



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates / nanoparticules métalliques pour des applications biomédicales

Somia Tomane

► **To cite this version:**

Somia Tomane. Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates / nanoparticules métalliques pour des applications biomédicales. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF007 . tel-03260317

HAL Id: tel-03260317

<https://theses.hal.science/tel-03260317>

Submitted on 14 Jun 2021

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.

Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates
/ nanoparticules métalliques pour des applications
biomédicales

*Synthesis and characterization of polyoxometalates / metallic
nanoparticles composites for biomedical applications*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571 : Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et
biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, CNRS, Institut Lavoisier de Versailles, 78000,
Versailles, France.

Référent : Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
Le 15/03/2021, par**

Somia TOMANE

Composition du Jury

Laure CATALA Professeure des universités, Paris-Saclay	Présidente
Roberta BRAYNER Maître de conférences, Université de Paris	Rapporteur & Examinatrice
Laurent RUHMANN Professeur des universités, Université de Strasbourg	Rapporteur & Examineur
Florence VOLATRON Maître de conférences, Sorbonne Université	Examinatrice

Direction de la thèse

Pierre MIALANE Professeur des universités, UVSQ, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Anne DOLBECQ Directrice de recherche, UVSQ, Université Paris-Saclay	Co-directrice de thèse
Souhir BOUJDAY Professeure des universités, Sorbonne Université	Co-encadrante
Anne VALLÉE Maître de conférences, UVSQ, Université Paris-Saclay	Co-encadrante

Remerciements

Je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, le Professeur Laure Catala, le Docteur Florence Volatron ainsi que le Docteur Roberta Brayner et le Professeur Laurent Ruhlmann en leur qualité de rapporteurs. Je tiens aussi à remercier le Professeur Emmanuel Cadot et le Professeur Hélène Pernot de m'avoir accueillie au sein de leur équipe respective (MIM de l'Institut Lavoisier de Versailles et le LRS de Sorbonne Université).

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à l'ensemble de mes encadrants de thèse, le Docteur Anne Vallée, le Docteur Anne Dolbecq, le Professeur Souhir Boujday et le Professeur Pierre Mialane. Je vous remercie de m'avoir guidé tout au long de la thèse tout en m'accordant de l'autonomie. Je vous remercie également pour votre bienveillance, votre gentillesse, vos précieux conseils et votre soutien. Merci encore pour ces trois années.

Je remercie également l'ensemble des collaborateurs : le Docteur Vincent Humblot, le Docteur Claire Wilhelm, le Docteur Elena López-Maya, le Docteur Abdelwaheb Dhahri, Baptiste Pochinot, Lucas Busson, Basile Bouvet, Flavien Bourdreux, Sandra Casale et Jérôme Marrot.

Je remercie l'ensemble du personnel permanent et non permanent de l'ILV et du LRS pour les bons moments passés.

Je tiens à remercier Clémence, Fay, Lucie, Yacine, Virgile, Youven, Nadia, David, Jad, Yohan, Mathis, Kevin, Médéric, Lu, Sunny et toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant ces trois ans de thèse. Particulièrement Yacine, merci pour toutes nos discussions passionnantes et tous les conseils que tu m'as donnés.

Je souhaite aussi remercier mes amis qui sont devenus ma famille : Sarah A, Amina, Elisa, Sarah Z, Christelle, Jade, Youri, Jeffrey, Nicodème, Pauline, son mari Souleymane et leurs magnifiques enfants Adam et Isaac, Vierajitha, Ghada et Wissam. Je vous remercie du plus profond de mon cœur pour votre soutien sans faille et d'être toujours dans ma vie après autant d'années.

Enfin, je remercie ma famille et plus particulièrement ma mère. Tu es une femme incroyable. Je te remercie pour l'éducation que tu m'as donnée, pour les sacrifices que tu as faits pour moi. Aucune femme ne peut t'égaliser. Je suis fière de ton parcours et honorée d'être ta fille. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ale : Alendronate

ATG : Analyse thermogravimétrique

ATP : Adénosine triphosphate

AgNPs : Nanoparticules d'argent

AuNPs : Nanoparticules d'or

AuNRs : nano-batônnetts d'or

AuNSs : Nano-étoiles d'or

BP(s) : Bisphosphonates

CMI : Concentration minimale d'inhibition

CTAB : Bromure de cétrimonium

DLS : Dynamic light scattering

DRX : Diffraction des rayons X

EPSPS : Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazinepropane sulfonique

EPR: Enhanced permeability and retention effect

FMN : Flavine mononucléotide

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

ICP-OES : Inductively coupled plasma – Optical emission spectrometry

IR : Infrarouge

LSPR : Localized Surface Plasmon Resonance

MOPS : Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

NIR: Near-infrared

NP(s): Nanoparticule(s)

PBP: Penicillin-Binding-proteins

POM(s): Polyoxométallate(s)

POMo(s): Polyoxomolybdate(s)

POT(s): Polyoxotungstate(s)

POV(s): Polyoxovanadate(s)

PTT: Photothermal therapy

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Ris : Risedronate

SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline

SPP: Surface Plasmon Polariton

STEM: Scanning transmission electron microscopy

TEM : Transmission electron microscopy

UV : Ultraviolet

VRE : Entérocoques résistants à la vancomycine

X-EDS: X-ray Energy-dispersive spectroscopy

XPS: X-ray photoelectron spectrometry

Zol: Zoledronate

5-FU : 5-Fluorouracile

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I : Repères bibliographiques	5
Repères bibliographiques.....	5
I – Généralités sur les Polyoxométallates	6
I.1 – Introduction	6
I.2 – Structure et fonctionnalisation des polyoxométallates	7
I.2.1 – Diversité structurale des polyoxométallates	7
I.2.2 – La fonctionnalisation des polyoxométallates.....	8
I.3 – Les propriétés biologiques des POMs.....	12
I.3.1 – Les propriétés anticancéreuses des POMs.....	13
I.3.2 – Les propriétés antibactériennes des POMs	17
II – Les nanoparticules d’or : de la synthèse aux applications	22
II.1 – Introduction générale	22
II 2. Les propriétés optiques des AuNPs	23
II.2.1 – Résonance de plasmon de surface localisée (LSPR).....	23
II.2.2 – Facteurs influençant la bande LSPR	24
II.3 – La synthèse des nanoparticules d’or.....	26
II.3.1 – Synthèse de nanoparticules d’or sphériques.....	27
II.3.2 – Les nanoparticules d’or anisotropes	30
II.4 – Les applications biomédicales des AuNPs	32
II.4.1 – Introduction générale.....	32
II.4.2 – Les AuNPs comme vecteurs de médicaments	33
II.4.3 – Les AuNPs en Photothermie (PTT)	35
Références bibliographiques :.....	38

Chapitre II : Synthèse d'assemblages POVs/NPs comme agents antibiofilm61

Introduction générale.....	62
Partie 1 : Synthèse et caractérisation du nouveau POV hybride $V_3(Al)_3$	64
Partie 2 : Synthèse d'assemblages AuNPs@POV comme agents antibiofilm	67
I. Introduction.....	67
II. Contributions.....	68
III. Article.....	68
Partie 3 : Synthèse d'assemblages AgNPs@POV comme agents antibiofilm	91
I. Introduction.....	91
II. Élaboration d'assemblages AgNPs@POV.....	92
III. Propriétés antibiofilm des AgNPs@POV	98
Conclusion	101
Références bibliographiques :.....	102

Chapitre III : Nanoparticules hybrides AuNPs@ $Mo_4(Zol)_2Mn^{III}$ comme agents anticancéreux photothermiques 105

Introduction générale.....	106
Synthèse de nanoparticules hybrides pour des applications anticancéreuses	108
I. Contributions.....	108
II. Article.....	108
Références bibliographiques :.....	144

Chapitre IV : Synthèse de AuNPs sphériques et étoilées utilisant le POM Mo₄(Ale)₂ comme réducteur et stabilisant149

Partie 1 : Synthèse et caractérisation du POM hybride Mo₄(Ale)₂ 150

I. Description du POM Mo₄(Ale)₂ 150

Partie 2 : Synthèse de AuNPs@POMo sphériques par micro-onde..... 152

I. Introduction..... 152

II. Synthèse de AuNPs@POMo 152

III. Conclusion..... 166

Partie 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or décorées par le POM Mo₄(Ale)₂..... 168

I. Introduction..... 168

II. Synthèse de nano-étoiles d'or par nucléation-croissance 169

II.1 Synthèse des germes 170

II.2 Synthèse des nano-étoiles (AuNS) à partir du composé Mo₄(Ale)₂ 173

II.3 Modulation de la bande plasmon des nano-étoiles..... 178

III. Conclusion 180

Conclusion générale 182

Références bibliographiques :..... 184

Conclusion générale..... 188

Partie matériels et méthodes 191

I. Synthesis of bisphosphonates (BPs)..... 192

I.1 Synthesis of alendronic acid H₂O₃PC(C₃H₆NH₂)(OH)PO₃H₂ (Ale) 192

I.2	Synthesis of zoledronic acid $\text{H}_2\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2)(\text{OH})\text{PO}_3\text{H}_2$ (Zol)	192
II.	Synthesis of POM/BP complexes	194
II.1	Synthesis of $\text{V}_3(\text{Ale})_3$	194
II.2	Synthesis of $\text{Mo}_4(\text{Zol})_2\text{Mn}$	194
II.3	Synthesis of $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$	195
III-	Synthesis of Gold nanoparticles (AuNPs)	195
III.1	Synthesis of citrate-protected gold nanoparticles (AuNPs@Cit)	195
III.2	Synthesis of POMs-Gold nanoparticles assemblies (AuNPs@POMs)	196
IV.	Synthesis of AgNPs@POV	198
V.	Biological procedures	198
V.1	Antibiofilm assay	199
V.2	Cytotoxicity assay	202
VI.	Characterisation techniques	202
	References :	208

Introduction générale

Le cancer et les infections bactériennes sont deux des principaux problèmes de santé publique auxquels nous devons faire face actuellement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le cancer est actuellement la deuxième cause de décès dans le monde et a fait 8,8 millions de morts en 2015. En 2030, 20 millions de personnes devraient être atteintes par un cancer. De plus, les infections bactériennes ont entraîné 5500 décès en 2015 en France.¹ Les traitements anticancéreux actuels ont l'inconvénient d'avoir des effets secondaires. Quant aux traitements antibactériens, ils sont limités par la résistance bactérienne qui est la conséquence d'une surconsommation d'antibiotiques. Il est donc primordial de développer de nouvelles thérapies médicamenteuses. Pour cela l'utilisation combinée de polyoxométallates (POMs) et de nanoparticules d'or (AuNPs) représente une stratégie prometteuse.

Les polyoxométallates sont des analogues moléculaires solubles d'oxydes métalliques. Ces entités inorganiques peuvent être associées de manière covalente à des molécules organiques, ce qui permet leur fonctionnalisation.² Le fait que les POMs inorganiques possèdent des propriétés biologiques intrinsèques et la possibilité de les fonctionnaliser par des molécules organiques elles-mêmes actives explique que les propriétés biomédicales (anticancéreuses, antibactériennes, etc...) des polyoxométallates attirent l'attention de la communauté scientifique depuis plus de vingt années.^{3,4} Cependant leur instabilité en milieu biologique, leur toxicité et leur faible capacité à pénétrer les cellules limitent leur application directe dans le domaine médical. Les nanoparticules d'or qui sont biocompatibles et facilement fonctionnalisables représentent des supports de choix pour vectoriser les POMs, diminuer leur toxicité et améliorer leur stabilité ainsi que pour des applications en thérapie photothermique.^{5,6} De plus les POMs peuvent jouer le rôle de réducteurs de sels d'or et de stabilisant lors de la synthèse des nanoparticules d'or.^{7,8}

Les objectifs de ces travaux de thèse s'inscrivent dans ce cadre et concernent la mise au point de voies de synthèses de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des POMs hybrides

contenant des ligands bisphosphonates ainsi que l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes et anticancéreuses.

Le premier chapitre sera tout d'abord consacré à l'état de l'art sur la synthèse et la fonctionnalisation des POMs. Une fois les propriétés biologiques des POMs abordées, il se focalisera sur la synthèse des nanoparticules d'or via l'utilisation de réducteurs classiques puis de polyoxométallates réduits. Les propriétés des AuNPs dans le domaine médical seront finalement présentées.

Le deuxième chapitre débutera par la description de la synthèse et des caractérisations structurales et spectroscopiques d'un nouveau polyoxovanadate hybride associant des ligands alendronate et des ions V^{IV} . La synthèse en une étape de nanoparticules d'or utilisant ce polyoxovanadate comme réducteur et stabilisant sera ensuite présentée. Après leur caractérisation, l'évaluation de l'activité de ces assemblages polyoxovanadates / AuNPs sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* sera décrite. Ces résultats seront présentés sous la forme d'un article paru en 2019 dans *Nanoscale Advances*. Des résultats préliminaires sur la synthèse de NPs d'argent en utilisant le même POM seront également exposés.

Le troisième chapitre est consacré à la synthèse et la caractérisation d'assemblages de nanoparticules d'or et de polyoxomolybdates fonctionnalisés par un agent anticancéreux, le zoledronate. Les ions molybdène étant au degré d'oxydation +VI dans ces POMs hybrides, la synthèse en une étape décrite ci-dessus en utilisant le POM comme réducteur ne peut être considérée. Ces NPs ont donc été obtenues en deux étapes : la première étape consiste à synthétiser des nanoparticules d'or stabilisées par des ligands citrates, ces ligands citrates étant échangés dans une deuxième étape par les POMs hybrides. L'évaluation des propriétés photothermiques de ces assemblages sur des cellules cancéreuses sera également décrite. Ce chapitre sera également présenté sous forme d'un article actuellement soumis.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre abordera la synthèse par micro-ondes en une seule étape de nanoparticules d'or sphériques à partir d'un polyoxomolybdate hybride associant des ions Mo^V et des ligands alendronate. Ce mode de synthèse est inédit pour des assemblages POM / AuNPs. Dans une deuxième partie, la synthèse de nanoparticules d'or anisotropes en

forme d'étoiles sera présentée, cette dernière topologie étant obtenue pour la première fois via l'utilisation de POMs réduits.

Références bibliographiques

- (1) *Semaine Mondiale Pour Un Bon Usage Des Antibiotiques 2018*; **2018**. https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/dossier-information_antibioresistance_def.pdf.
- (2) Dolbecq, A.; Dumas, E.; Mayer, C. R.; Mialane, P. Hybrid Organic-Inorganic Polyoxometalate Compounds: From Structural Diversity to Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 6009–6048. <https://doi.org/10.1021/cr1000578>.
- (3) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. The Antibacterial Activity of Polyoxometalates: Structures, Antibiotic Effects and Future Perspectives. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>.
- (4) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer Angewandte. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58*, 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>.
- (5) Das, M.; Shim, K. H.; An, S. S. A.; Yi, D. K. Review on Gold Nanoparticles and Their Applications. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **2011**, *3* (4), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s13530-011-0109-y>.
- (6) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Kandjani, A. E.; Shukla, R.; Bhargava, S. K.; Bansal, V. Synergistic Influence of Polyoxometalate Surface Corona towards Enhancing the Antibacterial Performance of Tyrosine-Capped Ag Nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6* (2), 758–765. <https://doi.org/10.1039/c3nr03806h>.
- (7) Zhang, G.; Keita, B.; Biboum, R. N.; Miserque, F.; Berthet, P.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Catala, L.; Nadjó, L. Synthesis of Various Crystalline Gold Nanostructures in Water: The Polyoxometalate $\beta\beta\text{-[H}_4\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}\text{]}^{3-}$ as the Reducing and Stabilizing Agent. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (45), 8639. <https://doi.org/10.1039/b903599k>.
- (8) Tomane, S.; López-Maya, E.; Boujday, S.; Humblot, V.; Marrot, J.; Rabasso, N.; Castells-Gil, J.; Sicard, C.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Vallée, A. One-Pot Synthesis of a New Generation of Hybrid Bisphosphonate Polyoxometalate Gold Nanoparticles as Antibiofilm Agents. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1* (9), 3400–3405. <https://doi.org/10.1039/c9na00401g>.

Chapitre I

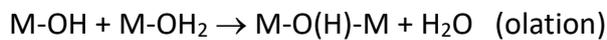
Repères bibliographiques

L'objectif de ces travaux de thèse est l'élaboration d'assemblages polyoxométallates / nanoparticules d'or pour des applications biologiques antibactériennes ou antitumorales. Ce premier chapitre présente l'état de l'art relatif à la synthèse des polyoxométallates et des nanoparticules d'or ainsi que leurs propriétés biologiques.

I. Généralités sur les Polyoxométallates

I.1 Introduction

Les polyoxométallates (POMs) sont définis comme étant des clusters anioniques formés par des ligands oxo O^{2-} et des métaux de transition à haut degré d'oxydation (typiquement $Mo^{VI/V}$, $W^{VI/V}$, $V^{VI/IV}$). Ce sont des espèces intermédiaires entre l'ion métallate basique mononucléaire $[MO_4]^{n-}$ et l'oxyde métallique infini MO_x . Généralement, les polyanions sont formés par condensation en acidifiant une solution aqueuse de MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} ou VO_4^{3-} . Deux types de condensation peuvent être rencontrés, l'olation et l'oxolation:



La figure suivante résume le processus de formation des polyoxométallates à partir de la brique élémentaire $[MO_r]^{n-}$ par polycondensation à pH contrôlé (Figure 1).

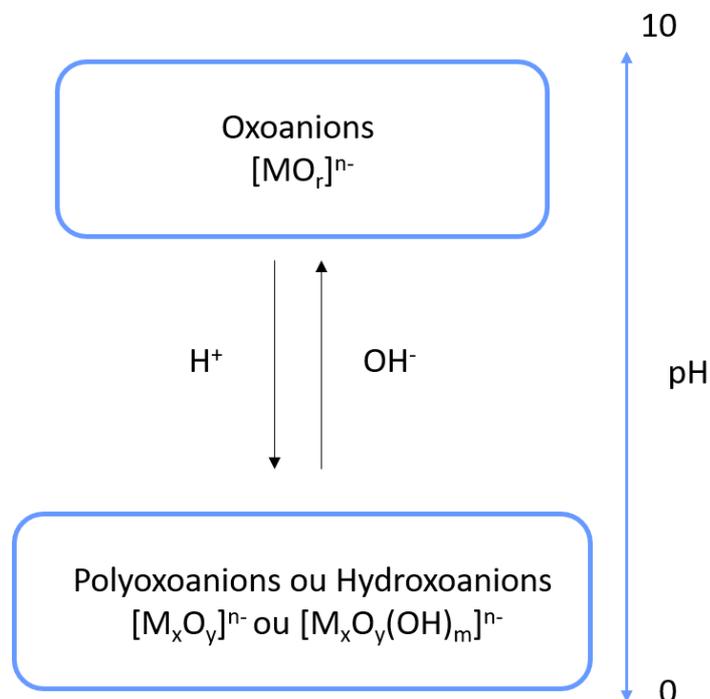


Figure 1: Processus de formation des POMs

Les POMs contenant des ions $\text{Mo}^{\text{VI,V}}$ sont appelés polyoxomolybdates et sont notés par la suite POMos, les POMs contenant des ions $\text{W}^{\text{VI,V}}$ sont appelés polyoxotungstates et sont notés par la suite POTs et enfin les POMs contenant des ions $\text{V}^{\text{V,IV}}$ sont appelés polyoxovanadates et sont notés POVs. Une grande diversité structurale peut être obtenue en modifiant les paramètres de la réaction comme le pH, la concentration, la température, la nature des précurseurs ou encore la force ionique. Cependant, ces oxydes anioniques peuvent être classés en deux grandes familles : les isopolyoxométallates (ou isopolyanions), de formule générale $[\text{M}_x\text{O}_y]^{n-}$, et les hétéropolyoxométallates (ou hétéropolyanions), de formule générale $[\text{X}_2\text{M}_x\text{O}_y]^{n-}$, où X représente un hétéroatome du groupe p (B^{III} , Si^{IV} , P^{V} , As^{V} , ...).

Historiquement, le premier POM mentionné dans la littérature est le dodécamolybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, découvert par J.J. Berzelius en 1826.¹ Grâce aux travaux de J.F. Keggin, sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X sur monocristal.² Ces dernières décennies, une multitude de structures ont été mises en évidence. Cette diversité structurale ainsi que les propriétés physico-chimiques qui en découlent ont permis l'utilisation des POMs dans différents domaines comme la catalyse,³ l'électrochimie,⁴ le magnétisme⁵ ou le biomédical.^{6,7}

I.2 Structure et fonctionnalisation des polyoxométallates

I.2.1 Diversité structurale des polyoxométallates

Comme précisé précédemment, les POMs sont des oxydes métalliques dont la représentation la plus commune correspond à l'assemblage de polyèdres. L'atome métallique occupe le centre du polyèdre, les atomes d'oxygène occupant les sommets. Ces derniers peuvent être soit des atomes d'oxygène pontants soit des atomes d'oxygène terminaux. De plus les polyèdres $\{\text{MO}_x\}$ peuvent s'assembler de différentes manières par la mise en commun de sommets, d'arêtes ou de faces. Cependant, même si ces différents assemblages laissent penser qu'il est possible d'obtenir des combinaisons infinies, la majorité des POMs dérivent de structures types. On distingue ainsi les structures de type Lindqvist $[\text{M}_6\text{O}_{19}]^{n-}$ ($\{\text{M}_6\}$), Anderson $[\text{XM}_6\text{O}_{24}]^{n-}$ ($\{\text{XM}_6\}$), Keggin $[\text{XM}_{12}\text{O}_{40}]^{n-}$ ($\{\text{XM}_{12}\}$) et Dawson $[\text{X}_2\text{M}_{18}\text{O}_{62}]^{n-}$ ($\{\text{X}_2\text{M}_{18}\}$) (Figure 2). La structure de Lindqvist appartient à la famille des isopolyanions alors que les trois

autres structures appartiennent à la famille des hétéropolyanions. La structure d'Anderson correspond à l'assemblage de six octaèdres $\{MO_6\}$ connectés entre eux par le partage d'arêtes autour d'un hétéroatome en environnement octaédrique $\{XO_6\}$. Les structures de type Keggin et Dawson comportent respectivement un et deux hétéroatomes en environnement tétraédrique $\{XO_4\}$.

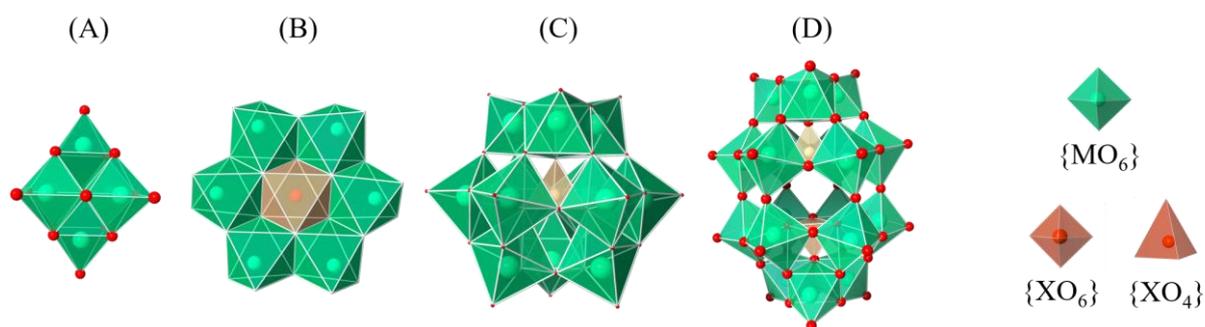


Figure 2: Représentation polyédrique des structures de POMs les plus communes : (A) Lindqvist $[M_6O_{19}]^{n-}$, (B) Anderson $[XM_6O_{24}]^{n-}$, (C) Keggin $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$, (D) Dawson $[X_2M_{18}O_{62}]^{n-}$

1.2.2 La fonctionnalisation des polyoxométallates

Les composés hybrides organique-inorganiques, qui peuvent combiner les propriétés de fragments organiques et inorganiques (effet d'addition ou de synergie) ou même posséder de nouvelles propriétés, ont été largement développés ces dernières années. Ainsi, les POMs étant des entités purement inorganiques, il peut être intéressant de leur associer un ou des fragment(s) organique(s) fonctionnels.

Les POMs hybrides sont classés en deux catégories selon la nature de l'interaction entre la partie inorganique et la partie organique.⁸ La classe I regroupe les POMs dans lesquels les interactions sont faibles : interactions électrostatiques, liaisons hydrogène et forces de van der Waals. La classe II englobe elle les POMs pour lesquels les interactions entre les deux composantes sont fortes : liaisons covalentes et iono-covalentes. La formation de POMs hybrides par des liaisons fortes nécessite un point d'ancrage. Ce dernier va dépendre de la nature chimique et des propriétés électroniques du fragment inorganique. La méthode de fonctionnalisation la plus répandue consiste à lier un atome d'oxygène périphérique du POM avec un fragment incorporant un élément du bloc p (phosphonate, alkoxyde, siloxane ou

carboxylate par exemple).⁸ Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des POMs par des bisphosphonates (BPs). Les bisphosphonates sont connus depuis le 19^{ème} siècle, la première synthèse a été effectuée en 1865 par N. Menschutkin.⁹ Ce sont des analogues stables des pyrophosphates pour lesquels la liaison P-O-P est remplacée par une liaison P-C-P. Cette liaison est en effet beaucoup plus stable à l'hydrolyse enzymatique. Les BPs sont divisés en deux grandes familles : les BPs qui ne contiennent pas de groupement azoté et les BPs azotés (Figure 3). De façon notable, les deux groupements R₁ et R₂ liés à l'atome de carbone central peuvent jouer deux rôles distincts. Par exemple, le cœur P-C-P et la chaîne R₁ peuvent chélater le calcium, en particulier lorsque R₁ représente une fonction hydroxyle, conférant alors aux BPs une forte affinité pour le minéral osseux, tandis que le groupement R₂ peut être responsable de l'activité inhibitrice des BPs sur les ostéoclastes (voir ci-dessous).¹⁰ Ceci met en évidence la potentialité comme agents biologiquement actifs de ces systèmes. Ce n'est cependant qu'à partir des années 1960 que leurs propriétés ont vraiment été explorées par l'industrie pharmaceutique.¹¹

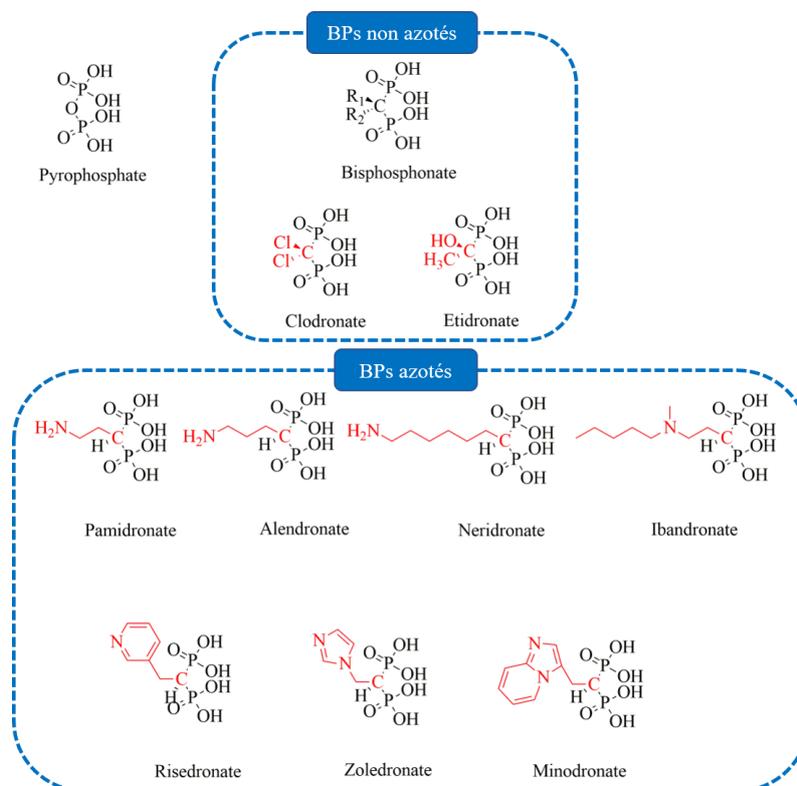


Figure 3: Représentation des ligands bisphosphonates simples et azotés

De nos jours, les bisphosphonates sont commercialisés comme médicament pour lutter contre l'ostéoporose, la maladie de Paget et l'hypercalcémie maligne : le Fosamax® (Alendronate en mélange avec de la vitamine D₃), l'Actonel® (Risedronate en combinaison avec du calcium et de la vitamine D₃) et l'Aclasta® (Zoledronate) en sont des exemples. De plus, de nombreuses études ont démontré leur efficacité comme agents anticancéreux et antibactériens.¹²⁻¹⁴ Par conséquent, la fonctionnalisation de POMs possédants des propriétés intrinsèques par des bisphosphonates peut s'avérer être une stratégie prometteuse pour conduire à de nouvelles entités possédant des propriétés anticancéreuses ou antibactériennes exaltées. Au cours de ces travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux bisphosphonates, l'Alendronate (Ale) et le Zoledronate (Zol).

