all these effects being included in the A_{505} parameter. However, a detailed study on the effect of aggregation on enhancement factors requires fitting spectra recorded for several visible wavelengths, in order to fully separate the molecular and nonresonant contributions in an absolute manner. This systematic analysis is planned for future studies.

CONCLUSION

In this article, we investigated Si/SAM/AuNP films for different surface coverages of gold nanoparticles and two SAMs, APTES and APTES/MUA. We combined microscopic and spectroscopic tools for the films analysis. SFG analysis of the APTES and APTES/MUA SAMs allowed us to identify all the corresponding vibration modes. In spite of the weakness of the SFG signals, this spectroscopy showed the presence of unreacted ethoxy groups from the silane. These terminal CH_3 functions lie mostly parallel to the silicon plane. AuNP grafting led to a significant enhancement of the SFG signal but did not modify the internal structure of the SAM. The local enhancement of the SFG signals made it possible to monitor the weak response of our samples by tuning the visible wavelength involved in the SFG process. Using APTES or APTES modified by MUA as an interlayer between silicon and AuNPs led to significant differences. The addition of MUA stabilized the gold nanoparticle layer and favored homogeneous adsorption of isolated particles up to high surface coverages. On the contrary, APTES alone led to less organized layers, which even at medium surface coverages showed the presence of

aggregates. Both grafting methods showed excellent stability over long periods of time, proving the usefulness of these high quality layers for further applications. If the goal is to adsorb as many particles as possible while ensuring that they remain isolated, then the best choice is APTES/MUA grafting, provided that the surface density remains below 10^{11} particles per cm^2 . On the contrary, if the key parameter is the local density of particles and not the structure of the AuNP layer, then APTES and APTES/MUA SAMs exhibit rather similar behaviors, while aging films, surprisingly, seem to improve the quality of the APTES samples. The structure of the AuNP layer was investigated by electron microscopy and visible reflectance spectroscopy. Microscopy images provide useful information on the heterogeneity of the particle dispersion on the surface, but they are inadequate for calculating an average surface coverage. An effective value of this quantity is better estimated through the amplitude of the plasmon resonance of isolated particles, which is shown to vary proportionally to the surface density measured by microscopy but also includes heterogeneity effects in a single measurement. In addition, the aggregation state of grafted AuNPs shown by microscopy images is in the same way quantified by the amplitude of the longitudinally coupled surface plasmon resonance in reflectance spectra, providing a fast quantitative criterion for distinguishing isolated and aggregated films. Finally, we observed that, for SFG spectroscopy of the SAM layer, the key parameter is indeed the local density of particles, whether aggregated or not. The various relative intensities of molecular and nonresonant contributions to the SFG spectrum are due to a weak amplification of the SFG process due to the coupling to plasmonic properties of the AuNPs, while the Si+Au contribution is in addition proportional to the square density of particles, as measured by visible reflectance spectroscopy rather than by microscopy. The best compromise is to be found between an efficient amplification for future spectroscopic studies of molecules adsorbed at the surface of the particles (and not of the underlying SAM). The aggregated or isolated character of the nanoparticles may however become important, especially for the generation of hot spots between two particles which would produce additional enhancements.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

UV-vis details and spectra, table of sample names and experimental conditions, and SEM images. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03601.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(B.B.) E-mail: bertrand.busson@u-psud.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Région Ile-de-France as part of the C'Nano IdF funding program under the CREMOSOFT grant agreement. The authors also acknowledge the ERM financial support of the Université Paris-Sud. We thank Dr. A. Hervier for fruitful scientific discussions.

■ REFERENCES

- (1) Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. Biosensing with Plasmonic Nanosensors. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 442–453.
- (2) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir* **2009**, *25*, 13840–13851.
- (3) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S. K.; Rogers, R. G.; Nuzzo, R. G. Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 494–521.
- (4) Bishop, L. M.; Tillman, A. S.; Geiger, F. M.; Haynes, C. L.; Klaper, R. D.; Murphy, C. J.; Orr, G.; Pedersen, J. A.; De Stefano, L.; Hamers, R. J. Enhancing Graduate Student Communication to General Audiences through Blogging about Nanotechnology and Sustainability. *J. Chem. Educ.* **2014**, *91*, 1600–1605.
- (5) Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8410–8426.
- (6) Pelaz, B.; del Pino, P. *In Frontiers of Nanoscience*; Elsevier: 2012.
- (7) Liu, X. H.; Wang, Y.; Chen, P.; Wang, Y. S.; Mang, J. L.; Aili, D.; Liedberg, B. Biofunctionalized Gold Nanoparticles for Colorimetric Sensing of Botulinum Neurotoxin A Light Chain. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2345–2352.
- (8) Morel, A.-L.; Boujday, S.; Methivier, C.; Krafft, J.-M.; Pradier, C.-M. Biosensors Elaborated on Gold Nanoparticles, a PM-IRRAS Characterisation of the IgG Binding Efficiency. *Talanta* **2011**, *85*, 35–42.
- (9) Morel, A.-L.; Volmant, R.-M.; Methivier, C.; Krafft, J.-M.; Boujday, S.; Pradier, C.-M. Optimized Immobilization of Gold Nanoparticles on Planar Surfaces through Alkyldithiols and their Use to Build 3D Biosensors. *Colloids Surf., B* **2010**, *81*, 304–312.
- (10) Ben Haddada, M.; Blanchard, J.; Casale, S.; Krafft, J.-M.; Vallee, A.; Methivier, C.; Boujday, S. Optimizing the Immobilization of Gold Nanoparticles on Functionalized Silicon Surfaces: Amine- vs Thiol-Terminated Silane. *Gold Bull.* **2013**, *46*, 335–341.
- (11) Lundgren, A.; Hulander, M.; Brorsson, J.; Hermansson, M.; Elwing, H.; Andersson, O.; Liedberg, B.; Berglin, M. Gold-Nanoparticle-Assisted Self-Assembly of Chemical Gradients with Tunable Sub-50 nm Molecular Domains. *Part. Part. Syst. Charact.* **2014**, *31*, 209–218.
- (12) Nath, N.; Chilkoti, A. A Colorimetric Gold Nanoparticle Sensor To Interrogate Biomolecular Interactions in Real Time on a Surface. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 504–509.
- (13) Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayer. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 735–743.
- (14) Humbert, C.; Pluchery, O.; Lacaze, E.; Tadjeddine, A.; Busson, B. Optical Spectroscopy of Functionalized Gold Nanoparticles Assemblies as a Function of the Surface Coverage. *Gold Bull.* **2013**, *46*, 299–309.
- (15) Liu, Y.; Yehl, K.; Narui, Y.; Salaita, K. Tension Sensing Nanoparticles for Mechano-Imaging at the Living/Nonliving Interface. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5320–5323.
- (16) Rahma, H.; Buffeteau, T.; Belin, C.; Le Bourdon, G.; Degueil, M.; Bennetau, B.; Vellutini, L.; Heuze, K. Resolving the Chemical Nature of Nanodesigned Silica Surface Obtained via a Bottom-Up Approach. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 6843–6849.
- (17) Humbert, C.; Pluchery, O.; Lacaze, E.; Tadjeddine, A.; Busson, B. A Multiscale Description of Molecular Adsorption on Gold Nanoparticles by Nonlinear Optical Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 280–289.
- (18) Nie, S. M.; Emery, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- (19) Hoffmann, F. M. Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy of Adsorbed Molecules. *Surf. Sci. Rep.* **1983**, *3*, 107–192.
- (20) Aissauoui, N.; Bergaoui, L.; Landoulsi, J.; Lambert, J.-F.; Boujday, S. Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction,

