



HAL
open science

Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'or à l'aide de molécules phosphorées

Romain Aufaure

► **To cite this version:**

Romain Aufaure. Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'or à l'aide de molécules phosphorées. Matériaux. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD013 . tel-01735222

HAL Id: tel-01735222

<https://theses.hal.science/tel-01735222>

Submitted on 15 Mar 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.

UNIVERSITÉ PARIS 13 – PARIS-NORD

ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur d'Université

Discipline : **Chimie**

Présentée et soutenue publiquement par

Romain Aufaure

Le 8 décembre 2016

Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'or à l'aide de molécules phosphorées

Directeurs de thèse :

M. Yoann Lalatonne, MCU-PH, Université Paris 13-Hôpital Avicenne

M. Erwann Guénin, MCU, Université Paris 13

Devant le jury composé de :

Mme Hynd Remita, Directeur de Recherche, Université de Paris-Sud

Rapporteur

M. Ali Abou-Hassan, MCU, Université Pierre et Marie Curie

Rapporteur

Mme Laurence Motte, Professeur, Université Paris 13

Examineur

Mme Souad Ammar, Professeur, Université Paris Diderot

Examineur

M. Yoann Lalatonne, MCU-PH, Université Paris 13-Hôpital Avicenne

Directeur de thèse

M. Erwann Guénin, MCU, Université Paris 13

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse Erwann Guénin et Yoann Lalatonne, pour m'avoir accordé leur confiance. Votre aide et vos conseils m'ont été précieux. Merci pour toutes nos discussions passionnées, pour vos idées, votre enthousiasme et votre bienveillance. Grâce à vous, j'ai pu m'épanouir au cours de ces trois ans.

Je remercie également Laurence Motte pour son regard avisé, sa rigueur mais aussi pour l'attention qu'elle nous porte. Laurence, j'ai beaucoup apprécié votre franc-parler.

Je remercie le Dr. Hynd Remita et le Dr. Ali Abou-Hassan pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que le Pr. Souad Ammar pour avoir accepté d'examiner mon travail. Je les remercie pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit.

Je remercie l'ensemble des collaborateurs qui nous ont apporté leur expertise pour mener à bien ce projet de thèse. Merci à Nicole Lièvre pour toutes les séances de microscopie électronique que nous avons faites ensemble. Merci à Nadine Millot et Olivier Heintz de m'avoir accueilli chaleureusement à Dijon, pour leurs conseils et leurs prestations sur les analyses XPS. Merci à Claire Wilhelm de nous avoir aidé à réaliser les premiers tests biologiques sur nos nanoparticules. Merci à Julie Hardouin pour ses prestations en spectrométrie de masse. Merci à Gwénaëlle Hervé pour sa relecture attentive.

Je remercie évidemment mes collègues de paillasse pour leur aide mais aussi tout les bons moments que nous avons vécu ensemble. Merci au camarade Fred pour son amitié, son humour, son soutien, son expérience. Fred, tu es un pilier central de ce groupe et on ne te remerciera jamais assez. Merci à toi Rachèle, pour ta sympathie j'ai beaucoup aimé travailler en ta compagnie. Merci à toi Émilie, d'avoir ri à mes blagues et pour tous les délicieux gâteaux que tu nous as fait. Un grand merci à ma très chère Sophie, qui m'a pris sous son aile quand je suis arrivé. Je n'oublierai jamais nos fous rires, ton superbe mariage et ton accent chti que tu réserves à de si rares occasions ! Mille merci à toi, Anouchka, pour ta bonne humeur indestructible (une sorte de rayon de soleil venu de Pézenas) et pour ton coup de main crucial sur les tests bio. Merci infiniment à ~~Dubroil~~ à Chloé pour sa complicité. Chloé ton humour et ton sens de l'anecdote sont inestimables. Vous m'avez aidé, toutes les deux, à me remettre du départ de Sophinette ! Vous êtes géniales.

Merci à Nadia Bouchemal et Olivier Gager pour leur aide en RMN. Merci à Julia Deschamps, Maëlle Monteil, Evelyne Migianu et Carole Marbeuf pour m'avoir fait découvrir l'enseignement à la fac. Merci à Sylvie Changotade, Florence Poirier, Anne Denis et Didier Lutomski pour leur sympathie et pour les gâteaux que vous partagez régulièrement avec

nous. Merci Karim pour m'avoir fait connaître ton répertoire de blagues, s'il y avait un Nobel pour ce genre de chose tu serais lauréat, c'est certain.

Merci aux doctorants du CSPBAT et du LVTS que j'ai eu le plaisir de côtoyer. Merci à vous, Inga, Max, Raymond, Hanane, Corentine, Margery, les Nicolas, Jade, Diego et Amena.

Merci à toi Kasia, pour cette belle leçon de courage. Ta capacité à faire face à l'ignominie est impressionnante. C'est un honneur de se battre pour quelqu'un de ta trempe !

Merci, Benjamin, pour ton amitié, ton soutien indéfectible et ton esprit de solidarité si touchant.

Merci à Christine et Pétra pour leurs encouragements, leur sympathie et les diners que nous avons partagé ensemble.

Merci à Anne Arlot pour toutes nos discussions palpitantes. J'espère qu'on pourra continuer nos déjeuner-débats.

Merci à Julien Rivoire pour sa sympathie et pour m'avoir accompagné lors des tractages à l'entrée de la fac.

Merci à mes fidèles amis de l'ESCOM. Robin c'est toujours un bonheur de te voir à Roanne, merci à toi. Martin, merci pour toutes nos longues conversations et ton soutien. Merci à Amélie, Alexandra, Leila, Luce, Alexia et Fanny de m'avoir fait sortir la tête de l'eau. J'ai adoré vous revoir.

Merci à mes camarades de Paris et d'ailleurs, notre engagement donne du sens à mon quotidien. Merci en particulier à Adrien, Hugo, Elisa, Aurélien, Coline, Hélène, Anne-Emmanuelle, Michel, Alice, Sylvain, Laurence, Sonia, Nicolas, Philippe, Florian, Diane, Sakina, Julien, Guillaume, Audrey, Marian, Cécile, Marion, Bernard, Mathilde et Ramzi.

Merci à mes amis d'enfance qui ont toujours été là : Cyril, Gilles, Sarah et leurs parents. Merci à ce sacré Maxime qui n'en finira jamais de me surprendre, et c'est peu dire. Merci à Antoine pour sa joie de vivre. Et merci à Mathieu, mon cher colocataire qui me supporte depuis plus d'un an et qui m'a fait une très belle TOC pour notre dernier article.

Je finirai ici par remercier ma famille. Merci à mes trois grands-parents qui m'ont toujours aidé et qui m'ont logé. Je remercie mes parents du fond du cœur, je leur dois tout, eux qui n'ont jamais cessé de croire en moi. Merci à ma merveilleuse petite sœur qui illumine ma vie et que je chéris plus que tout.

"Le courage dans le désordre infini de la vie qui nous sollicite de toutes parts, c'est de choisir un métier et de bien le faire, quel qu'il soit : c'est de ne pas se rebuter du détail minutieux ou monotone ; c'est de devenir autant qu'on peut, un technicien accompli ; c'est d'accepter de comprendre la spécialisation du travail qui est la condition de l'action utile, et cependant de ménager à son regard, à son esprit, quelques échappées vers le vaste monde et des perspectives plus étendues. [...] Le courage c'est de surveiller exactement sa machine à filer ou à tisser, pour qu'aucun fil ne se casse, et de préparer cependant un ordre social plus vaste et plus fraternel où la machine sera la servante commune des travailleurs libérés."

Jean Jaurès

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
Chapitre 1 : LES NANOPARTICULES D'OR ET LEURS APPLICATIONS EN NANOMÉDECINE.....	18
1. Définitions	18
2. Propriétés optiques des nanoparticules d'or	19
2.1. Réponse optique des NPs d'or sphériques selon le modèle quasi-statique	20
2.2. Réponse optique des NPs d'or sphériques selon le modèle de Mie.....	24
2.3. Cas des NPs d'or non-sphériques : les ellipsoïdes.....	25
2.4. Photo-luminescence des NPs d'or	26
2.5. Enjeux	27
3. Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules d'or en phase aqueuse.....	27
3.1. Synthèse de Turkevich.....	27
3.2. Autres synthèses en milieu aqueux.....	38
3.3. Habillage et post-fonctionnalisation	42
4. Applications en nanomédecine	47
4.1. Imagerie.....	48
4.2. Thérapie et vectorisation	51
4.3. Les biocapteurs.....	53
5. Conclusion	55
Chapitre 2 : SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES PAR UN BISPHTHONATE ALCÈNE	58
1. Introduction.....	58
2. Synthèse de NPs d'or.....	59
2.1. Synthèse de Turkevich.....	59
2.2. Synthèse de NPs d'or avec les HMBP	60
3. Synthèse par chauffage micro-ondes.....	62
3.1. Synthèse des NPs Au@Ct sous micro-ondes.....	63

3.2.	Synthèse des NPS Au@HMBPène sous micro-ondes.....	64
4.	Processus chimique d'oxydoréduction.....	65
5.	Caractérisations physicochimiques du nanomatériau	67
5.1.	Propriétés hydrodynamiques.....	67
5.2.	Caractérisations de surface	68
6.	Influence des paramètres réactionnels.....	73
6.1.	Influence du pH réactionnel.....	73
6.2.	Concentration en réactifs.....	78
6.3.	Mode de chauffage.....	78
7.	Stabilité colloïdale	79
7.1.	Test de stabilité en milieu salin	79
7.2.	Test de stabilité par échange de ligand.....	80
8.	Conclusion	81
9.	Matériels et méthodes	82
9.1.	Matériels.....	82
9.2.	Méthodes	83
Chapitre 3 : POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES AU@HMBPÈNE		88
1.	Introduction.....	88
2.	Métathèse	90
2.1.	Métathèse sur les NPs d'or et en phase aqueuse	90
2.2.	Métathèse sur les Au@HMBPène	91
2.3.	Observations par MET	94
2.4.	Évaluation de la réactivité du catalyseur pour la post-fonctionnalisation par métathèse croisée ⁹⁶	
2.5.	Bilan	98
3.	La réaction thiol-ène	98
3.1.	Principe.....	98
3.2.	Effet de l'initiateur radicalaire : l'hydroxycyclohexylphényl cétone	99

3.3.	Résultats	100
3.4.	Bilan	103
4.	Cycloaddition d'un composé tétrazine.....	103
4.1.	Réactivité du pyTz sur le HMBPène.....	103
4.2.	Post-fonctionnalisation des NPs Au@HMBPène à pH neutre.....	110
4.3.	Post-fonctionnalisation des NPs Au@HMBPène à pH acide	113
4.4.	Variation du substrat tétrazine : utilisation d'un composé tétrazine fluorescent	114
5.	Conclusion	116
6.	Matériel et méthodes.....	117
6.1.	Matériel	117
6.2.	Méthodes	117
Chapitre 4 : SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES PAR DES MOLÉCULES PHOSPHORÉES PORTANT DES POLYÉTHYLÈNES GLYCOLS		
122		
1.	Introduction.....	122
2.	Synthèse des HMBP-PEG.....	123
3.	Synthèse des NPs Au@PEG	127
3.1.	Synthèse des NPs Au@PEG par voie ligand-réducteur	127
3.2.	Synthèse des NPs Au@PEG avec l'ascorbate de sodium.....	133
4.	Caractérisation de surface.....	137
4.1.	Spectroscopie IRTF	137
4.2.	RMN.....	138
5.	Stabilité en milieu physiologique	139
6.	Couplage de la rhodamine 123.....	141
6.1.	Principe.....	141
6.2.	Propriétés optiques des NPs@PEG1 après couplage avec la rhodamine123	143
6.3.	Détermination du facteur de « quenching » intra-particule et dosage de la rhodamine 123	144
6.4.	Stabilité des NPs Au@PEG1@rhodamine 123 le sérum de bovin fœtal	145

7. Évaluation de la toxicité des NPs Au@PEG1	146
8. Conclusion	147
9. Matériel et méthode	148
9.1. Matériel	148
9.2. Méthode	148
Chapitre 5 : PERSPECTIVES DES NPs AU@HMBP POUR DES APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES	154
1. Potentiel anti-tumoral de NPs Au@HMBP.....	154
1.1. Synthèse et caractérisations des NPs Au@Alendronate.....	155
1.2. Étude de la toxicité sur les cellules PC3 : NPs Au@Alendronate vs Au@HMBPène	159
2. Résultats préliminaires sur la synthèse de NPs d'or multicœur.....	161
2.1. Synthèse	161
2.2. Étude cinétique et proposition d'un mécanisme de croissance	167
3. Conclusion	168
4. Matériel et méthodes.....	168
4.1. Matériel	168
4.2. Méthodes	169
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	170
ANNEXES.....	173
RÉFÉRENCES	199

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomic force microscopy
ATG	Analyse thermogravimétrique
Ct	Citrate
CT	Computed tomography
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DFT	Density functional theory
DLS	Dynamic light scattering
DMF	Diméthyl formamide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EPR	Enhanced permeability and retention effect
FDA	Food and drug administration
GTP	Guanosine tri phosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution
HGII	catalyseur de Hoveyda-Grubbs de seconde génération
HMBP	1-hydroxy-1,1-méthylène bisphosphonate
HMBPène	(1-hydroxy-1-phosphonopent-4-ène)phosphonate
HS-PEG	Thiol "pegylé"
IC	Inhibitory concentration
IRTF	Infrarouge par transformée de Fourier
LMH	Largeur à mi-hauteur
m-CPBA	Acide métachloroperbenzoïque
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
NHS	N-hydroxysuccinimide
NP(s)	Nanoparticule(s)
NSs	Nanostars
OCT	Optical computed tomography
PEG	Polyéthylène glycol
PVP	Polyvinylpyrrolidone
pyTz	3,6-di(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tétrazine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	Small angle x ray scattering
SBF	Sérum bovin foetal
SCK	Shell cross-linked
TPT	Thérapie photothermique
TzCy5	6-méthyl-tétrazine-sulfo-cy-5
UV-Vis	Ultraviolet-visible
XANES	X ray absorption near edge structure
XPS	X ray photoelectron spectroscopy

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les nanotechnologies connaissent un essor sur le plan scientifique et industriel. L'explosion du nombre de publications et de brevets dans ce domaine ces dernières décennies montrent la forte attractivité de ce domaine. L'or est un métal noble, convoité par les hommes depuis les civilisations antiques. Contrairement à bien d'autres métaux, son caractère inerte l'affranchi de l'oxydation naturelle ce qui lui permet de conserver sa brillance éclatante à travers les âges. Sur le plan historique, l'or a évidemment été un matériau de base pour la création d'objets de luxe mais aussi le premier étalon monétaire mondial. La communauté scientifique a étudié l'or sous forme de complexes moléculaires, comme composé essentiel pour le développement de catalyseur ou encore de drogues pour le traitement de l'arthrose. À l'échelle nanométrique, l'or possède des propriétés différentes du matériaux massif qui seront exploitées pour l'élaboration de nouvelles technologies. L'émergence des nanoparticules d'or, comme produit de synthèses chimiques, laisse entrevoir un vaste champ de recherche et notamment pour le développement de nouveaux outils pour les sciences biomédicales.

L'objectif de ce travail consiste à proposer des nouvelles synthèses de nanoparticules d'or en une étape à l'aide de molécules phosphorées bifonctionnelles pour en contrôler la morphologie ainsi que la nature chimique de son habillage. Ces nano-objets sont par la suite évalués en tant que plateformes fonctionnalisées pour le couplage de composés modèles.

Le premier chapitre rappelle les propriétés optiques des nanoparticules d'or. Par la suite est établi l'état de l'art des synthèses en phase aqueuse ainsi que les différentes méthodes d'habillage et de fonctionnalisation. Les principales applications en nanomédecine sont décrites brièvement et illustrées par des exemples de la littérature.

Le second chapitre est consacré à l'élaboration de nanoparticules d'or sphériques à l'aide d'un composé bisphosphonate portant une double liaison éthylénique en bout de chaîne : le HMBPène. Après avoir caractérisé leur propriétés physico-chimiques, nous décrivons l'influence des paramètres réactionnels sur leur morphologie. Leur stabilité est évaluée en comparaison avec des nanoparticules « citratées » communément utilisées en phase aqueuse.

Dans le troisième chapitre, différentes réactions sont évaluées pour réaliser le couplage de composés modèles sur les nanoparticules Au@HMBPène. La cycloaddition des composés tétrazines s'étant révélée efficace, nous détaillons sa réactivité et nous l'appliquons à un fluorophore utilisé couramment en biologie.

Le quatrième chapitre est consacré à l'élaboration de nanoparticules d'or habillées par des polymères dérivés du HMBPène : les HMBP-PEG. Ces dispersions qui présentent une stabilité améliorée en milieu physiologique, sont également étudiée comme plateforme pour le couplage d'un fluorophore. Dans un deuxième temps nous évaluons leur toxicité sur des cellules de la prostate.

Enfin, le dernier chapitre décrit deux perspectives possibles pour les applications thérapeutiques des nanoparticules d'or synthétisées avec les molécules phosphorées. Dans un premier temps nous discutons de la synthèse de nanoparticules Au@Alendronate et de leur propriétés anti-tumorales que nous comparons aux nanoparticules Au@HMBPène. Puis nous proposons dans un second temps un protocole pour la synthèse de nanoparticules d'or multicoeur à l'aide d'un composé HMBP-PEG.

Chapitre 1

LES NANOPARTICULES D'OR ET LEURS APPLICATIONS EN NANOMÉDECINE

Chapitre 1 : LES NANOPARTICULES D'OR ET LEURS APPLICATIONS EN NANOMÉDECINE

Dans ce chapitre nous commencerons par définir ce qu'est une dispersion de nanoparticules (NPs) d'or, puis nous décrirons leurs propriétés optiques. Nous présenterons les différentes voies de synthèse en milieu aqueux en soulignant le rôle des composés organiques pour le contrôle de la morphologie, de la stabilité et de la fonctionnalisation de surface des NPs. Pour finir, nous donnerons des exemples d'applications des NPs d'or en nanomédecine.

1. Définitions

La littérature destinée au grand public ne donne que peu de détails concernant la thématique des NPs. On trouve néanmoins dans les dictionnaires quelques définitions de termes associés, qui situent le contexte de notre objet d'étude. Le dictionnaire Larousse nous propose :

Nanosciences

Domaine de la science (spécialement de la physique, de la chimie et de la biologie) portant sur l'étude des phénomènes observés dans des structures et des systèmes extrêmement petits, mesurables en nanomètres, et possédant des propriétés qui découlent spécifiquement de leur taille.

Nanotechnologies

Domaine de la science dont la vocation est l'étude et la fabrication de structures (appelées nano-objets) dont les dimensions sont comprises entre 1 et 1 000 nanomètres (nm).

Nous nous intéressons donc à des nano-objets afin de valoriser leurs propriétés. Nous parlons plus généralement de l'étude des nanomatériaux, au sens où, un matériau est de la matière que l'on a transformée afin d'assurer une fonction. Deux approches pour l'élaboration de nanomatériaux peuvent être distinguées :

- l'approche « *top-down* » qui consiste à partir du matériau massif pour former des grains.
- l'approche « *bottom-up* » qui consiste en l'assemblage d'atomes pour former des agrégats nanométriques.

Nous traiterons dans ce travail l'obtention de NPs d'or conçues par l'approche dite « *bottom-up* ». Ces NPs contiennent donc un nombre fini d'atomes : environ 40 atomes pour une particule de 1 nm à plusieurs millions d'atomes pour une particule de 100 nm.

L'or est un métal noble, diamagnétique, de configuration électronique $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$ et sa structure cristalline est de type cubique face centrée. D'un point de vue géométrique, la diminution de taille provoque une augmentation du rapport surface/volume. La proportion d'atomes de surface augmente donc par rapport aux atomes de volume, à mesure que la taille des particules diminue. Cette forte proportion d'atomes en surface confère ainsi au matériau nanométrique des propriétés optiques bien différentes du matériau massif.

2. Propriétés optiques des nanoparticules d'or

Les dispersions de NPs d'or sont caractérisées par leurs colorations vives. La coupe de Lycurgus en est un exemple historique des plus célèbres : conçue au 4^{ème} siècle par les romains, elle présente des inclusions nanométriques d'or et d'argent immobilisées dans la matrice de verre.¹ Éclairée de l'intérieur, la lumière transmise à travers les parois de la coupe apparaît rouge (Figure 1 a). Tandis que si on l'éclaire de l'extérieur la lumière apparaît verte (Figure 1 b). Ces éclairages permettent de visualiser respectivement deux phénomènes optiques : l'absorption et la diffusion de la lumière en interaction avec les NPs (Figure 1 c).

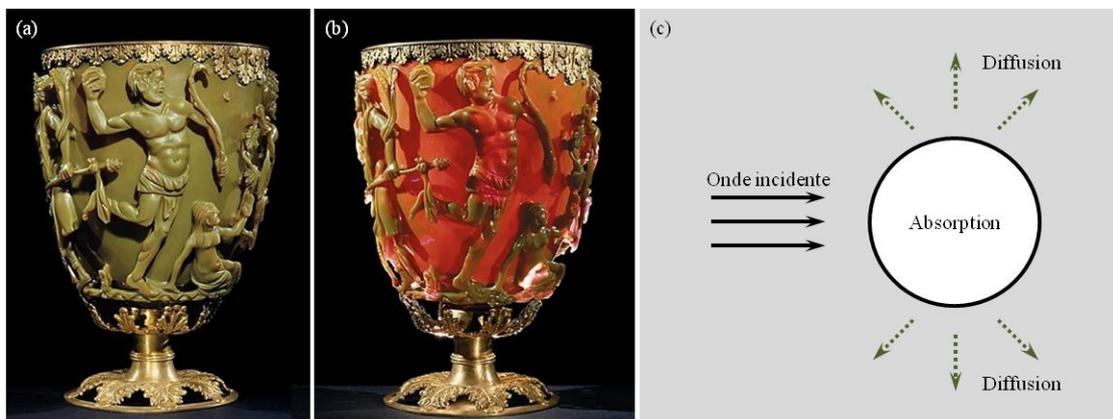


Figure 1. Coupe de Lycurgus (© The British Museum) éclairée de l'extérieur (a) et l'intérieur (b) ; Interactions d'une nanoparticule métallique avec la lumière(c)

L'étude de Faraday sur les propriétés optiques des nano-objets métalliques marque le début d'un intérêt croissant des scientifiques pour cette thématique.² Il décrit la formation de « l'or colloïdal » par la réduction d'un complexe de chloraurate $[\text{AuCl}_4]^-$ à l'aide de phosphore

en solution dans du sulfure de carbone et étudie les propriétés optiques de films colloïdaux soumis à des pressions mécaniques. De façon plus générale, on parle de suspension colloïdale pour les systèmes composés d'une phase solide dispersée dans une phase liquide.

Les propriétés optiques des NPs d'or sont influencées par un phénomène physique qui leur est propre : la résonance plasmon de surface. Ainsi les propriétés optiques des nano-objets diffèrent du matériau massif. Ce phénomène correspond à la polarisation du métal sous l'effet de la lumière et provoque une oscillation collective des électrons de conduction (Figure 2). Dans le cas de l'or, de même que pour les autres métaux nobles, l'absorption est intense dans le domaine du visible.

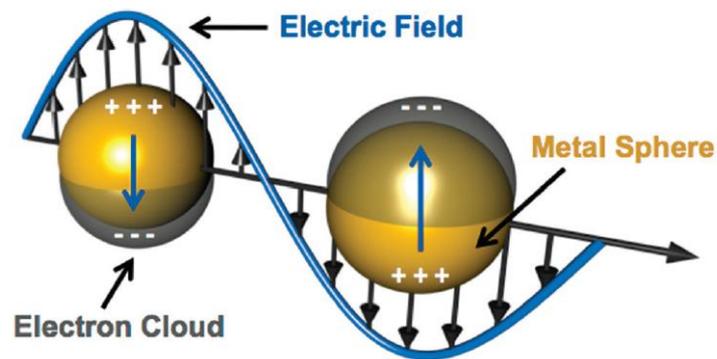


Figure 2. Résonance Plasmon de Surface³

2.1. Réponse optique des NPs d'or sphériques selon le modèle quasi-statique

La réponse optique des nanoparticules d'or sphériques peut être simulée en utilisant une approche dite quasi-statique.⁴ Dans cette approche, on considère la NP comme une sphère métallique dans un milieu diélectrique, en interaction avec une onde plane électromagnétique monochromatique E de pulsation ω . Pour des tailles D suffisamment faibles par rapport à la longueur d'onde optique λ ($D \leq \lambda / 10$), on se place dans le cadre de l'approximation quasi-statique. La section efficace d'extinction, somme des sections efficaces de diffusion et d'absorption, est dominée par cette dernière. Le champ est uniforme à l'intérieur de la sphère et le temps de propagation est considéré comme faible devant la période d'oscillation. On se base donc sur le modèle électrostatique de la polarisation d'une sphère dans un champ uniforme (Figure 3).

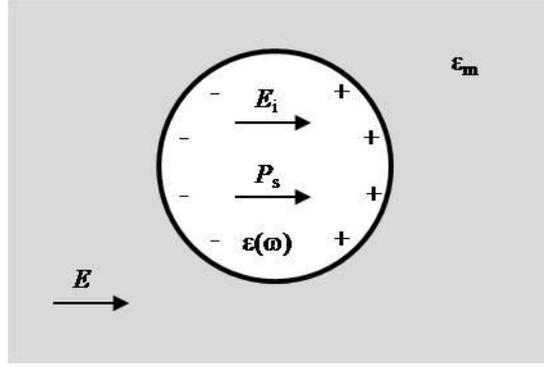


Figure 3. Particule sphérique en interaction avec une onde électromagnétique dans le cadre de l'approximation quasi statique.

Le champ électrique interne E_i est donc donné par :

$$E_i = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} E = f(\omega) E \quad (1)$$

avec ε_m la constante diélectrique réelle du milieu environnant, $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ la matrice diélectrique complexe du matériau et $f(\omega)$ est le facteur d'exaltation.

L'accumulation de charges à l'interface sphère-matrice créé un champ à l'extérieur de la sphère. Le dipôle induit par ce champ est de moment P_s :

$$P_s = 3V_{np}\varepsilon_0\varepsilon_m \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} E \quad (2)$$

avec ε_0 la permittivité diélectrique du vide et V_{np} le volume de la nanoparticule.

La surface d'extinction S_{ext} est alors :

$$S_{ext} = \frac{2\pi V_{np}}{\lambda\varepsilon_m^{1/2}} |f(\omega)|^2 \varepsilon_2 \quad (3)$$

Pour un ensemble de N_{np} sphères identiques, diluées dans un volume V suffisamment grand pour être indépendantes des interactions électromagnétiques, la constante diélectrique effective selon le modèle de Maxwell-Garnett⁵ s'exprime :

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon_m + 3p\varepsilon_m \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} \quad (4)$$

avec la fraction volumique $p = N_{np}V_{np}/V$.

Pour une lumière incidente d'intensité I_0 , l'intensité transmise I_t par le milieu d'épaisseur L s'exprime :

$$I_t = I_0 \exp(-\alpha L) \quad (5)$$

Dans les conditions décrites précédemment le coefficient d'absorption du milieu $\alpha(\omega)$ est alors :

$$\alpha(\omega) = \frac{\omega}{\epsilon_m^{1/2} c} p |f(\omega)|^2 \epsilon_2(\omega) \quad (6)$$

avec c la célérité de la lumière.

Le facteur $|f(\omega)|^2$ peut être résonnant si ϵ_1 est négatif, condition réalisée quand la contribution des électrons de conduction à la constante diélectrique domine. L'exaltation de l'absorption a lieu au voisinage de la fréquence ω_R pour laquelle le dénominateur est minimum : c'est la résonance plasmon de surface. Ce phénomène, purement diélectrique, résulte donc de l'exaltation de l'amplitude du champ électrique interne E_i par rapport au champ incident E . Or la constante diélectrique du métal s'exprime comme somme de deux contributions (Figure 4):

- La contribution intrabande associée aux transitions optiques des électrons de conduction, décrite par le modèle de Drude.⁶

$$\epsilon_{Drude} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma_0)} \quad (7)$$

avec ω_p est la fréquence plasma du métal et γ_0 le taux de collision optique des électrons.

- La contribution interbande associée aux transitions optiques entre deux bandes électroniques. Dans le cas des métaux nobles elle intervient essentiellement entre les bandes d et la bande de conduction sp .

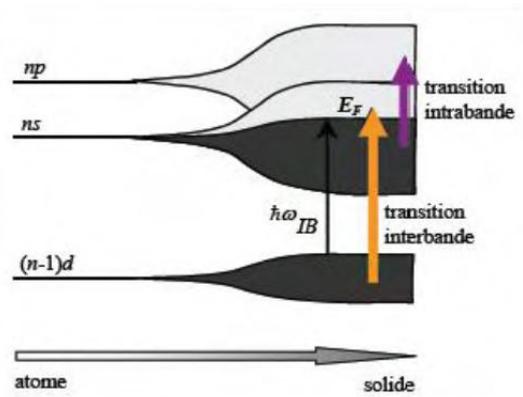


Figure 4. Contributions interbandes et intrabandes

Pour des NPs d'or ou de cuivre les transitions interbandes sont partiellement superposées avec la résonance plasmon de surface, ce qui n'est pas le cas des NPs d'argent. Ainsi la fréquence de résonance des NPs métalliques sphériques est principalement modifiée par la nature du métal et leur environnement, de par leurs constantes diélectriques (Figure 5).

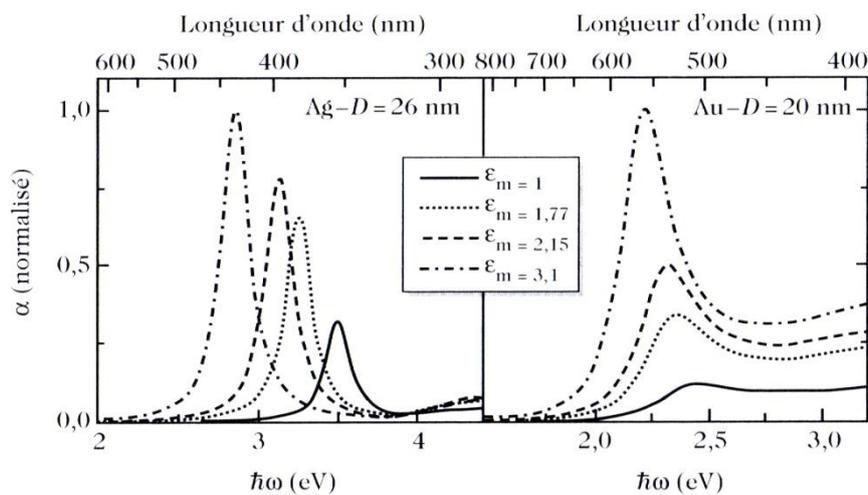


Figure 5. Spectres d'absorption calculés dans l'approximation quasi statique pour des nanosphères d'argent et d'or de diamètre respectifs $D = 26$ et 20 nm dans le vide ($\epsilon_m = 1$) et dans différentes matrices : eau ($\epsilon_m = 1,77$), silice ($\epsilon_m = 2,15$) et alumine ($\epsilon_m = 3,1$)⁷

2.2. Réponse optique des NPS d'or sphériques selon le modèle de Mie

Pour des nanosphères de taille $D \geq \lambda / 10$ l'approximation quasi-statique n'est plus valable. On applique alors le modèle de Mie⁸, qui définit les sections efficaces de diffusion S_{diff} et d'extinction S_{ext} :

$$S_{diff} = \frac{2\pi c^2}{\varepsilon_m \omega^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2l+1) (|a_l|^2 + |b_l|^2) \quad (8)$$

$$S_{ext} = \frac{2\pi c^2}{\varepsilon_m \omega^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2l+1) Re\{|a_l|^2 + |b_l|^2\} \quad (9)$$

Les coefficients a_l et b_l sont définis par

$$a_l = \frac{m\Psi_l(mx)\Psi'_l(x) - \Psi_l(x)\Psi'_l(mx)}{m\Psi_l(mx)\xi'_l(x) - \xi_l(x)\Psi'_l(mx)} \quad (10)$$

$$b_l = \frac{\Psi_l(mx)\Psi'_l(x) - m\Psi_l(x)\Psi'_l(mx)}{\Psi_l(mx)\xi'_l(x) - m\xi_l(x)\Psi'_l(mx)} \quad (11)$$

avec ψ_l et ξ_l les fonctions de Riccati-Bessel d'ordre l , x la taille de la nanosphère et m son indice de réfraction normalisé.

On observe alors un déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde ainsi qu'une augmentation de la largeur et de l'intensité de la bande de résonance (Figure 6). Pour $D \geq 50$ nm la diffusion n'est plus négligeable par rapport à l'absorption (Figure 6 c).

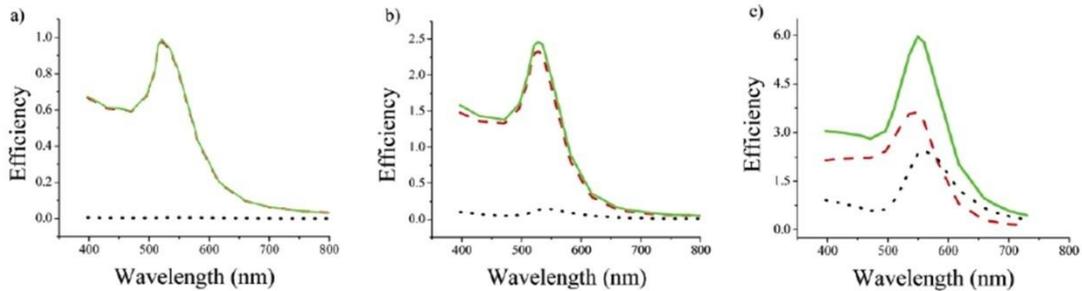


Figure 6. Spectres calculés des sections efficaces d'absorption S_{abs} (tirets rouges), de diffusion S_{diff} (pointillés noirs), et d'extinction S_{ext} (vert) pour des nanosphères d'or de diamètre $D = 20$ nm (a) ; $D = 40$ nm (b) et $D = 80$ nm (c)⁹

2.3. Cas des NPs d'or non-sphériques : les ellipsoïdes

La forme du nano-objet influence sa réponse optique de manière importante. Nous abordons ici brièvement les cas des ellipsoïdes car il est comparable à celui des sphères. Les expressions des sections efficaces de diffusion et d'extinction s'expriment pour une polarisation de l'onde incidente suivant un axe $i=x, y$ ou z (Figure 7).⁴

$$S_{diff}^i = \frac{8\pi^3 V_{np}^2 \varepsilon_m^2}{3\lambda^4 L_i^2} \left| \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + \frac{1-L_i}{L_i} \varepsilon_m} \right|^2 \quad (12)$$

$$S_{ext}^i = \frac{2\pi V_{np} \varepsilon_m^{3/2}}{3\lambda^4 L_i^2} \frac{\varepsilon_2}{\left| \varepsilon + \frac{1-L_i}{L_i} \varepsilon_m \right|^2} \quad (13)$$

On introduit donc un coefficient géométrique additionnel L_i :

$$L_i = \frac{abc}{2} \int_0^\infty \frac{du}{(u + l_i^2)(\sqrt{(u + a^2)(u + b^2)(u + c^2)})} \quad (14)$$

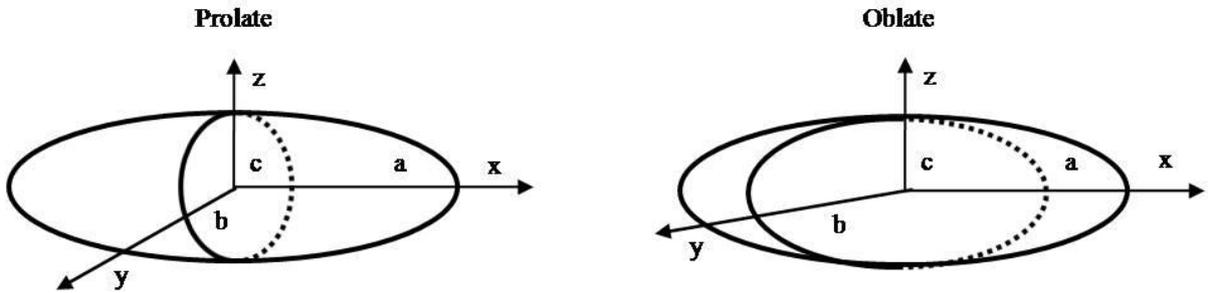


Figure 7. Ellipsoïdes prolates ($a \geq b = c$) et oblates ($a = b \geq c$)

Pour N_{np} ellipsoïdes orientés aléatoirement, on exprime les sections efficaces du matériau :

$$S_{ext,diff}^{mat} = \sum_i S_{ext,diff}^i \quad (15)$$

Dans la pratique, les NPs de forme ellipsoïde que l'on appelle nanobâtonnets présentent deux fréquences de résonance. En effet, selon la position de l'objet par rapport au champ électrique, la résonance plasmon est soit transverse, soit longitudinale. La

résonance plasmon transverse a lieu selon l'épaisseur du nano-bâtonnet qui est l'axe court, c'est donc la résonance qui se produit à plus basse longueur d'onde. La résonance plasmon longitudinale a lieu selon la longueur du nanobâtonnet et engendre donc un pic caractéristique à plus grande longueur d'onde (Figure 8).

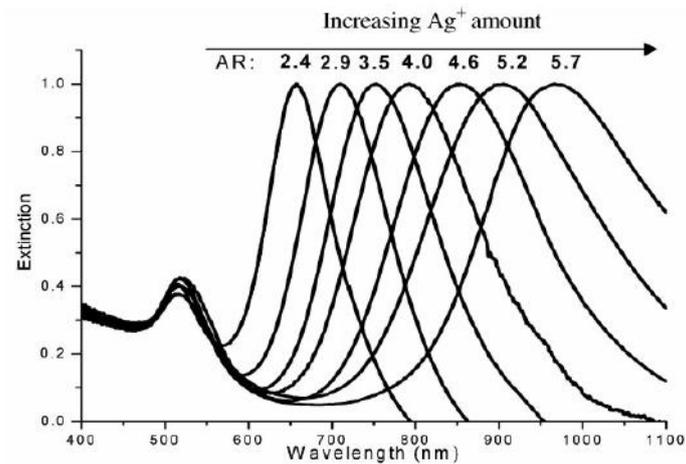


Figure 8. Variation de l'absorbance de nanobâtonnets d'or pour des ratios d'aspect obtenus par ajout croissant d'ions Ag^{+10}

2.4. Photo-luminescence des NPs d'or

C'est à partir des années 2000 que les propriétés luminescentes des NPs d'or ont été étudiées.¹¹ Les travaux de Bigioni et al. révèlent que des NPs d'or d'environ 1 nm de diamètre peuvent être excités et émettre dans le domaine du proche infrarouge.^{11d} Il est postulé que des transitions électroniques interviennent entre les bandes 5d et les bandes 6sp avec l'absorption et l'émission de photons (Figure 9). Ces propriétés peuvent également dépendre des paramètres tels que la taille des NPs^{11c, 12} ou la nature de l'habillage.^{11a, 11c} Les corrélations observées entre le spectre d'excitation et le spectre d'adsorption confirment l'importance de la résonance plasmon dans ce type de phénomène.^{11c, 12a}

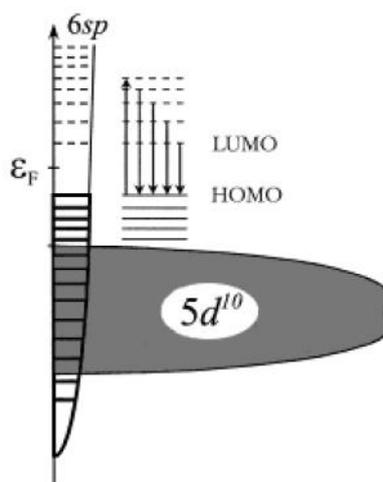


Figure 9. Excitations et émissions interbandes des NPs d'or^{11d}

2.5. Enjeux

Les propriétés optiques des NPs d'or sont donc liées au phénomène de la résonance plasmon qui est un phénomène purement diélectrique et essentiellement dépendant de la taille, de la morphologie de la particule mais aussi de son environnement. La synthèse de ces nanomatériaux doit donc permettre un contrôle des paramètres comme la taille, la forme, l'habillage et la stabilité pour un milieu donné.

3. Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules d'or en phase aqueuse

Dans cette partie nous décrivons les principales voies de synthèses des NPs d'or en phase aqueuse ainsi que les propriétés chimiques et la réactivité des composés qui constituent leur habillage.

3.1. Synthèse de Turkevich

Nous allons aborder dans ce paragraphe le cas classique des NPs d'or dites "citratées". La synthèse proposée par John Turkevich et al. en 1951¹³ fait figure de référence historique pour la communauté scientifique car ils ont établi un protocole simple qui permet d'obtenir des NPs sphériques de taille contrôlée en milieu aqueux. La toute première étude sur le sujet fût néanmoins réalisée par Hauser et al. en 1940 dans un ouvrage intitulé

Experiments in Colloid Chemistry.¹⁴ Bien que largement utilisée, il existe encore aujourd'hui différentes interprétations théoriques quant à la formation de ces NPs. Nous donnerons d'abord quelques éléments concernant le principe de cette réaction chimique, puis nous confronterons les différents modèles proposés pour le mécanisme de formation des nanosphères. Nous étudierons également les différentes adaptations proposées plus récemment, afin de comprendre leurs améliorations et leurs contributions à la compréhension du mécanisme global.

3.1.1. Principe

La synthèse de NPs d'or, comme toute réaction de cristallisation, nécessite de former un réseau cristallin. On utilise dans le cas de cette synthèse un sel précurseur d'Au(III) solubilisé dans l'eau sous forme d'un complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ que l'on réduit pour former le métal neutre Au(0) à l'aide des ions citrates (Ct). Le phénomène d'oxydoréduction observé par Turkevich et al.¹³ a été reformulé à plusieurs reprises notamment par Kumar et al.¹⁵ puis par Ojea-Jiménez et al.¹⁶ Ce dernier a également réalisé une étude par DFT (*Density Functional Theory*) pour détailler le mécanisme d'oxydoréduction.¹⁷ Le mécanisme de synthèse est donc formalisé en un processus multi-étapes (Figure 10). Après un échange de ligand dans la sphère de coordination du complexe d'or, le citrate s'oxyde en dicarboxylate d'acétone tandis que l'Au(III) se réduit en Au(I). Une réaction de dismutation intervient alors pour former le métal neutre Au(0) et le complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ initial.

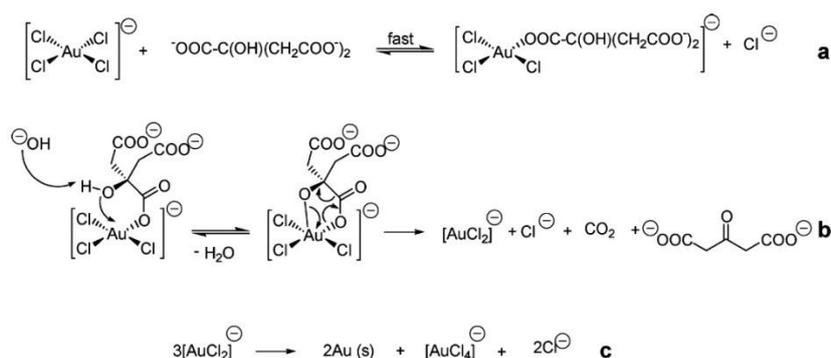


Figure 10. Réduction multi-étapes d'un complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ par les ions citrates selon Ojea-Jiménez et al.¹⁶ : (a) échange de ligand, (b) décarboxylation puis (c) dismutation

L'oxydation de l'acide citrique, étudiée par Kuyper et al.¹⁸ et Turkevich et al., montre que le dicarboxylate d'acétone joue un rôle de catalyseur dans la formation des NPs d'or. Ce composé se dégrade en acétone, également réducteur des complexes d'Au(III).^{13, 19} Il a été

également proposé que ce composé formerait un complexe macromoléculaire avec les ions Au(I), une sorte de matrice pour initier la nucléation^{13, 20}. Cependant les récentes expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) réalisés par Doyen et al. n'ont pas confirmé cette dernière hypothèse.²¹ Ce modèle est similaire à la théorie de nucléation par diffusion proposée par LaMer et al.²² (Annexe 1) puisqu'ici, la nucléation commence lorsque la concentration en or est suffisante pour former un nucléi dont le rayon est supérieur ou égal au rayon critique. La croissance cristalline se réalise sur des germes jusqu'à ce que la réaction de réduction de l'or ionique soit totale.

La stabilité colloïdale des NPs est due à la présence de molécules de citrate adsorbées sur leur surface. À pH basique, neutre ou faiblement acide les groupements carboxylates induisent un potentiel ζ (défini en Annexe 2) négatif sur les particules qui se repoussent mutuellement : on parle de stabilisation par répulsion électrostatique. La récente étude de Park et al. par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF) et spectroscopie par diffusion de photoélectrons X (XPS - défini en annexe 3) propose un modèle de structure en bicouche d'ions citrates.²³ Le groupement carboxylate central se lie à un atome d'Au(I) tandis que les autres groupements forment des liaisons hydrogène intermoléculaires (Figure 11).

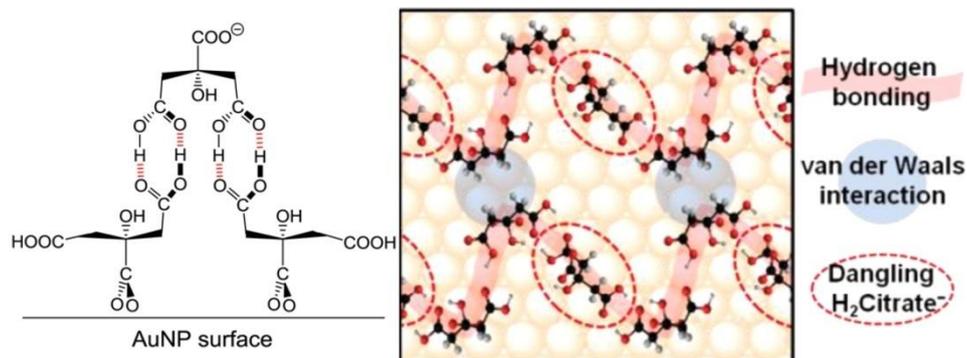


Figure 11. Structure des ions citrates adsorbés en surface des NPs d'or²³

3.1.2. Études du mécanisme de formation des NPs

S'il est communément admis que la formation des NPs d'or passe par une étape de nucléation puis de croissance cristalline autour des germes formés, le mécanisme global est sujet à de nombreuses interprétations divergentes que l'on peut classer selon trois grandes orientations :

- la théorie des intermédiaires nanofils
- la théorie nucléation - croissance par diffusion

- la théorie des intermédiaires par agrégation réversible

Intermédiaires nanofils

Pei et al. observent pour la première fois en 2004 la formation de nanofils pour des ratios Ct:Au faibles. Il constate que ces objets sont polycristallins et se forment par agrégation entre particules.²⁴ Néanmoins ils ne formulent pas d'hypothèses mécanistiques de formation des nanosphères à proprement parler.

Ji et al. montrent dans leurs travaux que le citrate, en plus de réduire et stabiliser les particules, joue un rôle de tampon. Cette propriété influence de façon déterminante la taille finale des NPs obtenues. Ils observent en effet que le diamètre des NPs diminue jusqu'à un minimum puis augmente pour des ratios Ct:Au croissants (Figure 12).

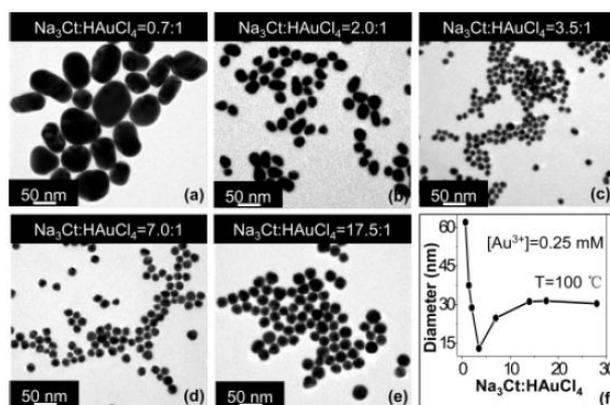


Figure 12. Clichés par microscopie électronique à transmission (MET) des NPs d'or obtenues pour différents ratios citrate/or (a-e) et résumé des diamètres moyens mesurés selon la méthode de Ji et al.²⁵

À partir de ces observations par MET et spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible (UV-Vis), il est proposé un modèle de mécanisme dépendant du pH :

- À pH acide : une formation rapide de nucléis, suivie d'une agrégation aléatoire / formation de nanofils. Dans un deuxième temps ces nanofils vont se réarranger en sphères par « murissement », c'est à dire que les atomes d'or vont migrer par diffusion.
- À pH basique : une formation moins rapide de nucléis puis une croissance cristalline par diffusion lente.

L'étape clé qui définit le mécanisme de la réaction selon Ji et al. est l'échange de ligand qui survient avec les ions HO⁻ dans la sphère de coordination du complexe d'Au(III). En

effet, la cinétique de réduction du complexe d'or dépend de l'avancement de son hydrolyse (Figure 13).

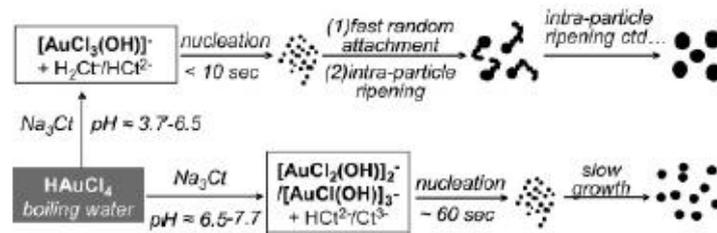


Figure 13. Modèle de Ji et al. : mécanisme pH-dépendant²⁵

L'influence de la charge de surface sur l'agrégation des nucléis a été étudiée par Zhao et al., confirmant l'apparition de nanofils intermédiaires.²⁶

Nucléation - croissance par diffusion

Une approche détaillée du mécanisme nécessite de suivre le processus de formation des nanocristaux en cours de réaction.

Takiyama et al. réalisent en 1958 la première étude de l'évolution du nombre de NPs au cours de la réaction ainsi que l'influence de la température et de la quantité initiale d'or sur la taille finale des NPs.²⁷ Il détermine que le nombre de NPs reste constant après l'étape de nucléation, que la taille diminue avec l'augmentation de la quantité d'or et augmente avec la température. Sur ces fondements, il apparaît que la croissance cristalline est contrôlée par la diffusion des ions autour des germes

A *contrario* la célèbre étude de Frens de 1973 montre que, pour une quantité initiale d'ions citrates décroissante et une concentration en or constante, la taille finale des NPs augmente.²⁸ Cette différence de résultats s'explique simplement par le fait que les auteurs ont travaillé sur deux gammes de ratio Au:Ct différentes. Comme montré précédemment, il y a deux types d'évolution de la taille suivant le ratio Au:Ct. Néanmoins dans cette étude, Frens considère également que la taille finale est déterminée par le nombre de germes.

C'est bien plus tard, en 2010, qu'un premier modèle complet est proposé par Polte et al.²⁹ À l'aide d'un montage qui permet une mesure par diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering - SAXS) et spectrométrie d'absorption des rayons X (X-ray Absorption Near Edge Structure - XANES) *in situ*,³⁰ les auteurs réalisent une étude de la cinétique de réduction de l'or en parallèle de l'évolution de la taille des nanosphères. Quatre

phases distinctes dans le mécanisme sont observées: une nucléation rapide, suivit d'une coalescence des nucléis, puis une croissance lente autour des germes et enfin une dernière étape de croissance rapide jusqu'à ce que la réaction soit totale (Figure 14).

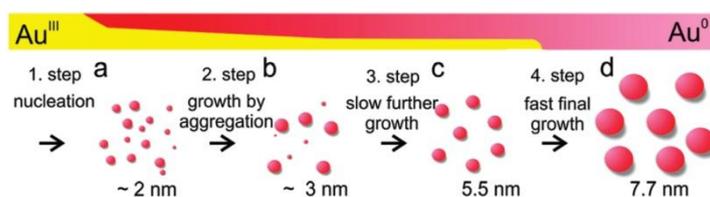


Figure 14. Modèle de Polte et al. : formation des NPs en 4 étapes^{*29}

Georgiev et al. réalisent en 2012 une étude combinant des analyses par microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy AFM), diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering - DLS ; définit en annexe 2) et MET³¹. Ils proposent un mécanisme dont les deux processus clés seraient une nucléation lente, continue et homogène suivie d'une croissance cristalline autocatalysée.

La récente étude de Wuihschick et al. donne incontestablement une vue d'ensemble du mécanisme selon l'hypothèse de la croissance par diffusion.³² En reprenant les travaux de Polte et al. évoqués ci-dessus, les auteurs s'attachent à démontrer qu'il n'existe pas d'intermédiaires sous forme de nanofils ou d'agrégation réversible, car non observés par les méthodes de diffusion des rayons X aux petits angles *in situ*. Les méthodes *ex situ* utilisées jusqu'alors (spectroscopie d'absorption UV-Vis, MET et AFM par exemple) sont jugées non appropriées, et porteraient à confusion sur un fait expérimental remarquable : l'apparition d'une couleur bleu-grise dans les premiers instants de la réaction, avant que la solution se teinte en rouge pour des NPs de 15-20 nm de diamètre. Cette coloration intermédiaire serait en fait due à la présence d'or ionique dans la double couche électrique. Elle établit également que la taille finale des NPs est déterminée au moment de la formation des germes (Figure 15), et qu'elle est contrôlée par le nombre de germes. Ce nombre est en fait déterminé par la quantité d'Au(0) et la taille des germes. Les études de Ji et al. évoquées dans la partie précédente relatent l'importance du pH réactionnel, Wuihschick et al. définissent alors l'intervalle de pH dans lequel leur mécanisme reste valide.

* La notation Au^{III}, communément utilisée dans la littérature désigne l'ensemble des complexes d'or issus de l'acide chloraurique, quelque soit leur niveau d'hydrolyse.

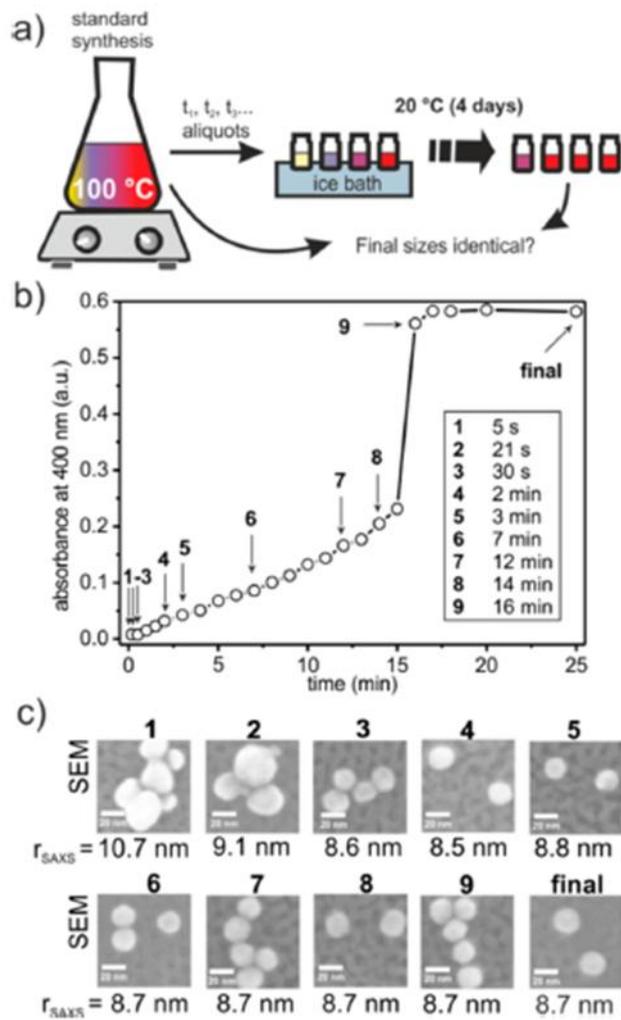


Figure 15. Expérience de Wuitchick et al. : des prélèvements sont effectués à différents temps de réactions (a), l'avancement est évalué par l'évolution de l'absorbance à 400 nm (b) puis le diamètre final est déterminé après quatre jours à température ambiante pour chacun d'entre eux (c)³²

Intermédiaires par agrégation réversible

D'autres auteurs ont soutenu l'hypothèse de la formation d'agrégats intermédiaires où, contrairement au modèle des nanofils, ce phénomène serait réversible (Figure 16).

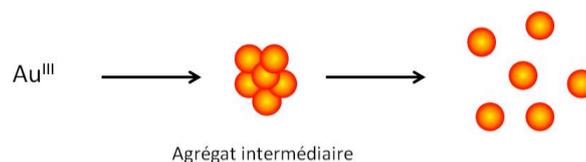


Figure 16. Modèle général de l'agrégation réversible

Chow et al. proposent en 1994 le premier modèle incluant une agrégation intermédiaire réversible en se basant sur des mesures en spectroscopie UV-Vis, en mobilité électrophorétique, en DLS et par des observations en MET.³³ L'influence de la quantité initiale d'or sur une plus large gamme que celle de Takiyama et Frens est également étudiée. Il est ainsi montré que le diamètre diminue jusqu'à un minimum puis augmente avec la quantité d'or.[†]

Rodríguez-Gonzalez et al. réalisent une étude électrochimique pour valider l'hypothèse de l'agrégation intermédiaire. En mesurant l'évolution du potentiel par rapport à une électrode d'argent, ils observent une chute de 0,75 V à 0,1 V qui est attribué à la peptisation des agrégats.³⁴

C'est l'étude de Mikhlin et al. qui révèle pour la première fois la contradiction qu'apportent les analyses SAXS par rapport aux méthodes *ex situ*.³⁵ Plutôt que d'agrégats à proprement parler, il propose la formation de gouttelettes denses quasi-liquides dans lesquelles a lieu la croissance cristalline (Figure 17).

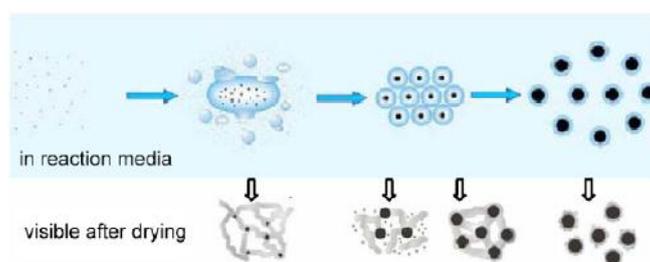


Figure 17. Modèle de Mikhlin et al. : formation de gouttelettes quasi-liquides³⁵.

Bilan

Bien d'autres études ont été menées pour tenter d'élucider le mécanisme complexe de synthèse de Turkevich sans forcément confirmer l'un de ces trois modèles. Kumar et al. proposent un modèle théorique et quantitatif basé sur l'étude cinétique des différentes réactions chimiques impliquées dans la réduction de l'Au(III) en Au(0).¹⁵ Le modèle de Patungwasa et al. rationalise l'évolution du diamètre final des nanosphères en fonction de l'état de charge des ions citrates, paramètre qui détermine la stabilité des états intermédiaires.³⁶ A mi-chemin entre les modèles nanofils et agrégation réversible, Pong et al. proposent la formation de longs fils en réseau qui se dissocient en particules individuelles.³⁷

[†] Conformément aux résultats obtenus par Ji et al. en 2007 que nous avons évoqués précédemment.

La diversité des formes anisotropiques observées par microscopie électronique laisse penser que cette méthode n'est pas appropriée pour caractériser les états intermédiaires en solution. Les méthodes de mesure *in situ* proposées par l'équipe de Polte apparaissent plus pertinentes bien que le mécanisme proposé ne soit valable que dans une gamme de pH restreinte. En effet, une récente étude du même groupe montre que des NPs d'or monodisperses ne peuvent être obtenues de façon reproductible que dans des conditions de mono-protonation des ions citrates.³⁸ La complexité du phénomène tient à son étroite dépendance d'un grand nombre de paramètres cinétiques (réduction des ions Au(III), formation des nucléis, croissance cristalline) et thermodynamiques (hydrolyse du complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ en $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$, protonation des ions citrates, stabilité des NPs à leurs différents stades de croissance).

3.1.3. Adaptations

La synthèse de Turkevich, fréquemment utilisée depuis que la communauté scientifique porte un intérêt pour les NPs d'or en solution aqueuse a néanmoins connu de nombreuses variations du protocole originel. La première étant évidemment celle proposée par Frens et al. qui permet d'obtenir des NPs relativement homogènes en augmentant leur taille de 16 nm à 147 nm de diamètre par l'ajout de quantités décroissantes de solution de citrate de sodium.²⁸

En 2006 Kimling et al. réalisent des synthèses de NPs Au@Ct sous irradiation UV à température ambiante qui permettent de garder une forme sphérique pour des plus grandes tailles.³⁹ Cependant les résultats sont plus homogènes lorsqu'ils utilisent l'acide ascorbique pour réduire les ions d'or et le citrate uniquement comme chélatant.

Dans les mêmes travaux que cités précédemment Ji et al. mettent au point une variation de la méthode de Frens et al. pour le contrôle de la taille des nanosphères.²⁵ Plutôt que de faire varier le ratio Ct:Au, les auteurs changent le pH réactionnel ce qui permet d'améliorer l'indice de polydispersité des différentes synthèses (Figure 18).

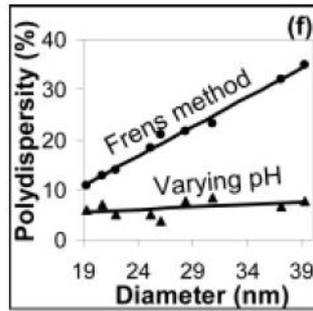


Figure 18. Variation du pH réactionnel pour un ratio Ct:Au constant versus méthode de Frens pour le contrôle de la taille des NPs.²⁵

L'influence des paramètres intensifs tels que la concentration et les ratios de réactifs sur la taille et la polydispersité des NPs d'or citratées a été étudiée en détail par Zabetakis.⁴⁰ La synthèse de Turkevich n'est viable que dans des conditions diluées (autour de 1 mM en or) et pour un ratio Au:Ct qu'il convient d'optimiser.

Plus simplement, certains auteurs ont inversé l'ordre d'introduction des réactifs. Au contraire de la méthode classique, c'est la solution de citrate que l'on porte à ébullition et sur laquelle on ajoute la solution d'acide chloraurique.⁴¹ Les NPs ainsi obtenues sont de tailles plus faibles (environ 9 nm de diamètre). Une synthèse des NPs dans le D₂O a également été réalisée par Ojea-Jiménez et al., diminuant la diamètre à environ 5 nm (Figure 19).¹⁶

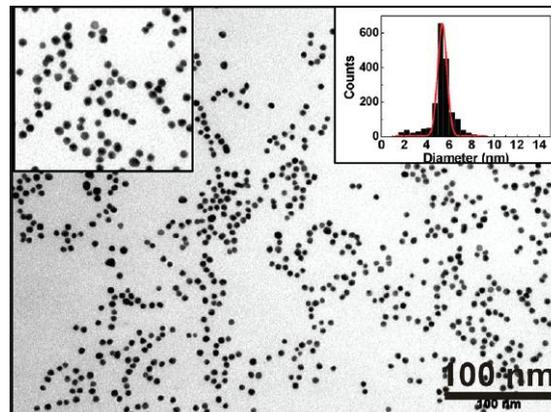


Figure 19. Photographie par MET de NPs d'or synthétisées dans le D₂O¹⁶

Xia et al. proposent en 2010 d'utiliser le nitrate d'argent comme catalyseur pour oxyder le citrate et met en place un protocole permettant d'obtenir des NPs quasi-sphériques pour des diamètres allant de 10 nm à 40 nm.⁴²

Il a également été montré par Schulz et al. que l'ajout d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) permet de diminuer drastiquement le coefficient de variation de la distribution de taille obtenue et améliore le coefficient de circularité (Figure 20).⁴³

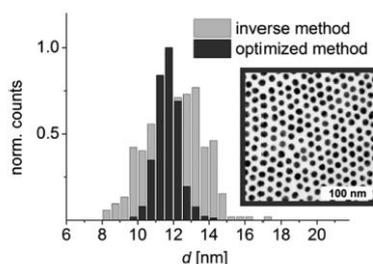


Figure 20. Adaptation de Schulz et al. pour la synthèse de Turkevich : effet sur la distribution de taille⁴³

Bien d'autres modifications du protocole de Turkevich ont été réalisées jusqu'à maintenant, notamment celle où un réducteur fort remplace le citrate pour accélérer la réduction et générer des NPs de taille plus faible. La méthode « seeding-growth » consiste à introduire ces germes synthétisés préalablement dans une solution de croissance pour former des particules plus larges, augmentant ainsi la gamme de NPs sur des diamètres de 5 à 40 nm ou de 15 à 300 nm selon les études (Figure 21).⁴⁴

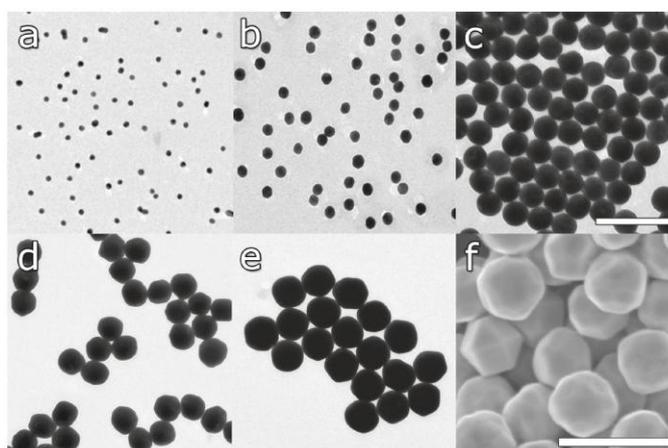


Figure 21. Images par MET de NPs d'or de (a) 15 ± 2 nm, (b) 31 ± 3 nm, (c) 69 ± 3 nm, (d) 121 ± 10 nm, (e) 151 ± 8 nm et par microscopie électronique à balayage (MEB) (f) 294 ± 17 nm. Barre d'échelle de 200 nm pour les images a-c et 500 nm pour les images d-f^{44a}

3.2. Autres synthèses en milieu aqueux

Il existe actuellement de très nombreuses façons de synthétiser des NPs d'or et nous tenterons ici de montrer leur diversité par les réactifs qu'elles mettent en jeu. Si le complexe précurseur le plus utilisé est l'acide chloraurique, les synthèses se différencient par la nature des réducteurs et les ligands introduits. Nous distinguerons ici deux catégories de synthèses :

- Les synthèses où le composé réducteur est aussi le ligand, c'est notamment le cas de la synthèse de Turkevich. Le ligand, généralement introduit en excès, participe au processus d'oxydoréduction du complexe d'or et stabilise les nanocristaux formés.
- Les synthèses faisant intervenir un réducteur et un ligand distincts.

3.2.1. Synthèses avec un ligand réducteur

La valorisation de la biomasse est actuellement un des critères majeurs de la chimie verte, c'est pourquoi de nombreuses synthèses de NPs d'or ont été réalisées à l'aide de molécules naturelles. Dans la famille des acides carboxyliques et de leurs conjugués carboxylates, un exemple courant est celui de l'acide gallique, un composé capable de s'oxyder sous sa forme quinone.⁴⁵ Ces NPs ont été utilisées pour leur activité antibactérienne⁴⁶ ainsi que pour la détection colorimétrique des ions Pb^{2+} ⁴⁷ et $Cr(III)/Cr(IV)$.⁴⁸ De même, l'acide tannique qui est un dérivé du composé précédent et le cholate de sodium sont employés dans des conditions similaires et les NPs synthétisées ont été étudiées pour leur propriétés catalytiques (Figure 22).⁴⁹

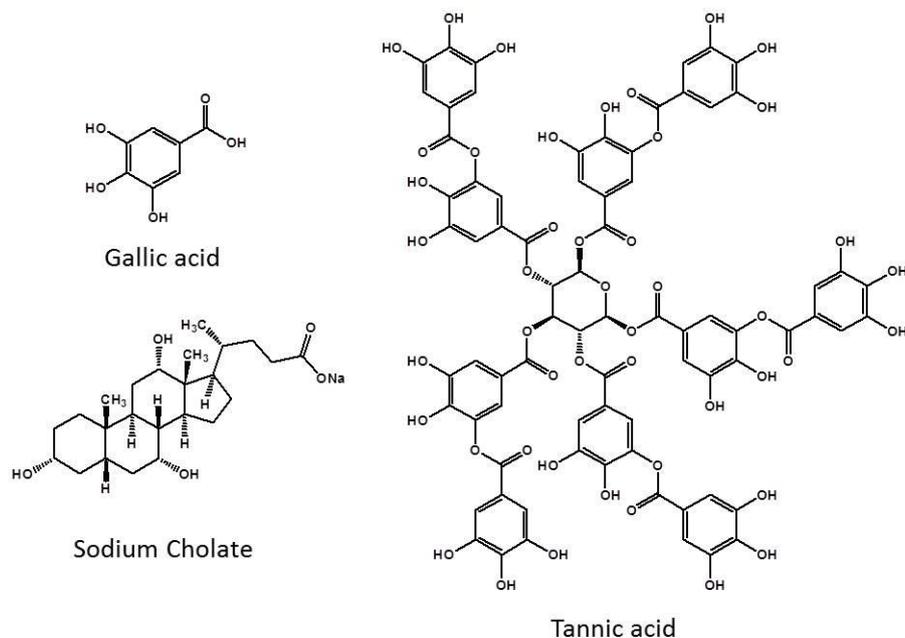


Figure 22. Exemple d'acide carboxyliques ou carboxylates naturels utilisés pour la synthèse de NPs d'or dans l'eau

Wangoo et al. proposent de comparer les synthèses à l'aide des 20 acides aminés naturels. Ces travaux mettent en évidence la relation entre la structure chimique du ligand réducteur et les propriétés de NPs d'or pour cette famille de biomolécules.⁵⁰ Cette étude permet également de constater de grandes différences de réactivité avec le complexe d'or pour des molécules qui possèdent des structures très semblables (Figure 23). Par exemple l'asparagine permet d'obtenir des NPs homogènes en taille tandis que la glutamine ne semble pas réduire le complexe d'or.