Le premier hétéropolyanion fonctionnalisé par un ligand monophosphonate a été décrit par Pope et *al.* en 1975.¹⁵ Ce POM a pour formule générale $[(RP)_2Mo_5O_{21}]^{4-}$, avec R= H, Me, Et, Ph, C₂H₄NH₃⁺ ou p-CH₂C₆H₄NH₃⁺. Sa structure est constituée d'un assemblage polyanionique pentanucléaire incorporant des centres Mo^{VI} ainsi que deux ligands monophosphonates. Depuis, d'autres composés de ce type ont été mis en évidence. Des POMs contenant des ions Mo(VI) et W(VI) et des ligands bisphosphonates (acide médronique et étidronique) ont été synthétisés pour la première fois par Pope et Kortz^{16,17} ainsi que Sergienko.¹⁸ On peut noter en particulier deux familles de POMs hexa et dodécanucléaires, respectivement.^{15,19}

L'équipe MIM de l'Institut Lavoisier de Versailles a acquis de longue date une expertise dans la synthèse de polyoxométallates fonctionnalisés par des ligands BPs.²⁰⁻²² Il est important de noter que les BPs en plus d'être des médicaments utilisés pour traiter des maladies osseuses telles que l'ostéoporose sont connus pour leurs propriétés antitumorales directes ou indirectes contre une grande variété de cellules tumorales^{23,24} et ont également montré des bonnes propriétés antibactériennes.²⁵ L'équipe MIM a par exemple développé une famille de polyoxomolybdates de formule générale $\{Mo_4(BP)_2M\}$, incorporant un métal de transition M (M = Mn^{II}, Mn^{III} ou Fe^{III}), fonctionnalisés par de l'alendronate (Ale), du zoledronate (Zol) ou un n-alkyl bisphosphonate (BPC₈NH₂ et BPC₉).²⁶ Leur structure est pseudo-centrosymétrique et comporte deux groupements $\{Mo^{VI}_2O_6\}$ liés au métal M central qui adopte un environnement octaédrique. Chaque unité $\{Mo_2O_6\}$ est connectée à un ligand BP via des liaisons P-O-Mo et C-O-Mo, les ligands BPs étant aussi liés à l'atome M (Figure 4). De façon notable, ces nouveaux

POMs ont montré de bonnes propriétés antitumorales (voir ci-dessous). Par ailleurs, des polyoxotungstates fonctionnalisés par des ligands BPs via des atomes de cuivre, nickel ou cobalt ont été caractérisés et leurs propriétés magnétiques et électrocatalytiques ont été étudiées.^{27,28}

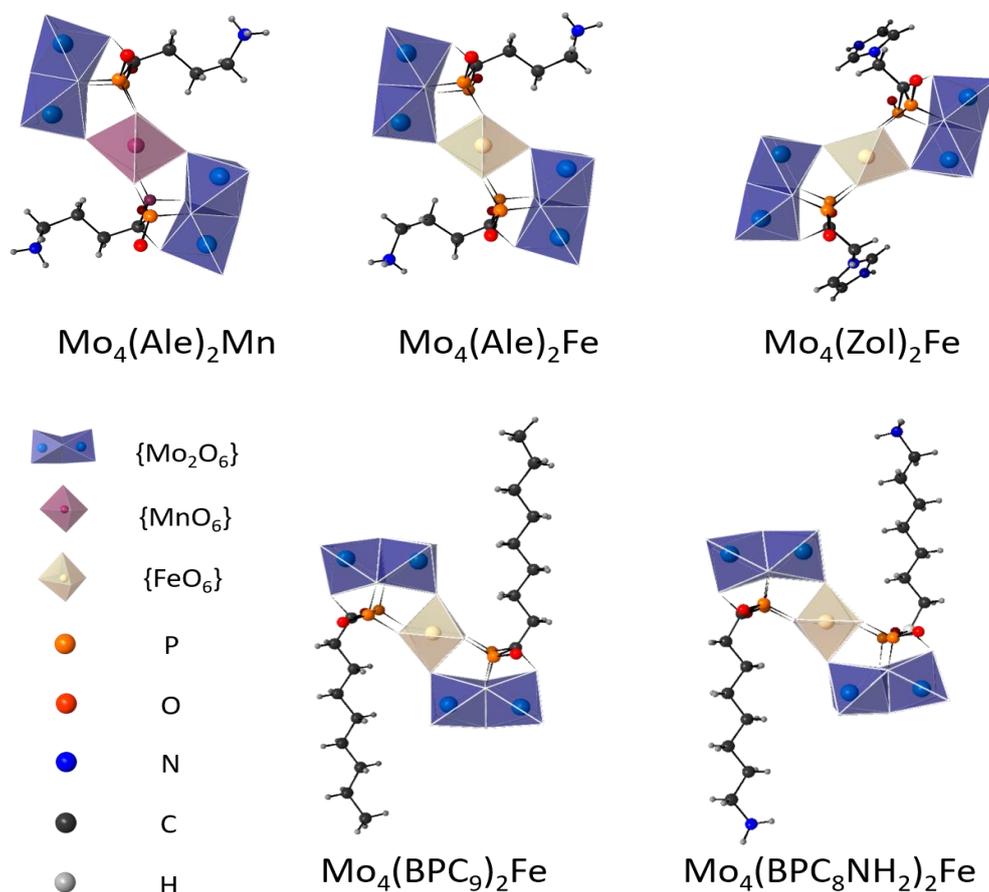


Figure 4: Représentation en polyèdres et en boules-bâtons des POMs/BPs de formule $\{\text{Mo}_4(\text{BP})_2\text{M}\}$. Reproduit selon la référence²⁶

Ainsi, de nombreux exemples d'assemblages POMs/BPs ont pu être caractérisés. Cependant, on peut remarquer que ces assemblages concernent un petit nombre de ligands BPs et que d'autres molécules comme le risedronate qui possède pourtant des propriétés biologiques particulièrement intéressantes ont été très peu étudiées comme ligand organique pour construire des POMs hybrides, deux exemples notables étant des polyoxomolybdates (Figure 5).^{29,30}

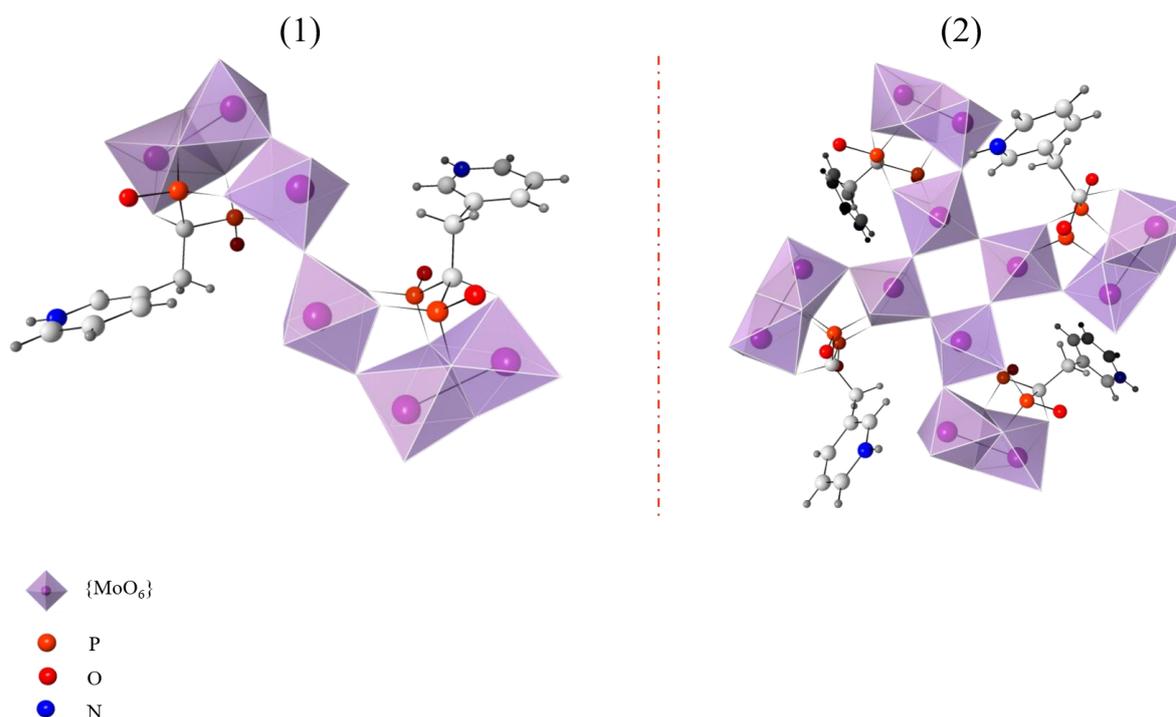


Figure 5: Représentation en polyèdres des POMs fonctionnalisés par des ligands Ris. Reproduit selon la référence²⁹

Le premier est constitué de deux sous-unités $[(\text{Mo}^{\text{VI}}_3\text{O}_8)\{\text{O}_3\text{PC}(\text{O})(\text{CH}_2\text{-3-C}_5\text{NH}_5)\text{PO}_3\}]^{2-}$ reliées par un atome d'oxygène (Figure 5 (1)). Les six ions Mo^{VI} sont situés dans le même plan. Les deux sous-unités adoptent une structure en forme de S et les ligands risédronate sont positionnés de part et d'autre du complexe, limitant l'encombrement stérique. Le second est constitué de quatre sous-unités $[(\text{Mo}_3\text{O}_8)\{\text{O}_3\text{PC}(\text{O})(\text{CH}_2\text{-3-C}_5\text{NH}_5)\text{PO}_3\}]^{2-}$ et possède une forme particulière de type "moulin à vent" (Figure 5 (2)). La même équipe a développé récemment d'autres polyoxomolybdates fonctionnalisés par du risédronate³⁰ et étudié leurs propriétés magnétiques. Cependant, il n'existe à ce jour dans la littérature aucune structure de POMs/risédronate incorporant des ions vanadium ou tungstène.

I.3 Les propriétés biologiques des POMs

Les POMs ont éveillé l'attention de la communauté scientifique en raison de leurs propriétés remarquables permettant d'envisager de les utiliser dans de nombreuses applications allant de la catalyse^{31,32} au magnétisme.^{33,34} Plus récemment, les POMs ont également été envisagés

pour des applications biomédicales, se révélant en effet être de bon agents anticancéreux et antibactériens.^{35,36} Nous allons ici développer successivement l'état de l'art sur ces deux propriétés des POMs.

1.3.1 Les propriétés anticancéreuses des POMs

a) Les POMs inorganiques

Historiquement, Mukherjee a été le premier à étudier les propriétés anticancéreuses *in vivo* des POMs en 1965.³⁷ Un mélange de $H_3[PW_{12}O_{40}]$, de $H_3[PMo_{12}O_{40}]$ et de caféine a été testé sur des patients souffrant de cancers gastro-intestinaux. Ce mélange a eu un effet bénéfique sur plusieurs patients, avec la disparition totale de la tumeur. Quelques années plus tard, Yamase *et al.* ont synthétisé l'heptamolybdate $[NH_3Pr^i]_6[Mo^{VI}_7O_{24}]$ (PM-8) (NH_3Pr^i = isopropyl ammonium) et ont mis en évidence ses propriétés inhibitrices sur la croissance tumorale.³⁸ En 1991, Fujita *et al.* ont étudié les propriétés anticancéreuses de plusieurs POMs dont le PM-8 et le PM-17, de formule $[H_2Mo^V_{12}O_{28}(OH)_{12}(Mo^{VI}O_3)_4]^{6-}$.³⁹ Le PM-17 s'est avéré être plus actif que la forme oxydée PM-8.⁴⁰ Partant de ce constat, Yamase a proposé un mécanisme où le PM-8 est réduit en PM-17 par la FMN (Flavine mononucléotide), qui est un transporteur d'électrons impliqué dans la chaîne respiratoire des cellules eucaryotes. Ensuite, le PM-17 est réoxydé.⁴¹ Plus récemment, Liu *et al.* ont testé les propriétés anticancéreuses d'une vingtaine de POMs vis-à-vis des cellules KB (dérivée HeLa de carcinome oral humain). Ils ont mis en évidence une corrélation entre la structure des POMs et l'activité biologique observée. L'activité anticancéreuse a été déterminée par la mesure de l' IC_{50} ou concentration inhibitrice médiane. L' IC_{50} est la concentration nécessaire pour inhiber de moitié un processus biologique. Plus cette concentration est faible et plus le composé est efficace. Les deux POMs les plus actifs sont le polyoxovanadate (POV) $K_7[V^V_{13}O_{38}]$ (IC_{50} = 0.29 - 0.36 mg/L) et l'heptamolybdate PM-8 (IC_{50} = 0.40 mg/L). Les POMs les moins actifs sont les POMs de type Keggin au Mo et au W (IC_{50} = 1.9 - 43.5 mg/L) et de type Dawson au Mo (IC_{50} = 34.5 - 52.3 mg/L).⁴²

Finalement, Yamase a mis en évidence que les propriétés anticancéreuses découlaient du pouvoir oxydant du POM. Ainsi, il a proposé un classement des POMs les plus actifs biologiquement aux moins actifs : POVs > POMos >> POTs.⁴³

Même s'il a été montré que les POMs inorganiques étaient actifs contre les cellules cancéreuses, plusieurs limitations existent cependant quant à leur étude en phase clinique. Notamment, leur instabilité dans les milieux physiologiques, leur faible pénétration dans les cellules, leur toxicité et leur faible sélectivité constituent des limitations importantes. Pour contourner ces limitations, il a été proposé de modifier chimiquement les POMs principalement par greffage de molécules organiques ou via leur encapsulation. L'encapsulation des POMs étant très éloignée du sujet de cette thèse, nous nous concentrerons sur la description des POMs fonctionnalisés contre le cancer.

b) Les POMs hybrides

La modification des POMs avec des ligands organiques peut changer leur surface, leur charge, leur polarité et leurs propriétés redox. Ces nouveaux POMs hybrides sont souvent beaucoup plus stables en milieu physiologique, sont moins toxiques que les POMs inorganiques et ont souvent une meilleure pénétration dans les cellules. Pour améliorer les propriétés antitumorales des POMs, ceux-ci ont été fonctionnalisés avec de nombreuses molécules organiques allant des composés organométalliques, médicaments, biomolécules ou molécules organiques azotées.³⁶

Les assemblages POM-médicaments montrent que l'association d'un POM avec un médicament permet d'augmenter son efficacité biologique et d'améliorer sa sélectivité. Par exemple, le 5-Fluorouracile (5-FU), un médicament administré dans le traitement des cancers de l'appareil digestif et de l'appareil reproducteur féminin a permis d'obtenir des assemblages avec des POMs de type Keggin ($[PW_{12}O_{40}]^{3-}$, $[SiW_{12}O_{40}]^{4-}$ et $[BW_{12}O_{40}]^{5-}$). Ces assemblages ont été testés sur des lignées cellulaires HeLa (cellules métastatiques du cancer de l'utérus d'Henrietta Lacks), Hep-G2 et SMMC-7721 (cellules métastatiques du cancer du foie) et ont montré une meilleure activité anticancéreuse et une toxicité plus faible que le médicament seul.⁴⁴⁻⁴⁶ Comme cela a été mentionné précédemment, les POMs peuvent être fonctionnalisés directement par des ligands BPs qui présentent de bonnes propriétés contre les cellules

tumorales. Les propriétés anticancéreuses de différents complexes POM/BPs obtenus au sein du groupe MIM ont été étudiées. Ces études ont montré que de nombreux paramètres peuvent impacter leurs propriétés biologiques, comme le degré d'oxydation des métaux, la structure du complexe, la nature du métal, la nature du bisphosphonate et l'ajout d'un hétéroélément. Les complexes POMs-bisphosphonates synthétisés ont été testés sur des lignées cellulaires relatives à différents cancers. Les POMs à base de vanadium se sont révélés les plus actifs mais également les plus toxiques quelle que soit la lignée étudiée. Cependant, les POMs à base de Mo ou de W ont de bonnes propriétés anticancéreuses lorsqu'ils sont fonctionnalisés par des ligands BPs. Notamment, il a été montré que l'assemblage POMo/zoledronate de formule $[(\text{Mo}^{\text{VI}}_3\text{O}_8)_2\text{O}(\text{Zol})_2]^{6-}$ ($\{\text{Mo}_6(\text{Zol})_2\}$) était particulièrement actif.^{22,26,47} Ceci se comprend aisément considérant que le zoledronate est l'un des bisphosphonates les plus actifs sur les cellules cancéreuses.²³ De plus l'incorporation d'un métal comme le manganèse dans un POM zoledronate a amélioré l'effet anticancéreux comparé au POM zoledronate seul. Ainsi, l'étude in vivo sur des souris du POM $[(\text{Mo}^{\text{VI}}_2\text{O}_6)_2(\text{Zol})_2\text{Mn}^{\text{III}}]^{5-}$ ($\{\text{Mo}_4\text{Zol}_2\text{Mn}^{\text{III}}\}$), a conduit à une diminution du volume de la tumeur de 85% par rapport au contrôle au bout de 4 semaines de traitement.⁴⁷

Plus récemment, des travaux ont montré que des composites avec des POMs pouvaient être utilisés pour la thérapie anticancéreuse, et en particulier pour la photothermie.^{48,49} Ces travaux ne seront pas détaillés plus dans ce chapitre.

c) Mécanismes proposés pour l'activité des polyoxométallates contre les cellules cancéreuses

Concernant les mécanismes impliqués, nous avons déjà vu que dans le cadre de l'étude du POM $[\text{NH}_3\text{Pr}^{\text{I}}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$, Yamase avait proposé que l'espèce active était une espèce réduite. Il a ainsi été montré que des polyoxométallates pouvaient activer la mort cellulaire. Par exemple, le composé $\text{Na}_7[\text{Cr}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{W}_{11}\text{O}_{39}]$ régule l'activation du cytochrome c et de la protéine kinase p38, qui sont impliqués dans l'apoptose (mort cellulaire programmée) et l'autophagie (dégradation des organites abîmés conduisant à la mort cellulaire).⁵⁰ Les POMs peuvent aussi interagir avec l'ADN et provoquer la mort des cellules tumorales.⁵¹ Un autre mécanisme connu des POMs est l'interaction de ce dernier avec des protéines. Des POMs de type Wells-Dawson inhibent la protéine kinase CK2, qui est impliquée dans la régulation de l'apoptose.⁵² Il a par

ailleurs été montré que les POM/BPs inhibent la prénylation (ajout d'un fragment C₁₅ ou C₂₀ à l'extrémité c-terminal de certaines protéines) des protéines de type GTPases (par exemple les protéines Ras).²⁶ Plus particulièrement, le zoledronate est connu pour inhiber une enzyme, la farnésyl-diphosphate, impliquée dans la synthèse des terpénoïdes, ces derniers étant essentiels à la prénylation.⁵³ En conclusion, les mécanismes d'action proposés pour expliquer l'activité anticancéreuse des POMs sont variés représentés Figure 6.

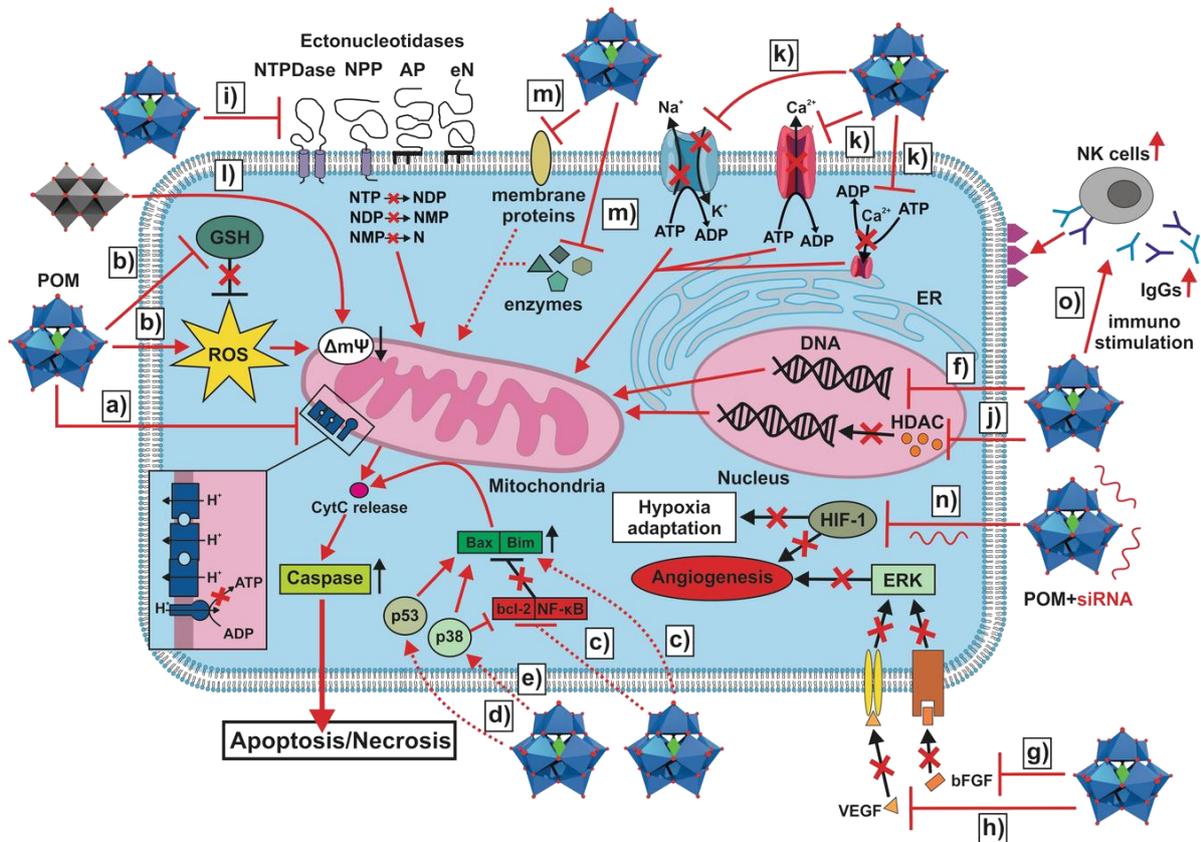


Figure 6: Schéma représentant les mécanismes d'action supposés des POMs anticancéreux. Reproduit selon la référence³⁶. a) Inhibition de la synthèse d'ATP par les POMs. b) Les POMs induisent une augmentation du niveau de ROS et une déplétion du réservoir de GSH. c) Les POMs induisent une amélioration de l'expression des composants pro-apoptotiques et la réduction de l'expression des composants anti-apoptotiques. d) et e) Activation des voies p38 et/ou p53 par les POMs. f) Induction de l'apoptose. g) et h) Inhibition de l'angiogenèse via des interactions avec bFGF et VEGF conduisant à la perturbation des interactions avec les récepteurs bFGF/VEGF. i) Inhibition des ectonucléotidases par les POMs conduisant à un changement des concentrations en nucléotides affectant le fonctionnement des cellules cancéreuses. j) Inhibition des HDAC par les POMs conduisant à l'accumulation d'histones acétylées causant des changements dans l'expression des gènes. k) Inhibition des ATP-ases de type P causant des effets négatifs sur l'homéostasie des ions cellulaires. l) Dépolarisation de la membrane des mitochondries induites par le décavanadate. m) Inhibition d'autres protéines affectant la viabilité cellulaire. n) Des POMs hybrides siARN régulent la diminution de HIF-1 conduisant à une altération de l'angiogenèse et à l'adaptation des cellules cancéreuses à un environnement hypoxique. o) Activité immunostimulante des POMs en favorisant l'expression d'anticorps et de composants immunitaires.

Nous allons à présent nous intéresser aux propriétés antibactériennes de ces oxydes moléculaires.

1.3.2 Les propriétés antibactériennes des POMs

a) Les POMs inorganiques

Les premières études faites par le groupe de Tajima en 1993 démontraient que les POMs possédaient des propriétés antibactériennes.^{54,55} Une des méthodes qui permet d'évaluer l'activité antibactérienne des POMs est la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI). La CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture bactérienne visible à l'œil nu. L'activité antibactérienne d'un POM va dépendre de sa structure, de sa nature et de sa charge mais également de la souche testée. Fukuda et Yamase ont par exemple montré que la nature du métal qui compose le POM jouait un rôle clé dans les propriétés antibactériennes. Ils ont mis en évidence que les POVs étaient plus actifs que les POMs et les POTs contre *Streptococcus pneumoniae*. Par la suite, une équipe s'est intéressée aux interactions entre les POVs et les molécules biologiques. Aureliano *et al.* ont ainsi étudié les interactions entre le décavanadate $[V_{10}O_{28}]^{6-}$, des macromolécules biologiques et des pompes ioniques. Le décavanadate $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ agit sur les pompes ATPases de type P. Ce sont des pompes ioniques et lipidiques que l'on retrouve principalement dans les bactéries et qui participent au maintien du potentiel électrochimique de la membrane en transportant des ions par hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate). L'action du POV $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ sur les ATPases entraîne une transformation des pompes ioniques en canaux, ce qui compromet le transport des ions et entraîne la mort cellulaire.^{56,57} De plus, il a aussi été montré que le décavanadate pouvait agir sur une protéine Mreb homologue à l'actine et qui possède un rôle important dans le contrôle de la forme de la bactérie. D'autres études

démontrent le caractère antibactérien intrinsèque des POMs. Par exemple Yamase a testé une dizaine de POMs sur *Helicobacter pylori*.⁵⁸ Parmi les POMs testés, ce sont les POTs fortement chargés et les polyoxovanadotungstates qui sont les plus actifs (CMI < 100 µg.ml⁻¹). Toutes ces études mettent en évidence le caractère antibactérien intrinsèque des POMs.

b) Les POMs hybrides

La fonctionnalisation de POMs par des fragments organiques est une stratégie pertinente pour exalter les propriétés antibactériennes. Comme pour les POMs hybrides antitumoraux, la fonctionnalisation apporte de la stabilité en milieu physiologique, diminue la toxicité et améliore la pénétration dans les cellules. Afin d'améliorer les propriétés antibactériennes, les POMs peuvent être fonctionnalisés avec des composés organométalliques, des antibactériens de synthèse, des polymères ou des nanoparticules métalliques.³⁵

1) Etudes de mélanges POMs/antibiotiques

Comme cela a été énoncé précédemment, les POMs peuvent avoir des propriétés antibactériennes intrinsèques. Partant de ce constat, plusieurs équipes se sont intéressées aux mélanges POMs/antibiotiques. Par exemple, Tajima a mis en évidence qu'un mélange de bêta-lactamine et du POM lacunaire de type Keggin [PW₁₁O₃₉]⁷⁻ avait un effet antibactérien synergique sur plusieurs souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM), *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus auricularis*).⁵⁹ Après ces premiers résultats, le même groupe a étudié les effets antibactériens d'une centaine de POMs. Cette nouvelle étude a révélé que, d'une manière plus générale, les POMs de type Wells-Dawson et Keggin associés à des antibiotiques bêta-lactamine ont des effets synergiques sur les bactéries de type SARM. De plus, ils ont observé une différence d'activité en fonction de la nature du métal, les POTs s'avérant être plus efficaces en combinaison avec un antibiotique bêta-lactamine que les POMs et les POVs.^{60,61}

Plus tard, Yamase et *al.* ont élucidé le mécanisme d'action des POTs contre les bactéries SARM.⁶² Les POTs affectent la transcription des enzymes PBP2a. En effet, les bactéries possèdent au sein de leur membrane des protéines spécifiques : les PBP (Penicillin-Binding-proteins). Ces PBP sont essentielles à la formation du peptidoglycane (élément majoritaire de la membrane plasmique) et forment un site d'affinité à la pénicilline. Lorsque la pénicilline se

fixe sur son site d'affinité cela perturbe la synthèse du peptidoglycane, provoquant la mort de la bactérie. Cependant lorsque les bactéries sont résistantes, comme les bactéries SARM, elles possèdent un gène spécifique : le gène *mecA*, qui code pour une enzyme PBP2a (Penicillin-Binding-Proteins 2a). Cette enzyme a une faible affinité pour les bêta-lactamine, ce qui permet le maintien de l'intégrité membranaire. Lorsque les POTs affectent la transcription de PBP2a, cela a pour conséquence l'inhibition du mécanisme de résistance des SARM et entraîne la mort des bactéries. Les POTs sont aussi connus pour réduire la production de la bêta-lactamase. Les antibiotiques de type bêta-lactamine possèdent un noyau lactame. L'enzyme bêta-lactamase hydrolyse le noyau lactame et inhibe l'action de l'antibiotique.

Les mécanismes antibactériens des POMs n'ont cependant pas été totalement élucidés. Ils vont dépendre notamment de la structure du POM, de sa charge, de son potentiel redox ou de sa stabilité dans les conditions physiologiques. Les fonctionnaliser avec des molécules organiques peut permettre d'améliorer leur stabilité, leur pénétration cellulaire mais aussi leur efficacité.

2) Les nanocomposites à base de POMs

Plusieurs travaux montrent que les nanocomposites à base de POMs possèdent une très bonne activité antibactérienne.³⁵ C'est le cas par exemple des POMs associés avec du chitosan⁶³⁻⁶⁵ ou des peptides.⁶⁶⁻⁶⁸ Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous allons décrire plus particulièrement les nanocomposites associant des POMs et des nanoparticules métalliques. Le groupe de Daima a par exemple synthétisé des nanoparticules d'or (AuNPs) à partir de la tyrosine (acide aminé) et les a post-fonctionnalisés avec des POMs et de la lysine (acide aminé).⁶⁹ Ils ont montré l'importance de la nature du stabilisant sur les propriétés antibactériennes. Les assemblages AuNPs-Tyrosine-POM-Lysine présentent la meilleure activité antibactérienne (Figure 7).

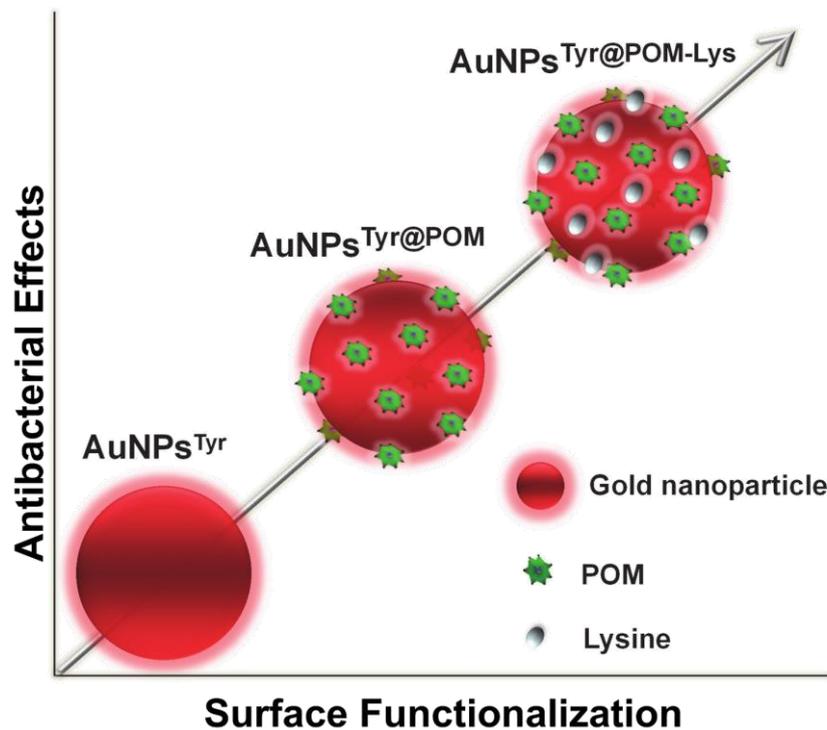


Figure 7: Schéma représentant l'augmentation de l'activité antimicrobienne des AuNPs après leur fonctionnalisation séquentielle avec les POMs et la lysine. Reproduit selon la référence⁶⁹

La même stratégie a été utilisée pour former des nanoparticules d'argent (AgNPs) à partir de tyrosine avant de les fonctionnaliser par des POMs.⁷⁰ Ces dernières possèdent d'excellentes propriétés antibactériennes. Plus récemment, le même groupe a mis au point la synthèse des AgNPs à partir de l'isoniazide (antibiotique) fonctionnalisées avec des POMs aux propriétés antimicrobiennes exaltées.⁷¹

c) Les mécanismes proposés pour l'activité antibactérienne des POMs

Les mécanismes d'action des POMs antibactériens sont encore mal connus. Cependant, il a été montré que l'activité antibactérienne des POMs dépendait de plusieurs facteurs comme la nature du métal composant le POM, la charge et la taille du POM.³⁵ La Figure 8 récapitule les mécanismes antibactériens supposés des POMs.

Ces mécanismes ne seront pas détaillés ici. Cependant, il faut souligner que les mécanismes d'action proposés suggèrent que les POMs agissent essentiellement sur les protéines et les

enzymes associées à la membrane et impliquées dans la respiration cellulaire. Par exemple, les POMs inhibent la production de β -lactamase (enzyme responsable de la résistance bactérienne aux antibiotiques β -lactamine).⁶² Quant aux nanocomposites POM-Chitosan et POM-AgNPs, ils déstabilisent l'intégrité de la membrane bactérienne et permettent ainsi l'interaction des POMs avec les constituants du cytoplasme. Il est important de préciser que l'argent⁷² et le chitosan⁷³ possèdent eux aussi des propriétés antimicrobiennes intrinsèques.

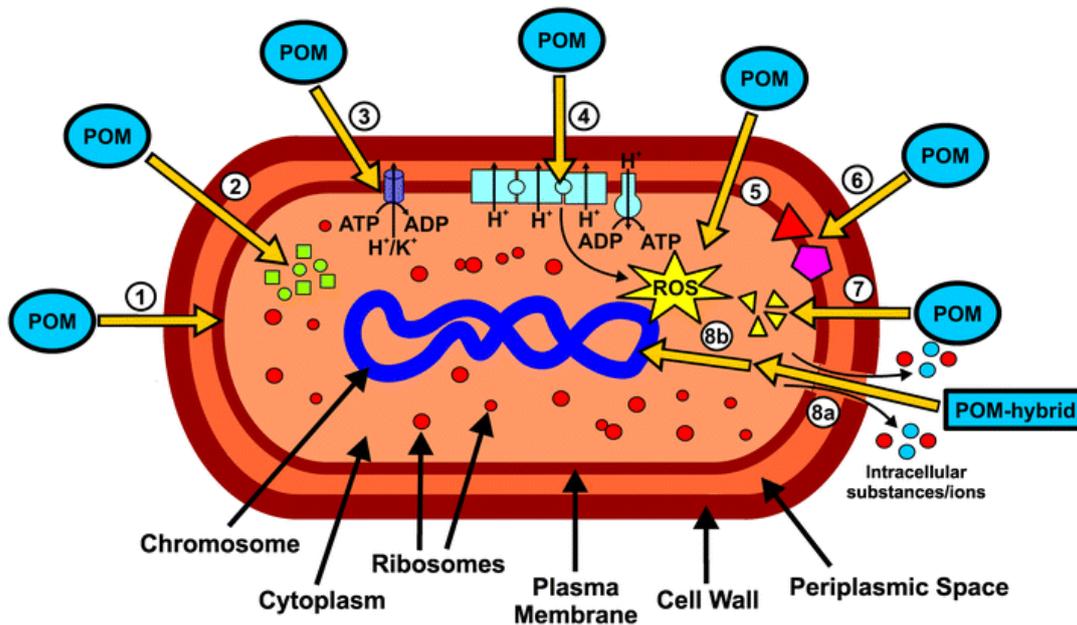


Figure 8: Schéma représentant les mécanismes d'action supposés des POMs antibactériens. Reproduit selon la référence³⁵. 1) Les POMs sont absorbés dans la membrane interne mais pas dans le cytoplasme. 2) Les POMs inhibent la production des PBP2a et des β -lactamases. 3) Les POMs et plus particulièrement le décavanadate ciblent les ATPases de type P. 4) Détérioration de la chaîne de transport des électrons des bactéries (respiration). 5) Augmentation du niveau des ROS par les POMs via des oxydations. 6) Les POMs peuvent réagir avec des protéines et des enzymes membranaires. 7) Les POMs interagissent avec des éléments du cytosquelette bactérien entraînant sa destruction. 8.a) Les nanocomposites à base de POMs peuvent perturber la paroi cellulaire bactérienne entraînant une fuite des substances intracellulaires. 8.b) Lors de la perturbation de la paroi cellulaire, les POMs peuvent interagir avec des éléments cytoplasmiques ou des protéines sensibles aux anions.

II. Les nanoparticules d'or : de la synthèse aux applications

II.1 Introduction générale

L'or a toujours fasciné l'humanité. Par son aspect jaune et brillant et sa rareté, il a toujours fait l'objet de convoitise. L'Histoire est marquée par sa présence de l'Antiquité jusqu'à nos jours. La synthèse de solutions colloïdales de métaux nobles est connue depuis l'antiquité romaine. On les utilisait par exemple pour colorer les verres et les vitraux. L'une des pièces les plus connues est la coupe de Lycurgus datant du IV^e siècle après JC (Figure 9.A et B). On sait aujourd'hui que le verre qui la compose contient des nanoparticules d'or et d'argent, ce qui lui confère la caractéristique particulière d'être verte quand elle est éclairée en réflexion et d'être rouge quand elle est éclairée en transmission. De plus l'or a joué un rôle important dans les civilisations anciennes. Symbole de puissance et de richesse, il était utilisé dans la joaillerie, l'ornementation d'édifices et d'armures ainsi que la création d'objets de culte.

Ce n'est pourtant qu'en 1856 que les premières nanoparticules d'or sont accidentellement synthétisées par Michael Faraday. En effet, ce dernier étudiait l'impact de la lumière sur des films d'or. Et lorsqu'il a voulu nettoyer ses films d'or, un liquide de couleur rubis a été observé. À partir de ce constat, Michael Faraday a procédé en 1857 à la synthèse de nanoparticules d'or en utilisant un composé phosphoré. Ces nanoparticules d'or sont exposées au Royal Institute of Great Britain (Figure 9.C).