- Stability, and Influence on Protein Adsorption. *Langmuir* **2012**, *28*, 656–665.
- (21) Liu, H.-B.; Venkataraman, N. V.; Bauert, T. E.; Textor, M.; Xiao, S.-J. Multiple Transmission-Reflection Infrared Spectroscopy for High-Sensitivity Measurement of Molecular Monolayers on Silicon Surfaces. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12372–12377.
- (22) Pluchery, O.; Humbert, C.; Valamanesh, M.; Lacaze, E.; Busson, B. Enhanced Detection of Thiophenol Adsorbed on Gold Nanoparticles by SFG and DFG Nonlinear Optical Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7729–7737.
- (23) Bourguignon, B.; Zheng, W.; Carrez, S.; Ouvrard, A.; Fournier, F.; Dubost, H. Deriving the Complete Molecular Conformation of Self-Assembled Alkanethiol Molecules from Sum-Frequency Generation Vibrational Spectra. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **2009**, *79*, 125433.
- (24) Himmelhaus, M.; Eisert, F.; Buck, M.; Grunze, M. Self-Assembly of n-Alkanethiol Monolayers. A Study by IR-Visible Sum Frequency Spectroscopy (SFG). *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 576–584.
- (25) Richter, L. J.; Yang, C. S. C.; Wilson, P. T.; Hacker, C. A.; van Zee, R. D.; Stapleton, J. J.; Allara, D. L. Optical characterization of Oligo(phenylene-ethynylene) Self-Assembled Monolayers on Gold. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12547–12559.
- (26) Guyot-Sionnest, P.; Shen, Y. R. Bulk Contribution in Surface 2nd-Harmonic Generation. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *38*, 7985–7989.
- (27) Lambert, A. G.; Neivandt, D. J.; McAloney, R. A.; Davies, P. B. A Protocol for the Reproducible Silanization of Mica Validated by Sum Frequency Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2000**, *16*, 8377–8382.
- (28) Yang, Y. J.; Hu, S. The Deposition of Highly Uniform and Adhesive Nanocrystalline PbS Film from Solution. *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 6048–6051.
- (29) Tyrode, E.; Liljebald, J. F. D. Water Structure Next to Ordered and Disordered Hydrophobic Silane Monolayers: A Vibrational Sum Frequency Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 1780–1790.
- (30) Weber, J.; Balgar, T.; Hasselbrink, E. Conformational Disorder in Alkylsiloxane Monolayers at Elevated Temperatures. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 244902.
- (31) Wang, H.; Sapi, A.; Thompson, C. M.; Liu, F.; Zhrebetsky, D.; Krier, J. M.; Carl, L. M.; Cai, X.; Wang, L.-W.; Somorjai, G. A. Dramatically Different Kinetics and Mechanism at Solid/Liquid and Solid/Gas Interfaces for Catalytic Isopropanol Oxidation over Size-Controlled Platinum Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10515–10520.
- (32) Uosaki, K.; Noguchi, H.; Yamamoto, R.; Nihonyanagi, S. Interfacial Molecular Structures of Polyelectrolyte Brush in Contact with Dry Nitrogen, Water Vapor, Liquid Water, and Aqueous Electrolyte Solution Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17271–17276.
- (33) Kim, J.; Holinga, G. J.; Somorjai, G. A. Curing Induced Structural Reorganization and Enhanced Reactivity of Amino-Terminated Organic Thin Films on Solid Substrates: Observations of Two Types of Chemically and Structurally Unique Amino Groups on the Surface. *Langmuir* **2011**, *27*, 5171–5175.
- (34) Tong, Y.; Tyrode, E.; Osawa, M.; Yoshida, N.; Watanabe, T.; Nakajima, A.; Ye, S. Preferential Adsorption of Amino-Terminated Silane in a Binary Mixed Self-Assembled Monolayer. *Langmuir* **2011**, *27*, 5420–5426.
- (35) Slot, J. W.; Geuze, H. J. A Method to Prepare Isodisperse Colloidal Gold Sols in the Size Range 3–17 nm. *Ultramicroscopy* **1984**, *15*, 383–383.
- (36) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- (37) Zhuang, X.; Miranda, P. B.; Kim, D.; Shen, Y. R. Mapping Molecular Orientation and Conformation at Interfaces by Surface Nonlinear Optics. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1999**, *59*, 12632–12640.
- (38) Shen, Y. R. Surfaces Probed by Nonlinear Optics. *Surf. Sci.* **1994**, *299*, 551–562.
- (39) Guyot-Sionnest, P.; Hunt, J. H.; Shen, Y. R. Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy of a Langmuir Film: Study of Molecular Orientation of a Two-Dimensional System. *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *59*, 1597–1600.
- (40) Wei, X.; Hong, S. C.; Lvovsky, A. I.; Held, H.; Shen, Y. R. Evaluation of Surface vs Bulk Contributions in Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy Using Reflection and Transmission Geometries. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3349–3354.
- (41) Le Rille, A.; Tadjeddine, A. In Situ Visible-Infrared Sum and Difference Frequency Generation at the Electrochemical Interface. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *467*, 238–248.
- (42) Busson, B.; Tadjeddine, A. Non-Uniqueness of Parameters Extracted from Resonant Second-Order Nonlinear Optical Spectroscopies. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 21895–21902.
- (43) Tong, Y.; Zhao, Y.; Li, N.; Osawa, M.; Davies, P. B.; Ye, S. Interference Effects in the Sum Frequency Generation Spectra of Thin Organic Films. II: Applications to Different Thin-Film Systems. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 034705.
- (44) Hines, M. A.; Todd, J. A.; Guyot-Sionnest, P. Conformation of Alkanethiols on Au, Ag(111), and Pt(111) Electrodes: A Vibrational Spectroscopy Study. *Langmuir* **1995**, *11*, 493–497.
- (45) Pasternack, R. M.; Rivillon Amy, S.; Chabal, Y. J. Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* **2008**, *24*, 12963–12971.
- (46) Zhu, M.; Lerum, M. Z.; Chen, W. How To Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-Derived Layers on Silica. *Langmuir* **2012**, *28*, 416–423.
- (47) Palik, E. D. *Handbook of Optical Constants of Solids*; Academic: New York, 1985.
- (48) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Chart*; Wiley: 2004.
- (49) Weeraman, C.; Yatawara, A. K.; Bordenyuk, A. N.; Benderskii, A. V. Effect of Nanoscale Geometry on Molecular Conformation: Vibrational Sum-Frequency Generation of Alkanethiols on Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14244–14245.
- (50) Lu, R.; Gan, W.; Wu, B. H.; Zhang, Z.; Guo, Y.; Wang, H. F. C-H Stretching Vibrations of Methyl, Methylene and Methine Groups at the Vapor/Alcohol (n = 1–8) Interfaces. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14118–14129.
- (51) Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Academic Press: 1991.
- (52) Diesner, M.-O.; Howell, C.; Kurz, V.; Verreault, D.; Koelsch, P. In Vitro Characterization of Surface Properties Through Living Cells. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2339–2342.
- (53) Bulard, E.; Guo, Z.; Zheng, W.; Dubost, H.; Fontaine-Aupart, M.-P.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Herry, J.-M.; Briandet, R.; Bourguignon, B. Non-Invasive Vibrational SFG Spectroscopy Reveals That Bacterial Adhesion Can Alter the Conformation of Grafted "Brush" Chains on SAM. *Langmuir* **2011**, *27*, 4928–4935.
- (54) Bulard, E.; Fontaine-Aupart, M.-P.; Dubost, H.; Zheng, W.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Herry, J.-M.; Bourguignon, B. Competition of Bovine Serum Albumin Adsorption and Bacterial Adhesion onto Surface-Grafted ODT: In Situ Study by Vibrational SFG and Fluorescence Confocal Microscopy. *Langmuir* **2012**, *28*, 17001–17010.
- (55) Backus, E. H. G.; Garcia-Araez, N.; Bonn, M.; Bakker, J. H. On the Role of Fresnel Factors in Sum-Frequency Generation Spectroscopy of Metal-Water and Metal-Oxide-Water Interfaces. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 23351–23361.
- (56) Liu, Q.; Tang, J.; Zhang, Y.; Martinez, A.; Wang, S.; He, S.; White, T. J.; Smalyukh, I. I. Shape-Dependent Dispersion and Alignment of Nonaggregating Plasmonic Gold Nanoparticles in Lyotropic and Thermotropic Liquid Crystals. *Phys. Rev. E* **2014**, *89*, 052505.