Concentration of amino acid (mM)	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0
Glutamic Acid	Blue	Red	Red	Red	Green
Aspartic Acid	Green	Red	Red	Red	Red
Phenylalanine	Blue	Red	Yellow	Yellow	Yellow
Tryptophan	Blue	Blue	Yellow	Yellow	Yellow
Cysteine	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Methionine	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Histidine	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Leucine	Blue	Red	Red	Red	Red
Isoleucine	Blue	Blue	Green	Green	Green
Valine	Blue	Green	Red	Red	Red
Lysine	Blue	Blue	Blue	Blue	Green
Glycine	Blue	Blue	Blue	Blue	Green
Alanine	Blue	Blue	Blue	Green	Green
Asparagine	Red	Red	Red	Red	Red
Glutamine	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Proline	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Serine	Red	Red	Red	Red	Red
Tyrosine	Red	Red	Red	Green	Green
Threonine	Red	Red	Red	Green	Green
Arginine	Blue	Green	Green	Green	Green

Figure 23. Pouvoir réducteur de 20 acides aminés dans une gamme de concentration de 0.1 mM à 5.0 mM (rouge : NPs monodisperses, bleu : pas de réduction, vert : réduction incomplète, jaune : dispersion instable)⁵⁰.

Bien d'autres travaux proposent des synthèses « vertes » en utilisant des sucres ⁵¹ ou des extraits de végétaux comme le géranium,⁵² le jacquier⁵³ voire des fruits riches en antioxydants (myrtilles, mures, grenade).⁵⁴

La littérature montre également une grande diversité de molécules synthétiques pour former ces colloïdes : aminosiloxy,⁵⁵ hydroxybenzophénone,⁵⁶ acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA),⁵⁷ phosphonium,⁵⁸ phosphonates,⁵⁹ phosphates et acides sulfoniques⁶⁰ ainsi que des dendrimères.⁶¹ Un effort particulier est à noter concernant la synthèse de NPs à l'aide de polymères. En effet la stabilisation dans l'eau à l'aide de petites molécules se fait par répulsions électrostatiques comme nous l'avons vu pour les NPs « citratées ». Or pour des applications en milieu physiologique la concentration en sels est trop importante, ce qui neutralise la barrière électrostatique et favorise l'agrégation. L'habillage des NPs à l'aide de polymères permet une stabilisation par répulsion stérique et pour les applications *in vivo* cela se traduit par une augmentation du temps de circulation.⁶²

Le polymère le plus couramment utilisé est le polyéthylène glycol (PEG), reconnu par la Food and Drug Administration (FDA) il assure une bonne solubilisation en milieu salin (Schéma 1). Stufiuc et al. proposent en 2013 une synthèse à partir de PEG linéaires de poids moléculaire allant de 200 à 20 000 Da.⁶³ Les NPs formées mesurent 30 nm de diamètre et

présentent une charge de surface décroissante pour des longueurs de chaînes croissantes. La même année Liu et al. développent des NPs de 5 nm recouvertes par des PEG de 1000 Da avec une fonction thiol en bout de chaîne. Ces NPs présentent une émission de fluorescence dans le proche infrarouge,⁶⁴ et ont été évaluées par imagerie de fluorescence sur des souris nude portant une tumeur MCF-7. Il a été ainsi montré que les NPs s'accumulent dans la tumeur par effet de perméabilité et de rétention accrue (enhanced permeability and retention – EPR ; détaillé plus loin) mais sont également éliminées par le système rénal quelques heures après injection.

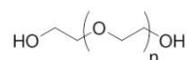


Schéma 1. Structure générale des PEG

Le poly(vinylpyrrolidone) (PVP) a aussi suscité un intérêt pour la stabilisation des NPs d'or, en tant que polymère amphiphile et non ionique (Schéma 2). Hoppe et al. ainsi que Zhou et al. ont développé des synthèses de NPs habillées par ce polymère en étudiant l'influence de différents paramètres réactionnels (ratio de réactifs et pH réactionnels) sur leur taille et leur morphologie.⁶⁵ Ce type de NPs peuvent être employées pour la synthèse de structure cœur-coquille Au@SiO₂.⁶⁶

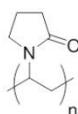


Schéma 2. Structure générale des PVP

D'autres polymères avec des structures plus complexes ont également été utilisés, comme par exemple des polymères ioniques.⁶⁷

3.2.2 Synthèses avec un réducteur et un ligand

Pour les familles de molécules citées dans le paragraphe précédent, de nombreux modes opératoires ont été proposés afin de s'en servir uniquement comme agent de stabilisation. Ceci implique d'ajouter une espèce avec un pouvoir réducteur plus fort pour réagir avec l'acide chloraurique dans des conditions où le ligand ne s'oxyde pas. Ce type de procédure accélère la nucléation et peut améliorer la distribution de taille des NPs obtenues.

Des exemples de synthèses sont résumés dans le tableau 1 afin d'illustrer les différents types de ligands employés dans cette méthode.

Ligand	Réducteur	Référence
Citrate	NaBH ₄	44b
Amino-alcool		68
GSH		69
MHA/TA		70
b-D-glucose		71
PAMAM		72
	N ₂ H ₄	73
CTAB	Acide ascorbique	74
		75
PVCL	NaBH ₄	76
HS-PEG-OMe		70
PVP	Glycérol	77
Polymère ionique	NaBH ₄	78
BSA	N ₂ H ₄	79

Tableau 1. Quelques exemples de synthèses de NPs d'or dans l'eau faisant intervenir différents couples ligand/réducteur

Ces synthèses sont réalisées à température ambiante et les NPs se forment dès que le réducteur est additionné sur la solution de complexe Au(III)-ligand.

Il existe toutefois d'autres méthodes de réduction du complexe d'or, comme par exemple la génération d'espèces radicalaires par exposition aux rayons γ .⁸⁰

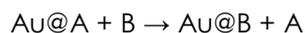
3.3. Habillage et post-fonctionnalisation

Les NPs, parfois appelées "nanoplateformes", peuvent être valorisées pour des molécules d'intérêt greffées ou couplées sur leur surface. Nous décrirons ici brièvement la méthode de l'échange de ligand pour la modification de l'habillage des NPs d'or, ainsi que les principaux couplages réalisés sur les composés adsorbés.

3.3.1. Échange de ligand

Les synthèses en phase aqueuse font donc intervenir une grande variété de ligands qui induisent une distribution en taille et en forme qui est propre à chacun d'entre eux. Si

certaines molécules ont un intérêt pour la fonctionnalisation de surface, elles ne permettent cependant pas toujours d'obtenir la morphologie désirée. Par exemple les thiols sont parmi les meilleurs ligands de surface mais ne permettent que rarement des synthèses efficaces. L'échange de ligand est donc une technique couramment employée pour apporter un habillage spécifique à des nanocristaux formés dans une étape antérieure. Il s'agit d'introduire un ligand B qui présente une affinité suffisante pour se lier à la surface d'or et remplacer le ligand A déjà présent après synthèse des NPs.



Ce procédé pourrait être comparé aux réactions de substitution sur les complexes métalliques dont on connaît trois mécanismes distincts : le mécanisme associatif, dissociatif ou d'échange intramoléculaire. Néanmoins la structure électronique d'un complexe mononucléaire d'Au(I) est plus simple que celles des NPs et par conséquent cette analogie ne permet pas de rationaliser le phénomène. Si sur des surfaces planes d'or il a été proposé d'appliquer le modèle cinétique par diffusion de Langmuir,⁸¹ ce modèle ne prend pas en compte certains paramètres tels que la barrière d'activation ou l'équilibre réactionnel.⁸² De plus les NPs d'or sont des polyèdres qui présentent différents sites de chimisorption à ses sommets, arêtes et faces cristallines. Chacun de ces sites a des densités électroniques différentes, ce qui influence la cinétique d'adsorption.⁸³

Les thiols sont les molécules les plus utilisées pour habiller les NPs car ces composés ont une grande affinité avec les surfaces d'or. Les liaisons Au-S se forment facilement bien que leur nature fasse encore l'objet de recherches.⁸⁴

En phase aqueuse, le cas le plus classique est l'échange avec des composés portant un groupe thiol ou disulfure sur des NPs « citratées ». Ainsi Kalimuthu et al. montrent par spectroscopie infrarouge que des ligands mercaptothiadiazole remplacent intégralement les ions citrate après échange et stabilisent les NPs par répulsions électrostatiques.⁸⁵ Lin et al. proposent un habillage par l'acide thioctique, capable de s'échanger partiellement dans un deuxième temps avec des thiols neutres peu solubles dans l'eau.⁸⁶

L'échange direct avec des macromolécules hydrosolubles comportant un groupe thiol permet de stabiliser efficacement le colloïde par répulsion stérique. C'est le cas des dendrons comme l'ont montré Cho et al.,⁸⁷ mais aussi des polymères de type thiol-PEG de façon très répandue (Figure 24).⁸⁸

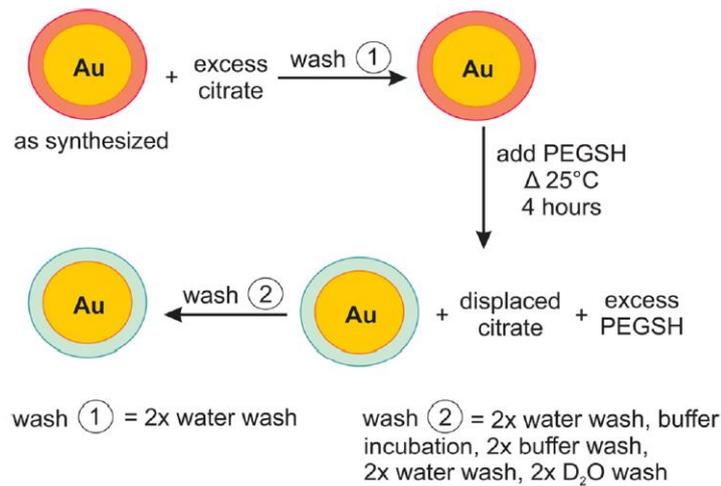


Figure 24. Procédure de Smith pour l'échange de ligand sur des NPs « citratées »^{88d}

3.3.2. Post fonctionnalisation et réactivité des molécules chimisorbées

On appelle post-fonctionnalisation la jonction de molécules d'intérêt à la surface des NPs. De nombreuses études portent sur le développement de nanoplateformes fonctionnalisées, des NPs inorganiques capables de servir de support pour des composés comme des catalyseurs ou des biomolécules. Ces colloïdes permettent de conjuguer les propriétés physiques des nanocristaux et les propriétés chimiques ou biologiques des composés supportés. On distingue deux stratégies pour préparer ces systèmes :

- L'adsorption directe du composé sur la surface des NPs. Par exemple dans le cas de l'ADN, le greffage sur les NPs d'or peut se faire par interactions ioniques.⁸⁹
- Le couplage de la molécule d'intérêt sur les ligands adsorbés en surface des NPs. La formation d'une liaison covalente nécessite de maîtriser les groupements fonctionnels disponibles et dans certains cas la réaction doit être chimiosélective.

Nous nous intéresserons à cette dernière stratégie que nous pouvons illustrer pour les NPs d'or en phase aqueuse par l'exemple du couplage de la trypsine, une endoprotéase du suc pancréatique qui permet la digestion. Ce type de système permet d'améliorer la reconnaissance spécifique de l'enzyme grâce à une concentration importante par unité de surface, mais aussi d'éviter l'autodigestion. Dans la pratique l'absorption de la lumière par les NPs et la possibilité de centrifuger les dispersions facilitent la manipulation de l'enzyme. Hinterwirth et al. proposent une synthèse où la trypsine est liée par couplage carbodiimide (Annexe 4) à des NPs d'or stabilisées par des chaînes PEG (Figure 25).^{88a} Le protocole fait intervenir un échange de ligand comme nous l'avons vu dans la partie précédente. Après lavage, l'auteur quantifie le nombre d'enzymes immobilisées par NP et mesure l'activité en

fonction de différentes longueurs de chaînes PEG. Il apparaît que plus la chaîne PEG est longue, plus la quantité de trypsine par NP augmente. L'activité est optimale pour des chaînes de 7 unités.

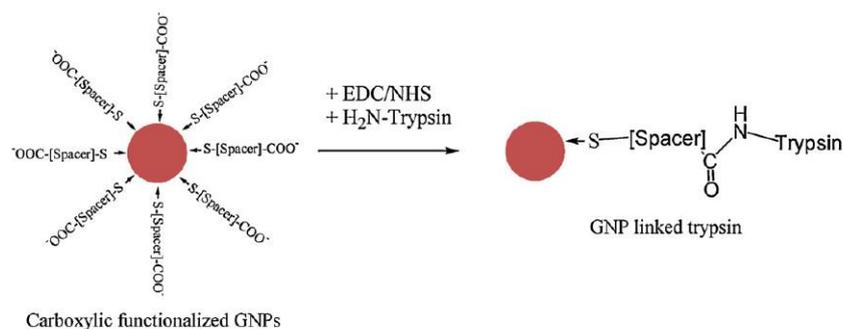


Figure 25. Couplage carbodiimide de la trypsine sur des NPs Au@PEG-COOH^{88a}

Quelques années plus tôt Gole et al. développent une stratégie semblable sur des nanobâtonnets d'or stabilisés par un co-polymère polystyrène sulfonique – acide maléique. L'originalité de ce travail est qu'il compare différentes formes de greffage/couplage notamment en introduisant un azide sur le co-polymère pour réaliser une réaction de Huisgen avec de l'acétylène-trypsine.⁹⁰ Ce type de couplage permet d'augmenter significativement le nombre d'enzymes portées par les nanobâtonnets mais aussi l'activité spécifique tout en préservant la stabilité du système. De façon similaire Brennan et al. ont conduit en 2006 cette réaction pour coupler de l'acétylène-lipase sur des NPs d'or habillées par un thiol-PEG-azide.⁹¹

En 2001 émerge une nouvelle catégorie de réaction de couplage, que l'on nome « chimie Click » et dont les critères sont définis par Kolb, Finn et Sharpless.⁹² Réalisable sur grande échelle, en phase aqueuse, sans sous-produits toxiques et avec d'excellents rendements, ce couplage est un puissant outil pour la post-fonctionnalisation des NPs d'or. L'exemple le plus connu est la réaction de cycloaddition 1-3 dipolaire d'un azide sur un alcyne catalysée par un complexe de cuivre (Schéma 3),⁹³ inspirée des travaux de Huisgen.⁹⁴

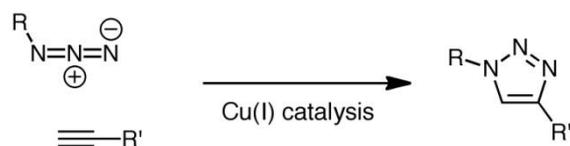


Schéma 3. Réaction cycloaddition 1-3 dipolaire catalysée au Cu(I)

Le champ d'application de la chimie « Click » sur les NPs a même été élargie à l'élaboration d'assemblages supramoléculaires. Ainsi Zhang et al. développent en 2012 des assemblages de NPs hybrides organiques – inorganiques par effet « template » pour la production cyclique de NPs de Janus.⁹⁵ Les NPs d'or servent ici de point d'ancrage pour la fonctionnalisation de NPs organiques « SCK » (Shell Crosslinked) composées d'un mélange de polymères. Après un couplage par chimie « Click » les NPs organiques liées aux NP d'or sont « détachées » à l'aide d'un échange de ligand (Figure 26). La face de la NP SCK qui a été en contact avec les ligands de la NPs d'or a donc une composition chimique différente, et le ratio de fonctions azide qui ont été substituées a été mesuré par le couplage chimiosélectif de fluorophores.

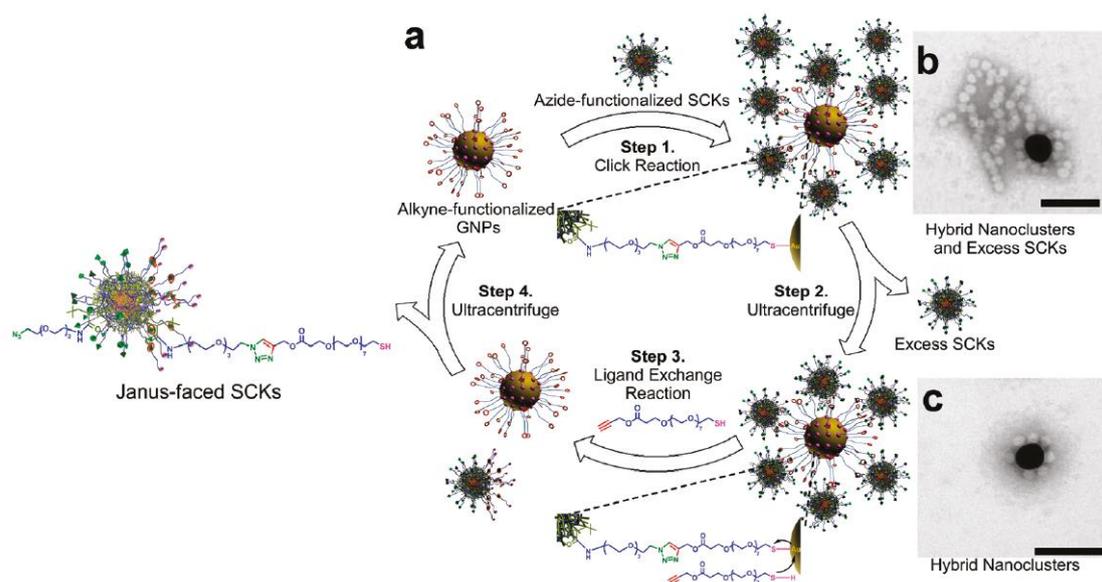


Figure 26. (a) Synthèse cyclique de NPs de Janus par stratégie « template » ; Assemblage supramoléculaire hybride or-SCK (b) avant et (c) après centrifugation⁹⁵.

Le développement de méthodes de post-fonctionnalisation est donc un enjeu crucial pour attacher aux NPs des composés d'intérêt, notamment pour leurs applications en nanomédecine.

3.3.3. Cas des hydroxyméthylène bisphosphonates

Au cours de nos travaux nous nous focaliserons sur l'utilisation des 1-hydroxy-1,1-méthylène bisphosphonates (HMBP - Schéma 4) pour la fonctionnalisation des NPs d'or. Ces composés ont principalement été étudiés comme agent de passivation des oxydes métalliques.⁹⁶ Chargés négativement, ils sont des ligands qui stabilisent efficacement les NPs.

Les HMBP se sont révélés être de bons candidats pour l'élaboration de NPs superparamagnétiques d'oxydes de fer à visée thérapeutique.⁹⁷

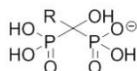


Schéma 4. Structure générale des HMBP

Par ailleurs, plusieurs études ont montré le fort potentiel des HMBP pour la post-fonctionnalisation de surface par couplage carbodiimide ou par chimie « Click » et en utilisant les micro-ondes.⁹⁸ Notons que l'alendronate, composé appartenant à la famille des HMBP, a été adsorbé à la surface des NPs par échange de ligand par plusieurs auteurs.⁹⁹ Cette molécule a même permis de réaliser une synthèse de NPs d'or sur le modèle du ligand-réducteur bien que le processus chimique ne soit pas rationalisé.^{59a} Par ailleurs Benyettou et al. ont synthétisé des NPs d'argent à l'aide de l'alendronate et proposent un mécanisme de réduction par voie radicalaire assistée par micro-ondes.¹⁰⁰

4. Applications en nanomédecine

Sur le plan historique l'usage thérapeutique de l'or remonte à plusieurs siècles.¹⁰¹ Les complexes d'Au(I), stables en phase aqueuse sont les plus utilisés pour la conception de drogue comme par exemple pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.¹⁰² Les principaux effets secondaires de ce type de traitement sont les réactions d'hypersensibilité sur la peau ou les muqueuses.¹⁰³

L'Au(0) est connu comme un métal peu réactif en milieu biologique, il est notamment utilisé pour les prothèses dentaires. Les NPs d'or présentent cependant une toxicité différente du métal massif de par leur importante surface spécifique. Elles peuvent par exemple être à l'origine d'une augmentation du stress oxydant par la formation d'hydroperoxydes lipidiques.¹⁰⁴ Il apparaît cependant que la toxicité des NPs d'or dépend de leur taille, leur forme, leur habillage, leur charge et leur état d'agrégation¹⁰⁵ mais aussi de leurs concentrations.¹⁰⁶ Comme nous l'avons vu précédemment la stabilité des NPs et leurs interactions dépendent essentiellement de leur fonctionnalisation de surface. Goodman et al.¹⁰⁷ ont montré que les NPs d'or anioniques de 2 nm de diamètre sont non toxiques par rapports à leurs équivalents cationiques. Ceci est confirmé par d'autres auteurs qui n'ont pas observé de mort cellulaire malgré l'internalisation de NPs sphériques « citratés ».¹⁰⁸ La stabilisation par des polymères améliore également la biocompatibilité, comme par exemple avec le PVP.¹⁰⁹ Les NPs d'or, selon leurs propriétés, peuvent donc être adaptées pour des applications en milieu biologiques.¹¹⁰

Aujourd'hui les NPs d'or sont au cœur du développement de nouveaux outils pour la médecine. Nous proposons ici un bref aperçu des principales techniques d'imagerie, de thérapie et d'élaboration de biocapteurs où ce type de nanomatériau apporte des améliorations.

4.1. Imagerie

4.1.1. Tomodensitométrie

La tomodensimétrie (computed tomography - CT) est une technique appartenant au domaine de la tomographie des plus utilisées dans le domaine de l'imagerie biomédicale. Elle permet de visualiser les structures osseuses qui présentent un fort contraste par rapport aux tissus qui l'entourent. En revanche les tissus de densité similaires se distinguent peu, c'est pourquoi les agents de contraste sont injectés dans le but de délimiter les réseaux vasculaires. Le contraste des tissus en tomodensimétrie repose sur l'atténuation des rayons X selon l'équation (16) :

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (16)$$

où I_0 est l'intensité du rayon X incident, I l'intensité du rayon X transmis, x est l'épaisseur du milieu et μ est le coefficient d'atténuation. μ dépend fortement de l'effet photoélectrique qui est proportionnel au cube du numéro atomique du matériau. Ainsi les NPs d'or ($Z = 79$) sont des agents de contraste efficaces de par leur important coefficient d'atténuation, supérieur à certains composés iodés couramment utilisés.¹¹¹

Nous pouvons illustrer cette technique par les travaux de Wang et al. où des NPs habillées par un dendrimère et post-fonctionnalisées par l'acide folique sont utilisées comme agent de contraste *in vivo* et *in vitro*.¹¹² Ces NPs ont été injectées dans des souris nude portant une tumeur SPC-A1. Elles s'internalisent dans ces cellules qui sur-expriment des récepteurs à l'acide folique. A la suite des injections intrapéritonéales, intraveineuses et intratumorales, les auteurs observent une augmentation de la radiodensité.

4.1.2. Tomographie en cohérence optique

La tomographie en cohérence optique (optical computed tomography -OCT) est une technique reposant sur l'interférométrie pour produire une image à partir de la diffusion optique des tissus et permet d'obtenir une résolution de quelques micromètres.

Zagaynova et al. ont étudié l'usage de nanocoquilles d'or comme agent de contraste pour l'OCT.¹¹³ Après application des NPs sur une peau de lapin, ils ont effectivement observé une augmentation de l'intensité du signal sur la zone superficielle du derme, ce qui permet notamment de contraster les follicules (Figure 27).

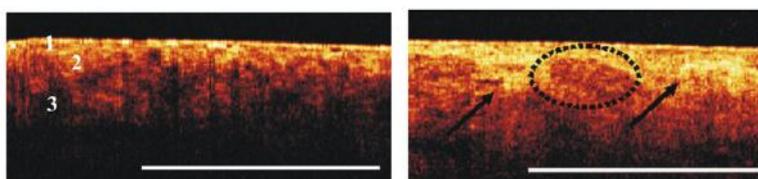


Figure 27. OCT d'un épiderme de lapin avant (gauche) et après (droite) application des nanocoquilles d'or : épiderme (1), derme superficiel (2) et derme profond (3). Les flèches montrent la limite entre ces deux parties du dermes. Les pointillés entourent la zone folliculaire.

Les récents travaux de Hu et al. ont établi l'influence des propriétés optiques des NPs d'or sur l'amélioration du contraste en OCT pour l'imagerie du cœur.¹¹⁴ En comparant des nanobâtonnets et des nanocoquilles d'or, il s'avère que ces dernières présentent le meilleur contraste.

4.1.3. Imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique est une technique qui permet une haute résolution spatiale des tissus profonds. Par l'exposition à des pulsations de laser, les photons se propagent à travers le milieu et une fois absorbés il se produit une expansion thermo-élastique des tissus qui génère des ondes ultrasons. La pression maximale initiale P_0 induite par la photo absorption est modélisée par l'équation (17) pour la propagation d'une onde plane dans un milieu homogène.

$$P_0 = \frac{\beta v_s^2}{C_p} \mu_a F_0 e^{-\mu_z z} = \Gamma \mu_a F_0 e^{-\mu_z z} \quad (17)$$

Avec β le coefficient thermique de l'expansion de volume, v_s la vitesse du son dans les tissus, C_p la capacité de chaleur spécifique du tissu à pression constante, μ_a le coefficient d'absorption, F_0 la fluence du laser pour une profondeur $z = 0$, Γ le paramètre de Grüneisen du tissu et μ_{eff} le coefficient d'extinction efficace du tissu. Les NPs d'or, de par leur importante surface d'extinction et leur signature photoacoustique spécifique peuvent être utilisées comme des agents de contraste. Huang et al. proposent une synthèse d'assemblages de NPs d'or sphériques en vésicules biodégradables comme agent de contraste sur des tumeurs de souris mais aussi comme support pour une thérapie par photothermie.¹¹⁵ Song et al. ont développé des nanobâtonnets d'or pour l'imagerie photoacoustique des ganglions lymphatiques de rats, dans la perspective d'un usage clinique pour le cancer du sein.¹¹⁶

4.1.4. Imagerie par fluorescence

L'imagerie par fluorescence a stimulé un grand intérêt car elle offre une capacité de détection sensible. Dans le domaine du proche infrarouge les biomolécules n'absorbent que très peu ce qui limite le bruit de fond par rapport au signal émis, le rendant ainsi détectable à travers plusieurs centimètres de tissu. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment (§2.4. et §3.2.1.) les NPs d'or peuvent émettre un signal par photoluminescence et donc être utilisées pour ce type d'imagerie. Wu et al. montrent également que des nanoclusters Au_{25} de 0,8 nm, synthétisés à partir d'albumine de sérum bovin, sont employés comme agents de contraste pour l'imagerie des tumeurs (Figure 28).¹¹⁷

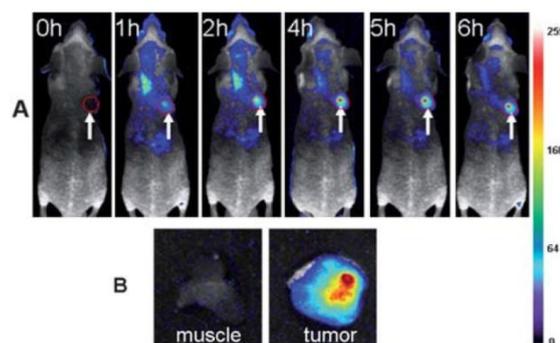


Figure 28. (A) Images par fluorescence in vivo d'une souris portant une tumeur MDA-MB-45 (flèche blanche) après injection par intraveineuse des nanoclusters. (B) Images par fluorescence ex vivo de la tumeur et d'un muscle adjacent de la souris.

4.2. Thérapie et vectorisation

Les NPs d'or font aussi l'objet d'un fort développement pour un usage thérapeutique. Cela fait intervenir deux principales caractéristiques : d'une part les propriétés thérapeutiques intrinsèques du matériau et d'autre part leur fonctionnalisation de surface.

La principale technologie thérapeutique faisant intervenir des NPs d'or est la thérapie photothermique (TPT) parfois combinée aux techniques d'imagerie^{115, 118}). Toujours en développement, ce type de technique appartient à une classe de traitement du cancer que l'on nomme l'hyperthermie. Il s'agit d'un traitement local réalisé à l'aide d'un laser qui, en irradiant une zone tumorale où a été ciblée des NPs d'or, va générer une quantité de chaleur suffisante pour détruire les cellules cancéreuses et les vaisseaux sanguins environnants. Les NPs d'or absorbent la lumière dans la gamme qui correspond à la fréquence de leur résonance plasmon et permettent de convertir l'énergie de la lumière en énergie thermique. Ce processus a été étudié pour des NPs de différentes morphologies mais les nanobâtonnets présentent des caractéristiques très intéressantes. Leur capacité d'absorption dans le proche infrarouge peut être maîtrisée car leur synthèse permet de contrôler le ratio d'aspect, et leur temps de circulation est amélioré par rapport aux nanosphères.¹¹⁹ D'autres NPs ont été développées pour cette application comme les nanocoquilles,¹²⁰ les nanocages¹²¹ ou encore les « nanostars » (NSs).¹²² Il est connu que la principale limitation de cette technique est que les tissus profonds sont irradiés moins efficacement que les tissus de surface. Cependant la récente étude de Espinoza et al. sur des NSs d'or montre que l'efficacité de chauffage *in vivo* dépend également de leur biodistribution, c'est-à-dire leur capacité à être internalisées dans les cellules. Les propriétés optiques mesurées en solutions aqueuses ne permettent pas d'anticiper l'efficacité de chauffage après injections, ce qui est probablement dû au changement drastique de leur comportement hydrodynamique.¹²³ Selon des travaux de ce même groupe, il est possible de coupler la TPT à l'hyperthermie magnétique par l'utilisation de nanomatériaux hybrides or-maghémite.¹²⁴

L'exemple de l'utilisation des NPs d'or pour la TPT illustre la nécessité d'un ciblage de la zone tumorale. Les NPs peuvent agir par ciblage passif des tumeurs par l'effet EPR : les cellules endothéliales des zones tumorales y sont plus perméables, ce qui induit une hyper vascularisation. Ces tissus ont donc un drainage sanguin plus important que les tissus sains, ce qui provoque une accumulation des NPs dans les tumeurs.¹²⁵ De façon plus générale, la vectorisation est un enjeu important de l'usage thérapeutique des NPs d'or. Afin de viser certaines fonctions biologiques, le recours à la (post-)fonctionnalisation de surface par des biomolécules spécifiques devient nécessaire : c'est le ciblage actif. Ainsi Zhang et al. proposent une synthèse de NPs d'or fonctionnalisées par des anticorps capables de cibler

des cellules qui présentent des récepteurs HER2.¹²⁶ C'est avec ce type de stratégie que Song et al. développent des vésicules fonctionnalisées avec des anticorps par couplage carbodiimide pour le transport d'une drogue anticancéreuse.¹²⁷ La paroi de ces vésicules est constituée de NPs d'or habillées par un mélange de polymères amphiphiles et de molécules hydrophobes qui émettent un signal par diffusion Raman exaltée de surface. Ces assemblages permettent non seulement de cibler les cellules cancéreuses mais aussi de suivre par spectroscopie Raman leur internalisation. Après internalisation des NPs par endocytose, le changement de pH disloque les vésicules et permet le relargage de la drogue (Figure 29).

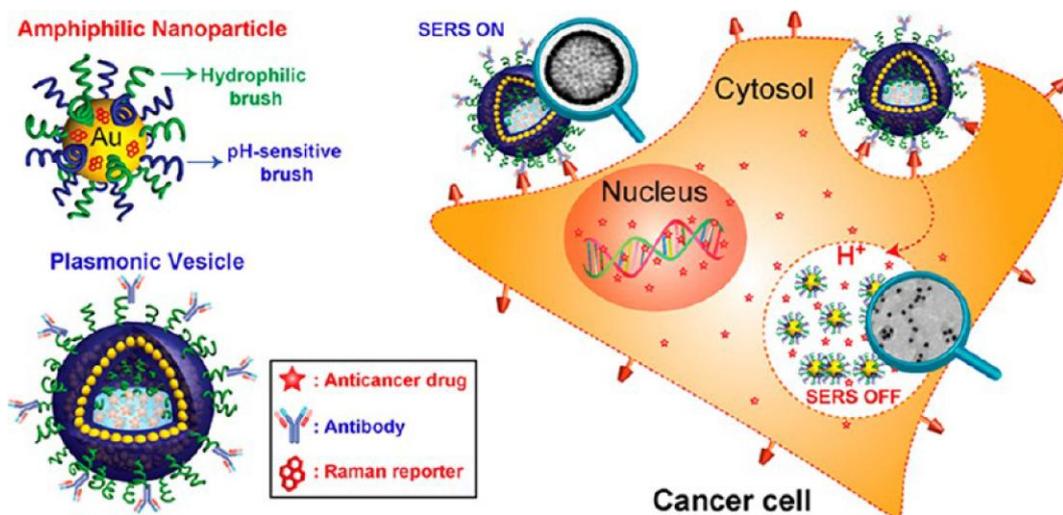


Figure 29. Vésicules des NPs d'or fonctionnalisées pour le transport ciblé d'une drogue anticancer¹²⁷.

Les NPs d'or peuvent avoir une action spécifique contre certaines pathologies, par exemple les travaux de Mukherjee et al. mettent en valeur leur activité anti-angiogénique.¹²⁸ Il montre que les NPs d'or ont une affinité pour les facteurs de croissance liant l'héparine ce qui favorise l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et des fibroblastes. De façon similaire Bhattacharya et al. montrent qu'il est aussi possible d'inhiber la prolifération des cellules du myélome multiple.¹²⁹ Ce type de stratégie en nanomédecine apparaît comme particulièrement porteur : Libutti et al. élaborent en 2010 des NPs fonctionnalisées par des chaînes PEG et un facteur de nécrose tumorale.¹³⁰ Ces nouveaux agents thérapeutiques ont passé la première phase d'essais cliniques sur des patients atteints d'un cancer avancé où la présence de NPs dans les tumeurs a confirmé l'efficacité du ciblage dans des doses non toxiques.

[‡] Les traitements anti-angiogéniques empêchent la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.

Les NPs d'or connaissent également un fort développement en tant que plateformes pour le transport de gènes. Il existe en effet différentes possibilités de fonctionnalisations de surface à l'aide d'acides nucléiques de façon covalente¹³¹ ou non covalente.¹³² Guo et al. proposent par exemple une synthèse avec un habillage de polymères en multi-couches qui permet le relargage contrôlé d'acides nucléiques après internalisation dans les endosomes (Figure 30).¹³³

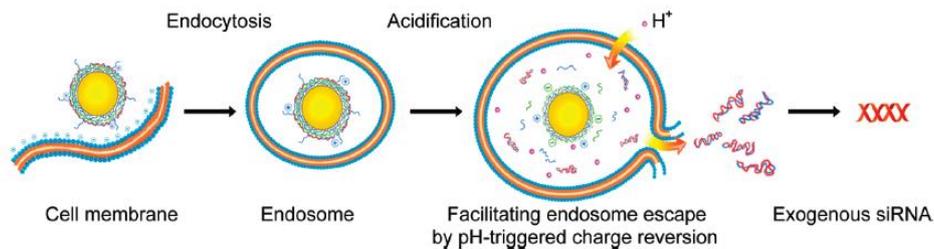


Figure 30. Internalisation des NPs d'or et relargage des acides nucléiques¹³³

4.3. Les biocapteurs

Comme nous l'avons vu précédemment les propriétés optiques des nanoparticules sont dépendantes de la chimie de surface et des interactions interparticules. Une grande variété de techniques analytiques reposent sur l'usage de NPs comme « sondes », de par leurs interactions avec des espèces en solution qui induisent un changement de propriété optique. En dehors du champ d'application biomédical, ce principe est à la base d'un grand nombre de méthodes pour la détection de composés organiques ou de cations métalliques. On appelle biocapteur un dispositif de détection des biomolécules. Jans et al classifient les biocapteurs faisant intervenir des NPs d'or en six catégories de détection :¹³⁴

- par variation de la bande de résonance plasmon
- par variation de la diffusion de la lumière
- par relargage sélectif
- par exaltation du signal Raman
- par exaltation de fluorescence
- par relargage de composé fluorescent

Nous nous intéresserons ici plus spécialement aux détections par variation de la bande de résonance plasmon qui est la méthode la plus directe et qui est similaire aux systèmes de capteurs chimiques évoqués plus haut. Le déplacement de la bande de résonance plasmon peut être induit par deux phénomènes distincts : l'agrégation des

particules et le changement de la constante diélectrique du milieu environnant. C'est en se basant sur ces phénomènes que sont développés les biocapteurs.

La méthode de détection par agrégation peut être illustrée par sa première version, proposée en 1996 par Mirkin et al. pour la détection de brins d'ADN.¹³⁵ Ils proposent d'utiliser deux lots de NPs d'or avec des brins d'ADN, qui diffèrent selon le lot, présentant une fonction thiol terminale pour lier à la surface des NPs. Une fois ces deux lots mélangés, l'ajout d'une séquence ADN complémentaire aux deux types de brins adsorbés sur les NPs provoque un appariement interparticules (Figure 31). Par simple effet de chauffage il est possible de séparer les brins, rendant ainsi le phénomène d'agrégation réversible sur plusieurs cycles.

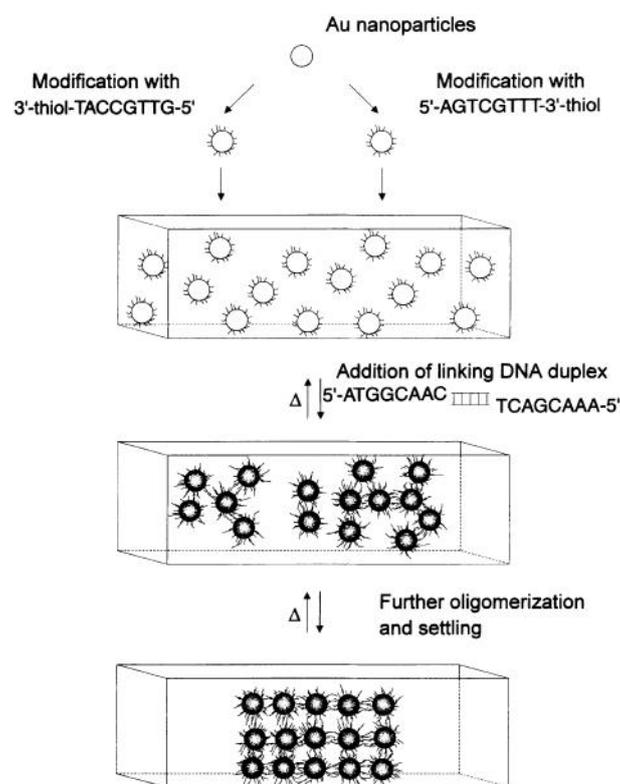


Figure 31. NPs d'or fonctionnalisées par des brin d'ADN comme biocapteurs¹³⁵

Cette stratégie inspirera d'autres auteurs pour le développement de biocapteurs fonctionnalisés par des acides nucléiques.¹³⁶ Nonobstant Englebienne et al. proposent une méthode alternative pour mesurer la constante d'affinité d'un anticorps.¹³⁷ Ce système de biocapteurs ne nécessite pas d'agrégation, la simple liaison de l'anticorps avec son antigène modifie l'indice de réfraction des NPs ce qui induit le déplacement de la bande de résonance plasmon. Les résultats obtenus sont aussi performants que pour des biocapteurs plus onéreux et sophistiqués tels que les systèmes BIAcore.

5. Conclusion

Nous avons exploré au cours de cet état de l'art la thématique des NPs d'or, de leurs propriétés physiques jusqu'aux applications en nanomédecine. Les synthèses des NPs d'or décrites dans la littérature sont diverses par la variété des réactifs et des conditions expérimentales mises en œuvre. Cependant, on peut établir pour un grand nombre d'entre elles un processus général en trois étapes clés :

- une première synthèse (classiquement la synthèse de Turkevich), pour « figer » le corps cristallin des nanocristaux ;
- suivit d'un habillage par échange de ligand, pour introduire des fonctions chimiques spécifiques ;
- et enfin d'une étape de post-fonctionnalisation, dans le but d'attacher un composé d'intérêt pour l'application visée.

Au cours de cette thèse nous développerons des synthèses de NPs d'or fonctionnalisées en une étape, dites « one pot » (Figure 32). Ces synthèses sont réalisées en phase aqueuse, sans réducteurs toxiques et à l'aide de molécules phosphorées : les HMBP. Nous illustrerons les possibilités de post-fonctionnalisation par des réactions de couplages de composés modèles.

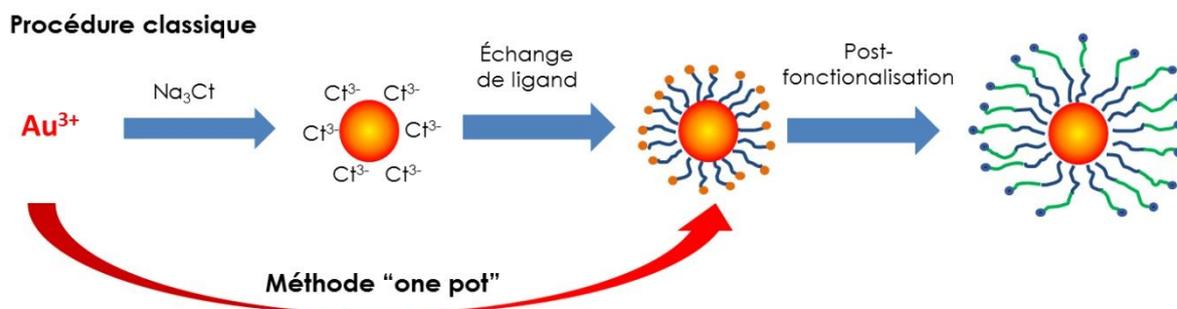


Figure 32. Synthèse « one pot » de NPs d'or fonctionnalisées : une stratégie alternative

Chapitre 2

SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES PAR UN BISPHOSPHONATE ALCÈNE

Chapitre 2 : SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES PAR UN BISPHOSPHONATE ALCÈNE

L'objectif de ce projet est de proposer une synthèse permettant d'obtenir en une étape des nanoparticules d'or de taille contrôlée et présentant en surface des ligands ayant des groupements fonctionnels disponibles pour la post-fonctionnalisation. Nous avons choisi la stratégie de synthèse à l'aide d'un ligand-réducteur : un composé appartenant à la famille des 1-hydroxy-1,1-méthylène bisphosphonate (HMBP). Nous étudierons en particulier la synthèse de NPs d'or avec la base conjuguée de l'acide (1-hydroxy-1-phosphonopent-4-ène)phosphonique (HMBPène - Schéma 5) :

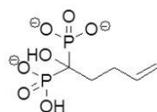


Schéma 5. HMBPène

Nous commencerons d'abord par justifier le choix de ce composé en comparant différents HMBP dans les conditions expérimentales de la synthèse de Turkevich. Ensuite nous proposerons un protocole standard de synthèse par chauffage sous micro-ondes. Nous étudierons dans ces conditions le processus chimique d'oxydoréduction en réalisant différentes caractérisations physico-chimiques. L'influence des paramètres réactionnels sur la taille et la morphologie des NPs ainsi que leur stabilité colloïdale seront étudiés.

1. Introduction

Comme décrit dans le Chapitre 1, le développement des NPs d'or en phase aqueuse pour des applications en sciences biomédicales nécessite la maîtrise de leurs propriétés physicochimiques. Le contrôle de paramètres tels que la morphologie, la stabilité, la fonctionnalisation de surface et la post-fonctionnalisation est un enjeu crucial. La synthèse des NPs avant post-fonctionnalisation (Chapitre 1, §3.2.2.) est réalisée en deux étapes : d'abord la synthèse des NPs puis la modification de l'agent de surface par échange de ligand. Le rôle de la première étape est donc de « figer » la taille et la forme des NPs. Pour des nanosphères, on recourt la plupart du temps à la synthèse de Turkevich.¹³ La deuxième

étape, fait classiquement intervenir un thiol portant un groupement fonctionnel qui reste disponible pour la post-fonctionnalisation après le greffage sur la surface des NPs.^{88a}

Les bisphosphonates sont des molécules connues comme des drogues pour le traitement de maladies associées à la résorption osseuse. C'est par exemple le cas de la maladie de Paget, le myélome, la métastase osseuse ou encore l'ostéoporose.¹³⁸ L'activité biologique des HMBP est induite par leur géométrie tétraédrique, leur capacité à former des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes mais surtout leur pouvoir de chélation des métaux. Nous rentrerons plus en détail sur le rôle thérapeutique des HMBP au Chapitre 5. Cette famille de molécules présente donc des caractéristiques intéressantes pour jouer le rôle de ligand de coordination des NPs d'or.

2. Synthèse de NPs d'or

2.1. Synthèse de Turkevich

Au cours de ce chapitre nous prendrons comme méthode de référence la synthèse des NPs Au@Ct. Le protocole de Turkevich s'effectue en deux étapes : une solution aqueuse d'acide chloraurique diluée ($[HAuCl_4] = 0,25 \text{ mM}$) est portée à ébullition puis la solution de citrate de sodium (quatre équivalents par rapport à l'or) est ajoutée dans un deuxième temps (Figure 33 A). Les NPs obtenues sont sphériques (Figure 33 B) avec un diamètre de $14,9 \pm 1,3 \text{ nm}$ (Figure 33 C).

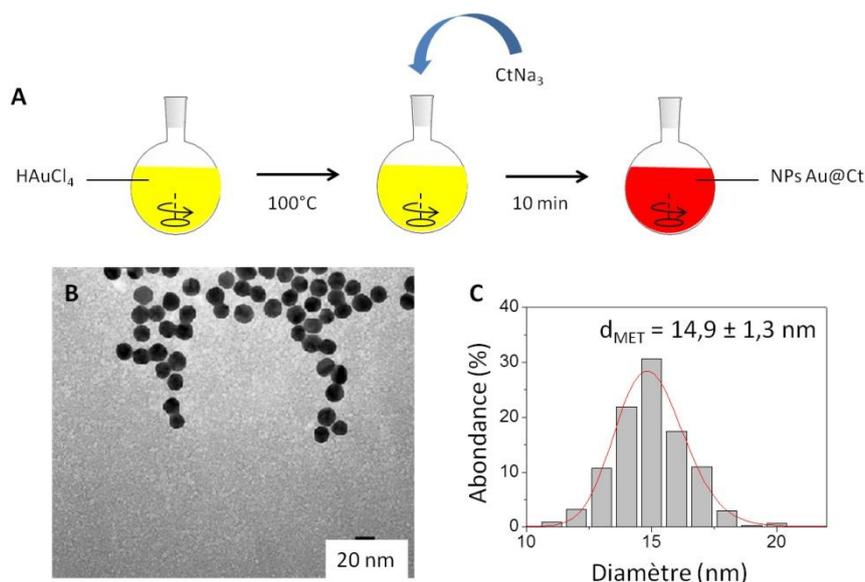


Figure 33. Synthèse des NPs Au@Ct selon le protocole de Turkevich (A), clichés par MET (B) et distribution de taille (C).

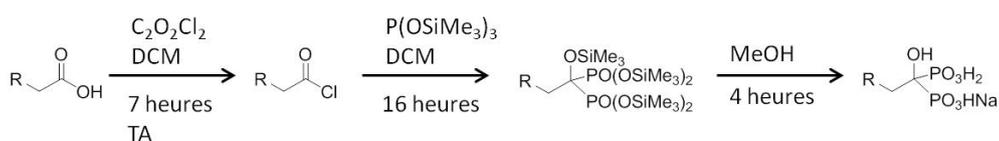
2.2. Synthèse de NPs d'or avec les HMBP

La stratégie que nous souhaitons mettre en œuvre est la suivante : développer des synthèses de NPs d'or avec des HMBP portant des insaturations en bout de chaîne. Cette classe de molécule a déjà été étudiée comme modèle pour la post-fonctionnalisation par chimie « Click » de nanoplateformes inorganiques.^{98c}

2.2.1. Synthèse générale des HMBP

Les HMBP sont synthétisés à partir d'acides carboxyliques dont la chaîne alkyl reste intacte au cours des réactions (Schéma 6). En ajoutant du chlorure d'oxalyle on forme le dérivé d'acide, hautement réactif de par son caractère électrophile. Ce composé est alors mélangé à froid au tris(triméthylsilyl)phosphite ($P(\text{OSiMe}_3)_3$) pour former le HMBP silylé que l'on hydrolyse dans le méthanol. Cette dernière étape nécessite aussi de travailler à froid pour éviter une réaction de transestérification. Le produit obtenu est placé à $\text{pH} = 2,3$ puis précipité dans un mélange eau/méthanol 1:9.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à trois HMBP, qui diffèrent par leur fonction terminale (alcène ou alcyne) ou leur longueur de chaîne : l'acide (1-hydroxy-1-phosphonopent-4-èn)phosphonique (Schéma 6 A), l'acide (1-hydroxy-1-phosphonopent-4-yn)phosphonique (Schéma 6 B) et l'acide (1-hydroxy-1-phosphonohept-6-yn)phosphonique (Schéma 6 C).



Composé	R	Rendement isolé
A (HMBPène)		70 %
B		82 %
C		72 %

Schéma 6. Voie de synthèse des HMBP

Certains dérivés d'acide, comme le chlorure de pent-4-ène, sont commerciaux et ils peuvent être utilisés directement pour la synthèse des HMBP. L'addition du $P(OSiMe_3)_3$ sur le dérivé d'acide est une réaction au mécanisme similaire à celui décrit par Arbusow et al. en 1964 (Schéma 7).¹³⁹ Le phosphore s'additionne une première fois au dérivé d'acide pour former un intermédiaire α -cétophosphonate, puis une seconde fois pour former le bisphosphonate.

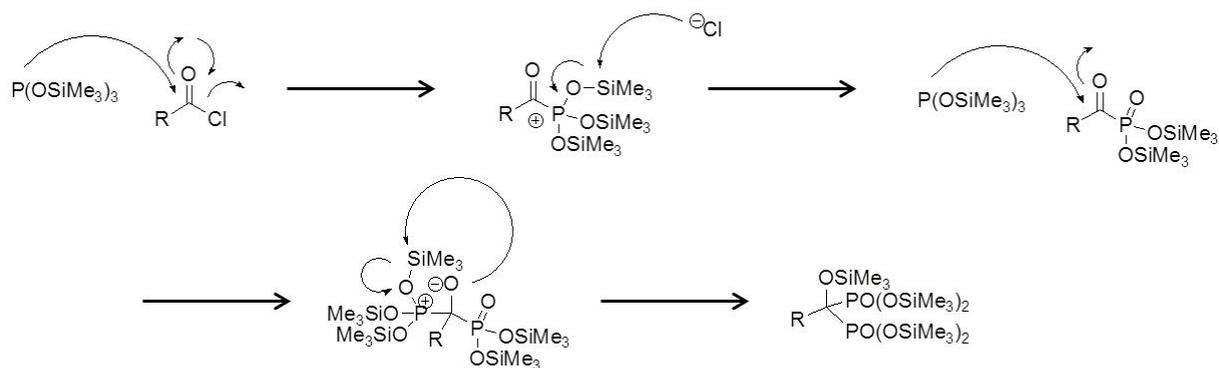


Schéma 7. Mécanisme de la synthèse du HMBP silylé.

2.2.2. Utilisation des HMBP pour la synthèse de NPs d'or

En s'inspirant des conditions réactionnelles de la synthèse de Turkevich, nous avons mis au point un protocole pour l'obtention des NPs Au@HMBP pour les trois HMBP précédemment cités. Des solutions de HMBP à pH = 8,2 sont préparées pour que l'effet tampon soit similaire à celui des solutions d'ions citrates. Le mode opératoire suivi est ensuite identique à celui de la réaction de Turkevich.[§] Les clichés par MET des NPs obtenues montrent que la structure du HMBP influence leur morphologie et leur dispersion en taille (Figure 34). En effet seul le HMBPène permet de synthétiser des nanosphères de taille homogène contrairement aux HMBP-alcyne. Les complexes d'or étant couramment utilisés pour des réactions de couplage sur les alcynes,¹⁴⁰ il est probable que la triple liaison $C\equiv C$ entre dans la sphère de coordination de l'or et modifie ses propriétés oxydoréductrices. Ces premiers résultats nous incitent donc à développer les synthèses de NPs d'or à l'aide du HMBPène pour mieux contrôler la morphologie des NPs.

[§] Quatre équivalents de réducteur sont ajoutés sur une solution aqueuse de $[HAuCl_4]$ à 0,25 mM préalablement portée à ébullition.

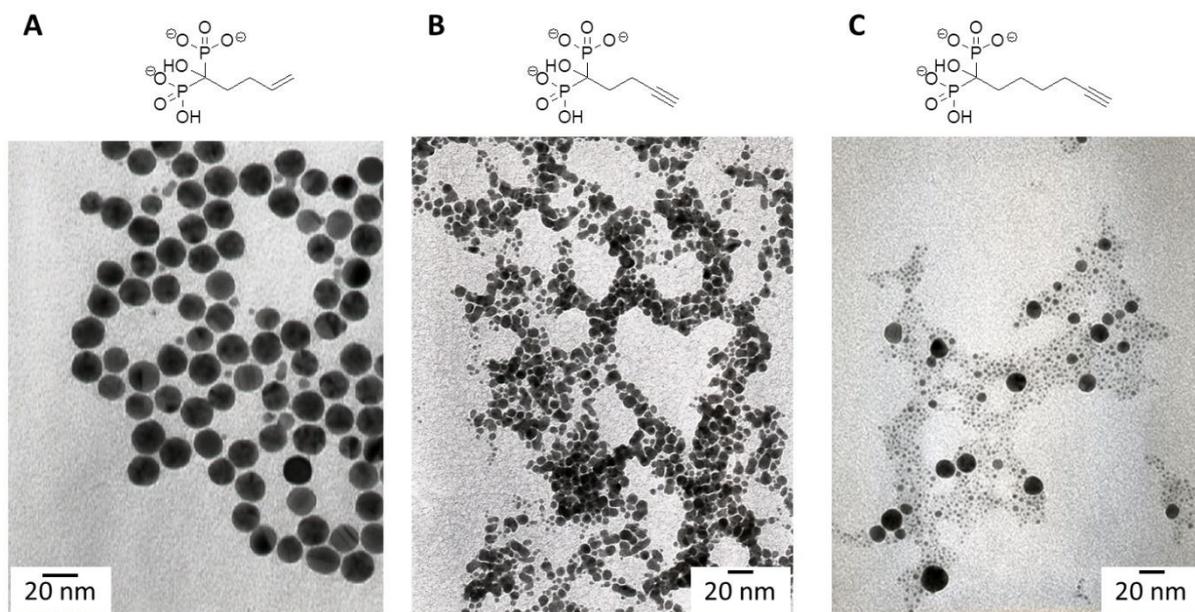


Figure 34. Clichés par MET des NPs obtenues pour différents HMBP.

3. Synthèse par chauffage micro-ondes

S'il est évident que les propriétés des NPs d'or sont intrinsèquement liées aux conditions expérimentales, nous nous intéresserons ici plus précisément aux conditions de chauffage. L'utilisation de la technologie micro-ondes a révélé des atouts considérables pour la synthèse chimique, et plus récemment pour la conception de matériaux de l'échelle mésométrique à nanométrique.¹⁴¹ Les techniques de chauffages classiques reposent sur le transfert de chaleur par conduction et convection, ce qui produit une répartition volumique de la chaleur hétérogène. L'absorption des micro-ondes par la phase liquide est un processus homogène qui fait intervenir deux phénomènes : la polarisation dipolaire et la conduction ionique. La polarisation dipolaire est la rotation des molécules polaires sur elles-mêmes pour s'aligner sur le champ électrique alternatif de l'appareil. La conduction ionique produit l'oscillation des ions en interaction avec les ondes et produit des collisions entre molécules. Ces deux phénomènes induisent une perte d'énergie sous forme de chaleur que l'on quantifie pour les solvants par le paramètre $\tan \delta$ qui dépend principalement de leur constante diélectrique. Par conséquent les synthèses en phase aqueuse se prêtent particulièrement bien à ce type de chauffage car la constante diélectrique de l'eau est supérieure à la plupart des solvants organiques apolaires.¹⁴² L'amélioration du contrôle de la taille et de la dispersité de NPs de métaux nobles qu'offre la technologie micro-ondes a déjà été étudiée par Dahal et al. dans l'éthylène glycol.¹⁴³

3.1. Synthèse des NPs Au@Ct sous micro-ondes

Dans un premier temps, nous avons réalisé la synthèse de NPs Au@Ct avec ce mode de chauffage afin de comparer les dispersions obtenues par rapport au protocole standard de Turkevich. En plus de changer la nature du transfert de chaleur, la méthode micro-ondes implique d'utiliser un appareil spécifique. Les réactifs doivent être mélangés au préalable dans le tube scellé avant de démarrer le chauffage. On programme une augmentation de la température la plus rapide possible avec une agitation constante pour une durée équivalente à la méthode de Turkevich (10 min). La procédure décrite par ce dernier indique que la solution d'acide chloraurique doit être portée à ébullition avant d'ajouter le citrate de sodium,¹³ et Wuihschick et al. ont montré que cette étape est déterminante.³² En effet les échanges de ligands dans la sphère de coordination du complexe d'Au(III) débutent au moment de l'ajout du citrate, et le nombre de particules dépend fortement de la quantité de $[\text{AuCl}_4]^-$ d'abord réduite puis hydrolysée en $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$.

Après 10 min de chauffage à 100°C on obtient une dispersion rouge (Figure 35 A) de NPs sphériques (Figure 35 B) avec un diamètre de $14,1 \pm 1,1$ nm (Figure 35 C). Ce mode opératoire est donc adapté pour la synthèse contrôlée de NPs Au@Ct dans des concentrations et des conditions de pH analogues à celles des Turkevich et al.

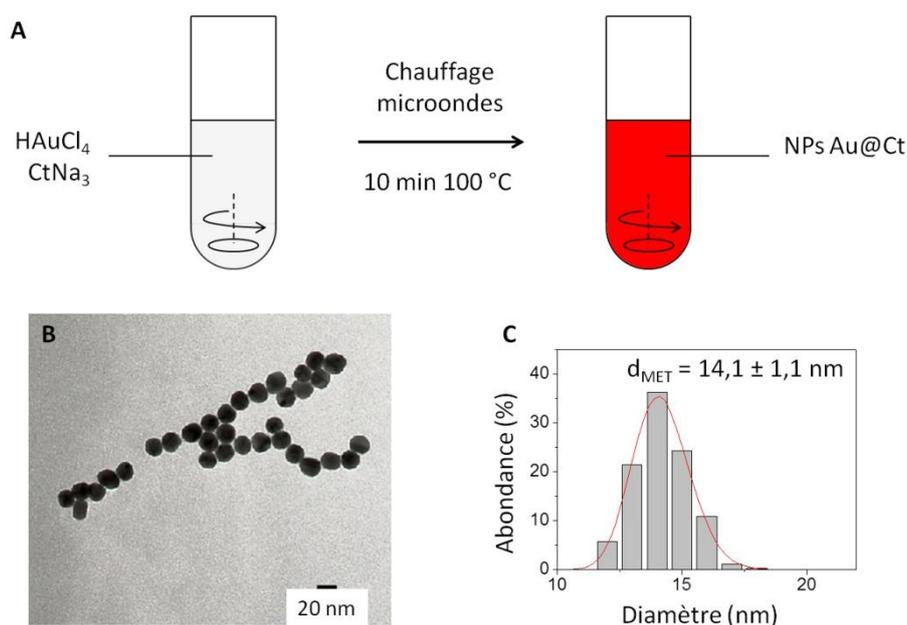


Figure 35. Synthèse des NPs Au@Ct selon le protocole de Turkevich et par chauffage micro-ondes (A), clichés par MET (B) et distribution de taille (C).

Les expériences menées en parallèle sur les mêmes quantités de solvant et de réactifs montrent que quelque soit la méthode de chauffage les caractéristiques des NPs obtenues sont très semblables (Figure 33 et 35). On observe sur les clichés par MET que les NPs ont une morphologie sphérique avec des distributions de taille similaires. De même les spectres d'absorption en UV-Vis se superposent ce qui confirme les observations par MET (Figure 36).

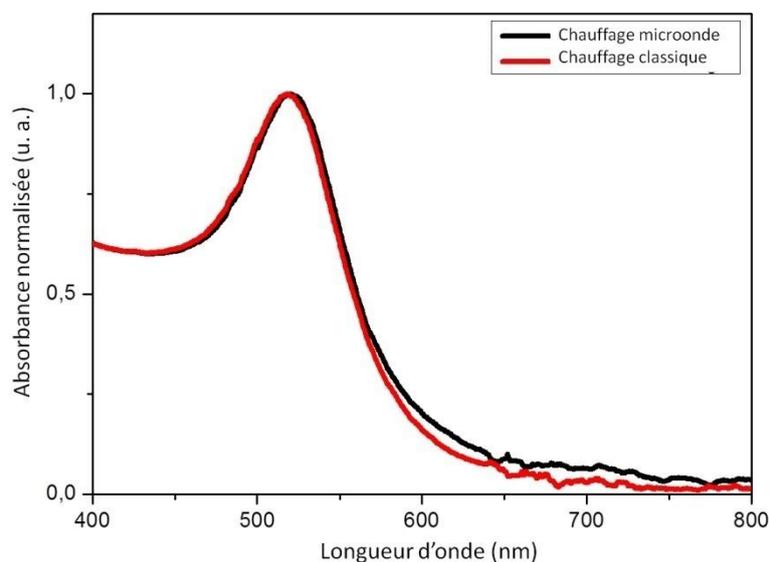


Figure 36. Comparaison des spectres d'absorption UV-Vis des NPs Au@Ct pour différents modes de chauffages.

On peut donc conclure que le chauffage micro-ondes est suffisamment efficace pour compenser l'hydrolyse du complexe précurseur par rapport au chauffage classique, tel qu'évoqué précédemment. Dans la suite de l'étude, nous utiliserons donc cette méthode de chauffage, qui permet également un contrôle de paramètres tels que la vitesse d'agitation, la puissance du chauffage et une plus grande souplesse dans la modulation des conditions en temps réel.

3.2. Synthèse des NPS Au@HMBPène sous micro-ondes

La synthèse des NPs Au@HMBPène sous micro-ondes est réalisée selon le protocole suivant : 4,4 équivalents de HMBPène sont ajoutés à la solution aqueuse d'acide chloraurique de concentration $[HAuCl_4] = 0,25 \text{ mM}$ (Figure 37). Le chauffage micro-ondes est programmé de façon identique à ce que nous avons décrit au paragraphe §3.1.

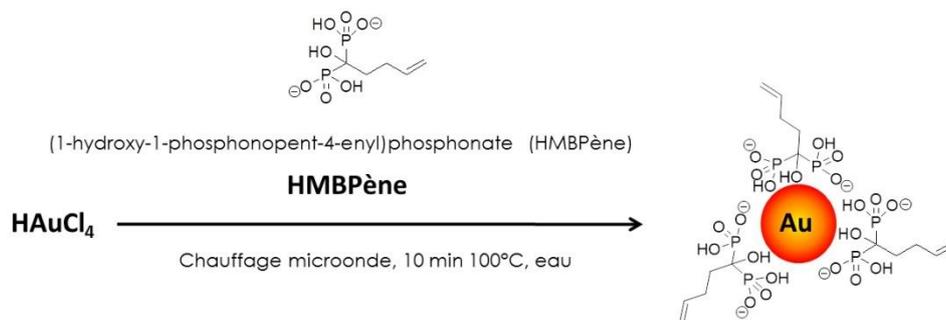


Figure 37. Synthèse par voie micro-ondes de NPs Au@HMBPène

On obtient ainsi une solution rouge caractéristique de NPs sphériques, comme le montre les images en MET (Figure 38 A). Le diamètre moyen est de $14,4 \pm 1,0$ nm (Figure 38 B) et le maximum d'absorption à 516 nm (Figure 38 C) de façon analogue aux NPs Au@Ct.

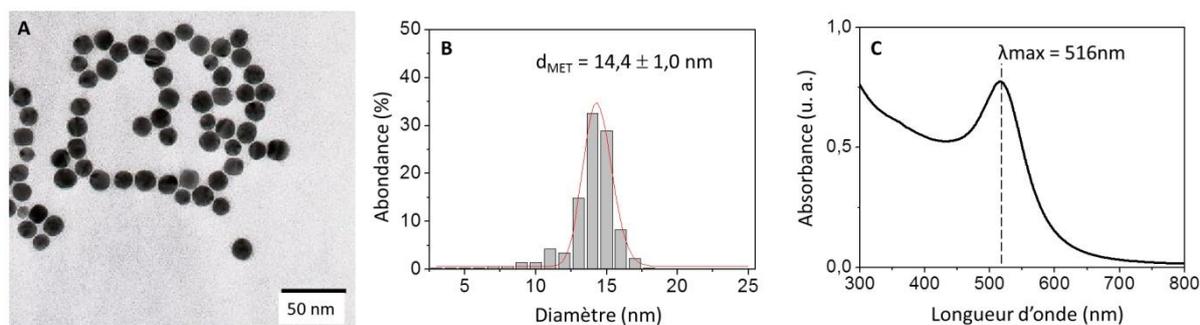


Figure 38. Caractéristiques des NPs Au@HMBPène obtenues par le protocole sous micro-ondes : photographie par MET (A), distribution de taille (B) et spectre UV-Vis (C)

4. Processus chimique d'oxydoréduction

Après une synthèse dans les conditions standards, les NPs sont isolées et le filtrat est lyophilisé puis analysé par RMN. Le spectre du phosphore 31 montre d'importantes modifications par rapport au HMBPène de départ (Figure 39 A). Bien que le pic du HMBPène à 18 ppm reste le plus intense, nous observons l'apparition de signaux, notamment dans la région de 0 à 5 ppm, qui correspondent à des composés de type phosphate. Les spectres proton 1 et carbone 13 (Figure 39 B et C) sont comparativement peu modifiés et montrent clairement la conservation de la double liaison sur la chaîne latérale.

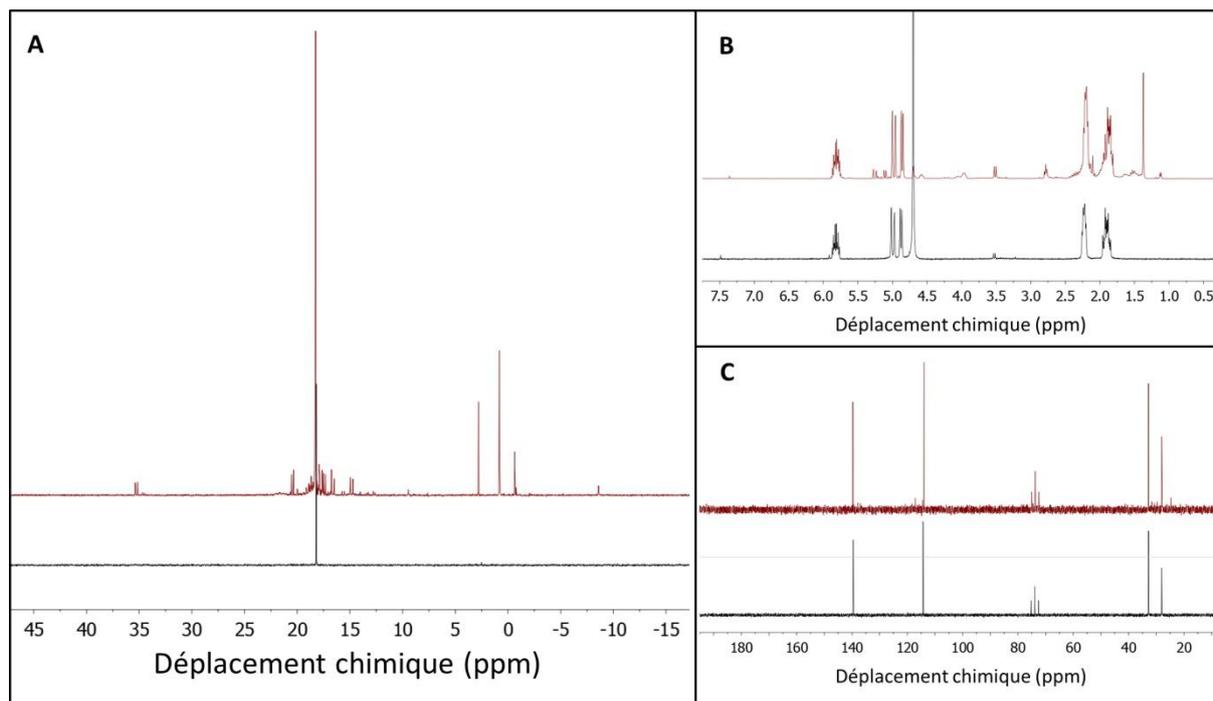


Figure 39. Spectres RMN ^{31}P (A) ^1H (B) et ^{13}C (C) du surnageant (rouge) après synthèse de NPs Au@HMBPène sous micro-ondes et du HMBPène (noir)

Ces résultats indiquent que le phénomène d'oxydation du HMBPène intervient plus précisément au niveau des groupements phosphonates. Turanen et al. ont montré que la dégradation des liaisons P-C-P pouvait intervenir en conditions douces générant des sous-produits tels que des α -cétophosphonates, des phosphates, des carboxylates ou encore des phosphites.¹⁴⁴ L'apparition d'un nombre important de pics sur le spectre du phosphore entre 0 et 5 ppm suggère que la dégradation oxydante du HMBPène est un phénomène complexe qui forme une grande variété de sous-produits. Pour ce qui est des composés dérivés de l'acide phosphorique, on peut raisonnablement poser l'hypothèse qu'ils résultent de la dégradation du HMBP en α -cétophosphonates (Schéma 8).