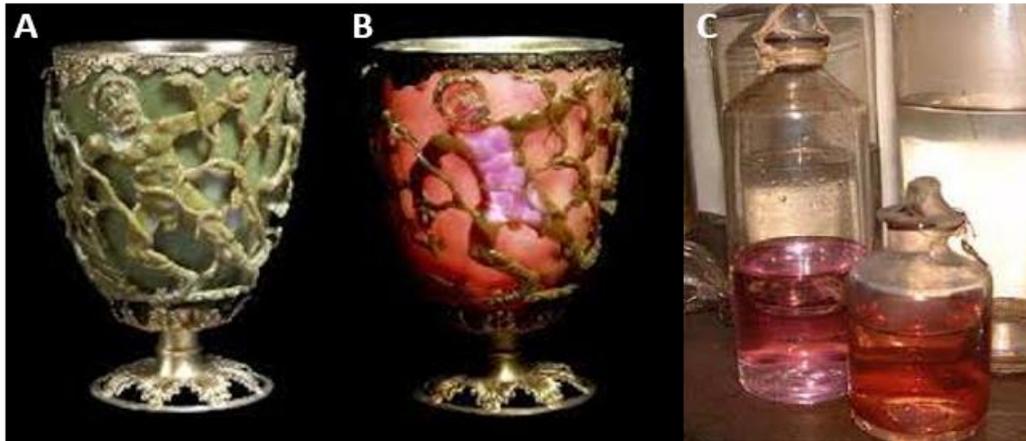


Figure 9: A) Coupe de Lycurgus éclairée en réflexion et B) en transmission, C) Nanoparticules d'or de Michael Faraday exposées au Royal Institut of Great Britain.

Actuellement, elles ont une place importante dans notre quotidien. Nous les retrouvons dans des cosmétiques,⁷⁴ des peintures,⁷⁵ dans l'industrie alimentaire humaine et animale⁷⁶ ainsi que dans le domaine biomédical.⁷⁷

II.2 Les propriétés optiques des AuNPs

Les nanoparticules d'or présentent des propriétés remarquables dues à leur taille et à leur forme, conduisant à leur utilisation dans diverses industries allant de l'électronique au biomédical. Une des propriétés les plus remarquables de ces particules est la résonance de plasmon de surface localisée. En effet, l'or étant un métal conducteur, les électrons sont libres de mouvement au sein des particules mais ils y sont confinés. Ce confinement donne lieu à des propriétés optiques qu'on ne retrouve pas dans le cas des métaux massifs.

II.2.1 Résonance de plasmon de surface localisée (LSPR)

Le terme « plasmon de surface » a été introduit pour la première fois par R. Ritchie en 1957 pour les interfaces métalliques. La résonance d'un plasmon de surface résulte de l'oscillation collective des électrons d'un métal excité par une onde électromagnétique (onde lumineuse). Ces oscillations peuvent créer des plasmons à l'interface entre un métal et un isolant. On parle alors de plasmon propagatif, ou SPP (Surface Plasmon Polariton). Dans le cas des

nanoparticules, le plasmon est différent ; on parle alors de LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance) (Figure 10).

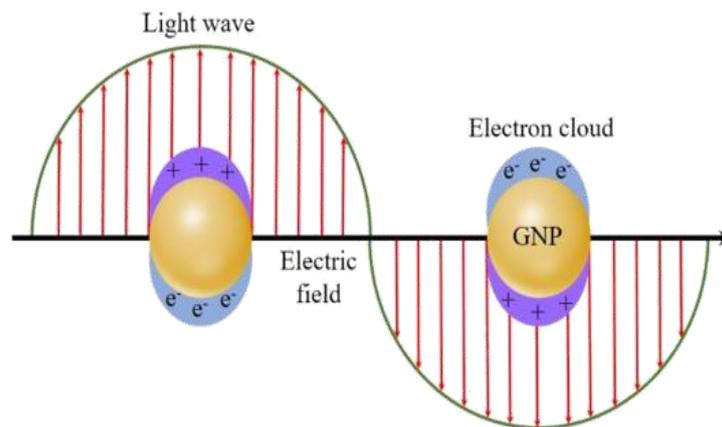


Figure 10 : Formation de la bande LSPR. Reproduit selon la référence¹⁸¹

Pour les AuNPs, les résonances se situent généralement dans le domaine du visible et se traduisent par une forte absorption dans ce domaine, ceci explique donc la coloration des suspensions colloïdales d'or. La bande LSPR dépend de la taille et de la forme des nanoparticules, du milieu environnant et des interactions entre les particules. Elle est donc modulable. Plusieurs méthodes existent pour moduler la bande LSPR.

II.2.2 Facteurs influençant la bande LSPR

Comme précisé précédemment, plusieurs facteurs influencent la position de la bande LSPR : la taille, la forme des AuNPs mais également le milieu dans lequel elles sont et leur état d'agrégation, ces deux derniers facteurs ne seront pas développés ici.

La taille des nanoparticules d'or va fortement influencer la localisation de la bande LSPR sur le spectre d'absorption. Les nanoparticules de moins de 2 nm ne présentent pas de bande plasmon. Pour les particules de diamètre supérieur à 2 nm, plus le diamètre des nanoparticules est grand, plus la bande LSPR est déplacée vers le proche infrarouge. Ce déplacement de la bande est accompagné d'une augmentation de sa largeur à mi-hauteur.⁷⁸

Cependant la largeur à mi-hauteur de la bande plasmon peut également être un bon

indicateur de la dispersion en taille des NPs constituant la solution colloïdale. Plus la largeur à mi-hauteur est fine et plus la dispersion des nanoparticules est étroite.⁷⁹ Il est ainsi possible de synthétiser des AuNPs possédant des propriétés optiques adaptées à une application donnée. Ceci est particulièrement important pour des applications pour le domaine biomédical, la fabrication de biocapteur⁸⁰ ou la photothermie.⁸¹ Le contrôle de la forme des nanoparticules d'or (Figure 11) permet aussi de moduler la position de la bande LSPR.^{82,83}

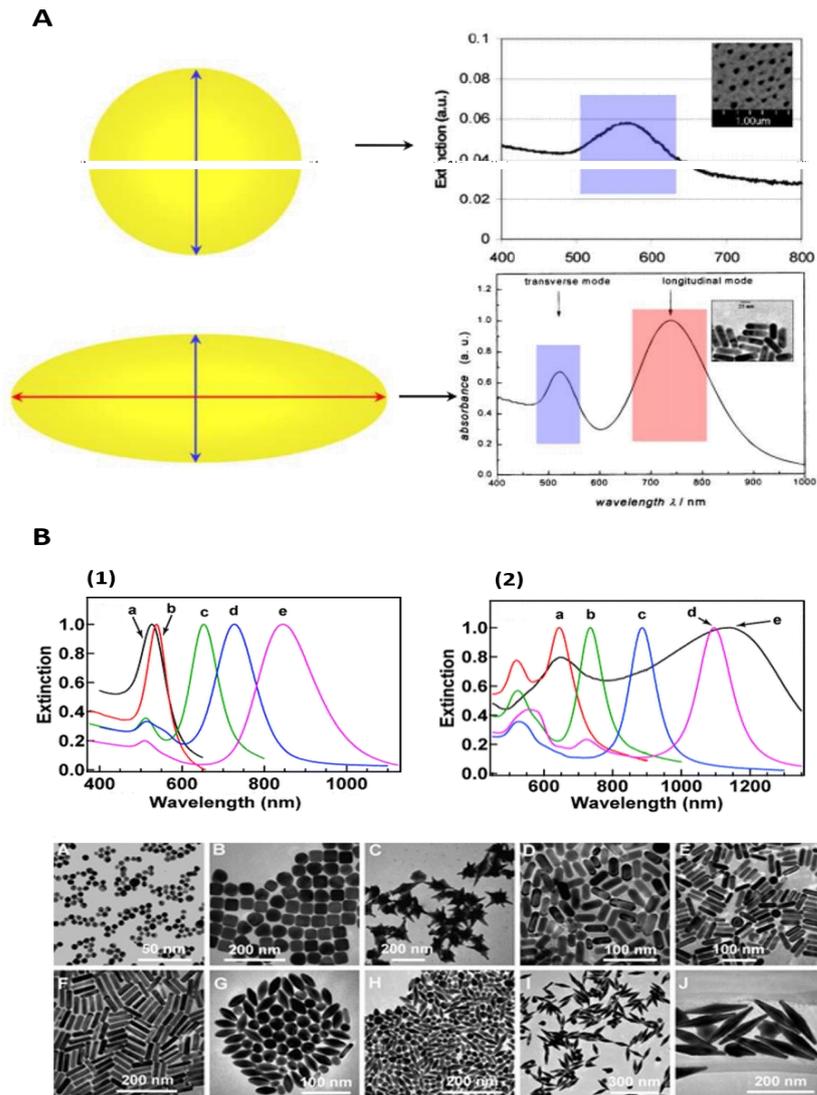


Figure 11: A- Modes transversal et longitudinal des nanoparticules d'or. B-Spectres UV-visible normalisés des AuNPs de différentes formes et tailles. (1) Les spectres a-e correspondent à des nanosphères, des nanocubes et des nanobâtonnets d'or avec un rapport de forme de 2.4 ± 0.3 , 3.4 ± 0.5 et 4.6 ± 0.8 respectivement. (2) Les spectres a-e correspondent à des nanobipyramides avec un rapport de forme de 1.5 ± 0.3 , 2.7 ± 0.2 , 3.9 ± 0.2 , et 4.7 ± 0.2 et des nanobranches d'or respectivement. Images TEM représentant différentes formes de AuNPs. Reproduit selon les références^{83, 182}

Dans le cas par exemple de AuNPs de forme ellipsoïdale, la résonance se dédouble et la bande LSPR possède deux bandes d'absorption. Ces deux bandes correspondent aux fréquences d'oscillation du mode transverse et du mode longitudinal.

Il est possible d'obtenir des AuNPs de tailles, morphologies différentes et ainsi de moduler leurs surfaces spécifiques et leurs propriétés optiques. Nous allons maintenant nous intéresser à leurs méthodes de synthèse.

II.3 La synthèse des nanoparticules d'or

Il existe de très nombreuses méthodes de synthèse des nanoparticules d'or. Elles peuvent être classées en deux grandes voies : la voie chimique ou bottom-up et la voie physique ou top-down comme présenté sur la Figure 12.

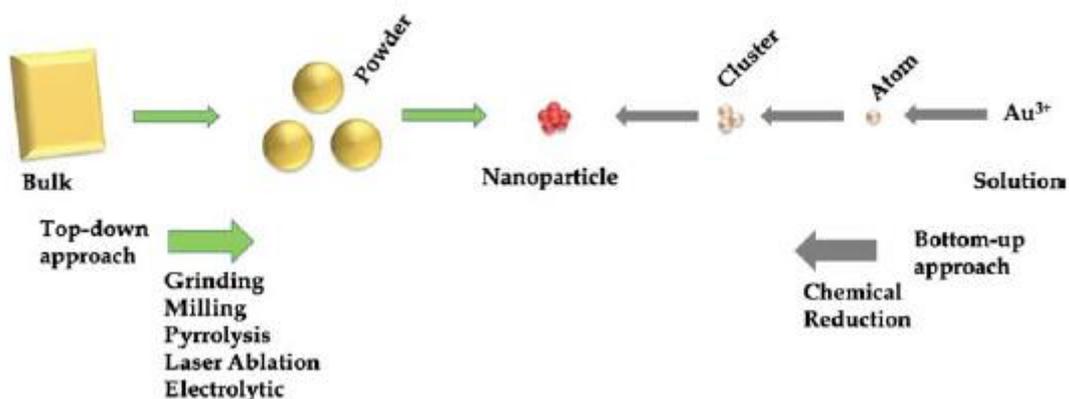


Figure 12: Approches pour l'élaboration de nanoparticules. Reproduit selon la référence⁹¹

La voie physique consiste à fragmenter (par pulvérisation ionique⁸⁴, ablation laser,⁸⁵ etc..) le bulk d'or pour générer une large gamme de nanoparticules, alors que la voie chimique consiste à élaborer des AuNPs via l'assemblage d'atomes. Il s'agit alors de réduire un précurseur d'or puis à stabiliser les nanoparticules par un agent approprié pour prévenir l'agrégation des nanoparticules. Plusieurs techniques chimiques peuvent être utilisées pour la réduction du sel d'or comme par exemple la réduction chimique, la sonochimie,⁸⁶ la photochimie⁸⁷ ou l'électrochimie.⁸⁸ Parmi ces dernières, la réduction chimique est de loin la méthode la plus utilisée.^{89,90} Elle permet un meilleur contrôle de la taille et de la morphologie

des nanoparticules. Au vu du grand nombre de voies de synthèse existantes, nous n'en décrivons ici que quelques-unes en lien direct avec les travaux de cette thèse.⁹¹

II.3.1 La synthèse de nanoparticules d'or sphériques

II.3.1.a) La méthode de Turkevich : Obtention de nanoparticules d'or sphériques

Parmi les méthodes de synthèse de nanoparticules d'or en milieu aqueux, la méthode de Turkevich est la plus connue. Développée par John Turkevich et al. en 1951,⁹² cette méthode est simple à mettre en œuvre et permet d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques de taille contrôlée en milieu aqueux. Celle-ci consiste à réduire l'acide chloraurique HAuCl_4 par des ions citrate en solution aqueuse à 100°C. Elle permet d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques dont la taille est comprise entre 12 et 20 nm et une distribution en taille assez étroite. Dans cette synthèse, le citrate joue à la fois le rôle de réducteur et d'agent de surface ou stabilisant, prévenant l'agrégation en introduisant une charge négative à la surface des particules.

En 1973, Frens a poursuivi les travaux de Turkevich sur la synthèse des AuNPs et a montré qu'en jouant sur les rapports or/citrate, il était possible de contrôler la taille des nanoparticules. Il a ainsi obtenu des nanoparticules d'or dont le diamètre varie entre 15 nm et 150 nm environ.⁹³

D'autres agents réducteurs (NaBH_4 , acide tannique etc..) ou stabilisants (thiols, polymères, tensioactifs etc..) peuvent être utilisés pour élaborer des nanoparticules sphériques.⁹⁴ Les nanoparticules d'or sont souvent utilisées comme vecteurs pour des molécules d'intérêt. Pour cela, il est cependant nécessaire de les fonctionnaliser, par des polymères,⁹⁵ des peptides,⁹⁶ des médicaments⁹⁷ ou des POMs.⁹⁸

II.3.1.b) Les nanoparticules d'or décorées de POMs

Des assemblages POM/nanoparticules d'or ont pu être obtenus par deux méthodes différentes : soit par échange de ligand à la surface des AuNPs, soit en utilisant des POMs comme agent réducteur et stabilisant.⁹⁹

Dans le premier cas consistant à échanger les ligands sur des nanoparticules déjà formées, deux approches peuvent être distinguées. Lorsque les POMs sont purement inorganiques, la charge anionique importante des POMs permet une interaction très forte via des interactions électrostatiques avec les nanoparticules d'or. Les POMs peuvent ainsi servir d'agents stabilisants¹⁰⁰⁻¹⁰² souvent meilleurs que les stabilisants organiques traditionnels.^{99,103} Une autre approche basée sur le développement de POMs hybrides organique-inorganique consiste à introduire des groupements thiols interagissant avec la surface des nanoparticules d'or.^{104,105,106}

Dans le second cas, les POMs vont avoir le rôle de réducteur du sel d'or en plus du rôle de stabilisant des nanoparticules. Les POMs réduits peuvent être obtenus par photochimie en utilisant un donneur d'électron sacrificiel comme le propan-2-ol,¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ par électrochimie,¹⁰⁹ ou en utilisant un réducteur chimique.¹¹⁰

En 2002, Troupis *et al.* ont développé les premières synthèses de nanoparticules d'or en utilisant les POMs comme réducteurs et stabilisants.¹¹¹ Leur méthode consistait à réduire dans un premier temps par photochimie le POM $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$ en présence de propan-2-ol. Ensuite, grâce à l'ajout d'ions métalliques, des nanoparticules d'or sont formées par réaction d'oxydo-réduction entre les POMs réduits et les ions métalliques. Cette stratégie a ensuite été également utilisée par Mandal *et al.* pour préparer des nanoparticules cœur coquille Au/Ag.¹¹²

Par la suite Keita *et al.* ont utilisé des POMs à valence mixte pour synthétiser dans des conditions douces (température ambiante, dans l'eau) des nanoparticules d'or.¹¹³ Cette étude a montré que la taille et la forme des nanostructures pouvaient être modulées en faisant varier le paramètre d'excès γ ($\gamma = [\text{sels métalliques}]/[\text{POM}]$). Différentes morphologies de nanoparticules d'or ont ainsi pu être obtenues en faisant varier le paramètre d'excès (Figure 13). En 2011, Bao *et al.* utilisent la même stratégie à partir du POM tungstovanadate à valence mixte en forme de roue $[\text{P}_8\text{W}_{48}\text{O}_{184}\{\text{V}^{\text{V}}_4\text{V}^{\text{V}}_2\text{O}_{12}(\text{H}_2\text{O})_2\}_2]^{32-}$ pour préparer des nanoparticules d'or dans des films de polyéthylène imine sur une surface d'ITO (oxyde d'indium-étain).¹¹⁴

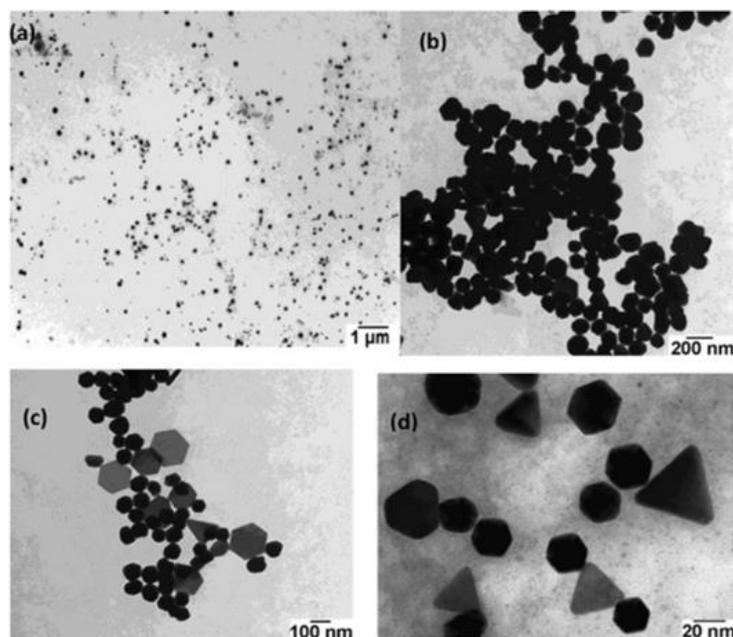


Figure 13: Images TEM des AuNPs obtenues à partir du POM à valence mixte $[H_4PMo^V_4Mo^{VI}_8O_{40}]^{3-}$ (1mM) en faisant varier le paramètre d'excès. (a) et (b) $\gamma = 1$, (c) $\gamma = 0.4$ et (d) $\gamma = 0.1$. Reproduit selon la référence¹⁸³

Plus récemment, Cronin et *al.* ont mis au point une synthèse de nanoparticules d'or décorées par des POMs à partir d'un sel d'or non conventionnel $AuNO_3(PMe)_3$ en présence de différents POMs ($[W_6O_{19}]^{2-}$, $[H_3V_{10}O_{28}]^{3-}$, $[H_4W_{12}O_{40}]^{4-}$, $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$, ...) dans l'acétonitrile par chauffage micro-ondes.¹¹⁵ Dans ce travail, les POMs ne jouent pas le rôle de réducteur du sel d'or mais leur présence est indispensable à la synthèse des nanoparticules et leur taille et leur charge impactent la taille et la façon dont les POMs recouvrent la surface des nanoparticules obtenues. Il est important de noter qu'une grande partie de ces travaux met en évidence la difficulté d'obtenir des nanoparticules monodisperses.

II.3.2 Les nanoparticules d'or anisotropes

De nombreuses propriétés (optique, électronique et catalytiques) dépendent de la forme des nanoparticules d'or. De nombreux travaux ont donc porté sur l'obtention de nanoparticules d'or de formes variables. Pour obtenir des nanoparticules anisotropes plusieurs stratégies peuvent être mises en place comme l'utilisation d'un moule qui permet de faire croître les nanoparticules avec la forme désirée, l'autoassemblage de nanostructures d'or existantes ou

l'utilisation d'agents stabilisants bloquant ou ralentissant sélectivement la croissance de certaines facettes des germes d'or. Cette dernière méthode utilise le plus souvent une approche appelée « nucléation croissance »¹¹⁶ car elle permet d'obtenir une meilleure homogénéité en forme et en taille des nanoparticules. Cette dernière est une méthode en deux étapes et consiste tout d'abord à élaborer des germes d'or. Ensuite, ces germes ou « seeds » vont être ajoutés à une solution de croissance contenant des sels d'or (HAuCl_4) et des additifs (des surfactants et des nitrates d'argent). Cette méthode a été mise au point par Jana et *al.* en 2001 afin d'obtenir des nano-bâtonnets d'or.¹¹⁷ C'est grâce à l'utilisation de surfactants, et notamment grâce au bromure de cétrimonium (CTAB), que ces synthèses de croissance médiée ont pu voir le jour. En effet, les surfactants stabilisent les nanomatériaux synthétisés et ainsi préviennent leur agrégation, grâce aux répulsions électrostatiques entre deux molécules de surfactants. Grâce à cette méthode, de nombreuses morphologies jusqu'alors inconnues ont été obtenues, avec notamment des bipyramides, des nano-bols, des tétraèdres mais surtout des nano-étoiles d'or qui peuvent également être nommées nano-oursins ou nano-fleurs.¹¹⁸ Nous développerons dans les prochains paragraphes un petit aperçu des différentes voies de synthèses de nano-étoiles.^{119,120}

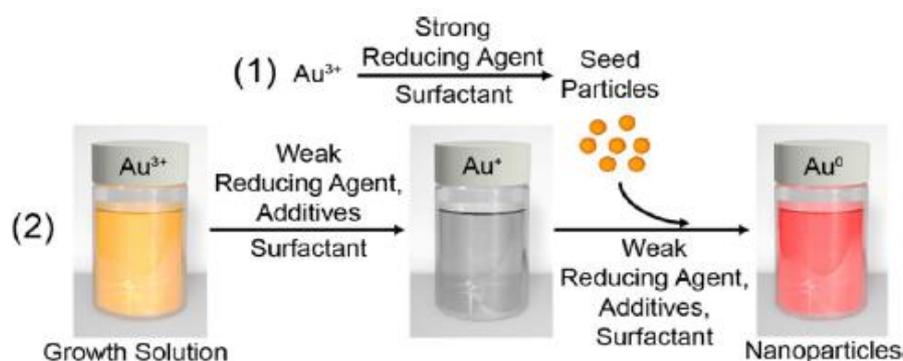


Figure 14: Stratégie de synthèse des AuNPs anisotropes par nucléation-croissance. Reproduit selon la référence¹²¹

II.2.2.a) Synthèse de nano-étoiles à partir de surfactants

La méthode la plus commune pour synthétiser des nano-étoiles (AuNSs) consiste à faire croître l'or sur des germes d'or en présence de surfactants cationiques le plus souvent le CTAB (bromure de cétrimonium).¹²²⁻¹²⁴ Ces travaux montrent que les surfactants comme le CTAB jouent un rôle primordial dans la formation des AuNSs. Ceux-ci vont s'adsorber

préférentiellement sur des facettes des germes d'or et permettre la croissance sur les facettes libres.¹²⁵ De plus de nombreux autres paramètres peuvent jouer un rôle sur le contrôle de la morphologie des nano-étoiles comme l'addition de sel d'argent,¹²⁶ la nature du réducteur¹²⁷ et du surfactant.^{119,128}

D'autres synthèses en une étape utilisant des surfactants comme le PVP et le CTAB ont également été réalisées.^{129,130}

Cependant, même si ces surfactants présentent l'avantage de permettre de contrôler la morphologie des AuNSs, leur toxicité et la difficulté de les échanger par un stabilisant moins toxique limite leur utilisation pour des applications biologiques. Il est donc nécessaire de trouver une alternative pour former des AuNSs sans utiliser de surfactants toxiques.

II.2.2.b) Synthèse sans surfactant

La première synthèse de AuNSs sans surfactant a été mise au point par le groupe de Vo-Dinh. en 2012.¹³¹ Pour cela, des germes d'or de 12 nm ont été synthétisés par voie citrate. La deuxième étape a consisté à ajouter du nitrate d'argent pour orienter la croissance et de l'acide ascorbique pour réduire les sels d'or. Les AuNSs obtenues sont sans surfactant, ce qui permet de les fonctionnaliser avec des molécules d'intérêt. Cette synthèse a ensuite été améliorée après avoir étudié l'effet de la température et de la concentration en sel d'argent pour mieux contrôler le nombre de branches des étoiles avec une bonne reproductibilité.^{132,133} D'autres voies de synthèse utilisant des tampons de Good comme l'HEPES,^{134,135} l'EPPS^{136,137} et le MOPS¹³⁸ ont permis la synthèse de AuNSs en une seule étape et sans surfactant. Dans ces synthèses le tampon joue le rôle de réducteur du sel d'or et d'agent directeur de forme pour former des nano-étoiles.

II.4 Les applications biomédicales des AuNPs

II.4.1 Introduction générale

Les AuNPs présentent des propriétés exceptionnelles qui en font des nanosystèmes prometteurs pour le domaine biomédical. Ce qui distingue les AuNPs des autres nanosystèmes

c'est leurs propriétés optiques uniques, résultants du phénomène de résonance de plasmon de surface localisée (LSPR) et leur stabilité en milieu biologique. Les AuNPs peuvent être envisagées pour le ciblage et la délivrance de médicament, pour la photothermie ou encore pour l'imagerie médicale (Figure 15).¹³⁹

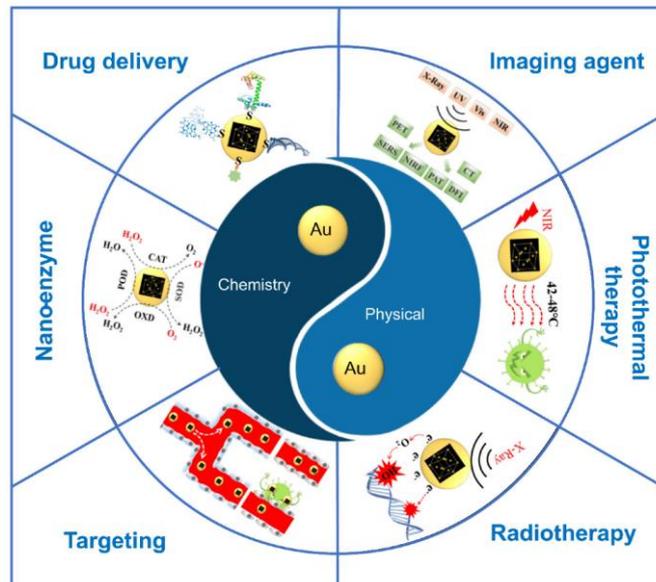


Figure 15: Applications biomédicales des AuNPs¹³⁹

Cette partie traitera de l'utilisation des AuNPs comme vecteurs de médicaments antibactériens et anticancéreux. La deuxième partie sera consacrée à l'utilisation des AuNPs pour la photothermie.

II.4.2 Les AuNPs comme vecteurs de médicaments

Malgré les immenses succès de la médecine obtenus ces dernières décennies, les traitements contre le cancer et les infections bactériennes continuent d'entraîner de nombreux effets secondaires.¹⁴⁰ Les limitations des médicaments utilisés dans ces traitements sont leur faible pénétration intracellulaire,^{141,142} leur instabilité¹⁴³ ou leur manque de spécificité cellulaire et tissulaire.¹⁴⁴ Ces inconvénients nécessitent d'administrer des doses fortes de médicament, qui à un certain stade impliquent une toxicité importante.^{145,146} Les nanoparticules d'or ont l'avantage d'avoir une surface et une forme modulables et très peu d'effets toxiques, ce qui permet de les envisager comme vecteurs de médicaments.¹⁴⁷ Et en effet, de nombreux

travaux ont montré que les AuNPs étaient de bons vecteurs de médicaments anticancéreux et antibactériens. La vectorisation des médicaments via les nanoparticules d'or se fait selon deux stratégies. La première est la vectorisation passive et elle fait appel aux propriétés intrinsèques des AuNPs. En effet, les tissus infectés et tumoraux ont une perméabilité plus grande que les tissus sains, ce qui permet une pénétration et une accumulation des AuNPs (effet EPR : Enhanced permeability and retention effect). La deuxième stratégie est la fonctionnalisation des AuNPs par des peptides ou des anticorps par exemple, pour adresser les AuNPs aux tissus malades et augmenter le temps de vie dans l'organisme.^{148,149}

a) Association des AuNPs avec des antibiotiques

L'or est généralement considéré comme biologiquement inerte. Sa surface étant fonctionnalisable, il est possible de l'associer à des médicaments, et notamment des antibiotiques. De nombreuses études montrent que l'association nanoparticules d'or/antibiotiques améliore fortement l'activité antibactérienne de ce dernier et en diminue la toxicité. Effectivement, grâce à leur petite taille les NPs vont pénétrer plus facilement les barrières biologiques et s'accumuler dans les sites actifs, cela permet donc d'administrer des concentrations plus faibles en médicaments.

Les principales stratégies mises en œuvre pour former des assemblages nanoparticules d'or/antibiotiques consistent à adsorber l'antibiotique sur des nanoparticules d'or préformées ou à utiliser les propriétés réductrices de certains antibiotiques pour former directement les nanoparticules d'or.¹⁵⁰

Des premiers travaux publiés par Xu *et al.* ont montré que l'association d'un dérivé de la vancomycine avec des nanoparticules d'or améliorerait les propriétés antibactériennes contre des entérocoques résistants à cet antibiotique (VRE) et contre *E. coli*. Leur stratégie a consisté à synthétiser des nanoparticules d'or d'environ 4-5 nm de diamètre et à les associer au bis(vancomycine)cystamide grâce à la formation de liaisons Au-S. La concentration minimale inhibitrice des nanoparticules d'or fonctionnalisées par la bis(vancomycine) cystamide a été déterminée contre des souches d'entérocoques résistants à la vancomycine (CMI = 2-4 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) et contre *E. coli* (CMI = 8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), la CMI de la vancomycine seule étant bien supérieure (CMI > 64 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).¹⁵¹ L'inconvénient majeur de ces systèmes est l'agrégation des AuNPs lors

de l'ajout de l'antibiotique à une solution de nanoparticules, cette agrégation pouvant impacter les propriétés biologiques. Plusieurs travaux ont confirmé par la suite qu'une amélioration des propriétés antibactériennes était obtenue lorsqu'un antibiotique était associé à des nanoparticules d'or.¹⁵²⁻¹⁵⁵

L'autre stratégie consiste donc à utiliser les propriétés réductrices d'antibiotiques pour former en une seule étape un assemblage nanoparticule d'or/antibiotique. Le céfaclor, un antibiotique possédant une amine réductrice a été utilisé comme réducteur et stabilisant pour l'obtention de AuNPs en une seule étape. Son utilisation présente l'avantage de conserver le groupement lactame libre. Il a pu être montré que l'effet antibactérien du céfaclor contre *S. aureus* et *E. coli* était accru d'un facteur 5 lorsqu'il était immobilisé à la surface des nanoparticules d'or.¹⁵⁶ Par ailleurs, une étude récente impliquant l'ampicilline a été menée. Il a été alors montré que l'assemblage AuNPs/ampicilline améliorait les propriétés antibactériennes de l'antibiotique.¹⁵⁷ Cependant, si la réaction de couplage est mal contrôlée et affecte le groupement actif, une perte d'activité peut être observée.

Ces études montrent qu'il est judicieux d'utiliser les nanoparticules d'or comme vecteurs d'antibiotiques. D'autres études ont révélé la possibilité d'associer des molécules qui ne sont pas des antibiotiques avec les AuNPs pour obtenir des effets antibactériens. Zhao et *al.*¹⁵⁸ ont ainsi montré que l'association de molécules azotées ne possédant pas a priori elles-mêmes d'effet antibactérien, comme la mélamine et la pyrimidine thiol, et des AuNPs avait un fort effet antibactérien sur des souches Gram-positive et Gram-négative. Il aurait été cependant judicieux de tester les ligands seuls afin de mettre en évidence un potentiel effet synergique entre les AuNPs et les molécules azotées. Les auteurs ont également mis en évidence des interactions entre leurs assemblages et les membranes bactériennes.¹⁵⁹

b) Les AuNPs comme vecteurs de médicament antitumorales.