Short Communication

Polyoxometalate nanostructured gold surfaces for sensitive biosensing of benzo[a]pyrene



Dimitri Mercier^{a,b}, Maroua Ben Haddada^{a,b}, Maria Huebner^c, Dietmar Knopp^c, Reinhard Niessner^c, Michèle Salmain^{d,e}, Anna Proust^{d,e}, Souhir Boujday^{a,b,f,*}

^a Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 6, UMR CNRS 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F-75005 Paris, France

^b CNRS, UMR 7197, Laboratoire de Réactivité de Surface, F-75005 Paris, France

^c Chair for Analytical Chemistry and Institute of Hydrochemistry, Technische Universität München, Marchioninstr. 17, Munich, Germany

^d Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, UMR 8232, IPCM, F-75005 Paris, France

^e CNRS, UMR 8232, IPCM, F-75005 Paris, France

^f Nanyang Technological University, Centre for Biomimetic Sensor Science, 50 Nanyang Drive, Singapore 637553, Singapore

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2014

Received in revised form 3 December 2014

Accepted 4 December 2014

Available online 12 December 2014

Keywords:

Biosensor

Nanostructuration

Polyoxometalate

Benzo[a]pyrene

QCM-D

ABSTRACT

We report the design of a polyoxometalate-nanostructured immunosensor for benzo[a]pyrene (B[a]P) detection. The organic–inorganic hybrid polyoxometalate (POM) $(\text{NBu}_4)_3[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}\{(\text{SiC}_6\text{H}_4\text{NH}_2)_2\text{O}\}]$ carrying two amine functions was covalently attached to a functionalized gold substrate to achieve a nanometric organization of amine groups at its surface. Pyrenebutyric acid (PBA) was subsequently grafted to amine groups to create the sensing layer. The detection of B[a]P in the indirect competitive format was carried out using a monoclonal anti-B[a]P antibody whose binding to the immunoprobe was monitored with a quartz crystal microbalance with dissipation measurement (QCM-D). The performances of the POM-nanostructured biosensor were compared to a reference sensor constructed from a cysteamine self-assembled monolayer. QCM-D measurements displayed significant input from POM-nanostructuration. Both the accessibility of the analogue on the surface and the analytical performances were enhanced showing a promising effect of this strategy of nanostructuration for the biosensing of small molecules.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Building up analytical devices to quantify small-sized analytes in various matrices in a fast and sensitive way is still an important challenge to which immunosensing devices provide a relevant response. However, while immunosensors enable rapid and low cost analyses, their sensitivity still requires improvement. In the case of low molecular weight targets, the detection is generally performed in the indirect competitive format: an analogue of the analyte is immobilized on the sensor surface that captures the antibody, and the presence of the target in the sample is evidenced by a decrease in the amount of bound antibody [1]. Thus, the greatest challenge in this format is the control of the surface functionalization to achieve a reliable, reproducible