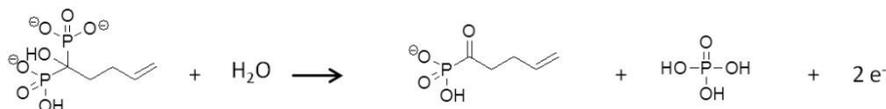
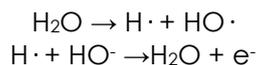


Schéma 8. Hypothèse de dégradation du HMBPène en α -cétophosphonates

Selon une récente revue de Goura et al. il n'existe pas d'étude sur les complexes or – phosphonates, bien que ces composés soient des ligands connus pour d'autre métaux du

groupe 11 comme le cuivre ou l'argent.¹⁴⁵ Il est donc difficile de se prononcer, sur la structure des complexes intermédiaires d'Au(I).

Benyettou et al. proposent dans leur études¹⁰⁰ de rationaliser la réduction des cations d'argent en présence d'alendronate en NPs sous chauffage micro-ondes en reprenant le mécanisme de Vaks.¹⁴⁶ Un phénomène de dissociation radicalaire de l'eau, sous l'effet des micro-ondes, conduit en milieu basique à la formation « d' électrons solvatés » qui induisent la réduction du complexe Ag⁺-Alendronate.



Bien que nous ne puissions exclure que ce phénomène intervient potentiellement dans notre synthèse micro-ondes, le simple fait que le chauffage classique permet de former des NPs d'or (§2.2.2) montre que le HMBPène participe au mécanisme d'oxydoréduction.

5. Caractérisations physicochimiques du nanomatériau

5.1. Propriétés hydrodynamiques

Les NPs en solution ont été caractérisées par DLS (Annexe 2), le diamètre hydrodynamique est de $16,5 \pm 5,2$ nm (Z_{av} Figure 40 A), ce qui est suffisamment proche de la taille cristalline mesurée par MET. Ceci indique l'absence d'agrégats de particules. Les NPs présentent un potentiel ζ de $-38,3 \pm 12,8$ mV (Figure 40 B). Ce potentiel négatif indique que le HMBPène, adsorbé en surface, apporte des charges négatives via ses groupements phosphonates. Ceci permet une stabilisation des NPs par répulsions électrostatiques. Le diamètre hydrodynamique mesuré sur un temps plus long reste constant jusqu'à au moins deux semaines après synthèse : les NPs peuvent donc se conserver à 4°C et à l'abri de la lumière sans modification de leurs propriétés (Figure 40 C).

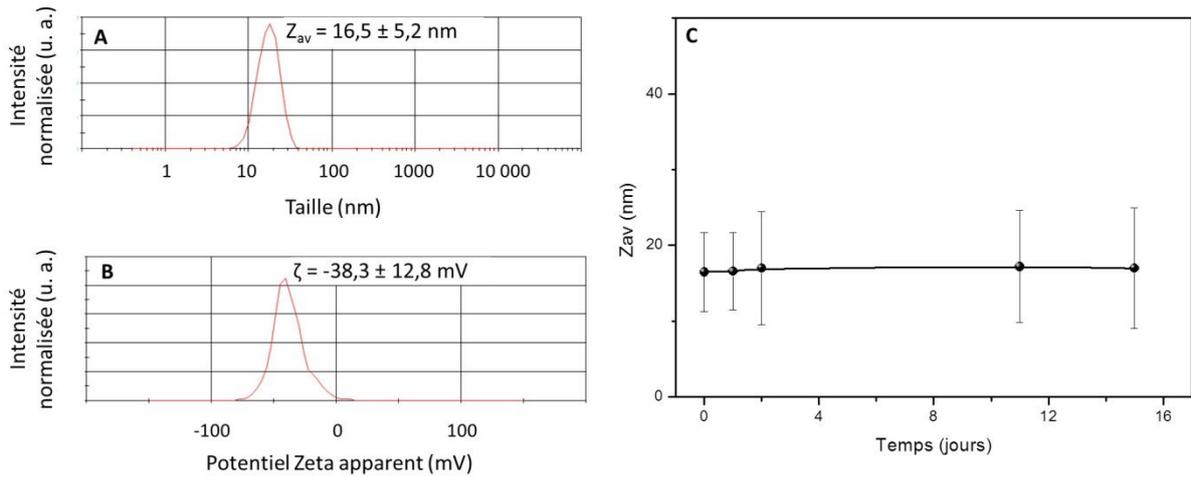


Figure 40. Mesures du diamètre hydrodynamique (A), du potentiel ζ (B) et suivi de la stabilité au cours du temps des NPs Au@HMBPène obtenues par le protocole sous micro-ondes (C)

5.2. Caractérisations de surface

5.2.1. Analyse thermogravimétrique

Les molécules résiduelles non adsorbées après synthèses sont éliminées par des ultrafiltrations successives. L'analyse thermogravimétrique (ATG) nécessite des quantités de l'ordre de quelques milligrammes de NPs. La synthèse des NPs a donc été réalisée en utilisant une concentration de HAuCl_4 de 1 mM au lieu de 0,25 mM, toutes les autres conditions restant identiques (paragraphe §6.2). La Figure 41 montre la perte de masse observée.

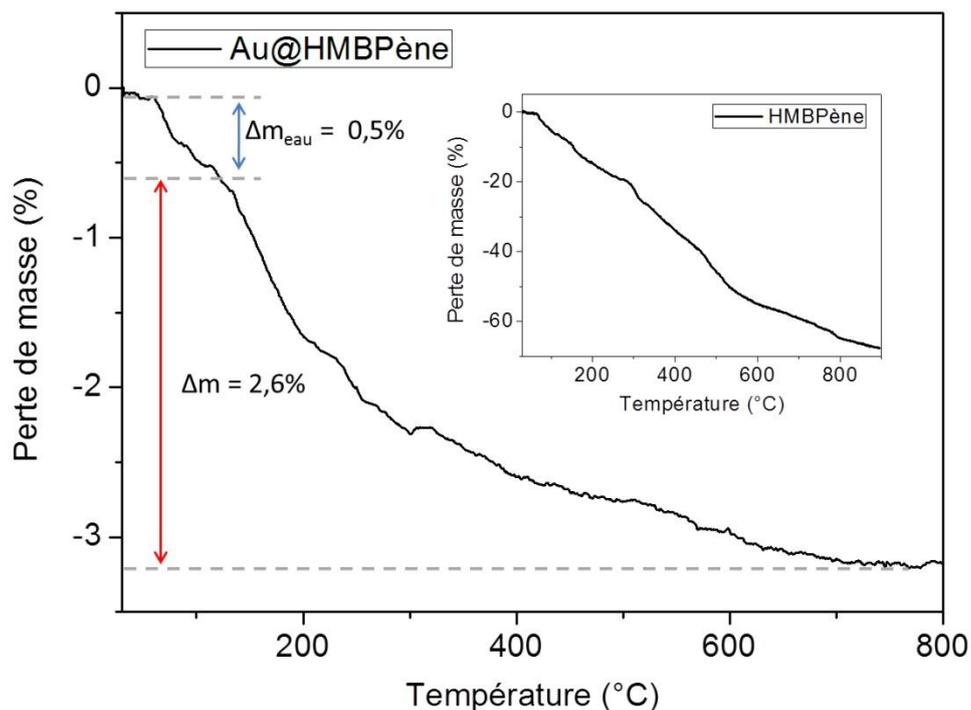


Figure 41. ATG de 8,74 mg de poudre de NPs Au@HMBPène de $13,7 \pm 1,4$ nm et HMBPène seul (courbe insérée)

Cette perte de masse correspond à la quantité de HMBPène pour une masse totale de 8,74 mg de NPs Au@HMBPène de 13,7 nm. On dénombre environ 2 000 molécules par NP soit un taux de couverture de 3,4 HMBPène/nm² (Annexe 4). Cette estimation est du même ordre de grandeur que ce qui a été obtenu pour les NPs de maghémite de taille similaire habillées par des HMBP.^{98b} Ce résultat suggère que bien que les propriétés physiques et de surface entre les oxydes métalliques et les métaux nobles soient différentes, on constate dans les deux cas une structuration des HMBP en monocouche.

5.2.2. Analyses par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier

Nous avons procédé à des analyses par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF) afin de comparer l'habillage des NPs Au@HMBPène et le HMBPène seul (Figure 42). On retrouve sur le spectre des NPs les bandes de vibrations qui correspondent à la chaîne carbonée du HMBPène tel que les élongations des liaisons C-H à 2920 cm⁻¹ et 2850 cm⁻¹, des liaisons C=C à 1640 cm⁻¹ et les cisaillements des liaisons C-H à 1450 cm⁻¹. On remarque que la bande de vibration à 1390 cm⁻¹ correspondant aux déformations des CH₂

est amplifiée à la surface des NPs tandis qu'elle est de très faible intensité sur le spectre du HMBPène seul. La plus grande variation observée entre le spectre de la molécule seule et des NPs se situe au niveau des bandes de vibrations des P-O et P=O entre 1250 cm^{-1} et 850 cm^{-1} . Ainsi pour les NPs Au@HMBPène une seule bande large est observée.

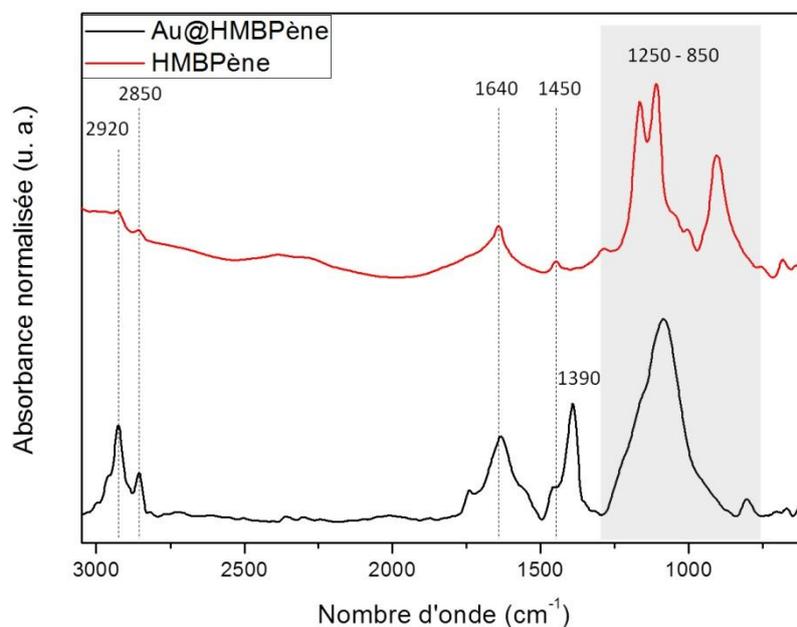


Figure 42. Comparaison des spectres IRFT des NPs Au@HPBPène versus HMBPène (molécule seule)

Ce type de modification des bandes de vibration des P-O et P=O s'observe également sur les NPs de maghémite $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @HMBP et témoigne d'une chélation de la surface de l'oxyde métallique par les groupements phosphonates.^{97c, 147}

Pour ce qui est des NPs d'or, la plupart des travaux cités précédemment ne considèrent pas le groupement phosphonate comme agent de chélation de la surface^{59a, 99}. De plus, les travaux de Li et al. proposent une synthèse de NPs d'or à l'aide d'un phosphonate dont la double liaison C=C s'oxyderait en liaison C-Au.^{59b} Cependant l'étude de Benyettou et al. sur les NPs Ag@Alendronate valide le modèle de chélation par les groupements phosphonates en confirmant que cela implique bien une modification des bandes de vibrations. Cette observation est validée par modélisation des spectres IRTF à l'aide de calculs par DFT.¹⁰⁰ Il est donc cohérent d'envisager ce mode d'interaction pour la chimisorption des HMBP sur les métaux nobles. Il est à noter que dans les autres travaux évoqués précédemment aucune étude comparative de spectrométrie IRTF entre la molécule seule et la molécule adsorbée n'a été réalisée.

5.2.3. Analyses par spectroscopie par photoélectrons X

Afin de déterminer la composition chimique des échantillons et d'étudier l'énergie de liaison des électrons de chaque atome, des expériences par spectroscopie par photoélectrons X (XPS) ont été réalisées sur des poudres.** L'étude a porté sur les électrons 2p du phosphore, 4f de l'or et 1s du carbone afin de comparer nos données à la littérature.

La figure 43 présente l'ensemble des résultats. On observe tout d'abord que le pic des électrons 2p du phosphore est présent sur notre échantillon. Ceci confirme la présence d'un composé phosphoré à la surface des NPs. Les déconvolutions des contributions de spin 1/2 et 3/2 ont des énergies et des aires semblables à la molécule seule, mais les largeurs à mi-hauteur (LMH) sont plus faibles (Figure 43 A). Ce résultat est en accord avec ceux de Basly et al.¹⁴⁸ et indique que l'état d'oxydation du phosphore correspond à celui des phosphonates dont l'environnement électronique est modifié par leur adsorption sur la surface d'or.

Les pics des électrons 4f de l'or témoignent de deux états d'oxydation en surface des NPs par la présence d'Au(I) et d'Au(0) (Figure 43 B). La LMH des pics de l'Au(I) est plus importante de 0,7-0,8 eV que celle de pics de l'Au(0), ce qui est tout fait comparable aux valeurs mesurées par Park pour les NPs Au@Ct.²³ Nous pouvons ainsi déduire la nature ionique de la liaison entre le métal et le ligand.

Le pic des électrons 1s du carbone est localisé à 286,7 eV (Figure 43 C). Cette position est classiquement attribuée aux carbones engagés dans des liaisons C-O,¹⁴⁹ donc dans notre cas il correspond à celui portant le groupement hydroxyle. Ainsi, contrairement aux travaux de Li et al. le pic attribué à la formation d'une liaison C-Au au cours du processus d'oxydoréduction et localisé à une énergie de 289 eV n'est pas observé.^{59b}

** L'ensemble des travaux d'analyse XPS ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du professeur Nadine Millot au sein du laboratoire Institut Carnot De Bourgogne de l'Université de Bourgogne.

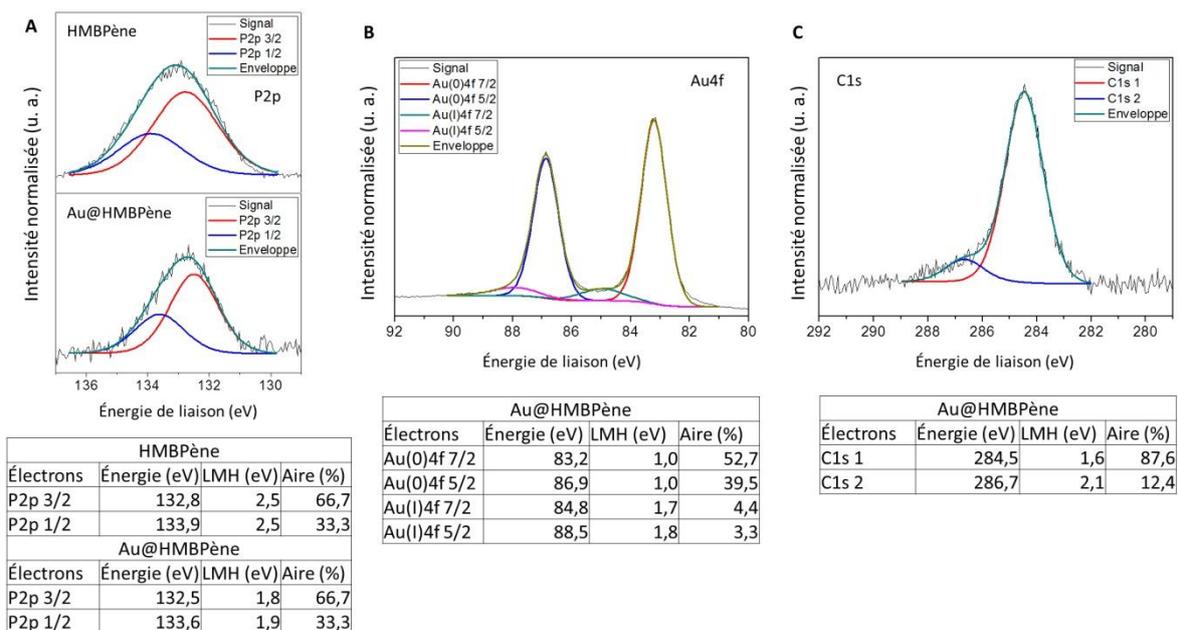


Figure 43. Comparaison des énergies de liaison des électrons P2p du HMBPène libre et chimisorbé sur les NPs d'or (A). Énergies de liaison des électrons Au4f des NPs Au@HMBPène (B). Énergies de liaison des électrons C1s du HMBPène chimisorbé sur les NPs d'or(C).

5.2.4. Conclusion sur le modèle de chélation

L'ensemble des données recueillies en ATG, IRTF et XPS sont cohérentes et indiquent l'adsorption du HMBPène en monocouche sur la surface des NPs d'or via une liaison ionique avec les groupements phosphonates (Figure 44). La double liaison C=C reste donc disponible pour une étape de post-fonctionnalisation.

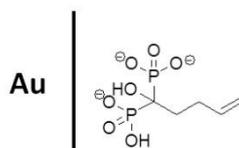


Figure 44. Modèle de chélation du HMBPène sur la surface d'une NP d'or

La contradiction avec le modèle de Li et al. se justifie par les différences observées sur les analyses XPS comme nous l'avons évoqué précédemment. Mais elle se justifie également par les caractérisations par IRTF où dans son cas il n'observe pas de différence entre la molécule seule et l'habillage des NPs au niveau des bandes de vibration des phosphonates.

Les études de Ross et al.^{99b-d}, Cole et al.^{99a} et Drogat et al.^{59a} mettent en jeu des composés HMBP portant une fonction amine et ils postulent que la liaison sur la surface des NPs se fait par l'atome d'azote. Contrairement au modèle de chélation proposé par Benyettou et al.,¹⁰⁰ cette hypothèse n'est pas confirmée par une étude comparative en spectroscopie IRTF.

6. Influence des paramètres réactionnels

6.1. Influence du pH réactionnel

Comme discuté au chapitre précédent pour la synthèse de Turkevich, le pH réactionnel influence la cinétique de formation des NPs. Nous proposons ici d'étudier de façon analogue aux travaux de Ji et al.²⁵ l'effet du pH sur la taille finale des NPs, en procédant selon deux méthodes différentes :

- Par la variation du ratio HMBPène/HAuCl₄ avec une solution de HMBPène précurseur à pH ajusté à 8,2.
- Par la variation du pH de la solution de HMBPène précurseur pour un ratio HMBPène/HAuCl₄ ajusté à R = 4,4.

Pour ces deux études, on utilisera une concentration en or de 0,25 mM identique à celle employée dans le mode opératoire décrit au paragraphe §3.3.

6.1.1. Variation du ratio réducteur-or

Le protocole de synthèse a donc été répété en modifiant pour chaque essai la concentration en HMBPène de la solution précurseur. Les NPs obtenues conservent leur forme sphérique et ont des tailles qui varient entre $13,1 \pm 1,0$ nm et $20,2 \pm 2,9$ nm pour des ratios R = HMBPène/HAuCl₄ allant de 2 à 20 correspondant au cas où le réducteur est donc toujours en excès (Figure 45).

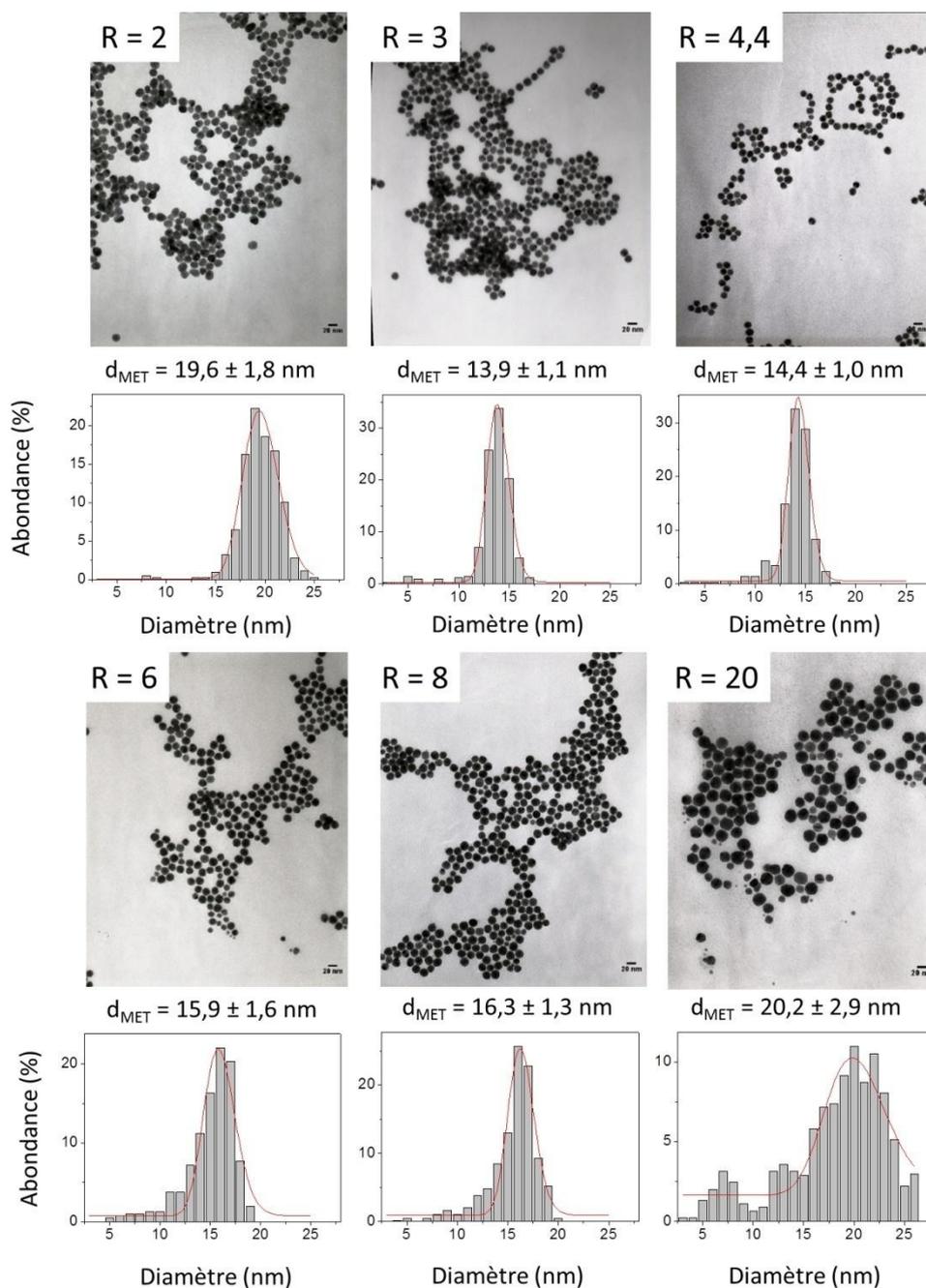


Figure 45. Images MET et distribution de taille des NPs Au@HMBPène synthétisées pour différents ratios $R = \text{HAuCl}_4/\text{HMBPène}$

L'évolution de la taille finale des NPs Au@HMBPène en fonction du ratio est présentée (Figure 46 A). Une diminution de la taille est d'abord observée pour les ratios inférieurs à 4 puis une augmentation pour les ratios supérieurs. Pour chaque expérience le pH a été mesuré en fin de réaction (Figure 46 B). Le comportement en fonction du rapport R est très similaire à celui décrit dans la littérature pour la synthèse de Turkevich (Figure 46 A)^{25, 32-33} : le pH

augmente pour les ratios inférieurs à 8 puis un palier autour de pH = 8 est obtenu. Ceci signifie que le HMBPène tamponne le milieu réactionnel comme cela a été démontré pour les ions citrates, bien que les valeurs des constantes d'acidité du HMBPène ($pK_a = 0,8 / 2,3 / 6,3 / 10,9$) couvrent une plus large gamme que celle de l'acide citrique ($pK_a = 3,2 / 6,8 / 8,4$).

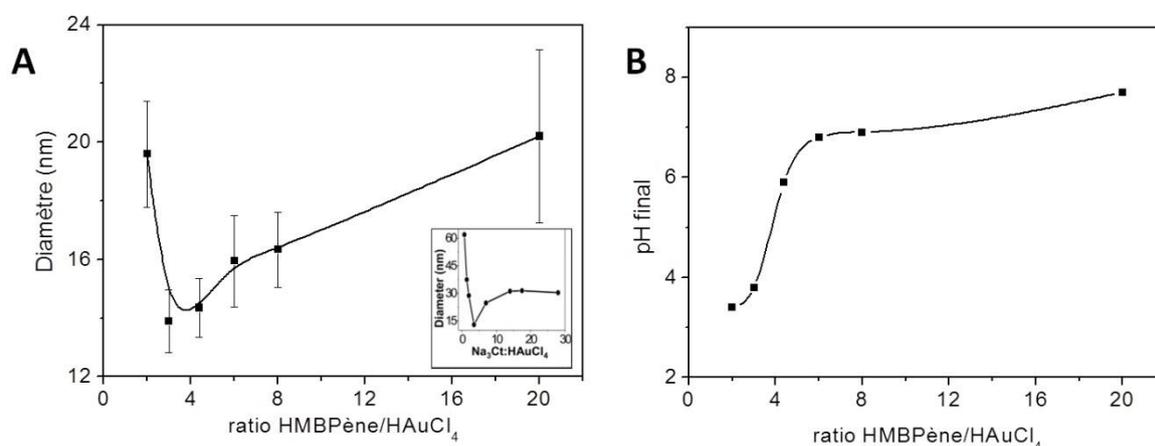


Figure 46. Évolution de la taille des NPs Au@HMBPène pour différents ratios HAuCl₄/HMBPène et courbe de Ji et al.²⁵ en insertion (A). Évolution du pH final pour différents ratios HAuCl₄/HMBPène (B)

Il est à noter que les expériences conduites pour des ratios $R < 1$ où le HMBPène n'est plus en excès conduit à une solution grise après 10 min de chauffage ($R = 0,7$), et après quelques heures à température ambiante les NPs précipitent.

6.1.2. Variation du pH initial du réducteur

Le pH réactionnel peut être également modulé en changeant simplement le pH de la solution précurseur de HMBPène. La figure 47 montre l'évolution de la taille et distribution de taille lorsque la synthèse est réalisée avec un ratio $R = 4,4$ et en modulant le pH initial du réducteur. La forme sphérique des NPs est conservée, avec des tailles qui varient entre $13,5 \pm 0,9$ nm et $18,3 \pm 1,8$ nm sur une échelle de pH entre 4,2 et 11,8.

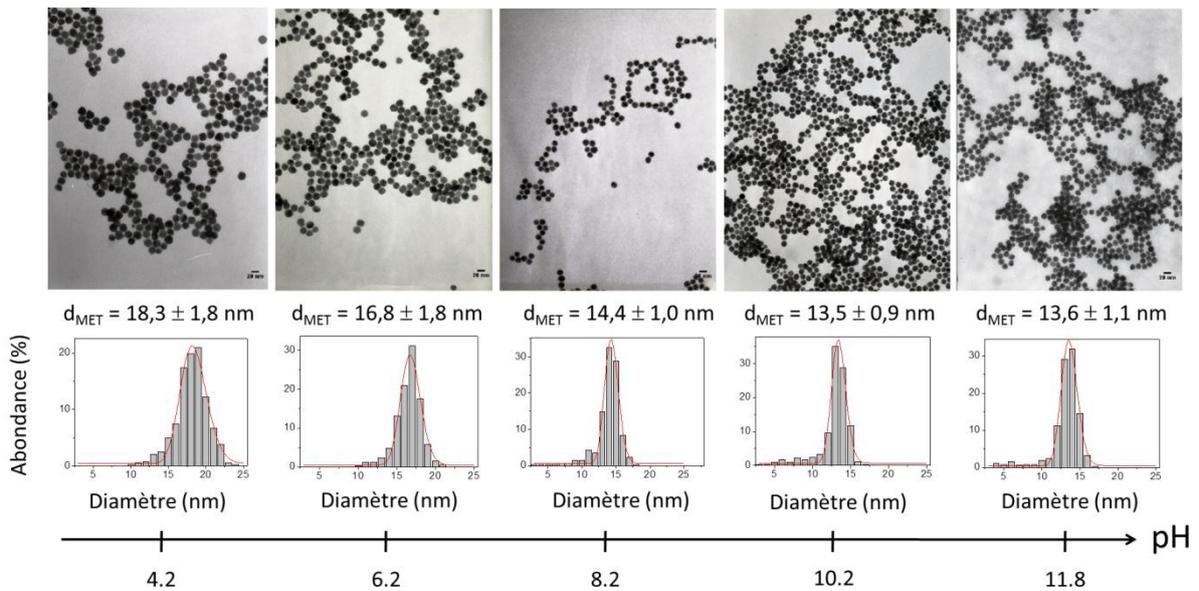


Figure 47. Photographies MET et distribution de taille des NPsAu@HMBPène synthétisées pour différents pH de la solution précurseur de HMBPène avec $R=4,4$

On observe donc une décroissance de la taille cristalline des nanosphères avec l'augmentation du pH (Figure 48 A). La comparaison avec l'étude précédente (Figure 46 A) suggère que l'on retrouve la même allure de courbe pour des ratios R inférieurs à 4,4. De plus l'augmentation du pH final de 4,2 à 7 pour cette série d'expériences (Figure 48 B) confirme cette similarité de l'effet tampon.

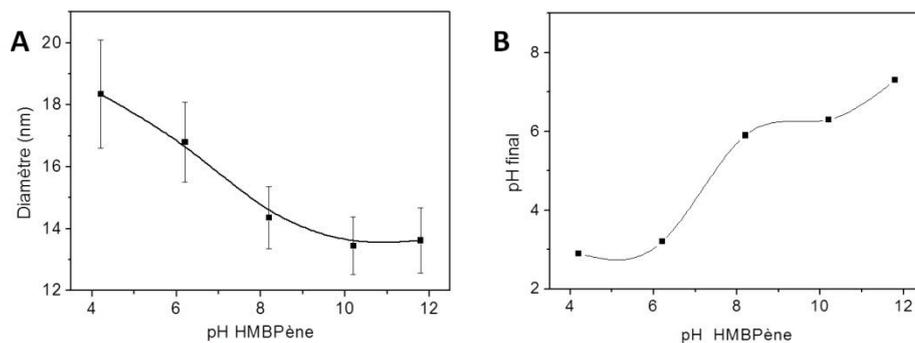


Figure 48. Évolution de la taille des NPsAu@HMBPène (A) et du pH final (B) pour différents pH de la solution précurseur de HMBPène avec $R = 4,4$

6.1.3. Discussion sur le mécanisme de formation des NPs d'or avec le HMBPène

Comme cité précédemment, les NPs synthétisées pour des ratios $R < 1$ ne sont pas stables. La même expérience a donc été réalisée avec des temps de chauffage plus longs. Les solutions obtenues se colorent peu à peu jusqu'à l'obtention d'une solution violette foncée après 2h à 100°C (Figure 49 A). Les mesures par spectrométrie UV-Vis montrent l'apparition d'une large bande de résonance plasmon autour de 540 nm. Les photographies par MET mettent en évidence la présence de nanofils pour 10 minutes de chauffage (Figure 49 B) puis de nanocristaux polymorphes 2 heures plus tard (Figure 49 C).

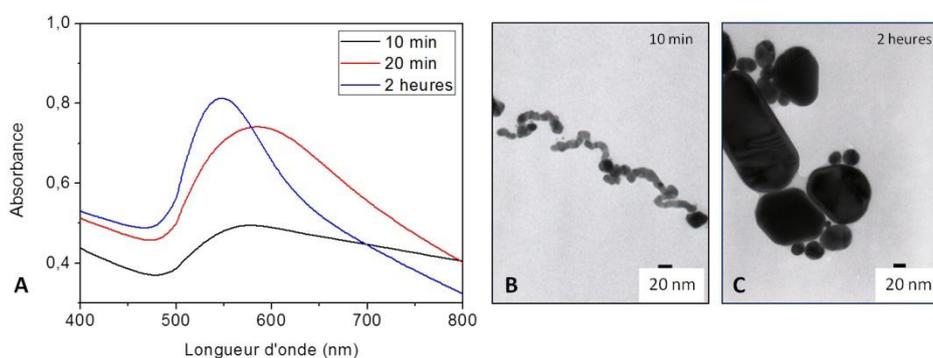


Figure 49. Suivi de la synthèse de NPs Au@HMBPène pour $R = 0,7$ par spectrométrie UV-Vis (A) et par MET : images après 10 min (B) et 2 heures (C) de chauffage

Selon le modèle de mécanisme pH-dépendant proposé par Ji et al. décrit au chapitre précédent, la formation d'intermédiaire nanofils résulte d'une agrégation des germes dans les premiers instants de la réaction lorsqu'elle est conduite à pH acide.²⁵ Dans notre cas, deux effets se produisent :

- la faible quantité de HMBPène ne compense plus la forte acidité de HAuCl_4 . Ce qui pourrait expliquer une déstabilisation des germes,
- la cinétique globale de formation des NPs est plus lente, comme en témoigne l'évolution de l'absorption, que lorsque le réducteur est en excès.

L'évolution de la bande de résonance plasmon et de la morphologie des NPs au cours de l'avancement de la réaction corréle donc avec le modèle type nucléation - agrégation - « murissement intraparticules » que propose Ji et al., bien que remis en cause récemment par Wuithsick et al.³² S'il est difficile de contester le caractère inadéquat des méthodes *ex-situ* telles que la spectroscopie UV-Vis ou la MET pour définir le mécanisme de formation des NPs, notre étude confirme l'importance du pH comme paramètre pour le

contrôle du diamètre des nanosphères. Par ailleurs le mécanisme classique de nucléation - croissance par diffusion ne permet pas de comprendre la diminution de la taille des NPs avec l'augmentation du pH réactionnel telle qu'elle est décrite dans le paragraphe §5.2.

6.2. Concentration en réactifs

Dans le but de moduler la quantité de NPs synthétisées, nous avons réalisé la synthèse sous chauffage micro-ondes avec une concentration en HAuCl_4 de 1 mM (au lieu de 0,25 mM) et dans les mêmes conditions.^{††} Des nanosphères d'un diamètre moyen de $13,7 \pm 1,4$ nm sont obtenues (Figure 50). Ainsi, on observe une diminution de la taille moyenne lorsqu'on augmente la concentration initiale en précurseur d'or : taille de 13,7 nm ($[\text{HAuCl}_4] = 1$ mM) et 14,4 nm ($[\text{HAuCl}_4] = 0,25$ mM). Cet effet est en accord avec les travaux de Turkevich.¹³ D'autre part, les solutions ne sont pas stables pour des synthèses employant des concentrations supérieures. Par la suite, nous concentrons nos échantillons en réduisant le volume après synthèse par ultrafiltration.

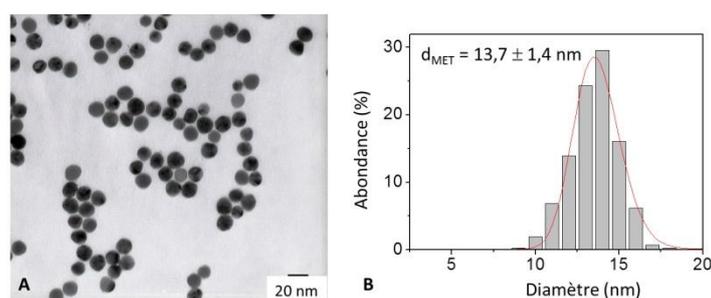


Figure 50. Synthèse par chauffage micro-onde de NPs Au@HMBPène pour $[\text{HAuCl}_4] = 1$ mM: images par MET (A) et distribution de taille (B)

6.3. Mode de chauffage

Le chauffage classique n'apporte pas de changement de morphologie intéressant dans les conditions standards par rapport au chauffage micro-ondes (Figure 51 A1 et A2). Il permet néanmoins d'obtenir des NPs de $10,1 \pm 0,8$ nm lorsque l'on augmente la concentration en HAuCl_4 à 1 mM (Figure 51 B1 et B2).

La diminution du diamètre observée précédemment par chauffage micro-ondes (Figure 50) est ainsi amplifiée avec la méthode de chauffage classique. Il apparaît que contrairement à ce qui a été observé pour $[\text{Au}] = 0,25$ mM, le chauffage micro-ondes ne

^{††} ratio R = 4 et pH de la solution de HMBPène fixé à 8,2

compense plus le phénomène de réduction du complexe $[\text{AuCl}_4]^-$ avant hydrolyse. Ainsi l'augmentation de la cinétique de réduction induit un plus grand nombre de germes dans les premiers instants après ajout de la solution de HMBPène, donc une diminution de la taille finale dans l'hypothèse où le nombre de NPs reste constant.

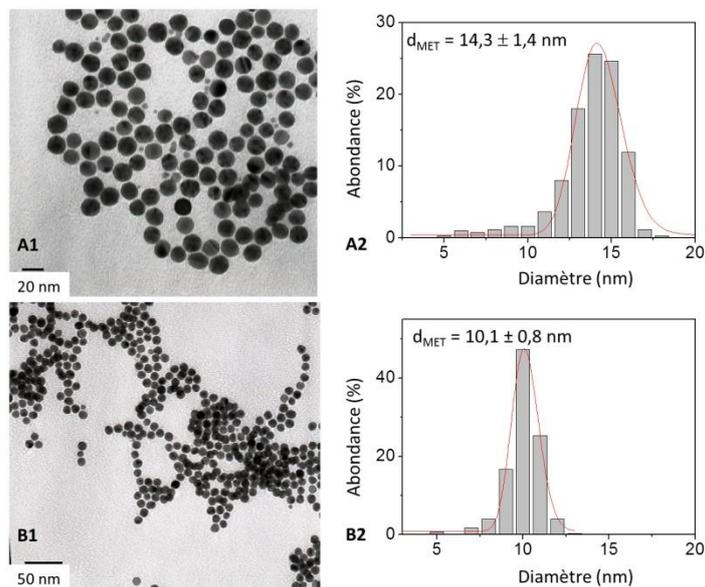


Figure 51. Synthèse par chauffage classique de NPs Au@HMBPène pour $[\text{Au}] = 0,25 \text{ mM}$ et $[\text{Au}] = 1,00 \text{ mM}$: images par MET (respectivement A1 et B1) et distribution de taille (respectivement A2 et B2)

7. Stabilité colloïdale

Dans cette partie nous proposons d'évaluer la stabilité colloïdale des NPs Au@HMBPène de 14 nm dans deux conditions de perturbation différentes. Dans un premier test, les NPs seront placées en milieu salin afin de « masquer » les charges de surface pour perturber les répulsions électrostatiques inter-particules. Dans un second test, nous ajouterons un composé portant une fonction thiol pour provoquer la désorption de ligand par réaction d'échange à la surface des NPs. Ces deux méthodes seront également testées sur des NPs Au@Ct de 14 nm synthétisées par voie micro-ondes afin de comparer ces deux types d'habillages.

7.1. Test de stabilité en milieu salin

Après ajout d'une solution de chlorure de sodium sur les dispersions en NPs fraîchement synthétisées, les spectres d'absorption UV-Vis sont enregistrés au cours du temps

(Figure 52). On constate dans les deux cas une évolution assez rapide des propriétés optiques avec l'apparition d'une nouvelle bande de résonance plasmon autour de 640 nm, témoignant de l'agrégation causée par l'augmentation de la force ionique. Dans le cas des NPs Au@Ct, le phénomène semble moins rapide car l'absorbance à 640 nm continue d'augmenter après 30 min tandis que pour les NPs Au@HMBPène le maximum à cette longueur d'onde est atteint dans les 5 premières minutes. Dans ce dernier cas, on observe une diminution de l'absorbance à 640 nm, témoignant d'une précipitation des NPs.

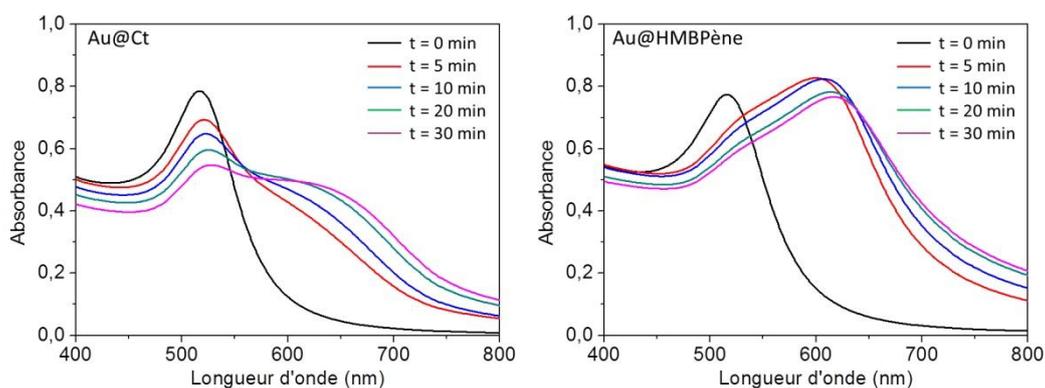


Figure 52. Suivi de l'agrégation par spectrométrie UV-Vis des NPs Au@Ct (gauche) et des NPs Au@HMBPène (droite) en solution aqueuse de chlorure de sodium à 50 mM

On peut en déduire que l'habillage citrate permet une répulsion électrostatique plus forte que l'habillage HMBP, ce qui rend le colloïde moins sensible à l'augmentation de la force ionique. À pH neutre, on mesure une légère différence de potentiel ζ entre ces deux types de NPs ($-38,3 \pm 12,8$ mV pour les NPs Au@HMBPène contre $-46,6 \pm 14,4$ mV pour les NPs Au@Ct) qui corrèle avec les résultats obtenus. L'augmentation de stabilité relative en milieu salin peut être expliquée par l'hypothèse selon laquelle la structure en bicouche de l'habillage citrate est à l'origine de cette différence de charge de surface.

7.2. Test de stabilité par échange de ligand

Le chlorure de cystéamine est un sel d'ammonium avec une fonction thiol (Schéma 9), par conséquent capable de se lier à la surface des NPs d'or de façon plus efficace que les oxanions carboxylates ou phosphonates.

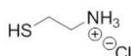


Schéma 9. Chlorure de cystéamine

Le principe de ce test de stabilité est de provoquer un échange de ligand en présence de ce composé, et ainsi d'introduire des cations ammonium au sein des couches de molécules adsorbées. Ceci diminue la charge de surface et engendrer une perte de stabilité. Ce phénomène est nettement observé pour les NPs Au@Ct avec des concentrations inférieures ou égales à 2 μM tandis que les NPs Au@HMBPène restent stables puisque le spectre d'absorption est inchangé (Figure 53).

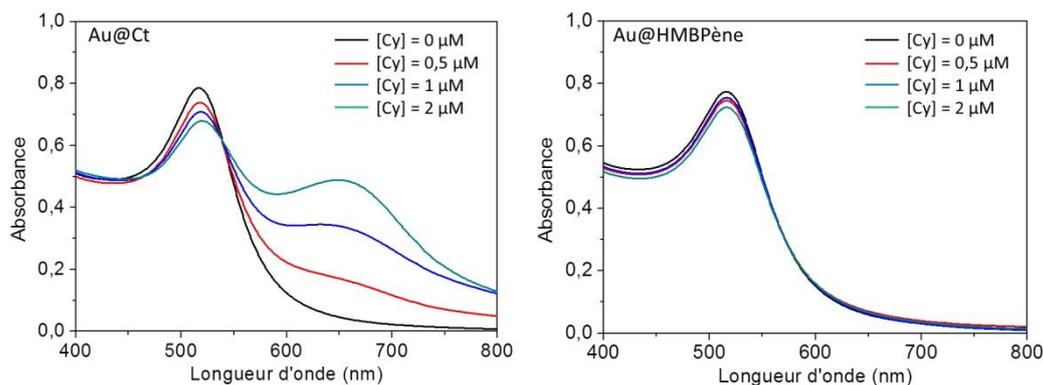


Figure 53. Suivi de l'agrégation par spectrométrie UV-vis des NPs Au@Ct (gauche) et des NPs Au@HMBPène (droite) pour différentes concentrations en chlorure de cystéamine

La différence chimique entre ces deux habillages de NPs influence donc significativement l'aspect thermodynamique de l'échange de ligand. Il est clair que la désorption des ions citrates est si importante que la couche d'anions adsorbés ne garantit plus une répulsion électrostatique suffisante. On en déduit que la liaison des groupements phosphonates sur la surface d'or est plus forte que celles des groupements carboxylates. Par conséquent les NPs Au@HMBPène ont un habillage qui peut favoriser la post-fonctionnalisation par couplage covalent plutôt qu'un échange de ligand.

8. Conclusion

Nous avons étudié dans ce chapitre la possibilité de mettre au point une nouvelle synthèse « one pot » de NPs d'or en phase aqueuse par voie micro-ondes à l'aide d'un bisphosphonate, le HMBPène, qui offre donc la possibilité de réduire le complexe d'or puis de stabiliser les NPs formées. La dégradation partielle du ligand réducteur et l'influence du pH sur la taille finale des nanosphères sont des observations qui suggèrent un mécanisme similaire à la synthèse de Turkevich.

Les caractérisations de surface confirment l'efficacité de la stratégie des ligands bifonctionnels : l'habillage en monocouche est assuré par la chélation des fonctions bisphosphonates sur la surface des NPs, les doubles liaisons éthyléniques restent ainsi disponibles pour une étape de post-fonctionnalisation. La liaison de l'or avec les phosphonates apparaît plus robuste qu'avec les carboxylates face à l'échange de ligand.

9. Matériels et méthodes

9.1. Matériels

Tous les réactifs sont commerciaux et ont été utilisés sans purification préalable. L'eau a été purifiée grâce à un système Milipore (résistivité de 18.2 MΩcm). La verrerie utilisée pour la synthèse de NPs d'or est nettoyée à l'acide nitrique et rincée abondamment à l'eau avant chaque manipulation. Toutes les expériences sous micro-ondes ont été réalisées dans un appareil Anton Paar, Monowave 300. Les spectres de Résonance Magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H (400 MHz), du carbone ^{13}C (100,6 MHz) et du phosphore ^{31}P (162,0 MHz) ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance 400 et les déplacements chimiques ont été reportés en partie par million (ppm) sur l'échelle δ . Le pic de solvant a été utilisé comme valeur de référence (RMN ^1H : H_2O dans D_2O : 4,79 ppm). Les données sont reportées comme suit : s = singulet, d = doublet, q = quadruplet, qt = quintuplet, m = multiplet et les constantes de couplages sont données en Hz. Les spectres RMN non présentés dans le chapitre sont donnés en annexe 17. Les spectres ITRF ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Nicolet 380 Thermo Scientific FTIR. Les échantillons ont été préparés sous forme de pastilles de bromure de potassium (KBr). Les spectres UV visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Jasco V-630. Le diamètre hydrodynamique (D_h) et le potentiel ζ des nanocristaux ont été déterminés grâce à un nanosizer Malvern : Nano-ZS (Red Badge) ZEN 3600. Les images de MET ont été obtenues à l'aide d'un microscope FEI CM10 (Phillips) et les échantillons ont été préparés par dépôt d'une goutte de solution de NPs en suspension sur une grille de carbone recouverte de cuivre placée sur un papier filtre. Le diamètre moyen d_{MET} , ainsi que la déviation standard w ont été déduites des mesures de MET et la distribution en taille a été modélisée à l'aide de la fonction $g(d)$ décrite par l'équation suivante

$$g(d) = \frac{1}{\sigma d \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{\left(\ln\frac{d}{d_{TEM}}\right)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (18)$$

Avec σ la déviation standard de $\ln(d)$ qui s'exprime

$$\sigma \approx \sqrt{\ln\left(1 + \left(\frac{w}{d_{TEM}}\right)^2\right)} \quad (19)$$

Les analyses thermogravimétriques (ATG) ont été enregistrées à l'aide d'un appareil LabSysevo TG-DTA-DSC 16000, Setaram Instrumentation. Les spectres de masse haute résolution (HRMS) ont été enregistrés sur un spectromètre de masse LTQ OrbitrapVelos (Thermo Scientific) en mode positif et négatif avec une source ESI. Les spectres de masse (MS) ont été enregistrés avec un analyseur Orbitrap avec une précision de 1 à 2 ppm.^{††} La spectrométrie photoélectronique X est réalisée par un appareil PHI 5000 Versaprobe. La source d'énergie de rayon X est issue d'une radiation monochromatique Al Ka (1486,7 eV avec un spot de 200 µm de diamètre). Les poudres sont déposées sur une feuille d'indium pour immobiliser les nanoparticules. Le carbone de contamination est utilisé pour calibrer les spectres XPS de chacun des échantillons. Son énergie de liaison est fixée à 284,5 eV et est utilisé pour calibrer tous les autres pics d'un spectre afin de pouvoir les comparer. Durant l'analyse la pression est fixée 8.10⁻⁸ Pa.

9.2. Méthodes

9.2.1. Synthèse de NPs Au@Ct de 14 nm par chauffage classique

Deux solutions de réactifs précurseurs sont préparées : une solution A d'acide chloraurique (HAuCl₄ · 3H₂O, ≥ 99,9%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 20 mM (38,8 mg dans 5 mL d'eau distillée) et une solution B de citrate de sodium (Na₃C₆H₅O₇, ≥ 99%, AcrosOrganics) à 40 mM (59,1 mg dans 5 mL d'eau distillée). 125 µL de solution A sont ajoutés à 9.5 mL d'eau pure dans un monocol de 50 mL. Une fois porté à ébullition 250 µL de solution B sont ajoutés au mélange que l'on laisse sous agitation, 10 min au reflux. Le changement de couleur est immédiat et on obtient après quelques minutes une solution rouge bordeaux de NPs d'or de 14 nm.

9.2.2. Synthèse de NPs Au@Ct de 14nm par chauffage micro-ondes

9,5 mL d'eau pure, 125 µL de solution A et 250 µL de solution B décrites précédemment (§ 7.2.1.) sont introduits dans un tube micro-ondes de 30 mL. Le chauffage est programmé en trois étapes : (1) atteindre 100°C aussi vite que possible (2) maintenir 100°C

^{††} L'ensemble des spectres de masses ont été réalisés par Julie Hardouin au sein du laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces de l'Université de Rouen.

pendant 10 min (3) refroidissement. La vitesse de rotation de l'agitation magnétique est fixée à 1200 rpm. On obtient une solution rouge bordeaux de NPs d'or de 14 nm.

9.2.3. Synthèse du HMBPène

593 mg (5 mmol) de chlorure de pent-4-énoyle ($\text{ClCO}(\text{CH}_2)_2\text{CHCH}_2$, 98%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sont introduits dans un monocol de 25 mL et gelés dans de l'azote liquide pour y ajouter 5 mL (15 mmol) de tris-(triméthylsilyl phosphite) ($\text{P}(\text{OSiMe}_3)_3$, 92%, AcrosOrganics). Le mélange est lentement ramené à température ambiante sous agitation constante. Une suspension blanche est obtenue qui est laissée sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Les produits de départ résiduels sont évaporés sous vide à 70°C (0.1 Torr) pendant 20 minutes puis le mélange est hydrolysé dans 20 mL de méthanol (ajout à 0°C) pendant 4 h. Après évaporation du solvant sous pression réduite on obtient une huile jaune qui cristallise à pH = 2,3 dans un mélange binaire méthanol/eau 9:1 à froid. Le solide blanc obtenu est filtré sur Buchner, lavé par du méthanol froid et de l'éther diéthylique avant d'être séché à l'air. 940 mg de HMBPène monosodique (3,5 mmol 70% de rendement) sont obtenus sous la forme d'une poudre blanche.

RMN ^1H (400 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 5,90 (m, 1H, $\text{HC}=\text{CH}_2$) ; 5,02 (dd, $J^3_{\text{trans}}(\text{H}-\text{H}) = 17.2$ Hz, $J^3_{\text{cis}}(\text{H}-\text{H}) = 10,2$ Hz, 2H, $\text{C}=\text{CH}_2$) ; 2,32 (m, 2H, CH_2COH) ; 1,99 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$).

RMN ^{13}C { ^1H } (100,63 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 139,5 ; 114,3 ; 73,8 (t, $J^1(\text{C}-\text{P}) = 135,5$ Hz, COH) ; 32,8 ; 28,0.

RMN ^{31}P { ^1H } (161,98 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 18,9 (s).

HR-MS (ESI-Q ToF) $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_7\text{P}_2$: m/z ($\text{M} - \text{H}$) $^-$: 244,99818 ; calc. : 244,998.

IR (KBr, pH = 7): 2920 ; 2852 ; 1640 ; 1448 ; 1163 ; 1107 ; 907 cm^{-1}

9.2.4. Synthèse du HMBP-alcyne (n = 5)

834 mg (8,5 mmol) d'acide 4-pentynoïque ($\text{CHCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 95%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sont dissous dans 20 mL de dichlorométhane et introduits dans un monocol muni d'une garde à chlorure de calcium. 5,6 g (44 mmol) de chlorure d'oxalyle ($\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sont injectés, goutte à goutte, à la seringue dans le mélange, laissé sous agitation 7 heures après addition. Le solvant et l'excès de chlorure d'oxalyle sont éliminés sous pression réduite à l'aide d'une pompe munie d'un piège à azote liquide. Une huile jaune est obtenue qui est gelée dans de l'azote liquide. 8,5 mL (25 mmol) de tris-

(trimethylsilyl phosphite) ($\text{P}(\text{OSiMe}_3)_3$, 92%, AcrosOrganics) sont ensuite additionnés. La solution est laissée revenir à température ambiante sous agitation puis laissée pendant une nuit à température ambiante. Les produits de départ résiduels sont évaporés sous vide à 70°C (0,1 Torr) pendant 20 minutes puis le mélange est hydrolysé dans 20 mL de méthanol (ajout à 0°C) pendant 4 h. Après évaporation du solvant sous pression réduite une huile jaune est obtenue et cristallisée à pH 2,3 dans un mélange binaire méthanol eau 9:1, à froid. Le solide blanc obtenu est filtré sur Buchner, lavé au méthanol froid et à l'éther diéthylique puis séché à l'air. 1,873 g de HMBP-alcyne (7 mmol, 82% de rendement) sont obtenus sous la forme d'un solide blanc.

RMN ^1H (400 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 2,49 (m, 2H, CH_2COH) ; 2,30 (t, $J^4(\text{H-H}) = 2,7$ Hz, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}$) ; 2,19 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$).

RMN ^{13}C { ^1H } (126 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 86,04 (s), 73,39 (t, $J^1(\text{C-P}) = 135,1$ Hz, COH), 69,08 (s), 32,81 (s), 13,35 (t, $J^2(\text{C-P}) = 7,7$ Hz, CH_2COH).

RMN ^{31}P (202 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 17,7 (t, $J^3(\text{P-H}) = 12,8$ Hz).

9.2.5. Synthèse du HMBP-alcyne ($n = 7$)^{98c}

On réalise le même protocole que celui décrit au paragraphe §9.2.4. avec une quantité initiale de 1,072 g (8,5 mmol) d'acide 6-heptynoïque ($\text{HCC}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$, 90%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). 1,792 g de HMBP-alcyne sont obtenus (6,1 mmol, 72 % de rendement).

RMN ^1H (400 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 2,29 (1H, t, $J^4(\text{H-H}) = 2,6$ Hz, $\text{HC}\equiv\text{C}$) ; 2,20 (2H, td, $J^3(\text{H-H}) = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 1,91 (2H, m, CH_2COH) ; 1,63 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$) ; 1,51 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$).

RMN ^{13}C { ^1H } (100,63 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 86,5 ; 74,0 (t, $J^1(\text{C-P}) = 134,5$ Hz, COH) ; 68,9 ; 33,1 ; 28,7 ; 23,0 ; 17,5.

RMN ^{31}P (161,98 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 18,4 (t, $J^3(\text{P-H}) = 13,9$ Hz)

9.2.6. Synthèse de NPs Au@HMBPène de 14 nm par chauffage micro-ondes

Une solution C de HMBPène à 44 mM (59,1 mg dans 4,5 mL d'eau distillée) est préparée à pH 8,2. 9,5 mL d'eau distillée, 125 μL de solution A décrite précédemment (§ 7.2.1.) et 250 μL de solution C sont introduits dans un tube micro-ondes de 30 mL. Le

chauffage est programmé en trois étapes : (1) atteindre 100°C aussi vite que possible (2) maintenir 100°C pendant 10 min (3) refroidissement. La vitesse de rotation de l'agitation magnétique est fixée à 1200 rpm. Une solution rouge bordeaux de NPs d'or de 14 nm est obtenue.

9.2.7. Test de stabilité des NPs vs NaCl

100 µL de solution de chlorure de sodium (NaCl, 99%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 1 M sont ajoutés à 2 mL de solution de NPs d'or de 14 nm fraîchement synthétisées selon les procédures décrites aux paragraphes §9.2.2. pour les NPs Au@Ct et §9.2.4. pour les NPs Au@HMBPène. Les spectres UV sont enregistrés après avoir mélangé les réactifs et à des intervalles de temps variables (0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min).

9.2.8. Test de stabilité des NPs vs hydrochlorure de cystéamine

100 µL de solution d'hydrochlorure de cystéamine ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$, 98%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) de concentration variable (0 µM, 10 µM, 20 µM et 40 µM) sont ajoutés à 2 mL de solution de NPs d'or de 14 nm fraîchement synthétisées selon les procédures décrites aux paragraphes §9.2.2. pour les NPs Au@Ct et §9.2.4. pour les NPs Au@HMBPène. Les spectres UV sont enregistrés 10 min après avoir mélangé les réactifs.

Chapitre 3

POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES AU@HMBPÈNE

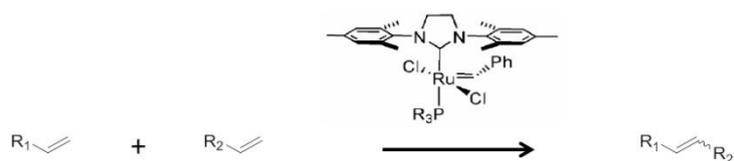
Chapitre 3 : POST-FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES AU@HMBPÈNE

Dans ce chapitre, nous cherchons à démontrer que les NPs Au@HMBPène (dont la synthèse est décrite au Chapitre 2) peuvent jouer le rôle de nanoplateformes fonctionnalisées pour le couplage chimiosélectif de composés d'intérêt en phase aqueuse. Deux stratégies de post-fonctionnalisation sont évaluées : le couplage par métathèse croisée et des réactions par chimie « Click ». Ces réactions sont testées sur des composés modèles pour évaluer leur faisabilité. Nous détaillons plus particulièrement la cycloaddition des composés tétrazines, une réaction chimiosélective qui ouvre des perspectives pour le couplage de composés d'intérêt biologique.

1. Introduction

Dans la nomenclature en chimie organique, les doubles liaisons éthyléniques ne sont pas considérées comme des groupements fonctionnels puisqu'elles appartiennent à la chaîne carbonée. Néanmoins ce type d'insaturation possède une réactivité qui lui est propre. Ainsi, nous pouvons trouver de nombreux exemples dans la littérature de substitutions et d'additions sur les alcènes.

Les réactions de couplage par catalyse organométallique permettent de former des liaisons C-C tout en conservant l'insaturation. Nous nous focaliserons ici sur la métathèse des oléfines, une réaction qui fait intervenir deux alcènes pour échanger leurs substituants. Décrite pour la première fois en 1964 par Banks et al. comme une réaction de dismutation,¹⁵⁰ cette synthèse a été développée aussi bien pour des couplages intramoléculaires que des couplages intermoléculaires.¹⁵¹ Yves Chauvin, Richard R. Schrock et Robert H Grubbs obtiennent en 2005 le prix nobel de chimie pour leurs travaux sur la métathèse. Notre étude portera sur la métathèse croisée, qui fait intervenir le couplage de deux alcènes distincts à l'aide du catalyseur de Grubbs de deuxième génération tel que résumé sur le schéma 10.



Mécanisme

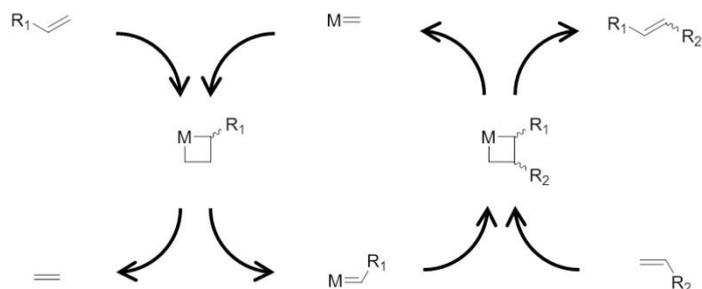


Schéma 10. Équation bilan et mécanisme de la réaction de métathèse croisée

Nous avons évoqué brièvement au chapitre 1 les principes de la chimie « Click » que nous avons illustré par son plus célèbre exemple : la réaction de Huisgen. D'autres réactions sur des substrats alcènes ont été développées, faisant aussi intervenir un processus photocatalytique.¹⁵² Nous évaluerons dans ce travail la réaction thiol-ène,¹⁵³ couramment utilisée pour la fonctionnalisation de matériaux,¹⁵⁴ dont l'équation bilan ainsi que le cycle catalytique sont décrit sur le schéma 11. Ce type de synthèse nécessite l'ajout d'un initiateur radicalaire afin de générer des radicaux, qui vont eux même maintenir le cycle catalytique par propagation.

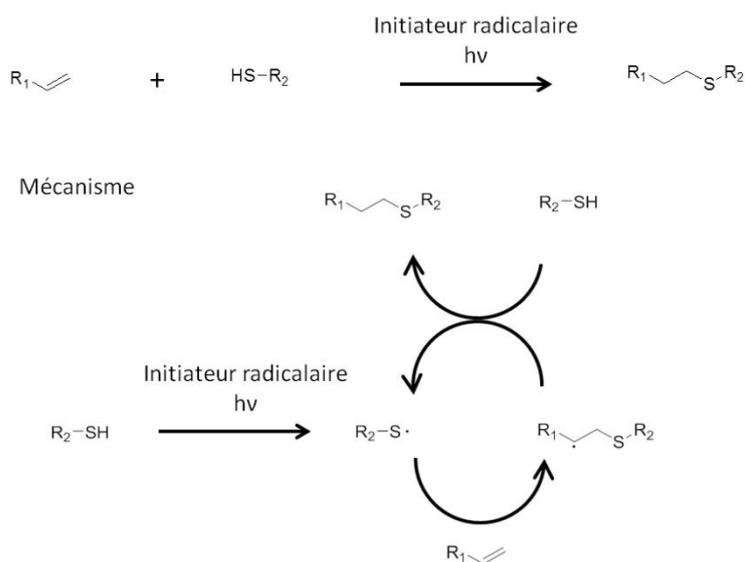


Schéma 11. Équation bilan de la réaction thiol-ène et son cycle catalytique

La réaction de cycloaddition des tétrazines sur les alcènes a récemment stimulé un grand intérêt car elle est aussi compatible avec les principes de la chimie « Click ». Développée pour la première fois en 1959 par Carboni,¹⁵⁵ son mécanisme est de type « Diels-Alder à demande électronique inverse » (Schéma 12). Elle trouve aujourd'hui des applications dans les sciences du vivant pour le biomarquage.¹⁵⁶ Nous étudierons la réactivité d'un composé tétrazine sur le HMBPène et la viabilité de cette voie pour la post-fonctionnalisation de nos nanoplateformes.

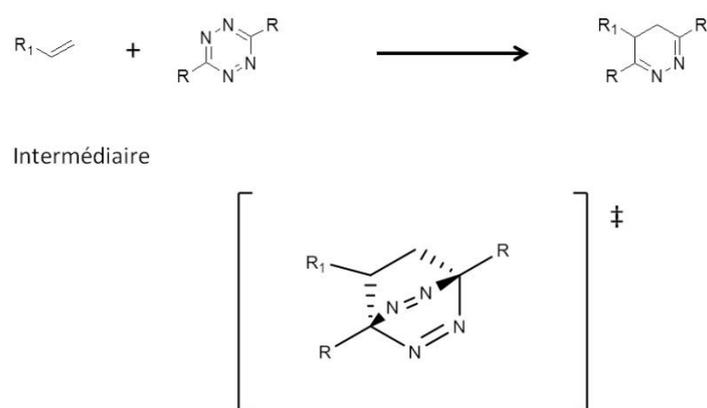


Schéma 12. Équation bilan de la réaction de cycloaddition d'un composé tétrazine sur un alcène et formule générale de l'intermédiaire réactionnel

2. Métathèse

2.1. Métathèse sur les NPs d'or et en phase aqueuse

On trouve dans la littérature des exemples de métathèse sur les NPs d'or fonctionnalisées par des alcènes avec une fonction thiol. Ces molécules possèdent une double liaison C=C en bout de chaîne alkyl, et du fait de leur faible solubilité dans l'eau ces réactions sont conduites en phase organique. Certains auteurs ont développé des polymérisations par ouverture de cycle à l'aide de dérivés de norbornène (hydrocarbure ponté de formule C₇H₁₀), formant ainsi une couche de polymère autour de la NP.¹⁵⁷ Ornelas et al. ont développé le couplage par métathèse croisée des dérivés d'acrylate ce qui illustre la possibilité de post-fonctionnalisation par la catalyse organométallique.¹⁵⁸ À ce jour, aucune étude ne propose de fonctionnaliser les NPs d'or par métathèse en phase aqueuse.

Robert H Grubbs a développé des complexes de ruthénium pour la catalyse homogène des réactions de métathèse d'oléfine.¹⁵⁹ Ces catalyseurs ont notamment été

modifiés pour réaliser ces réactions en phase aqueuse.¹⁶⁰ Le catalyseur de Hoveyda-Grubbs de seconde génération (HGII) étant commercial mais peu soluble dans l'eau, nous nous inspirerons des travaux de Binder et al. pour la solubilisation à l'aide d'un co-solvant polaire : le diméthylformamide (DMF).¹⁶¹ Si d'autres co-solvants organiques ont montré un rendement supérieur dans cette étude, le DMF présente l'avantage de solubiliser à la fois le catalyseur et les NPs.

2.2. Métathèse sur les Au@HMBPène

2.2.1. Premières observations

Des NPs Au@HMBPène de 14 nm synthétisées et lavées dans les conditions décrites au chapitre 2 sont mises en solution dans un mélange binaire eau/DMF 1:4 avec 1 mg de catalyseur HGII. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, nous observons l'apparition d'une coloration violette (Figure 54). Les NPs étant stables dans le DMF, ce changement de propriétés optiques peut être attribué à l'action du catalyseur sur les molécules chimisorbées à la surface des NPs. En considérant que la réaction est efficace, ceci suggère un auto-assemblage des nanosphères par couplage inter-particules, générant des agrégats suffisamment gros pour présenter une absorption dans la région du proche infrarouge.

Ainsi, bien que ce ne soit pas notre objectif initial, la conception de tels édifices nanométriques pourrait être prometteuse pour des applications en TPT (Chapitre 1). C'est pourquoi il nous a paru important de caractériser et de tenter de contrôler ce type de synthèse.