A l'instar des antibiotiques, les AuNPs peuvent être utilisées pour la vectorisation de médicaments anticancéreux, les composites étant généralement obtenus soit par adsorption¹⁶⁰ soit en utilisant des ligands de type thiol.¹⁶¹ De plus, une amélioration des propriétés biologiques et une limitation de la toxicité de ces systèmes¹⁶² peuvent être obtenues en les combinant avec des composés améliorant le ciblage comme le PEG,¹⁶³ l'acide

folique¹⁶⁴ ou des peptides.¹⁶⁵ Plusieurs travaux¹⁶⁶ montrent en effet que cette association diminue l'IC₅₀ tout en favorisant la biodisponibilité. Par exemple, les travaux de Morshed et al.¹⁶⁷ révèlent que l'élaboration de AuNPs couplées à un peptide, à un PEG et à la doxorubicine entraîne la diminution de l'IC₅₀ d'environ 80% par rapport à la doxorubicine libre et une diminution d'environ 70% par rapport aux nanoparticules d'or couplées à la doxorubicine. Une autre équipe a mis en évidence une amélioration de l'IC₅₀ pour des AuNPs pegylées couplées avec un autre médicament anticancéreux, l'oxaliplatine.¹⁶⁸

II.4.3 Les AuNPs en Photothermie (PTT)

La photothermie est une thérapie prometteuse pour le traitement du cancer en raison de son caractère peu invasif et de sa grande sélectivité. Cette technique repose sur l'utilisation d'un laser et d'un agent photothermique permettant d'induire une hyperthermie locale afin de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant les cellules saines (Figure 16).¹⁶⁹

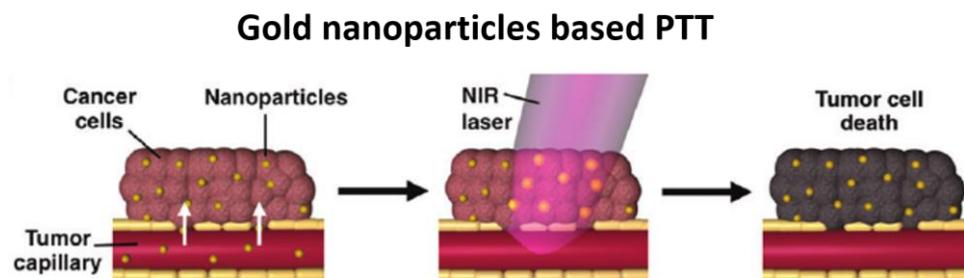


Figure 16: Principe schématique de la PTT utilisant les nanoparticules. Reproduit selon la référence¹⁸⁴

Pour cela, il est nécessaire de travailler dans des gammes de longueurs d'ondes correspondant aux fenêtres biologiques (fenêtre I, $650 \text{ nm} < \lambda < 950 \text{ nm}$; fenêtre II, $1000 \text{ nm} < \lambda < 1350 \text{ nm}$) (Figure 17). Cela permet de préserver les tissus sains du rayonnement laser tout en affectant les cellules cancéreuses.¹⁷⁰ Or certaines AuNPs absorbent dans ces domaines, relarguant l'énergie absorbée sous forme de chaleur. C'est pour cela que récemment la communauté scientifique s'est intéressée à l'utilisation de ces nanosystèmes comme agents photothermiques.¹⁶⁹ Ceux-ci doivent posséder une absorption maximale pour des valeurs de λ supérieures à 650 nm. L'effet PTT des AuNPs dépendra donc de la taille des particules, de

leur forme (sphères, étoiles, cages, bâtonnets) et de leur organisation en solution (agrégation) puisque comme nous l'avons vu précédemment ces paramètres jouent un rôle crucial sur la position de la bande LSPR.^{171,172}

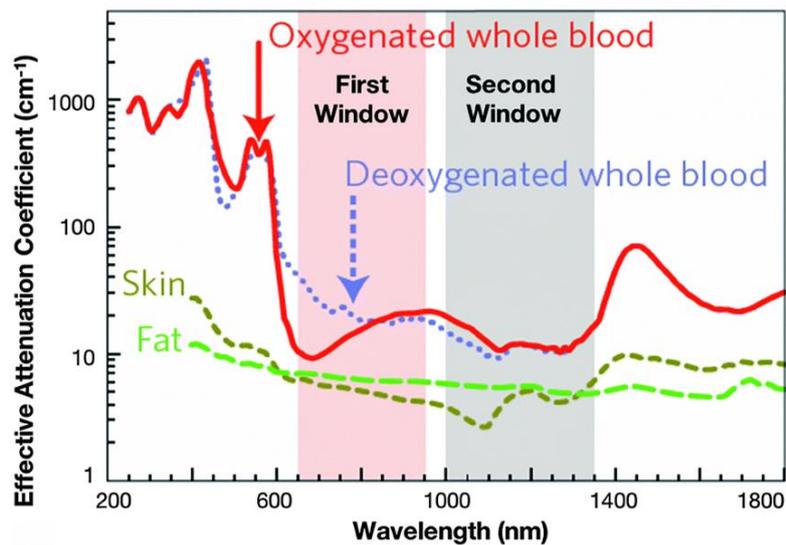


Figure 17: Spectre d'absorption des tissus biologiques. Reproduit selon la référence ¹⁷⁰

Par exemple, les nano-bâtonnets d'or (AuNRs) possèdent deux bandes plasmons, l'une transverse et l'autre longitudinale. La bande plasmon longitudinale se trouve dans le domaine du proche infrarouge et confère des propriétés photothermiques aux AuNRs.¹⁴⁹ Cependant leur utilisation en PTT reste limitée du fait des surfactants toxiques utilisés pour leur synthèse. Concernant les nanoparticules sphériques, leurs propriétés photothermiques sont dues à un phénomène de confinement intracellulaire. En effet, lorsque les AuNPs sont internalisées dans les cellules, la proximité entre plusieurs particules entraîne un couplage plasmonique à l'origine du décalage dans le proche infra-rouge (NIR) de la bande plasmon.¹⁷³

Par ailleurs, la taille des particules, au-delà d'influer sur la position de la bande LSPR, joue un rôle important dans la pénétration et l'élimination cellulaire. La taille des AuNPs doit donc être parfaitement contrôlée afin de permettre une bonne pénétration dans le tissu cible et également une bonne élimination afin de limiter la cytotoxicité.¹⁷⁴ Il a été montré qu'une taille de AuNPs voisine de 50 nm conduisait à une activité biologique optimale.¹⁷⁵

De plus, il est possible de combiner les propriétés de vecteur de médicaments et photothermiques des AuNPs afin d'obtenir une exaltation des propriétés anticancéreuses. On

parle alors de thérapie combinatoire. Celle-ci permet d'associer la chimiothérapie avec d'autres thérapies (radiothérapie, hyperthermie (photothermie, radiofréquence et ultrasons)). En particulier, la combinaison de la chimiothérapie et de la photothermie présente de nombreux avantages.¹⁷⁶ En effet, des études ont montré que l'utilisation de la photothermie amène des défauts dans les jonctions intracellulaires, augmentant la perméabilité du site tumoral et donc améliorant la pénétration des médicaments dans les cellules cancéreuses.¹⁷⁷ Par ailleurs, l'utilisation combinée de la chimiothérapie et de la photothermie permet de diminuer les phénomènes de résistance aux médicaments, des travaux ayant démontré que cette multithérapie pouvait conduire à l'inhibition des pompes à efflux, responsables de l'élimination cellulaire des médicaments.¹⁷⁸ On notera également que certains travaux ont montré que l'hyperthermie retarde la réparation des dommages causés par la chimiothérapie sur l'ADN sur les cellules cancéreuses.¹⁷⁹

Enfin, on mentionnera que des travaux ont mis en évidence l'utilisation de la photothermie comme traitement antibactérien.¹⁸⁰ Cependant, cette approche est à ce jour beaucoup moins développée que dans le cas du traitement du cancer.

Les travaux de thèse qui vont être développés dans les chapitres suivants traitent de la synthèse de AuNPs (sphériques, étoiles) en utilisant des POMs comme agents stabilisants, de leur caractérisation et de l'étude de leur propriétés biologiques (antibactériennes et anticancéreuses). La préparation de nanosystèmes analogues AgNPs est aussi présentée.

Références bibliographiques

- (1) Berzelius, J. . Beitrag Zur Näheren Kenntniss Des Molybdäns. *Poggendorff Ann. der Phys.* **1826**, *6*, 369–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/andp.18260820402>.
- (2) Keggin, J. . Structure of the Molecule of 12-Phosphotungstic Acid. *Nature* **1933**, *131*, 908–909. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/131908b0>.
- (3) Wang, S. S.; Yang, G. Y. Recent Advances in Polyoxometalate-Catalyzed Reactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (11), 4893–4962. <https://doi.org/10.1021/cr500390v>.
- (4) Ueda, T. Electrochemistry of Polyoxometalates: From Fundamental Aspects to Applications. *ChemElectroChem* **2018**, *5* (6), 823–838. <https://doi.org/10.1002/celec.201701170>.
- (5) Clemente-Juan, J. M.; Coronado, E. Magnetic Clusters from Polyoxometalate Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *193–195*, 361–394. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00170-8).
- (6) Hasenknopf, B. Polyoxometalates : Introduction to a Class of Inorganic Compounds and Their Biomedical Applicatons. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 275–287. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316606>.
- (7) Yamase, T. Anti-Tumor, -Viral, and -Bacterial Activities of Polyoxometalates for Realizing an Inorganic Drug. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (45), 4773. <https://doi.org/10.1039/b504585a>.
- (8) Dolbecq, A.; Dumas, E.; Mayer, C. R.; Mialane, P. Hybrid Organic-Inorganic Polyoxometalate Compounds: From Structural Diversity to Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 6009–6048. <https://doi.org/10.1021/cr1000578>.
- (9) Menshutkin, V. N. Einwirkung Des Chloracetyls Auf Phosphorigc. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1865**, *133* (3), 317–320.
- (10) Stresing, V.; Daubiné, F.; Benzaid, I.; Mönkkönen, H.; Clézardin, P. Bisphosphonates in Cancer Therapy. *Cancer Lett.* **2007**, *257* (1), 16–35. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.07.007>.

- (11) Russell, R. G. G. Bisphosphonates : The First 40 Years. *Bone* **2011**, *49* (1), 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.022>.
- (12) Chmielewska, E.; Kafarski, P. Physiologic Activity of Bisphosphonates – Recent Advances Abstract : *Open Pharm. Sci. J.* **2016**, *3*, 56–78. <https://doi.org/10.2174/1874844901603010056>.
- (13) Cimini, E.; Piacentini, P.; Sacchi, A.; Gioia, C.; Leone, S.; Lauro, G. ; Martini, F.; Agrati, C. Zoledronic Acid Enhances V02 T-Lymphocyte Antitumor Response to Human Glioma Cell Lines. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2011**, *24* (I), 139–148. <https://doi.org/10.1177/039463201102400116>.
- (14) Leon, A.; Liu, L.; Yang, Y.; Hudock, M. P.; Hall, P.; Yin, F.; Studer, D.; Puan, K.; Morita, C. T.; Oldfield, E. Isoprenoid Biosynthesis as a Drug Target : Bisphosphonate Inhibition of Escherichia Coli K12 Growth and Synergistic Effects of Fosmidomycin. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7331–7341.
- (15) Kwak, W.; Pope, M. T.; Scully, T. F. Stable Organic Derivatives of Heteropoly Anions, Pentamolybdobisphosphonates. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* (20), 5735–5738. <https://doi.org/10.1021/ja00853a017>.
- (16) Kortz, U.; Jameson, G. B.; Pope, M. T. Polyoxometalate Diphosphate Complexes. Folded Macrocyclic Dodecatungstates, [(O3PXPO3)4W12O36]16- (X = O, CH2). *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (6), 2659–2660. <https://doi.org/10.1021/ja00085a072>.
- (17) Kortz, U.; Pope, M. T. Poly Oxometalate-Diphosphate Complexes. 4.1 Structure of Na4[(O3PCHN(CH3)2PO3)W2O6]•11H2O. *Inorg. Chem.* **1995**, *34* (14), 3848–3850. <https://doi.org/10.1021/ic00118a043>.
- (18) Sergienko, V. S. Structural Chemistry of 1-Hydroxyethylidenediphosphonic Acid Complexes. *Russ. J. Coord. Chem. Khimiya* **2001**, *27* (10), 681–710. <https://doi.org/10.1023/A:1012334908835>.
- (19) Ueda, T.; Yonemura, T.; Shiro, M.; Fukudome, M.; Hojo, M. Synthesis of Molybdo-Methylphosphate and -Ethylphosphate with Inverted-Keggin Structure. *Inorg. Chem. Commun.* **2007**, *10* (11), 1301–1303. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2007.07.025>.

- (20) Compain, J. D.; Mialane, P.; Marrot, J.; Sécheresse, F.; Zhu, W.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Tetra- to Dodecanuclear Oxomolybdate Complexes with Functionalized Bisphosphonate Ligands: Activity in Killing Tumor Cells. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (46), 13741–13748. <https://doi.org/10.1002/chem.201001626>.
- (21) El Moll, H.; Dolbecq, A.; Mbomekalle, I. M.; Marrot, J.; Deniard, P.; Dessapt, R.; Mialane, P. Tuning the Photochromic Properties of Molybdenum Bisphosphonate Polyoxometalates. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (4), 2291–2302. <https://doi.org/10.1021/ic202299d>.
- (22) El Moll, H.; Zhu, W.; Oldfield, E.; Rodriguez-Albelo, L. M.; Mialane, P.; Marrot, J.; Vila, N.; Mbomekallé, I. M.; Rivière, E.; Duboc, C.; Dolbecq, A. Polyoxometalates Functionalized by Bisphosphonate Ligands: Synthesis, Structural, Magnetic, and Spectroscopic Characterizations and Activity on Tumor Cell Lines. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (14), 7921–7931. <https://doi.org/10.1021/ic3010079>.
- (23) Zekria, J.; Mansour, M.; Karim, S. M. The Anti-Tumour Effects of Zoledronic Acid. *J. Bone Oncol.* **2014**, *3* (1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2013.12.001>.
- (24) Green, J. R. Bisphosphonates : Preclinical Review. *Oncologist* **2004**, *9* (suppl 4), 3–13.
- (25) Kruszewska, H.; Zareba, T.; Tyski, S. Examination of Antimicrobial Activity of Selected Non-Antibiotic Drugs. *Acta Pol. Pharm.* **2004**, *61* Suppl (November), 18–21.
- (26) Saad, A.; Zhu, W.; Rousseau, G.; Mialane, P.; Marrot, J.; Haouas, M.; Taulelle, F.; Dessapt, R.; Serier-Brault, H.; Rivière, E.; Kubo, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Polyoxomolybdate Bisphosphonate Heterometallic Complexes: Synthesis, Structure, and Activity on a Breast Cancer Cell Line. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10537–10547. <https://doi.org/10.1002/chem.201406565>.
- (27) Oms, O.; Yang, S.; Salomon, W.; Marrot, J.; Dolbecq, A.; Rivière, E.; Bonnefont, A.; Ruhlmann, L.; Mialane, P. Heteroanionic Materials Based on Copper Clusters, Bisphosphonates, and Polyoxometalates: Magnetic Properties and Comparative Electrocatalytic NO_x Reduction Studies. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (4), 1551–1561. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02456>.

- (28) El Moll, H.; Rousseau, G.; Dolbecq, A.; Oms, O.; Marrot, J.; Haouas, M.; Taulelle, F.; Rivière, E.; Wernsdorfer, W.; Lachkar, D.; Lacôte, E.; Keita, B.; Mialane, P. Properties of a Tunable Multinuclear Nickel Polyoxotungstate Platform. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (21), 6753–6765. <https://doi.org/10.1002/chem.201204366>.
- (29) Yang, L.; Zhou, Z.; Wang, J.; Niu, J. Assembly of Dimeric and Tetrameric Complexes of Polyoxomolybdobisphosphonates Built from $[(\text{Mo}_3\text{O}_8)\{\text{O}_3\text{PC}(\text{O})(\text{CH}_2\text{-}3\text{-C}_5\text{NH}_5)\text{PO}_3\}]_2$ -Subunits. *Cristal growth Des.* **2013**, *4*, 2540–2547. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/cg400292g>.
- (30) Sun, X.; Ban, R.; Ma, P.; Wang, J.; Zhang, D.; Niu, J.; Wang, J. Four Transition-Metal-Bridging Risedronate-Based Polyoxomolybdates: Syntheses, Structures, Characterizations and Magnetic Properties. *Synth. Met.* **2017**, *223*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.11.035>.
- (31) Proust, A.; Thouvenot, R.; Gouzerh, P. Functionalization of Polyoxometalates: Towards Advanced Applications in Catalysis and Materials Science. *Chem. Commun.* **2008**, No. 16, 1837–1852. <https://doi.org/10.1039/b715502f>.
- (32) Weinstock, I. A.; Schreiber, R. E.; Neumann, R. Dioxygen in Polyoxometalate Mediated Reactions. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (5), 2680–2717. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00444>.
- (33) Ritchie, C.; Ferguson, A.; Nojiri, H.; Miras, H. N.; Song, Y. F.; Long, D. L.; Burkholder, E.; Murrie, M.; Kögerler, P.; Brechin, E. K.; Cronin, L. Polyoxometalate-Mediated Self-Assembly of Single-Molecule Magnets: $\{[\text{XW}_9\text{O}_{34}]_2[\text{Mn}^{\text{III}}_4\text{Mn}^{\text{II}}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_4]\}$ 12-. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (30), 5609–5612. <https://doi.org/10.1002/anie.200801281>.
- (34) Murad A. AlDame, Juan M. Clemente-Juan, Eugenio Coronado, Carlos Martí-Gastaldo, A. G.-A. Mononuclear Lanthanide Single-Molecule Magnets Based on Polyoxometalates. *JACS Commun.* **2008**, *130*, 8874–8875.
- (35) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. The Antibacterial Activity of Polyoxometalates: Structures, Antibiotic Effects and Future Perspectives. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (10),

- 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>.
- (36) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer *Angewandte. Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58*, 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>.
- (37) H N MUKHRJEE. TREATMENT OF CANCER OF THE INTESTINAL TRACT WITH A COMPLEX COMPOUND OF PHOSPHOTUNGSTIC PHOSPHOMOLYBDIC ACIDS AND CAFFEINE. *J Indian Med Assoc* **1965**, *44*, 477–479.
- (38) Yamase, T. T. *Biomed. Inorg. Polym* **2013**, 65–116.
- (39) Fujita, H.; Fujita, T.; Sakurai, T.; Seto, Y. A New Type of Antitumor Substances Polyoxomolybdates. *Chemotherapy* **1992**, *40*, 173–178.
- (40) Ogata, A.; Yanagie, H.; Ishikawa, E.; Morishita, Y.; Mitsui, S.; Yamashita, A.; Hasumi, K.; Takamoto, S.; Yamase, T.; Eriguchi, M. Antitumour Effect of Polyoxomolybdates: Induction of Apoptotic Cell Death and Autophagy in in Vitro and in Vivo Models. *Br. J. Cancer* **2008**, *98* (2), 399–409. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604133>.
- (41) Yamase, T. Polyoxometalates for Molecular Devices: Antitumor Activity and Luminescence. *Mol. Eng.* **1993**, *3* (1–3), 241–262. <https://doi.org/10.1007/BF00999636>.
- (42) Liu, Y.; Tian, S.; Liu, S.; Wang, E. In Vitro Inhibitory Effect of Polyoxometalates on Human Tumor Cells. *Transit. Met. Chem.* **2005**, *30* (1), 113–117. <https://doi.org/10.1007/s11243-004-3825-1>.
- (43) Gumerova, N. I.; Blazevic, A.; Caldera Fraile, T.; Roller, A.; Giester, G.; Rompel, A. Synthesis and Characterization of Hybrid Anderson Hexamolybdoaluminates(III) Functionalized with Indometacin or Cinnamic Acid. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2018**, *74* (11), 1378–1383. <https://doi.org/10.1107/S2053229618012536>.
- (44) C. G. Feng, S. S. Wang, X. L. Synthesis, Spectral Characteristics and Antitumor Activity of Tungstosilicic Polyoxometalate Containing 5-Fluorouracil. *Pol. J. Chem.* **2009**, *83*, 2079 – 2087.

- (45) Liu, X.; Gan, Q.; Feng, C. Synthesis, Characterization and Antitumor Activity of Rare Earth (Y, La) Substituted Phosphotungstates Containing 5-Fluorouracil. *J. Rare Earths* **2012**, *30* (6), 604–608. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(12\)60098-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(12)60098-2).
- (46) L. I. Juan, L. I. Jing, Q. I. Yan-Fei, W. Hong-Fang, W. E.-B.; H. U. Chang-Wen, X. U. Lin, W. U. X.-Y. Synthesis and Anti-Liver Cancer Activity of 5-Fluorouracil Salt of 12-Tungstoboric Acid. *Chem. J. Chin. Univ.* **2004**, *25* (6), 1010–1012.
- (47) Boulmier, A.; Feng, X.; Oms, O.; Mialane, P.; Rivière, E.; Shin, C. J.; Yao, J.; Kubo, T.; Furuta, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Anticancer Activity of Polyoxometalate-Bisphosphonate Complexes: Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Results. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (13), 7558–7565. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01114>.
- (48) Kong, X.; Wan, G.; Li, B.; Wu, L. Recent Advances of Polyoxometalates in Multi-Functional Imaging and Photothermal Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (36), 8189–8206. <https://doi.org/10.1039/d0tb01375g>.
- (49) Guedes, G.; Wang, S.; Santos, H. A.; Sousa, F. L. Polyoxometalate Composites in Cancer Therapy and Diagnostics. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *2020* (22), 2121–2132. <https://doi.org/10.1002/ejic.202000066>.
- (50) Liu, H. Y.; Pan, X. L.; Tian, J. N.; Sun, H.; Huan, Q.; Huang, Y. L.; Liu, J. Q. Na₇CrCuW₁₁O₃₉·16H₂O Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells through the P38 Signaling Pathway. *Oncol. Lett.* **2017**, *13* (4), 2418–2424. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5719>.
- (51) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (10), 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>.
- (52) Prudent, R.; Sautel, C. F.; Cochet, C. Structure-Based Discovery of Small Molecules Targeting Different Surfaces of Protein-Kinase CK2. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804* (3), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.003>.
- (53) Goffinet, M.; Thoulouzan, M.; Pradines, A.; Lajoie-Mazenc, I.; Weinbaum, C.; Faye, J. C.;

- Séronie-Vivien, S. Zoledronic Acid Treatment Impairs Protein Geranyl-Geranylation for Biological Effects in Prostatic Cells. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-60>.
- (54) Tajima, Y.; Nagasawa, Z.; Tadano, J. A Factor Found in Aged Tungstate Solution Enhanced the Antibacterial Effect of β -Lactams on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Microbiol. Immunol.* **1993**, *37* (9), 695–703. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1993.tb01694.x>.
- (55) Marques-Da-Silva, D.; Fraqueza, G.; Lagoa, R.; Vannathan, A. A.; Mal, S. S.; Aureliano, M. Polyoxovanadate Inhibition of: *Escherichia Coli* Growth Shows a Reverse Correlation with Ca^{2+} -ATPase Inhibition. *New J. Chem.* **2019**, *43* (45), 17577–17587. <https://doi.org/10.1039/c9nj01208g>.
- (56) Aureliano, M.; Fraqueza, G.; Ohlin, C. A. Ion Pumps as Biological Targets for Decavanadate. *Dalt. Trans.* **2013**, *42* (33), 11770–11777. <https://doi.org/10.1039/c3dt50462j>.
- (57) Aureliano, M. Interactions of Vanadate Oligomers with Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1221*, 259–271.
- (58) Inoue, M.; Segawa, K.; Matsunaga, S.; Matsumoto, N.; Oda, M.; Yamase, T. Antibacterial Activity of Highly Negative Charged Polyoxotungstates, K 27[KAs4W4O140] and K 18[KSb9W21O86], and Keggin-Structural Polyoxotungstates against *Helicobacter Pylori*. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99* (5), 1023–1031. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.01.010>.
- (59) Tajima, Y. Purification of a Factor That Enhances the Antibacterial Activity of β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Its Identification as Undecaphosphotungstate. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68* (2), 93–99. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(97\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(97)00049-4).
- (60) Yamase, T.; Fukuda, N.; Tajima, Y. Synergistic Effect of Polyoxotungstates in Combination With. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19* (3), 459–465. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>.

- (61) Tajima, Y. Lacunary-Substituted Undecatungstosilicates Sensitize Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* to β -Lactams. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24* (9), 1079–1084. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.1079>.
- (62) Fukuda, N.; Yamase, T.; Tajima, Y. Inhibitory Effect of Polyoxotungstates on the Production of Penicillin-Binding. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22* (5), 463–470. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>.
- (63) Fiorani, G.; Saoncella, O.; Kaner, P.; Altinkaya, S. A.; Figoli, A.; Bonchio, M.; Carraro, M. Chitosan-Polyoxometalate Nanocomposites: Synthesis, Characterization and Application as Antimicrobial Agents. *J. Clust. Sci.* **2014**, *25* (3), 839–854. <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0685-x>.
- (64) Shah, H. S.; Al-Oweini, R.; Haider, A.; Kortz, U.; Iqbal, J. Cytotoxicity and Enzyme Inhibition Studies of Polyoxometalates and Their Chitosan Nanoassemblies. *Toxicol. Reports* **2014**, *1*, 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.06.001>.
- (65) Meißner, T.; Bergmann, R.; Oswald, J.; Rode, K.; Stephan, H.; Richter, W.; Zänker, H.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Reck, G. Chitosan-Encapsulated Keggin Anion [Ti₂W₁₀PO₄₀]⁷⁻. Synthesis, Characterization and Cellular Uptake Studies. *Transit. Met. Chem.* **2006**, *31* (5), 603–610. <https://doi.org/10.1007/s11243-006-0035-z>.
- (66) Zhang, S.; Peng, B.; Xue, P.; Kong, X.; Tang, Y.; Wu, L.; Lin, S. Polyoxometalate-Antioxidant Peptide Assembly Materials with NIR-Triggered Photothermal Behaviour and Enhanced Antibacterial Activity. *Soft Matter* **2019**, *15* (27), 5375–5379. <https://doi.org/10.1039/c9sm01059a>.
- (67) Kong, Y.; Pan, L.; Peng, J.; Xue, B.; Lu, J.; Dong, B. Preparation and Antibacterial Activity of Nanorod-Amino Acid Polyoxometalates. *Mater. Lett.* **2007**, *61* (11–12), 2393–2397. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.09.023>.
- (68) Li, J.; Chen, Z.; Zhou, M.; Jing, J.; Li, P. W.; Wang, Y.; Wu, P. L.; Wang, L.; Wang, Y.; Lee, M. Polyoxometalate-Driven Self-Assembly of Short Peptides into Multivalent Nanofibers with Enhanced Antibacterial Activity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *128* (7), 2638–2641.

- (69) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Shukla, R.; Bhargava, S. K.; Bansal, V. Fine-Tuning the Antimicrobial Profile of Biocompatible Gold Nanoparticles by Sequential Surface Functionalization Using Polyoxometalates and Lysine. *PLoS One* **2013**, *8* (10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079676>.
- (70) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Kandjani, A. E.; Shukla, R.; Bhargava, S. K.; Bansal, V. Synergistic Influence of Polyoxometalate Surface Corona towards Enhancing the Antibacterial Performance of Tyrosine-Capped Ag Nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6*, 758–765.
- (71) Umapathi, A.; Nagaraju, N. P.; Madhyastha, H.; Jain, D.; Srinivas, S. P.; Rotello, V. M.; Daima, H. K. Highly Efficient and Selective Antimicrobial Isonicotinylhydrazide-Coated Polyoxometalate-Functionalized Silver Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *184* (July), 110522. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110522>.
- (72) Le Ouay, B.; Stellacci, F. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: A Surface Science Insight. *Nano Today* **2015**, *10* (3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>.
- (73) Goy, R. C.; Morais, S. T. B.; Assis, O. B. G. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Quaternized Derivative on E. Coli and S. Aureus Growth. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2016**, *26* (1), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.bjfp.2015.09.010>.
- (74) Raj, S.; Jose, S.; Sumod, U. S.; Sabitha, M. Nanotechnology in Cosmetics: Opportunities and Challenges. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2012**, *4* (3), 186–193. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.99016>.
- (75) Iwakoshi, A.; Nanke, T. Coating Materials Containing Gold Nanoparticles. **2005**, No. Figure 1, 107–112.
- (76) He, X.; Hwang, H. ScienceDirect Nanotechnology in Food Science : Functionality , Applicability , and Safety Assessment. *J. Food Drug Anal.* **2016**, *24* (4), 671–681. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.001>.
- (77) Singh, R.; Nalwa, H. S. Medical Applications of Nanoparticles in Biological Imaging, Cell Labeling, Antimicrobial Agents, and Anticancer Nanodrugs. *J. Biomed. Nanotechnol.*

- 2011**, 7 (4), 489–503. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1324>.
- (78) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, 27 (17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>.
- (79) Oliveira, J. P.; Prado, A. R.; Juve, W.; Ribeiro, R. N.; Pontes, M. J.; Nogueira, B. V.; Guimara, M. C. C. A Helpful Method for Controlled Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles through Response Surface Modeling. **2020**, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.04.003>.
- (80) Nath, N.; Chilkoti, A. A Colorimetric Gold Nanoparticle Sensor To Interrogate Biomolecular Interactions in Real Time on a Surface. *Anal. Chem.* **2002**, 74 (3), 504–509.
- (81) Wu, X.; Mu, L.; Chen, M.; Liang, S.; Wang, Y.; She, G.; Shi, W. Bifunctional Gold Nanobipyramids for Photothermal Therapy and Temperature Monitoring. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, 2 (6), 2668–2675. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00344>.
- (82) Lee, K.; El-sayed, M. A. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging : Sensitivity of Plasmon Response to Size , Shape , and Metal Composition. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (39), 19220–19225. <https://doi.org/10.1021/jp062536y>.
- (83) Chen, H.; Kou, X.; Yang, Z.; Ni, W.; Wang, J. Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, 24 (10), 5233–5237. <https://doi.org/10.1021/la800305j>.
- (84) Birtcher, R. C.; Donnelly, S. E.; Schlutig, S. Nanoparticle Ejection from Gold during Ion Irradiation. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2004**, 215 (1–2), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(03\)01789-0](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(03)01789-0).
- (85) Tangeysh, B.; Moore Tibbetts, K.; Odhner, J. H.; Wayland, B. B.; Levis, R. J. Gold Nanoparticle Synthesis Using Spatially and Temporally Shaped Femtosecond Laser Pulses: Post-Irradiation Auto-Reduction of Aqueous [AuCl₄]⁻. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117 (36), 18719–18727. <https://doi.org/10.1021/jp4056494>.
- (86) Okitsu, K.; Ashokkumar, M.; Grieser, F. Sonochemical Synthesis of Gold Nanoparticles:

- Effects of Ultrasound Frequency. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (44), 20673–20675. <https://doi.org/10.1021/jp0549374>.
- (87) Dong, S. A.; Zhou, S. P. Photochemical Synthesis of Colloidal Gold Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **2007**, *140* (3), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2007.03.020>.
- (88) Huang, S.; Ma, H.; Zhang, X.; Yong, F.; Feng, X.; Pan, W.; Wang, X.; Wang, Y.; Chen, S. Electrochemical Synthesis of Gold Nanocrystals and Their 1D and 2D Organization. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (42), 19823–19830. <https://doi.org/10.1021/jp052863q>.
- (89) Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17-18 SPEC. ISS.), 1870–1901. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.030>.
- (90) Tréguer-Delapierre, M.; Duguet, E.; Majimel, J.; Mornet, S.; Ravaine, S. Synthesis of Non Spherical Gold Nanoparticles. *Gold Bull.* **2008**, *41*, 195–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF03216597>.
- (91) Alex, S.; Tiwari, A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications-A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (3), 1869–1894. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9718>.
- (92) Stevenson, P. C.; Turkevich, J.; Hillier. A Study of the Nucleation and Growth Processes I N the Synthesis Of. *Discuss. Faraday. Soc.* **1951**, *11* (c), 55–75.
- (93) Frens, G. Particle Size and Sol Stability in Metal Colloids. *Colloid Polym. Sci.* **1972**, *741*, 736–741.
- (94) Slot, J. W.; Geuze, H. J. A Method to Prepare Isodisperse Colloidal Gold Sols in the Size Range 3–17 NM. *Ultramicroscopy* **1984**, *15* (4), 383. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(84\)90144-x](https://doi.org/10.1016/0304-3991(84)90144-x).
- (95) Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B. J. Polyethylene Glycol Functionalized Gold Nanoparticles : The Influence of Capping Density on Stability in Various Media. *Gold Bull.* **2011**, No. 44, 99–105. <https://doi.org/10.1007/s13404-011-0015-8>.

- (96) Zong, J.; Cobb, S. L.; Cameron, N. R. Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles: Versatile Biomaterials for Diagnostic and Therapeutic Applications. *Biomater. Sci.* **2017**, No. 5, 875–886.
- (97) Gibson, J. D.; Khanal, B. P.; Zubarev, E. R. Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *JACS* **2007**, No. 25, 1615–1619.
- (98) Wang, Y.; Weinstock, I. A. Polyoxometalate-Decorated Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (22), 7479–7496. <https://doi.org/10.1039/c2cs35126a>.
- (99) Jameel, U.; Zhu, M.; Chen, X.; Tong, Z. Recent Progress of Synthesis and Applications in Polyoxometalate and Nanogold Hybrid Materials. *J. Mater. Sci.* **2016**, 51 (5), 2181–2198. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9503-1>.
- (100) Ernst, A. Z.; Sun, L.; Wiaderek, K.; Kolary, A.; Zoladek, S.; Kulesza, P. J.; Cox, J. A. Synthesis of Polyoxometalate-Protected Gold Nanoparticles by a Ligand-Exchange Method: Application to the Electrocatalytic Reduction of Bromate. *Electroanalysis* **2007**, 19 (19–20), 2103–2109. <https://doi.org/10.1002/elan.200703925>.
- (101) Wang, Y.; Neyman, A.; Arkhangelsky, E.; Gitis, V.; Meshi, L.; Weinstock, I. A. Self-Assembly and Structure of Directly Imaged Inorganic-Anion Monolayers on a Gold Nanoparticle. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (47), 17412–17422. <https://doi.org/10.1021/ja907815d>.
- (102) Wang, Y.; Zeiri, O.; Sharet, S.; Weinstock, I. A. Role of the Alkali-Metal Cation Size in the Self-Assembly of Polyoxometalate-Monolayer Shells on Gold Nanoparticles. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (14), 7436–7438. <https://doi.org/10.1021/ic300431a>.
- (103) Keita, B.; Liu, T.; Nadjo, L. Synthesis of Remarkably Stabilized Metal Nanostructures Using Polyoxometalates. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 19–33.
- (104) Mayer, C. R.; Neveu, S.; Cabuil, V. A Nanoscale Hybrid System Based on Gold Nanoparticles and Heteropolyanions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, 41 (3), 501–503. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020201\)41:3<501::AID-ANIE501>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020201)41:3<501::AID-ANIE501>3.0.CO;2-Z).
- (105) Hegde, S.; Joshi, S.; Mukherjee, T.; Kapoor, S. Formation of Gold Nanoparticles via a

- Thiol Functionalized Polyoxometalate. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (4), 2332–2337. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.065>.
- (106) Mandal, S.; Rautaray, D.; Sastry, M. Ag 1 – Keggin Ion Colloidal Particles as Novel Templates for the Growth of Silver Nanoparticle Assemblies. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13* (13), 3002–3005.
- (107) Troupis, A.; Hiskia, A.; Papaconstantinou, E. Synthesis of Metal Nanoparticles by Using Polyoxometalates as Photocatalysts and Stabilizers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (11), 1911–1914. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020603\)41:11<1911::AID-ANIE1911>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020603)41:11<1911::AID-ANIE1911>3.0.CO;2-0).
- (108) Barna, A. V; Tsymbal, L. V; Lampeka, Y. D. NANOCOMPOSITES OF METALLIC SILVER WITH OCTAMOLYBDATE AMINE COMPLEXES OF NICKEL (II) AND COPPER (II). *Theor. Exp. Chem.* **2015**, *51* (1), 56–59. <https://doi.org/10.1007/s11237-015-9398-6>.
- (109) Keita, B.; Mbomekalle, I. M.; Nadjjo, L.; Haut, C. Tuning the Formal Potentials of New V IV-Substituted Dawson-Type Polyoxometalates for Facile Synthesis of Metal Nanoparticles. *Electrochem. commun.* **2004**, *6* (10), 978–983. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2004.07.016>.
- (110) Compain, J. D.; Dolbecq, A.; Marrot, J.; Mialane, P.; Sécheresse, F. Characterization of Tetra, Dodeca and Tetradeca MoV Polyoxometalate Wheels Structured by Etidronate Ligands. *Comptes Rendus Chim.* **2010**, *13* (3), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.09.007>.
- (111) Troupis, A.; Hiskia, A.; Papaconstantinou, E. Synthesis of Metal Nanoparticles by Using Polyoxometalates as Photocatalysts and Stabilizers **. **2002**, 1911–1914.
- (112) Mandal, S.; Rautaray, D.; Sastry, M. Ag 1 – Keggin Ion Colloidal Particles as Novel Templates for the Growth of Silver Nanoparticle Assemblies. *J. Mater. Chem.* **2003**, 3–6. <https://doi.org/10.1039/b307000j>.
- (113) Zhang, G.; Keita, B.; Biboum, R. N.; Miserque, F.; Berthet, P.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Catala, L.; Nadjjo, L. Synthesis of Various Crystalline Gold Nanostructures in Water: The Polyoxometalate [Small Beta]-[H4PMo12O40]3- as the Reducing and Stabilizing Agent.