and efficient sensing layer [1–4] as well as the relative affinity of the antibody for the analogue and the target analyte [5]. The key parameters are consequently the organization and the accessibility of the analogue molecules on the transducer surface, which can be optimized by surface nanostructuration. Very few methods enable patterning and controlled reactivity of surfaces at nanometric resolution. Lithographic techniques enable surface patterning with a resolution above 50 nm [6–9]. Colloids, either gold [10–12] or oxide nanoparticles [13], decrease the organization down to 5 nm. Below, at the 1-nm scale level, the potential of polyoxometalates (POMs) as nanostructuration agents deserves to be addressed. POMs are discrete nanoscale oxoclusters of the early transition metals displaying a great variety of molecular structures [14,15]. A growing attention is paid to these molecular oxides due to their multiple properties and related applications [16]. Deposition of POMs on surfaces has proved to lead to self assembled 2D-ordered arrays of POMs. The availability of organic–inorganic hybrid POMs including reactive residues [16,17] enables their covalent attachment to surfaces to form stable, dense, and well-ordered monolayers. In view of application

* Corresponding author at: Laboratoire de Réactivité de Surface, UMR CNRS 7197, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, 4 Place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France. Tel.: +33 144276001; fax: +33 144276033.

E-mail address: souhir.boujday@upmc.fr (S. Boujday).

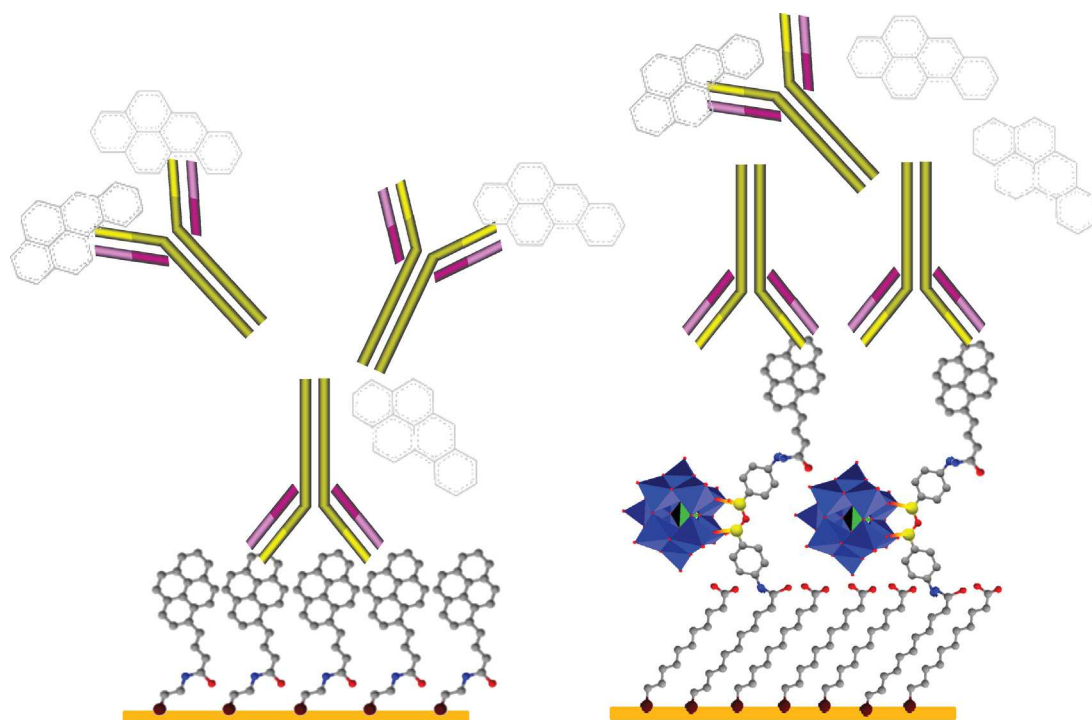


Fig. 1. Schematic representation of the reference immunosensor (left) and nanostructured immunosensor (right).

in the biosensor field, we have chosen to tether the homobifunctionalized $[PW_{11}O_{39}\{(SiC_6H_4NH_2)_2O\}]^{3-}$ anion to gold substrate prefucionalized with a carboxylic acid terminated self-assembled monolayer (SAM) of thiol. This POM carries two amine functions, the first devoted to its reaction with the acid-terminated SAM, while the second enables further grafting of molecules. The sequential steps of immobilization of this POM were investigated and optimized using polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and atomic force microscopy (AFM) in a recent work described by some of us [18]. The binding of POMs to the surface was successful and led to a nanostructured layer of organized amine functions. Eventually, we constructed a model immunosensor for which a monoclonal anti-rabbit IgG antibody was immobilized on a quartz crystal sensor. This immunoprobe efficiently recognized rabbit IgG and the POM nanostructuring avoided non-specific adsorption [18]. We now apply this strategy to the detection of a member of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) family. PAHs are a class of chemicals resulting from the incomplete combustion of organic substances such as fossil fuels [19]. Benzo[a]pyrene (B[a]P), whose concentration often correlates well with the total PAHs contents in environmental samples, is an identified carcinogen and displays endocrine-disruptive activity. A limited number of label-free immunosensors have been set up to detect and quantify B[a]P in water samples. All these immunosensors operate in the competitive format with electrochemical [20], optical [21], or piezoelectric [22] transduction modes, due to very small size of this molecule (252.31 g mol^{-1}). In this work, we constructed a POM-nanostructured surface and used it to immobilize pyrenebutyric acid (PBA), an analogue of B[a]P recognized by the same antibody with a lower affinity. Then we assessed the efficiency of the sensing layer using quartz crystal microbalance in the $0\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$ range of B[a]P. As we intend to establish the benefit of surface nanostructuring in terms of analogue accessibility and sensor sensitivity, the nanostructured sensing layer was compared to a reference layer built from an amine-terminated SAM on gold (see Fig. 1).