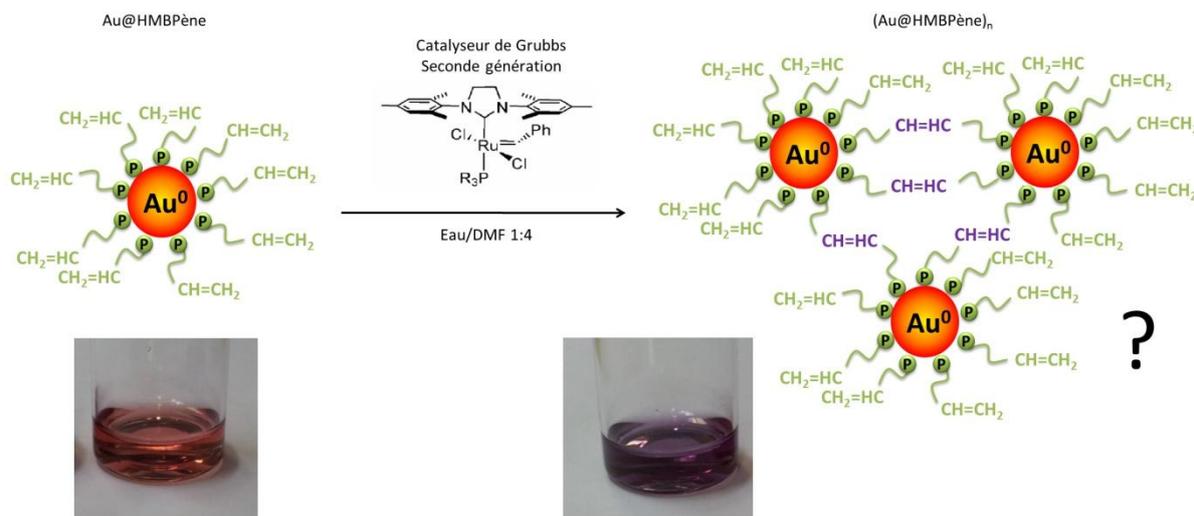


Figure 54. Premier résultats expérimentaux : en présence du catalyseur HGII un changement de couleur est observé. Hypothèse d'un couplage inter-particules conduisant à la formation d'assemblages.

2.2.2. Variation de la température et quantité de catalyseur

Deux paramètres nous ont paru intéressants à étudier : la quantité de catalyseur et la température de chauffage. Afin de contrôler précisément la température et d'accélérer l'agrégation des NPs, nous avons utilisé le chauffage micro-ondes. Les NPs Au@HMBPène de 14 nm, dans le mélange eau/DMF ont donc été mises en présence de quantités variables de catalyseur et la réaction conduite à différentes températures. Le mélange réactionnel est laissé sous micro-ondes pendant cinq minutes puis dilué dans 50% d'eau afin de stopper la réaction. La Figure 55 présente l'évolution des spectres d'absorption UV-Vis^{§§} et des diamètres hydrodynamiques en fonction de la quantité de catalyseur et de la température de chauffage :

- Pour les différentes concentrations en HGII testées, la température de réaction est fixée arbitrairement à 100 °C.
- Lorsque l'on étudie l'effet de la température, la concentration en HGII est fixée arbitrairement à 32 µM.
- Les NPs sont introduites pour une concentration or de 1,0 mM.

^{§§} Afin de s'affranchir des effets de dilution, les absorbances sont normalisées.

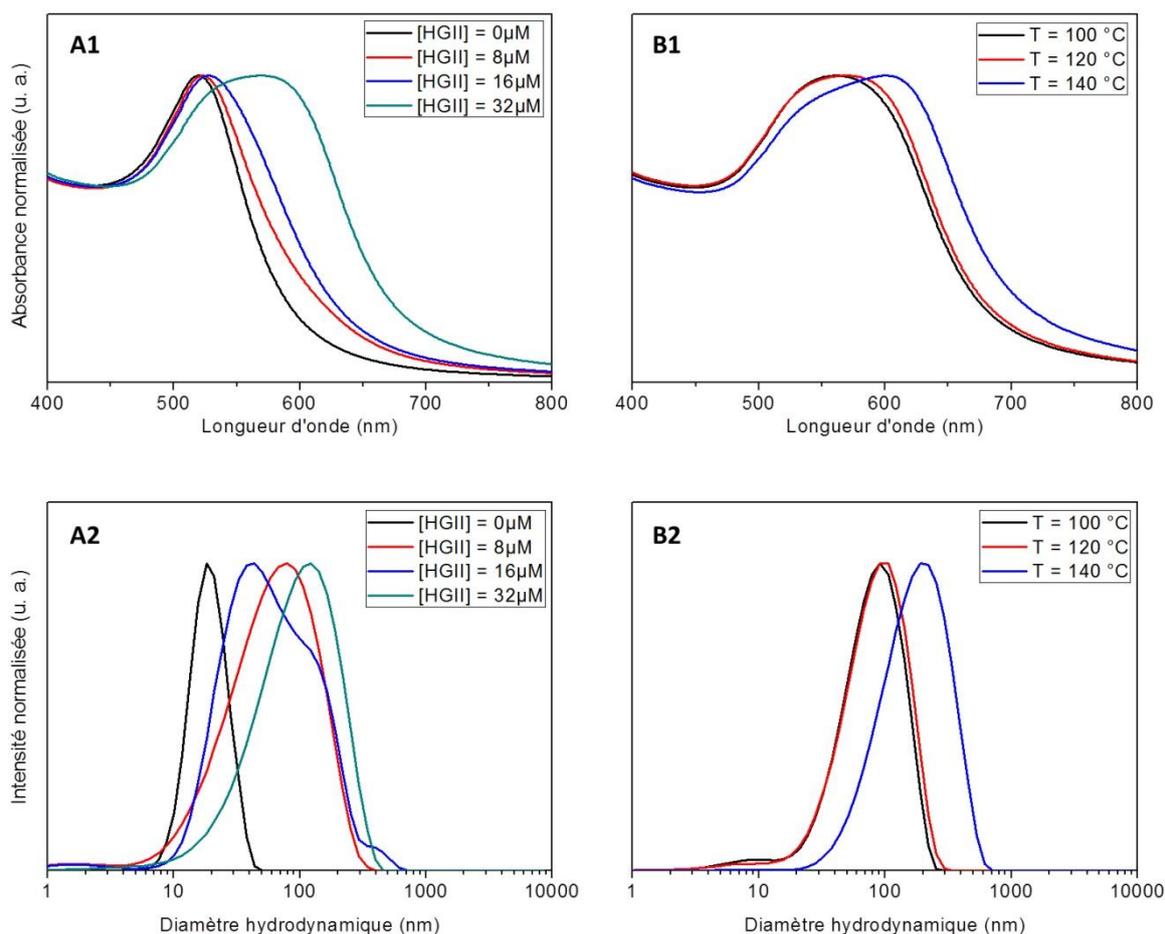


Figure 55. Évolution de la résonance plasmon et du diamètre hydrodynamique en fonction de la quantité de catalyseur (respectivement A1 et A2) et de la température de chauffage (respectivement B1 et B2). Dans les conditions de référence : $[HGII] = 32 \mu\text{M}$, $[\text{Au}] = 1,0 \text{ mM}$ et $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$.

La bande plasmon se déplace vers le rouge lorsqu'on augmente la quantité de catalyseur (Figure 55 A1), ou encore avec l'augmentation de la température de chauffage (Figure 55 A2). Ceci suggère une augmentation de la taille des assemblages. Il semble donc que l'activité catalytique puisse être modulée en fonction de ces paramètres intensifs.

La taille hydrodynamique de ces structures a été mesurée par DLS après élimination du DMF par ultrafiltration (Figure 55 A2 et B2). Le diamètre hydrodynamique augmente avec la quantité de catalyseur (à l'exception de l'expérience réalisée pour $[HGII] = 16 \mu\text{M}$) et avec la température du chauffage. Ces résultats sont cohérents avec le déplacement vers le rouge de la bande plasmon.

2.3. Observations par MET

Si les mesures en spectrométrie UV-vis mettent en évidence l'agrégation des NPs de façon qualitative, elles ne permettent pas de connaître la taille moyenne et la polydispersité des assemblages. La DLS indique que nous pouvons moduler la taille hydrodynamique de nos complexes de NPs entre 50 et 200 nm suivant la concentration de catalyseur et la température de chauffage choisie. Afin de confirmer l'état d'agrégation des NPs en solution, une étude par MET a été réalisée.

Pour cela il a été nécessaire de mettre au point une méthode de dépôt sur la grille MET. En effet l'évaporation du solvant lors du dépôt sur la grille de MET influence fortement la disposition des NPs. Nous avons donc choisi de laisser flotter une grille de MET sur une solution de NPs puis de laisser évaporer lentement l'eau en plaçant l'échantillon à l'étuve une nuit (Figure 56 A). Le temps d'imprégnation de la grille étant considérablement allongé, cela pourrait favoriser l'homogénéité du dépôt.

Afin de valider ce protocole, nous avons utilisé les Au@HMBPène de 14 nm. La Figure 56 B C D montre les clichés par MET pris sur différentes zones de la grille. Il apparaît clairement que la densité de NPs déposées est variable suivant la zone d'observation. Ceci étant, nous constatons que les sphères sont isolées les unes des autres dans les zones où la densité est plus faible (Figure 56 B). Donc dans ce cas précis, les clichés par MET sont représentatifs du niveau d'agrégation.

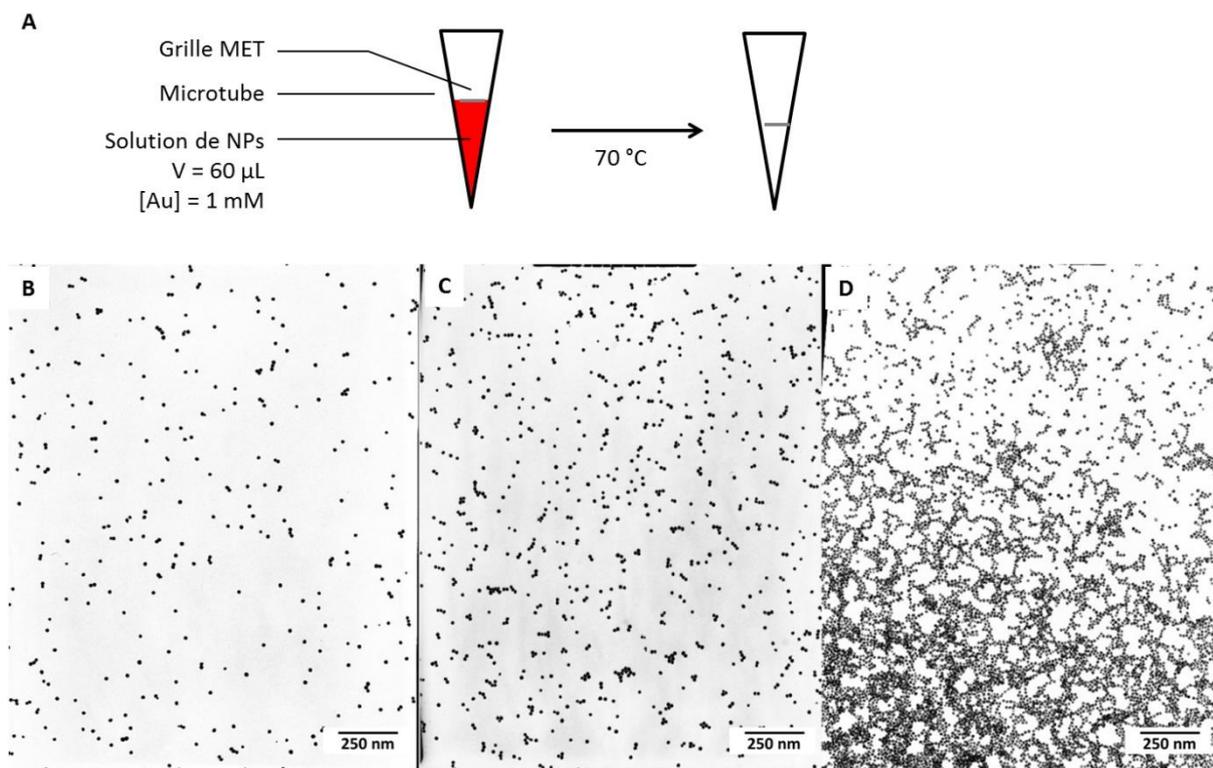


Figure 56. Méthode de dépôt alternative sur grille de MET pour une solution de NPs Au@HMBPène standard de 14 nm : images MET de différentes zones de la grille.

Le même protocole a été réalisé sur les trois expériences de métathèse utilisant des quantités de catalyseur croissantes, les résultats obtenues en MET sont présentés figure 57.

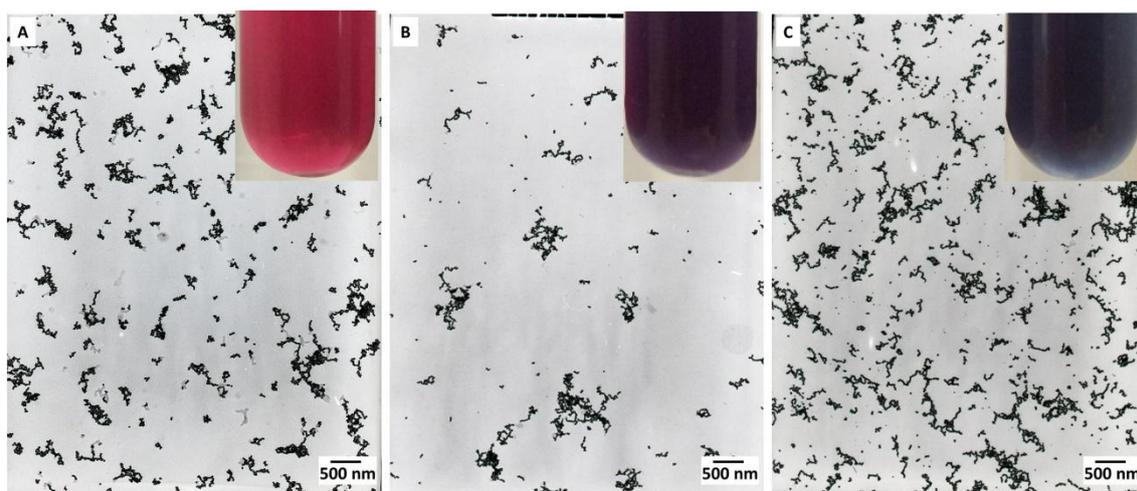


Figure 57. Visualisation par MET des assemblages de NPs pour différentes concentration en catalyseur : $[\text{HGII}] = 16 \mu\text{M}$ (A), $[\text{HGII}] = 32 \mu\text{M}$ (B) et $[\text{HGII}] = 64 \mu\text{M}$ (C)

Les colorations des solutions témoignent de la grande différence du niveau d'agrégation. Les clichés par MET (zones diluées) mettent en évidence la présence d'agrégats de plusieurs dizaines de NPs. Néanmoins il est difficile de donner par cette méthode une taille moyenne à cause de l'hétérogénéité et du caractère amorphe de ces assemblages. De surcroît, nous ne pouvons corrélérer le niveau d'agrégation avec la quantité de catalyseur introduite.

2.4. Évaluation de la réactivité du catalyseur pour la post-fonctionnalisation par métathèse croisée

Conformément à notre objectif initial, nous avons aussi essayé de coupler sur le HMBPène adsorbé en surface des NPs un composé organique par métathèse croisée. Pour ce faire, il est nécessaire que l'alcène en solution ait une fonction chimique détectable par les méthodes analytiques classiques. C'est pourquoi nous avons synthétisé le N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide par condensation du 3-azido-1-propanamine sur du chlorure de pent-4-énoyl (Schéma 13). Ce composé présente un groupement azide facilement identifiable par spectroscopie IRTF avec une bande de vibration caractéristique pour la fonction azide autour de 2100 cm^{-1} .

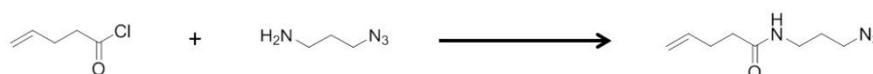


Schéma 13. Synthèse du N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide

La réaction de métathèse a été réalisée en introduisant cinq équivalents de N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide par rapport à la quantité estimée de HMBPène à la surface des NPs. L'expérience est conduite dans les conditions standards ($[\text{HGII}] = 32 \mu\text{M}$, $[\text{Au}] = 1,0 \text{ mM}$ et $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$) et la réaction stoppée après 5 minutes par dilution du mélange dans 50% d'eau. Pour l'analyse par spectroscopie IRTF, les NPs sont lavées par ultrafiltration, puis la solution est évaporée en présence de KBr.

La Figure 58 montre les spectres d'absorption UV-Vis et IRTF avant et après réaction. On observe une modification du spectre d'absorption UV-Vis avec un élargissement de la bande de plasmon (Figure 58 A) témoignant d'une légère agrégation. La bande de plasmon reste localisé vers 550 nm tandis qu'en absence de N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide la métathèse entre particules conduisait à une bande vers 600 nm (Figure 55 A spectre vert).

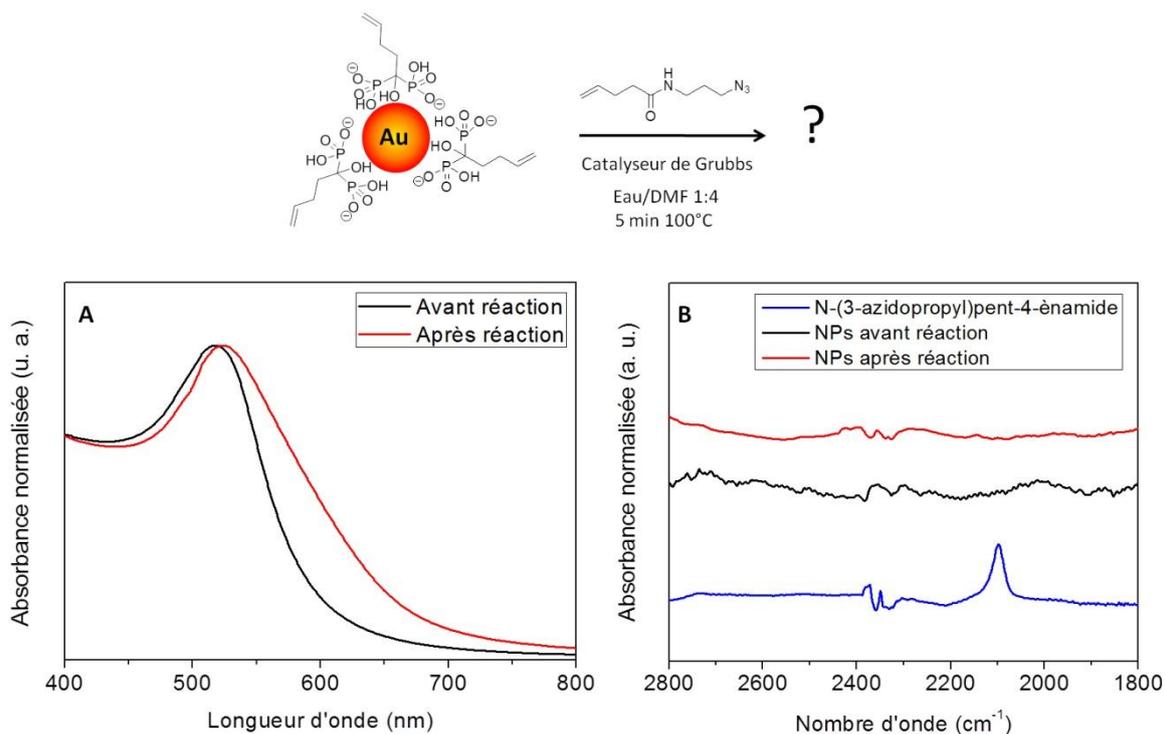


Figure 58. Spectroscopie UV-Vis (A) et IRTF (B) des NPs Au@HMBPène avant et après réaction avec le N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide dans les conditions réactionnelles de la métathèse

La comparaison des spectres IRTF montrent qu'après réaction (Figure 58 B spectre rouge), la bande de vibration caractéristique des azides à 2100 cm^{-1} n'est pas observée. Ceci montre que le couplage n'a pas lieu ou avec un très faible rendement.

La métathèse croisée ne serait pas efficace comme le suggèrent les résultats préliminaires. Ceci nous oblige à remettre en cause notre hypothèse de départ, c'est-à-dire que l'agrégation des NPs Au@HMBPène sous l'action du catalyseur ne serait pas le résultat d'un couplage inter-particules. Les phosphonates étant capables de complexer les cations de ruthénium,¹⁴⁵ on peut effectivement supposer que l'agrégation intervient à cause de la désorption d'une partie des molécules d'HMBPène de la surface. Dans le dernier cas l'agrégation des NPs est atténuée par la présence de N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide, ce qui peut résulter d'une interaction entre ce composé et le catalyseur HGII.

2.5. Bilan

Si les premiers résultats obtenus suggéraient un potentiel de cette stratégie pour l'élaboration d'assemblage de NPs, nous avons été confrontés à des difficultés de caractérisations. En effet, l'évolution de l'absorbance en spectrométrie UV-Vis et du diamètre hydrodynamique mettent en évidence le processus d'agrégation mais nous n'avons pas pu prouver le couplage des NPs entre elles. Ces résultats laissent penser que l'agrégation des NPs peut résulter d'un autre phénomène que d'un couplage par métathèse croisée. L'absence de preuve pour justifier la formation d'une liaison C=C et la non-chimiosélectivité du processus sont des limitations considérables. Toutefois il faudrait compléter cette étude par d'autres techniques d'analyses comme l'XPS pour avoir une meilleure compréhension du phénomène.

Les problématiques posées ici pourraient être occasionnées sur bien d'autres réactions faisant intervenir des catalyseurs organométalliques, notamment le couplage de Heck. C'est pourquoi nous nous sommes dès lors engagés sur des stratégies de post-fonctionnalisation ne nécessitant pas l'usage de ce type de catalyseur.

3. La réaction thiol-ène

3.1. Principe

Des études montrent que la réaction thiol-ène a été utilisée pour la post-fonctionnalisation des NPs organiques¹⁶² et inorganiques.¹⁶³ Les travaux de Norberg et al. proposent de réaliser cette réaction sur des surface d'or « passivées » par une couche de polystyrène tandis que la polymérisation par thiol-ène/thiol-yne avec des inclusions de NPs d'or a été développé par Lowe.¹⁶⁴ On ne trouve cependant pas d'exemple de couplage de molécules organiques sur les NPs d'or en solution, aqueuse ou organique, *via* ce type de chimie « Click ». Nous pouvons l'expliquer, a priori, par une raison simple : les thiols ayant une forte affinité pour l'or il est difficile d'exclure une adsorption non spécifique de ses composés (Figure 59). Nous avons vu au chapitre précédent que les NPs Au@HMBPène sont moins sensibles à l'échange de ligand en présence de composés présentant une fonction thiol que les NPs Au@Ct. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de déterminer si le couplage chimiosélectif pouvait être favorable dans des conditions radicalaires. L'addition d'un thiol de formule générale HS-R sur les liaisons C=C disponibles en surface des NPs devrait favoriser une plus grande stabilité des NPs par rapport à l'échange de ligand, car cela permettrait de conserver une charge de surface suffisamment négative.

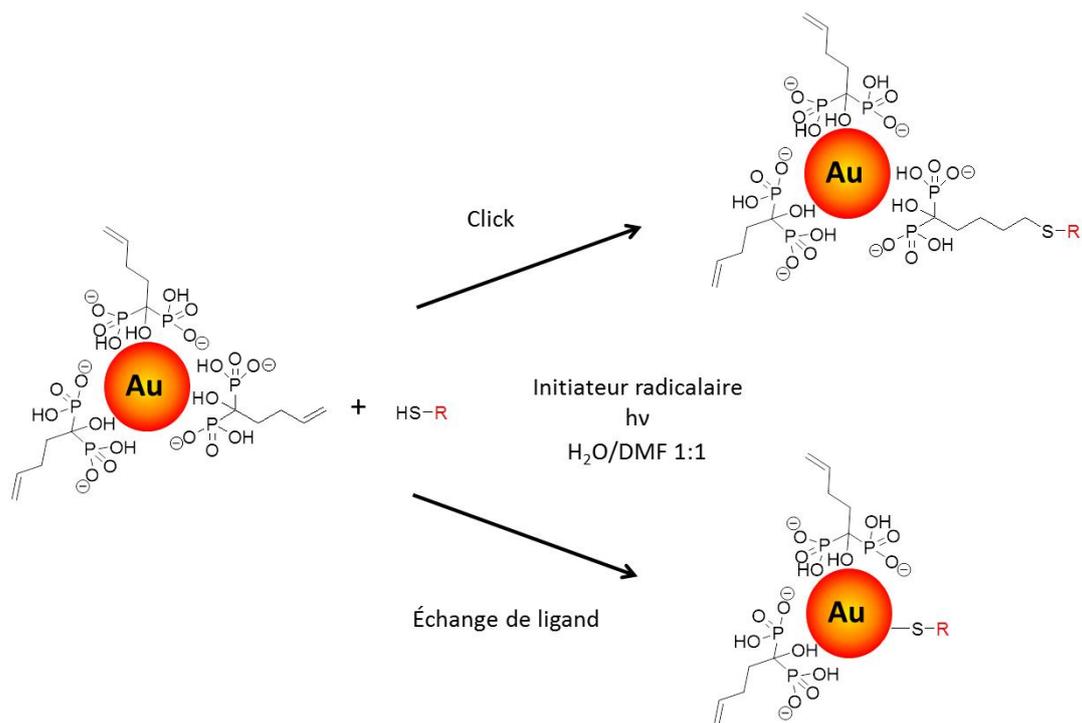


Figure 59. Hypothèses sur les voies réactionnelles possibles des thiols sur les NPs Au@HMBPène en condition radicalaire : couplage « Click » et/ou échange de ligand.

3.2. Effet de l'initiateur radicalaire : l'hydroxycyclohexylphényl cétone

L'exposition de l'hydroxycyclohexylphényl cétone au rayonnement UV génère des radicaux tels que décrit par le schéma 14.

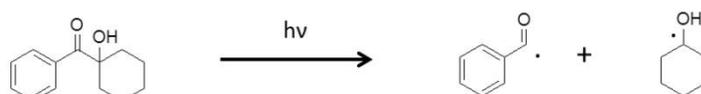


Schéma 14. Clivage radicalaire de l'hydroxycyclohexylphényl cétone¹⁶⁵

Les interactions radicaux – NPs d'or faisant l'objet des plusieurs études,¹⁶⁶ nous avons voulu déterminer dans une première étape si les propriétés des NPs Au@HMBPène seront affectées par les conditions radicalaires. Il est communément admis qu'une faible quantité d'initiateur radicalaire permet d'enclencher le cycle autocatalytique, et pour des réactions de synthèse organique quelques mg suffisent. Nous avons donc choisi de travailler avec une concentration d'initiateur radicalaire de 5 mM. Les NPs ([Au] = 0,5 mM) et l'initiateur radicalaire sont mélangés dans un mélange binaire eau/DMF 1:1. La figure 60 présente l'évolution de l'aspect du mélange sous agitation et après différents temps d'irradiation UV.

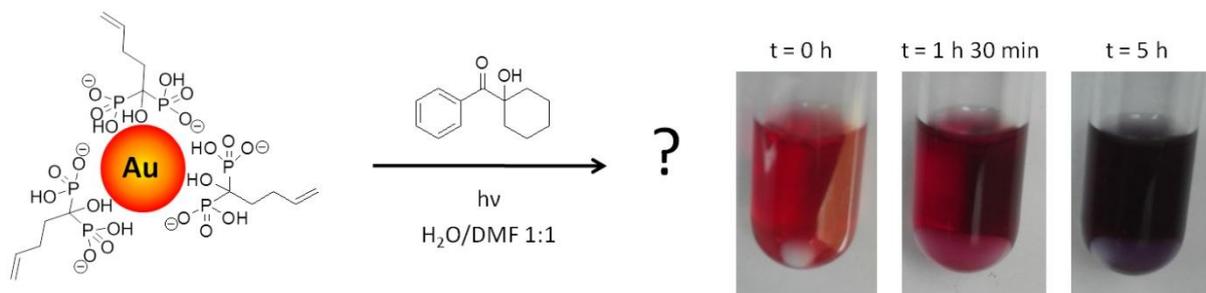


Figure 60. Évaluation qualitative de la stabilité des NPs Au@HMBPène en présence d'un initiateur radicalaire et sous irradiation UV. Le mélange contient des NPs Au@HMBPène pour $[Au] = 0,5 \text{ mM}$ et 1 mg de 1-hydroxycyclohexylphényl cétone.

Nous observons un changement de couleur du rouge au violet de la solution après plusieurs heures d'irradiation UV, ce qui montre que la stabilité colloïdale est perturbée par les espèces radicalaires. Afin de garder un maximum de surface disponible pour la post-fonctionnalisation, nous nous sommes affranchis de ce phénomène d'agrégation en diluant la solution d'initiateur radicalaire d'un facteur 10^5 . L'initiateur radicalaire est alors introduit à 0,06 équivalent par rapport au HMBPène adsorbé. En répétant l'expérience avec ces nouvelles conditions nous n'avons pas observé de changement de couleur.

3.3. Résultats

Dans un premier temps nous avons étudié l'addition du 4-nitrothiophénol sur les NPs Au@HMBPène avec un temps d'irradiation de 1h30. La figure 61 présente les spectres IRTF des NPs avant et après réaction, ainsi que celui du thiol que l'on souhaite coupler.

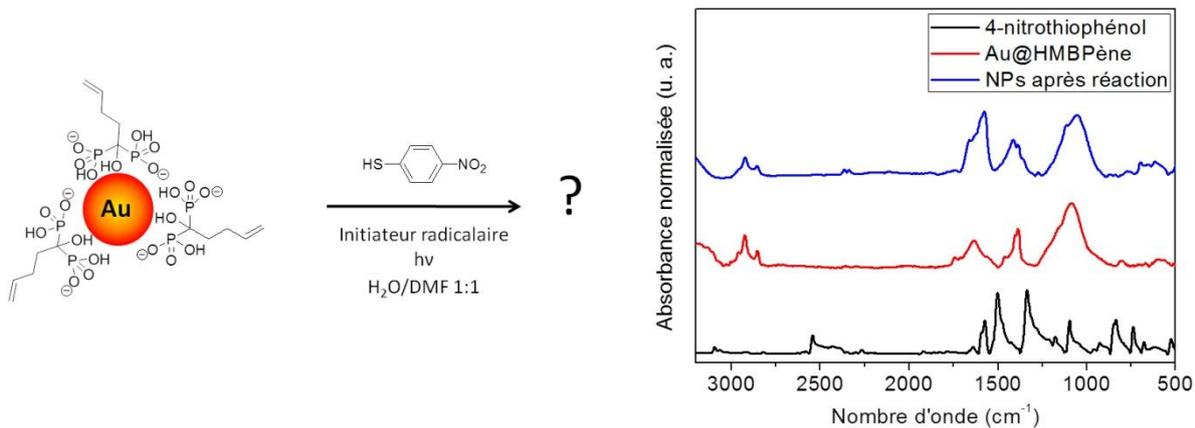


Figure 61. Évaluation par spectroscopie IRTF de la réactivité du 4-nitrothiophénol sur les NPs Au@HMBPène dans les conditions de la réaction thiol-ène. On fixe $[Au] = 0,5 \text{ mM}$ et $[HS-\phi\text{-NO}_2] = 1 \text{ }\mu\text{M}$ soit 0,12 équivalent par rapport au HMBPène adsorbé sur les NPs.

Après 1h30 de réaction nous n'observons pas de changement de couleur, ce qui indique que les NPs restent stables. Les spectres IRTF (Figure 61), montrent que les bandes de vibrations caractéristiques du réactif de départ telles que les elongations des C-H aromatiques (3096 cm^{-1}), du S-H (2541 cm^{-1}) et des N-O (1505 cm^{-1} et 1339 cm^{-1}) n'apparaissent pas après réaction sur les NPs. Nous n'avons donc pas de preuves pour justifier le couplage du 4-nitrothiophénol.

La réaction de thiol-ène a également été réalisée avec le poly(éthylène glycol) méthyléther thiol (HS-PEG). Ce composé possède des signaux en spectroscopie IRTF plus intenses du fait du nombre important d'unité éthylène glycol (2000 g/mol). Trois conditions réactionnelles ont été évaluées :

- 1) $[Au] = 2,5 \text{ mM}$, $[HS\text{-PEG}] = 5 \text{ }\mu\text{M}$ (0,12 équivalent par rapport au HMBPène)- 1h30 d'irradiation UV en présence d'initiateur radicalaire.
- 2) $[Au] = 2,5 \text{ mM}$, $[HS\text{-PEG}] = 25 \text{ }\mu\text{M}$ (0,6 équivalent par rapport au HMBPène) - 1h30 d'irradiation UV en présence d'initiateur radicalaire.
- 3) $[Au] = 2,5 \text{ mM}$, $[HS\text{-PEG}] = 25 \text{ }\mu\text{M}$ (0,6 équivalent par rapport au HMBPène) - 1h30 dans l'obscurité et sans d'initiateur radicalaire.

La figure 62 présente les spectres IRTF des NPs pour chacune des conditions ainsi que leurs spectres d'absorption UV-Vis.

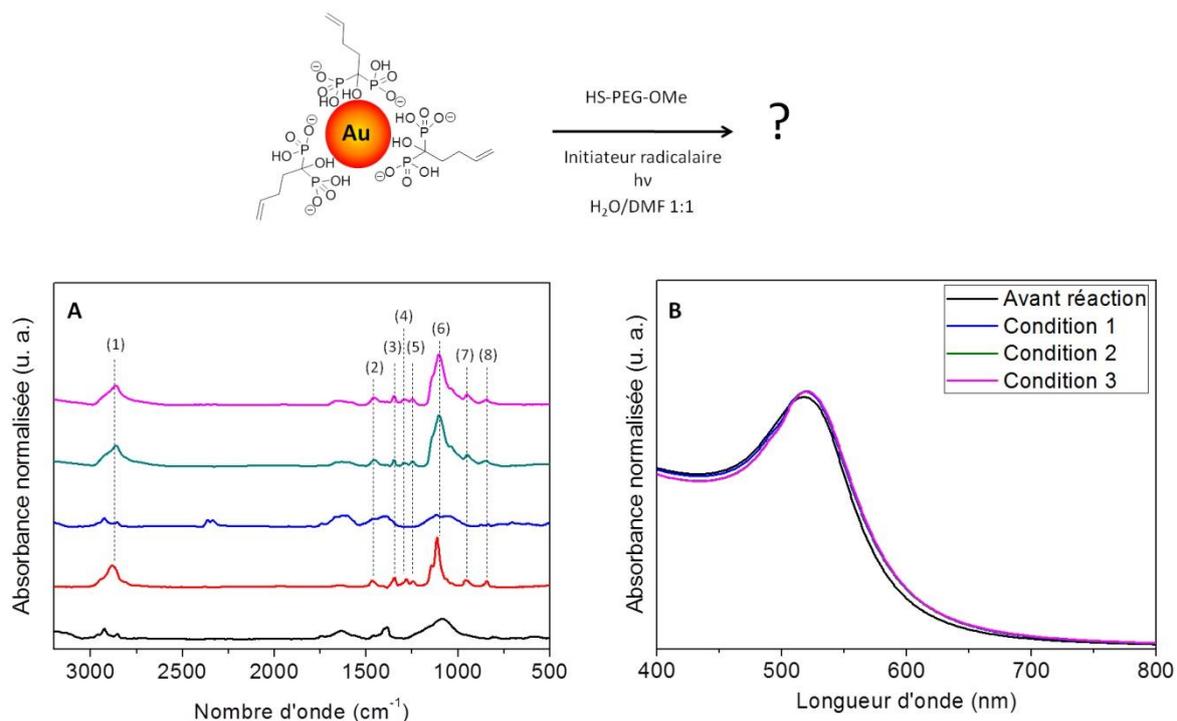


Figure 62. Évaluation qualitative de la réactivité du HS-PEG sur les NPs Au@HMBPène dans différentes conditions: Spectroscopies IRTF et UV-Vis pour les NPs ayant réagi dans les conditions 1 (bleu), 2 (vert) et 3 (mauve) versus Au@HMBPène avant réaction (noir) et HS-PEG (rouge)

Pour la réaction effectuée dans les conditions 1, nous observons des signaux sur le spectre IRTF qui restent assez proches des NPs Au@HMBPène avant réaction (Figure 62 A). A contrario lorsque l'on augmente sa concentration d'un facteur 5 pour les conditions 2 et 3, nous retrouvons les bandes de vibrations caractéristiques des chaînes PEG : les élongations des C-H à 2864 cm⁻¹ (1), les cisaillements des C-H à 1462 cm⁻¹ (2), les déformations des CH₂ à 1349 cm⁻¹ (3), les élongations des C-O à 1282 cm⁻¹ (4) et 1246 cm⁻¹ (5), les élongations des C-O-C à 1115 cm⁻¹ (6) et les « rocking » des C-H à 957 cm⁻¹ (7) et 845 cm⁻¹ (8). Dans chacune de ces conditions l'absorbance UV-vis des NPs ne varie pas, ce qui témoigne de l'absence de formation d'agrégats (Figure 62 B). Il n'y a donc pas de différence avec ou sans catalyse radicalaire, l'adsorption du polymère se fait vraisemblablement par échange de ligand même s'il est en défaut par rapport aux molécules de HMBPène chimisorbées.

3.4. Bilan

Nos résultats montrent que la stratégie de la réaction thiol-ène pour la post-fonctionnalisation des NPs est limitée par deux inconvénients majeurs. Lorsque le thiol est introduit à 0,12 équivalent par rapport au HMBPène, l'échange de ligand est négligeable (conformément à ce qui a été vu au chapitre 2), mais le rendement du couplage est trop faible pour observer le composé en surface. D'autre part, augmenter la concentration en thiol favorise l'échange de ligand. Notons que les dispersions aqueuses de NPs d'or utilisées absorbent fortement à 360 nm, ce qui peut diminuer fortement l'efficacité du clivage radicalaire de l'hydroxycyclohexylphényl cétone et de surcroît à ce niveau de dilution. Cette stratégie est donc difficilement applicable puisqu'il serait nécessaire de trouver une concentration optimale en thiol et en initiateur radicalaire (si elle existe) afin de rendre le processus chimiosélectif.

4. Cycloaddition d'un composé tétrazine

La voie de la cycloaddition des tétrazines est une stratégie qui présente deux avantages par rapport à celles qui ont été étudiées ci-dessus. Elle ne nécessite pas de catalyseur ni de photoactivation contrairement à d'autres réactions « Click » de cycloaddition sur les alcènes avec des tétrazole,¹⁶⁷ des azirines¹⁶⁸ ou encore des aldéhydes.¹⁶⁹ Ces réactions ont déjà été utilisées avec des NPs magnétofluorescentes pour le biomarquage,¹⁷⁰ mais également pour la biofonctionnalisation de « quantum dots ».¹⁷¹

Nous avons tout d'abord évalué la réactivité du 3,6-di-2-pyridyl-1,2,4,5-tétrazine (pyTz), un composé commercial et hydrosoluble, sur le HMBPène avec les techniques classiques de synthèse organique. Ensuite nous avons adapté les conditions réactionnelles pour réaliser et caractériser le couplage sur les NPs Au@ HMBPène.

4.1. Réactivité du pyTz sur le HMBPène

4.1.1. Conditions optimisées pour la synthèse organique

La cycloaddition sur le HMBPène a été réalisée à température ambiante avec un taux de conversion de 100 % lorsque le pyTz est introduit en excès (deux équivalents) et à pH < 1. La réaction n'est pas complète lorsque l'on s'astreint aux quantités stœchiométriques puisque l'on observe dans ces conditions une dégradation du pyTz que nous étudierons ultérieurement. Tel que décrit par Carboni et ses collaborateurs,¹⁵⁵ on obtient un composé

dihydropyridazine, sous deux formes tautomères. Au cours de la réaction les dihydropyridazines 1 et 1' vont s'oxyder partiellement en pyridazine 2, ce qui est favorisé thermodynamiquement par la restauration de l'aromaticité (Schéma 15).

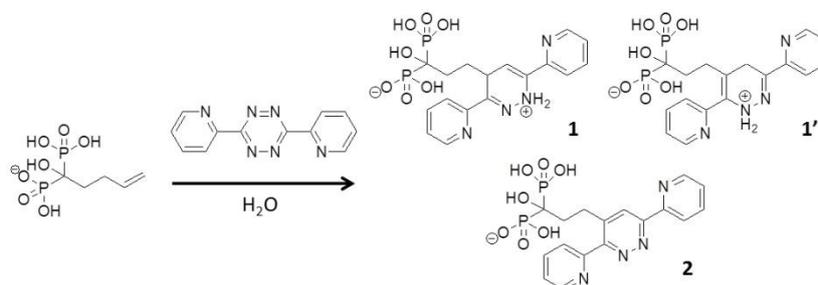


Schéma 15. Cycloaddition du pyTz sur le HMBPène à température ambiante en conditions acides

Après un lavage en phase organique pour éliminer l'excès de réactif et les sous-produits de la dégradation, le mélange a été analysé par RMN ¹H et ³¹P (Figure 63). Sur le spectre ¹H, on peut aisément distinguer les 3 composés par les signaux des protons non aromatiques les plus déblindés. Le composé 1 présente un doublet à 5,7 ppm pour son proton éthylénique (bleu) et un multiplet à 4,0 ppm pour son proton aliphatique (vert) tandis que le composé 1' présente un singulet à 3,4 ppm pour ses protons aliphatiques (rouge). Le composé 2 présente un triplet à 3,2 ppm pour ses protons en position benzylique (rose) fortement déblindés par le cycle aromatique. Les intégrations normalisées montrent que leurs valeurs corrélerent avec celles qui sont mesurées sur le spectre du ³¹P (insertion dans la figure 63). Après 16 h de réaction nous obtenons donc un mélange constitué par 14 % de composé 1, 28 % de composé 1' et 60 % de composé 2.

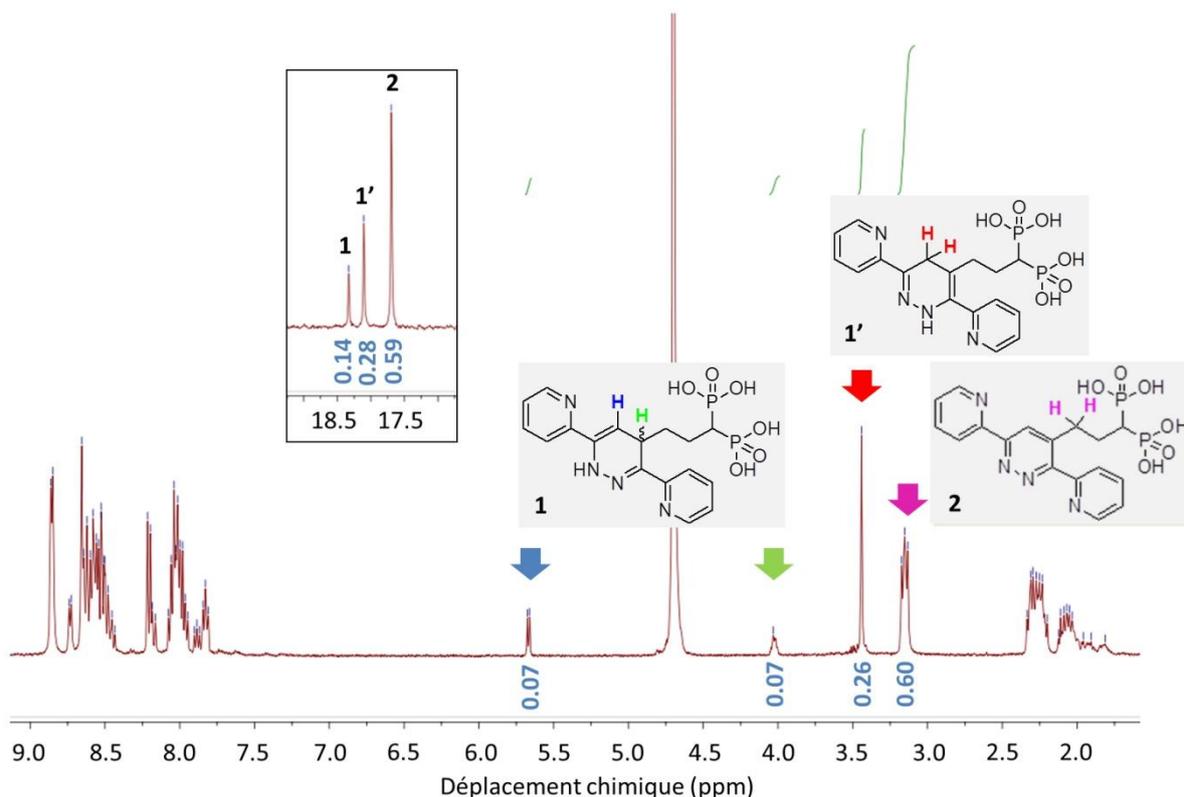


Figure 63. Étude RMN ^1H du mélange des trois produits de la réaction. En insère RMN ^{31}P du mélange réactionnel.

4.1.2. Obtention du produit oxydé et purification

Selon Knall et al. divers oxydants peuvent être utilisés pour former la pyridazine tel que des gaz azotés, le nitrite d'isoamyle, le peroxyde d'hydrogène ou encore le 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone.¹⁷² Afin de ne pas dégrader la fonction bisphosphonate, nous avons utilisé l'acide 3-chloroperbenzoïque (m-CPBA) qui est moins réactif que les réactifs cités précédemment. Bien que peu soluble dans l'eau, le m-CPBA est introduit en excès et sous forte agitation il permet d'oxyder totalement les composés 1 et 1' (Schéma 16).

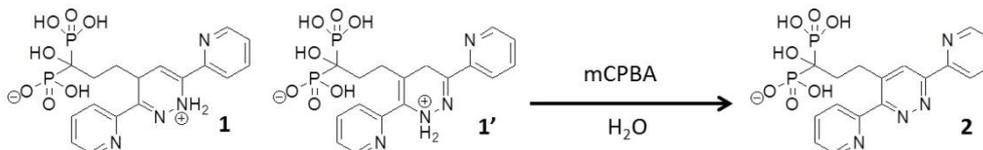


Schéma 16. Oxydation des formes tautomères de la dihydropyridazine

Le produit a été cristallisé dans le méthanol afin de le purifier et de le caractériser complètement par RMN (Figure 64), RMN 2D (Annexe 17) et spectrométrie de masse (Annexe 6). Notons que si le mélange des trois composés reste stable à l'équilibre en solution, après lyophilisation du mélange l'oxydation à l'air se produit sur la poudre. Par conséquent il semble difficile d'isoler les dihydropyridazine 1 et 1'.

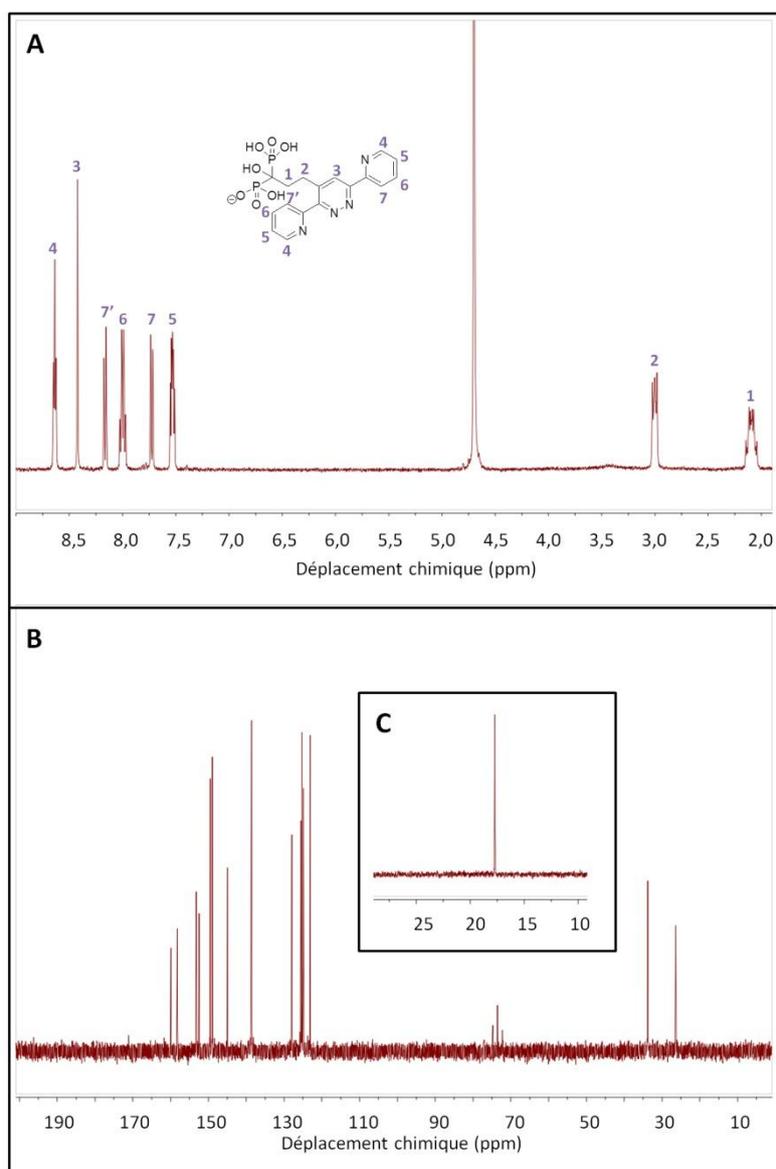


Figure 64. Caractérisation RMN ^1H (A), ^{13}C (B) et ^{31}P (C) du composé 2

Le spectre RMN ^1H est largement simplifié dans la zone des aromatiques par rapport au mélange (Figure 64). Le spectre RMN ^{13}C présente 15 singulets et 2 triplets (73,50 ppm et 26,38 ppm) ce qui correspond aux 17 carbones du composé 2, dont les deux plus proches des groupements phosphonates couplent avec les phosphores. La présence d'un seul signal en RMN ^{31}P confirme que notre réaction d'oxydation est achevée.

4.1.3. Étude cinétique

Knall et al. ont évalué la cinétique réactionnelle de diverses oléfines sur le pyTz par suivi en spectrométrie UV-Vis dans le méthanol.¹⁷³ Nous nous sommes inspiré de cette méthode pour calculer la constante cinétique de notre réaction. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le pyTz se dégrade à pH acide. D'un point de vue expérimental, la formation de bulles est observée quelques heures après la préparation de la solution, ce qui suggère une formation de diazote par l'ouverture du cycle tétrazine. Si l'on reprend le mécanisme proposé par Carboni et al. il est attendu la formation du picolinonitrile (Schéma 17).¹⁵⁵

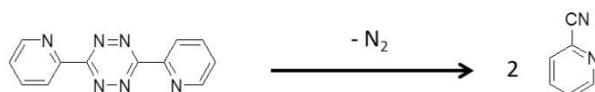


Schéma 17. Dégradation du pyTz

La concentration du pyTz peut être évaluée par spectrométrie UV-vis car elle est proportionnelle à son absorbance à 516 nm, qui est un maximum local sur son spectre d'absorption (Annexe 7). Nous nous sommes d'abord attachés à quantifier la cinétique de la dégradation du pyTz pour, ensuite, la prendre en compte dans la détermination de la constante cinétique globale. La concentration en pyTz a été fixée à 1 mM et l'évolution de l'absorbance a été suivie au cours du temps (Figure 65). Il est observé une diminution linéaire de la concentration en pyTz. La réaction de dégradation est donc d'ordre 0 et de constante $k_{deg} = (6,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-8} M^{-1} \cdot s^{-1}$ (détail des calculs en Annexe 8).

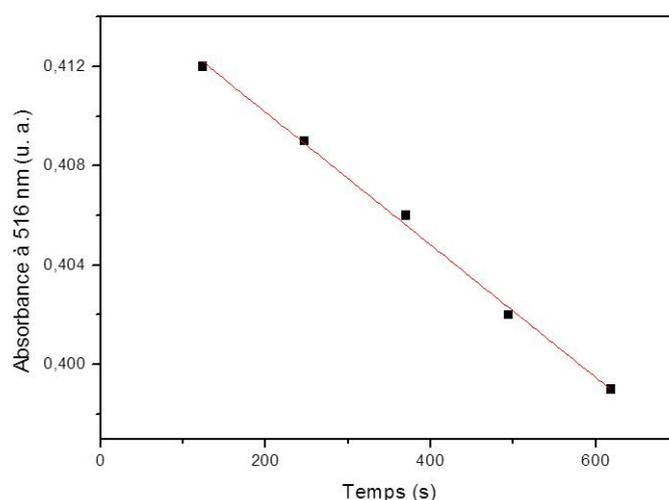


Figure 65. Suivi cinétique de la dégradation du pyTz en solution à pH = 1

En effet les réactions de Diels Alder à demande électronique inverse sont connues comme étant d'ordre global 2 avec des ordres partiels de 1 pour chacun des réactifs. Nous nous sommes donc placés en excès de HMBPène et la concentration de pyTz a été mesurée au cours du temps. L'expérience a été répétée pour différents excès de HMBPène. En prenant en compte la dégradation du pyTz, la linéarisation de $\ln([\text{pyTz}]/[\text{pyTz}_0])$ donne accès aux constantes cinétiques apparentes pour chacune des concentrations en HMBPène (Figure 66 A) et à la constante cinétique globale de la réaction $k = 0,024 \pm 0,004 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Figure 66 B - détail des calculs en annexe 8).

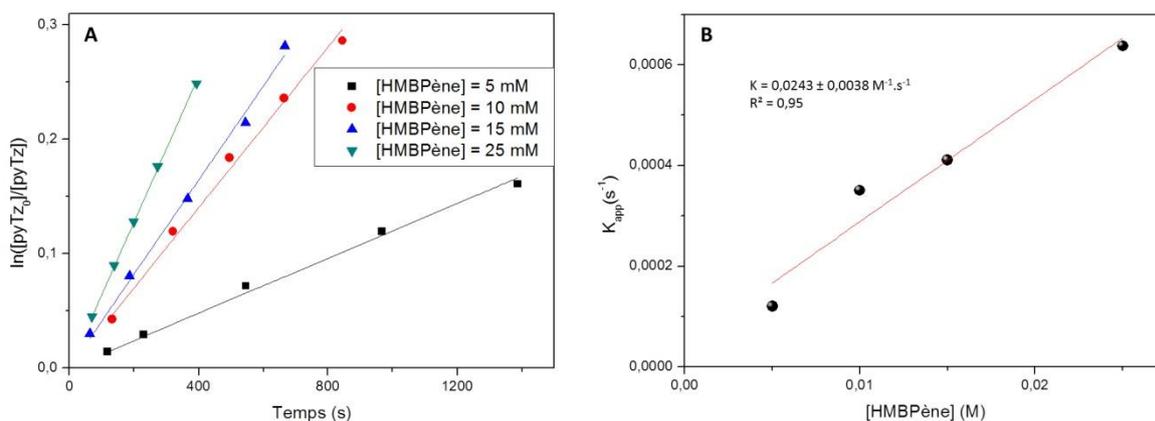


Figure 66. Détermination graphique des constantes cinétiques apparentes pour différentes concentrations en HMBPène (A) et de la constante cinétique globale de la réaction (B)

La vitesse de réaction est plus élevée que celle déterminée pour un alcène linéaire tel que le hex-1-ène ($k = 0,001 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) par Knall et al.¹⁷³ Ceci peut s'expliquer essentiellement par la différence de solvant, car selon les travaux de Wijnen et al., l'eau accélère la réaction du fait de son caractère fortement protique et participe à la stabilisation de l'intermédiaire activé.¹⁷⁴ Par ailleurs le pH acide participe à l'accélération de la cinétique, probablement par la protonation des amines aromatiques, ce qui amplifie l'effet électroattracteur.

4.1.4. Stabilité et réactivité en conditions douces

Après avoir caractérisé notre réaction par un protocole classique de synthèse organique, nous avons cherché à adapter cette expérience pour l'appliquer sur les dispersions aqueuses de NPs Au@HMBPène tout en préservant la stabilité colloïdale. Le pyTz

étant peu soluble dans l'eau à pH neutre, la réaction a été menée avec une concentration de l'ordre du millimolaire.

La Figure 67 présente la stabilité du pyTz suivi par RMN ^1H (Figure 67 A) ainsi que sa réactivité avec le HMBPène, suivi par RMN du ^{31}P (Figure 67 B). Deux conditions réactionnelles ont été comparées : à température ambiante (Figure 67 A2 et B2) et après 30 min à 80°C sous chauffage micro-ondes (Figure 67 A3 et B3).

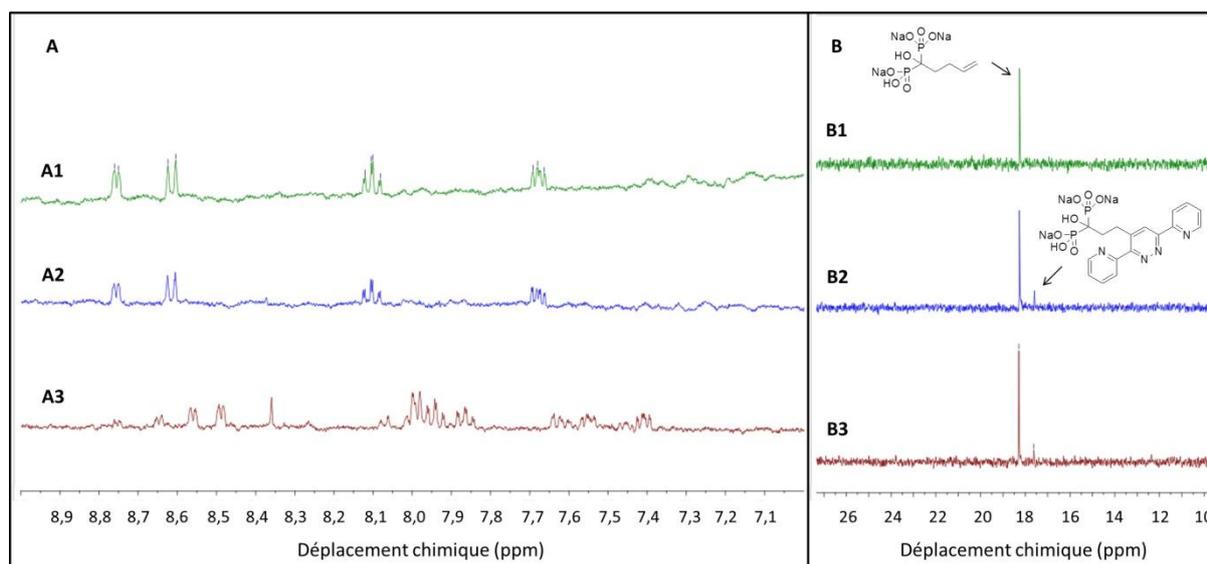


Figure 67. Étude comparative de la stabilité du pyTz par RMN ^1H (A) et du taux de conversion de la cycloaddition par RMN ^{31}P (B) en conditions douces. Les spectres sont enregistrés à $t = 0$ min (A1 et B1), après 16 h à température ambiante (A2 et B2) et après 30 min de chauffage micro-onde à 80°C (A3 et B3). Les concentrations sont fixées à $[\text{pyTz}] = [\text{HMBPène}] = 1 \text{ mM}$.

Notre première étude montre que le pyTz reste stable à température ambiante puisque son spectre proton n'évolue pas après 16 h tandis que lorsque l'on utilise le chauffage micro-ondes les signaux des sous-produits apparaissent. Lorsque l'on ajoute un équivalent de HMBPène, l'apparition du pic du composé 2 sur les spectres ^{31}P est observé pour les deux conditions de chauffage. Dans les deux cas un taux de conversion d'environ 13 % peut être estimé. Bien que ces conditions puissent être optimisées, elles permettent d'assurer que le couplage est toujours thermodynamiquement favorable.

4.2. Post-fonctionnalisation des NPs Au@HMBPène à pH neutre

La cycloaddition du pyTz sur NPs Au@HMBPène a donc été réalisée dans les conditions douces décrites ci-dessus, et dans un premier temps à température ambiante (Figure 68). Cette fois ci nous avons utilisé une solution concentrée de NPs de 10 nm de diamètre (synthèse décrite au chapitre 2 §6.3.) afin d'augmenter la surface disponible et en utilisant 10 équivalents de pyTz par rapport au HMBPène adsorbé.

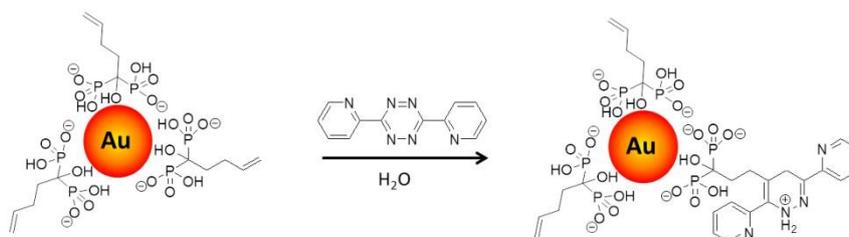


Figure 68. Cycloaddition du pyTz sur les NPs Au@HMBPène

4.2.1. Évolution des propriétés physico-chimiques

Après réaction nous n'observons pas de changement de couleur de la solution. Le spectre d'absorption UV-Vis présente un faible déplacement de la bande de résonance plasmon (Figure 69 A) tandis que la taille hydrodynamique reste invariante (Figure 69 tableau B). Ce phénomène peut être attribué à un changement de propriétés électroniques lié à une modification de l'habillage. Le potentiel ζ évolue de $-42,6 \pm 8,0$ mV à $-34,1 \pm 9,9$ mV (Figure 69 tableau C), ce qui peut s'expliquer par l'apparition de charges positives portés par les dihydropyridazines. Néanmoins la charge de surface est suffisamment négative pour garantir la stabilité des NPs, et d'autre part malgré l'excès de pyTz la désorption du HMBPène semble négligeable.

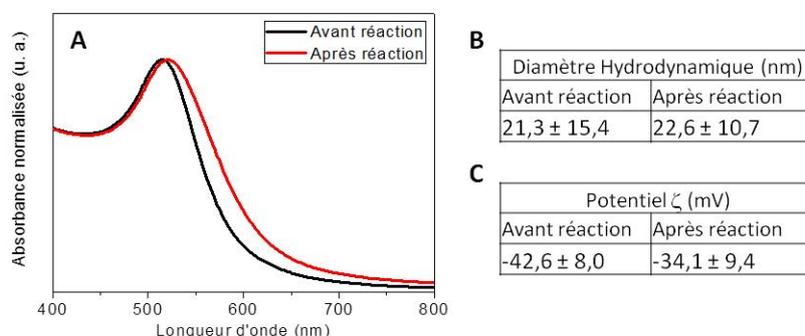


Figure 69. Évolution de l'absorption UV-Vis (A), du diamètre hydrodynamique (B) et du potentiel ζ (C) avant et après réaction à température ambiante

4.2.2. Caractérisations par spectrométrie IRTF

Le protocole de lavage requiert des ultrafiltrations avec une solution aqueuse de chlorure de sodium afin de séparer les paires d'ions ammonium - phosphonates et donc de s'affranchir des possibles adsorptions non spécifiques du réactif de départ.

La figure 70 présente les spectres IRTF des NPs avant et après réaction, ainsi que celui du composé 2.

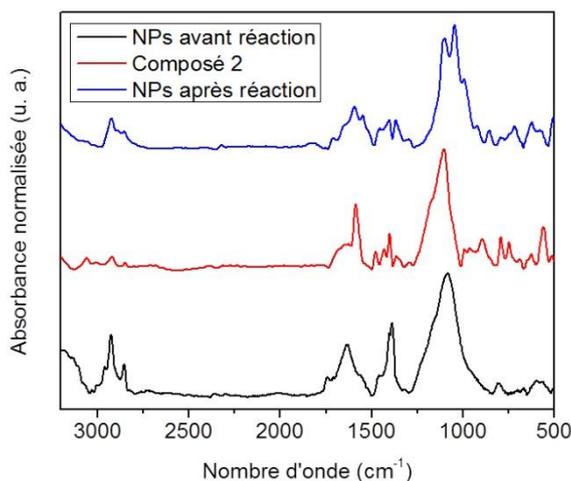


Figure 70. Comparaison des spectres IRTF des NPs avant et après réaction avec le composé 2

Après réaction le spectre infrarouge des NPs présente les trois bandes de vibrations caractéristiques des P-O autour de 1200 cm^{-1} avec l'effet de resserrement observé pour les NPs Au@HMBPène (Figure 70). On retrouve également la bande vibration d'élongation des liaisons C=C aromatiques à 1600 cm^{-1} ce qui suggère la présence de groupement pyridine.

Pour la pyridazine purifiée (composé 2) ces bandes sont légèrement modifiées par rapport au HMBPène (Chapitre 2 §5.2.2.) avec une faible intensité de la bande à 900 cm^{-1} , ce qui peut résulter des interactions zwitterioniques.

4.2.3. Caractérisations XPS

Les analyses XPS nous permettent ici de caractériser l'énergie des électrons 1s de l'azote pour la réaction de couplage (Figure 71). Tout d'abord le spectre de la pyridazine purifiée (composé 2) se réduit à la présence d'un unique pic à $399,0\text{ eV}$ qui peut être

attribué aux atomes d'azote aromatiques (Figure 71 A). Ensuite nous comparons les spectres des NPs Au@HMBPène avant (Figure 71 B) et après réaction, 16 heures à température ambiante ou 30 min à 80°C sous chauffage micro-ondes (Figure 71 B, C et D). Ces analyses confirment la présence d'un composé azoté après la réaction de couplage. Les spectres des NPs post fonctionnalisés sont identiques quel que soit le mode de chauffage, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en RMN ³¹P. Par ailleurs le signal XPS peut être décomposé à l'aide d'un fit Gaussien (70 %) -Lorentzien (30%) en deux pics distincts de LMH identique : un pic N1 à 399,1 eV et un pic N2 à 400,3 eV. Le pic N1 est donc identique à celui observé sur le produit pur, tandis que le pic N2 est classiquement attribué aux cations ammonium.¹⁷⁵ Bien que le niveau de bruit ne permette pas d'avoir une estimation précise des aires, on peut supposer que ce pic correspond à l'ammonium porté les dihydropyridazines. Les échantillons étant lyophilisés à pH neutre, les groupements pyridines ne sont pas sous forme protonée. De plus, la surface des NPs d'or, du fait de ses propriétés électroniques particulières, peut probablement favoriser ces formes tautomères plutôt que la forme oxydée.

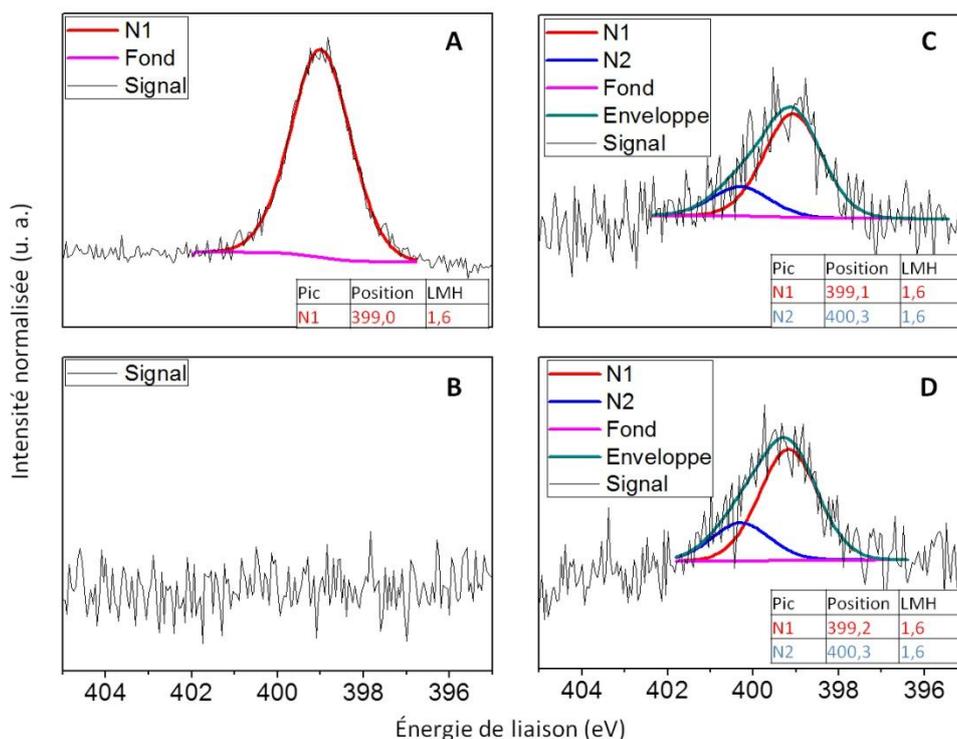


Figure 71. Énergie de liaison des électrons 1s de l'azote du composé 2 (A) versus NPs Au@HMBPène (B) et des NPs après réactions sous conditions micro-ondes (C) versus température ambiante (D)

Nous avons vu précédemment que le couplage du pyTz en conditions micro-ondes favorisait sa dégradation tandis qu'il restait stable à température ambiante. La similarité des

signaux obtenus dans les deux conditions réactionnelles montre qu'après lavage l'excès de pyTz ainsi que les sous-produits formés sous micro-ondes sont bien éliminés. Le couplage du pyTz est donc effectif sur la surface des NPsAu@HMBPène.

4.3. Post-fonctionnalisation des NPs Au@HMBPène à pH acide

Le taux de conversion et la cinétique réactionnelle de la cycloaddition du pyTz sur le HMBPène dépend fortement du pH. Afin de tenter d'améliorer le rendement de couplage, la réaction a été étudiée sur les NPs Au@HMBPène en se plaçant à pH acide (pH= 3).

La figure 72 présente l'évolution de l'absorbance UV-Vis des NPs au cours du temps en présence du pyTz à pH = 3 ainsi qu'un échantillon témoin pour vérifier l'effet du pH.