- J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (45), 8639–8644. <https://doi.org/10.1039/B903599K>.
- (114) Bao, Y. Y.; Bi, L. H.; Wu, L. X. One-Step Synthesis and Stabilization of Gold Nanoparticles and Multilayer Film Assembly. *J. Solid State Chem.* **2011**, *184* (3), 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.01.011>.
- (115) Martín, S.; Takashima, Y.; Lin, C. G.; Song, Y. F.; Miras, H. N.; Cronin, L. Integrated Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Polyoxometalate Clusters. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (7), 4110–4116. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03013>.
- (116) Li, N.; Zhao, P.; Astruc, D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (7), 1756–1789.
- (117) Jana, N. ; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *18* (18), 1389–1393.
- (118) Dykman, L.; Khlebtsov, N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/c1cs15166e>.
- (119) Guerrero-Martínez, A.; Barbosa, S.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Nanostars Shine Bright for You. Colloidal Synthesis, Properties and Applications of Branched Metallic Nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (2), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.12.007>.
- (120) Chirico, G.; Borzenkov, M.; Pallavicini, P. *Gold Nanostars: Synthesis, Properties and Biomedical Application*; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20768-1>.
- (121) Personick, M. L.; Mirkin, C. A. Making Sense of the Mayhem behind Shape Control in the Synthesis of Gold Nanoparticles. **2013**, No. C.
- (122) Sau, T. K.; Murphy, C. J. Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (28), 8648–8649. <https://doi.org/10.1021/ja047846d>.
- (123) Nehl, C. L.; Liao, H.; Hafner, J. H. Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles.

- Nano Lett.* **2006**, *6* (4), 683–688. <https://doi.org/10.1021/nl052409y>.
- (124) Chen, S.; Wang, Z. L.; Ballato, J.; Foulger, S. H.; Carroll, D. L. Monopod, Bipod, Tripod, and Tetrapod Gold Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (52), 16186–16187. <https://doi.org/10.1021/ja038927x>.
- (125) Kuo, C. H.; Huang, M. H. Synthesis of Branched Gold Nanocrystals by a Seeding Growth Approach. *Langmuir* **2005**, *21* (5), 2012–2016. <https://doi.org/10.1021/la0476332>.
- (126) Wu, H. L.; Chen, C. H.; Huang, M. H. Seed-Mediated Synthesis of Branched Gold Nanocrystals Derived from the Side Growth of Pentagonal Bipyramids and the Formation of Gold Nanostars. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (1), 110–114. <https://doi.org/10.1021/cm802257e>.
- (127) Zou, X.; Ying, E.; Dong, S. Seed-Mediated Synthesis of Branched Gold Nanoparticles with the Assistance of Citrate and Their Surface-Enhanced Raman Scattering Properties. *Nanotechnology* **2006**, *17* (18), 4758–4764. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/18/038>.
- (128) Sau, T. K.; Murphy, C. J. <Ja047846D.Pdf>. *Communications* **2004**, 8648–8649. <https://doi.org/10.1021/ja047846d>.
- (129) Dondapati, S. K.; Sau, T. K.; Hrelescu, C.; Klar, T. A.; Stefani, F. D.; Feldmann, J. Label-Free Biosensing Based on Single Gold Nanostars as Plasmonic Transducers. *ACS Nano* **2010**, *4* (11), 6318–6322. <https://doi.org/10.1021/nn100760f>.
- (130) Trigari, S.; Rindi, A.; Margheri, G.; Sottini, S.; Dellepiane, G.; Giorgetti, E. Synthesis and Modelling of Gold Nanostars with Tunable Morphology and Extinction Spectrum. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (18), 6531–6540. <https://doi.org/10.1039/c0jm04519e>.
- (131) Yuan, H.; Khoury, C. G.; Hwang, H.; Wilson, C. M.; Grant, G. A.; Vo-Dinh, T. Gold Nanostars: Surfactant-Free Synthesis, 3D Modelling, and Two-Photon Photoluminescence Imaging. *Nanotechnology* **2012**, *23* (7).
- (132) Ramsey, J. D.; Zhou, L.; Kyle Almlie, C.; Lange, J. D.; Burrows, S. M. Achieving Plasmon Reproducibility from Surfactant Free Gold Nanostar Synthesis. *New J. Chem.* **2015**, *39*

- (12), 9098–9108. <https://doi.org/10.1039/c5nj01590a>.
- (133) De Silva Indrasekara, A. S.; Johnson, S. F.; Odion, R. A.; Vo-Dinh, T. Manipulation of the Geometry and Modulation of the Optical Response of Surfactant-Free Gold Nanostars: A Systematic Bottom-Up Synthesis. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2202–2210. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01700>.
- (134) Webb, J. A.; Erwin, W. R.; Zarick, H. F.; Aufrecht, J.; Manning, H. W.; Lang, M. J.; Pint, C. L.; Bardhan, R. Geometry-Dependent Plasmonic Tunability and Photothermal Characteristics of Multibranching Gold Nanoantennas. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (7), 3696–3707. <https://doi.org/10.1021/jp408793a>.
- (135) De Puig, H.; Tam, J. O.; Yen, C. W.; Gehrke, L.; Hamad-Schifferli, K. Extinction Coefficient of Gold Nanostars. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (30), 17408–17415. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03624>.
- (136) Cai, J.; Raghavan, V.; Bai, Y. J.; Zhou, M. H.; Liu, X. L.; Liao, C. Y.; Ma, P.; Shi, L.; Dockery, P.; Keogh, I.; Fan, H. M.; Olivo, M. Controllable Synthesis of Tetrapod Gold Nanocrystals with Precisely Tunable Near-Infrared Plasmon Resonance towards Highly Efficient Surface Enhanced Raman Spectroscopy Bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (37), 7377–7385. <https://doi.org/10.1039/c5tb00785b>.
- (137) Lu, G.; Forbes, T. Z.; Haes, A. J. SERS Detection of Uranyl Using Functionalized Gold Nanostars Promoted by Nanoparticle Shape and Size. *Analyst* **2016**, *141* (17), 5137–5143. <https://doi.org/10.1039/c6an00891g>.
- (138) Chandra, K.; Culver, K. S. B.; Werner, S. E.; Lee, R. C.; Odom, T. W. Manipulating the Anisotropic Structure of Gold Nanostars Using Good's Buffers. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (18), 6763–6769. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b03242>.
- (139) Bai, X.; Wang, Y.; Song, Z.; Feng, Y.; Chen, Y.; Zhang, D.; Feng, L. The Basic Properties of Gold Nanoparticles and Their Applications in Tumor Diagnosis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (7).
- (140) Partridge, A. H.; Burstein, H. J.; Winer, E. P. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women with Early-Stage Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*

- Monogr.* **2001**, 30 (30), 135–142.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451>.
- (141) Bongers, S.; Hellebrekers, P.; Leenen, L. P. H.; Koenderman, L.; Hietbrink, F. Intracellular Penetration and Effects of Antibiotics on Staphylococcus Aureus inside Human Neutrophils: A Comprehensive Review. *Antibiotics* **2019**, *8* (2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020054>.
- (142) Grantab, R. H.; Tannock, I. F. Penetration of Anticancer Drugs through Tumour Tissue as a Function of Cellular Packing Density and Interstitial Fluid Pressure and Its Modification by Bortezomib. *BMC Cancer* **2012**, *12*.
- (143) Reed, G. A. Stability of Drugs, Drug Candidates, and Metabolites in Blood and Plasma. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2016**, 7.6.1-7.6.12. <https://doi.org/10.1002/cpph.16>.
- (144) Jahangirian, H.; Kalantari, K.; Izadiyan, Z.; Rafiee-Moghaddam, R.; Shameli, K.; Webster, T. J. A Review of Small Molecules and Drug Delivery Applications Using Gold and Iron Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 1633–1657. <https://doi.org/10.2147/IJN.S184723>.
- (145) Grill, M. F.; Maganti, R. K. Neurotoxic Effects Associated with Antibiotic Use: Management Considerations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72* (3), 381–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03991.x>.
- (146) Plenderleith, I. H. Treating the Treatment: Toxicity of Cancer Chemotherapy. *Can. Fam. Physician* **1990**, *36* (OCT.), 1827–1830.
- (147) Jeong, E. H.; Jung, G.; Hong, C. A.; Lee, H. Gold Nanoparticle (AuNP)-Based Drug Delivery and Molecular Imaging for Biomedical Applications. *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37* (1), 53–59. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0273-5>.
- (148) Wang, J.; Sui, M.; Fan, W. Nanoparticles for Tumor Targeted Therapies and Their Pharmacokinetics. *Curr. Drug Metab.* **2010**, *11* (2), 129–141. <https://doi.org/10.2174/138920010791110827>.
- (149) Mao, W.; Son, Y. J.; Yoo, H. S. Gold Nanospheres and Nanorods for Anti-Cancer Therapy:

- Comparative Studies of Fabrication, Surface-Decoration, and Anti-Cancer Treatments. *Nanoscale* **2020**, 12 (28), 14996–15020. <https://doi.org/10.1039/d0nr01690j>.
- (150) Zhao, Y.; Jiang, X. Multiple Strategies to Activate Gold Nanoparticles as Antibiotics. *Nanoscale*. 2013, pp 8340–8350. <https://doi.org/10.1039/c3nr01990j>.
- (151) Gu, H.; Ho, P. L.; Tong, E.; Wang, L.; Xu, B. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. *Nano Lett.* **2003**, 3 (9), 1261–1263. <https://doi.org/10.1021/nl034396z>.
- (152) Burygin, G. L.; Khlebtsov, B. N.; Shantrokha, A. N.; Dykman, L. A.; Bogatyrev, V. A.; Khlebtsov, N. G. On the Enhanced Antibacterial Activity of Antibiotics Mixed with Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, 4 (8), 794–801. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9316-8>.
- (153) Nirmala Grace, A.; Pandian, K. Antibacterial Efficacy of Aminoglycosidic Antibiotics Protected Gold Nanoparticles-A Brief Study. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, 297 (1–3), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.024>.
- (154) Saha, B.; Bhattacharya, J.; Mukherjee, A.; Ghosh, A. K.; Santra, C. R.; Dasgupta, A. K.; Karmakar, P. In Vitro Structural and Functional Evaluation of Gold Nanoparticles Conjugated Antibiotics. *Nanoscale Res. Lett.* **2007**, 2 (12), 614–622. <https://doi.org/10.1007/s11671-007-9104-2>.
- (155) Ahangari, A.; Salouti, M.; Heidari, Z.; Kazemizadeh, A. R.; Safari, A. A. Development of Gentamicin-Gold Nanospheres for Antimicrobial Drug Delivery to Staphylococcal Infected Foci. *Drug Deliv.* **2013**, 20 (1), 34–39. <https://doi.org/10.3109/10717544.2012.746402>.
- (156) Rai, A.; Prabhune, A.; Perry, C. C. Antibiotic Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles with Potent Antimicrobial Activity and Their Application in Antimicrobial Coatings. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20 (32), 6789. <https://doi.org/10.1039/c0jm00817f>.
- (157) Chavan, C.; Kamble, S.; Murthy, A. V. R.; Kale, S. N. Ampicillin-Mediated Functionalized Gold Nanoparticles against Ampicillin-Resistant Bacteria: Strategy, Preparation and Interaction Studies. *Nanotechnology* **2020**, 31 (21).

- (158) Zhao, Y.; Chen, Z.; Chen, Y.; Xu, J.; Li, J.; Jiang, X. Synergy of Non-Antibiotic Drugs and Pyrimidinethiol on Gold Nanoparticles against Superbugs. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (35), 12940–12943. <https://doi.org/10.1021/ja4058635>.
- (159) Feng, Y.; Chen, W.; Jia, Y.; Tian, Y.; Zhao, Y.; Long, F.; Rui, Y.; Jiang, X. N-Heterocyclic Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Effective Antibiotics against Multi-Drug Resistant Bacteria. *Nanoscale* **2016**, *8* (27), 13223–13227. <https://doi.org/10.1039/c6nr03317b>.
- (160) Curry, D.; Cameron, A.; MacDonald, B.; Nganou, C.; Scheller, H.; Marsh, J.; Beale, S.; Lu, M.; Shan, Z.; Kaliaperumal, R.; Xu, H.; Servos, M.; Bennett, C.; MacQuarrie, S.; Oakes, K. D.; Mkandawire, M.; Zhang, X. Adsorption of Doxorubicin on Citrate-Capped Gold Nanoparticles: Insights into Engineering Potent Chemotherapeutic Delivery Systems. *Nanoscale* **2015**, *7* (46), 19611–19619. <https://doi.org/10.1039/c5nr05826k>.
- (161) Aryal, S.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S. Doxorubicin Conjugated Gold Nanoparticles as Water-Soluble and PH-Responsive Anticancer Drug Nanocarriers. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (42), 7879–7884. <https://doi.org/10.1039/b914071a>.
- (162) Gonçalves, M.; Mignani, S.; Rodrigues, J.; Tomás, H. A Glance over Doxorubicin Based-Nanotherapeutics: From Proof-of-Concept Studies to Solutions in the Market. *J. Control. Release* **2020**, *317* (July 2019), 347–374. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.016>.
- (163) Prabakaran, M.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S. Gold Nanoparticles with a Monolayer of Doxorubicin-Conjugated Amphiphilic Block Copolymer for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6065–6075. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.048>.
- (164) Chen, H.; Li, S.; Li, B.; Ren, X.; Li, S.; Mahounga, D. M.; Cui, S.; Gu, Y.; Achilefu, S. Folate-Modified Gold Nanoclusters as near-Infrared Fluorescent Probes for Tumor Imaging and Therapy. *Nanoscale* **2012**, *4* (19), 6050–6064. <https://doi.org/10.1039/c2nr31616a>.
- (165) Chen, W. H.; Xu, X. D.; Jia, H. Z.; Lei, Q.; Luo, G. F.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X.; Zhang, X. Z. Therapeutic Nanomedicine Based on Dual-Intelligent Functionalized Gold Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy In vivo. *Biomaterials* **2013**, *34* (34), 8798–

8807. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.084>.
- (166) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>.
- (167) Morshed, R. A.; Muroski, M. E.; Dai, Q.; Wegscheid, M. L.; Auffinger, B.; Yu, D.; Han, Y.; Zhang, L.; Wu, M.; Cheng, Y.; Lesniak, M. S. Cell-Penetrating Peptide-Modified Gold Nanoparticles for the Delivery of Doxorubicin to Brain Metastatic Breast Cancer. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (6), 1843–1854. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00004>.
- (168) Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J. A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (13), 4678–4684. <https://doi.org/10.1021/ja908117a>.
- (169) Yang, W.; Liang, H.; Ma, S.; Wang, D.; Huang, J. Gold Nanoparticle Based Photothermal Therapy: Development and Application for Effective Cancer Treatment. *Sustain. Mater. Technol.* **2019**, *22*.
- (170) Hemmer, E.; Benayas, A.; Légaré, F.; Vetrone, F. Exploiting the Biological Windows: Current Perspectives on Fluorescent Bioprobes Emitting above 1000 Nm. *Nanoscale Horizons* **2016**, *1* (3), 168–184. <https://doi.org/10.1039/c5nh00073d>.
- (171) Blakey, I.; Merican, Z.; Thurecht, K. J. A Method for Controlling the Aggregation of Gold Nanoparticles: Tuning of Optical and Spectroscopic Properties. *Langmuir* **2013**, *29* (26), 8266–8274. <https://doi.org/10.1021/la401361u>.
- (172) Link, S.; El-Sayed, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (21), 4212–4217. <https://doi.org/10.1021/jp984796o>.
- (173) Plan Sangnier, A.; Van de Walle, A.; Aufaure, R.; Fradet, M.; Motte, L.; Guénin, E.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Endosomal Confinement of Gold Nanospheres, Nanorods, and Nanoraspberries Governs Their Photothermal Identity and Is Beneficial for Cancer

- Cell Therapy. *Adv. Biosyst.* **2020**, 4 (4), 1–13. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900284>.
- (174) Vines, J. B.; Yoon, J. H.; Ryu, N. E.; Lim, D. J.; Park, H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.* **2019**, 7 (APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>.
- (175) Dreaden, E. C.; Austin, L. A.; MacKey, M. A.; El-Sayed, M. A. Size Matters: Gold Nanoparticles in Targeted Cancer Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **2012**, 3 (4), 457–478. <https://doi.org/10.4155/tde.12.21>.
- (176) Beik, J.; Khateri, M.; Khosravi, Z.; Kamrava, S. K.; Kooranifar, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Gold Nanoparticles in Combinatorial Cancer Therapy Strategies. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 387, 299–324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.025>.
- (177) Hettinga, J. V. E.; Konings, A. W. T.; Kampinga, H. H. Reduction of Cellular Cisplatin Resistance by Hyperthermia - A Review. *Int. J. Hyperth.* **1997**, 13 (5), 439–457. <https://doi.org/10.3109/02656739709023545>.
- (178) May, J. P.; Li, S. Hyperthermia-Induced Drug Targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, 10 (4), 511–527.
- (179) Schaaf, L.; Schwab, M.; Ulmer, C.; Heine, S.; Murdter, T. E.; Schmid, J. O.; Sauer, G.; Aulitzky, W. E.; Van Der Kuip, H. Hyperthermia Synergizes with Chemotherapy by Inhibiting PARP1-Dependent DNA Replication Arrest. *Cancer Res.* **2016**, 76 (10), 2868–2875. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2908>.
- (180) Yougbaré, S.; Mutalik, C.; Krisnawati, D. I.; Kristanto, H.; Jazidie, A.; Nuh, M.; Cheng, T. M.; Kuo, T. R. Nanomaterials for the Photothermal Killing of Bacteria. *Nanomaterials* **2020**, 10 (6), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano10061123>.
- (181) Wibowo, K. M.; Tun, U.; Onn, H.; Talib, A. Bin; Mersing, P.; Hidayah, N.; Tun, U.; Onn, H.; Ahmad, N. B.; Mersing, P. *A Review of Graphene Materials-Based Sensors (Chapter 6) - Current Advances in Microdevices and Nanotechnology*; 2019.
- (182) Ouzounian, A. *Elaboration et Étude Photophysique de Nouvelles Nanoparticules d' or Fonctionnalisées Par Des Phospholes*, Ecole Polytechnique X, 2009.

- (183) Zhang, G.; Keita, B.; Biboum, R. N.; Miserque, F.; Berthet, P.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Catala, L.; Nadjo, L. Synthesis of Various Crystalline Gold Nanostructures in Water: The Polyoxometalate $[H_4PMo_{12}O_{40}]^{3-}$ as the Reducing and Stabilizing Agent. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (45), 8639. <https://doi.org/10.1039/b903599k>.
- (184) Riley, R. S.; Day, E. S. Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Applications and Opportunities for Multimodal Cancer Treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2017**, *9* (4).

Chapitre II

Synthèse d'assemblages Polyoxovanadates/Nanoparticules métalliques comme agents antibiofilm

Ce chapitre est consacré à l'élaboration d'assemblages polyoxovanadates / nanoparticules métalliques actifs contre des biofilms bactériens. La première partie présente les résultats obtenus pour des assemblages POVs / nanoparticules d'or. La deuxième partie est consacrée aux résultats obtenus pour les assemblages POVs / nanoparticules d'argent.

Introduction générale

L'émergence de bactéries résistantes constitue actuellement un problème de santé publique important. Cette résistance est en partie expliquée par la consommation excessive d'antibiotiques qui a pour conséquence de limiter l'efficacité de ces traitements. Au fil du temps, les bactéries ont en effet développé des stratégies élégantes pour se protéger des agressions extérieures.¹ Une de ces stratégies est la formation de biofilms. Un biofilm est défini comme étant une association de bactéries attachée à une surface solide (émail dentaire, cathéter ou prothèse par exemple) et protégée par une matrice extracellulaire polymérique et hydratée.^{2,3} Le biofilm se forme en plusieurs étapes (Figure 1). Tout d'abord, les bactéries planctoniques (bactéries flottantes dans le milieu) vont venir s'attacher à une surface. Après cette phase d'adhésion initiale, les bactéries se divisent et sécrètent les composants de la matrice extracellulaire polymérique. Ensuite, c'est l'étape de maturation qui permet le développement de la structure tridimensionnelle du biofilm. Finalement, la dernière étape est une phase de dispersion où les bactéries se détachent du biofilm sous forme isolée ou d'agrégat afin de coloniser une autre surface. Les biofilms peuvent avoir un impact positif, notamment en industrie pour des procédés de dépollution, mais ils peuvent aussi représenter un réel danger pour la santé humaine et animale. En effet, les biofilms sont résistants à la plupart des désinfectants et se développent assez facilement dans les réacteurs de production industrielle.

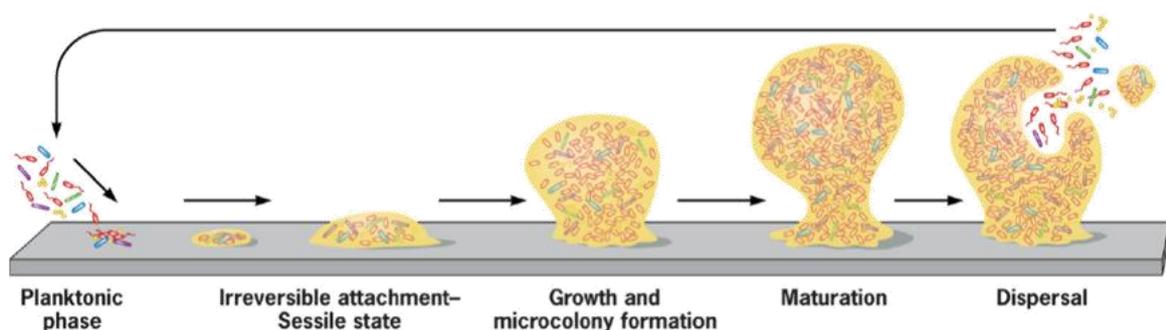


Figure 1: Les différentes étapes de formation du biofilm bactérien. Reproduite selon la référence 4.

Afin de pallier à ce problème différents traitements peuvent être envisagés, comme l'utilisation combinée de plusieurs antibiotiques. Ces traitements lourds perdent en efficacité car ils entraînent une nouvelle forme de résistance. C'est pour cela que, plus récemment, des études ont porté sur l'utilisation de nanoparticules métalliques afin d'améliorer l'efficacité des antibiotiques traditionnels ou de les remplacer (cf. chapitre 1).⁵ La stratégie développée dans ce chapitre est de combiner les propriétés antibactériennes intrinsèques des polyoxovanadates fonctionnalisés par des ligands alendronate avec les propriétés remarquables des nanoparticules d'or et d'argent. La première partie met en évidence l'efficacité des assemblages polyoxovanadates / nanoparticules d'or comme agents antibiofilm. La deuxième partie présente les assemblages polyoxovanadates / nanoparticules d'argent contre les biofilms bactériens.

Ce chapitre est divisé en trois parties : la première décrit la synthèse et la caractérisation du polyoxovanadate réduit utilisé dans cette étude. La deuxième partie présente la synthèse des nanoparticules d'or à partir de ce nouveau POV sous forme d'article scientifique.

La troisième partie présente la synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'argent ainsi que les tests antibactériens préliminaires.

Partie 1 : Synthèse et caractérisation du nouveau POV hybride $V_3(Al)_3$

Pour cette étude un nouveau polyoxovanadate réduit a été synthétisé puis utilisé comme agent réducteur et stabilisant lors de la synthèse des nanoparticules d'or et d'argent décrites dans les deux parties suivantes.

La voie de synthèse conduisant au nouveau POV réduit $V_3(Al)_3$ est basée sur la procédure développée dans notre groupe par El Moll et *al.* pour la synthèse de POMs incorporant des ligands bisphosphonates.⁹ La synthèse est effectuée en mélangeant une solution de métavanadate de sodium et de l'acide alendronique à pH = 4.7 dans l'eau. Les ions V^V sont réduits par ajout de triéthylamine, qui permet également d'augmenter le pH à 6. Le composé est obtenu sous forme de cristaux de couleur turquoise (Figure 2.B). Le POV a été caractérisé par diffraction des rayons X sur monocristal, par spectroscopie infrarouge, par analyse élémentaire et par analyse thermogravimétrique. Celui-ci est constitué de trois ions V^{IV} formant un triangle isocèle et dont les centres vanadium sont dans des environnements octaèdres distordu. Les ligands alendronate occupent les arêtes du triangle et se comportent comme des ligands tétradentates. Ils sont connectés deux à deux aux ions vanadium (Figure 2.A).

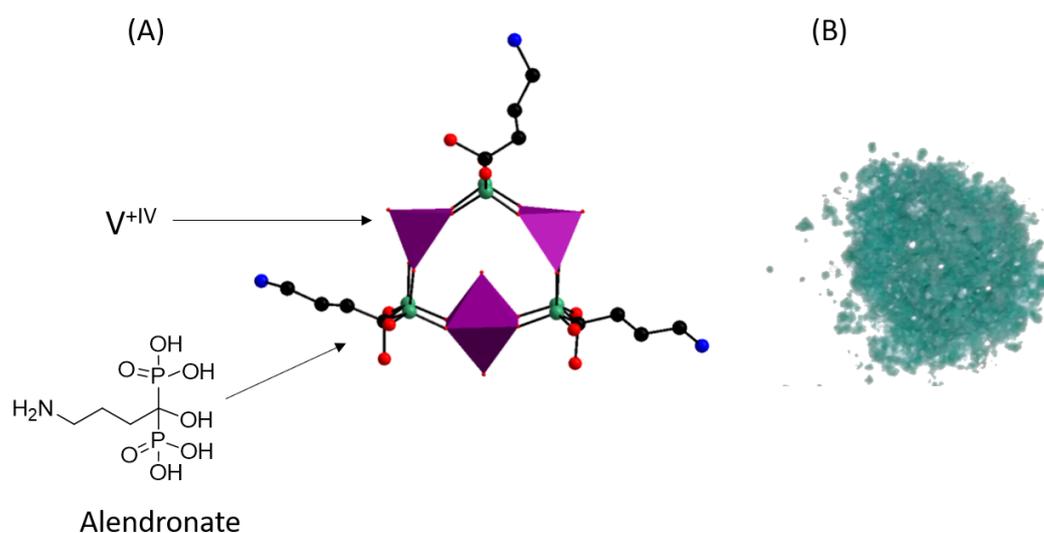


Figure 2: (A) Représentation polyédrique et boule-bâtonnet du POV réduit $V_3(Alc)_3$. (B) Photographie de cristaux du composé $V_3(Alc)_3$.

Le spectre infrarouge (Figure 3) du composé $V_3(Alc)_3$ met en évidence les bandes P-O caractéristiques des groupements phosphonates entre 1039 cm^{-1} et 1086 cm^{-1} et V-O relatives aux sites métalliques entre 929 cm^{-1} et 999 cm^{-1} . De plus, les mesures par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) indiquent des rapports P : V : Na de 6 : 3 : 3. Le rapport P/V = 2,04 déterminé par ICP-OES est également en accord avec le rapport P/V = 2 déterminé par diffraction des rayons X

L'analyse thermogravimétrique du complexe $V_3(Alc)_3$ montre trois pertes de masses attribuées au départ de molécules d'eau entre la température ambiante et 200°C , à la combustion des ligands organiques alendronate entre 200 et 450°C et enfin à la formation des oxydes métalliques au-delà de 450°C (Figure 4).

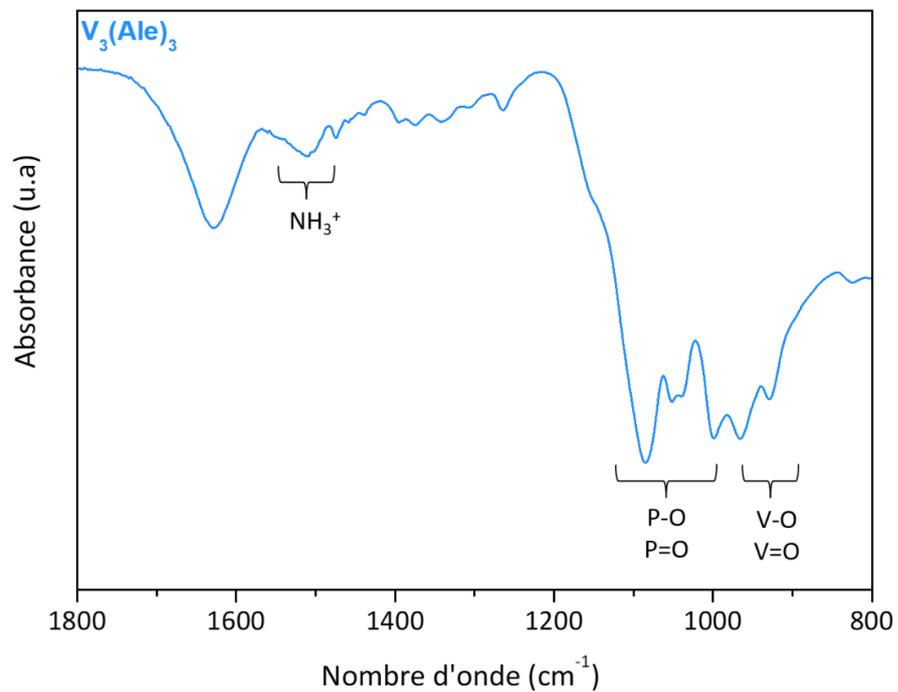


Figure 3: Spectre infrarouge du composé $V_3(Alc)_3$.

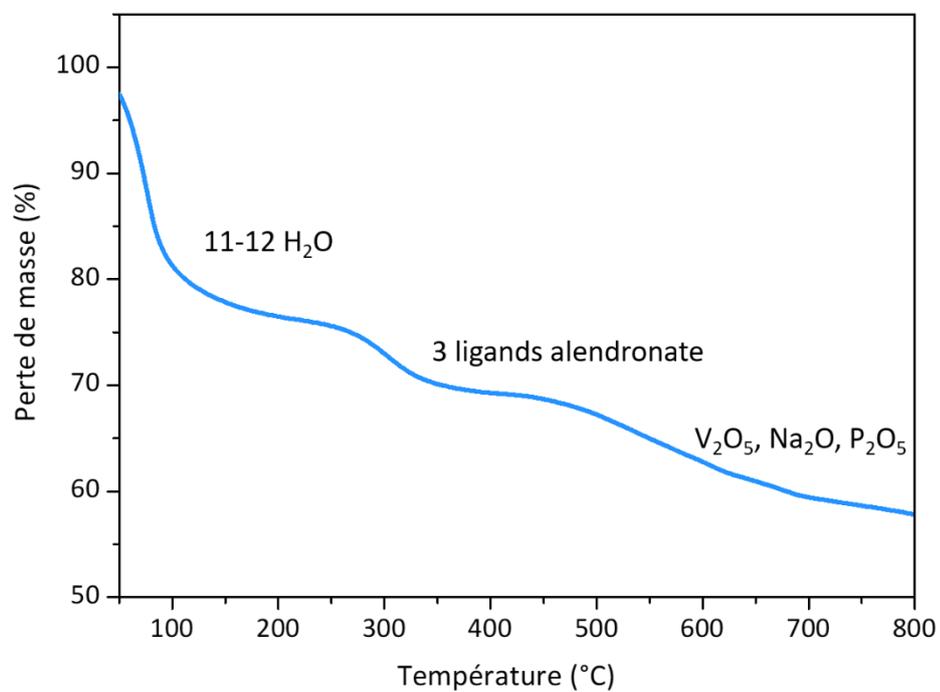


Figure 4: Courbe ATG du POM $V_3(Alc)_3$.