2. Experimental

2.1. Chemicals

Cysteamine (CEA), mercaptoundecanoic acid (MUA), N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), benzo[a]pyrene (B[a]P) and 1-pyrenebutyric acid (PBA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The mouse monoclonal anti-PAH antibody (mAb) 22F12 was prepared at the Institute of Hydrochemistry, TU Munich [5]. The polyoxometalate (POM) $(NBu_4)_3[PW_{11}O_{39}\{(SiC_6H_4NH_2)_2O\}]$ was prepared following the procedure we previously described [23]. A stock solution of B[a]P (1 mM) was prepared in absolute ethanol. Standard solutions of B[a]P ($1\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$) were prepared in PBS/ethanol 9:1 which had been thoroughly degassed under Argon (for 15 min) before use in the QCM-D experiments. Experiments were carried out at room temperature unless otherwise stated.

2.2. Surface functionalization and nanostructuring

Self-assembled monolayers formation: Gold-coated sensor chips were immersed in a solution of CEA in water (1 mM, 10 mL) during 12 h for the “reference immunosensor” or in a solution of MUA in absolute ethanol (1 mM, 10 mL) during 3 h for the “POM-nanostructured immunosensor”. Then substrates were washed twice with the same volume of water or EtOH and dried under nitrogen flow.

Nanostructuring with POM: The MUA-modified substrates were chemically activated using the following procedure: $150\text{ }\mu\text{L}$ of NHS (20 mM) and EDC (10 mM) in Milli-Q water were deposited on the MUA-modified surface during 90 min, then substrates were rinsed with Milli-Q water and dried under nitrogen flow. The activated surfaces were immediately immersed in a solution of POM (0.5 mM, 10 mL) in acetonitrile during 3 h, then were rinsed twice with the same solvent and dried under nitrogen flow.

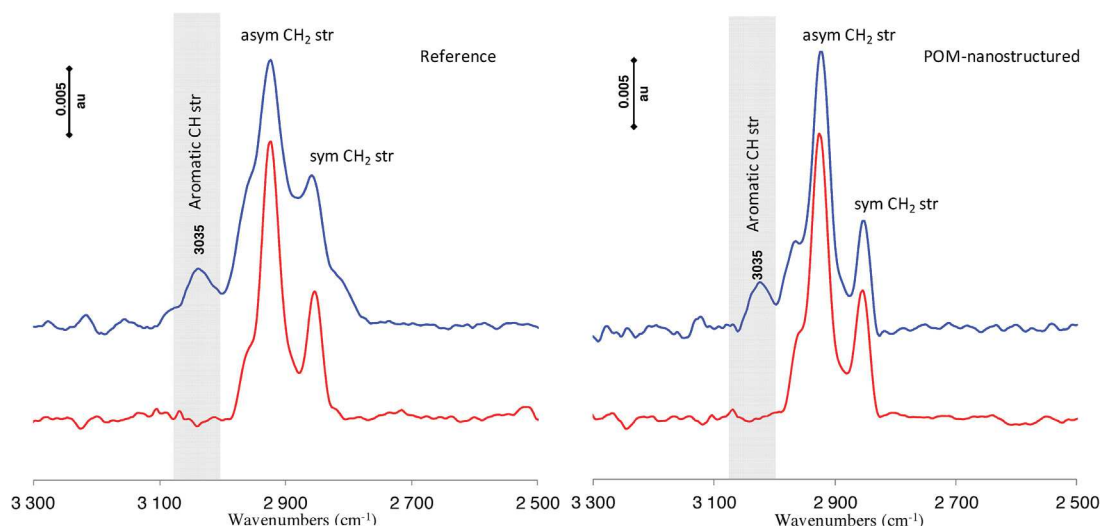


Fig. 2. PM-IRRAS spectra of the amine-terminated gold substrates before (lower curve, red) and after (upper curve, blue) pyrenebutyric acid grafting on the reference. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Competitive immunosensor elaboration: Pyrenebutyric acid was immobilized on the amine-terminated surfaces following a previously described procedure [1]. PBA (10 mM, 10 mL) was activated in solution using a NHS–EDC (1.2 eq.) mixture in DMF during 90 min. Then, amine-coated chips were dipped in this solution for 3 h, after which the sensors were vigorously washed with DMF and dried under nitrogen.

Mixtures of B[a]P in various concentrations (0–10 μ M) and mAb 22F12 (5 mg/L) in PBS/EtOH (9:1) were incubated for 1 h at 37 °C prior to interaction with the sensors. The mixture PBS/EtOH was necessary as B[a]P is poorly soluble in pure water.

2.3. Techniques

PM-IRRAS: Polarization modulation infrared reflection absorption spectra were recorded on a commercial NICOLET Nexus FT-IR spectrometer. The details on the experimental set-up are available in reference [24,25]. Sensor chips were made of borosilicate glass substrates (11 mm \times 11 mm), coated successively with a 2.5 ± 1.5 nm thick layer of chromium and a 250 ± 50 nm thick layer of gold (Arrandee, Werther, Germany). They were annealed in a butane flame to ensure a good crystallinity of the topmost layers and dipped in a bath of absolute ethanol during 15 min before adsorption.

QCM-D: Quartz crystal microbalance measurements were carried out with a dissipative QCM (Q-Sense, Gothenburg, Sweden) using AT-cut 5 MHz quartz crystals coated with a 3–100 nm thick layer of gold (Lot-oriel, Massy, France) at 22 °C. Before use, they were cleaned by ethanol and dried under nitrogen flow. Experiments were carried out in flow-through conditions using a peristaltic pump operating at a flow rate of 25 μ L/min using degassed PBS/EtOH 9:1 as carrier buffer. Data were simultaneously acquired at the fundamental frequency F of 5 MHz ($N=1$) and several overtone frequencies (15, 25, 35, 45, and 55 MHz, i.e. $N=3, 5, 7, 9$ and 11). Two physical parameters are discussed: the frequency of oscillation and the dissipation. The frequency change can be correlated to the mass of the adsorbed layer using the Sauerbrey equation [26]:

$$\Delta F = \frac{-N\Delta m}{C_f}$$

where C_f ($=17.7$ ng cm^{-2} Hz at $F=5$ MHz) is the mass-sensitivity constant, and N is the overtone number. The curves shown

in the manuscript are those obtained for the third harmonics (15 MHz).