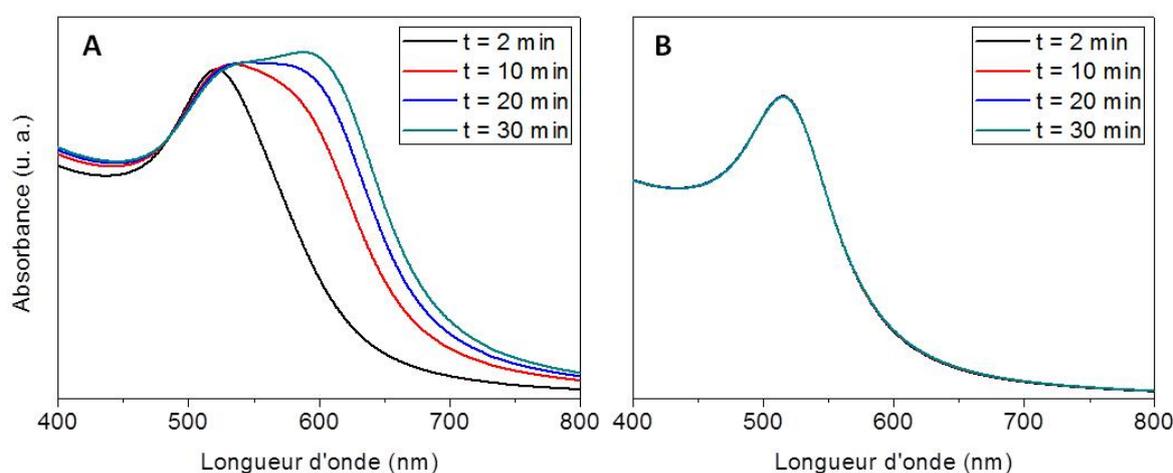


Figure 72. Évolution de la résonance plasmon des NPsAu@HMBPène en présence de 10 équivalents de pyTz (A) et sans pyTz (B) à pH = 3.

En présence de pyTz, le spectre d'absorption se déplace très rapidement vers le rouge indiquant une rapide agrégation des NPs. Le spectre d'absorption des NPs « seules » à pH = 3 reste invariant au cours du temps. Ceci indique que l'agrégation observée en présence de pyTz n'est pas due à un effet du pH.

D'autre part la cinétique de la réaction étant bien supérieure à la cinétique de dégradation du pyTz (§4.1.3.), l'agrégation observée pourrait être due à un π -stacking entre pyridazines. Ainsi en travaillant à pH=3 le rendement de réaction est supérieur mais il s'accompagne d'une perte de la stabilité des NPs. Une fois totalement agrégées les NPs ont été centrifugées puis analysées par spectrométrie IRTF (Figure 73).

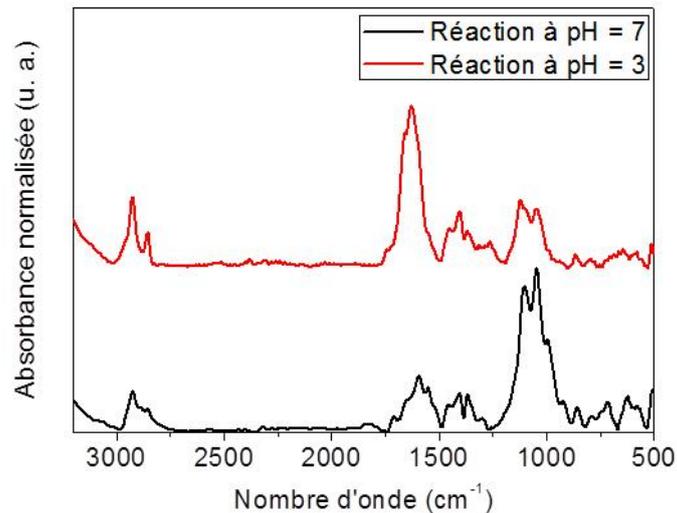


Figure 73. Comparaison des spectres IRTF des NPs après réaction pour pH = 7 et pH = 3

Les bandes de vibrations correspondantes aux élongations des C-C aromatiques (1600 cm^{-1}) sont beaucoup plus intenses par rapport aux bandes de vibrations des phosphonates (1200 cm^{-1}). Ainsi, comparativement à l'expérience menée à pH neutre, on peut affirmer que la quantité de pyridazine formée en surface des NPs est plus importante.

4.4. Variation du substrat tétrazine : utilisation d'un composé tétrazine fluorescent

Afin de montrer que la post-fonctionnalisation des NPs peut être appliquée de façon plus générale, la même méthode a été mise en œuvre avec un autre composé tétrazine : la 6-méthyl-tétrazine-sulfo-cy-5 (TzCy5), dérivé de la Cyanine 5 portant une fonction tétrazine (Figure 74). La Cyanine 5 est un fluorophore couramment utilisé pour l'imagerie en milieu biologique.¹⁷⁶ Ce composé absorbe et émet dans le proche infrarouge, région du spectre électromagnétique où les biomolécules ont une autofluorescence faible et où l'absorption des tissus est minimale.

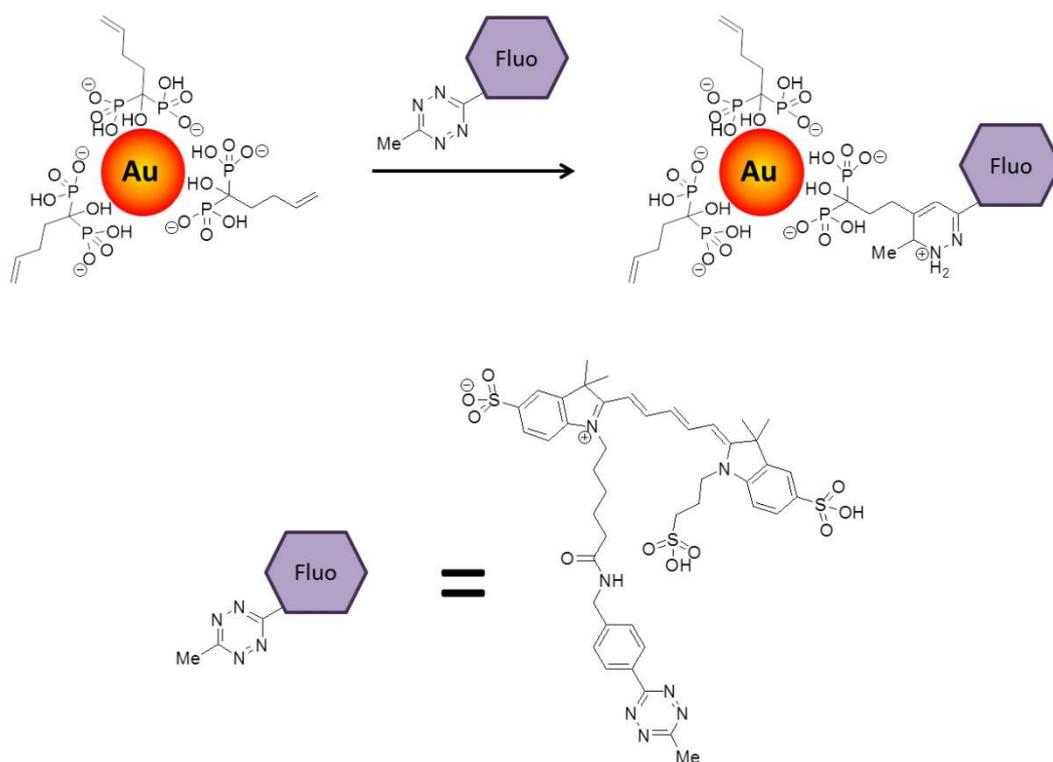


Figure 74. Cycloaddition d'un fluorochrome tetrazine sur les NPsAu@HMBPène

Le couplage du TzCy5 sur les NPs Au@HMBPène de 10 nm a été réalisé à pH neutre et dans des conditions similaires à celle décrite pour le couplage du pyTz, soit 10 équivalents de TzCy5 pour 16 heures de réaction à température ambiante. De même l'excès de TzCy5 est éliminé par des ultrafiltrations successives à l'aide d'une solution saline. Les dispersions de NPs d'or sont ensuite analysées par spectroscopies UV-Vis et de fluorescence (Figure 75).

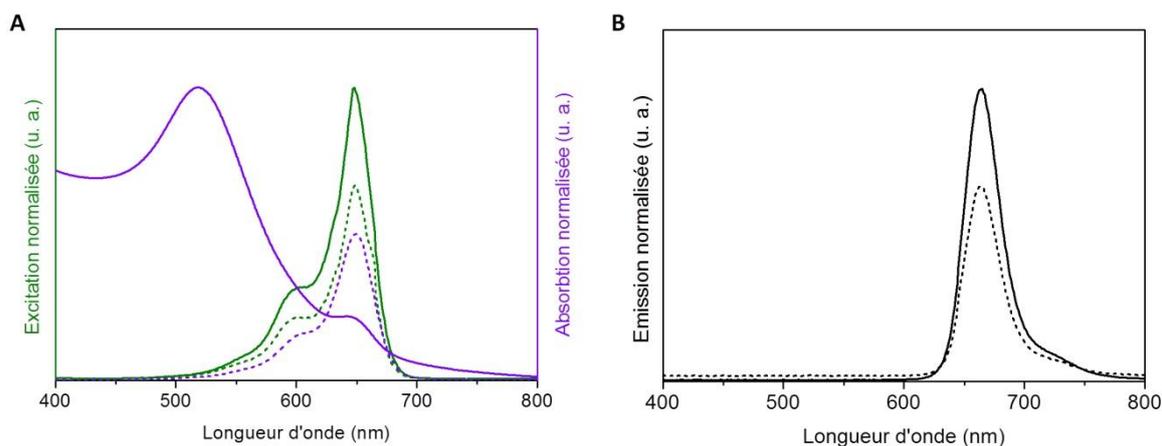


Figure 75. Propriétés optiques des NPs Au@HMBPène après réaction de couplage avec du TzCy5. Spectre d'absorption UV-Vis (A-Violet), spectre d'excitation (A-Vert) et d'émission (B-Noir) : NPs (trait) versus TzCy5 (Pointillés). Les intensités relatives des pics sont arbitraires.

Le spectre d'absorption des NPs après couplage présente, en plus de la bande de résonance plasmon à 520 nm, une bande à 648 nm. Cette partie du signal correspond au maximum d'absorption du TzCy5 ce qui témoigne de la présence du fluorophore à la surface des NPs. Les spectres d'excitations confirment cette interprétation puisque le spectre d'excitation des NPs@TzCy5 est totalement identique à celui du TzCy5. De plus les NPs ont un maximum d'émission à 668 nm, elles peuvent donc être utilisées comme sondes fluorescentes pour des applications en imagerie.

5. Conclusion

Nous avons étudié dans ce chapitre, différentes possibilités de couplage chimiosélectif sur les doubles liaisons C=C des NPs Au@HMBPène. Le couplage par métathèse à l'aide du catalyseur de Grubbs nous a fait mettre en évidence le problème inhérent à la stabilisation des NPs par des oxanions. En présence d'un complexe métallique, de surcroît peu stable en milieu aqueux, on peut favoriser un échange de ligand dans sa sphère de coordination. Cela peut provoquer la désorption des anions qui stabilisent la NPs d'or, mais rend également le catalyseur inefficace.

Les réactions de chimie « Click » apparaissent alors comme une alternative viable puisqu'elles sont efficaces en phase aqueuse. La post-fonctionnalisation par réaction thiol-ène est cependant difficilement applicable car elle nécessite un initiateur radicalaire qui

déstabilise les NPs, de plus elle semble peu efficace en condition diluée et non spécifique en condition concentrée. La cycloaddition des composés tétrazine est plus intéressante car elle ne nécessite pas d'initiateur ou de photoactivation. Après avoir décrit une réaction classique sur le HMBPène avec pour modèle le pyTz, ce composé est mis en réaction avec les NPs Au@HMBPène. Il peut être introduit en large excès sans qu'il ne déstabilise le colloïde. Les mesures hydrodynamiques ainsi que caractérisations de surface par spectroscopie IRTF et XPS ont permis de confirmer le couplage. De la même manière nous avons étendu cette stratégie de couplage à un composé d'intérêt pour l'imagerie en milieu biologique : le TzCy5.

La cycloaddition des tétrazines a donc été employée de façon originale pour la post-fonctionnalisation des NPs d'or. Cette stratégie nécessite de développer de nouvelles méthodes de caractérisations pour confirmer la structure des pyridazines formées en surface mais aussi estimer le rendement.

6. Matériel et méthodes

6.1. Matériel

Tous les réactifs sont commerciaux et ont été utilisés sans purification préalable. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un Spectromètre de Fluorescence Fluoromax (Horiba Jobin Yvon).

6.2. Méthodes

6.2.1. Métathèse

6.2.1.1. Métathèse interparticules

On prépare deux solutions de réactifs précurseurs. Une solution A de NPs Au@HMBPène de 14 nm (selon la méthode décrite au paragraphe §6.2. du chapitre 2) qui ont été lavées puis concentrées pour $[Au] = 5 \text{ mM}$. Une solution B de catalyseur d'Hoveyda-Grubbs seconde génération ($C_{31}H_{38}Cl_2N_2ORu$, 97%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à $320 \mu\text{M}$ (1,0 mg dans 5 mL de DMF). 700 μL de DMF, 200 μL de solution A et 100 μL de solution B sont introduits dans un tube micro-ondes de 4 mL. Le chauffage est programmé en trois étapes : (1) atteindre 100°C aussi vite que possible (2) maintenir 100°C pendant 5min (3) refroidissement. La vitesse de rotation de l'agitation magnétique est fixée à 1200 rpm. Les NPs sont diluées sur 10 mL d'eau puis lavées par cinq cycles d'ultrafiltration successifs.

6.2.1.2. Synthèse du N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide

273 mg (2,3 mmol) de chlorure de pent-4-énoyl ($\text{ClCO}(\text{CH}_2)_2\text{CHCH}_2$, 98%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sont introduits dans un monocol contenant 10 mL de DCM froid 300 mg (2,3 mmol) de N,N-diisopropylethylamine ($((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{NC}_2\text{H}_5$, 99%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sont ajoutés puis 267 mg (2,4 mmol) de 3-Azido-1-propanamine ($\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_4$, 90%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 heures. La phase organique est lavée successivement par 10 mL de solution de soude 1M, 10 mL de solution d'acide chlorhydrique 1 M et 10 mL d'eau pure. Le DCM est évaporé sous pression réduite. Le produit est dissout dans 10 mL d'éther diéthylique que l'on lave avec 10 mL de soude 1M. Après évaporation du solvant on obtient 214 mg de N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide pur (1,2 mmol 51% de rendement) sous forme d'huile brune.

^1H RMN (400 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 5,81 (m, 1H, $\text{HC}=\text{CH}_2$) ; 5,04 (dd, $J^3_{\text{trans}}(\text{H}-\text{H}) = 17,2$ Hz, $J^3_{\text{cis}}(\text{H}-\text{H}) = 10,4$ Hz, 2H, $\text{C}=\text{CH}_2$) ; 3,34 (dt, 4H, CH_2N_3 et $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$) ; 2,39 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$) ; 2,27 (dt, 2H, CH_2CONH) ; 1,78 (quint, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

^{13}C NMR (100.63 MHz, 25 °C, D_2O) : δ = 172,56 ; 137,11 ; 115,80 ; 49,51 ; 37,24 ; 35,97 ; 29,71 ; 28,96.

IR (KBr, pH = 7) : 3918 ; 2850 ; 2098 ; 1730 ; 1668 ; 1387 ; 1275 ; 1101 cm^{-1}

6.2.1.3. Métathèse du N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide sur les NPs Au@HMBPène

On prépare une solution C de N-(3-azidopropyl)pent-4-énamide à 800 μM (1,5 mg dans 10 mL de DMF). 600 μL de DMF, 200 μL de solution A, 100 μL de solution B décrites précédemment (§ 6.2.1.) et 100 μL de solution C sont introduits dans un tube micro-ondes de 4 mL. Le chauffage est programmé de la même façon que pour la métathèse interparticules (§ 6.2.1.). 10 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel obtenu et le surnageant est éliminé par 5 cycles d'ultrafiltration successifs en rinçant le filtrat avec de l'eau pure.

6.2.2. Thiol-ène

6.2.2.1. Test de stabilité des NPs Au@HMBPène en présence d'un initiateur radicalaire.

Une solution E1 de 1-hydroxycyclohexylphényl cétone à 0,5 M (1 mg dans 10 μL de DMF) est préparée ainsi qu'une solution E2 du même composé dilué à 50 μM . 10 μL de

solution E1, 100 μL de solution A décrite précédemment (§ 6.2.1.), 490 μL de DMF et 400 μL d'eau sont introduits dans un tube en verre et le mélange est irradié sous agitation pendant 1h30 à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). On répète la même procédure en remplaçant la solution E1 par la solution E2.

6.2.2.2. Réactivité du 4-nitrothiophénol sur les NPs Au@HMBPène en condition radicalaire

Une solution F de 4-nitrothiophenol à 100 μM (15,5 mg dans 1 mL de DMF) est préparée. 10 μL de la solution F, 480 μL de DMF, 400 μL d'eau ainsi que 10 μL de solution E1 et 100 μL de solution A décrite précédemment (§ 6.2.1.) sont introduits dans un tube en verre puis le mélange est irradié sous agitation pendant 1h30 à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). 10 mL d'eau sont additionnés au milieu réactionnel obtenu et le surnageant est éliminé par 5 cycles d'ultrafiltration successifs en rinçant le filtrat avec de l'eau pure.

6.2.2.3. Réactivité du poly(ethylene glycol) methyl ether thiol sur les NPs Au@HMBPène en condition radicalaire

Une solution I de PEG methyl ether thiol à 1 mM (2 mg dans 1 mL d'eau) est préparée. 10 μL de solution I, 950 μL de DMF ainsi que 50 μL de solution E1 et 1 mL de solution A décrite précédemment (§ 6.2.1.) sont introduits dans un tube en verre puis le mélange est irradié sous agitation pendant 1h30 à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). 10 mL d'eau est additionné au milieu réactionnel obtenu et le surnageant est éliminé par 5 cycles d'ultrafiltration successifs en rinçant le filtrat avec de l'eau pure.

6.2.3. Cycloaddition des tétrazines

6.2.3.1. Cycloaddition de la 3,6-di-2-pyridyl-1,2,4,5-tétrazine sur le HMBPène

23 mg de HMBPène (0,086 mmol) et 42 mg of pyTz (0,178 mmol) sont dissous dans 2 mL d'eau et 700 μL de HCl 1 M. Après une nuit sous agitation et à température ambiante on obtient un mélange de 3 produits (les deux formes tautomères (1 et 1') et la forme oxydée (2)) avec un taux de conversion de 100%. L'oxydation des composés 1 et 1' est achevée par ajout de 15 mg de m-CPBA (0,087 mmol) dans la solution et agitation pendant 5h à température ambiante. La phase aqueuse est lavée à l'éther, ajustée à pH 11, lavée au DCM

puis lyophilisée. 40 mg de poudre sont alors partiellement cristallisés dans 1 mL de MeOH et après séchage à l'air ambiant 16,4 mg de produit pur sont obtenus (0,032 mmol rendement 37%).

^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ = 8,72 – 8,55 (m, 2H) ; 8,42 (s, 1H) ; 8,16 (d, J = 8.0 Hz, 1H) ; 8,08 – 7,91 (m, 2H) ; 7,73 (d, J = 8,0 Hz, 1H) ; 7,53 (m, 2H) ; 3,14 – 2,84 (m, 2H) ; 2,09 (m, 2H).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, D_2O) δ = 159,94 (s) ; 158,24 (s) ; 153,22 (s) ; 152,48 (s) ; 149,48 (s) ; 148,96 (s) ; 144,96 (s) ; 138,66 (s) ; 138,59 (s) ; 127,94 (s) ; 125,51 (s) ; 125,24 (s) ; 124,88 (s) ; 123,08 (s) ; 73,50 (t, $J^1(\text{C-P})$ = 128,1 Hz) ; 33,78 (s) ; 26,38 (t, $J^2(\text{C-P})$ = 7.2 Hz).

^{31}P $\{^1\text{H}\}$ RMN (162 MHz, D_2O) δ = 17,73 (s).

HR-MS (ESI-Q Tof) $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_7\text{N}_4\text{P}_2$: m/z (M-H): 453,07114; calc.: 453,0723.

6.2.3.3. Suivi cinétique de la cycloaddition de la 3,6-di-2-pyridyl-1,2,4,5-tétrazine sur le HMBPène

Les solutions de réactifs sont ajustées à pH 1 et mélangées dans une cuve de spectrométrie UV-vis pour une concentration en pyTz de 1mM et des concentrations en HMBPène de 5, 10, 15 et 25 mM. La diminution de la concentration en pyTz est suivit par la mesure de l'absorbance à 516 nm. Les constantes cinétiques apparentes sont obtenues par la méthode de la dégénérescence de l'ordre, en linéarisant le $\ln([\text{pyTz}]/[\text{pyTz}_0])$ en fonction du temps et en prenant en compte la dégradation de la tétrazine. La régression linéaire des constantes apparentes en fonction de la concentration en HMBPène donne accès à la valeur de la constante cinétique globale de la réaction.

6.2.3.4. Cycloaddition de la 3,6-di-2-pyridyl-1,2,4,5-tétrazine sur les NPs Au@HMBPène

Une solution mère à 10 mM de 3,6-di-2-pyridyl-1,2,4,5-tétrazine est préparée en dissolvant 2,4 mg de réactif dans 1 mL de solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M. Cette solution est diluée au dixième sur 1 mL en prenant soin de neutraliser le pH avec environ 100 μl de solution de soude à 0,1 M. 1 mL de solution de NPs Au@HMBPène de 10 nm (selon la méthode décrite au paragraphe 2.3. du chapitre 2) lavées puis concentrées pour $[\text{Au}] = 5$ mM est ensuite additionné. Après une nuit sous agitation et à température ambiante le surnageant est éliminé par 2 cycles d'ultrafiltration successifs en rinçant le filtrat avec une solution aqueuse de NaCl à 20 mM puis 3 cycles avec de l'eau pure.

Chapitre 4

SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES PAR DES MOLÉCULES PHOSPHORÉES PORTANT DES POLYÉTHYLÈNES GLYCOLS

Chapitre 4 : SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES PAR DES MOLÉCULES PHOSPHORÉES PORTANT DES POLYÉTHYLÈNES GLYCOLS

Dans ce chapitre, nous présentons la synthèse de NPs d'or « pegylées » fonctionnalisées, en utilisant la stratégie « one pot » développés au chapitre 2. Pour réaliser cette synthèse, nous avons utilisés des composés PEG fonctionnalisés par des fonctions phosphonates et des groupements carboxyles. Ce caractère bifonctionnel des molécules « pegylées » nous permet d'envisager la post-fonctionnalisation des NPs. En supposant une chélation de la surface par les groupements phosphonates, les groupements carboxylates libres restent disponibles pour une réaction de couplage. Nous évaluerons d'abord différents protocoles de synthèses pour le contrôle de la morphologie des NPs. Ensuite nous étudierons la stabilité du colloïde ainsi que la post-fonctionnalisation par couplage d'un fluorophore. Pour finir nous présenterons une étude de la cytotoxicité de ces NPs sur des cellules cancéreuses de la prostate.

1. Introduction

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les polymères sont fréquemment utilisés pour fonctionnaliser la surface des nanoparticules (NPs). L'usage en milieu biologique du polyéthylène glycol (PEG) remonte à plusieurs décennies,¹⁷⁷ ce polymère étant reconnu comme biocompatible et biodégradable. Sur les NPs en général, l'habillage par le PEG permet donc d'améliorer la stabilité colloïdale en milieu biologique et la furtivité *in vivo* des nanoparticules.¹⁷⁸ Il se révèle être un moyen efficace pour diminuer l'adsorption non spécifique de protéines sur la surface des NPs, et ainsi éviter le phénomène d'opsonisation.¹⁷⁹ En effet, la présence d'opsonines (comme les anticorps) sur les NPs induit leur reconnaissance comme corps étranger par le système immunitaire. Les macrophages, qui possèdent des récepteurs spécifiques, procèdent alors à l'endocytose. C'est pourquoi la « pegylation » des NPs est décrite dans la littérature comme un moyen efficace de lutter contre l'internalisation des NPs par les cellules du système réticulo-endothélial et donc leur élimination prématurée du système vasculaire. *In vivo*, cela se traduit par une diminution de l'interaction avec les protéines aboutissant à une augmentation du temps de circulation. Dans le cas du traitement de tumeurs cancéreuses, les NPs « pegylées » cible passivement des tumeurs par effet EPR (paragraphe §4.2. Chapitre 1). L'habillage des NPs d'or par des composés de type

thiol PEG a été étudié afin de démontrer l'amélioration de leur stabilité colloïdale en milieu biologique.

2. Synthèse des HMBP-PEG

Les composés HMBP-PEG que nous utiliserons pour la synthèse de NPs sont synthétisés par voie thiol-ène. Cette méthodologie a été choisie afin de simplifier la synthèse et d'utiliser des polymères commerciaux bien caractérisés. En effet plusieurs synthèses de bisphosphonates PEG ont déjà été décrites mais basées sur des processus multi-étapes faisant intervenir des réactions de protection-déprotection et des conditions réactionnelles drastiques. Notre approche plus simple utilise le HMBPène précédemment décrit sur lequel il est aisé de condenser des thiols par réaction thiol-ène. Nous développerons ici l'exemple du composé issu de l'addition de l'acide poly(éthylène glycol) 2-mercaptoéthyl éther acétique (masse molaire moyenne en nombre, $M_n = 2100$ g/mol) sur le HMBPène.

On nomme HMBP-S-PEG₄₅-COOH le composé obtenu en faisant réagir le HMBPène avec deux équivalents de HS-PEG. La réaction est réalisée en présence d'un initiateur radicalaire, l'hydroxycyclohexylphényl cétone, dans un mélange binaire eau/DMF dégazé à l'argon, et avec 2h d'irradiation UV à température ambiante (Schéma 18). Après lavage et lyophilisation, on obtient le produit pur avec un rendement isolé de 81 %.

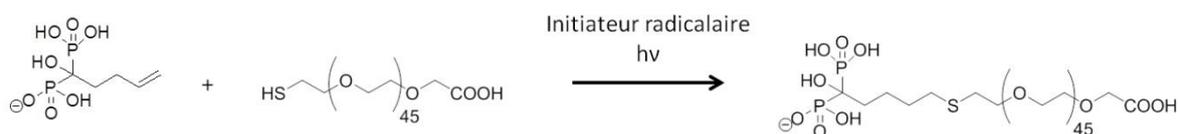


Schéma 18. Synthèse du HMBP-S-PEG₄₅-COOH

Le produit synthétisé a été caractérisé par RMN du proton (Figure 76 A). Il est important de dégazer les solvants à l'argon pour chasser le dioxygène solvaté afin d'obtenir uniquement le produit désiré. En effet lorsque la réaction est effectuée sans prendre cette précaution, ou bien en allongeant le temps de la réaction à 16 h, de nouveaux signaux apparaissent sur le spectre RMN ¹H en plus du produit de réaction (Figure 76 B). Cet autre produit est caractérisé par un multiplet à 1,7 ppm. De manière concomitante l'intensité des signaux à 1,5 ppm caractéristiques des protons en position 1 ou 2 des groupements phosphonates pour le produit attendu est diminuée. Le déplacement chimique observé pour ce nouveau multiplet, plus déblindé, peut s'expliquer par l'oxydation du pont sulfure (C-S-C). Afin de valider cette hypothèse, le mélange de produits obtenus a été traité avec un large

excès d'acide méta-chloroperbenzoïque (m-CPBA), afin d'achever l'avancement de la réaction l'oxydation. Deux modifications notables sont observées (Figure 76 C). Les triplets des protons 4 et 5 sont déplacés dans la zone des 3,0 - 4,0 ppm et les multiplets des protons en position 1 et 2 sont déblindés à 1,6 ppm et 1,7 ppm. L'absence de signaux à 1,5 ppm, 2,5 ppm et 2,7 ppm prouve bien qu'il ne reste plus de produit non oxydé. Les signaux des CH₂ des unités éthylène glycol entre 3,4 ppm et 3,7 ppm sont conservés sur chacun des produits.

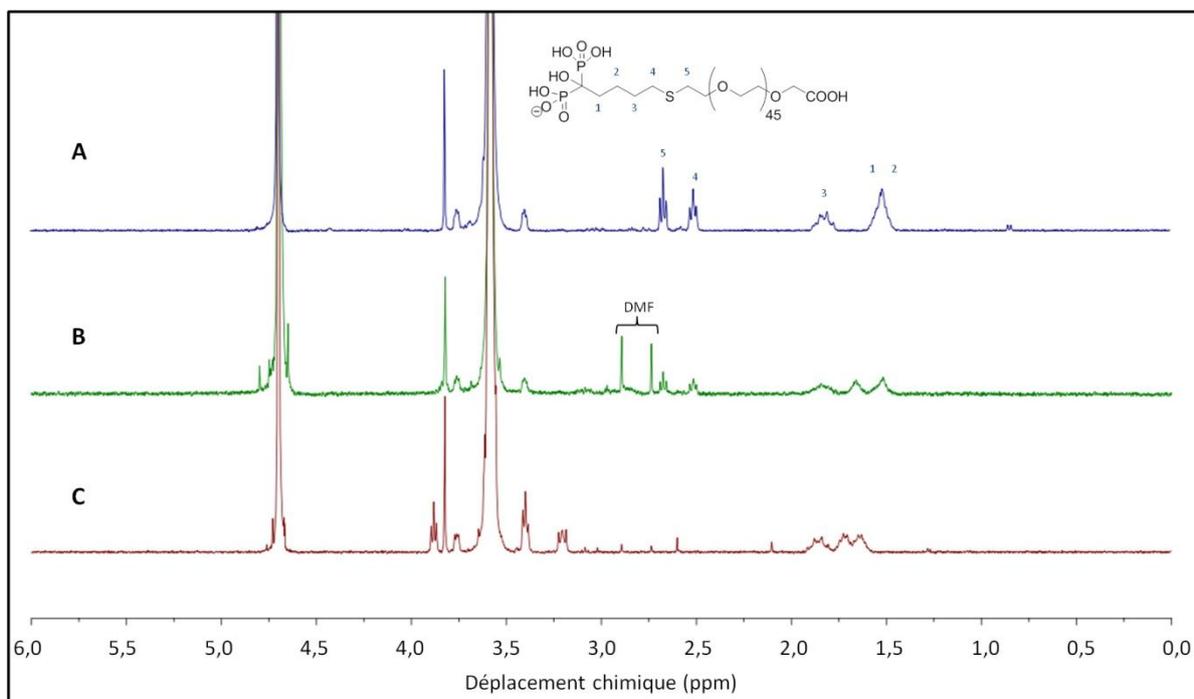


Figure 76. Étude RMN ¹H de l'oxydation du HMBP-S-PEG₄₅-COOH. Produit de la réaction thiol-ène en condition désoxygénée (A), en condition normale sur 16 heures (B) et après oxydation par quatre équivalents de m-CPBA (C).

Si le produit obtenu semble bien correspondre à un produit d'oxydation du pont sulfure, théoriquement, deux produits peuvent être générés par oxydation du soufre : un sulfinyle, dans le cas de la mono-oxydation, ou un sulfonyle dans le cas de la di-oxydation (Schéma 19).

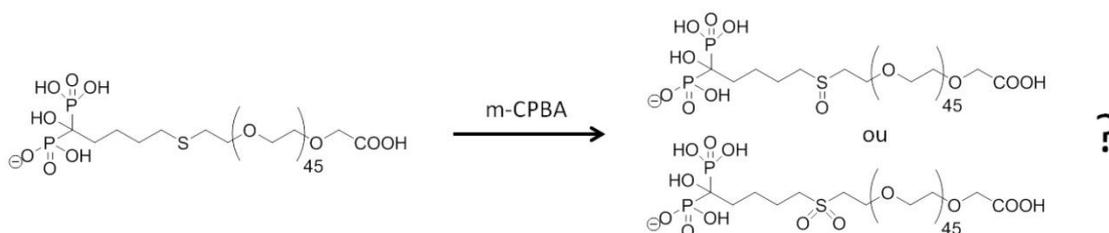


Schéma 19. Hypothèse des produits formés par oxydation du HMBP-S-PEG₄₅-COOH

Afin de caractériser le produit obtenu, l'oxydation a été étudiée sur un composé plus simple que l'on nomme HMBP-S-COOH issu du couplage thiol-ène et du HMBPène avec l'acide mercaptopropionique en condition désoxygénée (Schéma 20). Ce composé qui possède la même structure sur la partie HMBP-S que le HMBP-S-PEG₄₅-COOH, est obtenu à partir d'un produit moins coûteux que le HS-PEG₄₅-COOH. De plus la caractérisation RMN est plus aisée puisque ne présentant pas les multiples signaux correspondant aux protons de la chaîne polymérique.

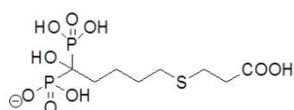


Schéma 20. HMBP-S-COOH

Le spectre RMN du HMBP-S-COOH est présenté figure 77 A . Ce composé a ensuite été placé en présence de quatre équivalents de m-CPBA. Après purification, le spectre RMN du proton (Figure 77 B) montre qu'il ne reste plus de HMBP-S-COOH car nous n'observons plus le massif à 1,5 ppm (Figure 77 A et B). Néanmoins la dissymétrie du massif à 1,7 ppm suggère la présence d'un mélange de deux produits. Si l'on réalise l'oxydation avec cinq équivalents de m-CPBA, une meilleure séparation des signaux présents dans la zone 1,6 ppm – 2,0 ppm est observé sur le spectre RMN (Figure 77 C), de façon similaire à l'oxydation du HMBP-S-PEG₄₅-COOH (Figure 77 C). Il semblerait donc que l'avancement de la réaction soit favorisé en présence d'un large excès de m-CPBA. Dans ces conditions, un début de dégradation du bisphosphonate a été observé (RMN du phosphore 31 en annexe 9). Les analyses par spectrométrie de masse indiquent la présence du sulfonyle après oxydation complète (Annexe 10).

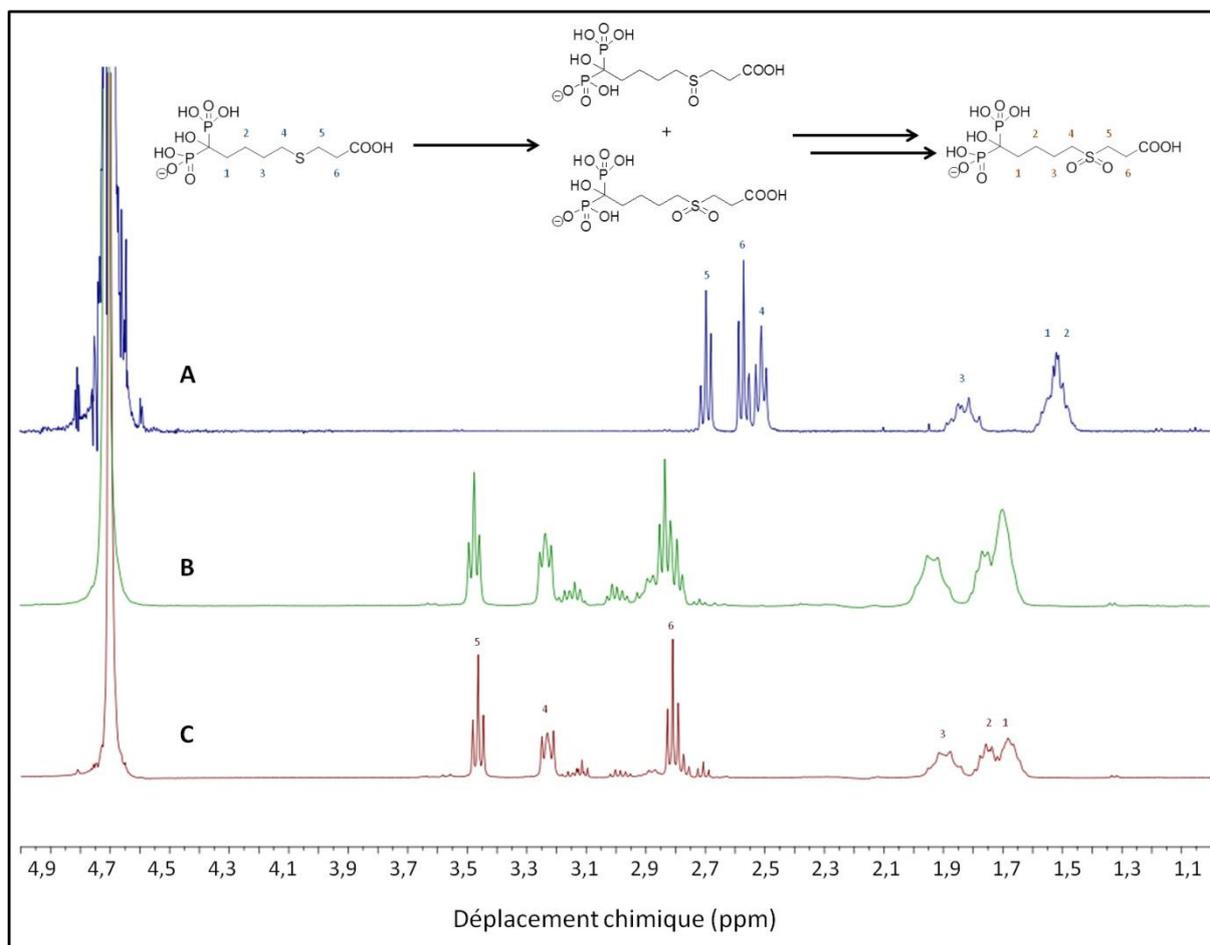


Figure 77. Étude RMN ^1H de l'oxydation du HMBP-S-COOH. Produit de la réaction thiol-ène en condition désoxygéné (A), après oxydation par quatre équivalents (B) et cinq équivalents de m-CPBA (C).

Si le HMBP-S-COOH est moins réactif que le HMBP-S-PEG₄₅-COOH, ces expériences montrent néanmoins que l'oxydation par le m-CPBA permet la formation du sulfonyle dans les deux cas. Nous avons donc à notre disposition pour la synthèse de NPs un lot de HMBP-S-PEG₄₅-COOH et un lot de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH. Notons que le HMBP-S-COOH peut être cristallisé de la même façon que le HMBPène,^{***} et qu'une fois à l'état de poudre nous n'avons pas observé d'oxydation du pont sulfure.

^{***} Dans un binaire eau/méthanol 1:9 on fixe préalablement le pH du HMBP à 2,3.

3. Synthèse des NPs Au@PEG

3.1. Synthèse des NPs Au@PEG par voie ligand-réducteur

3.1.1. Au@HMBP-S-PEG₄₅-COOH

Nous avons cherché dans un premier temps à reproduire une synthèse de NPs sous chauffage micro-ondes tel que cela a été vu au chapitre 2 en employant cette fois ci le HMBP-S-PEG₄₅-COOH comme ligand réducteur. Les synthèses sont réalisées pour des solutions de HMBP précurseurs à différents pH afin d'évaluer son influence sur la morphologie des NPs et en fixant le ratio HMBP/Au à 1:4. Les solutions après réaction sont de couleur rose de plus en plus translucides avec l'augmentation du pH. La figure 78 montre les spectres d'absorption dans les différentes conditions de pH.

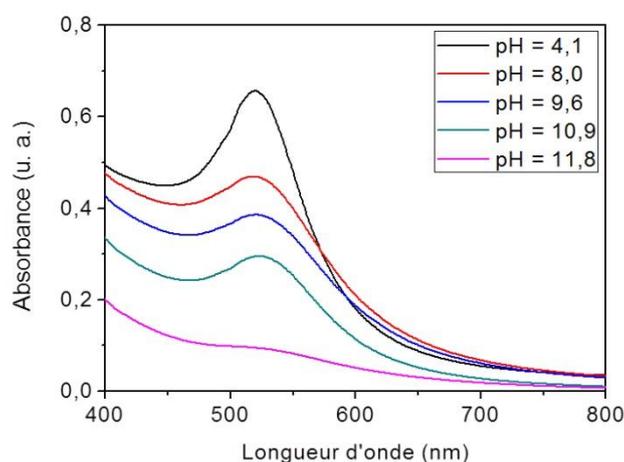


Figure 78. Spectres UV-vis des NPs Au@HMBP-S-PEG₄₅-COOH synthétisées par chauffage micro-ondes pour des solutions de HMBP-S-PEG₄₅-COOH à différents pH

La longueur d'onde au maximum d'absorption reste constante ($\lambda = 520$ nm) avec une densité optique décroissante lorsque le pH augmente. Si l'on augmente le temps de chauffage (de 10 à 20 min), nous n'observons pas de modification de l'absorption UV-Vis, ce qui nous indique que la réaction est achevée dans chacun des cas. Les clichés par MET des solutions obtenues pour chaque condition de pH révèlent que les populations de NPs ne sont pas homogènes en taille (Figure 79).

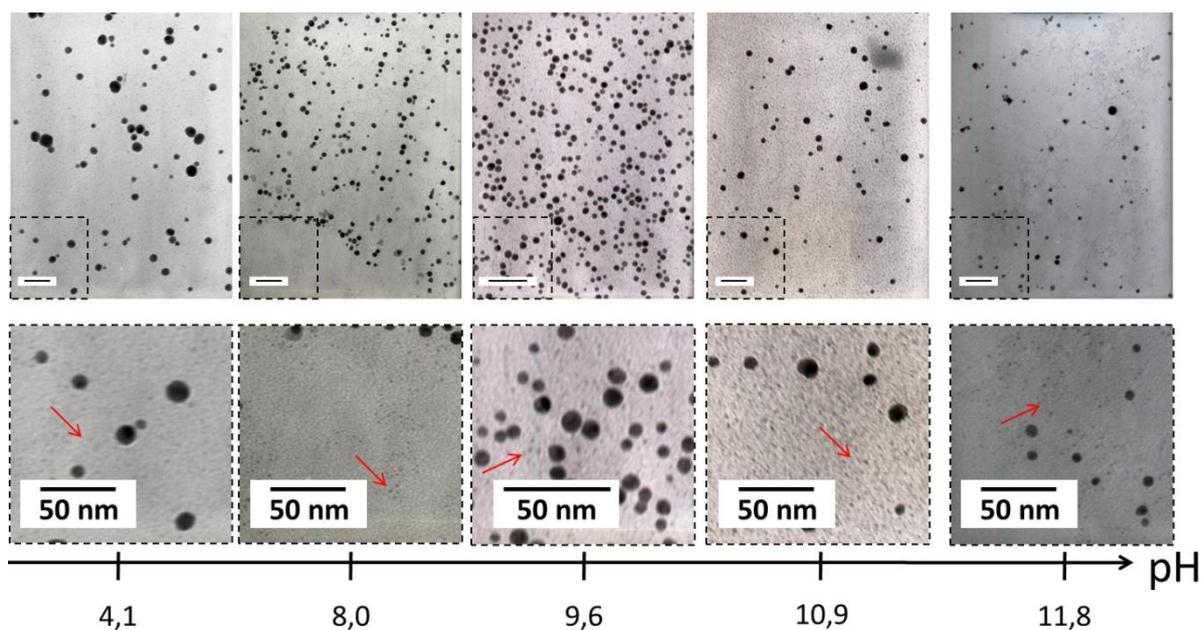


Figure 79. Photographies MET des NPs Au@HMBP-S-PEG₄₅-COOH synthétisées par chauffage micro-ondes pour des solutions de HMBP-S-PEG₄₅-COOH à différents pH

On constate que deux populations sont présentes : des nanosphères d'environ 10 nm de diamètre ainsi que des germes de l'ordre du nanomètre (flèches rouges dans les encarts en pointillés). Les germes étant répartis de façon non homogènes sur la grille de MET, il est difficile de réaliser une distribution en taille représentative. En comparant ces images avec les mesures d'absorption (Figure 78), on peut en déduire que la proportion de germes augmente avec le pH réactionnel puisque leur contribution dans la bande de résonance plasmon est moindre. Si l'on pose l'hypothèse que le mécanisme de formation des NPs est conforme aux principes énoncés dans les travaux de Wuithschick et al.³² alors les germes étant formés dans les premiers instants de la réaction, leur nombre important souligne une cinétique de réaction rapide. La structure du HMBP laisse penser que l'étape de réduction peut intervenir par deux phénomènes distincts : soit par l'oxydation du pont sulfure, soit par la dégradation partielle du bisphosphonate. Ces deux réactions peuvent se dérouler simultanément ce qui contribuerait à accélérer la cinétique réactionnelle. On peut donc émettre l'hypothèse que l'hétérogénéité en taille des NPs s'explique par une réaction trop rapide et en conséquence une croissance cristalline qui s'amorce avant la fin de la formation des germes (Figure 80).

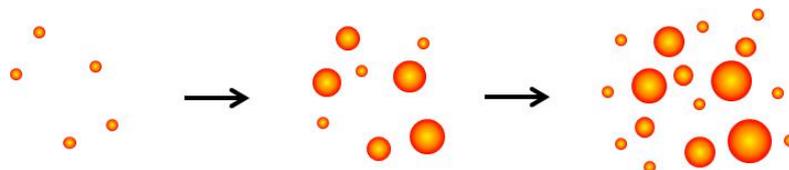


Figure 80. Hypothèse sur le processus de formation des NPs Au@HMBP-S-PEG₄₅-COOH

3.1.2. Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH

Afin de s'affranchir de l'oxydation potentielle du pont sulfure sur la formation des NPs, nous avons réalisé la synthèse de NPs à l'aide du HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. En spectroscopie UV-Vis, la longueur d'onde au maximum d'absorption des NPs varie peu (λ compris entre 523 nm et 530 nm) et contrairement au cas précédent la densité optique reste constante (Figure 81).

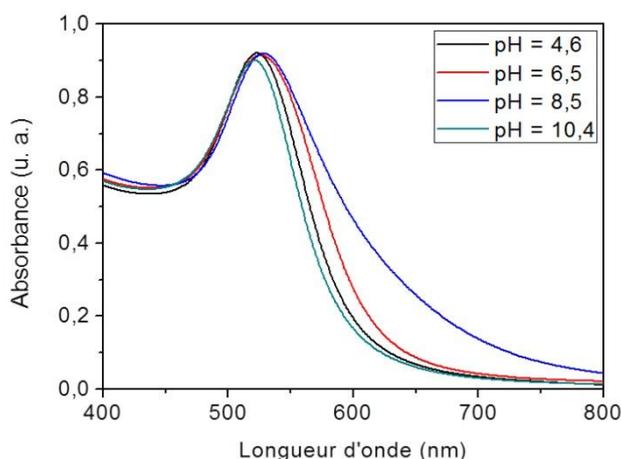


Figure 81. Spectre UV-Vis des NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH synthétisées par chauffage micro-ondes pour des solutions de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH à différents pH

On observe sur les clichés MET que les NPs sont polydisperses avec des tailles cristallines comprises entre 20 nm et 200 nm (Figure 82). L'absence de germes et la taille plus importante des NPs suggèrent une cinétique de réaction plus lente. Ainsi, le fait de s'affranchir du phénomène d'oxydation du pont sulfure au cours de la synthèse influence donc de manière significative la croissance cristalline. Néanmoins ce protocole ne permet pas de contrôler la taille et la forme des particules pour la gamme de pH testée.

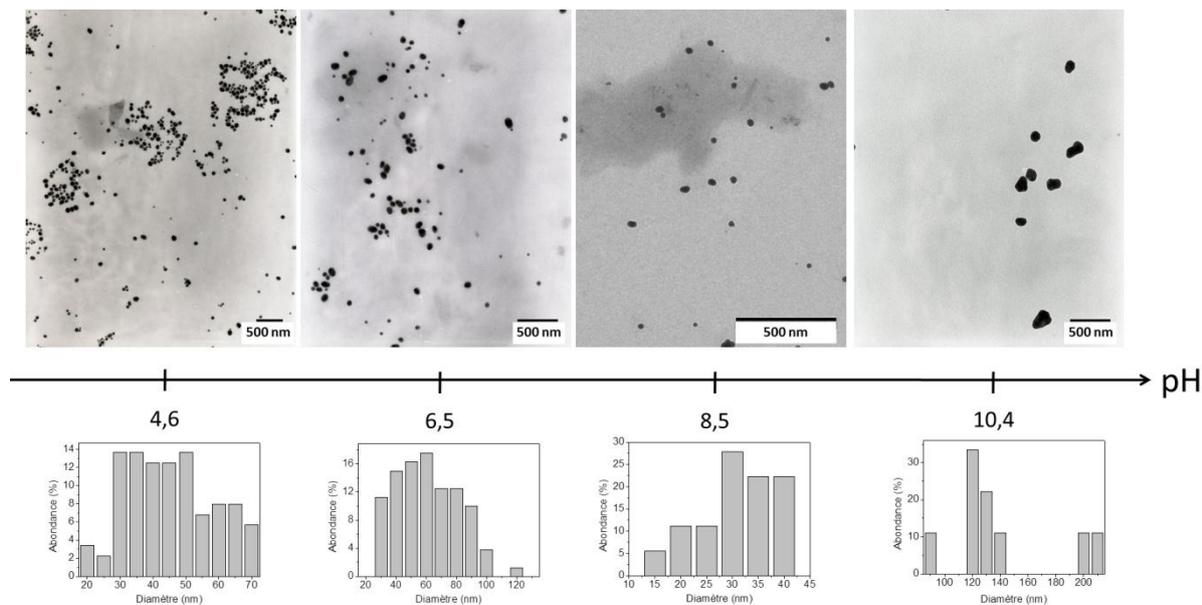


Figure 82. Clichés par MET des NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH synthétisées par chauffage micro-ondes pour des solutions de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH à différents pH

Dans le but de favoriser une nucléation plus rapide et homogène, ces expériences sont renouvelées avec le protocole élaboré pour le chauffage classique : la solution de HAuCl₄ est portée à ébullition puis est ajouté le HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH. La bande de résonance plasmon se situe autour de $\lambda = 522$ nm (Figure 83) quel que soit le pH de la réaction. Ces NPs observées par MET ont un diamètre compris entre 2 nm et 20 nm (Figure 84). Cette méthode, ne permet donc pas de résoudre le problème de la distribution de taille des nanosphères bien qu'elles soient plus petites.

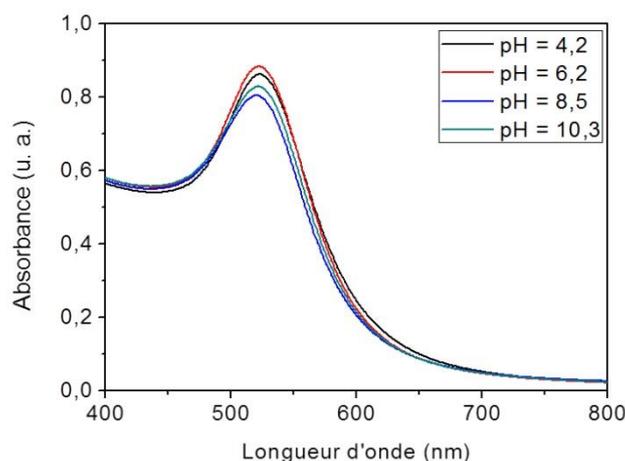


Figure 83. Spectres UV-Vis des NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH synthétisées par chauffage classique pour des solutions de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH à différents pH

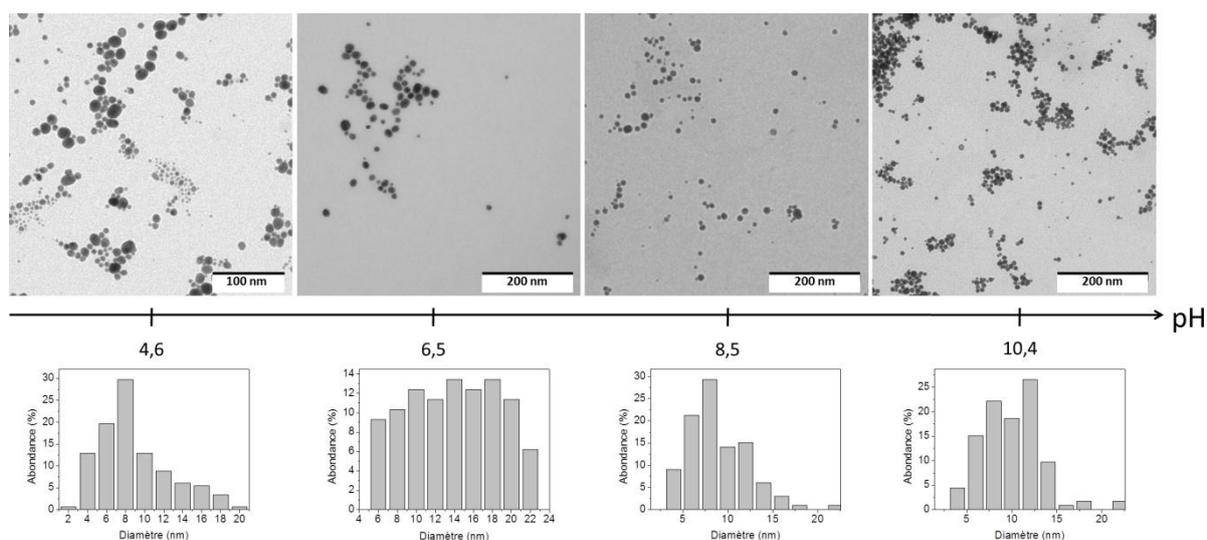


Figure 84. Clichés par MET des NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH synthétisées par chauffage classique pour des solutions de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH à différents pH

3.1.3. Effet de la longueur de la chaîne PEG

Nous avons étudié l'effet de la longueur de la chaîne PEG en réalisant la synthèse avec un composé analogue sans chaîne PEG : le HMBP-S-COOH, ainsi qu'un autre de poids moléculaire plus faible : le HMBP-S-PEG₄-COOH. Le pH de la solution précurseur est fixé à 10, le réducteur est introduit à quatre équivalents et la synthèse est réalisée par chauffage micro-ondes.^{†††} La dispersion de NPs obtenue est analysée par spectroscopie UV-Vis et par MET (Figure 85). Bien que les distributions de tailles soient hétérogènes dans les deux cas, nous pouvons constater que l'utilisation du HMBP-S-COOH comme ligand réducteur nous permet de former des NPs de diamètre inférieur à celles obtenues avec le HMBP-S-PEG₄-COOH. Cet exemple confirme que la structure du HMBP est un autre paramètre déterminant pour le contrôle de la taille et de la morphologie des NPs.

^{†††} Dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe §3.1.1. c'est à dire 20 min à 100°C.

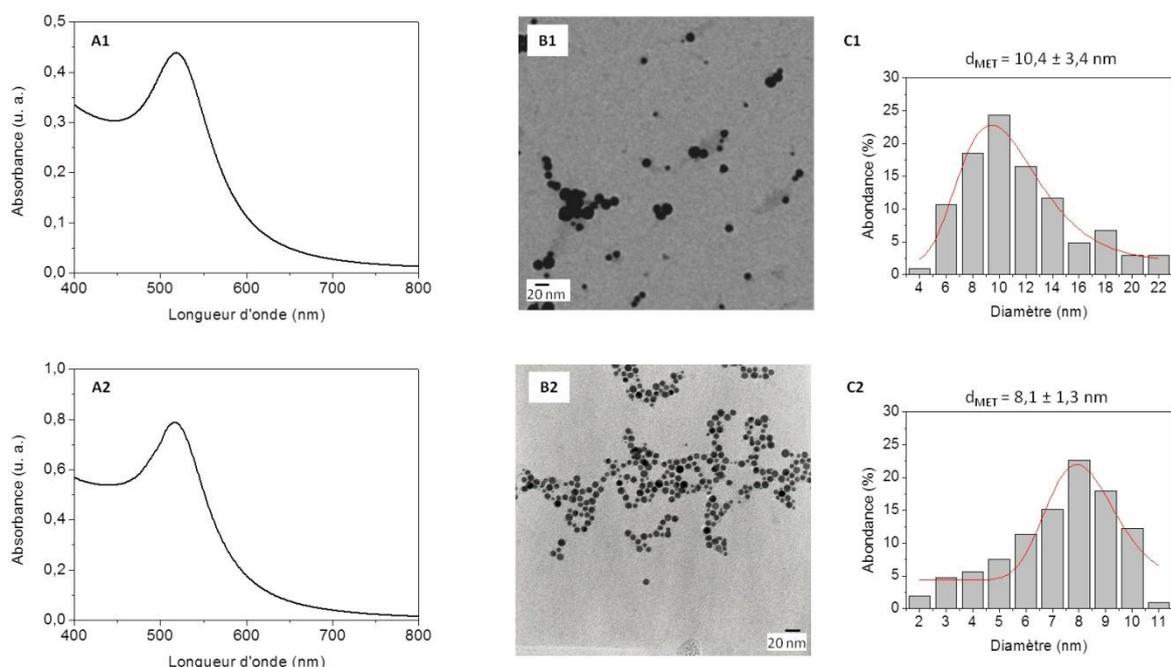


Figure 85. Synthèse par chauffage micro-ondes de NPs Au@HMBP-S-PEG₄-COOH et Au@HMBP-S-COOH : absorption UV-Vis (respectivement A1 et A2) et clichés par MET (respectivement B1 et B2)

3.1.4. Effet de la fonction phosphonate vs bisphosphonate

Nous avons également réalisé cette synthèse avec une molécule commerciale, le poly(éthylène glycol) méthyl éther phosphonate (P-PEG₄₅-OMe ; Schéma 21). À la différence de nos composés synthétiques, cette molécule ne présente pas de pont sulfure et elle est mono-fonctionalisée par un groupement phosphonate. Afin d'observer l'évolution de la couleur de la solution, nous travaillons ici en chauffage classique. Après 20 min de reflux nous n'observons pas le changement de couleur caractéristique de la formation de NPs. Selon les travaux décrits au chapitre 2, la réduction du complexe d'or par les HMBP fait intervenir la dégradation du pont P-C-P. Or le P-PEG₄₅-OMe ne présentant pas ce motif, il est donc logique que la réaction n'est pas lieu. Cela confirme ainsi le processus d'oxydoréduction proposé précédemment.

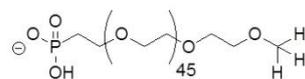


Schéma 21. P-PEG₄₅-OMe

3.1.5. Bilan

Ces premières expériences illustrent l'importance fondamentale de la structure du ligand réducteur dans le processus de formation des NPs. Il semble que la présence d'un pont sulfure dans la chaîne carbonée, et de surcroît proche de la fonction chélatante, accélère la réduction du complexe d'or. Ceci nous conduit à poser l'hypothèse que lorsque les complexes « Au^{III} » parviennent à la surface des NPs par diffusion, l'oxydation du pont sulfure en sulfinyle ou sulfonyle peut favoriser la croissance cristalline. (Figure 86).

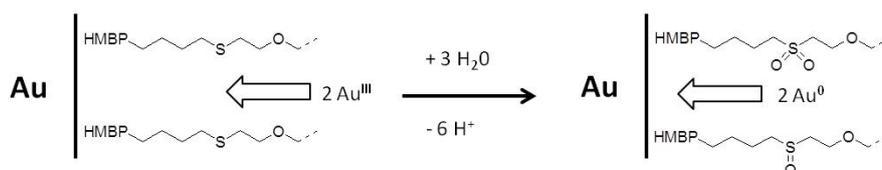


Figure 86. Hypothèse sur le mécanisme d'oxydoréduction en surface des NPs

Néanmoins l'utilisation d'un composé HMBP-PEG oxydé au préalable ne permet pas de former des dispersions homogènes de NPs. Afin de trouver des conditions expérimentales où le processus d'oxydoréduction serait contrôlé, nous avons réalisé les synthèses en utilisant un autre composé réducteur, l'ascorbate et en présence du HMBP-PEG en tant que ligand.

3.2. Synthèse des NPs Au@PEG avec l'ascorbate de sodium

L'acide ascorbique, plus connu sous le nom de vitamine C, est un réducteur couramment utilisé pour la synthèse de nanobâtonnets d'or.¹⁸⁰ Moins réactif que l'hydroborure de sodium et non toxique, ce composé réagit instantanément avec le complexe d'or à température ambiante. Afin de ne pas acidifier le pH réactionnel nous utiliserons la base conjuguée : l'ascorbate de sodium. Le protocole réalisé pour cette nouvelle voie de synthèse consiste à mélanger à température ambiante préalablement l'acide chloraurique, le HMBP-PEG (quatre équivalents, préalablement ajusté à pH =10), et d'ajouter dans un second temps l'ascorbate de sodium (deux équivalents) sous forte agitation (Figure 87).

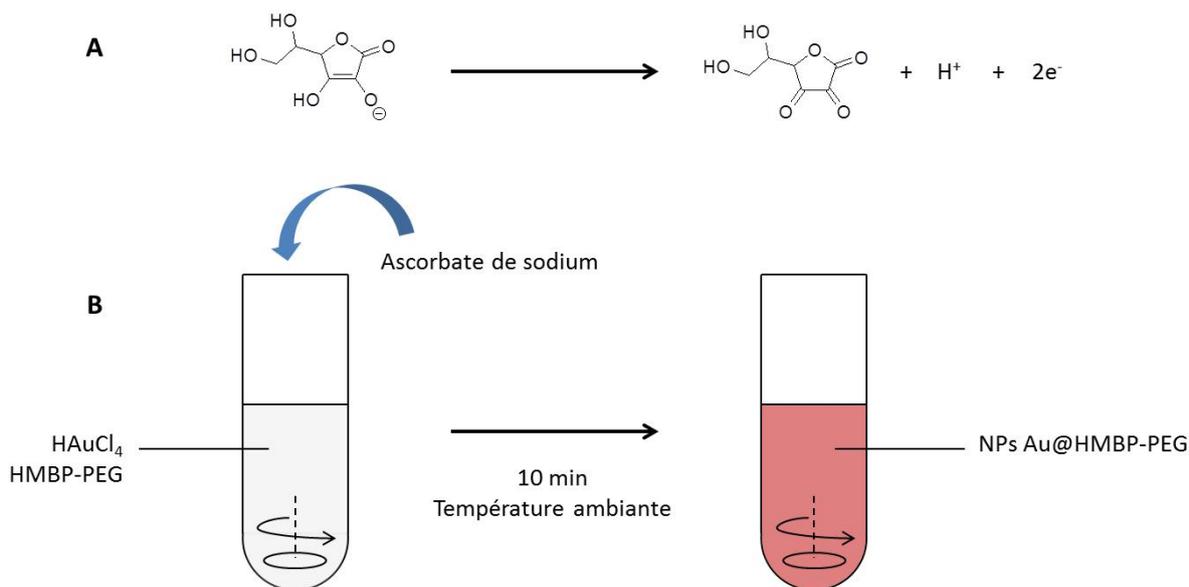


Figure 87. Demi équation de l'oxydoréduction de l'ascorbate (A) et schéma du protocole (B)

3.2.1. Morphologie et dispersion en taille en fonction du ligand

Pour cette stratégie de synthèse nous avons utilisés différents composés « pegylés » afin de déterminer la structure la plus adaptée. Les chaînes PEG de 2100 g.mol⁻¹ (soit 45 unités éthylène glycol) ont été privilégiées pour leur stabilisation efficace des NPs en milieu biologique. Les trois ligands testés sont : le HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH, HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe (synthétisé de façon analogue à partir du poly(éthylène glycol) méthyl éther thiol) et le P-PEG₄₅-OMe commercial.

Aucun changement de couleur n'est observé lors du mélange or/ligand. La couleur apparait dès l'ajout de l'ascorbate de sodium et quelques minutes suffisent pour que la réaction se termine. Les signatures spectrales des dispersions obtenues (Figure 88) sont cohérentes avec les NPs observées par MET (Figure 89). Les NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH sont très hétérogènes en taille (Figure 89 A), avec une majorité de nanosphères de l'ordre de 5 nm et quelques-unes de l'ordre de 20 nm ce qui explique la largeur de la bande de résonance plasmon. Les NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe ont un diamètre de 8,0 ± 1,5 nm (Figure 89 B) tandis que les NPs Au@P-PEG₄₅-OMe ont un diamètre de 13,7 ± 2,2 nm (Figure 89 C). Selon les travaux de Haiss, le rapport d'absorbance A_{SPR}/A_{400} (avec A_{SPR} le maximum d'absorption et A_{400} l'absorbance pour $\lambda = 400$ nm) est proportionnel à la taille des nanosphères,¹⁸¹ ce qui rationalise la différence de propriété optique entre ces trois lots de NPs.

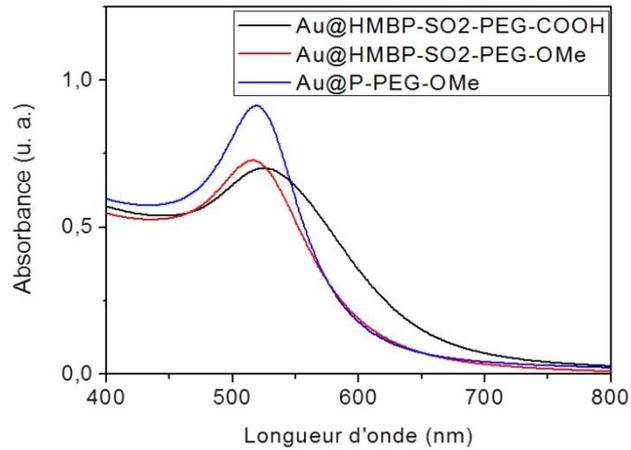


Figure 88. Spectre UV-Vis des NPs « pegylées » synthétisées par réduction à l'ascorbate de sodium pour des différents PEG phosphorés

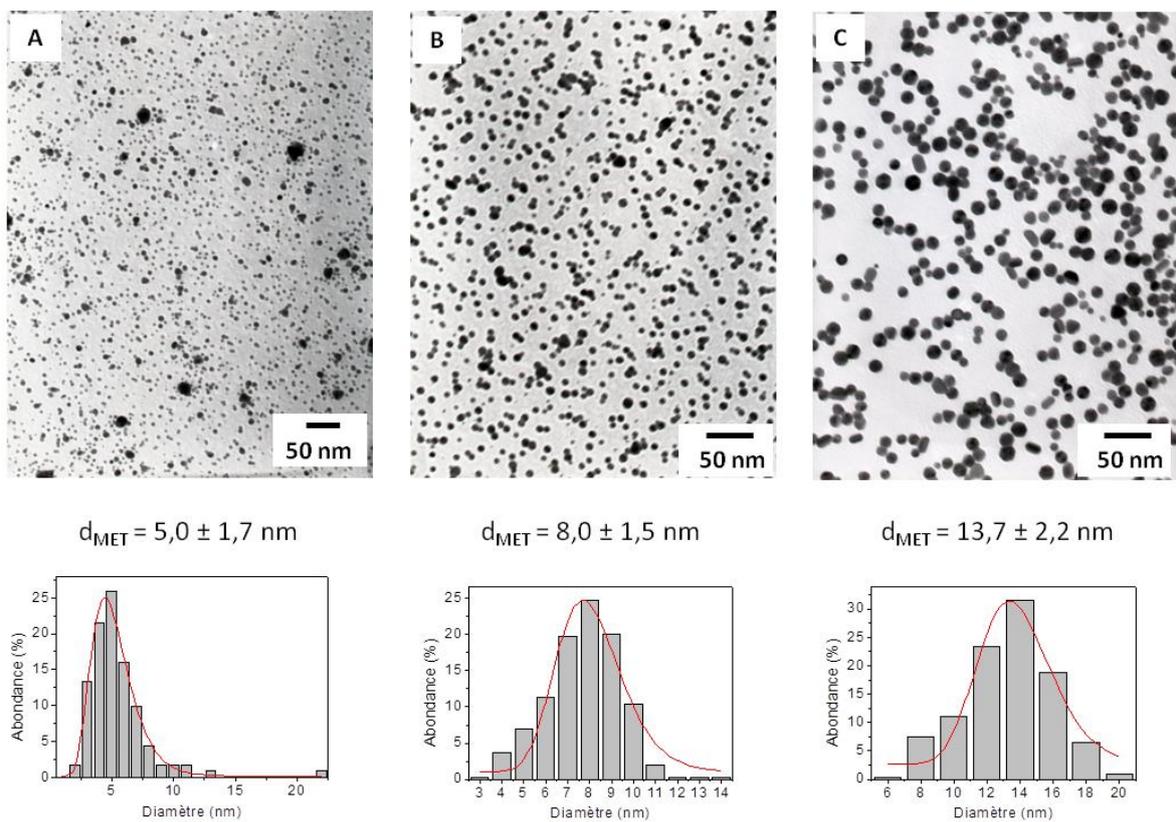


Figure 89. Clichés par MET et distribution de taille des NPs « pegylées » synthétisées par réduction à l'ascorbate de sodium pour des différents HMBP-PEG : HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH (A), HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe (B) et P-PEG₄₅-OMe (C)

Ces molécules induisent donc un processus de croissance des NPs qui diffère suivant les fonctions terminales des chaînes PEG. Il est donc vraisemblable que le nombre et la nature des groupements chélatants influencent la nucléation. Notons que les composés PEG qui portent une fonction chélatante (HMBP ou phosphonate) et un groupement éther méthylique aux extrémités du polymère permettent d'obtenir des NPs homogènes en taille. Cependant le caractère bifonctionnel du HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH est intéressant puisqu'il offre des possibilités de post-fonctionnalisation.