La combinaison de ces différentes techniques de caractérisation conduit à la formulation $\text{Na}_3[\text{V}^{\text{IV}}_3\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)(\text{OH})\text{PO}_3)_3]\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ pour ce complexe. Celle-ci est en accord avec l'analyse élémentaire effectuée sur les éléments C, H et N (formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_{49}\text{Na}_3\text{N}_3\text{O}_{35}\text{P}_6\text{V}_3$). La présence de trois centres réduit V^{IV} nous permet d'envisager son utilisation comme agent réducteur pour la formation de nanoparticules métalliques. La suite de ce chapitre présentera sous forme de publication l'obtention de nanoparticules d'or à partir de ce POV ainsi que l'étude des propriétés antibiofilm de ces assemblages.

Partie 2 : Synthèse d'assemblages AuNPs@POV comme agents antibiofilm

I. Introduction

Comme cela a été vu dans le premier chapitre, les AuNPs présentent l'avantage d'être très peu toxiques et d'être utilisées dans le domaine biomédical comme vecteurs de médicaments. De plus, l'efficacité d'assemblages AuNPs / POMs comme nouveaux agents antibactériens a été démontrée lors de précédents travaux. En particulier, Daima et al. ont montré que des AuNPs fonctionnalisées par des POMs commerciaux purement inorganiques étaient actifs sur *E. coli*.⁶ On peut noter que les propriétés antibactériennes intrinsèques de POMs inorganiques avaient déjà été mises en évidence.⁷ Mais par ailleurs, les ligands bisphosphonates (BPs)⁸ sont également reconnus pour leurs propriétés antibactériennes. Il s'avère donc judicieux d'étudier les propriétés biologiques d'entités combinant POMs et ligands BPs. De plus, leur association avec des nanoparticules d'or pourrait permettre une exaltation de leurs potentielles propriétés antibiofilm.

La synthèse de nanoparticules d'or à partir du POV $V_3(\text{Al})_3$ et les propriétés antibiofilm des composites obtenus sont ici détaillées. Cette partie sera présentée sous forme de publication.

II. Contributions

Ces travaux ont été publiés dans le journal *Nanoscale Advances* (<https://doi.org/10.1039/C9NA00401G>). La synthèse et la caractérisation du nouveau POV $V_3(\text{Al})_3$ ont été effectuées conjointement par E. López-Maya et moi-même. L'acquisition des données cristallographiques et la résolution de la structure ont été faites respectivement par J. Castells-Gil et J. Marrot. L'ICP-OES a été effectué par F. Bourdreux. Les tests antibactériens ont été faits par E. López-Maya et moi-même, sous la supervision de V. Humblot. A. Vallée, A. Dolbecq, P. Mialane, S. Boujday, V. Humblot et N. Rabasso ont supervisé ce travail. A. Vallée a écrit l'article avec l'aide et la correction de l'ensemble des auteurs.

III. Article

Nanoscale
Advances

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal | View Issue

One-pot synthesis of a new generation of hybrid bisphosphonate polyoxometalate gold nanoparticles as antibiofilm agents†

Cite this: *Nanoscale Adv.*, 2019, 1, 3400Received 25th June 2019
Accepted 29th July 2019

DOI: 10.1039/c9na00401g

rsc.li/nanoscale-advances

S. Tomane,[†] E. López-Maya,[†] S. Boujday,[†] V. Humblot,[†] J. Marrot,[†] N. Rabasso,[†] J. Castells-Gil,[†] C. Sicard,[†] A. Dolbecq,[†] P. Mialane[†] and A. Vallée^{†*}

A reduced polyoxovanadate functionalized with bisphosphonate molecules was synthesized and used to prepare in one step hybrid organic–inorganic polyoxometalate decorated gold nanoparticles. These new composites were shown to strongly inhibit *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* biofilm growth, with the three components constituting the nanoparticles (Au⁰ core, vanadium and alendronate) acting synergistically.

Nowadays, the wide use of antibiotics has led to the emergence of resistant bacteria causing serious public health problems. Antibiotic resistance currently includes all known classes of natural and synthetic compounds leading to an urgent requirement for alternatives.¹ Among the different resistance mechanisms developed by bacteria, some bacterial populations use cell attachment to solid substrates forming associations named biofilms.² Particularly, bacterial biofilms are much more resistant to antibiotics than planktonic cells because of the generation of extracellular polymeric substances, which impede the penetration of antibacterial agents that reduce the growth rates of the biofilm cells, impacting the effectiveness of antibiotics capable of targeting rapidly multiplying cells.^{3,4} Recently, the use of antimicrobial nanomaterials has attracted great attention because of their ability to disrupt the bacterial membranes and to hinder biofilm formation.^{5,6} Several nanomaterials, such as silver, copper and zinc oxide nanoparticles (NPs), exhibit intrinsic

antibacterial activity.¹ Nevertheless, their toxicity remains problematic. In contrast, it has been evidenced that gold nanoparticles (AuNPs) are non-toxic,^{7–9} and in the last decade conjugates of AuNPs with antibiotics^{10–14} or other antibacterial agents^{15–19} have been shown to improve antibacterial activity against biofilms. Besides, several polyoxometalates (POMs), which can be seen as negatively charged molecular oxides incorporating metals (mainly tungsten, molybdenum and vanadium) in high oxidation states,²⁰ have shown important antibacterial activity,^{21–26} and notably two examples of anti-biofilm POM composites have been reported in the literature.^{27,28} In this context, the use of POMs as active antibacterial agents supported by AuNPs represents a promising alternative. The relevance of this approach to the elaboration of antibacterial agents is supported by the studies of Daima *et al.*, which showed that AuNPs post-functionalized with purely inorganic commercial POMs exhibit antibacterial activity against the non-resistant *E. coli* bacteria.^{29,30} In addition, precedent studies have established that POMs containing Mo^V or V^{IV} ions can be used as reducing agents for the synthesis of a large variety of POM functionalized metallic NPs. Importantly, AuNPs consisting of a metallic core stabilized by POMs in their oxidized form have been obtained in one step, at room temperature and in water.^{31–33} This synthetic strategy has, however, only been exploited for purely inorganic reduced POMs, while the use of reduced hybrid organic–inorganic polyoxometalates could lead to antibacterial materials combining the properties of AuNPs, POMs and biologically active organic substrates. The chemistry of POMs structured by bisphosphonate ligands (BPs) has been widely studied,^{34–40} and in particular several molybdenum, tungsten and vanadium complexes incorporating the alendronate (Ale) ligand [O₃PC(C₃H₆NH₃)OPO₃]^{4–} have been obtained.^{20,41} Interestingly, it has also been shown that alendronate itself increases antibiofilm effects when combined with bioactive glass.⁴² Considering inorganic POMs, it has been evidenced that compounds incorporating vanadium centers exhibit the highest antibacterial activities.¹⁹ It follows that the study of the

*Institut Lavoisier de Versailles, UVSQ, UMR CNRS 8180, Université Paris-Saclay, 45, avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles Cedex, France. E-mail: anne.vallee@uvsq.fr

† Sorbonne Université, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), UMR CNRS 7197, 4 place Jussieu, 75252 Paris, France

† Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, UMR CNRS 8182, Université Paris-Sud, Université Paris Saclay, 15 rue Georges Clemenceau, 91405 Orsay Cedex, France

† Universidad de Valencia (ICMol), Catedrático José Beltrán-2, 46980, Paterna, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details, TGA and IR spectra, the effect of concentration on biofilm formation. See DOI: 10.1039/c9na00401g

† These authors contributed equally to this work.



Communication

antibacterial properties of systems combining alendronate molecules, POMs containing vanadium ions and AuNPs appears to be particularly attractive.

Herein, we report on the inhibition of Gram-negative and Gram-positive bacteria biofilm growth by such composites. A reduced polyoxovanadate (POV_{red}) functionalized with alendronate ligands was first synthesized. Then, the ability of this reduced POV_{red} to act as both a reducing and stabilizing agent was exploited^{32,43} to prepare in one step alendronate POV capped gold NPs (NPs@POV). In parallel, citrate-stabilized gold nanoparticles (CitNPs) functionalized with hybrid POVs in their reduced form were prepared for comparison of the activities of the two systems (Scheme 1). Finally the antibacterial properties of these new NPs@POV hybrid materials toward biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* were studied. To the best of our knowledge, this work represents the first investigation of materials associating NPs, POMs and biologically active organic substrates for antibiofilm applications.

Results and discussion

Polyoxovanadate and nanoparticle synthesis and characterization

First, a reduced polyoxovanadate (V₃(AlE)₃, also called here POV_{red}) was synthesized by mixing sodium metavanadate and alendronic acid at pH 4.7 in water. In this synthesis, the V^V ions are likely reduced by triethylamine which is added in the medium to increase the pH (see the Experimental section, ESI†). Despite numerous efforts, only low quality single-crystals were obtained. However, data collection at the synchrotron allowed solving the structure of the synthesized compound. In the structure of POV_{red}, two independent molecules are in the asymmetric unit, which only differ by the position of the alkyl chain of one of the alendronate ligands (Fig. 1 and S1, ESI†). X-ray diffraction studies thus evidence the formation of the title complex $\text{Na}_3[\text{V}_3\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)(\text{OH})\text{PO}_3)_3] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (V₃(AlE)₃). This POV_{red} is reminiscent of the zoledronate compound $\text{Na}_3[\text{V}_3\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2)(\text{OH})\text{PO}_3)_3] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

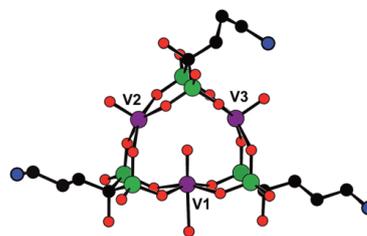
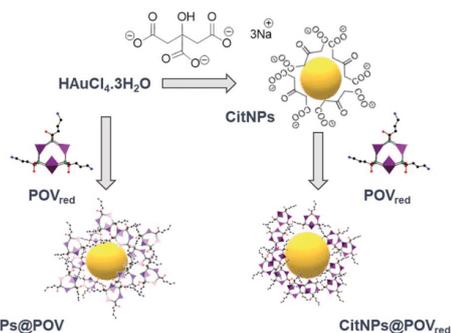


Fig. 1 Ball-and-stick representation of one of the molecules present in the structure of the V₃(AlE)₃ complex. Purple sphere = V, green spheres = P, black spheres = C, red spheres = O, blue spheres = N; H atoms are omitted for clarity.

(V₃(Zol)₃) previously characterized by some of us.⁴⁴ In both V₃(Zol)₃ and V₃(AlE)₃, three V^{IV} ions (bond valence sums for the vanadium ions in V₃(AlE)₃ = 3.80–4.05, Fig. S1, ESI†) form an isosceles triangle, with the vanadium centers being in distorted octahedral environments. Three alendronate moieties occupy the edges of the triangle, acting as tetradentate ligands by connecting two by two the vanadium ions. Each vanadium center is connected to a terminal oxygen atom ($d_{\text{V-O}} = 1.63\text{--}1.65 \text{ \AA}$). Two of these V=O bonds (V2 = O and V3 = O, Fig. 1) point to the outside of the molecule while the third one (V1 = O) points to the inside. Finally, the coordination sphere of the V1 atom is completed by a terminal water molecule while the V2 and V3 atoms are weakly bound to the O=V1 oxygen atom ($d_{\text{V-O}} = 2.76$ and 2.73 \AA , respectively). Energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy measurements are in agreement with a P : V : Na ratio of 6 : 3 : 3 (ESI†). This is confirmed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-OES), with a determined P/V ratio of 2.04. Elemental analysis further confirms the proposed formula (Experimental section, ESI†). The TGA curve (Fig. S2a, ESI†) reveals three steps that can be attributed to water removal, ligand decomposition and finally formation of inorganic oxides (final experimental weight loss 41.0%, calculated 39.0%). Finally, the infrared spectrum of POV_{red} (Fig. S2b, ESI†) presents the characteristic bands of both the P–O/P=O groups in the 1039–1086 cm⁻¹ range and P–O and V=O/V–O groups in the 929–999 cm⁻¹ range.

POV_{red} was then used to prepare in one step functionalized polyoxovanadate decorated gold nanoparticles. While reduced POVs have already been considered for the one pot preparation of metallic nanoparticles,^{45,46} it rapidly appeared that the nanoparticle synthesis protocol with the reported hybrid POV_{red} needed to be tailored. In order to prevent the POV_{red} denaturation, the synthesis was carried out by adding an aqueous solution of H₂AuCl₄ basified to pH = 6 to an aqueous solution of POV_{red} at pH = 6. Indeed, the IR spectrum of the powder obtained by dissolution in water (pH 6) of POV_{red} followed by the addition of ethanol is similar to that of POV_{red} (Fig. S2b, ESI†), strongly suggesting that the title complex is stable in this medium. Additionally, an excess of POM was used ($\gamma = [\text{H}_2\text{AuCl}_4]/[\text{POM}] = 0.3$) to ensure the total reduction of the Au^{III} ions (see the ESI† for details). The colour change of the solution



Scheme 1 Schematic representation of CitNPs, CitNPs@POV_{red} and NPs@POV synthesis.



from turquoise to pink was indicative of the formation of the NPs@POV (POV being an oxidized form of the POV_{red}) gold nanoparticles, as confirmed by the presence of a surface plasmon resonance (SPR) band at 531 nm in the UV-spectra (Fig. 2a). In parallel, the CitNPs synthesized following the Turkevich method⁴⁷ and the POV_{red} functionalized citrate nanoparticles (CitNPs@ POV_{red}), prepared according to the procedure previously described⁴⁸ for the grafting of Keggin polyoxotungstates, both show the expected narrow band centered at 520 nm characteristic of a particle size of ca. 15 nm (Fig. 2a). Note that the shift in the position of the SPR bands between the NPs@POV and CitNPs@ POV_{red} is characteristic of the different sizes of the nanoparticles.

The size and dispersion of NPs@POV, CitNPs@ POV_{red} and CitNPs were determined from Transmission Electron Microscopy (TEM) (Fig. 2b and S3, ESI†) and Dynamic Light Scattering (DLS) analyses (Fig. 2c). TEM images revealed particle sizes of 30.8 ± 9.4 , 15.1 ± 1.9 and 14.8 ± 1.9 nm for NPs@POV, CitNPs@ POV_{red} , and CitNPs, respectively. As expected, the hydrodynamic diameter measured by DLS is larger for the three different batches of particles as it takes into account the presence of hydration layers, but also of POM layers for the two decorated NPs, not visible on TEM images. Besides, the zeta potential of CitNPs@ POV_{red} (-49.6 ± 1.7 mV) is lower than the zeta potential of pristine CitNPs (-42.1 ± 3.9 mV), which can be due to the adsorption at the surface of the NPs of the triply negatively charged POV. The zeta potential of NPs@POV (-44.1 ± 2.8 mV) is slightly less negative than for CitNPs@ POV_{red} . This can be attributed to the oxidation of the V^{IV} centers during the

formation of the NPs@POV. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) has also confirmed the presence of POVs at the surface of both NPs@POV and CitNPs@ POV_{red} , with the V–O vibrations related to the POV together with the P–O vibrations and NH_3 deformations related to the alendronate ligand being observed in the IR spectra (Fig. S4 and Table S1, ESI†). ICP-OES allowed confirming the presence of V and P in stoichiometric proportions compared to the initial POV, with a P/V ratio equal to 2.0 ± 0.1 for NPs@POV and 1.9 ± 0.1 for CitNPs@ POV_{red} . Moreover, taking into account the Au/V ratio determined by ICP and the size of the NPs, the number of POV molecules per nm^2 was estimated to be 38 ± 8 for the spherical 30.8 nm NPs@POV and 23 ± 5 for the 15.1 nm CitNPs@ POV_{red} (see the ESI† for details). We can note that the coverages are too high to correspond to a monolayer, which would lead to a maximum of 6 POV per nm^2 (see the ESI† for details). Therefore, the ICP data clearly corroborate the presence of POV multilayers as previously discussed on the basis of DLS measurements.

Inhibition of Gram-negative and Gram-positive bacteria biofilm growth by CitNPs, CitNPs@ POV_{red} and NPs@POV

The optical density method ($\text{OD}_{620 \text{ nm}}$) based on crystal violet staining was used to investigate the effect of CitNPs, CitNPs@ POV_{red} and NPs@POV on *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ and *S. epidermidis* CIP 105 777 biofilm formation (see the ESI† for details).⁴⁹ These Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, represent an excellent model for biofilm growth inhibition studies as they have been shown to severely

Open Access Article. Published on 29 July 2019. Downloaded on 12/21/2020 9:20:53 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

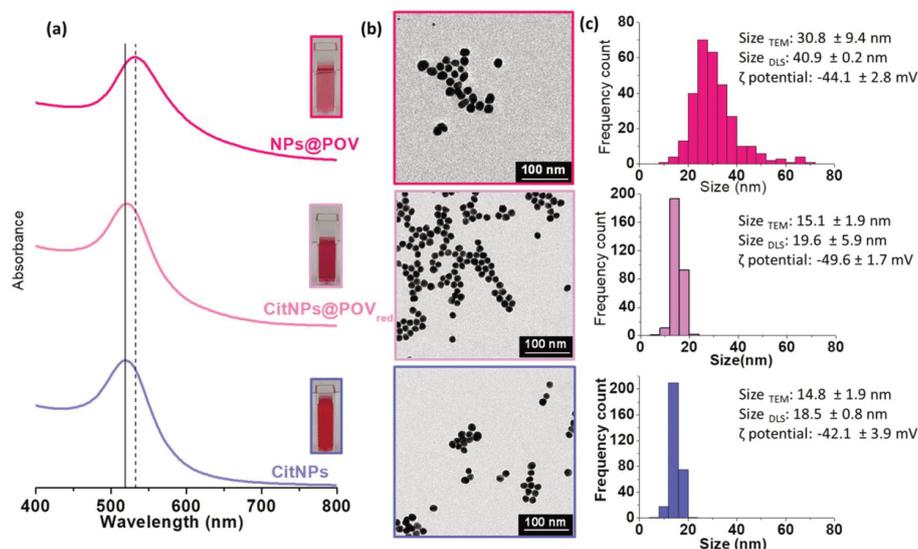


Fig. 2 Characterization of CitNPs, CitNPs@ POV_{red} and NPs@POV. UV-vis spectra and colloidal suspension pictures (inset) (a), TEM images (b) and particle size distribution histograms and dynamic light scattering size and zeta potential values (c).

develop on medical device surfaces, causing serious nosocomial infections.^{50–53} The biofilm formation was examined over periods of 24 and 48 hours (Fig. 3). The antibacterial activities of POV_{red} and alendronate at concentrations higher than those established for the functionalized NPs were also determined as references for the two different strains.

For *P. aeruginosa*, the bacterial growth was strongly inhibited after 24 hours of treatment by both NPs@POV and $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$, with a decrease of biofilm formation of ca. 60% compared to the control experiment. Noticeably, the biofilm growth inhibition is not significant for neither the unfunctionalized CitNPs nor the POV_{red} complex, when utilized separately, highlighting a synergistic effect between the AuNPs and the POV. These results suggest that the gold nanoparticles could act as carriers to improve the penetration of the POV into the bacteria. This trend is confirmed after 48 hours of treatment, with a decrease of the biofilm formation of ca. 80% for NPs@POV and $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$. Noticeably, after 48 h of treatment with alendronate and CitNPs, an antibacterial activity is observed as biofilm growth inhibition was around 60%. However this antibacterial effect remains lower than the one observed for POV decorated nanoparticles, confirming the synergistic effect.

To investigate the possible influence of the particle size on the antibacterial activity, the inhibitory effects of citrate gold particles functionalized with POV_{red} ($\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$) with two different sizes (15 and 47 nm) were investigated on *P. aeruginosa*. The synthesis and characterization of the 47 nm diameter AuNPs are described in the ESI (see the Experimental section and Fig. S5†). The antibacterial activities of the 15 and 47 nm NPs were found to be similar (Fig. S6†). Therefore, we can

assume that the size of the nanoparticles cannot be regarded as a determining factor influencing the antibacterial activity.

Focusing now on *S. epidermidis*, Fig. 3b, it was observed that only the NPs@POV induce a significant decrease of the biofilm formation starting after 24 h of treatment, and, very interestingly, this effect is very strong (>80%). The high antibacterial activity of the NPs@POV compared to the absence of activity of the $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$ against *S. epidermidis* can be tentatively attributed to the oxidation state of the vanadium centers (V^{IV} in $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$ and V^{V} in NPs@POV). Finally, we can also note that the antibiofilm activity of the NPs@POV against *S. epidermidis* remains unchanged after an additional 24 h.

The effect on the biofilm growth of the NPs@POV concentration in the 0.1–1 nM range was also studied for both strains (Fig. S7, ESI†). For a concentration of 0.1 nM, a decrease of the *P. aeruginosa* biofilm formation of 50% after 24 h of treatment was observed, with no further evolution after 24 h. At 0.2 nM, a decrease of 60% after 24 h and 80% after 48 h was determined, indicating that a 0.2 nM concentration of NPs@POV is sufficient to obtain a strong antibacterial effect against this strain. Regarding *S. epidermidis*, a decrease of the biofilm formation of 40 and 70% upon 24 and 48 h of treatment, respectively, was observed for a concentration of 0.6 nM. The maximum antibacterial effect was found for a concentration of 1 nM, with ca. 80% inhibition of the biofilm formation after 24 h.

In order to observe possible changes of the morphology of bacteria, scanning electron microscopy (SEM-FEG) micrographs of the *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* were recorded after 24 h in the presence and in the absence of NPs@POV (Fig. S8, ESI†). We used NPs@POV as an example as these hybrids show a good antibacterial activity against both bacterial strains.

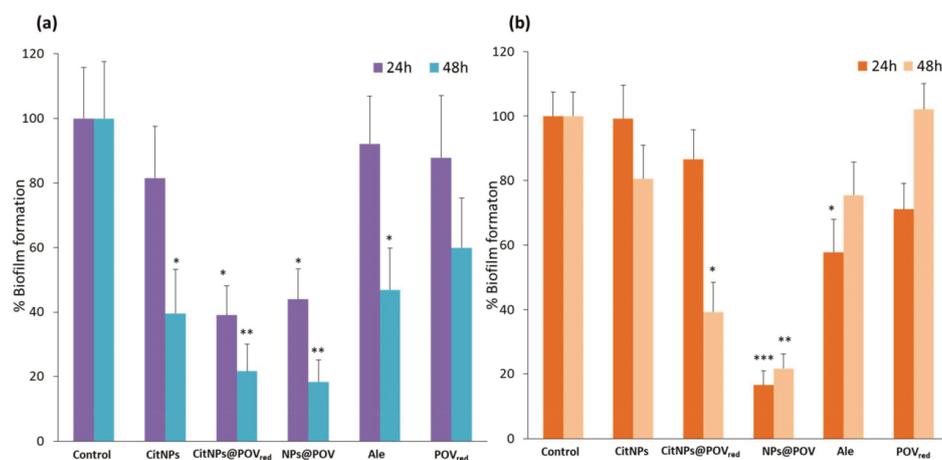


Fig. 3 The effect of CitNPs (1.3 nM), $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$ (1.3 nM), NPs@POV (1.0 nM), alendronate (540 μM), and POV_{red} (180 μM) on biofilm formation by (a) *P. aeruginosa* and (b) *S. epidermidis* after incubation for 24 and 48 h in 96-well plates. The values of the experimental groups were compared with the control group. Statistical significance was analyzed by Students' *t*-test to detect the presence of statistically significant differences (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). For CitNPs, $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$ and NPs@POV the numbers in brackets correspond to the concentration of gold nanoparticles.



The SEM images of the two bacterial strains without treatment showed intact bacterial membranes with *P. aeruginosa* exhibiting a rod like shape (Fig. S8a, ESI†) and *S. epidermidis* exhibiting a spherical shape (Fig. S8c, ESI†). In contrast, the cell envelopes of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* treated with NPs@POV are damaged and appear pierced causing the leakage of the cytoplasmic content and the collapse of the bacteria (Fig. S8b and d, ESI†). From these results, it could be concluded that NPs@POV seriously affect the bacterial membrane integrity causing bacterial death. The exact antibacterial mechanism is, however, not well elucidated and will be investigated in future studies.

Conclusions

In conclusion, we have used a new reduced polyoxovanadate $V_3(Al)_6$, incorporating the biologically relevant alendronate ligand to prepare in one-pot, in water, at room temperature and in the absence of any additional surfactant the hybrid functionalized gold nanoparticles NPs@POV. The optimized synthetic protocol produced size-controlled monodisperse stable NPs. The POV_{red} thus acts as a reducing agent but also as capping agent to stabilise the nanoparticles. The nanocomposites were thoroughly characterized by TGA, ATR-FTIR, UV-Vis, DLS, TEM, EDX and elemental analysis experiments. The high antibiofilm activity of NPs@POV towards both the Gram-negative and Gram-positive resistant bacteria was evidenced. Importantly, comparative studies strongly suggest that the three components constituting the NPs@POV (Au^0 core, vanadium and alendronate) act synergistically. The activity of POV_{red} functionalized citrate gold nanoparticles, CitNPs@ POV_{red} , was also studied, allowing us to conclude that the oxidation state of the vanadium centers constituting the POM may play a significant role in the inhibition of Gram-positive bacteria biofilm growth. This work, which to the best of our knowledge represents the first investigation of POM-functionalized NPs for antibiofilm applications, opens the way to a new generation of antibiofilm agents. We are currently investigating the influence of the nature of the polyoxometalate on the biological properties of such nanocomposites. Also, an advantage of alendronate is that it can be easily functionalized *via* its amino group. We are thus also presently working on the elaboration and the investigation of the inhibition of biofilm growth activity of antibiotic/alendronate/polyoxometalate NP systems.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS, the Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines and a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program no. ANR-11-IDEX-0003-02 and CHARMMMAT ANR-11-LABX-0039.

Notes and references

- P. V. Baptista, M. P. McCusker, A. Carvalho, D. A. Ferreira, N. M. Mohan, M. Martins and A. R. Fernandes, *Front. Microbiol.*, 2018, **9**, 1–26.
- L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton and P. Stoodley, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, **2**, 95–108.
- D. Davies, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2003, **2**, 114–122.
- P. S. Stewart and J. W. Costerton, *Lancet*, 2001, **358**, 135–138.
- G. R. Rudramurthy, M. K. Swamy, U. R. Sinniah and A. Ghasemzadeh, *Molecules*, 2016, **21**, 1–30.
- C. W. Chen, C. Y. Hsu, S. M. Lai, W. J. Syu, T. Y. Wang and P. S. Lai, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, **78**, 88–104.
- J. Conde, M. Larginho, A. Cordeiro, L. R. Raposo, P. M. Costa, S. Santos, M. S. Diniz, A. R. Fernandes and P. V. Baptista, *Nanotoxicology*, 2014, **8**, 521–532.
- X. Li, S. M. Robinson, A. Gupta, K. Saha, Z. Jiang, D. F. Moyano, A. Sahar, M. A. Riley and V. M. Rotello, *ACS Nano*, 2014, **8**, 10682–10686.
- U. Rajchakit and V. Sarojini, *Bioconjugate Chem.*, 2017, **28**, 2673–2686.
- Y. Zhao and X. Jiang, *Nanoscale*, 2013, **5**, 8340–8350.
- M. Rai, A. P. Ingle, R. Pandit, P. Paralikar, I. Gupta, M. V. Chaud and C. A. dos Santos, *Int. J. Pharm.*, 2017, **532**, 139–148.
- A. N. Brown, K. Smith, T. A. Samuels, J. Lu, S. O. Obare and M. E. Scott, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 2768–2774.
- T. Roshmi, K. R. Soumya, M. Jyothis and E. K. Radhakrishnan, *Gold Bull.*, 2015, **48**, 63–71.
- H. Mu, J. Tang, Q. Liu, C. Sun, T. Wang and J. Duan, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 1–9.
- G. Vinoj, R. Pati, A. Sonawane and B. Vaseeharan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, **59**, 763–771.
- Q. Yu, J. Li, Y. Zhang, Y. Wang, L. Liu and M. Li, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 1–14.
- M. Ramasamy, J. H. Lee and J. Lee, *Colloids Surf., B*, 2017, **160**, 639–648.
- X. Zhao, Y. Jia, J. Li, R. Dong, J. Zhang, C. Ma, H. Wang, Y. Rui and X. Jiang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 29398–29406.
- Y. Feng, W. Chen, Y. Jia, Y. Tian, Y. Zhao, F. Long, Y. Rui and X. Jiang, *Nanoscale*, 2016, **8**, 13223–13227.
- A. Dolbecq, E. Dumas, C. R. Mayer and P. Mialane, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 6009–6048.
- A. Bijelic, M. Aureliano and A. Rompel, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 1153–1169.
- N. I. Gumerova, E. Al-Sayed, L. Krivosudský, H. Čipčić-Paljetak, D. Verbanac and A. Rompel, *Front. Chem.*, 2018, **6**, 1–9.
- T. Yamase, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 4773.
- A. Kubo, L. Kremer, S. Herrmann, S. G. Mitchell, O. M. Bondarenko, A. Kahru and C. Streb, *ChemPlusChem*, 2017, **10130**, 867–871.
- P. Yang, B. S. Bassil, Z. Lin, A. Haider, G. Alfaro-Espinoza, M. S. Ullrich, C. Silvestru and U. Körtz, *Chem.–Eur. J.*, 2015, **21**, 15600–15606.



Communication

- 26 P. Yang, Z. Lin, G. Alfaro-Espinoza, M. S. Ullrich, C. I. Raç, C. Silvestru and U. Kortz, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 251–258.
- 27 A. Misra, I. Franco Castillo, D. P. Müller, C. González, S. Eyssautier-Chuine, A. Ziegler, J. M. de la Fuente, S. G. Mitchell and C. Streb, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2018, **57**, 14926–14931.
- 28 R. H. Piva, M. C. Rocha, D. H. Piva, H. Imasato, I. Malavazi and U. P. Rodrigues-Filho, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 30963–30972.
- 29 H. K. Daima, P. R. Selvakannan, A. E. Kandjani, R. Shukla, S. K. Bhargava and V. Bansal, *Nanoscale*, 2014, **6**, 758–765.
- 30 H. K. Daima, P. R. Selvakannan, R. Shukla, S. K. Bhargava and V. Bansal, *PLoS One*, 2013, **8**, 1–14.
- 31 A. Dolbecq, J. D. Compain, P. Mialane, J. Marrot, F. Sécheresse, B. Keita, L. R. B. Holzle, F. Miserque and L. Nadjo, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 733–741.
- 32 G. Zhang, B. Keita, R. N. Biboum, F. Miserque, P. Berthet, A. Dolbecq, P. Mialane, L. Catala and L. Nadjo, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 8639–8644.
- 33 U. Jameel, M. Zhu, X. Chen and Z. Tong, *J. Mater. Sci.*, 2016, **51**, 2181–2198.
- 34 R. Ban, X. Sun, J. Wang, P. Ma, C. Zhang, J. Niu and J. Wang, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 5856–5863.
- 35 L. Yang, Z. Zhou, J. Wang and J. Niu, *Cryst. Growth Des.*, 2013, **4**, 2540–2547.
- 36 A. Banerjee, F. S. Raad, N. Vankova, B. S. Bassil, T. Heine and U. Kortz, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 11667–11675.
- 37 U. Kortz, G. B. Jameson and M. T. Pope, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 2659–2660.
- 38 A. Banerjee, B. S. Bassil, G. V. Rösenthaller and U. Kortz, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 7590–7604.
- 39 A. Saad, W. Zhu, G. Rousseau, P. Mialane, J. Marrot, M. Haouas, F. Taulelle, R. Dessapt, H. Serier-Brault, E. Rivière, T. Kubo, E. Oldfield and A. Dolbecq, *Chem.–Eur. J.*, 2015, **21**, 10537–10547.
- 40 C. Peloux, P. Mialane and A. Dolbecq, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **542**, 2808–2810.
- 41 J. D. Compain, P. Mialane, J. Marrot, F. Sécheresse, W. Zhu, E. Oldfield and A. Dolbecq, *Chem.–Eur. J.*, 2010, **16**, 13741–13748.
- 42 A. K. Hiltunen, M. E. Skogman, K. Rosenqvist, H. Juvonen, P. Ihalainen, J. Peltonen, A. Juppoo and A. Fallarero, *Int. J. Pharm.*, 2016, **501**, 211–220.
- 43 Y. Wang and I. A. Weinstock, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 7479–7496.
- 44 H. El Moll, W. Zhu, E. Oldfield, L. M. Rodriguez-Albelo, P. Mialane, J. Marrot, N. Vila, I. M. Mbomekallé, E. Rivière, C. Duboc and A. Dolbecq, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 7921–7931.
- 45 Y. Y. Bao, L. H. Bi and L. X. Wu, *J. Solid State Chem.*, 2011, **184**, 546–556.
- 46 R. Liu, S. Li, X. Yu, G. Zhang, S. Zhang, J. Yao, B. Keita, L. Nadjo and L. Zhi, *Small*, 2012, **8**, 1398–1406.
- 47 J. Tukevich, P. C. Stevenson and J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, 1951, **11**, 55–75.
- 48 Y. Wang, A. Neyman, E. Arkhangelsky, V. Gitis, L. Meshi and I. A. Weinstock, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 17412–17422.
- 49 H. Mu, A. Zhang, L. Zhang, H. Niu and J. Duan, *Food Control*, 2014, **38**, 215–220.
- 50 K. Niemirowicz, I. Swiecicka, A. Z. Wilczewska, I. Misztalewska, B. Kalska-Szostko, K. Bienias, R. Bucki and H. Car, *Int. J. Nanomed.*, 2014, **9**, 2217–2224.
- 51 M. Klausen, A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aes-Jørgensen, S. Molin and T. Tolker-Nielsen, *Mol. Microbiol.*, 2003, **48**, 1511–1524.
- 52 F. Barbier and M. Wolff, *Med. Sci.*, 2010, **26**, 960–968.
- 53 M. Otto, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, **7**, 555–567.



Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale Advances.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

**One-pot synthesis of a new generation of hybrid bisphosphonate
polyoxometalate gold nanoparticles as antibiofilm agents**

S. Tomane, E. López-Maya, S. Boujday, V. Humblot, J. Marrot, N. Rabasso, J. Castells-Gil, C.
Sicard, A. Dolbecq, P. Mialane, and A. Vallée

SUPPORTING INFORMATION

Materials.....	4
Synthesis.....	4
• Polyoxovanadate : $\text{Na}_3[\text{V}_3\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)(\text{OH})\text{PO}_3)_3] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (V_3Al_e_3 or POV_{red})	4
• Gold nanoparticles using POV_{red} as reducing and stabilizing agent (NPs@POV).....	4
• Citrate-protected gold nanoparticles (CitNPs).....	5
• Functionalization of citrate-protected gold nanoparticles with POV_{red} ($\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$)	5
Characterization Techniques.....	5
Thermal Gravimetric Analysis	5
ATR-FTIR spectroscopy	5
UV-Visible spectroscopy.....	5
Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.....	5
Transmission Electron Microscopy	6
Dynamic Light Scattering.....	6
Zeta Potential Measurements.....	6
Calculation method of the coverage ratio :	6
Estimation of coverage ratio for monolayer :	7
Crystallographic data.....	8
Antibacterial activity	9
Observation of bacteria morphology by Microscopy	10

Fig. S1 : Ball-and-stick representations of the two independent molecules in the structure of the polyoxovanadate $V_3(Al)_3$, V-O bond distances and bond valence sums for the vanadium ions. Purple spheres = V, green spheres = P, red spheres = O, black spheres = C, blue spheres = N, H atoms have been omitted for clarity..... 9

Fig. S2 (a) TGA curve and Derivative weight and (b) ATR-FTIR spectrum of the polyoxovanadate $V_3(Al)_3$ as synthesized and after dissolution–reprecipitation. 10

Fig. S3 TEM images used to obtain the size histograms of (a) CitNPs, (b) CitNPs@POV_{red} and (c) NPs@POV. 11

Fig. S4 ATR-IR spectra of POV_{red} (black), NPs@POV (purple) and CitNPs@POV_{red} (red)..... 12

Fig. S5 Characterization of 47nm CitNPs@POV_{red}. UV-vis spectrum (a), TEM image (b) 13

Fig. S6 Effect of the size of CitNPs@POV red on biofilm formation for *P. aeruginosa* ATCC® 27853TM after incubation for 24h in 96-well plates. Statistical significance (Student’s T-test):*** p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 versus control. 13

Fig. S7 Effect of the concentration of NPs@POV on biofilm formation for *P. aeruginosa* ATCC® 27853TM (top) and *S. epidermidis* CIP 105 777 (bottom) after incubation for 24 and 48h in 96-well plates. Statistical significance (Student’s T-test):*** p<0.001, **p<0.0..... 14

Fig. S8 SEM micrographs of untreated cells of *P. aeruginosa* (a) and after interaction with NPs@POV (b) and *S. epidermidis* (c) and after interaction with NPs@POV (d)..... 15

Materials. Sodium metavanadate, sodium citrate, gold(III) chloride trihydrate and rubidium chloride were purchased from Sigma-Aldrich. Triethylamine was obtained from Acros Organics. Alendronic acid $\text{H}_2\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2)(\text{OH})\text{PO}_3\text{H}_2$ (Ale) was synthesized as previously described.¹

Milli-Q water (18 M Ω , Millipore, France) was used for the preparation of gold nanoparticles. All glassware used was cleaned with *aqua regia*, then carefully rinsed with Milli-Q water before use.

Bacterial strains *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853TM) were obtained from American type culture collection and *Staphylococcus epidermidis* (CIP 105 777) were obtained from the Collection of Institut Pasteur. Media were purchased from Conda Laboratory (Spain).

Synthesis

- **Polyoxovanadate :** $\text{Na}_3[\text{V}_3\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)(\text{OH})\text{PO}_3)_3]\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (V_3Ale_3 or **POV_{red}**)

To a solution of $\text{NaVO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.067 g, 0.55 mmol) in 5 mL of water was added alendronic acid (0.124 g, 0.50 mmol). The solution was stirred for 1 h at room temperature, and triethylamine was added dropwise to pH = 6. Then, the pH was adjusted to 4.7 with 1M HCl. The solution was stirred for 2 h at reflux, then left to evaporate at room temperature. Green crystals were collected after 2 days and washed with 2M NaCl. Yield 0.105 g (52% based on V). Anal. Calc. (found) for $\text{C}_{12}\text{H}_{49}\text{Na}_3\text{N}_3\text{O}_{35}\text{P}_6\text{V}_3$ (1202.41 g mol⁻¹): C 11.97 (12.25), H 4.10 (3.70), N 3.49 (3.53). IR (FTIR): ν (cm⁻¹): 1629 (s), 1508 (w), 1086 (s), 1051(m), 1039(m), 999 (s), 966 (s), 929 (m).

- **Gold nanoparticles using POV_{red} as reducing and stabilizing agent (NPs@POV)**

2.5 mL of an aqueous solution of POV_{red} (1.7 mM) were added at once to 2.5 mL of an aqueous solution of HAuCl_4 (0.5 mM) at pH = 6 adjusted with 0.5 M K_2CO_3 aqueous solution. The reaction was heated to 50°C for 1 hour. Then, the nanoparticles were centrifuged at 4000 rpm for 25 min. The colorless supernatant was removed and the nanoparticles were dispersed in 5mL of Milli-Q water.

- **Citrate-protected gold nanoparticles (CitNPs)**

The 15 nm colloidal gold nanoparticles were prepared following the method introduced by Turkevich.² 95 mL of a chlorauric acid HAuCl_4 (263 μM) solution were refluxed for 30 min and 5 mL of a sodium citrate (34 mM) solution added. The reduction of the gold ions by the citrate was completed after 5 min. The solution was further refluxed for 30 min and then left to cool to room temperature. Then, the colloidal solution was centrifuged at 14500 rpm for 15 min, and the colorless supernatant removed. The nanoparticles were dispersed in Milli-Q water, affording spherical nanoparticles with an average diameter of ca. 15 nm.

The 47 nm citrate-protected gold nanoparticles were synthesized mixing a solution A (20 mL of a chlorauric acid HAuCl_4 (360 μM)) and solution B (5mL of sodium citrate (2 μM)). Solution A and B were heated to 60°C under stirring then mixed. As the solution turned red, the mixture was heated up to 95°C for few minutes and finally cooled on ice. Then, the colloidal solution was washed as the 15 m citrate-protect gold nanoparticles.

- **Functionalization of citrate-protected gold nanoparticles with POV_{red} (CitNPs@ POV_{red})**

1.5 mL of an aqueous solution of POV_{red} (2.5 mM) were added with stirring to a vial containing 1.5 mL of an aqueous suspension of citrate-protected gold nanoparticles (CitNPs) prepared as described above. The solution was stirred for 20 h. Afterwards, the nanoparticles were centrifuged at 14500 rpm for 15 min and the colorless supernatant was removed. The colloidal solution was dispersed in 5 mL of Milli-Q water.

Characterization Techniques

Thermal Gravimetric Analysis were performed, in air atmosphere, on a Mettler Toledo-TGA equipment. The ramp rate was 5°C.min⁻¹ and the sample was placed in an aluminum pan.

ATR-FTIR spectroscopy measurements were performed on a Nicolet 30 ATR 6700 FT spectrometer with scan range from 4000 to 400 cm⁻¹.

UV-Visible spectroscopy spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 750.

Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry : P, V, and Au contents were determined on previously acid digested samples in aqueous solution on an Agilent

Technologies 700 Series ICP-OES instrument. The digestion procedure was carried out by the addition of a 0.5 mL 10% HNO₃:HCl (v/v) solution to 0.5 mL of each nanoparticle solution. After the digestion process (90 min), the samples were diluted with 4 mL of 2.5% HNO₃/HCl (v/v) and 2 mL of MilliQ water.

Transmission Electron Microscopy : Transmission electron microscopy (TEM) measurements were performed using a JEOL JEM 1011 microscope operating at an accelerating voltage of 100 kV. The TEM grids were prepared by depositing 10 µL of a particle suspension on a carbon-coated copper grid, and dried at room temperature. The nanoparticles size distribution was calculated by measuring a minimum of 300 particles using the ImageJ software.

Dynamic Light Scattering : Batch mode hydrodynamic size (diameter) measurements were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS. A minimum of three measurements per sample were made.

Zeta Potential Measurements : A Malvern Zetasizer Nano ZS instrument was used to measure zeta potential at 25°C for all samples. Samples prepared for the DLS measurements were loaded into a pre-rinsed folded capillary cell for the zeta potential measurements. A minimum of three measurements per sample were made.

Calculation method of the coverage ratio :

The POM/Au⁰ nanoparticle coverage ratio σ was calculated considering the following formula:

$$\sigma = \frac{N_{POM}}{N_{AuNps} S_{AuNps}}$$

where N_{POM} is the total number of POM molecules by liter, N_{AuNps} the total number of gold nanoparticles by liter and S_{AuNps} the surface of one gold nanoparticle, with:

$$N_{POM} = \frac{w_V N_A}{M_{(V)} \times 3}, w_V \text{ being the vanadium mass concentration.}$$

N_{AuNps} is equal to the number of Au atoms by liter divided by the number of Au atoms in a particle and can be written:

$$N_{AuNps} = \frac{w_{Au} N_A}{V_{AuNps} / V_{Au}}, \quad V_{AuNps} = \frac{\pi d^3}{6} \quad (d = \text{nanoparticle average diameter (nm)}) \text{ being the}$$

volume of one gold nanoparticle and $V_{Au} = \frac{M_{Au}}{N_A \rho_{Au}}$ the volume of a gold atom.

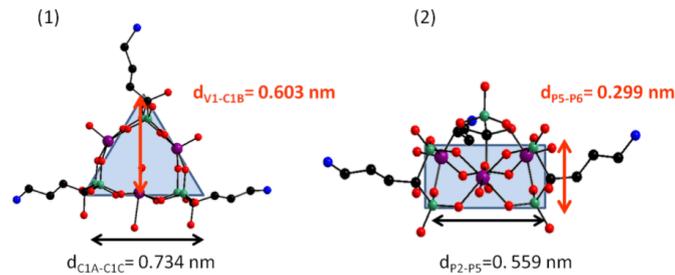
The equation can thus be written:

$$\sigma = \frac{N_{POM}}{N_{AuNps} S_{AuNps}} = \frac{w_V d N_A \rho_{Au}}{18 M_V \times w_{Au}}$$

With $S_{AuNps} = \pi d^2$ and w_V and w_{Au} being measured by ICP.

Estimation of coverage ratio for one monolayer :

We can estimate the coverage ratio for a POV's monolayer. The POV can adopt two positions on the gold nanoparticles surface.



	(1)	(2)
Surface of POV (nm ²)	0.221	0.168
Surface of 30.8 nm gold nanoparticle (nm ²)	2980.24	2980.24
Number of POV for 1 gold nanoparticle	13425	17739
Coverage ratio for a monolayer (POV/nm ²)	5	6

Crystallographic data

The data were measured at the XALOC beamline of the ALBA synchrotron ($\lambda = 0.72931 \text{ \AA}$) at 100 K using a MD2M single axis diffractometer (Maatel, France) and a Pilatus 6M detector (Dectris, Switzerland).

The crystal was taken directly from its solution, mounted with a drop of Paratone-N oil and immediately put into the cold stream of dry N_2 on the goniometer and kept at 100 K with a CryoStream 700 (Oxford Cryosystems, UK). X-ray diffraction data were collected in rotation steps of 1° over a total range of 360° . The X-ray diffraction images were indexed, integrated and scaled using the XDS package^{4,5} and scaled with SCALA from the CCP4 suite.⁶

The structure was solved with the SHELXT⁷ structure solution program, using the Intrinsic Phasing solution method. The model was refined with version 2018/3 of SHELXL⁸ using Least Squares minimisation.

Empirical formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{Na}_3\text{O}_{32.75}\text{P}_6\text{V}_3$, formula weight (g): 1144.97, crystal system: triclinic, space group: $P-1$, a (\AA) = 13.241(3), b (\AA) = 18.055(4), c (\AA) = 21.996(4), α ($^\circ$) = 99.43(3), β ($^\circ$) = 90.12(3), γ ($^\circ$) = 90.58(3), V (\AA^3) = 5187.2, $Z = 4$, ρ_{calc} (g cm^{-3}) = 1.466, μ (mm^{-1}) = 0.88, data (parameters): 27527 (1066), $R_{\text{int}} = 0.106$, GOF = 1.02, $R_1(>2\sigma(I)) = 0.134$, $wR_2 = 0.341$.

The complete data can be found in the cif file (CCDC 1926180).

There are two independent molecules in the unit cell (Fig. S1), which differ by the position of the alkyl chain of one of the alendronate ligand. In the first molecule, the ligands are not disordered while in the second molecule the ligand is disordered over two positions with equal occupancy factors.

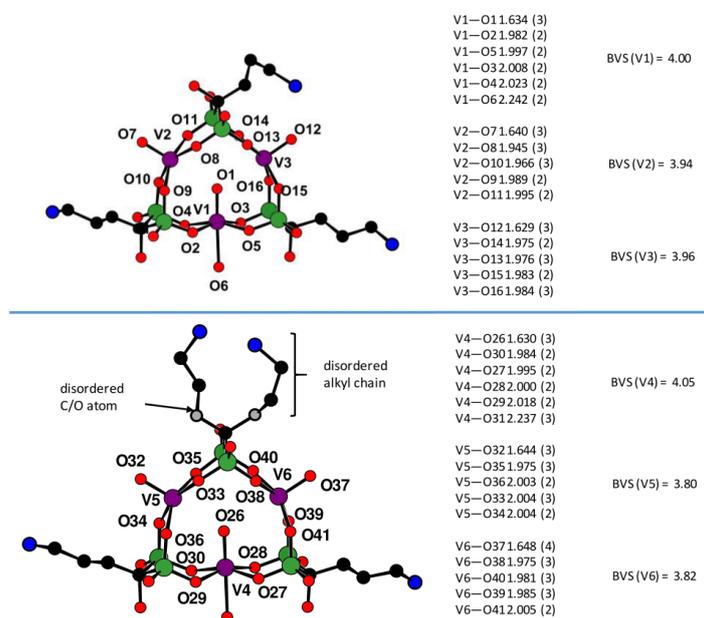


Fig. S1 : Ball-and-stick representations of the two independent molecules in the structure of the polyoxovanadate $V_3(Ale)_3$, V-O bond distances and bond valence sums for the vanadium ions. Purple spheres = V, green spheres = P, red spheres = O, black spheres = C, blue spheres = N, H atoms have been omitted for clarity.

Antibacterial activity

The gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™) and the gram-positive bacteria *Staphylococcus Epidermidis* (CIP 105 777) were grown on Lysogeny Broth (LB) plates and Mueller-Hinton (MH) plates, respectively, at 37°C for 24 h. A single colony was inoculated in LB or MH medium and grown in shaker incubator at 150 rpm at 37°C. After incubation overnight, bacteria cells were suspended in media.

Biofilm assays were carried out following the procedure described by H. Mu et al.³ 100µL (10^6 CFU) of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* solution were added to individual wells of a sterile 96-well microtiter plates. The plates were incubated at 37 °C for 24 h to allow biofilm formation.

Then, the supernatant containing non-adhered cells was removed and the wells were washed three times using 0.9% (w/v) NaCl solutions. Afterwards, existing biofilms were

incubated at 37 °C in 90 μ L of culture medium and 10 μ L of each nanoparticle solution for 24 h and 48 h. Bacteria incubated with medium only were used as control.

After different incubation times the media from each well were removed with a pipette and the plates were gently washed three times with 0.9% NaCl solutions. The plates were air dried at room temperature. Then the biofilm was stained by adding 100 μ L of crystal violet (1%, w/v) for 20 min. Excess crystal violet was gently removed by washing. The biofilm material was then solubilized in 150 μ L of acetic acid⁴ and quantified by measuring the OD₆₂₀ using a microtiter plate reader (Multiskan™ FC, ThermoFisher Scientific). All assays were performed at least 10 times.

Data were expressed as mean \pm standard deviation. The values of the experimental groups were compared with the control group. Statistical significance was analyzed by Student's T-test to detect the presence of statistically significant differences (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$). All tests were repeated at least 10 times.

Observation of bacteria morphology by Microscopy

Bacterial morphology analyses were carried out by SEM-FEG imaging, in order to visualize the potential effect of functionalized gold nanoparticles (NPS@POV) upon contact with bacteria.

Since SEM-FEG observations is a high vacuum technique, gold surfaces were prepared by fixing bacterial state using glutaraldehyde reticulation.

Thus, surfaces were immersed 2 h in 2.5% glutaraldehyde (v/v in PBS) solution. After PBS rinsing, surfaces were gently dried using ethanol solutions of increasing concentrations (25, 50, 75, 96 and 100%) before being dried.

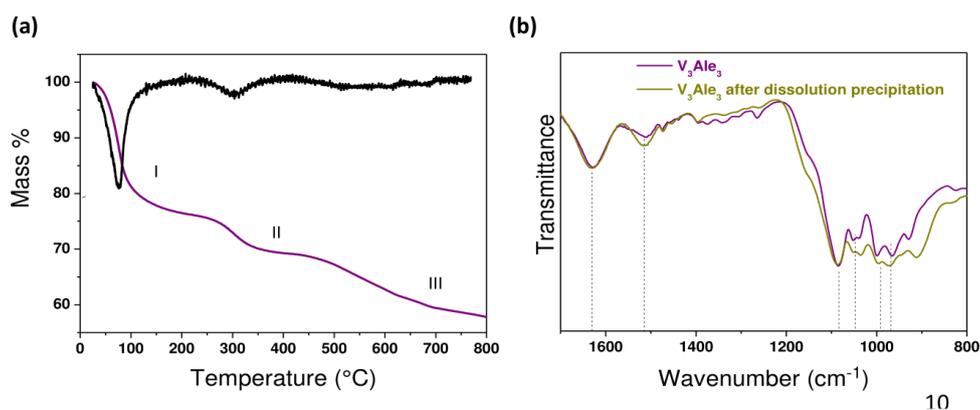


Fig. S2 (a) TGA curve and Derivative weight and (b) ATR-FTIR spectrum of the polyoxovanadate $V_3(Al)_3$ as synthesized and after dissolution–precipitation.

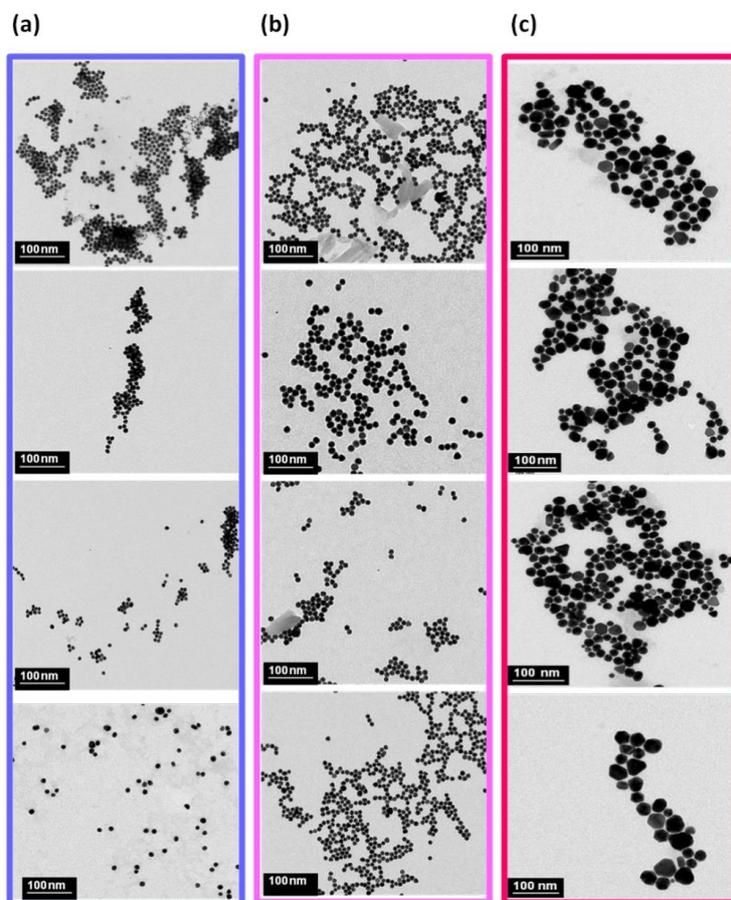


Fig. S3 TEM images used to obtain the size histograms of (a) CitNPs, (b) CitNPs@POV_{red} and (c) NPs@POV.

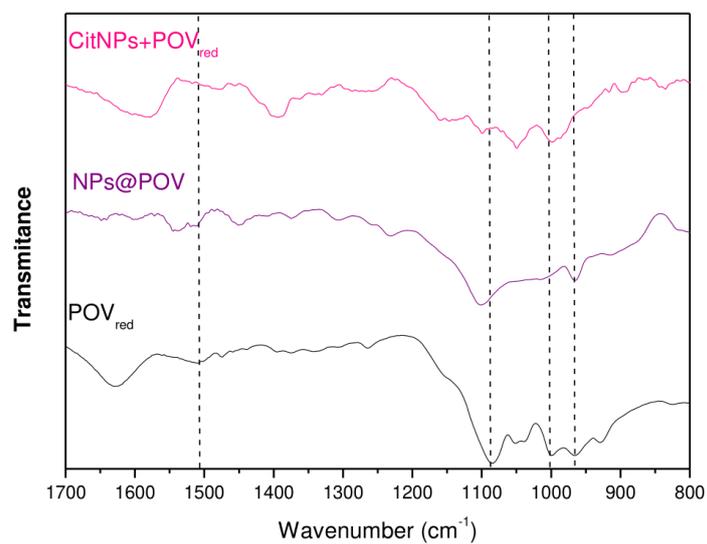


Fig. S4 ATR-IR spectra of POV_{red} (black), NPs@POV (purple) and $\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$ (red).

Table S1 Infrared Frequencies and Vibrational Assignments for POV , NPs@POVox and CitNPs@POV

Assignment	POV_{red}	NPs@POV	$\text{CitNPs@POV}_{\text{red}}$
$\delta_s (\text{NH}_2)$		1598	1577
$\delta_s (\text{NH}_3^+)$	1508	1515	
$\nu (\text{P-O}), \nu (\text{P=O})$	1086 1051 1039	1099 1045 1039	1097 1049 1029
$\nu (\text{V=O})$ and $\nu (\text{V-O}),$	999 966 929	999 953 916	999 964

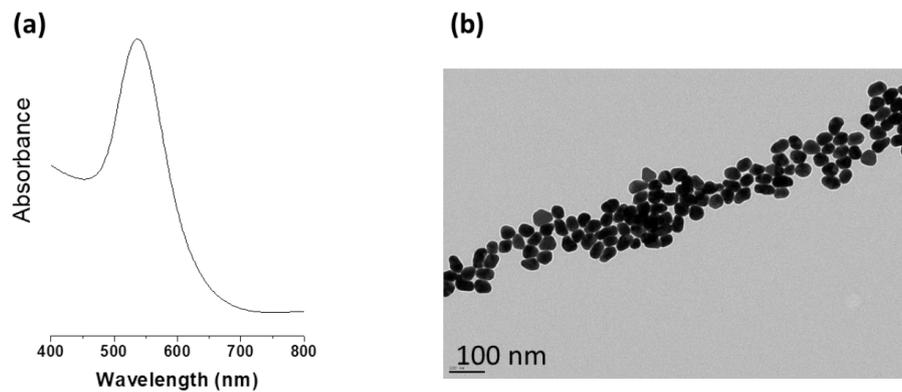


Fig. S5 Characterization of 47 nm CitNPs@POV_{red}. UV-vis spectrum (a), TEM image (b)

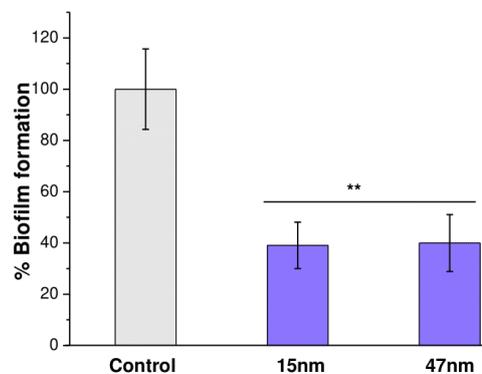


Fig. S6 Effect of the size of CitNPs@POV_{red} on biofilm formation for *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853TM after incubation for 24h in 96-well plates. Statistical significance (Student's T-test):*** p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 versus control.

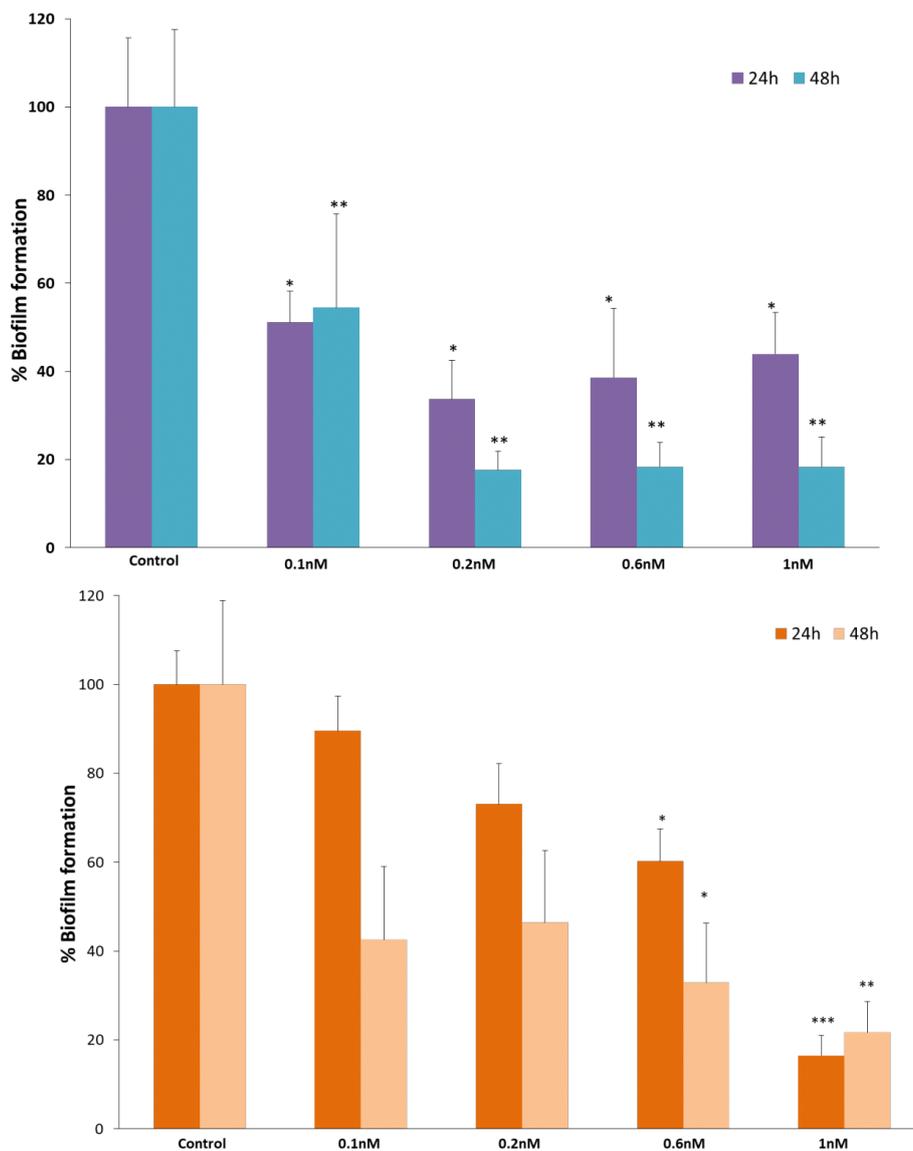


Fig. S7 Effect of the concentration of NPs@POV on biofilm formation for *P. aeruginosa* ATCC® 27853TM (top) and *S. epidermidis* CIP 105 777 (bottom) after incubation for 24 and 48h in 96-well plates. Statistical significance (Student's T-test):*** p<0.001, **p<0.0

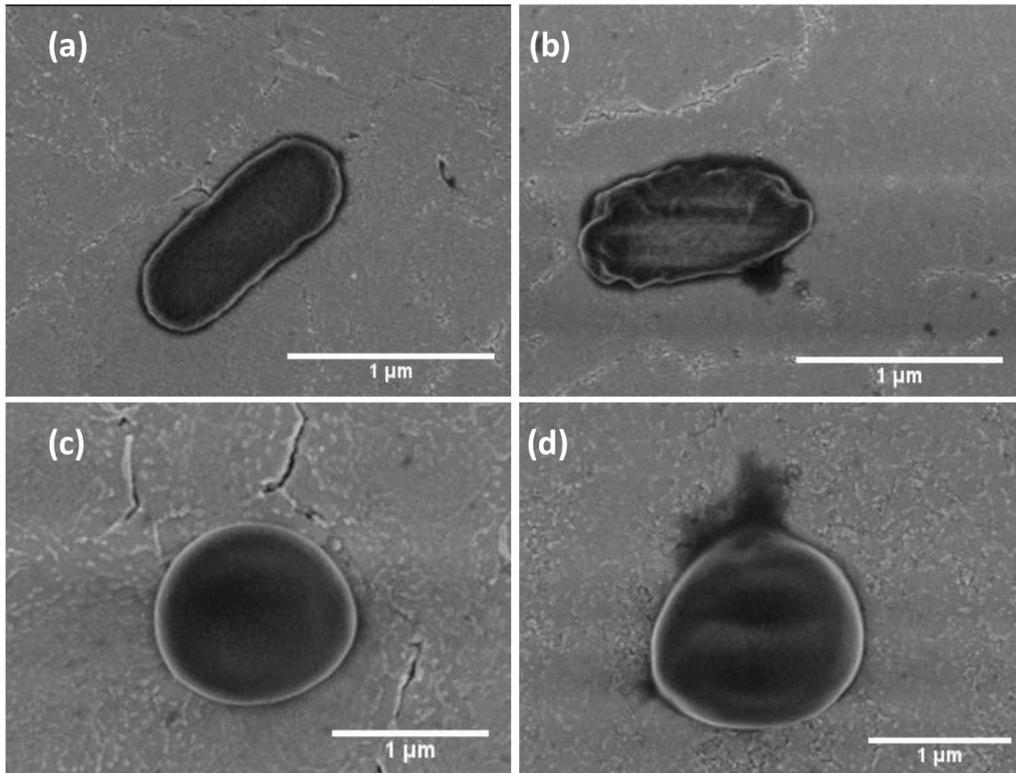


Fig. S8 SEM micrographs of untreated cells of *P. aeruginosa* (a) and after interaction with NPs@POV (b) and *S. epidermidis* (c) and after interaction with NPs@POV (d).

References

- 1 V. Kubíček, J. Kotecký, P. Hermann and I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, 333.
- 2 P. C. Stevenson, J. Turkevich and Hillier, *Discuss. Faraday. Soc.*, 1951, **11**, 55–75.
- 3 H. Mu, J. Tang, Q. Liu, C. Sun, T. Wang and J. Duan, *Nat. Publ. Gr.*, 2016, 1–9.
- 4 W. Kabsch, *Acta Cryst.* 2010, **D66**, 133–144.
- 5 W. Kabsch, *Acta Cryst.* 2010, **D66**, 125–132.
- 6 M. D. Winn et al., *Acta. Cryst.* 2011, **D67**, 235-242 .
- 7 G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* 2015, **A71**, 3-8.
- 8 G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* 2015, **C71**, 3-8.

Partie 3 : Synthèse d'assemblages AgNPs@POV comme agents antibiofilm

I. Introduction

Les nanoparticules d'argent (AgNPs) sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles comme l'industrie agroalimentaire (emballages, additifs et revêtements internes des réfrigérateurs) ou comme l'industrie du textile (vêtements, literies). En effet, celles-ci possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques intrinsèques.¹⁰ Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré qu'il était possible d'utiliser des POMs pour synthétiser des AgNPs.^{11–15} Comme indiqué ci-dessus, les POMs peuvent présenter eux aussi des propriétés antibactériennes intrinsèques.¹⁶ Leur association avec des AgNPs doivent donc conduire à des matériaux aux propriétés antibactériennes exaltées. Plusieurs travaux montrent l'aspect bénéfique de cette association. Par exemple, des travaux ont montré que des films composites constitués de nanoparticules d'argent et du POM [BW₁₂O₄₀]⁵⁻ empêchaient la croissance bactérienne d'*Escherichia coli*.¹⁷ D'autres travaux ont mis en évidence que, par comparaison avec des AgNPs non fonctionnalisées, des AgNPs modifiées par les POMs de type Keggin H₃PW₁₂O₄₀ ou H₃PMo₁₂O₄₀ endommageaient fortement l'intégrité cellulaire des bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus albus*.¹⁸ Plus récemment, la même équipe a développé une stratégie permettant de combiner un antibiotique, l'isoniazide (INH), les POMs de type Keggin H₃PW₁₂O₄₀ et H₃PMo₁₂O₄₀ et des nanoparticules d'argent.¹⁹

Les propriétés antibactériennes reconnues des AgNPs peuvent donc être encore améliorées via leur fonctionnalisation par des entités polyoxométallates. De plus, ces assemblages ont montré une faible cytotoxicité comparée aux POMs seuls. On doit enfin noter que, considérant les différentes familles de POMs, les polyoxovanadates (POVs) se sont révélés être des antibactériens plus actifs que les polyoxomolybdates (POMos) ou que les polyoxotungstates (POTs).¹⁶ Par analogie avec la partie précédente de ce chapitre, l'objectif de l'étude présente est donc de combiner les propriétés antibactériennes des polyoxovanadates et du ligand alendronate pour synthétiser des nanomatériaux aux propriétés antibactériennes exaltées. Le complexe V₃(Ale)₃ associé à des AuNPs a montré des très bons effets antibiofilm. Notre choix

s'est donc porté sur l'utilisation de ce même complexe pour former les AgNPs en une seule étape. Cette partie présentera la synthèse et la caractérisation des AgNPs à partir du $V_3(\text{Ale})_3$ ainsi que les premiers résultats antibiofilm.