3. Results and discussion

The nanostructured biosensor was elaborated by covalent grafting of a homobifunctional polyoxometalate $(\text{NBu}_4)_3[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}\{\text{SiC}_6\text{H}_4\text{NH}_2\}_2\text{O}]$ on gold-coated substrates previously modified by a carboxylic acid-terminated self-assembled monolayer (SAM). This POM contained two amino-groups: the first dedicated to its chemical grafting to the acid-terminated SAM, and the second, left free for further covalent binding of the analyte derivative. The optimal conditions of POM grafting on this SAM were investigated using PM-IRRAS, XPS, and AFM in a recent work described by some of us [18]. These conditions enabled successful binding of POMs to the surface and led to a nanostructured layer carrying organized amine functions. The resulting POM-nanostructured layer was compared to a reference one obtained by modifying gold surface by cysteamine to form an amine-terminated SAM as shown in Fig. 1.

The successive steps of construction of POM-nanostructured and reference amine-terminated sensor surfaces were monitored by PM-IRRAS. IR spectra (see supporting info, Fig. S1) support the step-by-step formation of the sensing layer as schematized in Fig. 1. First MUA grafting was attested by the presence of asymmetric and symmetric COO^- stretching vibration bands at 1585 and 1420 cm^{-1} and of COOH stretching band at 1715 cm^{-1} ; then, the successful activation of carboxylic acid groups was evidenced by the appearance of the carbonyl stretching vibration bands at 1741, 1787, and 1817 cm^{-1} that are characteristic of the NHS group; finally, grafting of POMs was evidenced by the presence of bands at 970, 1067, and 1110 cm^{-1} for $\nu \text{W}=\text{O}$, $\nu \text{P}=\text{O}$, and $\nu \text{Si}=\text{O}$, respectively.

To build up an immunosensor for benzo[a]pyrene operating in the indirect mode, an analogue of B[a]P, pyrenebutyric acid, was covalently attached to the amine-terminated surfaces. The carboxylic acid function of PBA was activated in solution by reaction with EDC and NHS and then was reacted with the amine-terminated surfaces. This step was followed by PM-IRRAS (Fig. 2).

On both POM-nanostructured and reference amine-terminated surfaces, PM-IRRAS spectra of Fig. 2 show characteristic bands at ~ 2920 and 2850 cm^{-1} , which are readily assigned to the asymmetric and symmetric stretching modes of the CH_2 groups of the alkyl chain, respectively [27]. These bands were still present after

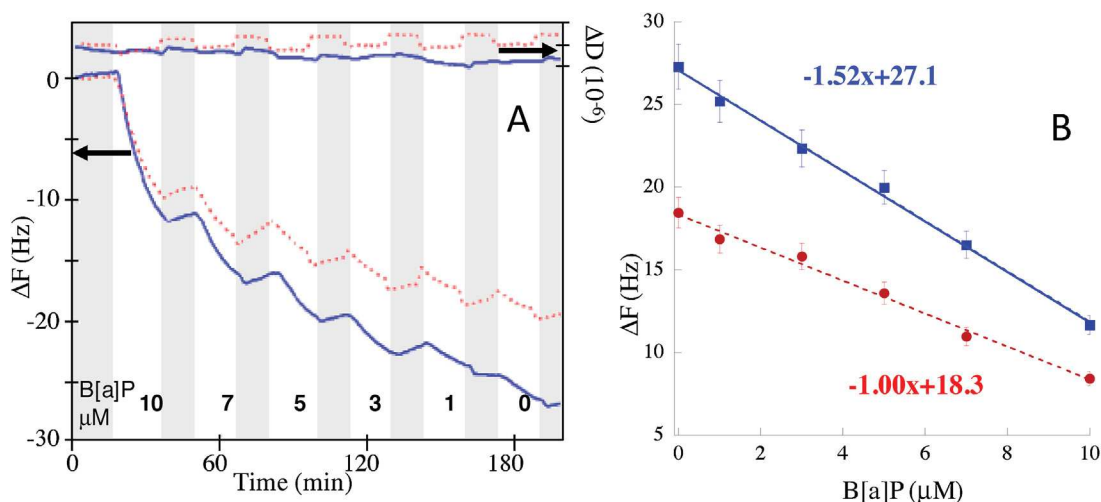


Fig. 3. A: Frequency and dissipation changes vs. time upon successive injections of mixtures of monoclonal anti-PAH (5 mg/L) and B[a]P (10–0 μ M) in PBS/EtOH (9:1) for POM-nanostructured (solid blue line) and reference (red dash) immunosensors. Washing steps are highlighted in the figure. B: Frequency changes from A as function of B[a]P concentration.

PBA grafting, but an additional weak and broad band appeared at $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$. This band was attributed to the stretching mode of aromatic C–H bonds [28] and thus evidenced the grafting of PBA at the sensors surface.

The reference and POM-nanostructured QCM sensors were mounted in the QCM modules and mixtures of monoclonal anti-PAH (5 mg/L) and the target B[a]P (1–10 μ M) in PBS/EtOH (9:1) pre-incubated for 1 h at 37 °C were successively flown over the sensors. A washing step with carrier buffer was included in between the injection of each mixture. Frequency and dissipation changes were simultaneously recorded (Fig. 3A). Upon successive injections of the mAb + B[a]P mixtures, the resonance frequency appeared to decrease as a result of antibody capture by the sensing layers. However the magnitude of this decrease depended on the concentration of B[a]P in the mixtures. Dissipation was also modified upon each injection but returned to its initial value after the washing step, aimed at the removal of loosely bound antibody. Note that for both reference and nanostructured sensors, frequency shifts recorded upon the washing step were similar (~ 1 Hz) suggesting a weak nonspecific interaction of the antibody to both surfaces. Conversely dissipation underwent marked fluctuations during the capture and washing steps for the reference sensor while very few changes were recorded for the POM-nanostructured surface. This finding may result from the less flexible nature of the nanostructured layer and consequently from a more rigid organization of the molecules at the surface of the sensor.