3.2.2. Synthèse de NPs avec des mélanges de ligands

De façon à combiner une taille de NPs homogène et la possibilité de post-fonctionnalisation, le protocole développé précédemment a été adapté avec un mélange de deux ligands : mono et bi-fonctionnels. Cette stratégie permettrait de trouver un compromis pour à la fois contrôler la taille des NPs et les habiller avec des groupements carboxylates disponibles en surface. Le mélange HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/P-PEG₄₅-OMe noté PEG1 et le mélange HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe noté PEG2 sont équimolaires. Après synthèse, on constate que les résultats obtenus sont fortement dépendant du type de mélange (Figures 90 et 91). La bande de résonance plasmon des NPs Au@PEG1 se situe à $\lambda = 514$ nm et les NPs ont un diamètre de $6,9 \pm 0,9$ nm tandis que les NPs Au@PEG2 sont fortement polydisperses avec un diamètre de $8,1 \pm 2,7$ nm.

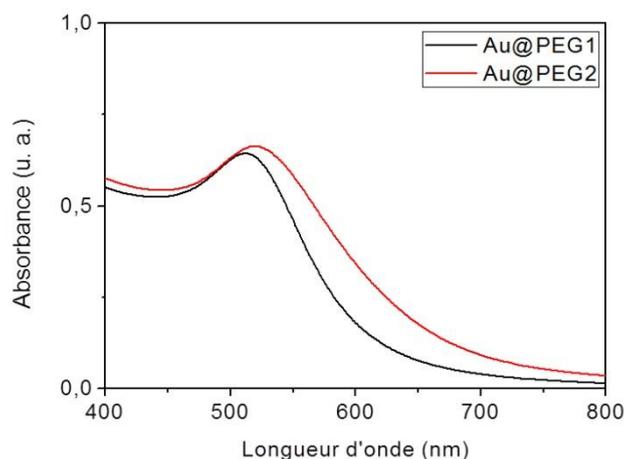


Figure 90. Spectre UV-Vis des NPs « pegylées » synthétisées par réduction à l'ascorbate de sodium en présence de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/P-PEG₄₅-OMe : PEG1 et le mélange HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe : PEG2

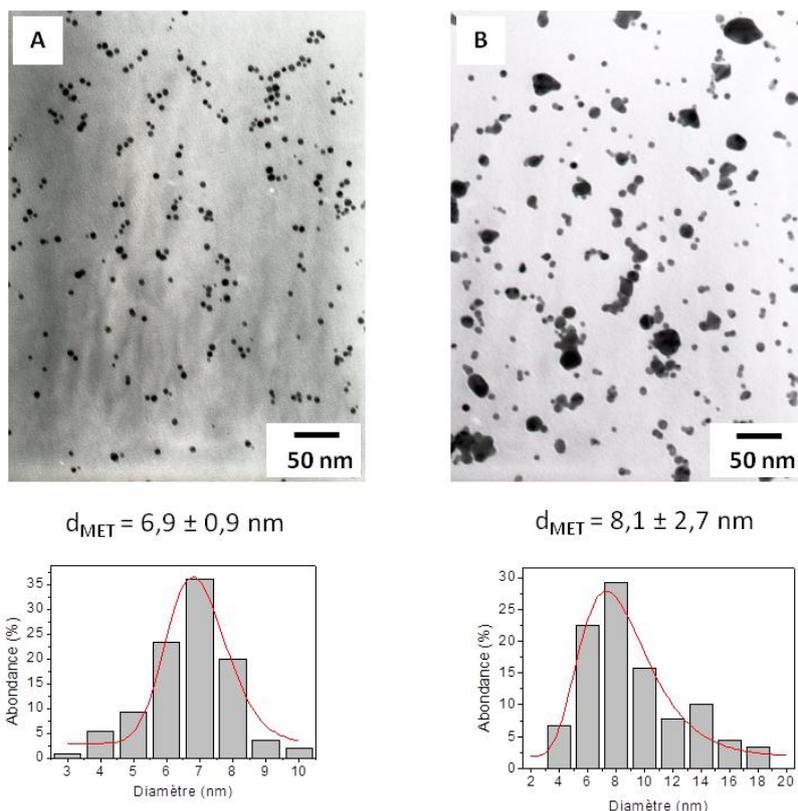


Figure 91. Clichés par MET et distribution de taille des NPs « pegylées » synthétisées par réduction à l'ascorbate de sodium en présence de HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/P-PEG₄₅-OMe : PEG1 (A) et le mélange HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe : PEG2 (B)

3.2.3. Bilan

Les NPs Au@PEG1 présentent une taille homogène et seront donc utilisées comme nanoplateformes de référence pour les caractérisations qui vont suivre. De par leur faible taille elles présentent une surface spécifique importante, ce qui augmente le nombre de groupement carboxyles disponibles pour la post-fonctionnalisation.

4. Caractérisation de surface

4.1. Spectroscopie IRTF

Nous avons procédé à des analyses par spectroscopie IRTF afin de comparer l'habillage des NPs Au@PEG1 avec les composés HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH et P-PEG₄₅-OMe seuls (Figure 92). On retrouve sur le spectre des NPs les bandes de vibrations communes aux

deux composés PEG à 1100 cm^{-1} ainsi que les élongations des liaisons C=O des groupements carboxyle à 1610 cm^{-1} du HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH.

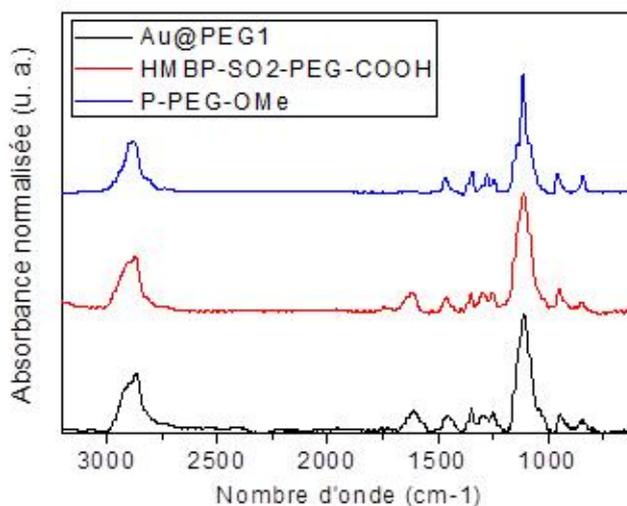


Figure 92. Comparaison des spectres IRFT des NPs Au@PEG1 versus HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH et P-PEG₄₅-OMe seuls

Ces analyses confirment l'habillage des NPs par les ligands introduits. Cependant elles ne donnent pas d'indice sur le ratio des deux polymères présents à la surface.

4.2. RMN

L'analyse RMN des dispersions de NPs a été réalisée afin de caractériser la composition de l'habillage des NPs. Jusqu'alors, les expériences RMN menées sur des NPs dont l'habillage est constitué d'une monocouche de molécules de taille comparable au HMBPène se sont révélées infructueuses. Comme cela a déjà été observé par Terrill et al., la résonance magnétique des atomes d'un ligand adsorbé sur les NPs est modifiée par rapport à la molécule libre.¹⁸² Dans cette étude les NPs d'or sont habillées par des thio-alcanes linéaires dont les pics des carbones en α et β souffre ne sont pas observables. Plus généralement, on constate une atténuation du signal lorsque les atomes du ligand sont proches de la surface.¹⁸²⁻¹⁸³ À la différence des habillages étudiés aux chapitres précédents, les chaînes PEG s'étendent suffisamment loin de la surface des NPs pour que le signal des protons les plus loin de la surface ne soit pas perturbé par la NP.

Les NPs Au@PEG1 sont lavées et concentrées par ultrafiltration, puis redispersées dans du D₂O. Après une acquisition prolongée en RMN du proton, on distingue aisément les

signaux des CH₂ du PEG que l'on compare aux molécules du mélange seules (Figure 93). Les signaux caractéristiques du CH₂ en a du carboxyle (3,81 ppm) ainsi que ceux du CH₃ terminal de l'éther (3,25 ppm) sont bien présents. Ceci témoigne d'une part de la présence des 2 composés sur les NPs et d'autre part que ces groupements fonctionnels ne sont pas en interaction avec la surface. La mesure des aires de ces deux signaux, rapporté au nombre de protons, nous permet d'estimer le ratio HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/P-PEG₄₅-OMe à 58:42. L'absence de signal en RMN du phosphore confirme le modèle de chélation par les phosphonates (Annexe 11).

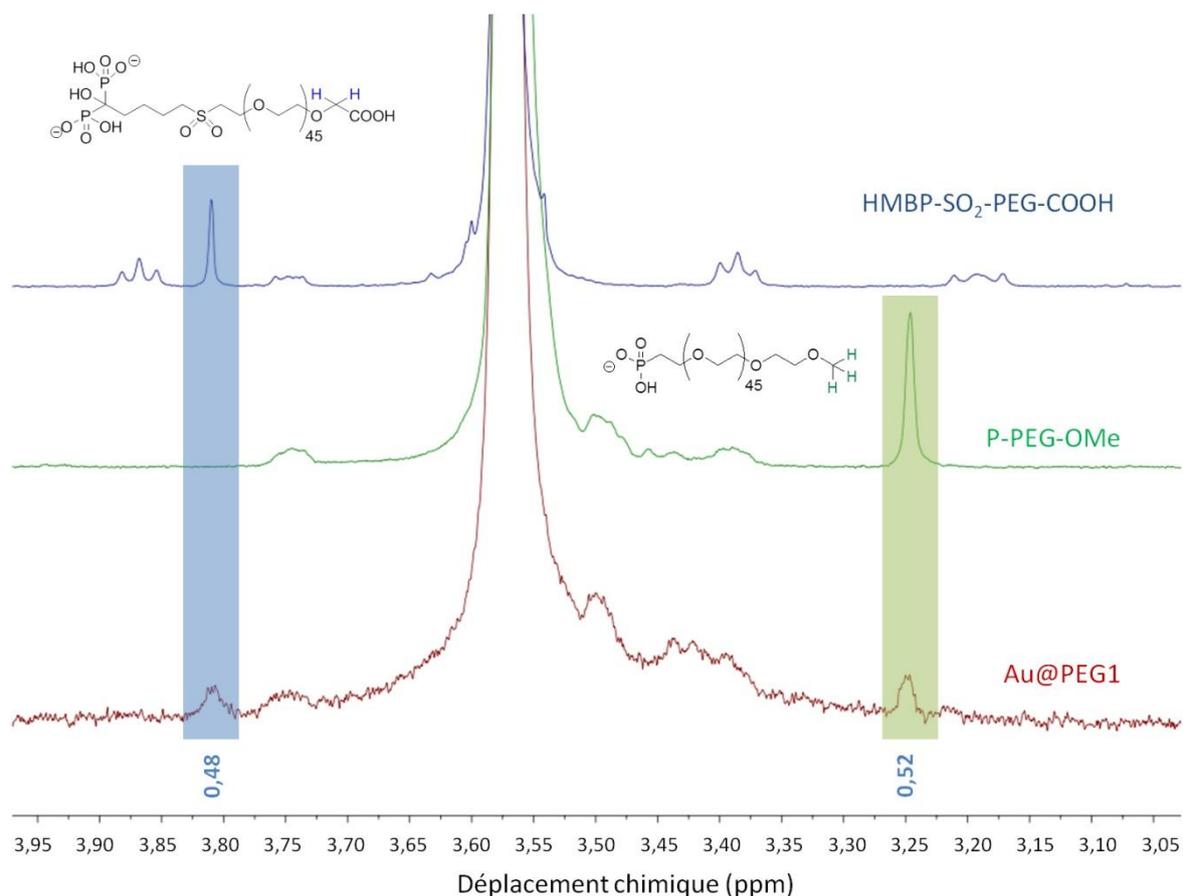


Figure 93. Comparaison des spectres RMN ¹H des NPs des NPs Au@PEG1 versus HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH et P-PEG₄₅-OMe seuls. Les déplacements chimiques de chacun des spectres sont étalonnés par rapport au pic des protons CH₂ des unités éthylène glycol : $\delta = 3,57$ ppm.

5. Stabilité en milieu physiologique

La stabilité colloïdale des NPs en milieu physiologique est un point clé pour leur utilisation biologique ce qui a motivé la « pegylation » de nos NPs. Les NPs Au@PEG1 sont

synthétisées avec un contrôle de la taille et de l'habillage, nous proposons donc d'évaluer ce dernier par un test de stabilité en présence d'un milieu de culture cellulaire classique : « Hank's Balanced Salt Solution » (HBSS). La forte concentration saline ($[\text{NaCl}] = 9 \text{ g.L}^{-1}$) est comme nous l'avons vu au chapitre 2 un facteur qui peut impacter fortement la stabilité des NPs.

Afin d'évaluer le gain de stabilité que permet la chaîne PEG greffées en surface, nous avons comparé le comportement hydrodynamique des NPs Au@PEG1 avec les NPs Au@HMBPène de 10 nm synthétisées précédemment. Les mesures par DLS effectuées au cours du temps montrent que les NPs pegylées gardent un diamètre hydrodynamique constant sur près de six heures (Figure 94 A), tandis que les NPs Au@HMBPène commencent à s'agréger dans les premières minutes (Figure 94 B). Ces résultats confirment que les chaînes PEG phosphorées assurent des répulsions stériques suffisantes pour stabiliser les NPs en milieu physiologique.

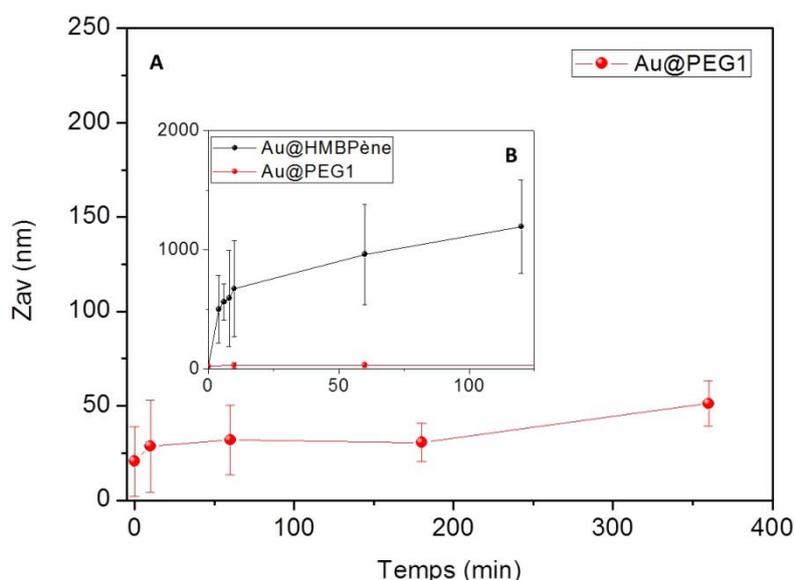


Figure 94. Évolution de la taille hydrodynamique dans 90 % de milieu HBSS : NPs Au@HMBPène versus Au@PEG1

L'excellente stabilité colloïdale des NPs@PEG1 en milieu physiologique nous permet d'envisager leur utilisation en milieu biologique. Pour démontrer la faisabilité de fonctionnaliser cette plateforme nous avons décidé de coupler un fluorophore : la rhodamine 123.

6. Couplage de la rhodamine 123

6.1. Principe

La post-fonctionnalisation des NPs d'or par couplage carbodiimide est une stratégie classique et couramment décrite dans la littérature (Chapitre 1 §3.3.2.). Pour valider la réactivité de notre nanoplateforme, nous avons choisi de coupler un composé fluorescent en surface : la rhodamine 123 (Figure 95). On procède d'abord à l'activation des groupements carboxyles en présence d'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de N-Hydroxysuccinimide (NHS) à pH = 3. On additionne ensuite la rhodamine 123 à pH= 9.

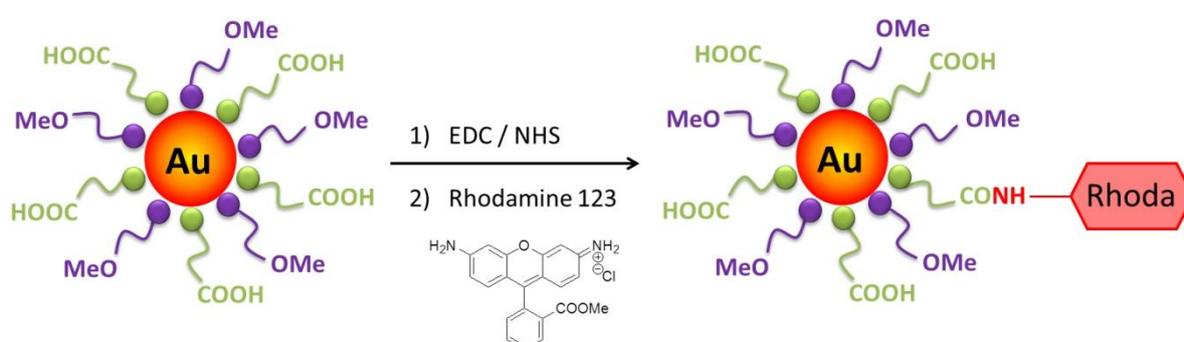


Figure 95. Couplage carbodiimide de la rhodamine 123 sur les NP Au@PEG1

Après élimination de l'excès de réactif par ultrafiltrations et afin d'évaluer le relargage du fluorophore, un échantillon de NPs post-fonctionnalisées est placé dans un milieu HBSS à 90% puis analysé par fluorimétrie. L'échantillon est excité à $\lambda_1 = 500$ nm et le maximum d'émission est mesuré à $\lambda_2 = 522$ nm. On constate que le signal de fluorescence augmente jusqu'à 20 min après injection dans le milieu (Figure 96).

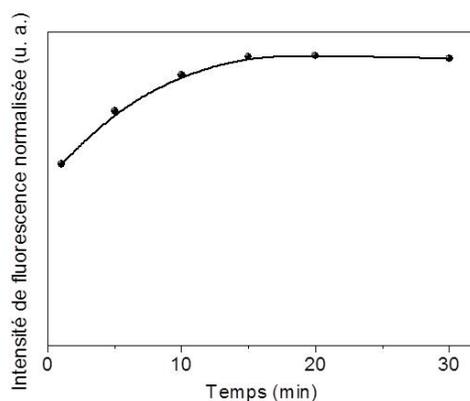


Figure 96. Mesure de fluorescence des NPs AU@PEG1@Rhodamine123 au cours du temps dans 90% de milieu HBSS pour une excitation à $\lambda_1 = 500$ nm et une mesure d'intensité d'émission à $\lambda_2 = 522$ nm

Ce phénomène témoigne d'un relargage de la rhodamine 123 adsorbée par interaction non spécifique sur la surface des NPs. La forte concentration en sels du milieu favorise la séparation des paires d'ions phosphonates/ammonium. Une fois les fluorophores décrochés de la surface, les facteurs de « quenching » diminuent ce qui augmente le signal global de la dispersion. On appelle « quenching » l'extinction du signal en fluorescence émit par un fluorophore. Ce phénomène est observé sur les NPs d'or,¹⁸⁴ et fait l'objet de récentes études pour ses potentielles applications en biodétection.¹⁸⁵ On distingue trois modes de « quenching » : entre le fluorophore et la NP, entre deux fluorophores et entre le fluorophore et une NP voisine (respectivement Q_1 , Q_2 et Q_3 ; Figure 97).

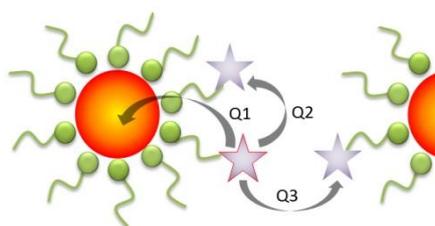


Figure 97. Différents modes de « quenching » : intra-particule (Q_1 et Q_2) et inter-particules (Q_3)

On en déduit que 30 minutes dans 90 % de milieu HBSS sont suffisantes pour relarguer la rhodamine 123 adsorbée non spécifiquement. Par conséquent nous adaptions la méthode de lavage afin de tirer profit de cette propriété du milieu (Figure 98). Après les premiers cycles d'ultrafiltration, la solution de NPs fluorescentes est concentrée puis redispersée dans ce

même milieu pour 30 min. Pour éviter de dégrader les NPs, on élimine le milieu par des cycles d'ultrafiltrations en rinçant avec de l'eau pure. Les NPs gardent leur stabilité car nous n'observons pas changement dans leur spectre d'absorption UV-Vis avant et après lavage.

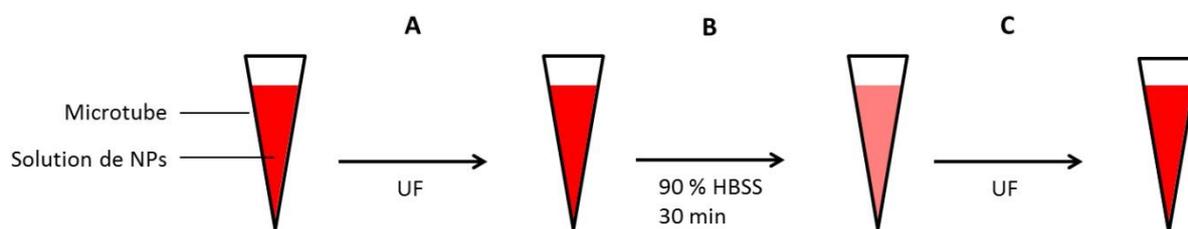


Figure 98. Méthode de lavage des NPs fluorescentes après couplage de la rhodamine 123 : trois cycles d'ultrafiltrations avec des unités à 30KDa (A), puis 30 min dans 90 % de milieu HBSS sous agitation à température ambiante (B) et à nouveau trois cycles d'ultrafiltrations (C)

6.2. Propriétés optiques des NPs@PEG1 après couplage avec la rhodamine123

Les dispersions de NPs d'or sont alors analysées par spectroscopie UV-Vis et par fluorimétrie (Figure 99).

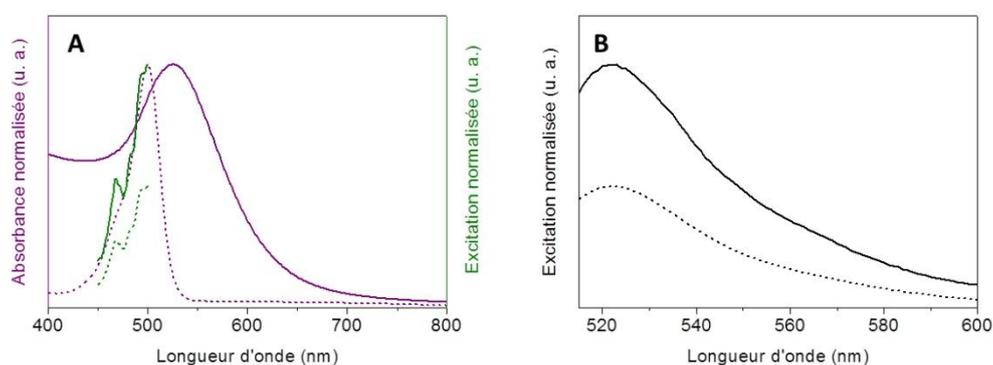


Figure 99. Propriétés optiques des NPs Au@PEG1 après réaction de couplage avec la rhodamine 123. Spectre d'absorption UV-Vis (A-Violet), spectre d'excitation (A-Vert) et d'émission (B-Noir) : NPs Au@PEG1@rhodamine 123 (trait) versus rhodamine 123 (Pointillés)

Bien que l'absorption des NPs couvre la même région spectrale que l'excitation de la rhodamine 123 (Figure 99 A), un signal en émission est tout de même observé (Figure 99 B). Afin de déterminer l'effet du « quenching » inter-particules, l'intensité d'émission est mesurée pour différentes concentrations en NPs (Figure 100).

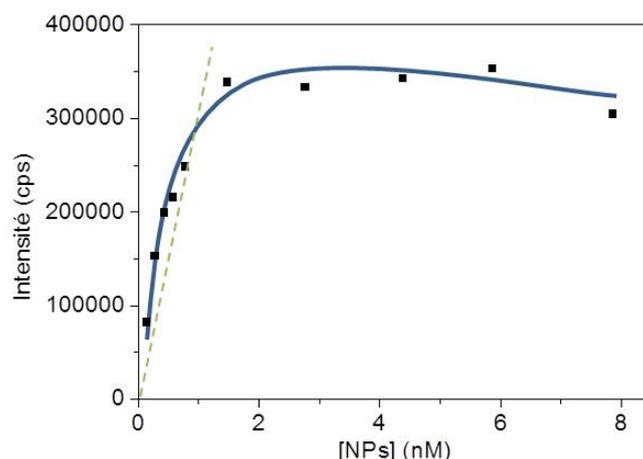


Figure 100. Fluorescence des NPs Au@PEG1 post-fonctionnalisées à la rhodamine 123 dans l'eau à pH neutre

Afin de s'affranchir du « quenching » inter-particules (Q_3) nous mesurons le signal en fluorescence sur une gamme de concentration de 0,1 nM à 7,9 nM en NPs d'or. L'augmentation du signal apparaît proportionnelle à la concentration en NPs de 0,1 nM à 1,5 nM puis un palier est observé à partir de cette dernière concentration, ce qui signifie que le facteur de « quenching » inter-particules Q_3 n'est plus négligeable. Nous quantifierons donc la quantité de rhodamine 123 couplée en se plaçant à une concentration en NPs de 1,5 nM afin de s'en affranchir.

6.3. Détermination du facteur de « quenching » intra-particule et dosage de la rhodamine 123

Dans la littérature, les auteurs calculent le facteur « quenching » fluorophore - particule en désorbant des NPs le fluorophore couplé.¹⁸⁶ Pour se faire nous introduisons dans notre échantillon un large excès de mercaptopropionate afin de favoriser l'échange de ligand ($1,7 \cdot 10^3$ équivalents par rapport aux chaînes PEG adsorbées). Après une heure d'agitation à température ambiante notre échantillon est à nouveau analysé au fluorimètre. On calcule les concentrations mesurées en rhodamine 123 par étalonnage externe avant et après relargage. Les droites d'étalonnage sont réalisées dans les mêmes conditions de pH, avec et sans mercaptopropionate (Annexes 12 et 13). On trouve pour $[NPs] = 1,5$ nM un titre de $[Rhodamine\ 123] = 13,5$ nM avant décrochage et de $[Rhodamine\ 123] = 118,7$ nM après décrochage, soit un facteur de « quenching » $Q_1 = 8,9$. D'après l'étude de Forster et al. le facteur de quenching entre molécules Q_2 est négligeable pour des concentration en

rhodamine 123 inférieures à 2,5 μM .¹⁸⁷ On peut donc en déduire un taux de couplage de 80 molécules de rhodamine 123 par NPs.

6.4. Stabilité des NPs Au@PEG1@rhodamine 123 le sérum de bovin fétal

Que ce soit pour les applications in-vitro ou in-vivo les NPs sont dispersées en présence de sérum contenant des protéases susceptibles d'hydrolyser les liaisons amide. Nous utilisons donc ici le sérum bovin fétal (SBF) pour étudier la stabilité des NPs Au@PEG1@rhodamine 123 et évaluer leur relargage. Le signal étant modifié en présence du sérum, nous procédons à un étalonnage externe dans le SBF. Le facteur de « quenching » est recalculé à partir de la mesure à $t = 0$ min, soit $Q_{\text{SBF}} = 3,2$. On pose R , le pourcentage de rhodamine 123 relarguée, définit par :

$$R = \frac{100(I - I_{\text{NPs}})}{Q_{\text{SBF}}I_{t=0}} \quad (20)$$

avec I l'intensité de fluorescence mesurée, I_{NPs} l'intensité de fluorescence de la rhodamine 123 couplée sur les NPs et $I_{t=0}$ l'intensité de fluorescence initiale. Le dénominateur correspondant à l'intensité maximale théorique dans ce milieu si le relargage est total.

I_{NPs} s'exprime en fonction de $I_{t=0}$, Q_{SBF} et I_R , l'intensité théorique de la rhodamine 123 relarguée :

$$I_{\text{NPs}} = I_{t=0} - \frac{I_R}{Q_{\text{SBF}}} \quad (21)$$

avec $I_R = I - I_{t=0}$.

L'évolution de R au cours du temps montre que le maximum est atteint deux heures après injection dans le milieu, autour de 11%, puis reste constant (Figure 101).

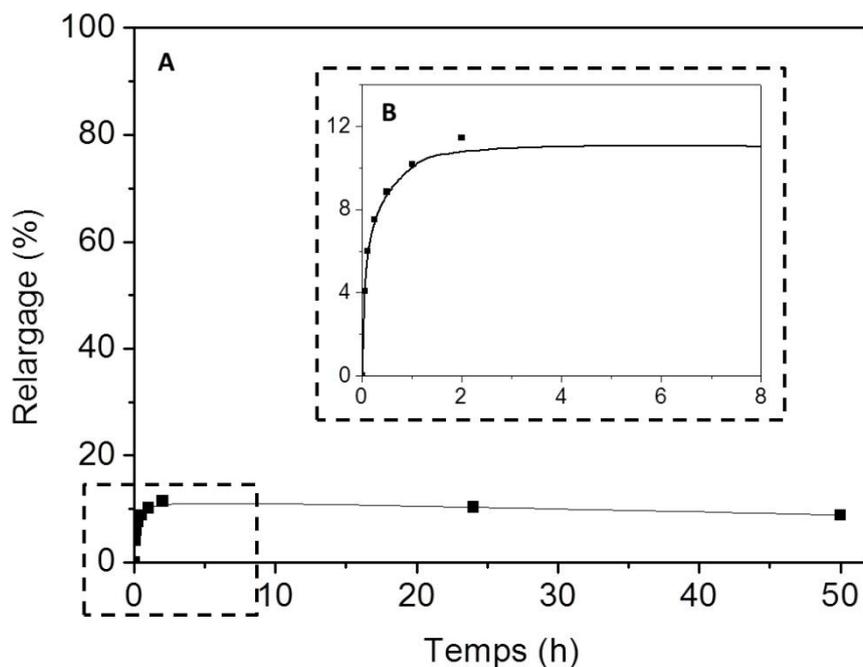


Figure 101. Évaluation du relargage des NPs Au@PEG1@rhodamine 123 au cours du temps dans 10% de SBF (excitation $\lambda_1 = 500$ nm ; émission $\lambda_2 = 522$ nm)

Ce type de post-fonctionnalisation est donc viable pour des applications en milieu biologique puisque une large majorité des molécules couplées en surface ne sont pas relarguées.

7. Évaluation de la toxicité des NPs Au@PEG1

Nous avons réalisés une évaluation de la toxicité des NPs Au@PEG1 à l'aide d'un test au bleu d'Alamar (Annexe 14) sur des cellules tumorales de la prostate PC-3.^{***} L'activité métabolique est ainsi déterminée pour un gradient de concentration en comparant les NPs avec les molécules seules (Figure 102).

^{***} L'ensemble des tests au bleu d'Alamar ont été réalisés par Anouchka Plan en collaboration avec l'équipe du docteur Claire Wilhelm au sein du laboratoire Matière et Systèmes Complexes de l'Université Paris Diderot.

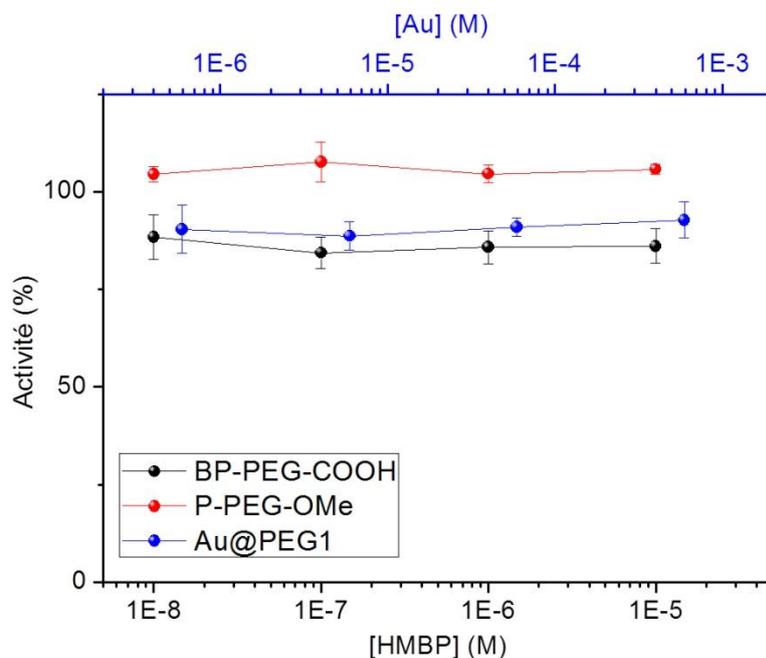


Figure 102. Activité métabolique des cellules PC-3 en présence du BP-S-PEG₄₅-COOH^{§§§}, du P-PEG-OMe et des NPs Au@PEG1.

Les composés « pegylés » seuls tout comme les NPs n'altèrent pas l'activité métabolique des cellules. Les NPs ne sont donc pas toxiques pour une concentration en or allant jusqu'à 0,6 mM, soit 57 nM en nanosphères de 7 nm, ce qui est supérieur aux concentrations d'étude que l'on peut trouver dans la littérature.^{123, 188}

8. Conclusion

Nous avons vu au cours de ce chapitre que les composés HMBP-PEG, dérivés du HMBPène par réaction thiol-ène sont également des ligands réducteurs capables de former et stabiliser des NPs d'or. Néanmoins, contrairement aux NPs synthétisées via le HMBPène, il apparaît que le processus de formation des NPs n'est pas homogène. Dans certaines conditions l'ajout d'ascorbate de sodium comme réducteur permet d'obtenir une distribution de taille satisfaisante, mais ce résultat dépend fortement de la structure du ligand HMBP « pegylé ». Il est possible que la structure polymérique de cette nouvelle classe de molécule complexifie les intermédiaires lors des étapes de nucléation et de croissance cristalline.

^{§§§} La BP-S-PEG₄₅-COOH est probablement oxydé en milieu biologique, c'est pourquoi nous pouvons comparer sa toxicité à l'habillage des NPs Au@PEG1.

Les NPs Au@PEG1 obtenues à l'aide d'un mélange HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH/P-PEG₄₅-OMe sont homogènes en taille, possèdent un habillage qui assure leur stabilité en milieu salin et des possibilités de post-fonctionnalisation. Le couplage de la rhodamine 123 a été réalisé sur notre nanoplateforme avec un excellent rendement ce qui ouvre le champ des perspectives pour d'autres voies de post-fonctionnalisation à l'aide de molécules d'intérêt biologique. De plus, l'absence de toxicité sur les cellules PC-3 est un élément qui confirme le potentiel de ces NPs pour des applications en milieu biologique bien qu'il faudrait étendre cette étude à d'autres modèles de cellules non tumorales.

9. Matériel et méthode

9.1. Matériel

Tous les réactifs sont commerciaux et ont été utilisés sans purification préalable.

9.2. Méthode

9.2.1. Synthèse du HMBP-S-PEG₄₅-COOH

500 mg d'acide poly(éthylène glycol) 2-mercaptoéthyl éther acétique (238 μmol, HSC₂H₄O(C₂H₄O)_nCH₂CO₂H, M_n = 2 100 Da, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), dans 3 mL de DMF et 32 mg de HMBPène (119 μmol) dans 3 mL d'eau sont introduits dans un tube en verre. On y ajoute une pointe de spatule de 1-hydroxycyclohexylphényl cétone et on irradie sous agitation pendant 3h le mélange à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). On ajoute 8 mL d'eau que l'on lave avec 10mL de mélange binaire DCM/éther 9:1 trois fois, puis avec 10 mL d'éther. La phase aqueuse est lyophilisée et on obtient 233,5 mg de poudre blanche (97 μmol, rendement : 81 %).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ = 3,91 (s, 1H) ; 3,64 (m, 180H) ; 2,76 (t, J³(H-H) = 6,4 Hz, 2H) ; 2,60 (t, J³(H-H) = 7,1 Hz, 2H) ; 1,92 (m, 2H) ; 1,62 (m, 4H).

RMN ³¹P {¹H} (162 MHz, D₂O) δ = 18,39 (s).

RMN ¹³C {¹H} (101 MHz, D₂O) δ = 176,98 (s) ; 69,27 (m) ; 33,18 (s) ; 31,09 (s) ; 30,35 (s) ; 29,93 (s) ; 23,10 (t, J²(C-P) = 6,3 Hz).

9.2.2. Synthèse du HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH

343 mg de HMBP-PEG (142 μ mol, selon la méthode décrite au paragraphe §9.2.1.) dans 4 mL d'eau et 94 mg de m-CPBA (545 μ mol) sont introduits dans un monocol, que l'on laisse sous forte agitation pendant 4 h. La phase aqueuse (pH = 4) est lavée trois fois avec 10mL d'éther puis lyophilisée. On obtient 330 mg de poudre blanche (137 μ mol, rendement : 96 %).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ = 3,97 (t, $J^3(\text{H-H}) = 5,5$ Hz, 2H) ; 3,91 (s, 2H), 3,66 (m, 180H) ; 3,29 (m, 2H) ; 1,95 (m, 2H) ; 1,81 (m, 2H) ; 1,73 (m, 2H).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (162 MHz, D_2O) δ = 18,14 (s).

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, D_2O) δ = 177,18 (s) ; 69,65 (m) ; 63,43 (s) ; 53,55 (s) ; 51,84 (s) ; 33,13 (s) ; 22,65 (t, $J^2(\text{C-P}) = 6,2$ Hz) ; 21,77 (s).

9.2.3. Synthèse de l'acide 3-(5-hydroxy-5,5-diphosphonopentylthio) propanoïque

57,3 mg d'acide 3-mercaptopropionique (540 μ mol, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), dans 3 mL de DMF et 122,8 mg de HMBPène (450 μ mol) dans 3 mL d'eau sont introduits dans un tube en verre. On y ajoute une pointe de spatule de 1-hydroxycyclohexylphényl cétone et on irradie sous agitation pendant 3h le mélange à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). On ajoute 8 mL d'eau que l'on lave avec 10mL de mélange binaire DCM/éther 9:1 trois fois, puis avec 10 mL d'éther. La phase aqueuse est lyophilisée et on recristallise le composé dans un binaire MeOH/eau 9:1 à pH = 2,3. On obtient 150 mg de poudre blanche (400 μ mol, rendement : 89 %).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ = 2,79 (t, $J^3(\text{H-H}) = 6,8$ Hz, 2H) ; 2,66 (t, $J^3(\text{H-H}) = 7,1$ Hz, 2H) ; 2,60 (t, $J^3(\text{H-H}) = 7,1$ Hz, 2H) ; 1,93 (m, 2H) ; 1,60 (m, 4H).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (162 MHz, D_2O) δ = 18,46 (s).

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (126 MHz, D_2O) δ = 177,08 (s) ; 74,00 (t, $J^1(\text{C-P}) = 135,3$ Hz) ; 34,39 (s) ; 33,17 (s) ; 30,90 (s) ; 29,70 (s) ; 26,10 (s) ; 23,02 (t, $J^2(\text{C-P}) = 6,4$ Hz).

9.2.4. Synthèse du HMBP-S-PEG₄-COOH

163 mg d'acide 1-mercapto-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oïque (578 μ mol, $\text{HS}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_4\text{C}_2\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, Iris-Biotech), dans 3 mL de DMF et 123 mg de HMBPène (450 μ mol) dans 3 mL d'eau sont introduits dans un tube en verre. On y ajoute une pointe de spatule de

1-hydroxycyclohexylphényl cétone et on irradie sous agitation pendant 3h le mélange à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). On ajoute 8 mL d'eau que l'on lave avec 10mL de mélange binaire DCM/éther 9:1 trois fois, puis avec 10 mL d'éther puis lyophilisée. On obtient 183,4 mg de poudre blanche (308 μ mol, rendement : 69 %).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ = 3,70 (m, 16H) ; 2,76 (t, $J^3(\text{H-H}) = 6,4$ Hz, 2H) ; 2,60 (t, $J^3(\text{H-H}) = 7.1$ Hz, 2H) ; 2,54 (t, $J^3(\text{H-H}) = 6,4$ Hz, 2H) ; 1,93 (m, 2H) ; 1,61 (m, 2H).

RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (162 MHz, D_2O) δ = 18,39 (s)

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (126 MHz, D_2O) δ = 178,05 (s) ; 74,08 (t, $J^1(\text{C-P}) = 135,0$ Hz) ; 69,52 (m) ; 69,45 (s) ; 69,38 (s) ; 69,27 (s) ; 66,94 (s) ; 35,79 (s) ; 33,23 (s) ; 31,10 (s) ; 30,36 (s) ; 29,91 (s) ; 23,11 (t, $J^2(\text{C-P}) = 6,3$ Hz).

9.2.5. Synthèse du HMBP-SO₂-PEG₄₅-OMe

477 mg de poly(éthylène glycol) méthyl éther thiol (238 μ mol, $\text{HSC}_3\text{H}_6\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{45}\text{OMe}$, $M_n = 2\ 000$ Da, Specific Polymer), dans 3 mL de DMF et 44 mg de HMBPène (164 μ mol) dans 3 mL d'eau sont introduits dans un tube en verre. On y ajoute une pointe de spatule de 1-hydroxycyclohexylphényl cétone et on irradie sous agitation pendant 3h le mélange à l'aide d'une lampe à UV (360 nm). On ajoute 8 mL d'eau que l'on lave avec 10mL de mélange binaire DCM/éther 9:1 trois fois, puis avec 10 mL d'éther. . On ajoute dans un deuxième temps 94 mg de m-CPBA (545 μ mol), que l'on laisse sous forte agitation pendant 4 h. La phase aqueuse (pH = 4) est lavée trois fois avec 10mL d'éther. La phase aqueuse est lyophilisée et on obtient 288 mg de poudre blanche (115 μ mol, rendement : 70 %).

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ = 3,67 (m, nH PEG) ; 3,37 (s, 3H) ; 3,30 (m, 2H) ; 2,09 (m, 2H) ; 1,91 (m, 2H) ; 1,82 (m, 2H) ; 1,76 (m, 2H).

RMN ^{31}P (202 MHz, D_2O) δ = 18,17 (t, $J^1(\text{P-C}) = 13,8$ Hz).

RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (126 MHz, D_2O) δ = 70,97 (s) ; 69,49 (m) ; 69,22 (s) ; 68,44 (s) ; 58,03 (s) ; 51,87 (s) ; 48,76 (s) ; 47,88 (s) ; 33,08 (s) ; 24,21 (s) ; 21,76 (s) ; 21,24 (s).

9.2.6. Synthèse de NPs Au@HMBP-S-PEG₄₅-COOH par chauffage micro-ondes

Deux solutions de réactifs précurseurs sont préparées : une solution A d'acide chloraurique ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 20mM (38,8 mg dans

5mL d'eau pure) et une solution B de HMBP-S-PEG₄₅-COOH à 10 mM (12,2 mg dans 0,5 mL d'eau pure). 900 µL d'eau pure, 12,5 µL de solution A et 100 µL de solution B sont introduits dans un tube micro-ondes de 4 mL. Le chauffage est programmé en trois étapes : (1) atteindre 100°C aussi vite que possible (2) maintenir 100°C pendant 10min (3) refroidissement. La vitesse de rotation de l'agitation magnétique est fixée à 1200 rpm.

9.2.7. Synthèse de NPs Au@HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH par chauffage classique

Une solution C de HMBP-SO₂-PEG-COOH à 62 mM (300 mg dans 2 mL d'eau pure) est préparée. 125 µL de solution A sont ajoutés à 9,5 mL d'eau pure dans un monocol. Une fois porté à ébullition on ajoute 1 mL de solution C au mélange que l'on laisse sous agitation pour 10 min de reflux. Le changement de couleur est visible après quelques minutes de chauffage.

9.2.8. Synthèse de NPs Au@HMBP-PEG à température ambiante

Une solution D d'ascorbate de sodium (C₆H₇NaO₆, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 50 mM (19,8 mg dans 2 mL d'eau pure) et une solution E de P-PEG –OMe (Specific Polymers) à 31 mM (65,6 mg dans 1 mL d'eau pure) sont préparées. 125 µL de solution A, 82 µL de solution C et 164 µL de solution E sont ajoutés à 9.5 mL d'eau pure dans un tube. On ajuste pH = 10,5 avec quelques µL de solution de NaOH à 100mM. On ajoute rapidement 100 µL de solution D pour 10 min d'agitation à température ambiante.

9.2.9. Couplage de la rhodamine 123 sur les NPs Au@HMBP-PEG

Une solution F de rhodamine 123 (C₂₁H₁₇ClN₂O₃, ≥ 85 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 130 µM (après dilution d'un facteur 100 d'une solution mère à 13 mM soit 4,9 mg dans 1 mL d'eau pure), une solution G d'EDC (C₈H₁₇N₃, ≥ 97 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 650 µM (après dilution d'un facteur 100 d'une solution mère à 65 mM soit 12,5 mg dans 1 mL d'eau pure) et une solution H de NHS (C₄H₅NO₃, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 650 µM (après dilution d'un facteur 100 d'une solution mère à 65 mM soit 7,5 mg dans 1 mL d'eau pure) sont préparées. On place dans un tube en verre 400 µL de solution de NPs Au@HMBP-PEG (selon la méthode décrite au paragraphe §9.2.8.) qui ont été lavées puis concentrées pour [Au] = 2,5 mM, on y ajoute 30 µL de solution G, 30 µL de solution H et on fixe pH = 3. Après 2 h 30 min

d'agitation à température ambiante on ajoute 30 μL de solution F et on fixe pH = 10 avec quelques μL de solution de NEt_3 à 25 g/L. On laisse réagir 16 h à température ambiante.

9.2.10. Évaluation de l'activité métabolique de cellules PC3

Deux plaques de 96 puits contenant 10 000 cellules PC3 par puits sont remplies avec 100 μL de milieu DMEM (ThermoFisher) complet contenant 10 % de sérum de veau foetal (ThermoFisher) et 1 % Pénicilline-Streptomycine (ThermoFisher). Après 4 heures à l'étuve à 37 °C, on incube les solutions à tester pour des gradients de concentration de 10^{-5} M à 10^{-8} M pendant 48 heures. Les puits sont rincés à l'aide d'une solution de milieu RPMI blanc, puis remplis avec 200 μL de solution de bleu d'alar (ThermoFisher) à 10 % dans ce même milieu. On laisse les cellules durant 2 heures à l'étuve, puis on mesure l'émission de fluorescence à $\lambda = 585$ nm en excitant pour $\lambda = 570$ nm.

Chapitre 5

PERSPECTIVES DES NPS AU@HMBP POUR DES APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

Chapitre 5 : PERSPECTIVES DES NPs Au@HMBP POUR DES APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

Nous proposons dans ce chapitre d'illustrer l'intérêt des NPs d'or stabilisées par des composés HMBP pour des applications thérapeutiques. Nos résultats préliminaires concernant deux approches potentiellement utilisables pour le traitement du cancer y sont présentés.

Nous décrivons dans un premier temps la synthèse de NPs d'or à l'aide d'un HMBP commercial couramment utilisé par l'industrie pharmaceutique : l'alendronate (Schéma 22). Les propriétés physico-chimiques des NPs Au@Alendronate sont étudiées ainsi que leur potentiel anti-tumoral.

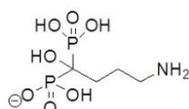


Schéma 22. Molécule d'alendronate

Ensuite nous avons réalisé une synthèse de NPs d'or multicœur ayant des propriétés optiques originales, permettant une absorption dans le proche infrarouge. La stabilisation de ces nano-objets est assurée des composés HMBP-PEG. Nous avons notamment étudié du contrôle de leur taille ainsi que leur morphologie. Enfin, nous avons formulé des hypothèses sur le mécanisme de leur formation

1. Potentiel anti-tumoral de NPs Au@HMBP

Nous nous intéresserons ici plus précisément à l'activité anti-tumorale de l'alendronate, un composé commercialisé sous le nom de Fosamax pour le traitement de l'ostéoporose et utilisé aussi comme adjuvant dans le cas de traitement du cancer du sein. Cette propriété anti-tumorale des HMBP a été étudiée et démontrée par de nombreux auteurs.¹⁸⁹ Les HMBP azotés sont des inhibiteurs de la voie du mévalonate : ils empêchent la prénylation des protéines GTPases ce qui affecte la morphologie des cellules, leur répllication et leur signalisation pouvant causer la mort cellulaire par apoptose.¹⁹⁰ Néanmoins l'usage thérapeutique de ce type de molécule peut poser des problèmes de biodisponibilité. En effet, une fois injectée dans les voies circulatoires, les HMBP ne sont que faiblement internalisés par les cellules et s'accumulent préférentiellement sur les os. Les travaux de

Benyettou et al. ont montré une augmentation de l'activité anti-tumorale de l'alendronate lorsqu'il est adsorbé à la surface des NPs de maghémite, ce qui favorise l'internalisation.^{97a, 97b, 191} Par ailleurs Lalatonne et al. ont utilisé d'autres HMBP, non azotés, pour habiller les NPs de maghémite dans la perspective de l'élaboration de nanoplateforme pour l'imagerie IRM mais sans activité anti-tumorale.^{97c} Les NPs d'or ayant leurs propriétés thérapeutiques propres, grâce à la thérapie par photothermie (TPT), nous évaluerons ainsi la possibilité de combiner l'activité anti-tumorale de l'alendronate adsorbé en surface. Par ailleurs nous étendrons cette étude aux NPs Au@HMBPène afin de déterminer si elles ont ou non un effet similaire.

En reprenant la stratégie de synthèse « one pot » élaborée précédemment, nous étudierons dans cette partie les propriétés physico-chimiques de NPs Au@Alendronate. Leurs propriétés anti-tumorales seront évaluées ainsi que celles des NPs Au@HMBPène précédemment obtenues.

1.1. Synthèse et caractérisations des NPs Au@Alendronate

1.1.1. Synthèse

Nous proposons de reprendre les conditions réactionnelles**** établit au paragraphe §6.3. du chapitre 2 car elles permettent de synthétiser aisément une solution concentrée de NPs d'or, en utilisant cette fois l'alendronate comme ligand réducteur. La solution d'or à 1 mM est portée à ébullition et 4,4 équivalents d'alendronate sont injectés. Le mélange est ensuite laissé 10 minutes au reflux. Lorsque l'on utilise le lavage par ultrafiltration afin d'éliminer l'excès d'alendronate, les NPs étant de taille importante, cela cause une agrégation partielle et provoque une perte de matière trop importante. Les lavages ont donc été réalisés par dialyse, sauf pour la caractérisation par spectrométrie IRTF.

On obtient ainsi une solution de NPs sphériques (Figure 103 A) avec un diamètre moyen de $41,2 \pm 9,9$ nm (Figure 103 B) et un maximum d'absorption à 528 nm (Figure 103 C).

**** Quatre équivalents de réducteur sont additionnés sur une solution aqueuse de HAuCl_4 à 1 mM à ébullition pour 10 minutes de reflux.

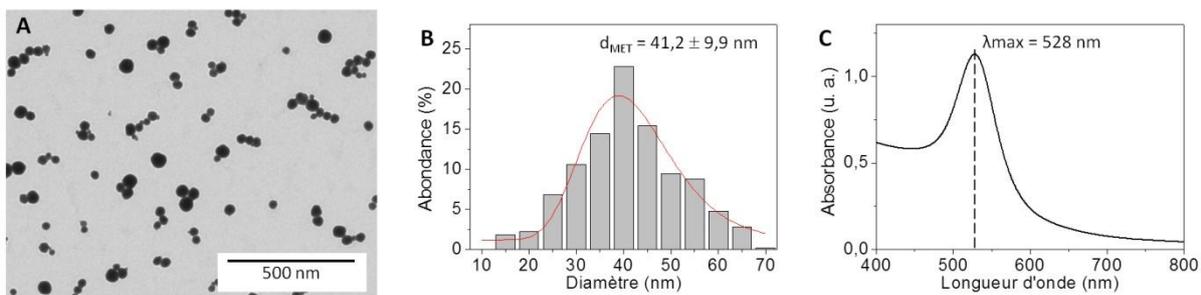


Figure 103. Caractéristiques des NPs Au@Alendronate obtenues par le protocole standard : photographie MET (A), distribution de taille (B) et spectre UV-Vis (C)

Il est important de préciser que cette nouvelle synthèse devra également faire l'objet d'un travail d'optimisation, pour étudier à nouveau l'influence des paramètres tels que le pH et la concentration. Dans ces conditions réactionnelles, les NPs obtenues avec le HMBPène sont caractérisées par une taille moyenne plus petite et une distribution plus homogène ($d_{Au@HMBPène} = 10,1 \pm 0,8 \text{ nm}$; Chapitre 2 §6.3.). Cela montre une fois encore l'influence de la structure du ligand réducteur sur la morphologie des NPs formées.

1.1.2. Analyse par spectroscopie IRTF

Ces NPs étant pastillées avec du bromure de potassium, on suppose que l'agrégation partielle générée avec le nettoyage par ultrafiltration n'influence pas les signaux obtenus par spectroscopie IRTF. L'habillage des NPs Au@Alendronate est donc comparé à l'alendronate seul (Figure 104).

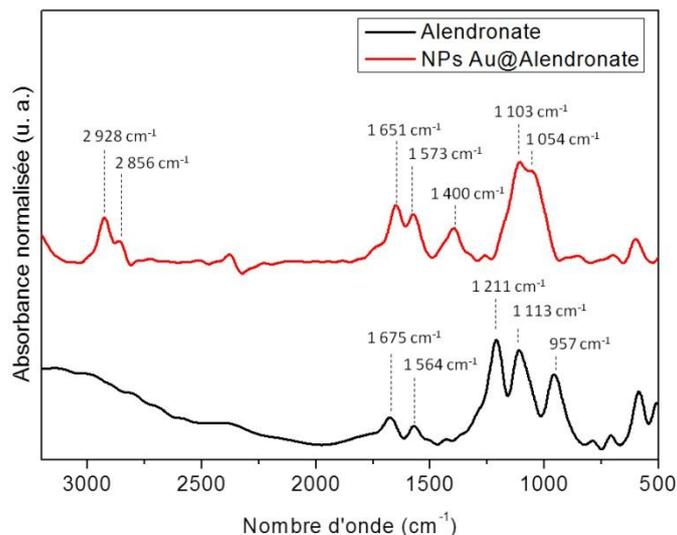


Figure 104. Comparaison des spectres IRTF des NPs Au@Alendronate versus Alendronate (molécule seule)

On retrouve sur le spectre des NPs les bandes de vibrations caractéristiques de l'alendronate tel que les cisaillements des liaisons N-H à 1650 et 1570 cm^{-1} . De façon similaire à ce qui a été observé au chapitre 2 pour les NPs Au@HMBPène, on observe une amplification des signaux correspondants à l'élongation des liaisons C-H à 2930 et 2860 cm^{-1} ainsi que les déformations des CH_2 à 1400 cm^{-1} . On obtient également un resserrement des bandes de vibrations des P-O et P=O entre 1100 cm^{-1} et 1000 cm^{-1} pour les phosphonates adsorbés sur les NPs, conformément aux résultats obtenus par Benyettou et al. sur les NPs d'argent¹⁰⁰ ainsi que nos propres résultats avec le HMBPène.

1.1.3. Détermination du taux de couverture

Le taux de couverture a été déterminé par analyse par thermogravimétrie (ATG) après lyophilisation des NPs (Figure 105).

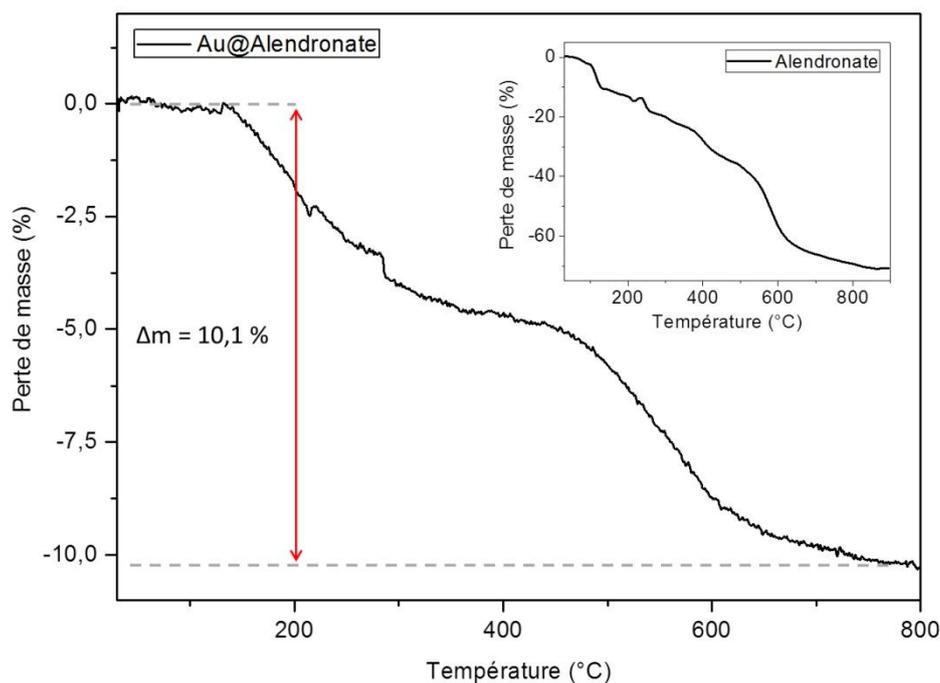


Figure 105. ATG de 3,63 mg de poudre de NPs Au@Alendronate de $41,2 \pm 9,9$ nm

La figure 105 montre une perte de masse de 10,1 %. Cette perte de masse correspond à la quantité d'alendronate pour une masse totale de 3,63 mg de NPs Au@Alendronate de 41 nm. On dénombre environ 217 000 molécules par NP soit un taux de couverture de 40,2 alendronate/nm². Ce taux, très supérieur à ce qui a été estimé pour les NPs Au@HMBPène (3,4 HMBPène/nm²), peut s'expliquer par deux raisons :

- L'alendronate est un zwitterion, capable de former des paires d'ions ce qui génère des multicouches autour de la NP.
- La dialyse est une méthode moins « drastique » que l'ultrafiltration et en l'absence de sels, ne permet pas de dissocier les paires d'ions.

1.1.4. Propriétés hydrodynamiques des NPs Au@Alendronate

Les NPs en solution sont isolées les unes des autres, comme le confirme les mesures de diamètre hydrodynamique par DLS à pH neutre ($Z_{av} = 47,3 \pm 31,1$ nm ; Figure 106 A), ce qui est suffisamment proche de la taille cristalline mesurée par MET pour témoigner de l'absence d'agrégats de particules. La valeur du potentiel ζ ($\zeta = -38,3 \pm 12,8$ mV ; Figure 106 B) prouve que l'alendronate adsorbé en surface apporte des charges négatives via ses groupements

phosphonates et permet une stabilisation du colloïde malgré la présence de cations ammonium.

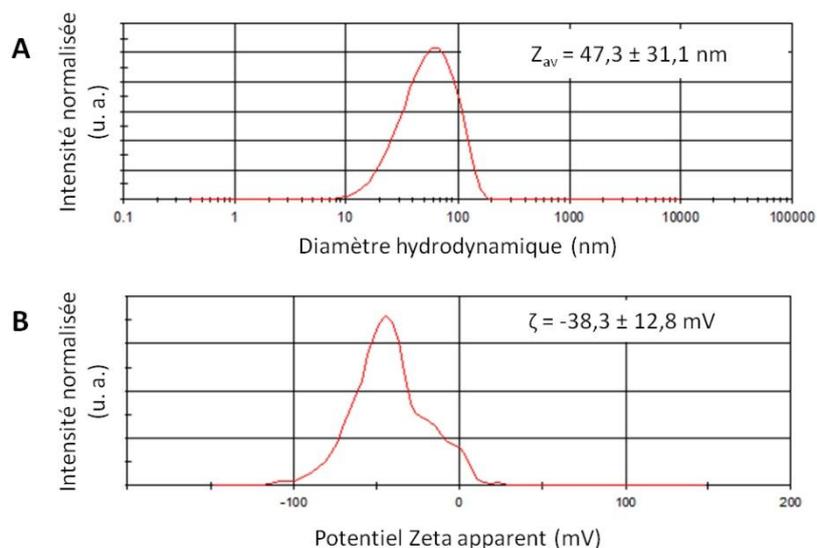


Figure 106. Mesures du diamètre hydrodynamique (A) et du potentiel ζ (B) des NPs Au@Alendronate obtenues

La bonne stabilité de ces NPs à pH physiologique nous permette d'envisager leur étude en milieu biologique.

1.2. Étude de la toxicité sur les cellules PC3 : NPs Au@Alendronate vs Au@HMBPène

Les travaux de Virtanen et al. ont montré que l'alendronate avait un effet anti-tumoral sur les cellules PC-3, la toxicité des NPs Au@alendronate a été évaluée sur le même modèle en réalisant un test au bleu d'Alamar pour évaluer la viabilité des cellules.^{††††} Par la même occasion nous testerons pour la première fois l'effet anti-tumoral du HMBPène et des NPs Au@HMBPène de 10 nm. Les molécules seules ainsi que les dispersions de NPs sont incubées 48 heures en présence des cellules avec un gradient de concentration (Figure 107).

^{††††} L'ensemble des tests au bleu d'Alamar ont été réalisés par Anouchka Plan en collaboration avec l'équipe du docteur Claire Wilhelm au sein du laboratoire Matière et Systèmes Complexes de l'Université Paris Diderot.

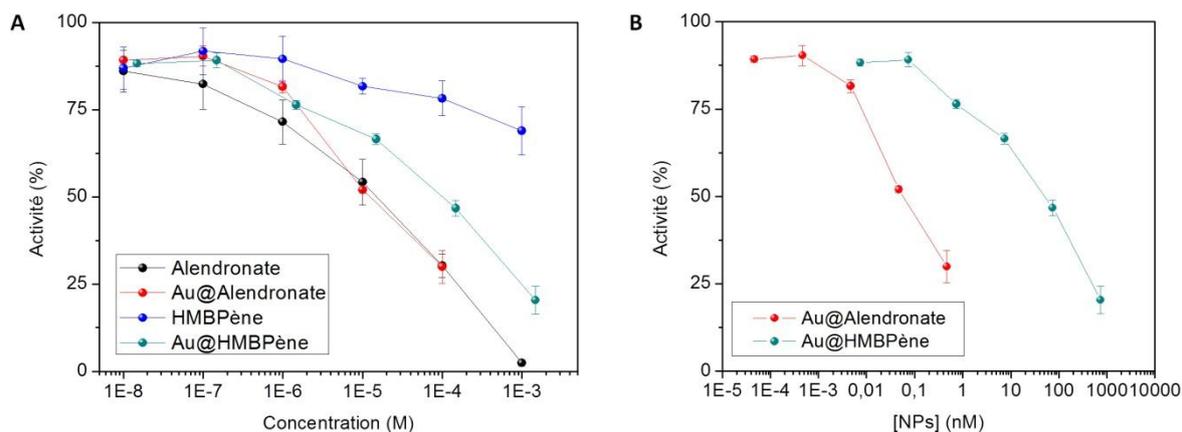


Figure 107. Étude de l'activité métabolique des cellules PC-3 en présence de NPs Au@Alendronate et de NPs Au@HMBPène : Comparaison pour différentes concentrations en molécules adsorbées et en molécules seules (A) et pour différentes concentrations en NPs (B)

La figure 107 A montre que les NPs Au@Alendronate présentent une inhibition de 50% des cellules (*inhibitory concentration* - IC_{50}) à 10^{-5} M en Alendronate adsorbé. Le même IC_{50} est obtenue pour la molécule d'alendronate seule. Les résultats obtenus en ATG (§1.1.3.) suggèrent la présence de multicouches sur les NPs. Le milieu cellulaire étant fortement salin, il est possible qu'une grande partie des molécules liées à la surface des NPs par interactions ioniques soient relarguées dans le milieu. Dans ce cas les molécules d'alendronate peuvent être considérées comme des composés solvatés, ce qui explique cette similarité avec l'activité mesurée pour la molécule seule. Bien que le potentiel anti-cancéreux de l'alendronate ne soit pas amélioré sur un modèle *in-vitro*, nous pouvons envisager une meilleure biodisponibilité *in-vivo* des NPs Au@Alendronate.¹⁹¹ On peut également envisager grâce aux propriétés optiques des NPs d'or d'y combiner l'effet photothermique. En effet les travaux d'Espinosa et al. ont montré que l'efficacité photothermique *in vivo* des NPs d'or diffèrent de ce que l'on pourrait prévoir d'après les spectres d'absorption UV-Vis en phase aqueuse.¹²³ Suivant les résultats d'Espinosa et al., on peut donc s'attendre à un déplacement de la bande de résonance plasmon des NPs Au@Alendronate vers le proche infrarouge après internalisation cellulaire. Les NPs Au@Alendronate permettrait ainsi de combiner l'effet chimio-thérapeutique de l'alendronate avec la TPT des NPs d'or.

En parallèle, l'activité anti-tumorale du HMBPène et des NPs Au@HMBPène a été évaluée. Le HMBPène seul ne présente qu'une faible activité anti-tumorale avec un IC_{50} non atteint à 10^{-3} M. L'adsorption de ce composé à la surface de NPs d'or permet d'amplifier de façon importante ($IC_{50} = 1,2 \cdot 10^{-4}$ M) son activité anti-tumorale. Cette différence peut

s'expliquer par une meilleure internalisation des NPs Au@HMBPène par rapport à la molécule seule qui est fortement électronégative. La figure 107 B montre que si l'on prend en compte les concentrations en NPs, les NPs Au@HMBPène présentent une inhibition plus faible de l'activité métabolique des cellules que les NPs Au@Alendronate. Ceci est cohérent avec les taux de couvertures déterminés ainsi que la nature de l'habillage, l'alendronate ayant une activité anti-tumorale plus efficace que le HMBPène. Néanmoins la possibilité de coupler sélectivement un composé d'intérêt sur les NPs Au@HMBPène élargie leur champ d'application en milieu biologique. De la même façon que les NPs Au@Alendronate, l'utilisation des NPs Au@HMBPène permettrait de combiner leur effet chimio- et photothérapeutique. Les NPs d'or synthétisées avec des composés HMBP sont donc potentiellement utilisables pour le traitement des tumeurs.

2. Résultats préliminaires sur la synthèse de NPs d'or multicœur

Dans cette partie nous décrirons brièvement nos premiers résultats sur la synthèse de NPs d'or multicœur à l'aide du BP-S-PEG₄₅-COOH. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les propriétés optiques des NPs d'or sont liées à leurs morphologies. Les NPs dont le domaine d'absorption s'étend jusqu'au proche infrarouge peuvent être employées pour la TPT.¹⁹², ce qui constitue une alternative à la chimiothérapie pour le traitement du cancer.

2.1. Synthèse

2.1.1. Principe

Les nanobâtônnetts d'or sont l'exemple le plus connu de NPs à fort potentiel pour la TPT.¹⁹³ Les travaux d'Alkilany et al. ont montré que les nanobâtônnetts stabilisés par le CTAB, ligand cationique disposé en bicouche, ont une toxicité accrue comparativement à leurs équivalents anioniques stabilisés par l'acide polyacrylique et le poly(allylamine) après échange de ligand.¹⁹⁴

Nous proposons d'élaborer un protocole mettant en jeu des composés HMBP non toxiques en s'inspirant du mode opératoire mis en œuvre pour la synthèse des nanobâtônnetts d'or. Nous substituons donc le BP-S-PEG₄₅-COOH au CTAB afin de s'affranchir de l'étape d'habillage par échange de ligand. En effet nous avons déterminé au chapitre précédent que notre polymère était capable de stabiliser efficacement les NPs d'or. De plus, sa forme oxydée le BP-SO₂-PEG₄₅-COOH ne présente pas de toxicité (Chapitre 4 §7.). Le CTAB joue également un rôle important lors de la synthèse des nanobâtônnetts, il agit comme un

« poison de surface » en passivant certaines faces cristallines et oriente la croissance sur un axe.¹⁹⁵ L'objectif de ces expériences est de déterminer si la structure du BP-S-PEG₄₅-COOH permet d'influencer la croissance cristalline de façon à obtenir une géométrie identifiable et de caractériser les propriétés optiques qui en découlent.

La synthèse classique des nanobâtonnets Au@CTAB procède en trois étapes (Figure 108) :

- (a) Des germes (de l'ordre de 2 nm de diamètres) sont synthétisés par réduction à l'hydroborure de sodium du complexe d'or en présence du CTAB.
- (b) Une solution de croissance est préparée en réduisant le complexe d'or à l'acide ascorbique, ce qui permet en présence de CTAB d'obtenir un complexe d'Au(I).
- (c) Les germes sont ajoutés dans la solution de croissance et l'Au(I) est réduit par l'acide ascorbique résiduel. La croissance cristalline se produit à la surface des germes pour former les nanobâtonnets.

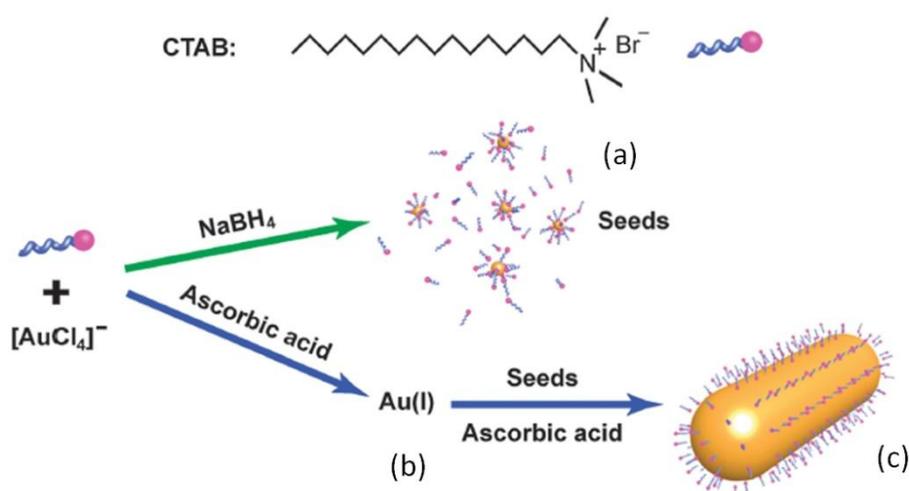


Figure 108. Voie de synthèse classique des nanobâtonnets d'or¹⁹⁶

La méthode de synthèse par « croissance sur germes » a également été développée pour l'élaboration de « nanostars » (NSs). Dans leurs travaux, Barbosa et al. proposent notamment une synthèse de NSs stabilisées par du PVP¹⁹⁷. Plus récemment, Tian et al. ont mis au point un protocole pour obtenir des NSs habillées par des composés HS-PEG-NH₂ pour des applications en tododensimétrie et en TPT.¹⁹⁸

Ainsi, nous avons adapté les trois étapes de la synthèse « par croissance sur germes » (Figure 109) en les réalisant comme suit :

- (a) Des NPs Au@HMBPène de 10 nm sont synthétisées par chauffage classique (Chapitre 2 § 6.3.)

- (b) La solution de croissance est préparée de façon analogue à ce qui est décrit ci-dessus avec le BP-S-PEG₄₅-COOH comme ligand pour stabiliser le complexe d'Au(I)
- (c) Nos « germes » de 10 nm sont alors ajoutés dans la solution de croissance

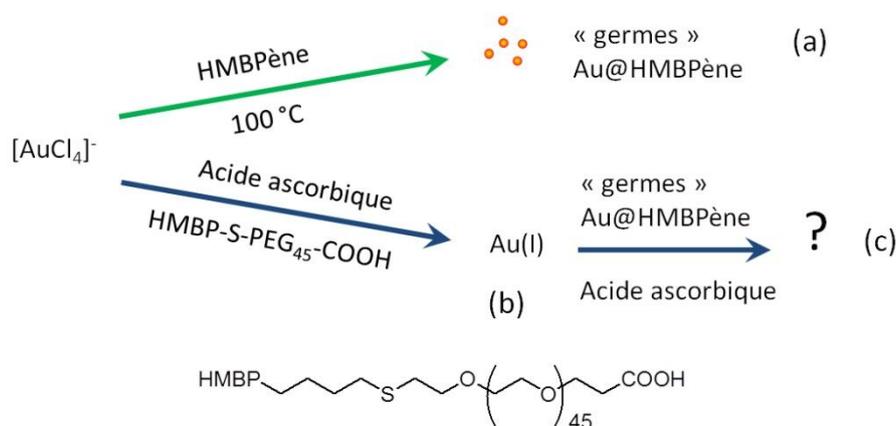


Figure 109. Stratégie d'obtention de NPs anisotropes envisagée à l'aide du HMBP-S-PEG₄₅-COOH

Afin de favoriser les conditions d'un processus homogène, nous avons choisi d'utiliser les NPs Au@HMBPène de 10 nm car elles présentent une faible dispersion en taille et peuvent être synthétisées aisément dans des quantités relativement importantes. La taille des NPs que nous utilisons comme « germes » est très supérieure à celles employées pour la synthèse de nanobâtônnetts et NSs. A concentration en or égale, nous avons donc dans notre cas une concentration en NPs très inférieure. Afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur la morphologie des NPs obtenues, nous avons répété l'expérience avec trois concentrations en germes différentes : $[NPs]_1 = 0,09 \text{ nM}$, $[NPs]_2 = 0,31 \text{ nM}$ et $[NPs]_3 = 0,62 \text{ nM}$.

2.1.2. Observations expérimentales

Après avoir mélangé le BP-S-PEG₄₅-COOH avec le complexe d'Au(III), la solution est légèrement jaune (Figure 110 A). En additionnant l'acide ascorbique (trois équivalents par rapport à l'or) la solution se décolore avec la formation du complexe d'Au(I) (Figure 110 B), puis une fois que l'on ajoute la solution de germes la solution se teinte après quelques minutes en bleu-gris (Figure 110 C). Ces observations sont récurrentes quel que soit la concentration de la solution de germes ajoutée.

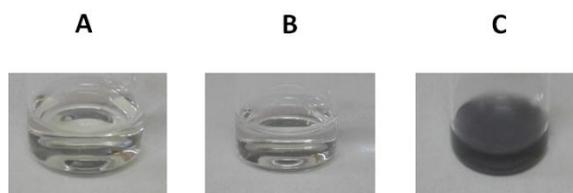


Figure 110. Évolution de la couleur de la solution pour les différentes étapes de la synthèse

Lors de la formation du complexe d'Au(I), deux équivalents d'acide ascorbique sont « consommés ». La réaction est amorcée avec l'ajout de germes et le dernier équivalent restant d'acide ascorbique permet de réduire l'Au(I) en Au(0).

2.1.3. Morphologie et contrôle de la taille

Les clichés par MET de chacune des dispersions obtenues nous confirment que le BP-S-PEG₄₅-COOH induit une morphologie particulière aux NPs (Figure 111 A). Nous les nommerons poétiquement « nanofleurs » (NFs). On constate que pour des concentrations croissantes en germes, la taille des NFs diminue. Bien que le spectre d'absorption UV-Vis des différentes dispersions de NFs soit très semblables (Figure 111 B), les mesures par DLS du diamètre hydrodynamique confirment l'évolution en taille observée par MET (Figure 111 C). Le spectre d'absorption des NFs ne ressemble pas à ce que l'on peut trouver dans la littérature, notamment à celui des NSs,¹⁹⁷⁻¹⁹⁸ essentiellement à cause des différences morphologiques de ces nano-objets. Cependant, leur taille importante et le caractère « non-sphérique » de ces NFs induit un facteur géométrique qui influence considérablement les sections efficaces de diffusion et d'extinction (Chapitre 1 §2.3.). Si l'on prend l'exemple des NFs 3, de taille comparable aux NPs Au@Alendronate décrites précédemment, le spectre d'absorption UV-Vis couvre cette fois ci largement la région du proche infrarouge.

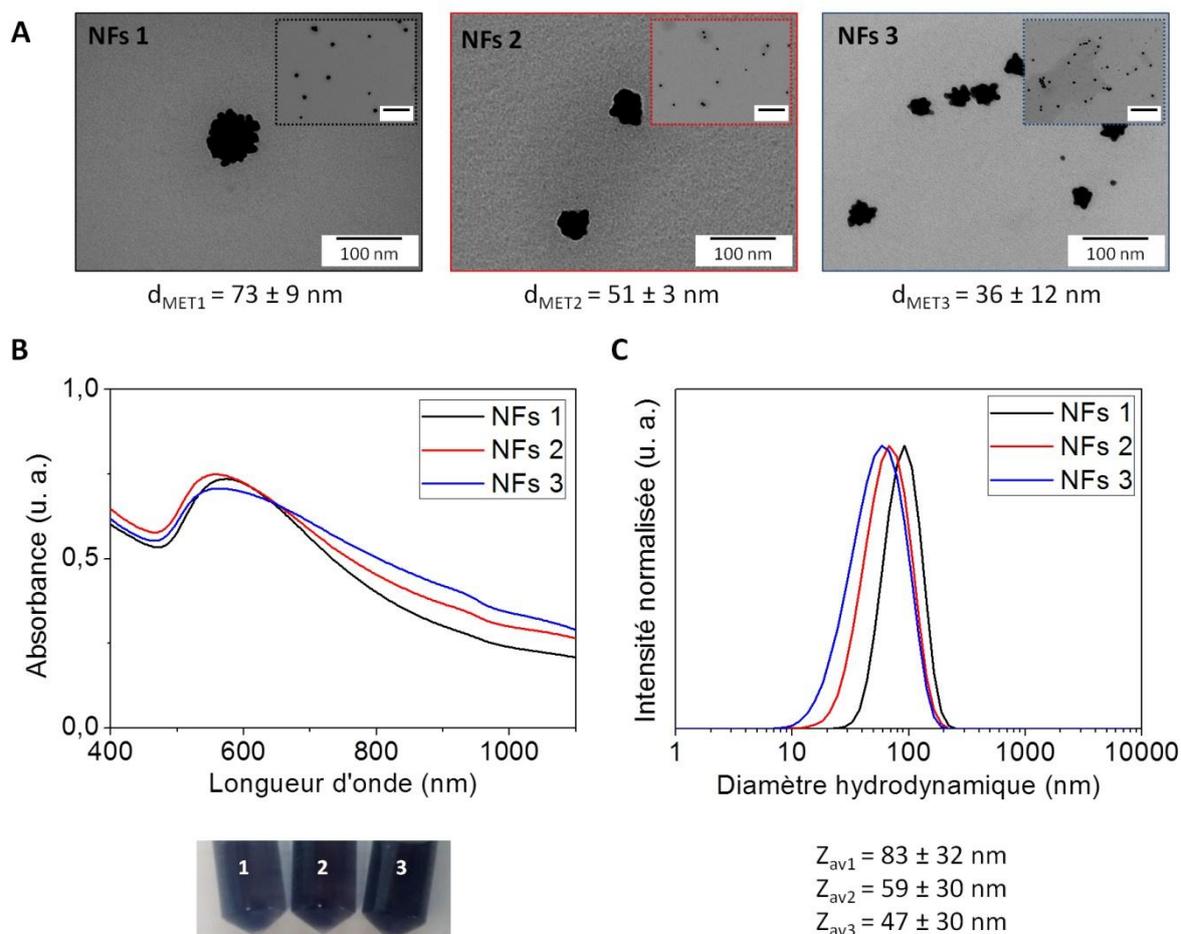


Figure 111. Caractéristiques des NFs 1,2 et 3 obtenues pour des concentrations en germes de respectivement $[NPs]_1 = 0,09 \text{ nM}$, $[NPs]_2 = 0,31 \text{ nM}$ et $[NPs]_3 = 0,61 \text{ nM}$: photographies MET (A) ; spectre UV-Vis et photographie des solutions (B) et diamètres hydrodynamiques (C)

Afin de rationaliser ce contrôle de la taille des NFs, les valeurs du diamètre mesurées par MET sont comparées à celles calculées par des modèles mathématiques. Lorsque les germes sont introduits dans la solution de croissance, on pose l'hypothèse que :

- La quantité totale d'Au(I) est réduite en Au(0).
- La croissance cristalline se réalise sur chaque germe, donc le nombre de NPs reste constant.

Si l'on apparente les NFs à des sphères alors le diamètre D s'exprime selon le modèle suivant (appelé modèle 1) :

$$D = K_1 \sqrt[3]{\frac{[Au]V_{maille}}{[NPs]}} \quad (22)$$

avec $[Au]$ la concentration totale en or, $[NPs]$ la concentration en germes, V_{maille} le volume d'une maille cristalline d'or et une constante $K_1 = 2(3/16\pi)^{1/3}$ (les détails des calculs sont donnés en annexe 16).

Si l'on apparente les NFs à un assemblage de petites sphères, alors le diamètre D' s'exprime selon le modèle suivant (appelé modèle 2 ou « modèle de la framboise » inspiré des travaux de Richard et al.¹⁹⁹) :

$$D' = \frac{K_2}{r_s} \sqrt[3]{\frac{V_{cube}[Au]V_{maille}}{[NPs]}} \quad (23)$$

avec r_s le rayon des petites sphères, V_{cube} le volume cubique occupé par une petite sphère et un constante $K_2 = 2(9/64\pi^2)^{1/3}$. Les excroissances des NFs observées sur les clichés par MET peuvent être assimilées à des sphères de rayon $r_s = 5 \text{ nm}$ (les détails des calculs sont donnés en annexe 16).

En comparant ces deux modèles théoriques aux valeurs mesurées par MET pour chacune de ces expériences, on constate que le modèle 2 correspond le mieux (Figure 112).

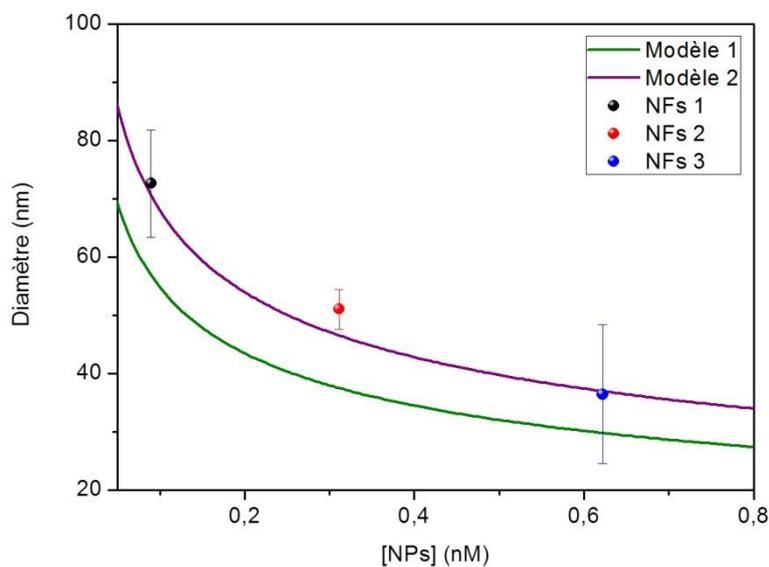


Figure 112. Comparaison de la taille mesurée en MET et de la taille calculée sur les modèles 1 et 2

La cohérence des observations expérimentales avec ce modèle géométrique confirme donc que l'on a bien une croissance cristalline qui se réalise sur chaque germe et

que le nombre de NPs reste constant. La structure framboise de ces particules induit donc une structure multicœur qui devra être confirmé par MET haute résolution.

2.2. Étude cinétique et proposition d'un mécanisme de croissance

Nous proposons ici de faire un suivi de la synthèse de NFs 1 par spectroscopie d'adsorption UV-Vis *in situ*. Cette réaction se faisant à température ambiante, on la réalise dans une cuve pour spectromètre avec des acquisitions pour différent intervalles de temps (Figure 113)

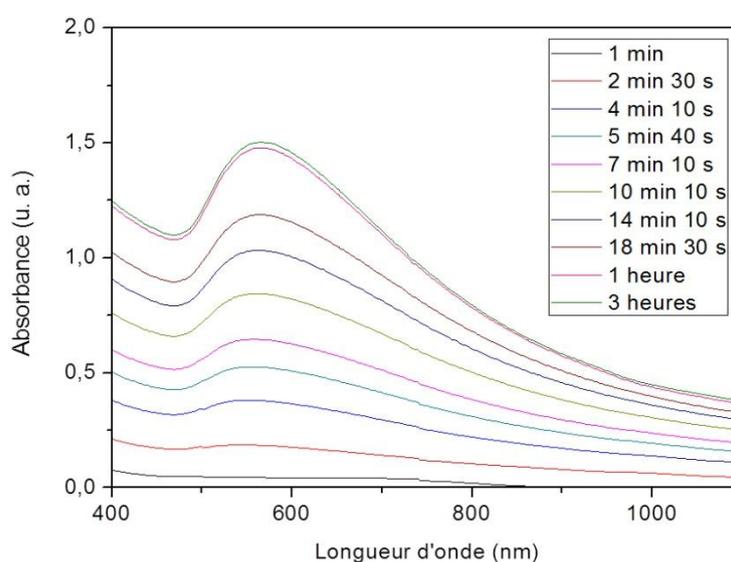


Figure 113. Suivi *in situ* de l'absorption UV-Vis pour la synthèse des NFs 1

Il apparaît que dès les premiers instants de la réaction, les NPs absorbent sur toute la gamme spectrale dès le début de la croissance cristalline. L'augmentation de l'intensité est le corolaire de l'augmentation de la taille des NFs. C'est pourquoi nous proposons un mécanisme de formation par diffusion d'un réseau de sphères compactes autour de chaque germe (Figure 114).

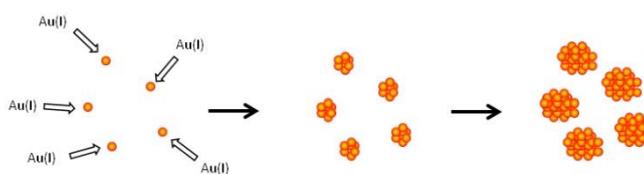


Figure 114. Proposition d'un mécanisme de formation des NFs

3. Conclusion

Les travaux présentés sur les caractérisations physicochimiques des NPs Au@Alendronate et leurs effets sur l'activité métabolique des cellules PC-3 montrent que la synthèse des NPs d'or par la voie des HMBP est viable pour l'élaboration de nanoplateformes anti-tumorales. De plus, si certains HMBP ont une activité anti-cancéreuse plus faible, elle peut être améliorée lorsqu'ils sont « portés » par des NPs d'or comme nous l'avons vu dans le cas du HMBPène. On pourrait étendre ce principe à une large variété de HMBP, pour différentes tailles et formes de NPs, puis réaliser des tests de toxicité sur d'autres lignées cellulaires.

A travers l'exemple du BP-S-PEG₄₅-COOH, nous avons vu qu'il est possible d'induire un changement de morphologie des NPs en réalisant une synthèse de type « croissance sur germes ». La taille des NFs obtenues peut être contrôlée avec la concentration en germes. L'adéquation au modèle théorique « de la framboise » et l'évolution de l'absorption UV-Vis en temps réel suggère un mécanisme de formation par diffusion. De par leurs propriétés optiques et leur absorption dans le proche infrarouge, ces NFs pourraient être de bons candidats pour des applications en TPT.

Ces deux exemples montrent que les HMBP sont des composés prometteurs pour la synthèse de NPs d'or à visées thérapeutiques. En fonction de certains éléments de leur structure comme la taille de leur chaîne ou encore leurs groupements fonctionnels, on influence les propriétés physicochimiques des NPs et donc leurs comportements en milieu biologique. Ainsi, la variété des substrats HMBP laisse entrevoir un vaste champ d'étude pour construire de nouveaux outils en nanomédecine.

4. Matériel et méthodes

4.1. Matériel

Tous les réactifs sont commerciaux et ont été utilisés sans purification préalable.

4.2. Méthodes

4.2.1. Synthèse des NPs Au@Alendronate de 40 nm

On prépare deux solutions de réactifs précurseurs : une solution A d'acide chloraurique ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 20 mM (38,8 mg dans 5 mL d'eau pure) et une solution B d'alendronate ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NaNO}_7\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 44 mM (28,6 mg dans 2 mL d'eau pure) préalablement ajusté à pH = 10. 1 mL de solution A sont ajoutés à 17 mL d'eau pure dans un monocol. Une fois porté à ébullition on ajoute 2 mL de solution B au mélange que l'on laisse sous agitation pour 10 min de reflux. Le changement de couleur est immédiat et on obtient après quelques minutes une solution rouge pourpre de NPs d'or de 40 nm.

4.2.2. Évaluation de l'activité métabolique de cellules PC3

On prépare deux plaques de 96 puits contenant 10 000 cellules PC3 par puit, dans 100 μL de milieu DMEM (ThermoFisher) complet contenant 10 % de sérum de veau fœtal (ThermoFisher) et 1 % Pénicilline-Streptomycine (ThermoFisher). Après 4 heures à l'étuve à 37 °C, on incube les solutions à tester pour des gradients de concentration de 10^{-3} M à 10^{-8} M pendant 48 heures. Les puits sont rincés à l'aide d'une solution de milieu RPMI blanc, puis remplis avec 200 μL de solution de bleu d'alamar (ThermoFisher) à 10 % dans ce même milieu. On laisse les cellules durant 2 heures à l'étuve, puis on mesure l'émission de fluorescence à $\lambda = 585\text{ nm}$ en excitant pour $\lambda = 570\text{ nm}$.

4.2.3. Synthèse des NFs

On prépare une solution C d'acide ascorbique ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à 100 mM (17,6 mg dans 1 mL d'eau pure) et une solution D de HMBP-S-PEG₄₅-COOH (synthétisé selon la procédure décrite au chapitre 4 §9.2.4.) à 61 mM (233,5 mg dans 1,6 mL d'eau pure). 85 μL de solution D sont dilués dans un pilulier pour un volume final de 2,5 mL en ajustant pH = 4. On y ajoute successivement 63 μL de solution A, 19 μL de solution C et 30 μL de solution de NPs Au@HMBPène de 10 nm (synthétisé selon la procédure décrite au chapitre 2 §6.3.) en agitant manuellement. La solution est laissée à température ambiante « au repos » sur plusieurs heures.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'état de l'art réalisé au chapitre 1 nous a permis de souligner une stratégie communément mise en œuvre pour la synthèse et la fonctionnalisation des NPs. Elle consiste dans un premier temps à la formation du corps cristallin de la NP et ensuite au contrôle de la composition chimique de surface par une réaction d'échange de ligand.

Nous avons présenté dans ce manuscrit les synthèses réalisées dans le but d'obtenir des NPs fonctionnalisées à l'aide d'un composé HMBP. Ces synthèses présentent les avantages de la synthèse de Turkevich : réalisables en une étape, dans l'eau et ne nécessitent pas de réactifs dangereux. Par ailleurs, l'aspect bifonctionnel des HMBP permet d'introduire à la surface des NPs un groupement chimique choisi. En effet, la maîtrise de la synthèse organique des HMBP donne accès à une importante gamme de molécules et permet d'envisager une vaste diversité d'habillage.

Au chapitre 2 nous avons pu valider le mode de chélation par les groupements phosphonates selon les résultats obtenus en spectrométrie IRTF et XPS. Ces résultats valident notre stratégie du ligand réducteur bifonctionnel. Partiellement dégradé dans le processus d'oxydoréduction, le HMBPène n'ayant pas réagi se greffe sur la surface de la NP d'or et garde sa double liaison C=C disponible pour une étape de post-fonctionnalisation. L'étude de l'influence du pH sur le diamètre final des NPs présente des similitudes avec les observations faites pour la synthèse de Turkevich. Dans ce cas particulier nous avons donc montré qu'il est possible de contrôler aisément la taille des NPs, donc leur surface spécifique en solution.

Les études réalisées au chapitre 3 illustrent l'adaptabilité de la chimie « Click ». Réalisée pour la première fois sur un composé de type HMBP, la cycloaddition des composés tétrazines est un outil efficace pour la post-fonctionnalisation chimiosélective des NPs Au@HMBPène.

Par ailleurs nous avons aussi employé la chimie « Click » pour modifier la structure du HMBP avant de l'employer pour la synthèse des NPs d'or. C'est l'objet du chapitre 4 dans lequel nous avons utilisé des composés de type HMBP-PEG. Nous avons pu constater qu'une simple oxydation au niveau d'un atome de soufre (au sein d'un PEG de 45 unités) change drastiquement la morphologie des NPs obtenues. Ceci confirme l'importance cruciale de la structure du ligand réducteur sur la cinétique et donc le mécanisme de formation des NPs. L'optimisation de la réaction nous a permis d'obtenir une dispersion de NPs « pegylées » de taille contrôlée, avec une excellente stabilité colloïdale en milieu physiologique, une faible

toxicité et la possibilité de post-fonctionnalisation par couplage carbodiimide. Ces propriétés permettent d'envisager l'utilisation de cette nanoplateforme d'or pour des applications biologiques.

Ce qui nous a conduit à étudier le potentiel des NPs Au@HMBP en vue d'applications thérapeutiques au chapitre 5. Ces résultats préliminaires ont montré que les méthodes de synthèse développées au cours de notre travail peuvent être reproduites avec d'autres HMBP, comme l'alendronate, pour ses propriétés anti-tumorales. Par ailleurs, nous avons identifié que le HMBP-S-PEG₄₅-COOH peut être un ligand pour la synthèse de NFs à partir de germe d'or en suivant un mode opératoire inspiré des synthèses de nanobâtonnets ou de NSs d'or.

Ces diverses études montrent que la chimie du phosphore et la chimie « Click » sont des outils puissants pour la synthèse et la fonctionnalisation des NPs d'or. L'importance des travaux réalisés dans ces deux domaines laissent entrevoir un vaste domaine de recherche pour l'élaboration notamment de nouveaux outils en nanomédecine.

Dans le prolongement des résultats obtenus, de nombreuses perspectives peuvent être développées sur ce sujet.

Nous souhaitons notamment étendre le principe de la synthèse de NPs assistée par réduction à l'acide ascorbique pour des HMBP-alcyne. Avec une optimisation des conditions réactionnelles, cela permettrait de mieux contrôler la taille et la morphologie des NPs. Ces composés, une fois adsorbés à la surface des NPs, pourraient offrir des possibilités de couplage par réaction du Huisgen sur la triple liaison C≡C.

De plus il serait intéressant d'appliquer la réaction de cycloaddition sur les NPs Au@HMBPène avec des substrats tétrazine d'intérêt biologique, et quantifier le taux de couplage. La toxicité de ces NPs pourrait être étudiée afin de s'assurer de leur viabilité in vivo.

Dans la continuité de ce qui a été évoqué au dernier chapitre, il faudrait optimiser les paramètres de ratio, de pH ainsi que la méthode de réduction pour la synthèse de NPs Au@Alendronate. L'obtention de NPs de diamètre de l'ordre de 10 nm permettrait d'assurer une meilleure stabilité colloïdale mais également une surface spécifique plus importante. Ces facteurs devraient donc favoriser une amélioration de l'activité anti-tumorale.

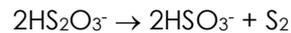
Par ailleurs, l'ensemble des NPs obtenues avec les composés HMBP doivent être étudiées pour des applications en TPT. Et ceci dans le but de déterminer l'influence de caractéristiques telles que la taille, la morphologie et la nature chimique de l'habillage sur l'efficacité du traitement.

Enfin, nous envisageons de générer d'autres morphologies de NPs par la méthode « de croissance sur germes » en employant des germes de différentes tailles et des ligands HMBP de différentes structures.

ANNEXES

Annexe 1. Théorie de Lamer

La Mer et al. ont travaillé sur la synthèse de sulfure colloïdal à partir de la réaction de décomposition des ions thiosulfate dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique :



Tel que le décrit sur la figure A.1, ils observent que la concentration en sulfure augmente avec l'avancement de la réaction et dépasse la concentration de saturation C_s . La nucléation commence à partir d'une concentration C_{\min} et compense la supersaturation afin de rester en deçà de la concentration critique C_{\max} . La formation rapide des nucléis fait ensuite diminuer la concentration du sulfure aqueux. Une fois que celle ci devient inférieure à C_{\min} , le système bascule sur le régime de croissance par diffusion. Les particules grossissent ainsi jusqu'à atteindre C_s .

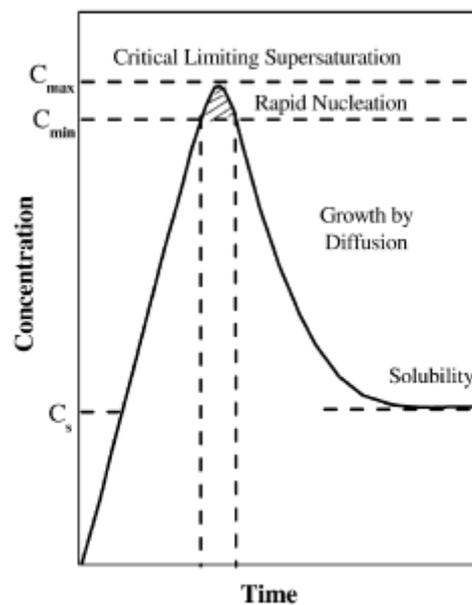


Figure A.1. Évolution de la concentration en sulfure avant et après la nucléation au cours du temps

Annexe 2. Diamètre hydrodynamique et potentiel ζ

Le potentiel ζ correspond à la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution, soit plus précisément la différence de potentiel entre

un plan de la double couche appelé plan de cisaillement et un point de la solution. Pour mesurer cette grandeur, on applique un champ électrique E à la solution entre deux électrodes. Les particules chargées vont migrer à une vitesse V appelée vitesse électrophorétique et donnée par :

$$\mu = \frac{V}{E}$$

avec μ la mobilité électrophorétique.

C'est cette dernière grandeur qu'on relie au potentiel ζ par l'intermédiaire de différents modèles, dont l'approximation de Smoluchowski, valable en milieu aqueux :

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon}$$

avec ε la constante diélectrique de l'eau.

En pratique, il suffit donc de mesurer la vitesse électrophorétique pour accéder au potentiel zêta. Cette mesure s'effectue par effet Doppler : on compare la différence de fréquence entre le faisceau laser incident et le faisceau laser diffusé à l'aide d'un interféromètre.

Le diamètre hydrodynamique est par ailleurs une autre caractéristique importante des NPs en solution. Cette grandeur est mesurée en spectroscopie par diffusion dynamique de la lumière (DLS), aussi appelée spectroscopie par corrélation de photons. Le diamètre hydrodynamique est égal à la somme du diamètre de la particule et de l'épaisseur de sa double couche de solvatation (Figure A.2).

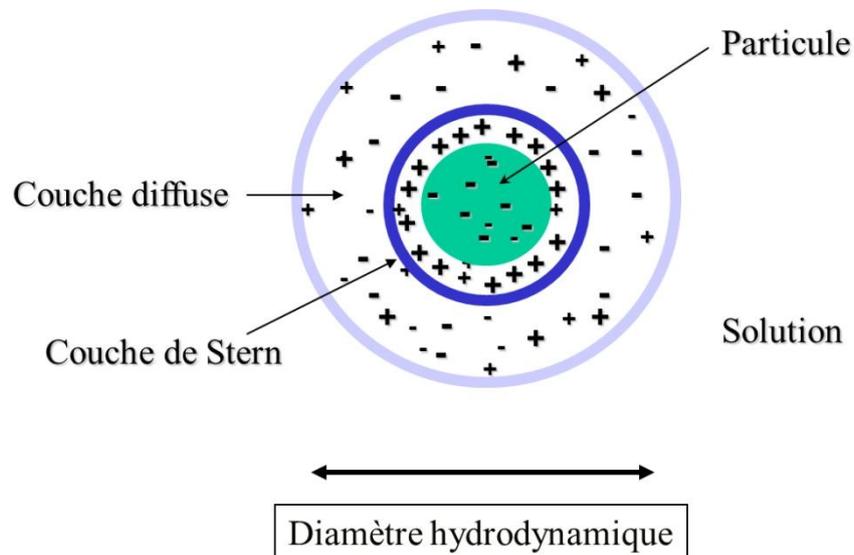


Figure A.2. Diamètre hydronamique

Dans un échantillon de particules en suspension, celles-ci sont soumises au mouvement brownien du fait de l'agitation thermique. Les grosses particules se déplacent lentement, tandis que les petites se déplacent rapidement. Si l'on éclaire la solution avec un laser, l'intensité diffusée par les grosses particules varie moins vite au cours du temps que pour des petites particules. La période de cette variation d'intensité, appelée t , correspond alors au temps de relaxation d'une fonction $G(t)$ appelée fonction d'auto-corrélation. Cette fonction permet de déduire le coefficient de diffusion translationnel D . Le diamètre hydrodynamique d_H des NPs est calculé à l'aide de la relation de Stokes-Einstein.

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

avec k la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité.

Le diamètre hydrodynamique est également le diamètre d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée. Dans nos travaux, nous donnons la taille moyenne (Z-average size notée Z_{av}), qui correspond à la taille des particules (ou agrégats de particules) qui diffusent avec la plus forte intensité.

Annexe 3. La spectroscopie par photoélectrons X

La spectroscopie par photoélectrons X est une technique d'analyse directe de la structure chimique et électronique des matériaux. L'échantillon est soumis à un rayonnement X, ce qui provoque le décrochage des électrons de la surface (Figure A.3).

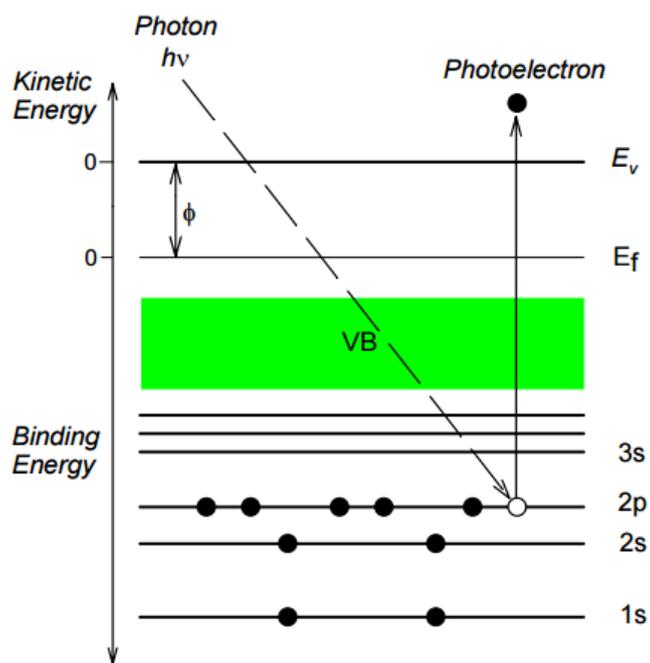


Figure A.3. Principe de la spectroscopie par photoélectrons X

L'application de la loi de conservation de l'énergie permet de relier l'énergie cinétique E_C du photoélectron k à l'énergie de liaison E_L ou potentiel d'ionisation par la relation :

$$E_C = h\nu - (E_L + \phi)$$

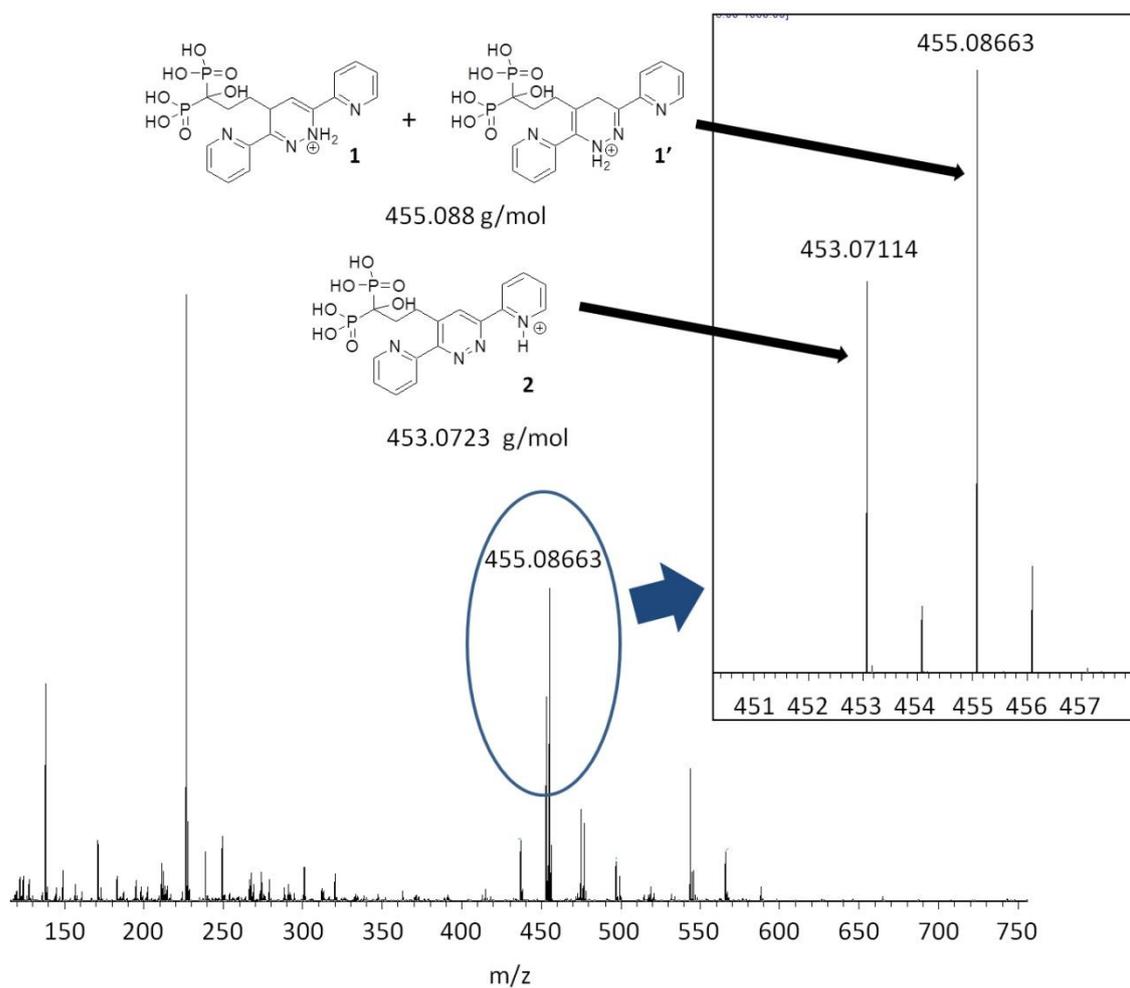
avec h la constante de Planck, ν la fréquence et ϕ le travail de sortie de l'analyseur.

Dans nos travaux nous nous sommes intéressés aux énergies de liaison des pics de cœur. Ces grandeurs sont hautement sensibles à l'environnement chimique des atomes, leurs degrés d'oxydation ainsi que les transferts électroniques.

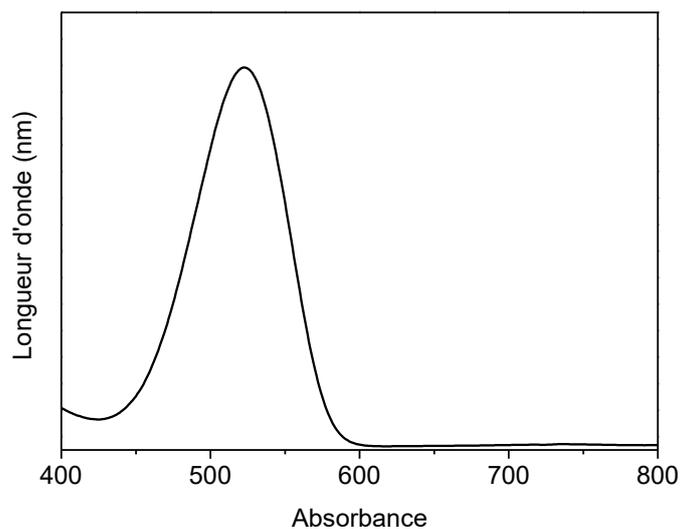
Annexe 5. ATG et calculs du taux de couverture des NPs Au@HMBPène de 14 nm

	Perte de masse	Masse	Masse molaire	Quantité de matière	Nombre de HMBPène/NPs	Taux de couverture
	%	mg	g/mol	mmol		nm ²
HMBPène	2,6	0,23	311	1,08E-03	1999	3,39
NPs d'or (13,7 nm)		8,47	15636991	5,42E-07		

Annexe 6. Spectre de Masse haute résolution du HMBP-PyTz



Annexe 7. Spectre d'absorption UV-Vis du pyTz



Annexe 8. Calculs des constantes cinétiques

Afin de tenir compte de la dégradation du PyTz dans les conditions réactionnels de l'étude cinétique, l'évolution de l'absorbance est mesurée au cours du temps.

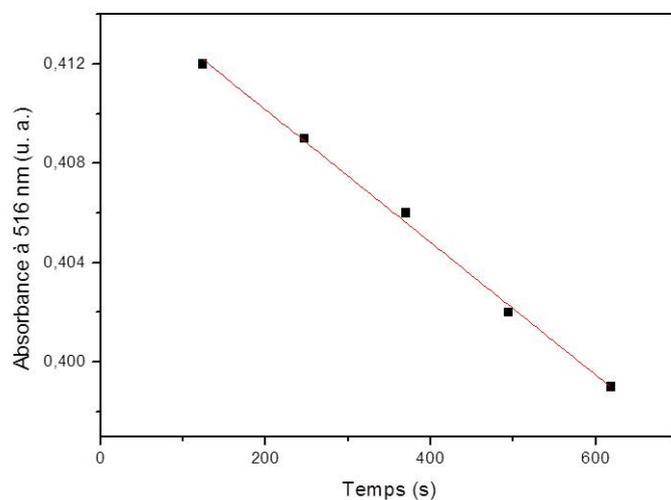


Figure A.4. Suivi cinétique de la dégradation du pyTz en solution à pH = 1

L'absorbance étant proportionnelle à la concentration en pyTz (loi de Beer-Lambert), la figure A.4 montre que la vitesse de dégradation est constante et puisque la concentration

évolue de façon linéaire. Dans ces conditions la réaction a un ordre global de 0 et s'écrit sous la forme

$$r_{deg} = d[pyTz]/dt = \Delta[pyTz]/\Delta t = k_{deg}$$

pour une absorptivité molaire de $\epsilon = 416 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ on en déduit donc $k_{deg} = (6,4 \pm 0,1)\cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$

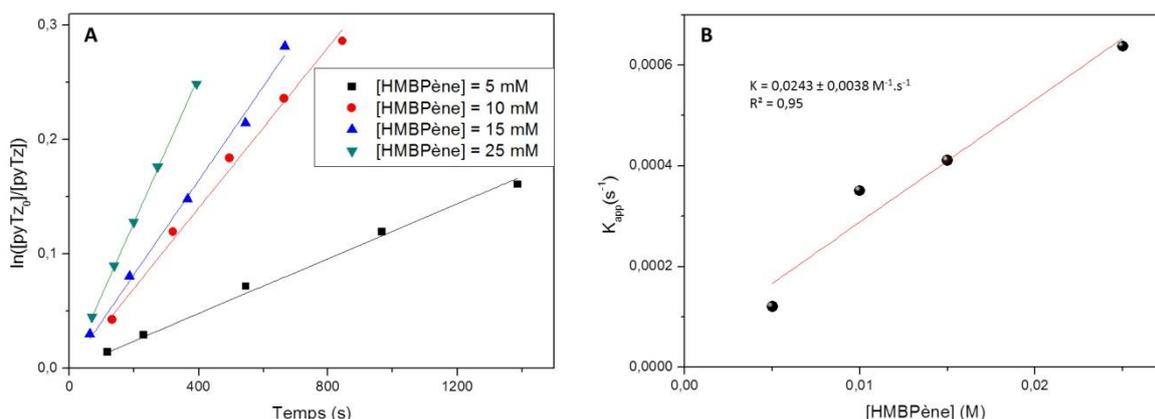


Figure A.5. Détermination graphique des constantes cinétiques apparentes pour différentes concentrations en HMBPène (A) et de la constante cinétique globale de la réaction (B)

La cycloaddition du pyTz sur les alcènes est décrite par Knall et al. comme étant une réaction d'ordre global 2 et d'ordre partiel 1 pour chacun des réactifs.¹⁷³ L'expression de la vitesse de réaction r est donc dans notre cas :

$$r = k[HMBPène][pyTz]$$

avec k la constante cinétique.

Lorsque $[HMBPène] \gg [pyTz]$ alors $[HMBPène]$ est considéré comme constante. L'expression de la vitesse devient alors :

$$r = k_{app}[pyTz]$$

avec $K_{app} = k[HMBPène]$ la constante cinétique apparente.

Donc pour un avancement x :

$$dx/dt = k_{app}[pyTz]$$

$$-d[pyTz]/dt = k_{app}[pyTz]$$

$$-d[pyTz]/[pyTz] = k_{app}dt$$

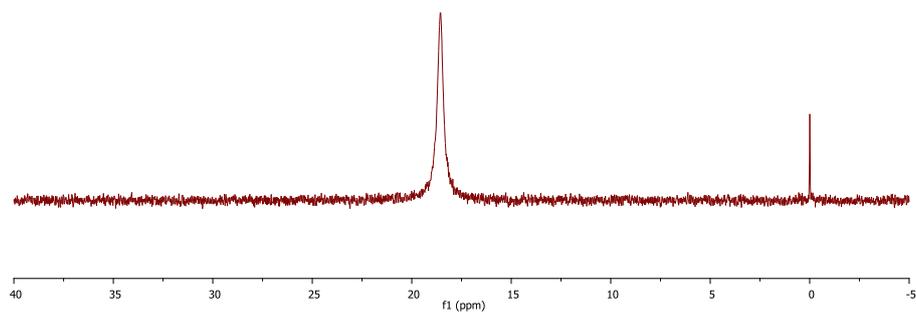
En intégrant sur le temps on obtient :

$$\ln([pyTz]_0/[pyTz]) = k_{app}t$$

L'expérience permet donc de déterminer une constante apparente pour chaque concentration en HMBPène fixée (Figure A.5). Le ratio $[PyTz]_0/[PyTz]$ est quantifié par la mesure de l'absorbance au cours du temps en tenant compte de l'autodégradation du PyTz.

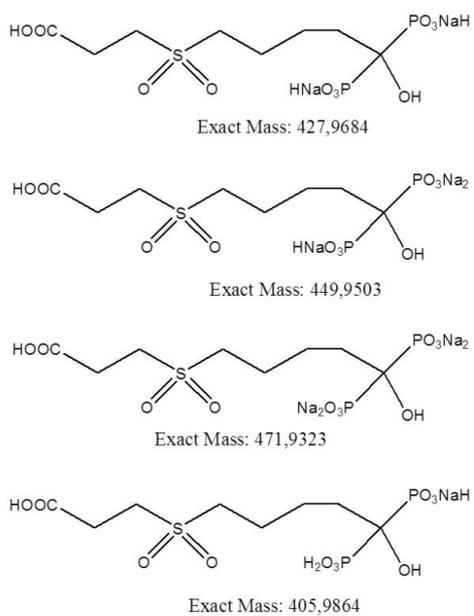
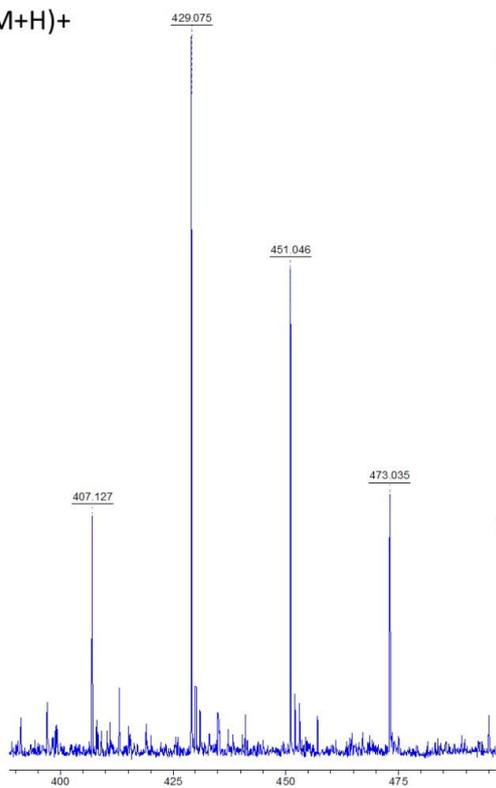
Par définition, K_{app} est linéaire en fonction de $[HMBPène]$ et nous permet de déterminer la constante cinétique $k = 0,0243 \pm 0,0038 \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Figure A.5).

Annexe 9. Dégradation partielle du HMBP-S-COOH avec l'excès d'oxydant

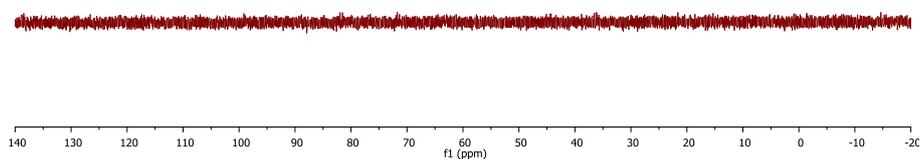


Annexe 10. Masse du HMBP-SO₂-COOH

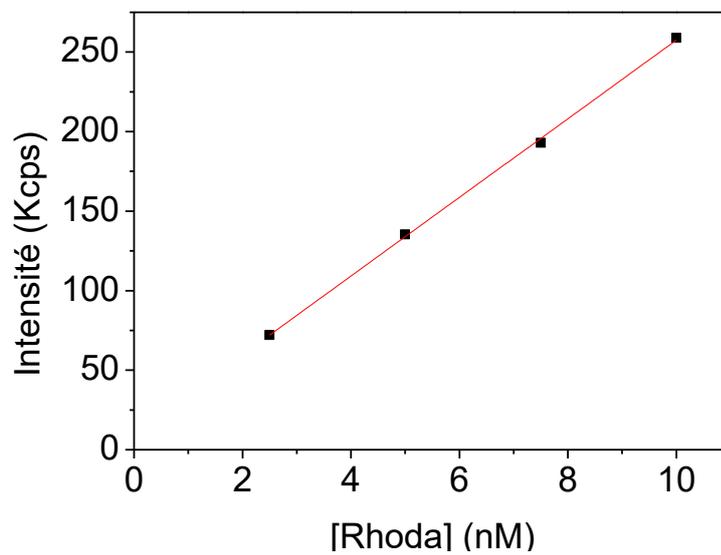
MALDI-MS
(M+H)⁺



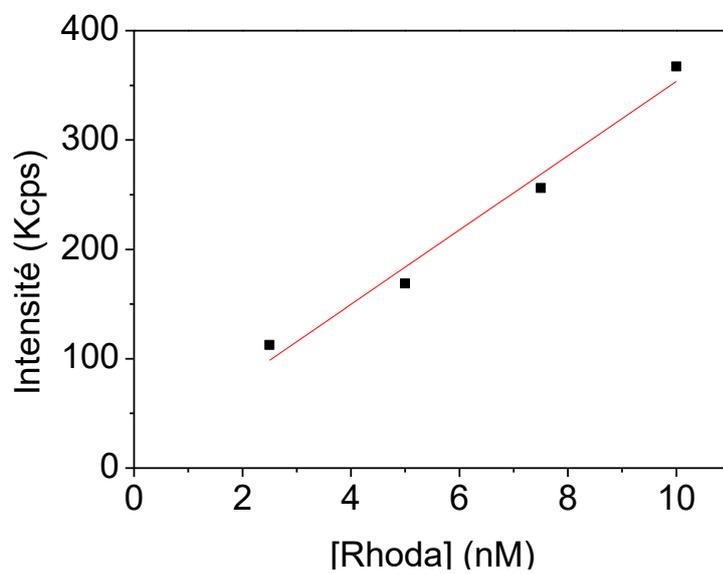
Annexe 11. Absence de signal en RMN ^{31}P pour les NPs Au@PEG



Annexe 12. Étalonnage en fluorescence de la rhodamine 123



Annexe 13. Étalonage en fluorescence de la rhodamine 123 en présence de mercaptopropionate



Annexe 14. Test au bleu d'Alamar

Le test au bleu d'Alamar est une évaluation de la viabilité cellulaire par fluorimétrie. La résazurine, une fois injectée dans le milieu cellulaire est métabolisée par les cellules en un composé fluorescent : la résorufine (Figure A.6). Le signal en fluorescence mesuré est donc proportionnel au nombre de cellules actives.

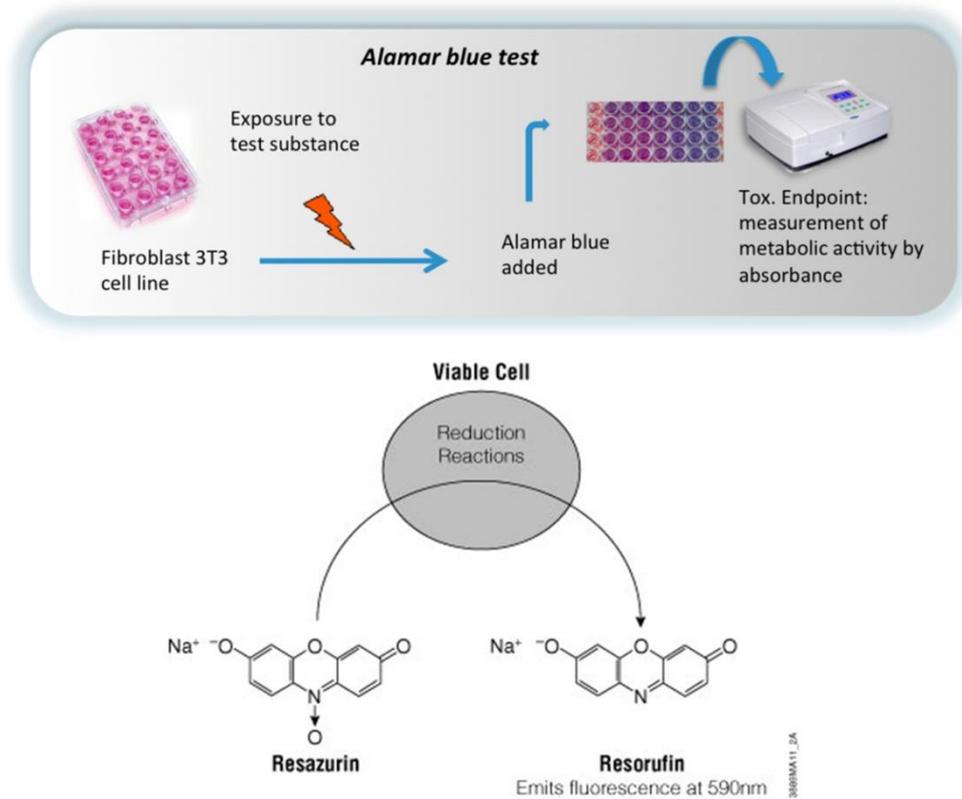


Figure A.6. Principe du test au bleu d'Alamar

Annexe 15. ATG et calculs du taux de couverture des NPs Au@HMBPène de 14 nm

	Perte de masse	Masse	Masse molaire	Quantité de matière	Nombre d'alendronate/NPs	Taux de couverture
	%	mg	g/mol	mmol		
Alendronate	10,1	0,37	315	1,64E-03	214240	40,18
NPs d'or (41,2 nm)		3,26	425288014	7,67E-09		

Annexe 16. Calculs du diamètre théorique des NFs

Modèle 1 : Considérons la NF comme une sphère.

Son diamètre s'exprime alors

$$D = 2 \left(\frac{3V}{4\pi} \right)^{1/3}$$

Une maille cristalline contenant quatre atome d'or, on peut exprimer V

$$V = \frac{1}{4} n(Au)_{NP} V_{maille}$$

avec V_{maille} le volume de la maille et $n(Au)_{NP}$ le nombre d'atome d'or par NF

on définit $n(Au)_{NP}$ tel que

$$n(Au)_{NP} = \frac{[Au]}{[NPs]}$$

avec $[Au]$ la concentration en or dans le milieu et $[NPs]$ la concentration en germes.

On en déduit

$$D = 2 \left(\frac{3}{16\pi} \right)^{1/3} \left(\frac{[Au] V_{maille}}{[NPs]} \right)^{1/3}$$

Modèle 2 :Considérons la NF comme un ensemble compact de sphères de rayons r_s et occupant un volume cubique V_{cube} .

Le volume V' de la NF s'exprime alors

$$V' = N_{sphere} V_{cube}$$

avec N_{sphere} le nombre de sphère par NF, soit

$$N_{sphere} = \frac{n(Au)_{NP}}{n(Au)_s}$$

$n(Au)_s$ étant le nombre d'atome d'or par sphère.

De même qu'établit précédemment,

$$n(Au)_s = 4 \frac{V_s}{V_{maille}}$$

avec V_s le volume cristallin de la sphère.

On en déduit

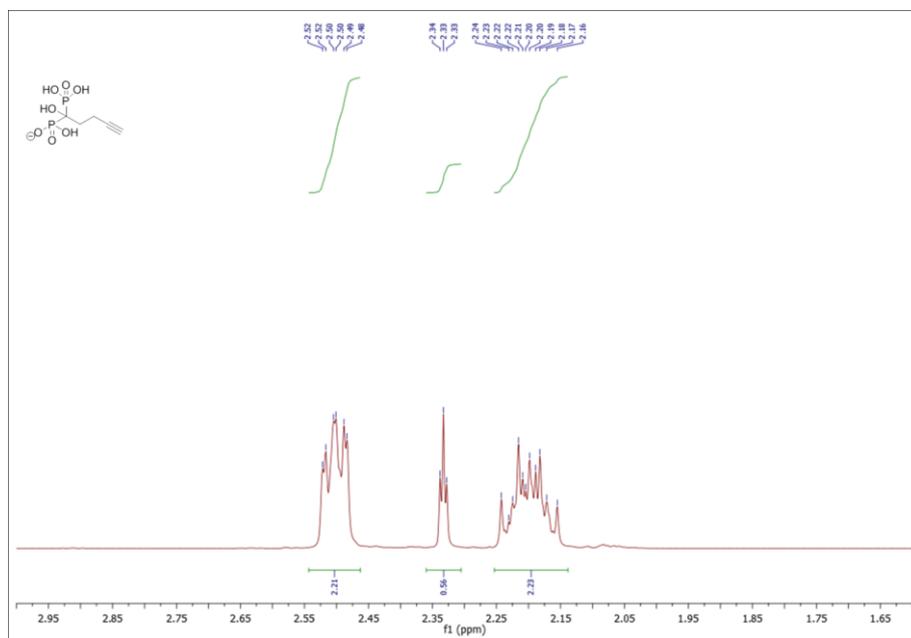
$$n(Au)_s = \frac{16\pi}{3} \frac{r_s^3}{V_{maille}}$$

Le diamètre D' de cette structure est donc

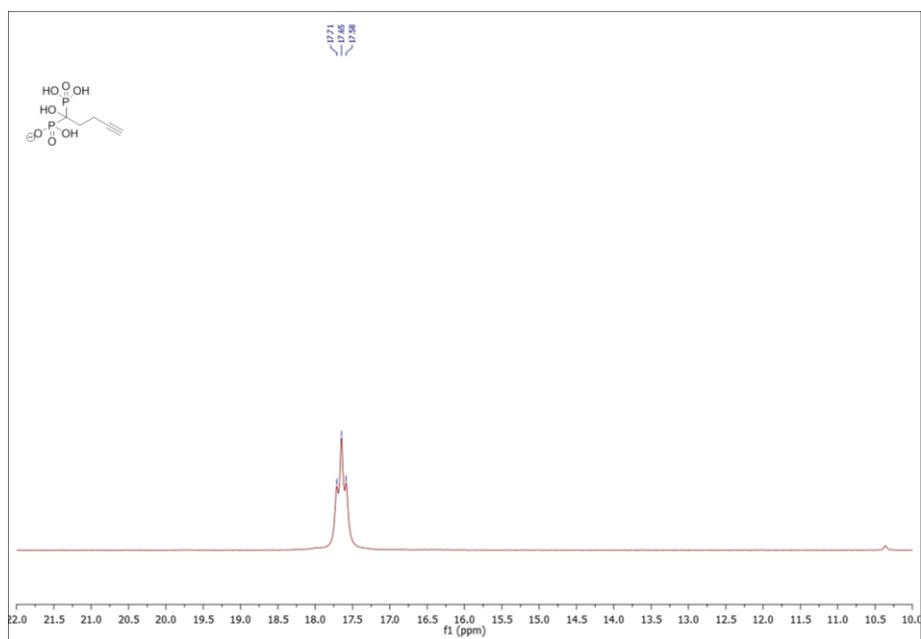
$$D' = 2 \left(\frac{9}{64\pi^2} \right)^{1/3} \frac{1}{r_s} \left(\frac{V_{cube}[Au]V_{maille}}{[NPs]} \right)^{1/3}$$

Annexe 17. Spectres RMN

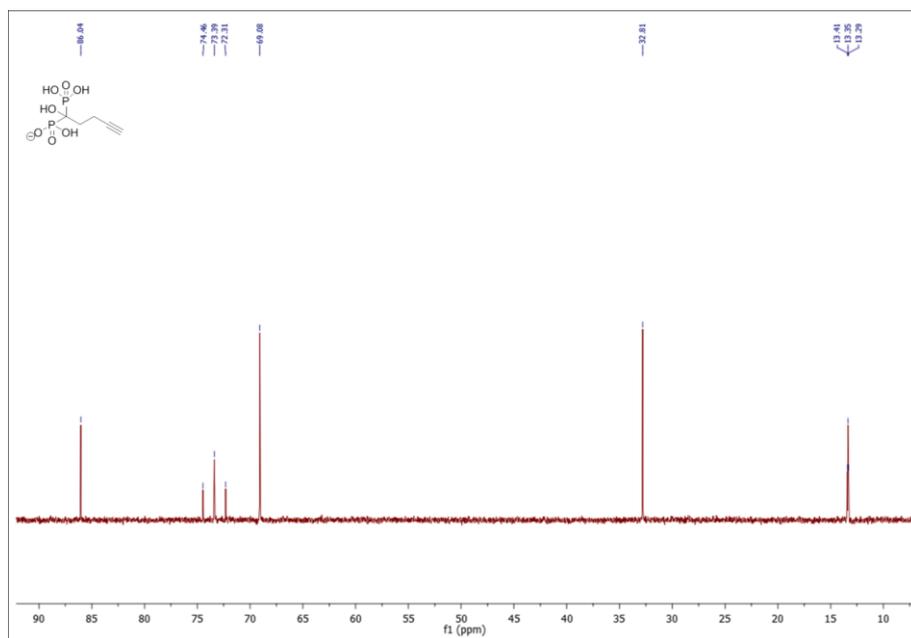
Annexe 17.1. Spectre RMN ^1H (D_2O) du HMBPyne (C=5)



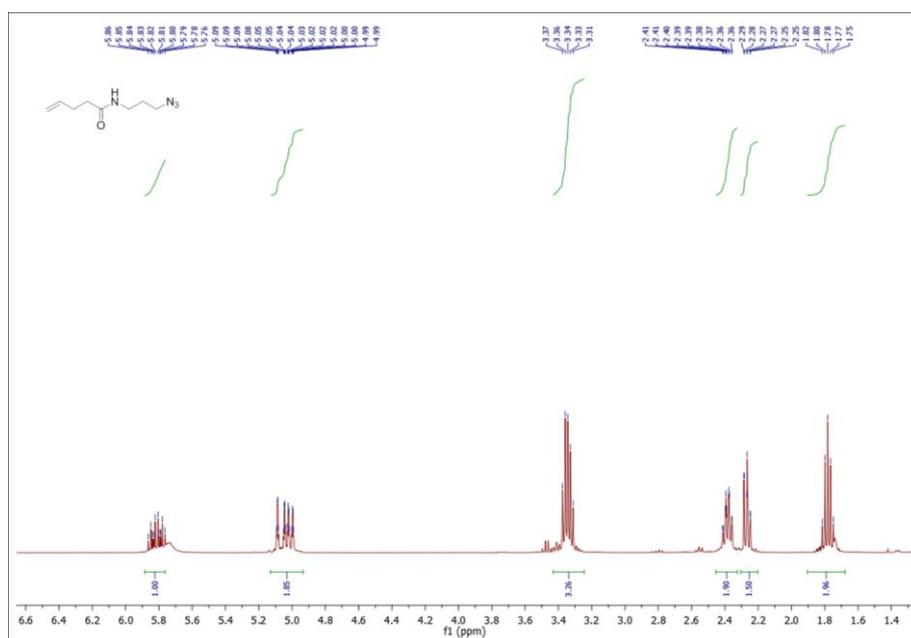
Annexe 17.2. Spectre RMN ^{31}P (D_2O) du HMBPyne (C=5)



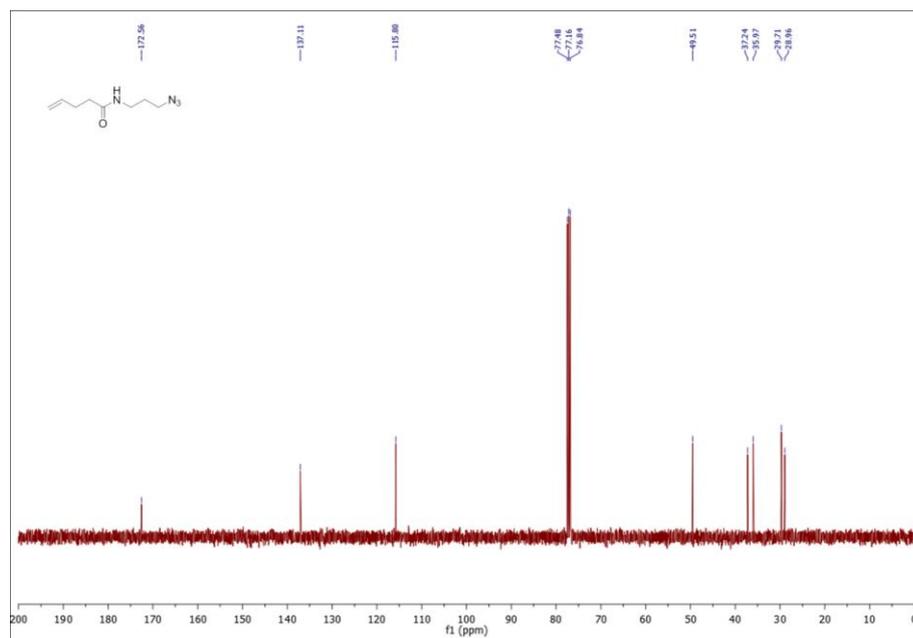
Annexe 17.3. Spectre RMN ^{13}C (D_2O) du HMBPyne (C=5)



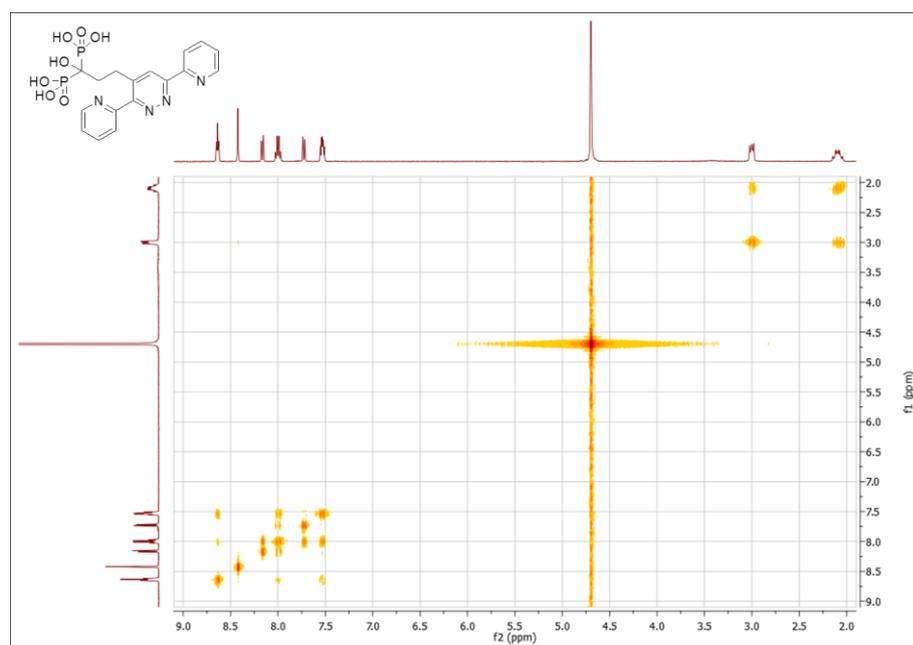
Annexe 17.4. Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du N-(3-azidopropyl)pent-4-ènamide



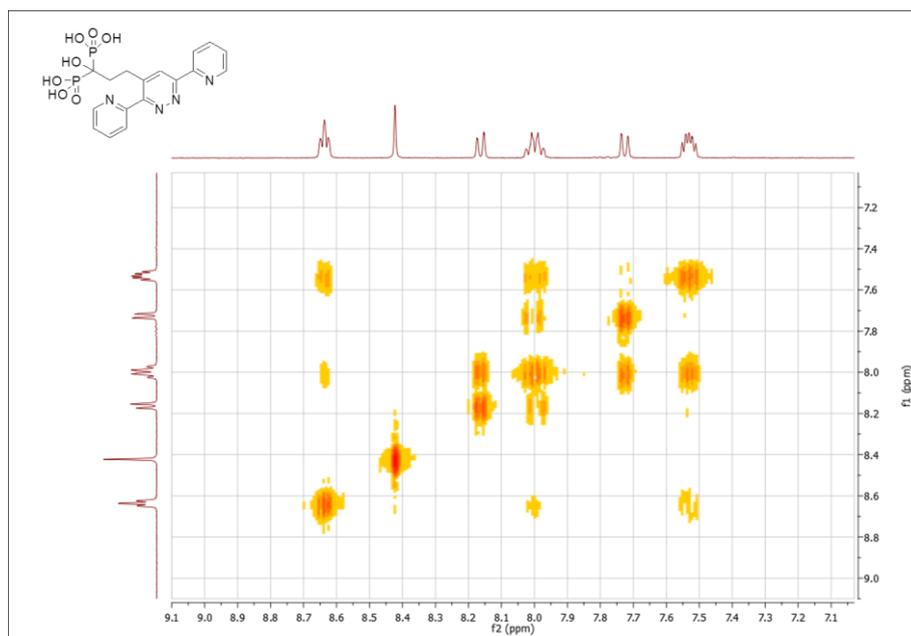
Annexe 17.5. Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3) du N-(3-azidopropyl)pent-4-ènamide