Frequency shifts were plotted as function of B[a]P concentration in Fig. 3B. Decreasing the concentration of target B[a]P led to a larger shift of the frequency owing to a larger amount of available free antibody in the mixture. This shift was clearly observable for both reference and POM-nanostructured sensors for the lowest B[a]P concentration, i.e. 1 μ M. In a previous work with the same reference sensor, but using the commercial monoclonal antibody BAP-13 obtained from Abcam we could not observe a change in frequency for such a low B[a]P concentration and the detection limit was 3 μ M. The mouse monoclonal 22F12 has indeed higher specificity towards B[a]P, and a lower cross-reactivity towards pyrene (18% vs. 47%) than the antibody BAP-13 as it was reported earlier [29]. In addition to this sensitivity enhancement, the behaviour of the POM-nanostructured sensor was different from that of the reference sensor. First, the sensors response at zero value, i.e. in absence of B[a]P and, therefore corresponding to the highest

coverage of the sensor by the antibody, was 27 and 18 Hz for the nanostructured and the reference sensors, respectively. These values show an increase of 50% of binding of anti-PAH antibody to the POM-nanostructured sensor with respect to the reference sensor. Therefore, there is an added value from nanometric organization of PBA at the surface of the sensor, possibly due to an improvement of PBA accessibility and thus, to a more efficient recognition of this analogue by the monoclonal antibody. Second, as the zero value was higher for the POM-nanostructured sensor, the frequency shifts in the presence of B[a]P were larger, leading to a better analytical system. The frequency shift vs. B[a]P concentration was fitted to a linear relationship. The resulting dose–response line, shown in Fig. 3, also displayed a slope 50% higher for the POM-nanostructured sensor with respect to the reference sensor, highlighting again the input of the nanometric organization to the accessibility and recognition of the target analogue by the antibody. Thus, the unprecedented use of covalently bound polyoxometalates for surface nanostructuring of biosensors, besides allowing the construction of ordered array of analyte analogues on the sensor surface also enabled a better accessibility of the immobilized molecules and consequently a significant increase of the biosensor sensitivity.

4. Conclusions

In this work, an original nanostructured sensing surface was used for small molecule immunosensing. A diamine terminated polyoxometalate, $(\text{NBu}_4)_3[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}\{(\text{SiC}_6\text{H}_4\text{NH}_2)_2\text{O}\}]$ was covalently attached to gold substrates to achieve a nanometric organization of amine groups. Then, pyrenebutyric acid was chosen to design a competitive piezoelectric biosensor for benzo[a]pyrene detection. QCM-D measurements showed significant input from the POM nanostructuring. Both the accessibility of the analogue on the surface and the analytical performances were enhanced by 50%, showing a promising effect of nanostructuring on the biosensing of small molecules. We are now working on using this surface chemistry towards other small-sized analytes. Additional polyoxometalates, with other functionalities are also tested to build ordered arrays of molecules or proteins and improve the accessibility and the efficiency of biorecognition phenomena.

Acknowledgments

This work was co-financially supported by ANR, Agence Nationale de la Recherche (France) and DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft (Germany), ANR-DFG program, project NARBioS, Grant no.: ANR-11-INTB-1013.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.12.015>.

References

- [1] S. Boujday, S. Nasri, M. Salmain, C.M. Pradier, Surface IR immunosensors for label-free detection of benzo[a]pyrene, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1750–1754.
- [2] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, A High-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 473–481.
- [3] A. Larsson, J. Angbrant, J. Ekeröth, P. Månsson, B. Liedberg, A novel biochip technology for detection of explosives TNT: synthesis, characterisation and application, *Sens. Actuators B* 113 (2006) 730–748.
- [4] D.R. Shankarana, K.V. Gobi, N. Miura, Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest, *Sens. Actuators B* 121 (2007) 158–177.
- [5] D. Matschulat, A.P. Deng, R. Niessner, D. Knopp, Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[a]pyrene in potable water, *Analyst* 130 (2005) 1078–1086.
- [6] M.E. Stewart, C.R. Anderton, L.B. Thompson, J. Maria, S.K. Gray, J.A. Rogers, et al., Nanostructured plasmonic sensors, *Chem. Rev.* 108 (2008) 494–521.
- [7] C.H. Lalander, Y. Zheng, S. Dhuey, S. Cabrini, U. Bach, DNA-directed self-assembly of gold nanoparticles onto nanopatterned surfaces: controlled placement of individual nanoparticles into regular arrays, *ACS Nano* 4 (2010) 6153–6161.
- [8] K.B. Lee, E.Y. Kim, C.A. Mirkin, S.M. Wolinsky, The use of nanoarrays for highly sensitive and selective detection of human immunodeficiency virus type 1 in plasma, *Nano Lett.* 4 (2004) 1869–1872.
- [9] M.K. Corbierre, J. Beerens, J. Beauvais, R.B. Lennox, Uniform one-dimensional arrays of tunable gold nanoparticles with tunable interparticle distances, *Chem. Mater.* 18 (2006) 2628–2631.
- [10] A. Lundgren, M. Hulander, J. Brorsson, M. Hermansson, H. Elwing, O. Andersson, et al., Gold-nanoparticle-assisted self-assembly of chemical gradients with tunable sub-50 nm molecular domains, *Part. Part. Syst. Charact.* 31 (2014) 209–218.
- [11] A.L. Morel, S. Boujday, C. Methivier, J.M. Krafft, C.M. Pradier, Biosensors elaborated on gold nanoparticles, a PM-IRRAS characterisation of the IgG binding efficiency, *Talanta* 85 (2011) 35–42.
- [12] A.-L. Morel, R.-M. Volmant, C. Méthivier, J.-M. Krafft, S. Boujday, C.-M. Pradier, Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors, *Colloids Surf. B* 81 (2010) 304–312.
- [13] J. Spadavecchia, S. Boujday, J. Landoulsi, C.M. Pradier, nPEG-TiO₂ nanoparticles: a facile route to elaborate nanostructured surfaces for biological applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (2011) 2637–2642.
- [14] D.L. Long, R. Tsunashima, L. Cronin, Polyoxometalates: building blocks for functional nanoscale systems, *Angew. Chem.* 49 (2010) 1736–1758.
- [15] M.T. Pope, A. Muller, Polyoxometalate chemistry – an old field with new dimensions in several disciplines, *Angew. Chem.* 30 (1991) 34–48.
- [16] A. Proust, B. Matt, R. Villanneau, G. Guillemot, P. Gouzerh, G. Izzet, Functionalization and post-functionalization: a step towards polyoxometalate-based materials, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7605–7622.
- [17] C. Rinfrey, G. Izzet, J. Pinson, S.G. Derouich, J.J. Ganem, C. Combellas, et al., Electrografting of diazonium-functionalized polyoxometalates: synthesis, immobilisation and electron-transfer characterisation from glassy carbon, *Chemistry* 19 (2013) 13838–13846.
- [18] D. Mercier, S. Boujday, C. Annabi, R. Villanneau, C.M. Pradier, A. Proust, Bifunctional polyoxometalates for planar gold surface, nanostructuring and protein immobilization, *J. Phys. Chem. C* 116 (2012) 13217–13224.
- [19] A.H. Miguel, T.W. Kirchstetter, R.A. Harley, S.V. Hering, On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon from gasoline and diesel vehicles, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 450–455.
- [20] K.A. Faehrich, M. Pravda, G.G. Guilbault, Disposable amperometric immunosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using screen-printed electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 73–82.
- [21] K.V. Gobi, N. Miura, Highly sensitive and interference-free simultaneous detection of two polycyclic aromatic hydrocarbons at parts-per-trillion levels using a surface plasmon resonance immunosensor, *Sens. Actuators B* 103 (2004) 265–271.
- [22] M. Liu, Q.X. Li, G.A. Rechnitz, Flow injection immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with a quartz crystal microbalance, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 29–38.
- [23] B. Matt, S. Renaudineau, L.M. Chamoreau, C. Afonso, G. Izzet, A. Proust, Hybrid polyoxometalates: Keggin and Dawson silyl derivatives as versatile platforms, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 3107–3112.
- [24] S. Boujday, C. Methivier, B. Beccard, C.-M. Pradier, Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: comparing the efficiency of FT-SPR, QCM-D, and PM-IRRAS, *Anal. Biochem.* 387 (2009) 194–201.
- [25] S. Boujday, C. Gu, M. Girardot, M. Salmain, C.-M. Pradier, Surface IR applied to rapid and direct immunosensing of environmental pollutants, *Talanta* 78 (2009) 165–170.
- [26] G. Sauerbrey, The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing, *Z. Phys.* 155 (1959) 206–222.
- [27] R.G. Nuzzo, L.H. Dubois, D.L. Allara, Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 558–569.
- [28] G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 2nd ed., 1994.
- [29] M. Suchanek, T. Scharnweber, M. Fisher, D. Knopp, R. Niessner, Monoclonal antibodies specific to polynuclear aromatic hydrocarbons, *Folia Biol.* 47 (2001) 106–107.

Biographies

Dimitri Mercier received his Ph.D. degree in chemistry from the University Paris XII in 2006. His research focuses on the elaboration and characterization of new active materials for biosensor or photovoltaic applications. He is currently working on new approaches for chemical profiling of inorganic materials.

Maroua Ben Haddada is a Ph.D. candidate at University Pierre & Marie Curie under the supervision of S. Boujday and M. Salmain. Her research focuses on the engineering of biofunctionalized gold nanoparticles and their further use for surface functionalization and biosensing of pollutants and toxins.

Maria Huebner is a Ph.D. candidate at the Chair for Analytical Chemistry of the Technische Universität München. She is a member of the “Bioanalytics” group. Her research focuses on the development of antibodies, sensors and assays for the detection of priority pollutants.

Dietmar Knopp graduated with a Diploma degree in Biochemistry and received a Ph.D. degree at the University of Leipzig in 1985. In 1992 he obtained his Habilitation in Applied Biochemistry at the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg. Currently he is a professor at the Chair of Analytical Chemistry of the Technische Universität München, heading the group ‘Bioanalytics’. His main research interests include the development of antibody-based immunological techniques for health, food, and environmental applications like antibody preparation for small analytes (haptens), immunoassay and biosensor development, immunoaffinity chromatography, and biofunctionalized nanoparticles.

Reinhard Niessner, full professor for Analytical Chemistry at the Technical University of Munich. Graduated in chemistry at the University of Freiburg 1976, he got Ph.D. from the University of Dortmund 1981. From 1986 to 1989 he was a Professor for Inorganic & Analytical Chemistry in Dortmund. He accepted 1989 the call for his current position. He received international awards, e.g. the Emanuel-Merck-Prize for Analytical Chemistry (1990), the Smoluchowski-Award for Aerosol Research of the Association for Aerosol Research (1991), the Fritz-Pregl-Medal of the Austrian Society for Analytical Chemistry (1996), and the Fresenius-Award for Analytical Chemistry of the German Chemical Society (2000).

Michele Salmain graduated from the Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris in 1987 and completed a Ph.D. at the Université Pierre & Marie Curie in 1990, in the interface discipline coined Bioorganometallic chemistry. As researcher appointed by the CNRS, she develops research projects dealing with the organometallic chemistry of proteins and the development of immunosensors.

Anna Proust is a graduate of the Ecole Normale Supérieure and of the University Pierre & Marie Curie-Paris 06. She is full Professor of inorganic chemistry since 2000. Her research interests are focused on organometallic oxides, noble metal-substituted polyoxometalates (POMs) and on the covalent functionalization and postfunctionalization of POMs for applications in catalysis and molecular nanosciences.

Souhir Boujday received Ph.D. degree in 2002 on the interfacial molecular recognition between transition metal complexes and silica surface. She joined the University Pierre & Marie Curie as Associate Professor in 2004. She defended her habilitation in 2012. She is currently Visiting Professor at Nanyang Technological University, Singapore. Her research work is focused on surface functionalization and characterization of the solid/liquid interface for biosensors and catalysis applications. Her work in the biosensors’ field is focused on the optimization of the sensing layer and the use of gold nanoparticles for an enhanced sensitivity.