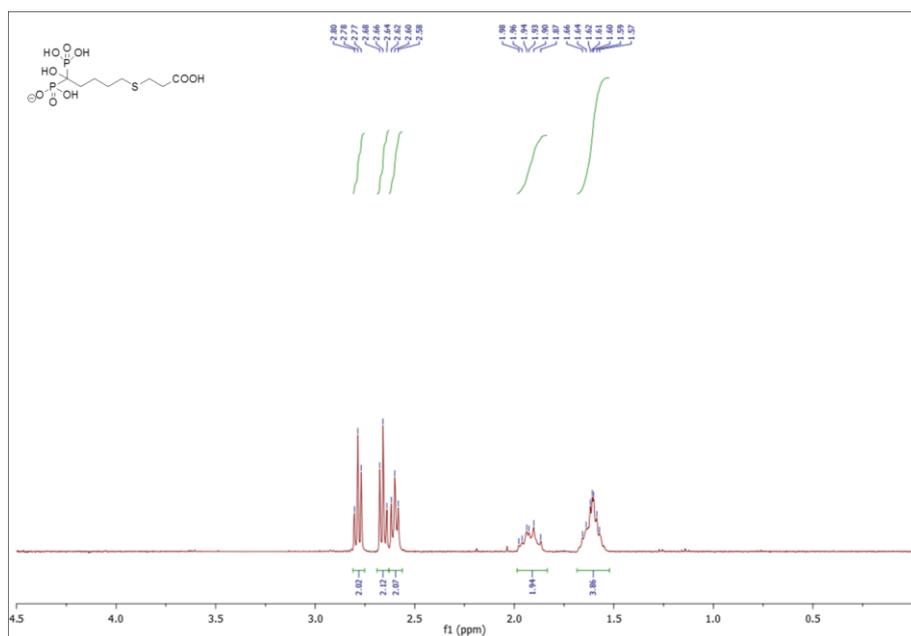
Annexe 17.6. Spectre RMN 2D ^1H - ^1H (D_2O) du HMBP-pyTz



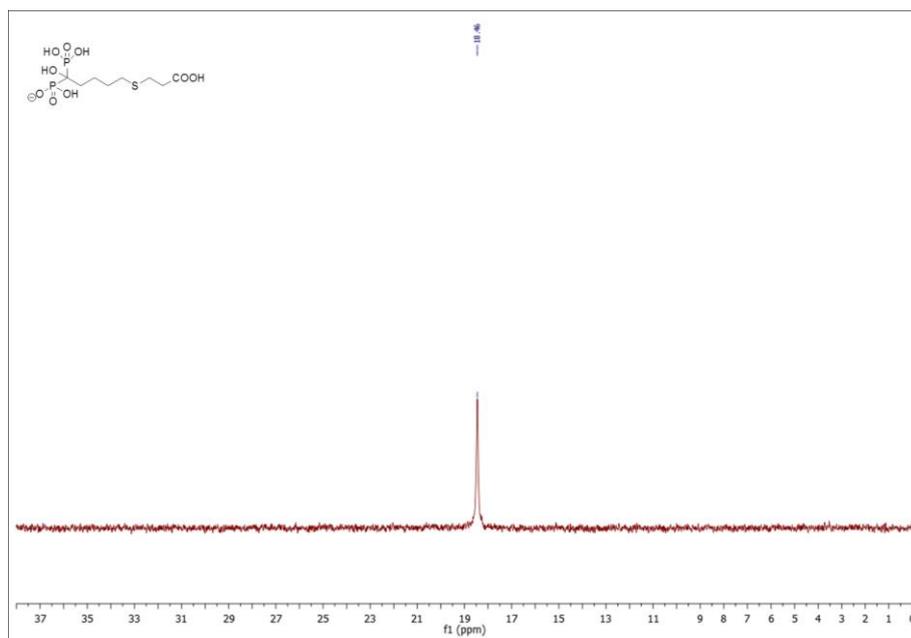
Annexe 17.7. Spectre RMN 2D ^1H - ^1H (D_2O) du HMBP-PyTz : zone des protons aromatiques



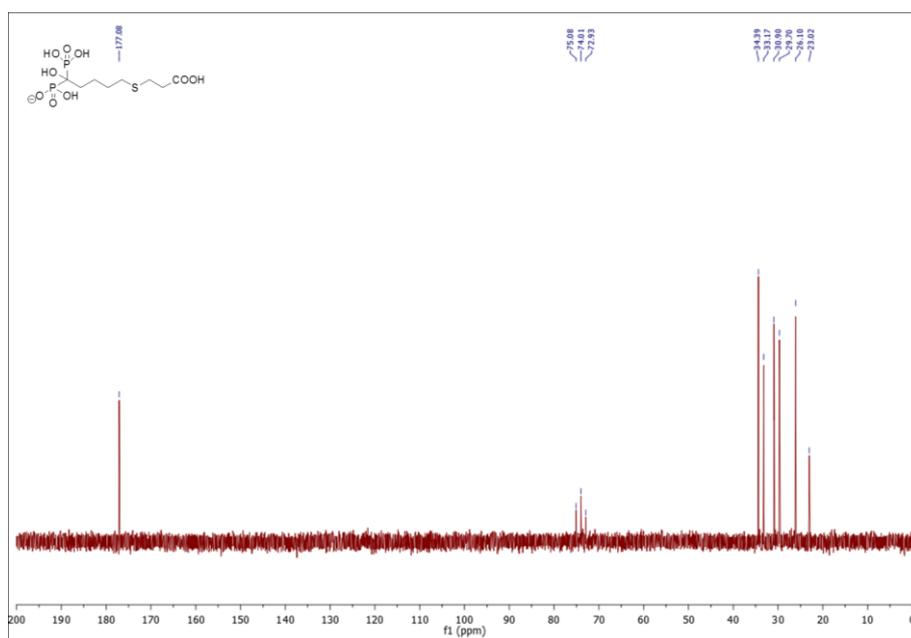
Annexe 17.8. Spectre RMN ^1H (D_2O) du BP-S-COOH



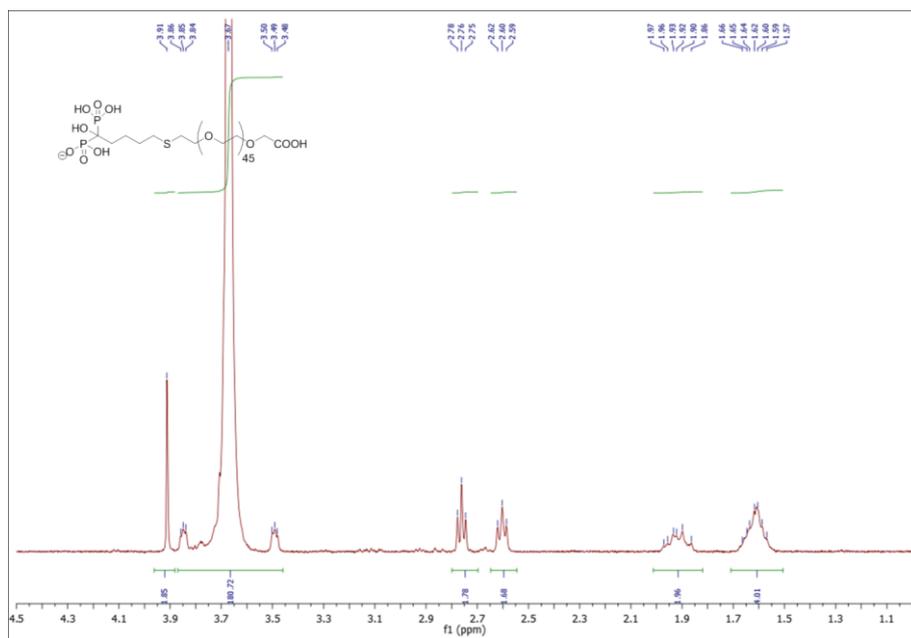
Annexe 17.9. Spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (D_2O) du BP-S-COOH



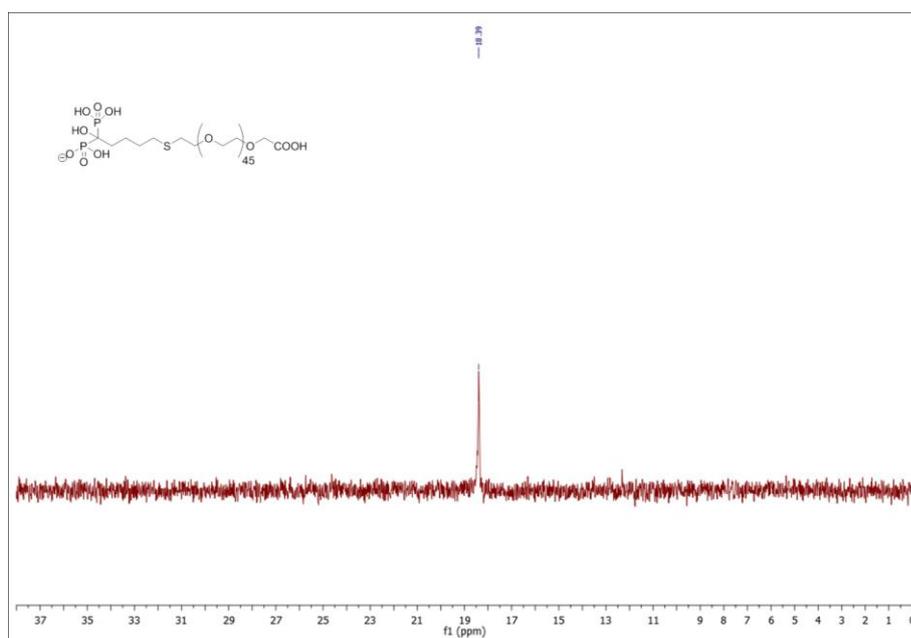
Annexe 17.10. Spectre RMN ^{13}C (D_2O) du BP-S-COOH



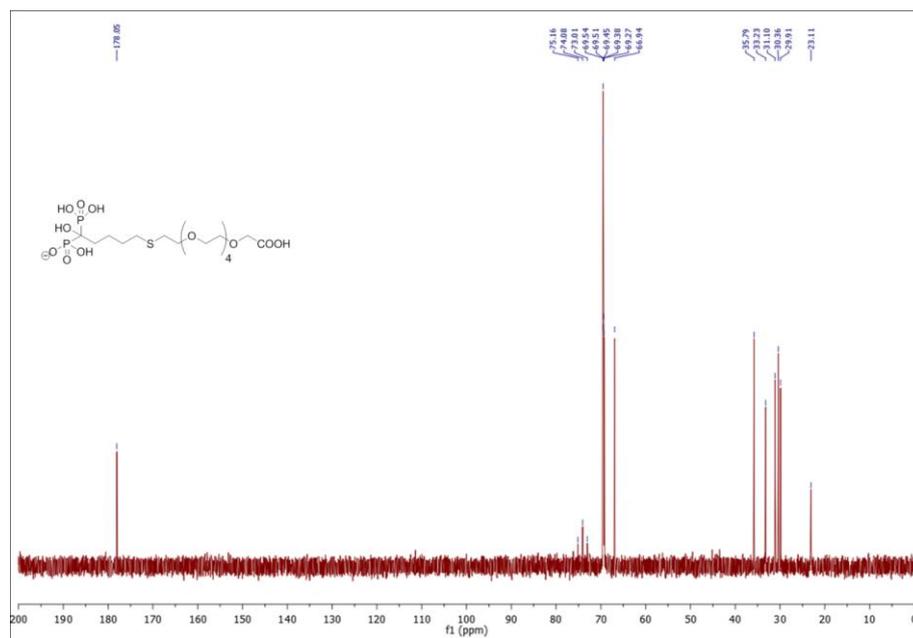
Annexe 17.11. Spectre RMN ^1H (D_2O) du HMBP-S-PEG₄₅-COOH



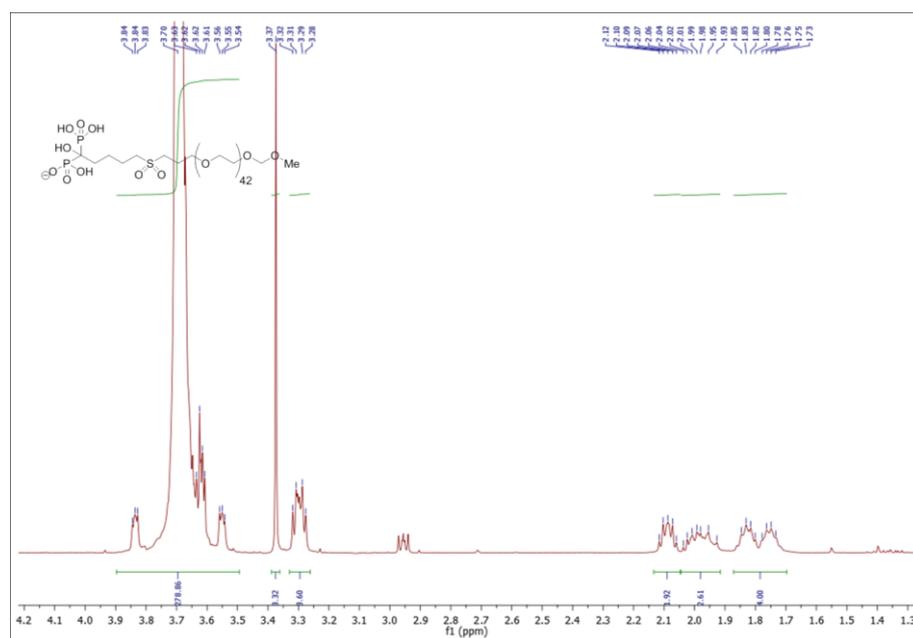
Annexe 17.12. Spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (D_2O) du HMBP-S-PEG₄₅-COOH



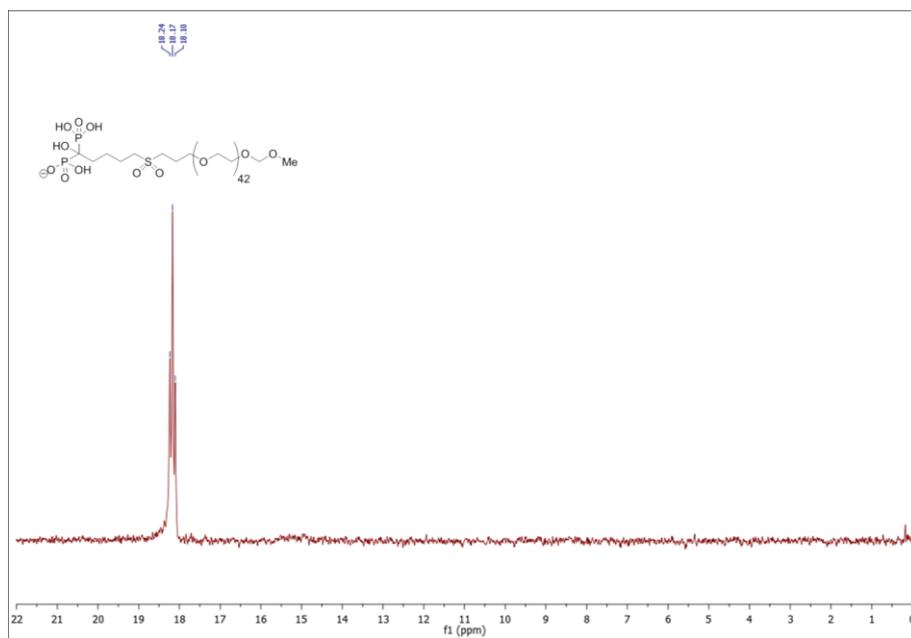
Annexe 17.19. Spectre RMN ^{13}C (D_2O) du HMBP-S-PEG $_4$ -COOH



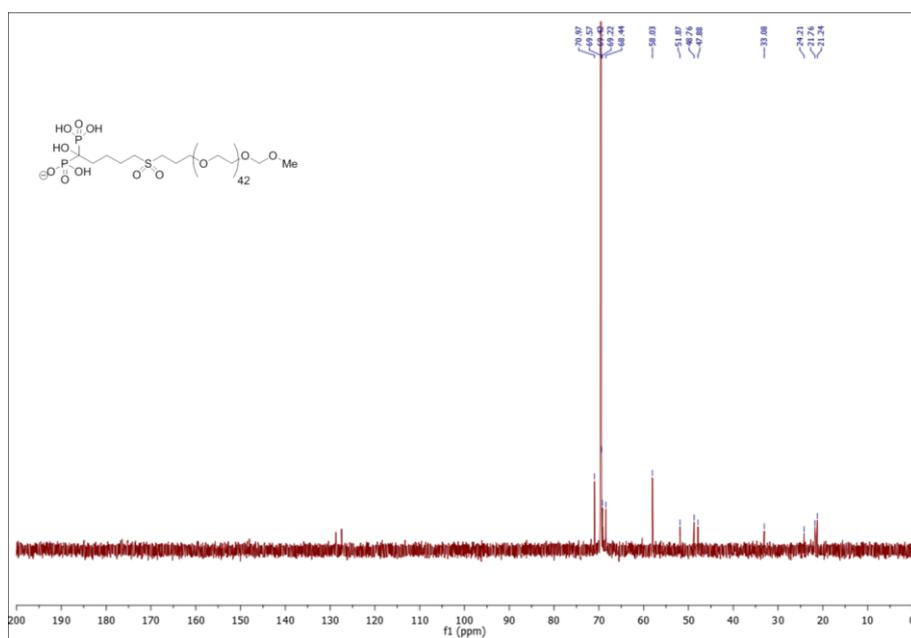
Annexe 17.20. Spectre RMN ^1H (D_2O) du HMBP-SO $_2$ -PEG $_{42}$ -OMe



Annexe 17.21. Spectre RMN ^{31}P (D_2O) du HMBP-SO $_2$ -PEG $_{42}$ -OMe



Annexe 17.22. Spectre RMN ^{13}C (D_2O) du HMBP-SO $_2$ -PEG $_{42}$ -OMe



RÉFÉRENCES

1. 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.
2. 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.
3. Langille, M. R.; Personick, M. L.; Mirkin, C. A., Plasmon-Mediated Syntheses of Metallic Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52 (52), 13910-13940.
4. Bohren, C. F.; Huffman, D. R., *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley-VCH Verlag GmbH: 2007; p i-xiv.
5. 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.
6. Drude, P., Zur Elektronentheorie der Metalle. *Annalen der Physik* **1900**, 306 (3), 566-613.
7. Vallée, F., Propriétés optiques des nanoparticules métalliques. In *Les nanosciences Tome 2 : Nanomatériaux et nanochimie*, Lahmani, M. a. B., C. and Houdy, P., Ed. Belin: 2012; Vol. 2, pp 211-243.
8. Mie, G., Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* **1908**, 330 (3), 377-445.
9. 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.
10. Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A., Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2009**, 21 (48), 4880-4910.
11. (a) Huang, T.; Murray, R. W., Visible Luminescence of Water-Soluble Monolayer-Protected Gold Clusters. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105 (50), 12498-12502; (b) Huang, C.-C.; Yang, Z.; Lee, K.-H.; Chang, H.-T., Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoparticles for Sensing Mercury(II). *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46 (36), 6824-6828; (c) Negishi, Y.; Tsukuda, T., Visible photoluminescence from nearly monodispersed Au₁₂ clusters protected by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Chemical Physics Letters* **2004**,

383 (1–2), 161-165; (d) Bigioni, T. P.; Whetten, R. L.; Dag, Ö., Near-Infrared Luminescence from Small Gold Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (30), 6983-6986.

12. (a) Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T., Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)–Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (14), 5261-5270; (b) He, H.; Xie, C.; Ren, J., Nonbleaching Fluorescence of Gold Nanoparticles and Its Applications in Cancer Cell Imaging. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (15), 5951-5957.

13. 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* (0), 55-75.

14. Hauser, E. A. a. L., J. E., *Experiments in Colloid Chemistry*. McGraw-Hill: New York, 1940.

15. Kumar, S.; Gandhi, K. S.; Kumar, R., Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method†. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2006**, *46* (10), 3128-3136.

16. Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puentes, V., Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (4), 1800-1804.

17. Ojea-Jiménez, I.; Campanera, J. M., Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (44), 23682-23691.

18. Kuyper, A. C., The Oxidation of Citric Acid. *Journal of the American Chemical Society* **1933**, *55* (4), 1722-1727.

19. Davies, A. E., The Kinetics of the Coagulation of Gold Sols. An Investigation of the "Thermo-Senescence Effect" exhibited at Elevated Temperatures. *The Journal of Physical Chemistry* **1928**, *33* (2), 274-284.

20. (a) Abid, J. P. Laser Induced Synthesis and Nonlinear Optical Properties of Metal Nanoparticles. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, 2003; (b) Turkevich, J., Colloidal gold. Part I. *Gold Bulletin* **1985**, *18* (3), 86-91.

21. Doyen, M.; Bartik, K.; Bruylants, G., UV–Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold–citrate aggregates. *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, *399*, 1-5.

22. (a) LaMer, V. K.; Dinegar, R. H., Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72* (11), 4847-4854;

- (b) LaMer, V. K.; Kenyon, A. S., Kinetics of the formation of monodispersed sulfur sols from thiosulfate and acid. *Journal of Colloid Science* **1947**, 2 (2), 257-264; (c) Mer, V. K. L., Nucleation in Phase Transitions. *Industrial & Engineering Chemistry* **1952**, 44 (6), 1270-1277.
23. Park, J.-W.; Shumaker-Parry, J. S., Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136 (5), 1907-1921.
24. Pei, L.; Mori, K.; Adachi, M., Formation Process of Two-Dimensional Networked Gold Nanowires by Citrate Reduction of AuCl₄⁻ and the Shape Stabilization. *Langmuir* **2004**, 20 (18), 7837-7843.
25. Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X., Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (45), 13939-13948.
26. Zhao, L.; Jiang, D.; Cai, Y.; Ji, X.; Xie, R.; Yang, W., Tuning the size of gold nanoparticles in the citrate reduction by chloride ions. *Nanoscale* **2012**, 4 (16), 5071-5076.
27. Takiyama, K., Formation and Aging of Precipitates. VIII. Formation of Monodisperse Particles (1) Gold Sol Particles by Sodium Citrate Method. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1958**, 31 (8), 944-950.
28. Frens, G., Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature* **1973**, 241 (105), 20-22.
29. Polte, J.; Ahner, T. T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thünemann, A. F.; Kraehnert, R., Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (4), 1296-1301.
30. Polte, J.; Eler, R.; Thunemann, A. F.; Emmerling, F.; Kraehnert, R., SAXS in combination with a free liquid jet for improved time-resolved in situ studies of the nucleation and growth of nanoparticles. *Chemical Communications* **2010**, 46 (48), 9209-9211.
31. Georgiev, P.; Bojinova, A.; Kostova, B.; Momekova, D.; Bjornholm, T.; Balashev, K., Implementing atomic force microscopy (AFM) for studying kinetics of gold nanoparticle's growth. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, 434, 154-163.

32. Wuihschick, 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.
33. Chow, M. K.; Zukoski, C. F., Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, *165* (1), 97-109.
34. Rodríguez-González, B.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán Luis, M., An Electrochemical Model for Gold Colloid Formation via Citrate Reduction. In *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 2007; Vol. 221, p 415.
35. Mikhlin, Y.; Karacharov, A.; Likhatski, M.; Podlipskaya, T.; Zubavichus, Y.; Veligzhanin, A.; Zaikovski, V., Submicrometer intermediates in the citrate synthesis of gold nanoparticles: New insights into the nucleation and crystal growth mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *362* (2), 330-336.
36. Patungwasa, W.; Hodak, J. H., pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Materials Chemistry and Physics* **2008**, *108* (1), 45-54.
37. Pong, B.-K.; Elim, H. I.; Chong, J.-X.; Ji, W.; Trout, B. L.; Lee, J.-Y., New Insights on the Nanoparticle Growth Mechanism in the Citrate Reduction of Gold(III) Salt: Formation of the Au Nanowire Intermediate and Its Nonlinear Optical Properties. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (17), 6281-6287.
38. Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Wuihschick, M.; Pinna, N.; Kraehnert, R.; Rademann, K.; Polte, J., Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (11), 4072-4081.
39. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A., Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (32), 15700-15707.
40. Zabetakis, K.; Ghann, W. E.; Kumar, S.; Daniel, M.-C., Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method. *Gold Bulletin* **2012**, *45* (4), 203-211.
41. (a) Ojea-Jiménez, I.; Bastús, N. G.; Puentes, V., Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (32), 15752-15757; (b) Philip, D., Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *71* (1), 80-85; (c) Sivaraman, S. K.; Kumar, S.; Santhanam, V., Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich

method – The role of chloroauric acid. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 361 (2), 543-547.

42. Xia, H.; Bai, S.; Hartmann, J.; Wang, D., Synthesis of Monodisperse Quasi-Spherical Gold Nanoparticles in Water via Silver(I)-Assisted Citrate Reduction. *Langmuir* **2010**, 26 (5), 3585-3589.

43. Schulz, F.; Homolka, T.; Bastús, N. G.; Puntès, V.; Weller, H.; Vossmeier, T., Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2014**, 30 (35), 10779-10784.

44. (a) Ziegler, C.; Eychmüller, A., Seeded Growth Synthesis of Uniform Gold Nanoparticles with Diameters of 15–300 nm. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115 (11), 4502-4506; (b) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2001**, 17 (22), 6782-6786; (c) Brown, K. R.; Natan, M. J., Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces. *Langmuir* **1998**, 14 (4), 726-728.

45. Yoosaf, K.; Ipe, B. I.; Suresh, C. H.; Thomas, K. G., In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111 (34), 12839-12847.

46. Moreno-Álvarez, S. A.; Martínez-Castañón, G. A.; Niño-Martínez, N.; Reyes-Macías, J. F.; Patiño-Marín, N.; Loyola-Rodríguez, J. P.; Ruiz, F., Preparation and bactericide activity of gallic acid stabilized gold nanoparticles. *J Nanopart Res* **2010**, 12 (8), 2741-2746.

47. Huang, K.-W.; Yu, C.-J.; Tseng, W.-L., Sensitivity enhancement in the colorimetric detection of lead(II) ion using gallic acid-capped gold nanoparticles: Improving size distribution and minimizing interparticle repulsion. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, 25 (5), 984-989.

48. Dong, C.; Wu, G.; Wang, Z.; Ren, W.; Zhang, Y.; Shen, Z.; Li, T.; Wu, A., Selective colorimetric detection of Cr(III) and Cr(VI) using gallic acid capped gold nanoparticles. *Dalton Transactions* **2016**.

49. (a) Sivaraman, S. K.; Kumar, S.; Santhanam, V., Room-temperature synthesis of gold nanoparticles — Size-control by slow addition. *Gold Bulletin* **2010**, 43 (4), 275-286; (b) Qiao, Y.; Chen, H.; Lin, Y.; Huang, J., Controllable Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles and Their Applications in Electrocatalysis and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Langmuir* **2011**, 27 (17), 11090-11097; (c) Aswathy Aromal, S.; Philip, D., Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2012**, 44 (7–8), 1692-1696.

50. Nishima, W.; Sarabjit, K.; Manish, B.; Jain, D. V. S.; Rohit, K. S., One pot, rapid and efficient synthesis of water dispersible gold nanoparticles using alpha-amino acids. *Nanotechnology* **2014**, *25* (43), 435608.
51. Qi, Z.-m.; Zhou, H.-s.; Matsuda, N.; Honma, I.; Shimada, K.; Takatsu, A.; Kato, K., Characterization of Gold Nanoparticles Synthesized Using Sucrose by Seeding Formation in the Solid Phase and Seeding Growth in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (22), 7006-7011.
52. Shankar, S. S.; Ahmad, A.; Pasricha, R.; Sastry, M., Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13* (7), 1822-1826.
53. Jiang, X.; Sun, D.; Zhang, G.; He, N.; Liu, H.; Huang, J.; Odoom-Wubah, T.; Li, Q., Investigation of active biomolecules involved in the nucleation and growth of gold nanoparticles by *Artocarpus heterophyllus* Lam leaf extract. *J Nanopart Res* **2013**, *15* (6), 1-11.
54. Nadagouda, M. N.; Iyanna, N.; Lalley, J.; Han, C.; Dionysiou, D. D.; Varma, R. S., Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Antioxidants from Blackberry, Blueberry, Pomegranate, and Turmeric Extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2014**, *2* (7), 1717-1723.
55. Zhu, H.; Pan, Z.; Hagaman, E. W.; Liang, C.; Overbury, S. H.; Dai, S., Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles stabilized with bifunctional amino/siloxy ligands. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *287* (1), 360-365.
56. Rawat, K. A.; Kailasa, S. K., 2,3,4-Trihydroxy benzophenone as a novel reducing agent for one-step synthesis of size-optimized gold nanoparticles and their application in colorimetric sensing of adenine at nanomolar concentration. *RSC Advances* **2016**, *6* (14), 11099-11108.
57. Dozol, H.; Mériquet, G.; Ancian, B.; Cabuil, V.; Xu, H.; Wang, D.; Abou-Hassan, A., On the Synthesis of Au Nanoparticles Using EDTA as a Reducing Agent. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (40), 20958-20966.
58. Duff, D. G.; Baiker, A.; Edwards, P. P., A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. *Langmuir* **1993**, *9* (9), 2301-2309.
59. (a) Drogat, N.; Jauberty, L.; Chaleix, V.; Granet, R.; Guénin, E.; Sol, V.; Gloaguen, V., Sensing of the uranyl ion based on its complexation with bisphosphonate-capped gold nanoparticles. *Materials Letters* **2014**, *122* (0), 208-211; (b) Li, P.; Lu, Z.; Sun, D.; Cai, C.; Wei, S.;

Chen, Y.; Lee, J.-M., Immobilization and electrocatalysis of Ru(III) ions on phosphonate functionalized gold nanoparticles. *Electrochimica Acta* **2015**, *157*, 199-204.

60. Osonga, F. J.; Yazgan, I.; Kariuki, V.; Luther, D.; Jimenez, A.; Le, P.; Sadik, O. A., Greener synthesis and characterization, antimicrobial and cytotoxicity studies of gold nanoparticles of novel shapes and sizes. *RSC Advances* **2016**, *6* (3), 2302-2313.

61. Esumi, K.; Hosoya, T.; Suzuki, A.; Torigoe, K., Formation of Gold and Silver Nanoparticles in Aqueous Solution of Sugar-Persubstituted Poly(amidoamine) Dendrimers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *226* (2), 346-352.

62. Thanh, N. T. K.; Green, L. A. W., Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* **2010**, *5* (3), 213-230.

63. Stiuftuc, R.; Iacovita, C.; Nicoara, R.; Stiuftuc, G.; Florea, A.; Achim, M.; Lucaciu, C. M., One-Step Synthesis of PEGylated Gold Nanoparticles with Tunable Surface Charge. *Journal of Nanomaterials* **2013**, *2013*, 7.

64. Liu, J.; Yu, M.; Ning, X.; Zhou, C.; Yang, S.; Zheng, J., PEGylation and Zwitterionization: Pros and Cons in the Renal Clearance and Tumor Targeting of Near-IR-Emitting Gold Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (48), 12572-12576.

65. (a) Hoppe, C. E.; Lazzari, M.; Pardiñas-Blanco, I.; López-Quintela, M. A., One-Step Synthesis of Gold and Silver Hydrosols Using Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) as a Reducing Agent. *Langmuir* **2006**, *22* (16), 7027-7034; (b) Min, Z.; Baoxiang, W.; Zbigniew, R.; Zhaohui, X.; Jon Otto, F.; Xiaofeng, Y.; Steinar, R., Minute synthesis of extremely stable gold nanoparticles. *Nanotechnology* **2009**, *20* (50), 505606.

66. Graf, C.; Vossen, D. L. J.; Imhof, A.; van Blaaderen, A., A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica. *Langmuir* **2003**, *19* (17), 6693-6700.

67. García-Serrano, J.; Pal, U.; Herrera, A. M.; Salas, P.; Ángeles-Chávez, C., One-Step "Green" Synthesis and Stabilization of Au and Ag Nanoparticles Using Ionic Polymers. *Chemistry of Materials* **2008**, *20* (16), 5146-5153.

68. Porta, F.; Krpetić, Ž.; Prati, L.; Gaiassi, A.; Scari, G., Gold-Ligand Interaction Studies of Water-Soluble Aminoalcohol Capped Gold Nanoparticles by NMR. *Langmuir* **2008**, *24* (14), 7061-7064.

69. Wu, R. H.; Nguyen, T. P.; Marquart, G. W.; Miesen, T. J.; Mau, T.; Mackiewicz, M. R., A facile route to tailoring peptide-stabilized gold nanoparticles using glutathione as a synthon. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2014**, *19* (5), 6754-75.

70. Oh, E.; Susumu, K.; Goswami, R.; Mattoussi, H., One-Phase Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles with Control over Size and Surface Functionalities. *Langmuir* **2010**, *26* (10), 7604-7613.
71. Shervani, Z.; Yamamoto, Y., Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites. *Carbohydrate Research* **2011**, *346* (5), 651-658.
72. Chechik, V.; Crooks, R. M., Monolayers of Thiol-Terminated Dendrimers on the Surface of Planar and Colloidal Gold. *Langmuir* **1999**, *15* (19), 6364-6369.
73. Balogh, L.; Valluzzi, R.; Laverdure, K. S.; Gido, S. P.; Hagnauer, G. L.; Tomalia, D. A., Formation of Silver and Gold Dendrimer Nanocomposites. *J Nanopart Res* **1999**, *1* (3), 353-368.
74. Khan, Z.; Singh, T.; Hussain, J. I.; Hashmi, A. A., Au(III)-CTAB reduction by ascorbic acid: Preparation and characterization of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *104*, 11-17.
75. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1957-1962.
76. Beija, M.; Marty, J.-D.; Destarac, M., Thermoresponsive poly(N-vinyl caprolactam)-coated gold nanoparticles: sharp reversible response and easy tunability. *Chemical Communications* **2011**, *47* (10), 2826-2828.
77. Ferreira, E. B.; Gomes, J. F.; Tremiliosi-Filho, G.; Gasparotto, L. H. S., One-pot eco-friendly synthesis of gold nanoparticles by glycerol in alkaline medium: Role of synthesis parameters on the nanoparticles characteristics. *Materials Research Bulletin* **2014**, *55*, 131-136.
78. Biondi, I.; Laurency, G.; Dyson, P. J., Synthesis of Gold Nanoparticle Catalysts Based on a New Water-Soluble Ionic Polymer. *Inorganic Chemistry* **2011**, *50* (17), 8038-8045.
79. Wang, Z.; Wu, H.; Shi, H.; Wang, M.; Huang, C.; Jia, N., A novel multifunctional biomimetic Au@BSA nanocarrier as a potential siRNA theranostic nanoplatform. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4* (14), 2519-2526.
80. (a) Belloni, J.; Mostafavi, M.; Remita, H.; Marignier, J.-L.; Marie-Odile Delcourt, a., Radiation-induced synthesis of mono- and multi-metallic clusters and nanocolloids. *New Journal of Chemistry* **1998**, *22* (11), 1239-1255; (b) Abidi, W.; Selvakannan, P. R.; Guillet, Y.; Lampre, I.; Beaunier, P.; Pansu, B.; Palpant, B.; Remita, H., One-Pot Radiolytic Synthesis of Gold Nanorods and Their Optical Properties. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (35),

14794-14803; (c) Gachard, E.; Remita, H.; Khatouri, J.; Keita, B.; Nadjo, L.; Jacqueline Belloni, a., Radiation-induced and chemical formation of gold clusters. *New Journal of Chemistry* **1998**, 22 (11), 1257-1265.

81. Kassam, A.; Bremner, G.; Clark, B.; Ulibarri, G.; Lennox, R. B., Place Exchange Reactions of Alkyl Thiols on Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (11), 3476-3477.

82. Caragheorghopol, A.; Chechik, V., Mechanistic aspects of ligand exchange in Au nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, 10 (33), 5029-5041.

83. Cumberland, S. L.; Strouse, G. F., Analysis of the Nature of Oxyanion Adsorption on Gold Nanomaterial Surfaces. *Langmuir* **2002**, 18 (1), 269-276.

84. (a) Grönbeck, H.; Curioni, A.; Andreoni, W., Thiols and Disulfides on the Au(111) Surface: The Headgroup–Gold Interaction. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122 (16), 3839-3842; (b) 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. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45 (8), 1183-1192.

85. Kalimuthu, P.; John, S. A., Studies on ligand exchange reaction of functionalized mercaptothiadiazole compounds onto citrate capped gold nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* **2010**, 122 (2–3), 380-385.

86. Lin, S.-Y.; Tsai, Y.-T.; Chen, C.-C.; Lin, C.-M.; Chen, C.-h., Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108 (7), 2134-2139.

87. Cho, T. J.; Zangmeister, R. A.; MacCuspie, R. I.; Patri, A. K.; Hackley, V. A., Newkome-Type Dendron-Stabilized Gold Nanoparticles: Synthesis, Reactivity, and Stability. *Chemistry of Materials* **2011**, 23 (10), 2665-2676.

88. (a) Hinterwirth, H.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M., Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: Effect of surface chemistry on bioactivity. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 733, 90-97; (b) Ruff, J.; Steitz, J.; Buchkremer, A.; Noyong, M.; Hartmann, H.; Besmehn, A.; Simon, U., Multivalency of PEG-thiol ligands affects the stability of NIR-absorbing hollow gold nanospheres and gold nanorods. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, 4 (16), 2828-2841; (c) Siriwardana, K.; Gadogbe, M.; Ansar, S. M.; Vasquez, E. S.; Collier, W. E.; Zou, S.; Walters, K. B.; Zhang, D., Ligand Adsorption and Exchange on Pegylated Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, 118 (20), 11111-11119; (d) Smith, A. M.; Marbella, L. E.; Johnston, K. A.; Hartmann, M. J.; Crawford, S. E.; Kozycz, L. M.; Seferos, D. S.; Millstone, J. E., Quantitative

Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ¹H NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (5), 2771-2778.

89. Ding, Y.; Jiang, Z.; Saha, K.; Kim, C. S.; Kim, S. T.; Landis, R. F.; Rotello, V. M., Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Mol Ther* **2014**, *22* (6), 1075-1083.

90. Gole, A.; Murphy, C. J., Azide-Derivatized Gold Nanorods: Functional Materials for "Click" Chemistry. *Langmuir* **2008**, *24* (1), 266-272.

91. Brennan, J. L.; Hatzakis, N. S.; Tshikhudo, T. R.; Razumas, V.; Patkar, S.; Vind, J.; Svendsen, A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Brust, M., Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17* (6), 1373-1375.

92. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-2021.

93. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (9), 3057-3064.

94. Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2* (10), 565-598.

95. Zhang, S.; Li, Z.; Samarajeewa, S.; Sun, G.; Yang, C.; Wooley, K. L., Orthogonally Dual-Clickable Janus Nanoparticles via a Cyclic Templating Strategy. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (29), 11046-11049.

96. Pujari, S. P.; Scheres, L.; Marcelis, A. T. M.; Zuilhof, H., Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (25), 6322-6356.

97. (a) Benyettou, F.; Chebbi, I.; Motte, L.; Seksek, O., Magnetoliposome for alendronate delivery. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (13), 4813-4820; (b) Benyettou, F.; Lalatonne, Y.; Sainte-Catherine, O.; Monteil, M.; Motte, L., Superparamagnetic nanovector with anti-cancer properties: $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@Zoledronate$. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *379* (2), 324-327; (c) Lalatonne, Y.; Paris, C.; Serfaty, J. M.; Weinmann, P.; Lecouvey, M.; Motte, L., Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. *Chemical Communications* **2008**, (22), 2553-2555; (d) Motte, L.; Benyettou, F.; de Beaucorps, C.; Lecouvey, M.; Milesovic, I.; Lalatonne, Y., Multimodal superparamagnetic nanoplatform for clinical applications: immunoassays, imaging & therapy. *Faraday Discussions* **2011**, *149* (0), 211-225.

98. (a) Benyettou, F.; Guenin, E.; Lalatonne, Y.; Motte, L., Microwave assisted nanoparticle surface functionalization. *Nanotechnology* **2011**, *22* (5), 055102; (b) Bolley, J.; Guenin, E.; Lievre, N.; Lecouvey, M.; Soussan, M.; Lalatonne, Y.; Motte, L., Carbodiimide versus Click Chemistry for Nanoparticle Surface Functionalization: A Comparative Study for the Elaboration of Multimodal Superparamagnetic Nanoparticles Targeting $\alpha v\beta 3$ Integrins. *Langmuir* **2013**, *29* (47), 14639-14647; (c) Demay-Drouhard, P.; Nehlig, E.; Hardouin, J.; Motte, L.; Guénin, E., Nanoparticles under the Light: Click Functionalization by Photochemical Thiol-yne Reaction, Towards Double Click Functionalization. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (26), 8388-8392; (d) Nehlig, E.; Motte, L.; Guénin, E., Nano-organocatalysts synthesis: Boc vs Fmoc protection. *Catalysis Today* **2013**, *208* (0), 90-96.
99. (a) Cole, L. E.; Vargo-Gogola, T.; Roeder, R. K., Bisphosphonate-functionalized gold nanoparticles for contrast-enhanced X-ray detection of breast microcalcifications. *Biomaterials* **2014**, *35* (7), 2312-2321; (b) Ross, R.; Cole, L.; Roeder, R., Relative binding affinity of carboxylate-, phosphonate-, and bisphosphonate-functionalized gold nanoparticles targeted to damaged bone tissue. *J Nanopart Res* **2012**, *14* (10), 1-11; (c) Ross, R. D.; Cole, L. E.; Tilley, J. M. R.; Roeder, R. K., Effects of Functionalized Gold Nanoparticle Size on X-ray Attenuation and Substrate Binding Affinity. *Chemistry of Materials* **2013**, *26* (2), 1187-1194; (d) Ross, R. D.; Roeder, R. K., Binding affinity of surface functionalized gold nanoparticles to hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2011**, *99A* (1), 58-66.
100. Benyettou, F.; Rezgui, R.; Ravaux, F.; Jaber, T.; Blumer, K.; Jouiad, M.; Motte, L.; Olsen, J. C.; Platas-Iglesias, C.; Magzoub, M.; Trabolsi, A., Synthesis of silver nanoparticles for the dual delivery of doxorubicin and alendronate to cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (36), 7237-7245.
101. (a) Antonovych, T., Gold nephropathy. *Annals of Clinical & Laboratory Science* **1981**, *11* (5), 386-391; (b) Higby, G. J., Gold in medicine. *Gold Bulletin* **1982**, *15* (4), 130-140.
102. Pricker, S. P., Medical uses of gold compounds: Past, present and future. *Gold Bulletin* **1996**, *29* (2), 53-60.
103. Merchant, B., Gold, the Noble Metal and the Paradoxes of its Toxicology. *Biologicals* **1998**, *26* (1), 49-59.
104. Li, J. J.; Hartono, D.; Ong, C.-N.; Bay, B.-H.; Yung, L.-Y. L., Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31* (23), 5996-6003.
105. Kong, B.; Seog, J. H.; Graham, L. M.; Lee, S. B., Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)* **2011**, *6* (5), 929-41.

106. Paino, I. M. M.; Marangoni, V. S.; de Oliveira, R. d. C. S.; Antunes, L. M. G.; Zucolotto, V., Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters* **2012**, *215* (2), 119-125.
107. Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M., Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15* (4), 897-900.
108. (a) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W., Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* **2006**, *6* (4), 662-668; (b) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D., Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1* (3), 325-327.
109. Dragoni, S.; Franco, G.; Regoli, M.; Bracciali, M.; Morandi, V.; Sgaragli, G.; Bertelli, E.; Valoti, M., Gold nanoparticles uptake and cytotoxicity assessed on rat liver precision-cut slices. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2012**, *128* (1), 186-97.
110. (a) Sperling, R. A.; Rivera Gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J., Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (9), 1896-1908; (b) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2740-2779; (c) Yang, X.; Yang, M.; Pang, B.; Vara, M.; Xia, Y., Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (19), 10410-10488.
111. Xu, C.; Tung, G. A.; Sun, S., Size and Concentration Effect of Gold Nanoparticles on X-ray Attenuation As Measured on Computed Tomography. *Chemistry of Materials* **2008**, *20* (13), 4167-4169.
112. Wang, H.; Zheng, L.; Peng, C.; Shen, M.; Shi, X.; Zhang, G., Folic acid-modified dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nanoprobe for targeted CT imaging of human lung adenocarcinoma. *Biomaterials* **2013**, *34* (2), 470-480.
113. Zagaynova, E. V.; Shirmanova, M. V.; Kirillin, M. Y.; Khlebtsov, B. N.; Orlova, A. G.; Balalaeva, I. V.; Sirotkina, M. A.; Bugrova, M. L.; Agrba, P. D.; Kamensky, V. A., Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: phantom, in vivo studies and Monte Carlo simulation. *Physics in Medicine and Biology* **2008**, *53* (18), 4995.
114. Hu, J.; Rivero, F.; Torres, R. A.; Loro Ramírez, H.; Rodríguez, E. M.; Alfonso, F.; García Solé, J.; Jaque, D., Dynamic single gold nanoparticle visualization by clinical intracoronary optical coherence tomography. *Journal of Biophotonics* **2016**, n/a-n/a.

115. Huang, P.; Lin, J.; Li, W.; Rong, P.; Wang, Z.; Wang, S.; Wang, X.; Sun, X.; Aronova, M.; Niu, G.; Leapman, R. D.; Nie, Z.; Chen, X., Biodegradable Gold Nanovesicles with an Ultrastrong Plasmonic Coupling Effect for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *Angewandte Chemie* **2013**, *125* (52), 14208-14214.
116. Song, K. H.; Kim, C.; Maslov, K.; Wang, L. V., Noninvasive in vivo spectroscopic nanorod-contrast photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes. *European Journal of Radiology* **2009**, *70* (2), 227-231.
117. Wu, X.; He, X.; Wang, K.; Xie, C.; Zhou, B.; Qing, Z., Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging in vivo. *Nanoscale* **2010**, *2* (10), 2244-9.
118. (a) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A., Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (6), 2115-2120; (b) Sun, M.; Liu, F.; Zhu, Y.; Wang, W.; Hu, J.; Liu, J.; Dai, Z.; Wang, K.; Wei, Y.; Bai, J.; Gao, W., Salt-induced aggregation of gold nanoparticles for photoacoustic imaging and photothermal therapy of cancer. *Nanoscale* **2016**, *8* (8), 4452-7.
119. 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.
120. Lal, S.; Clare, S. E.; Halas, N. J., Nanoshell-Enabled Photothermal Cancer Therapy: Impending Clinical Impact. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (12), 1842-1851.
121. Chen, J.; Wiley, B.; Li, Z. Y.; Campbell, D.; Saeki, F.; Cang, H.; Au, L.; Lee, J.; Li, X.; Xia, Y., Gold Nanocages: Engineering Their Structure for Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2005**, *17* (18), 2255-2261.
122. Li, J.; Cai, R.; Kawazoe, N.; Chen, G., Facile preparation of albumin-stabilized gold nanostars for the targeted photothermal ablation of cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (28), 5806-5814.
123. Espinosa, A.; Silva, A. K. A.; Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Péchoux, C.; Desboeufs, K.; Liz-Marzán, L. M.; Wilhelm, C., Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. *Advanced Healthcare Materials* **2016**, *5* (9), 1040-1048.
124. Espinosa, A.; Bugnet, M.; Radtke, G.; Neveu, S.; Botton, G. A.; Wilhelm, C.; Abou-Hassan, A., Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia? *Nanoscale* **2015**, *7* (45), 18872-18877.

125. Torchilin, V. P., Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal* **2007**, *9* (2), E128-E147.
126. Zhang, K.; Hao, L.; Hurst, S. J.; Mirkin, C. A., Antibody-Linked Spherical Nucleic Acids for Cellular Targeting. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (40), 16488-16491.
127. Song, J.; Zhou, J.; Duan, H., Self-Assembled Plasmonic Vesicles of SERS-Encoded Amphiphilic Gold Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Traceable Intracellular Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (32), 13458-13469.
128. Mukherjee, P.; Bhattacharya, R.; Wang, P.; Wang, L.; Basu, S.; Nagy, J. A.; Atala, A.; Mukhopadhyay, D.; Soker, S., Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2005**, *11*.
129. Bhattacharya, R.; Patra, C. R.; Verma, R.; Kumar, S.; Greipp, P. R.; Mukherjee, P., Gold Nanoparticles Inhibit the Proliferation of Multiple Myeloma Cells. *Advanced Materials* **2007**, *19* (5), 711-716.
130. Libutti, S. K.; Paciotti, G. F.; Byrnes, A. A.; Alexander, H. R.; Gannon, W. E.; Walker, M.; Seidel, G. D.; Yuldasheva, N.; Tamarkin, L., Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine. *Clinical Cancer Research* **2010**, *16* (24), 6139-6149.
131. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A., Nanostructures in Biodiagnostics. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1547-1562.
132. Kim, S. T.; Chompoosor, A.; Yeh, Y.-C.; Agasti, S. S.; Solfiell, D. J.; Rotello, V. M., Dendronized Gold Nanoparticles for siRNA Delivery. *Small* **2012**, *8* (21), 3253-3256.
133. Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A., Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science* **2006**, *312* (5776), 1027-1030.
134. Jans, H.; Huo, Q., Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2849-2866.
135. 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.
136. (a) 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. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (9), 1959-1964; (b) Storhoff, J. J.; Lucas, A. D.; Garimella, V.; Bao, Y. P.; Muller, U. R., Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat Biotech* **2004**, *22* (7), 883-887.

137. Englebienne, P.; Van Hoonacker, A.; Verhas, M.; Khlebtsov, N. G., Advances in high-throughput screening: biomolecular interaction monitoring in real-time with colloidal metal nanoparticles. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2003**, *6* (8), 777-87.

138. Galezowska, J.; Gumienna-Kontecka, E., Phosphonates, their complexes and bio-applications: A spectrum of surprising diversity. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256* (1-2), 105-124.

139. Arbusow, B. A., Michaelis-Arbusow- und Perkow-Reaktionen. In *Pure and Applied Chemistry*, 1964; Vol. 9, p 307.

140. Dorel, R.; Echavarren, A. M., Gold(I)-Catalyzed Activation of Alkynes for the Construction of Molecular Complexity. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (17), 9028-9072.

141. Guenin, E., *Microwave Engineering of Materials - From Mesoscale to Nanoscale*. Pan Stanford Publishing: 2016.

142. Zhu, Y.-J.; Chen, F., Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (12), 6462-6555.

143. Dahal, N.; García, S.; Zhou, J.; Humphrey, S. M., Beneficial Effects of Microwave-Assisted Heating versus Conventional Heating in Noble Metal Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano* **2012**, *6* (11), 9433-9446.

144. Turhanen, P. A.; Vepsäläinen, J. J., Unexpected degradation of the bisphosphonate P-C-P bridge under mild conditions. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2008**, *4*, 7.

145. Goura, J.; Chandrasekhar, V., Molecular Metal Phosphonates. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (14), 6854-6965.

146. Vaks, V. L.; Domrachev, G. A.; Rodygin, Y. L.; Selivanovskii, D. A.; Spivak, E. I., Dissociation of water by microwave radiation. *Radiophysics and Quantum Electronics* **1994**, *37* (1), 85-88.

147. (a) de Montferrand, C.; Lalatonne, Y.; Bonnin, D.; Lièvre, N.; Lecouvey, M.; Monod, P.; Russier, V.; Motte, L., Size-Dependent Nonlinear Weak-Field Magnetic Behavior of Maghemite Nanoparticles. *Small* **2012**, *8* (12), 1945-1956; (b) Lalatonne, Y.; Monteil, M.; Jouni, H.; Serfaty, J. M.; Sainte-Catherine, O.; Lièvre, N.; Kusmia, S.; Weinmann, P.; Lecouvey, M.; Motte, L.,

Superparamagnetic Bifunctional Bisphosphonates Nanoparticles: A Potential MRI Contrast Agent for Osteoporosis Therapy and Diagnostic. *Journal of Osteoporosis* **2010**, 2010, 7; (c) Nehlig, E.; Motte, L.; Guenin, E., Magnetic nano-organocatalysts: impact of surface functionalization on catalytic activity. *RSC Advances* **2015**, 5 (127), 104688-104694.

148. Basly, B.; Popa, G.; Fleutot, S.; Pichon, B. P.; Garofalo, A.; Ghobril, C.; Bilotey, C.; Berniard, A.; Bonazza, P.; Martinez, H.; Felder-Flesch, D.; Begin-Colin, S., Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (6), 2146-2157.

149. Clark, D. T.; Feast, W. J.; Tweedale, P. J.; Thomas, H. R., ESCA applied to polymers. XXVI. Investigation of a series of aliphatic, aromatic, and fluorine-containing polycarbonates. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1980**, 18 (6), 1651-1664.

150. Banks, R. L.; Bailey, G. C., Olefin Disproportionation. A New Catalytic Process. *I&EC Product Research and Development* **1964**, 3 (3), 170-173.

151. Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A. R., The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction. *Nature* **2007**, 450 (7167), 243-251.

152. Tasdelen, M. A.; Yagci, Y., Light-Induced Click Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52 (23), 5930-5938.

153. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49 (9), 1540-1573.

154. Bhairamadgi, N. S.; Gangarapu, S.; Caipa Campos, M. A.; Paulusse, J. M. J.; van Rijn, C. J. M.; Zuilhof, H., Efficient Functionalization of Oxide-Free Silicon(111) Surfaces: Thiol-yne versus Thiol-ene Click Chemistry. *Langmuir* **2013**, 29 (14), 4535-4542.

155. Carboni, R. A.; Lindsey, R. V., Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, 81 (16), 4342-4346.

156. (a) Niederwieser, A.; Späte, A.-K.; Nguyen, L. D.; Jüngst, C.; Reutter, W.; Wittmann, V., Two-Color Glycan Labeling of Live Cells by a Combination of Diels-Alder and Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52 (15), 4265-4268; (b) Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulderson, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S., In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49 (19), 3375-3378.

157. (a) Koenig, S.; Chechik, V., Shell Cross-Linked Au Nanoparticles. *Langmuir* **2006**, *22* (11), 5168-5173; (b) Watson, K. J.; Zhu, J.; Nguyen, S. T.; Mirkin, C. A., Hybrid Nanoparticles with Block Copolymer Shell Structures. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (2), 462-463.
158. Ornelas, C.; Méry, D.; Cloutet, E.; Aranzaes, J. R.; Astruc, D., Cross Olefin Metathesis for the Selective Functionalization, Ferrocenylation, and Solubilization in Water of Olefin-Terminated Dendrimers, Polymers, and Gold Nanoparticles and for a Divergent Dendrimer Construction. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (4), 1495-1506.
159. Grubbs, R. H.; Trnka, T. M., Ruthenium-Catalyzed Olefin Metathesis. In *Ruthenium in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2005; pp 153-177.
160. (a) Gułajski, Ł.; Michrowska, A.; Narożnik, J.; Kaczmarska, Z.; Rupnicki, L.; Grela, K., A Highly Active Aqueous Olefin Metathesis Catalyst Bearing a Quaternary Ammonium Group. *ChemSusChem* **2008**, *1* (1-2), 103-109; (b) Hong, S. H.; Grubbs, R. H., Highly Active Water-Soluble Olefin Metathesis Catalyst. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (11), 3508-3509; (c) Jordan, J. P.; Grubbs, R. H., Small-Molecule N-Heterocyclic-Carbene-Containing Olefin-Metathesis Catalysts for Use in Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (27), 5152-5155.
161. Binder, J. B.; Blank, J. J.; Raines, R. T., Olefin Metathesis in Homogeneous Aqueous Media Catalyzed by Conventional Ruthenium Catalysts. *Organic Letters* **2007**, *9* (23), 4885-4888.
162. Korthals, B.; Morant-Miñana, M. C.; Schmid, M.; Mecking, S., Functionalization of Polymer Nanoparticles by Thiol-Ene Addition. *Macromolecules* **2010**, *43* (19), 8071-8078.
163. Kotsuchibashi, Y.; Ebara, M.; Aoyagi, T.; Narain, R., Fabrication of doubly responsive polymer functionalized silica nanoparticles via a simple thiol-ene click chemistry. *Polymer Chemistry* **2012**, *3* (9), 2545-2550.
164. Lowe, A. B., Thiol-yne 'click'/coupling chemistry and recent applications in polymer and materials synthesis and modification. *Polymer* **2014**, *55* (22), 5517-5549.
165. Jockusch, S.; Turro, N. J., Radical Addition Rate Constants to Acrylates and Oxygen: α -Hydroxy and α -Amino Radicals Produced by Photolysis of Photoinitiators. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (16), 3921-3925.
166. (a) Hull, J. M.; Provorse, M. R.; Aikens, C. M., Formyloxyl Radical-Gold Nanoparticle Binding: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116* (22), 5445-5452; (b) Zhang, Z.; Berg, A.; Levanon, H.; Fessenden, R. W.; Meisel, D., On the Interactions of Free

Radicals with Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (26), 7959-7963; (c) Aryal, S.; Remant Bahadur, K. C.; Khil, M. S.; Dharmaraj, N.; Kim, H. Y., Radical scavenger for the stabilization of gold nanoparticles. *Materials Letters* **2007**, *61* (19–20), 4225-4230.

167. Wang, Y.; Song, W.; Hu, W. J.; Lin, Q., Fast Alkene Functionalization In Vivo by Photoclick Chemistry: HOMO Lifting of Nitrile Imine Dipoles. *Angewandte Chemie* **2009**, *121* (29), 5434-5437.

168. Lim, R. K. V.; Lin, Q., Azirine ligation: fast and selective protein conjugation via photoinduced azirine-alkene cycloaddition. *Chemical Communications* **2010**, *46* (42), 7993-7995.

169. Conradi, M.; Junkers, T., Photoinduced Conjugation of Aldehyde Functional Polymers with Olefins via [2 + 2]-Cycloaddition. *Macromolecules* **2011**, *44* (20), 7969-7976.

170. (a) Peterson, V. M.; Castro, C. M.; Lee, H.; Weissleder, R., Orthogonal Amplification of Nanoparticles for Improved Diagnostic Sensing. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3506-3513; (b) Chung, H. J.; Reiner, T.; Budin, G.; Min, C.; Liong, M.; Issadore, D.; Lee, H.; Weissleder, R., Ubiquitous Detection of Gram-Positive Bacteria with Bioorthogonal Magnetofluorescent Nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *5* (11), 8834-8841.

171. Han, H.-S.; Devaraj, N. K.; Lee, J.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Bawendi, M. G., Development of a Bioorthogonal and Highly Efficient Conjugation Method for Quantum Dots Using Tetrazine–Norbornene Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (23), 7838-7839.

172. Knall, A.-C.; Slugovc, C., Inverse electron demand Diels-Alder (iEDDA)-initiated conjugation: a (high) potential click chemistry scheme. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (12), 5131-5142.

173. Knall, A.-C.; Hollauf, M.; Slugovc, C., Kinetic studies of inverse electron demand Diels–Alder reactions (iEDDA) of norbornenes and 3,6-dipyridin-2-yl-1,2,4,5-tetrazine. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (34), 4763-4766.

174. Wijnen, J. W.; Zavarise, S.; Engberts, J. B. F. N.; Charton, M., Substituent Effects on an Inverse Electron Demand Hetero Diels–Alder Reaction in Aqueous Solution and Organic Solvents: Cycloaddition of Substituted Styrenes to Di(2-pyridyl)-1,2,4,5-tetrazine. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (6), 2001-2005.

175. Acres, R. G.; Feyer, V.; Tsud, N.; Carlino, E.; Prince, K. C., Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118* (19), 10481-10487.
176. (a) Ethirajan, M.; Chen, P.; Ohulchanskyy, T. Y.; Goswami, L. N.; Gupta, A.; Srivatsan, A.; Dobhal, M. P.; Missert, J. R.; Prasad, P. N.; Kadish, K. M.; Pandey, R. K., Regioselective Synthesis and Photophysical and Electrochemical Studies of 20-Substituted Cyanine Dye–Purpurinimide Conjugates: Incorporation of Nill into the Conjugate Enhances its Tumor-Uptake and Fluorescence-Imaging Ability. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (21), 6670-6684; (b) Ornelas, C.; Lodescar, R.; Durandin, A.; Canary, J. W.; Pennell, R.; Liebes, L. F.; Weck, M., Combining Aminocyanine Dyes with Polyamide Dendrons: A Promising Strategy for Imaging in the Near-Infrared Region. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17* (13), 3619-3629; (c) Lülfi, H.; Bertucci, A.; Septiadi, D.; Corradini, R.; De Cola, L., Multifunctional Inorganic Nanocontainers for DNA and Drug Delivery into Living Cells. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20* (35), 10900-10904.
177. Langer, R., New methods of drug delivery. *Science* **1990**, *249* (4976), 1527-1533.
178. Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S., Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (London, England)* **2011**, *6* (4), 715-728.
179. Veronese, F. M.; Pasut, G., PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (21), 1451-1458.
180. Murphy, C. J.; Jana, N. R., Controlling the Aspect Ratio of Inorganic Nanorods and Nanowires. *Advanced Materials* **2002**, *14* (1), 80-82.
181. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
182. Terrill, R. H.; Postlethwaite, T. A.; Chen, C.-h.; Poon, C.-D.; Terzis, A.; Chen, A.; Hutchison, J. E.; Clark, M. R.; Wignall, G., Monolayers in Three Dimensions: NMR, SAXS, Thermal, and Electron Hopping Studies of Alkanethiol Stabilized Gold Clusters. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (50), 12537-12548.
183. (a) Ferdous, S.; Ioannidis, M. A.; Henneke, D., Adsorption kinetics of alkanethiol-capped gold nanoparticles at the hexane–water interface. *J Nanopart Res* **2011**, *13* (12), 6579-6589; (b) Sekiguchi, S.; Niikura, K.; Matsuo, Y.; Ijiro, K., Hydrophilic Gold Nanoparticles Adaptable for Hydrophobic Solvents. *Langmuir* **2012**, *28* (13), 5503-5507.

184. Dulkeith, E.; Morteani, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S. A.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Möller, M.; Gittins, D. I., Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects. *Physical Review Letters* **2002**, *89* (20), 203002.
185. (a) Leung, F. C.-M.; Tam, A. Y.-Y.; Au, V. K.-M.; Li, M.-J.; Yam, V. W.-W., Förster Resonance Energy Transfer Studies of Luminescent Gold Nanoparticles Functionalized with Ruthenium(II) and Rhenium(I) Complexes: Modulation via Esterase Hydrolysis. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6* (9), 6644-6653; (b) Ghosh, D.; Girigoswami, A.; Chattopadhyay, N., Superquenching of coumarin 153 by gold nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, *242*, 44-50.
186. (a) Bolley, J.; Lalatonne, Y.; Haddad, O.; Letourneur, D.; Soussan, M.; Perard-Viret, J.; Motte, L., Optimized multimodal nanoplatfoms for targeting $\alpha_5\beta_3$ integrins. *Nanoscale* **2013**, *5* (23), 11478-11489; (b) Richard, S.; Boucher, M.; Herbet, A.; Lalatonne, Y.; Meriaux, S.; Boquet, D.; Motte, L., Endothelin B receptors targeted by iron oxide nanoparticles functionalized with a specific antibody: toward immunoimaging of brain tumors. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (15), 2939-2942.
187. Forster, S.; Thumser, A. E.; Hood, S. R.; Plant, N., Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In In vitro Drug Transport Assays. *PLoS ONE* **2012**, *7* (3), e33253.
188. Arnida; Malugin, A.; Ghandehari, H., Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Journal of Applied Toxicology* **2010**, *30* (3), 212-217.
189. (a) Smith, M. R., Antitumor Activity of Bisphosphonates. *Clinical Cancer Research* **2003**, *9* (15), 5433-5434; (b) Clézardin, P., Activité anti-tumorale des bisphosphonates : mythe ou réalité ? *Revue du Rhumatisme* **2002**, *69* (10-11), 997-1001; (c) Green, J. R., Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* **2003**, *97* (S3), 840-847.
190. Benyettou, F. Nanovecteurs Superparamagnétiques Anti-Tumoraux : Synthèse, Caractérisations et Évaluations Biologiques. Université Paris 13, 2010.
191. Benyettou, F.; Lalatonne, Y.; Chebbi, I.; Benedetto, M. D.; Serfaty, J.-M.; Lecouvey, M.; Motte, L., A multimodal magnetic resonance imaging nanoplatfom for cancer theranostics. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (21), 10020-10027.
192. Dreaden, E. C.; Mackey, M. A.; Huang, X.; Kang, B.; El-Sayed, M. A., Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (7), 3391-3404.

193. (a) Choi, W. I.; Kim, J.-Y.; Kang, C.; Byeon, C. C.; Kim, Y. H.; Tae, G., Tumor Regression In Vivo by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers. *ACS Nano* **2011**, 5 (3), 1995-2003; (b) Jang, B.; Park, J.-Y.; Tung, C.-H.; Kim, I.-H.; Choi, Y., Gold Nanorod-Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy In Vivo. *ACS Nano* **2011**, 5 (2), 1086-1094.
194. Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D., Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, 5 (6), 701-708.
195. (a) Johnson, C. J.; Dujardin, E.; Davis, S. A.; Murphy, C. J.; Mann, S., Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. *Journal of Materials Chemistry* **2002**, 12 (6), 1765-1770; (b) Meena, S. K.; Sulpizi, M., From Gold Nanoseeds to Nanorods: The Microscopic Origin of the Anisotropic Growth. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55 (39), 11960-11964.
196. Chen, H.; Shao, L.; Li, Q.; Wang, J., Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (7), 2679-2724.
197. Barbosa, S.; Agrawal, A.; Rodríguez-Lorenzo, L.; Pastoriza-Santos, I.; Alvarez-Puebla, R. A.; Kornowski, A.; Weller, H.; Liz-Marzán, L. M., Tuning Size and Sensing Properties in Colloidal Gold Nanostars. *Langmuir* **2010**, 26 (18), 14943-14950.
198. Tian, Y.; Luo, S.; Yan, H.; Teng, Z.; Pan, Y.; Zeng, L.; Wu, J.; Li, Y.; Liu, Y.; Wang, S.; Lu, G., Gold nanostars functionalized with amine-terminated PEG for X-ray/CT imaging and photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, 3 (21), 4330-4337.
199. Richard, S. Élaboration de nanoplateformes bimodales pour l'imagerie moléculaire des cancers. Université Paris XIII, 2015.

La synthèse de nanoparticules (NPs) d'or fonctionnalisées en phase aqueuse est encore aujourd'hui un enjeu majeur de la recherche dans le domaine des nanomatériaux. Depuis les travaux de J. Turkevich de 1951, la synthèse utilisant le citrate comme ligand et agent réducteur est la méthode de choix pour obtenir des NPs d'or. Cependant cette synthèse nécessite une étape supplémentaire de modification de surface par échange de ligand, pour pouvoir accrocher des molécules d'intérêt. Afin de simplifier la procédure, notre projet propose de synthétiser en une seule étape des NPs qui possèdent un groupement permettant une post-fonctionnalisation. La nouvelle voie de synthèse fait intervenir des composés bifonctionnels de la famille des 1-hydroxy-1,1-méthylène bisphosphonates (HMBP). Ainsi la base conjuguée de l'acide (1-hydroxy-1-phosphonopent-4-ènyl)phosphonique (HMBPène), qui possède une fonction éthylénique terminale nous a permis d'obtenir des dispersions de nanosphères de tailles contrôlées et nous avons pu rationaliser le mécanisme de synthèse utilisant ce type de molécules. Nous avons ensuite évalué plusieurs modalités de post-fonctionnalisation de notre nanoplateforme et validé une approche par chimie « Click » la *via* cycloaddition de composés tétrazine. En utilisant une nouvelle classe de HMBP couplés à une chaîne polyéthylène glycol, des NPs stables en milieu physiologique ont pu être synthétisées selon le même modèle. Elles offrent également des possibilités de post-fonctionnalisation par couplage carbodiimide, que nous avons illustré par le couplage d'un fluorophore. Nous développons en dernière partie les résultats préliminaires sur deux types NPs d'or synthétisées à l'aide des HMBP pour des applications thérapeutiques.

SYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES WITH PHOSPHORUS COMPOUNDS

In the ever growing fields of nanoscience the control of the synthesis of gold nanoparticles (GNPs) owing to their large variety of applications has emerged as an important domain. Among all methodologies Turkevich-Frens synthesis using citrates that act as ligand and reducing agent remains a method of choice for the obtaining of water soluble GNPs. Nevertheless, in post-synthesis, citrates are often exchanged with other ligands to enhanced stabilization and allow further functionalisation. In our work we present a new class of bi-functional molecules (1-hydroxy-1,1-methylene bisphosphonates HMBP) that can both reduce Au(III) and act as an efficient stabilizer of the formed GNPs in water. The first size controlled GNPs "one pot" synthesis was achieved by using an alkene conjugated HMBP, the (1-hydroxy-1-phosphonopent-4-enyl)phosphonic acid (HMBPene). We moreover, rationalized the mechanism of the GNPs synthesis using this type of molecule. We then, evaluated several methodologies for the post-functionalization of our nanoplateform and developed a « Click » chemistry approach to nanoparticle coating by tetrazine cycloaddition. Other nanoplatfroms were synthesized using pegylated hydroxyl methylene bisphosphonates. This new class of bisphosphonate coated GNPs showed an improved stability in biological media and brought reactive groups available for post-functionalization as well, illustrated by the coupling of a fluorescent dye. The last part of this was dedicated to our latest results on GNPs synthesis for biomedical applications with HMBP compounds.

CHIMIE

Mots-clés : nanoparticules d'or, bisphosphonates, chimie click