II. Élaboration d'assemblages AgNPs@POV

Comme pour la synthèse des AuNPs, le POV $V_3(\text{Ale})_3$ permet la synthèse de nanoparticules d'argent en une seule étape et dans des conditions douces (eau, température ambiante). En sus de la caractérisation de ces matériaux, des tests antibiofilm préliminaires ont été effectués considérant la souche *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853TM) (Figure 5).

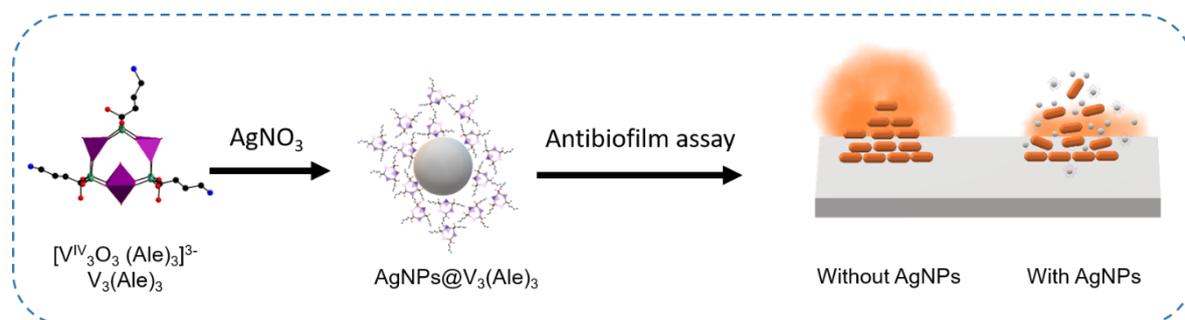


Figure 5: Stratégie pour l'élaboration d'AgNPs fonctionnalisées obtenues en présence du POV $V_3(\text{Ale})_3$ et schématisation des tests antibiofilm.

La démarche adoptée pour l'élaboration d'assemblages AgNPs@POV est donc similaire à celle considérée pour la formation des nanocomposites d'or $\text{AuNPs@V}_3(\text{Ale})_3$ présentée ci-dessus, le sel métallique étant réduit dans l'eau et à température ambiante par le POM $V_3(\text{Ale})_3$. Dans le cas présent, une unité $V_3(\text{Ale})_3$ peut a priori réduire trois équivalents de sel d' AgNO_3 . Cependant, pour obtenir une synthèse reproductible et des nanoparticules homogènes en taille et en forme, il nous a fallu être en excès de POM réduit. Lors de l'ajout du POV dans la solution de nitrate d'argent, un changement de couleur immédiat est observé. La solution devient en effet jaune foncé, ce qui est caractéristique de la formation de AgNPs sphériques. Ceci est confirmé par l'étude par spectroscopie UV-visible du milieu, avec l'apparition d'une bande plasmon à 400 nm (Figure 6). La formation de NPs est confirmée par les images obtenues par microscopie électronique par transmission (Figure 7).

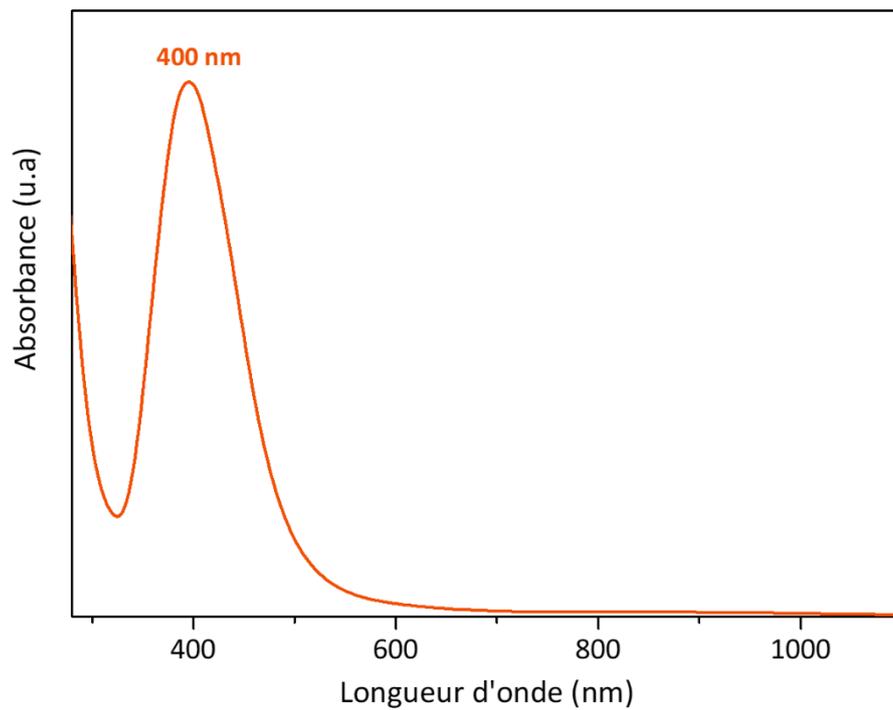


Figure 6: Spectre UV-visible des AgNPs obtenues en présence du complexe $V_3(Al)_3$

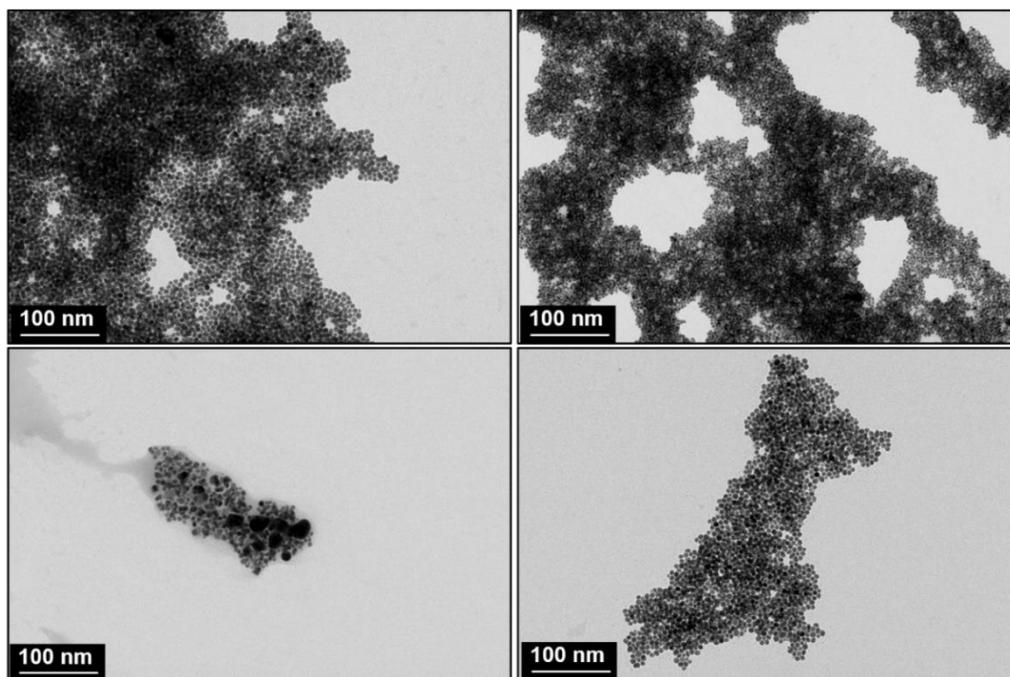


Figure 7: Images obtenues par microscopie électronique à transmission des AgNPs@POV.

La taille des AgNPs déterminée par TEM est de 13.5 ± 5.4 nm. L'étude par DLS conduit à une taille de 26.7 ± 0.3 nm (Figure 8). Cette différence notable s'explique par la prise en compte de la présence des couches de POMs et d'hydratation dans le cas de la mesure faite par DLS. Enfin, un potentiel ζ de -38.3 ± 5.1 mV a été mesuré pour les AgNPs formées. Ceci est indicatif de l'adsorption du POV $V_3(Al)_3$ chargé négativement à la surface des nanoparticules d'argent. Il est important de noter que l'obtention de nanoparticules de taille et de forme homogènes est rare pour des nanoparticules d'argent synthétisées à partir de POMs.

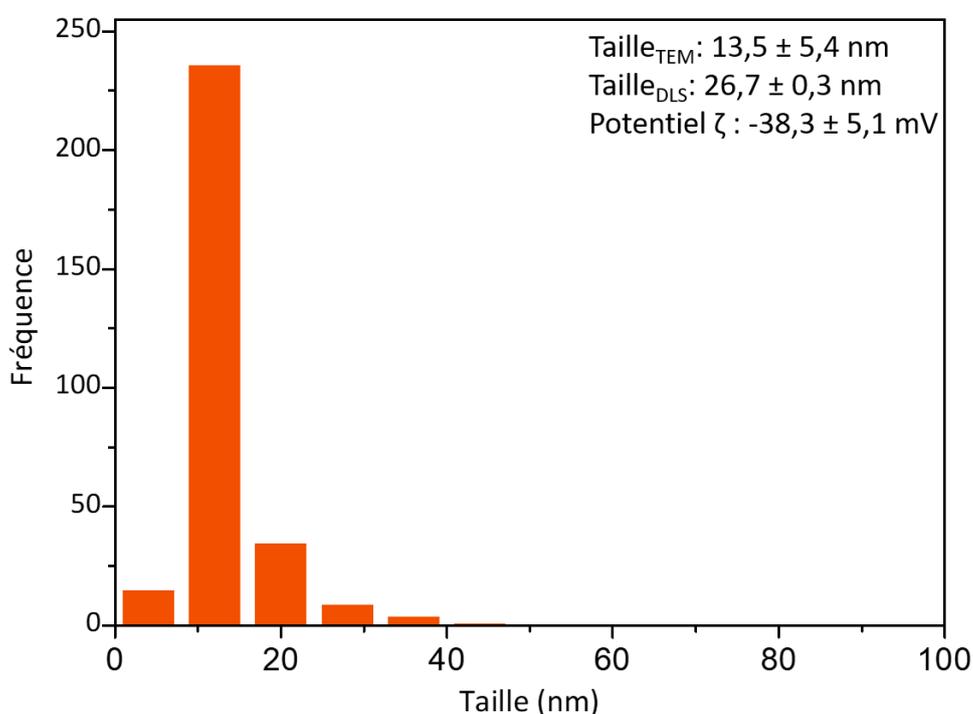


Figure 8: Histogramme de la distribution en taille des AgNPs@POV mesuré par TEM. La taille obtenue par DLS et le potentiel zêta des AgNPs@POV sont indiqués en insert.

La présence de POVs à la surface des AgNPs est confirmée par spectroscopie infrarouge (Figure 9 et Tableau 1), les bandes de vibration des liaisons P-O étant observées entre 1034 cm^{-1} et 1095 cm^{-1} et celles des liaisons V-O entre 955 cm^{-1} et 983 cm^{-1} . De même que pour les AuNPs@POV, la structure du POV à la surface des NPs n'est pas connue de façon certaine.

Dans le cas des AuNPs, le rapport P/V de 2 suggérait que le rapport Al_e/V était conservé. On peut faire l'hypothèse que c'est également le cas pour les AgNPs (P/V = 2,3 ± 0,1), le POV à la surface des NPs possédant la structure V₃(Al_e)₃ avec une oxydation partielle des centres V^{IV}.

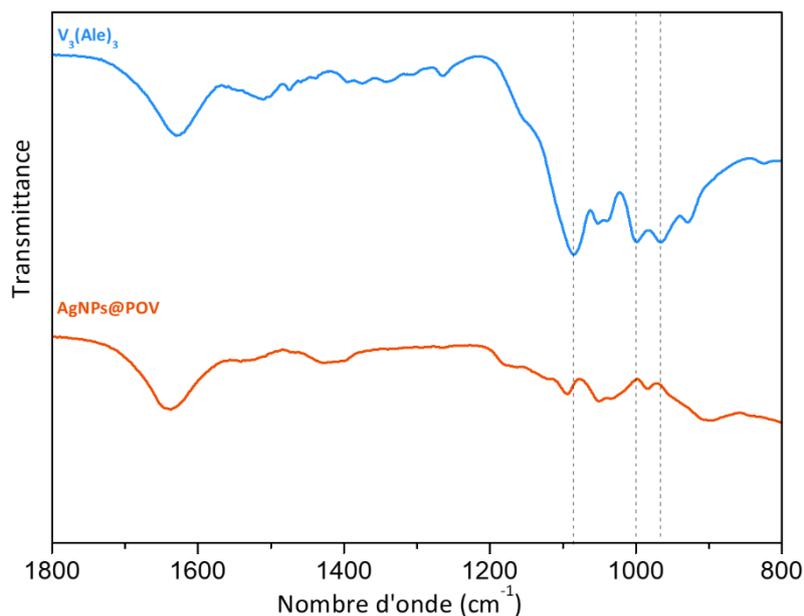


Figure 9: Spectres infrarouge du complexe V₃(Al_e)₃ (bleu) et des AgNPs@POV (orange).

Tableau 1: Valeurs des fréquences de vibrations (cm⁻¹) pour le complexe V₃(Al_e)₃ (à gauche) et pour le composite AgNPs@POV (droite)

Type de liaison	V ₃ (Al _e) ₃	AgNPs@V ₃ (Al _e) ₃
δ _s (NH ₃ ⁺)	1508	1531
	1086	1095
ν (P-O), ν (P=O)	1051	1051
	1039	1034
ν (V=O) and ν (V-O)	999	983
	966	955
	929	

Le lavage des AgNPs obtenues s'est révélé extrêmement difficile. Plusieurs protocoles de lavage ont été testés en considérant différents paramètres (temps et vitesse de centrifugation par exemple). Cependant, nous nous sommes heurtés au fait que soit les AgNPs sédimentaient très peu, soit elles se redispersaient difficilement, avec des phénomènes d'agrégation. La Figure 10 correspond à un exemple de spectre UV-visible obtenu pour des AgNPs nettoyées par centrifugation pendant 10 min à 14500 rpm et redispersées dans de l'eau ultrapure. Ce spectre met en évidence un épaulement vers 500 nm, qui peut être attribué à un début d'agrégation de la solution colloïdale. Il s'ensuit que la couleur de la solution passe de jaune orangé à marron.

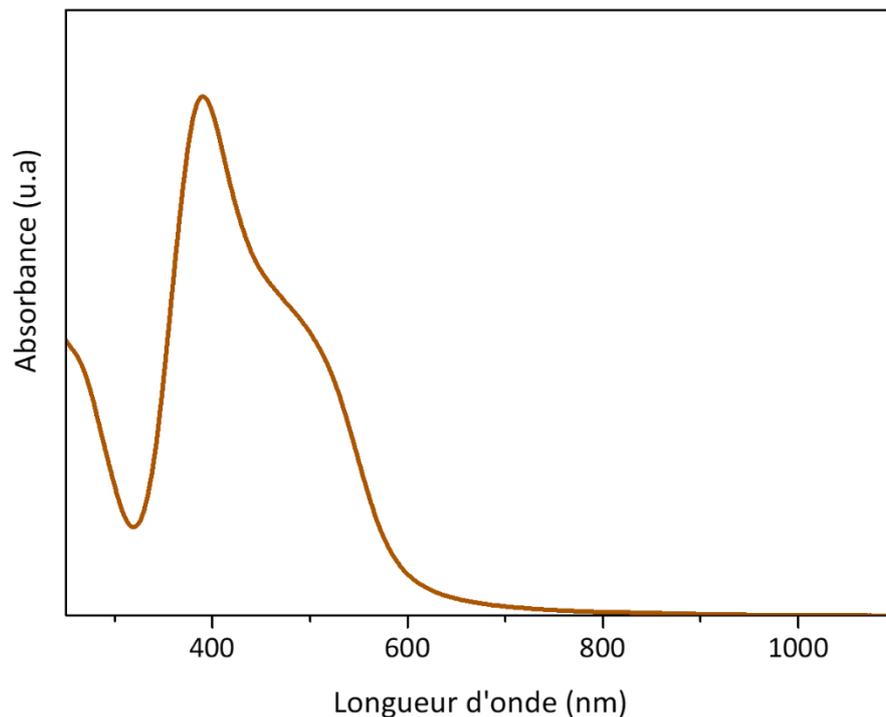


Figure 10: Spectre UV-visible d'une solution de AgNPs@POV après centrifugation et redispersion dans de l'eau ultrapure.

En parallèle, nous avons tenté d'obtenir des AgNPs citratées d'environ 15 nm devant servir de référence lors des test antibactériens, et ainsi nous permettre de mettre en évidence l'influence du POV sur les propriétés antibiofilm de nos composites. Pour cela, nous nous

sommes basés sur la synthèse mise au point par Agnihotri et al.²⁰ Malheureusement, nous n'avons pu à ce jour reproduire les résultats décrits dans cette publication, la position et la largeur de la bande plasmon caractérisant nos AgNPs étant différentes de celles attendues (Figure 11 et Tableau 2).

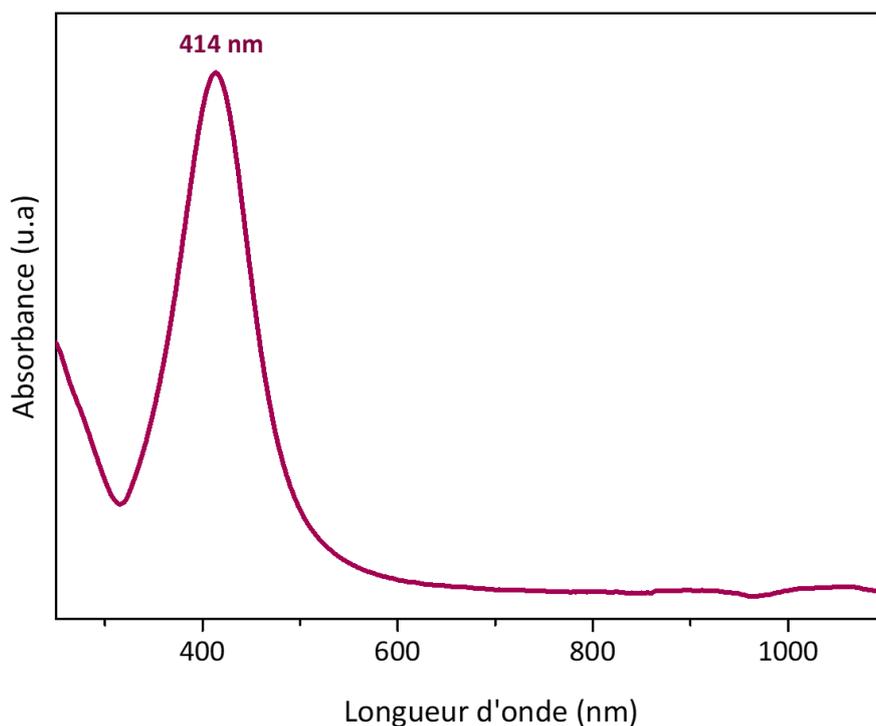


Figure 11: Spectre UV-visible des AgNPs citratées obtenues dans le cadre de cette étude.

Tableau 2: Positions et largeurs à mi-hauteur de la bande LSPR pour les AgNPs citratées obtenues par Agnihotri et al. et dans le cadre de cette étude.

	Synthèse de Agnihotri	Synthèse reproduite
$\lambda_{LSPR}(nm)$	401	414
FWHM (nm)	55-85	93

De plus, les images de microscopie (Figure 12) de nos AgNPs@citrates montrent une polydispersité en taille et en forme. Des efforts sont donc encore nécessaires afin d'obtenir le nanosystème visé. Nous avons cependant décidé d'initier l'étude des propriétés antibiofilm du système AgNPs@POV non lavé.

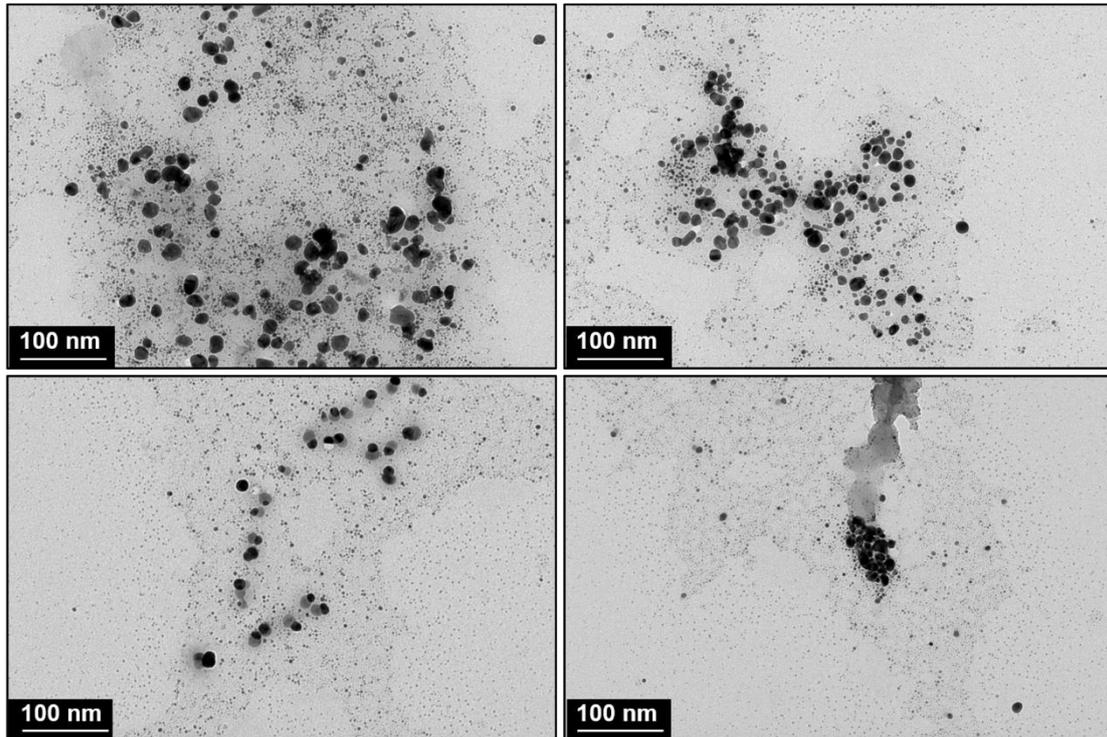


Figure 12: Images TEM des AgNPs citratées obtenues dans le cadre de cette étude.

III. Propriétés antibiofilm des AgNPs@POV

Cette partie expose les résultats préliminaires relatifs à l'action d'AgNPs@POV sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853™) obtenus en suivant le protocole employé pour la détermination des propriétés antibiofilm des nanoparticules d'or AuNPs@V₃(Al)₃ (cf. partie 2). Les AgNPs@POV utilisées sont directement issues du milieu de synthèse, i.e. sans lavage préalable. Néanmoins, ces premiers résultats permettront d'évaluer l'activité du système sur les biofilms bactériens, et seront donc indicatifs sur la pertinence à poursuivre dans la direction adoptée. Deux expériences ont été faites en parallèle, la première (Figure 13) afin d'étudier l'impact des AgNPs@POV sur la formation du biofilm et la deuxième (Figure 14) sur la capacité du système AgNPs@POV à détruire un biofilm formé. De plus, le POV V₃(Al)₃ et le

POV $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ ($V_{10}O_{28}$) ont également été testés. Le décavanadate est en effet connu pour posséder de bonnes propriétés antibactériennes,^{21,22} et son activité a été déterminée sur 24 h en mesurant la densité optique à 620 nm.

La Figure 13 représente le pourcentage de formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* après 24 h d'incubation pour les différents systèmes. L'histogramme montre qu'après 24 h d'incubation, les AgNPs@POV empêchent la formation du biofilm bactérien à 99 % comparé au contrôle. Les CitAgNPs sans POV inhibent la formation du biofilm de 87 %. Le POV $V_3(Al)_3$ quant à lui diminue la croissance du biofilm d'environ 67 % et le décavanadate de 54 %. Ces résultats démontrent que le nouveau POV réduit $V_3(Al)_3$ a de meilleures propriétés antibiofilm que le décavanadate. De plus, l'association du $V_3(Al)_3$ et des nanoparticules d'argent exalte les propriétés antibiofilm. Ces résultats préliminaires sont encourageants et montrent l'efficacité antibactérienne d'assemblages nanoparticules d'argent et de POVs contre la formation de biofilms.

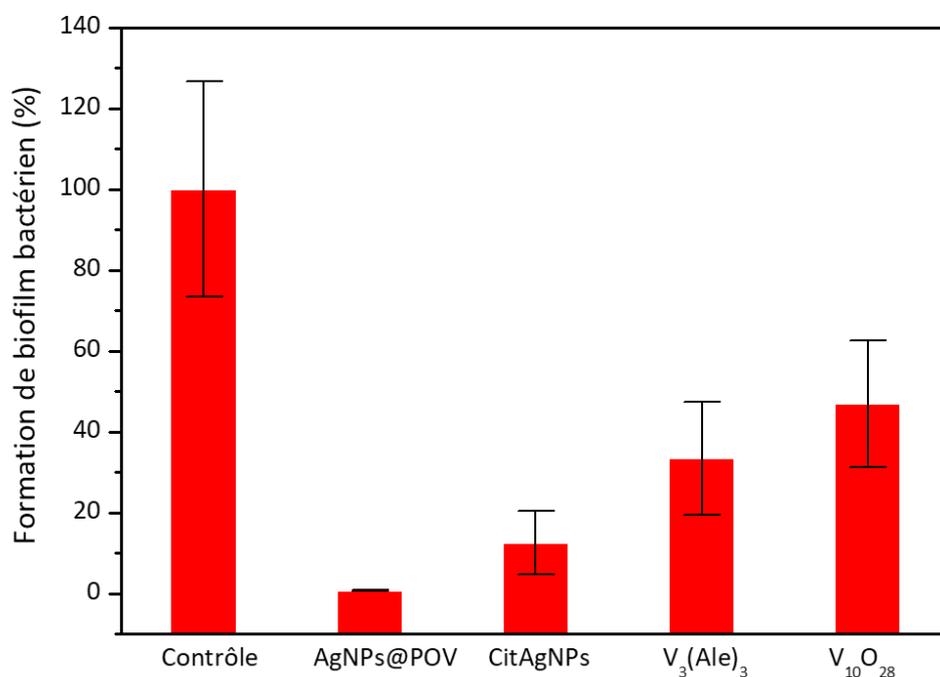


Figure 13: Histogramme représentant le pourcentage de formation d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* seul et en présence des systèmes AgNPs@POV, $V_3(Al)_3$ et $V_{10}O_{28}$.

Cependant, cette tendance n'est pas retrouvée lorsque les différents systèmes sont testés sur des biofilms existants (Figure 14). L'historgramme montre en effet que la présence de AgNPs@POV conduit à une dégradation de 47 % du biofilm alors que les CitAgNPs, le POV $V_3(Al)_3$ et le POV $V_{10}O_{28}$ dégradent le biofilm de 76 %, 36 % et 19 % respectivement. Les POVs sont plus efficaces que les assemblages AgNPs@POV. Cette aptitude des NPs@POM à inhiber la formation de biofilms et leur manque d'activité vis-à-vis de biofilms préformés n'a pu être expliquée de façon satisfaisante à ce jour.

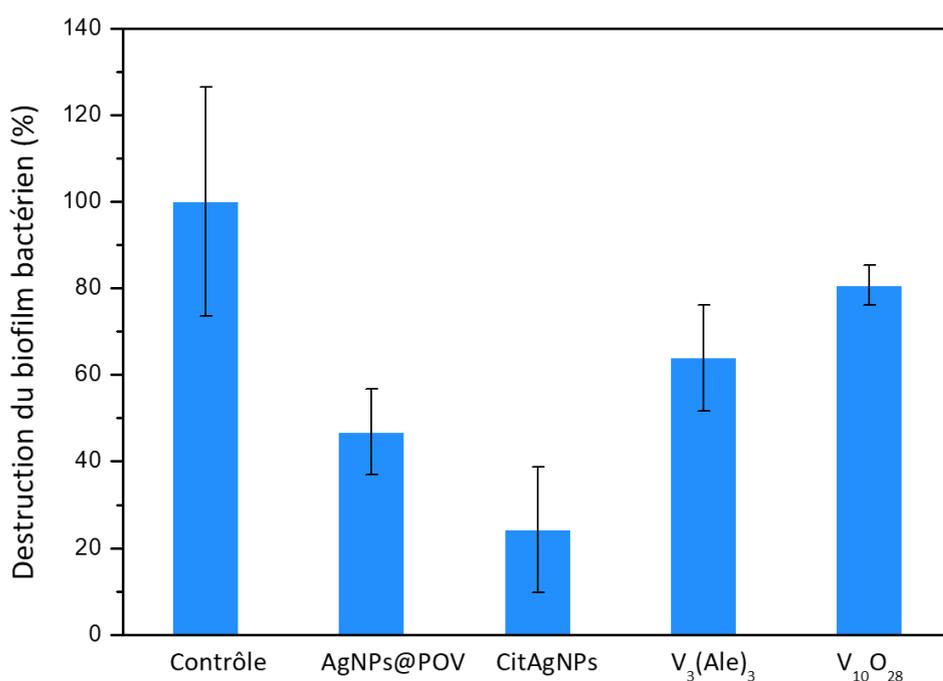


Figure 14: Histogramme représentant le pourcentage de destruction d'un biofilm préformé de *Pseudomonas aeruginosa* seul et en présence des systèmes AgNPs@POV, $V_3(Al)_3$ et $V_{10}O_{28}$.

Conclusion

En conclusion, ces travaux ont confirmé la possibilité de synthétiser des nanoparticules d'or et d'argent en utilisant un nouveau polyoxovanadate réduit et fonctionnalisé par un ligand alendronate comme agent réducteur et stabilisateur. Le nouveau POM $V_3(Al)_3$ obtenu a été totalement caractérisé via un large panel de techniques (DRX sur monocristal, analyse élémentaire, EDX, spectroscopie infrarouge et ATG). La synthèse des systèmes AuNPs@ $V_3(Al)_3$ et AgNPs@POV est maintenant parfaitement contrôlée et reproductible. On peut souligner que les voies de synthèse conduisant à l'obtention d'AgNPs/POM de forme et de taille homogènes restent rares. Les différents assemblages POVs / nanoparticules métalliques ont été caractérisés par diverses techniques (TEM, DLS, potentiel ζ , spectroscopies infrarouge et UV-visible). Les AuNPs synthétisées à partir du $V_3(Al)_3$ ont montré d'excellentes propriétés antibiofilm sur deux souches, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*. De plus, ce travail a permis de mettre en évidence un des mécanismes d'action des AuNPs fonctionnalisées par des POMs sur les biofilms, à savoir la destruction de la membrane bactérienne. Enfin, des résultats très prometteurs ont été obtenus sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* avec AgNPs@POV. Ces dernières inhibent en effet à 99 % la formation du biofilm bactérien, ne conduisant néanmoins qu'à une dégradation de 47 % du biofilm préformé. Cependant, de nombreuses études restent à mener. Le problème de lavage des AgNPs@POV persiste et devra être résolu. La caractérisation par ICP-OES devra ensuite être effectuée sur les NPs lavées. La synthèse d'AgNPs citratées doit être améliorée afin que ces NPs puissent être utilisées comme contrôle lors des tests antibiofilm. Par ailleurs, les différents paramètres de la synthèse (concentration en $AgNO_3$, en POV $V_3(Al)_3$, pH, température ...) devront être modulés afin d'accéder à des tailles et morphologies variées, ces dernières pouvant jouer un rôle crucial sur l'activité biologique de tels systèmes. Le Chapitre 4, qui sera dédié à la synthèse de nano-étoiles d'or en présence de POMs, s'inscrit dans cette démarche même si les applications visées diffèrent.

Références bibliographiques

- (1) Lin, J.; Nishino, K.; Roberts, M. C.; Tolmasky, M.; Aminov, R. I.; Zhang, L. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (FEB), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034>.
- (2) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80-.)*. **1999**, *284* (5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- (3) Lewis, K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (4), 999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>.
- (4) Magana, M.; Sereti, C.; Ioannidis, A.; Mitchell, C. A.; Ball, A. R.; Magiorkinis, E.; Chatzipanagiotou, S.; Hamblin, M. R.; Hadjifrangiskou, M.; Tegos, G. P. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31* (3), 1–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>.
- (5) Qayyum, S.; Khan, A. U. Nanoparticles: Vs. Biofilms: A Battle against Another Paradigm of Antibiotic Resistance. *Medchemcomm* **2016**, *7* (8), 1479–1498. <https://doi.org/10.1039/c6md00124f>.
- (6) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Kandjani, A. E.; Shukla, R.; Bhargavaa, S. K.; Bansal, V. Synergistic Influence of Polyoxometalate Surface Corona towards Enhancing the Antibacterial Performance of Tyrosine-Capped Ag Nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6*, 758–765.
- (7) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. The Antibacterial Activity of Polyoxometalates: Structures, Antibiotic Effects and Future Perspectives. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>.
- (8) Ermer, M. A.; Kottmann, S. C.; Otten, J. E.; Wittmer, A.; Poxleitner, P.; Pelz, K. In Vitro Investigation of the Antimicrobial Effect of Three Bisphosphonates Against Different Bacterial Strains. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2018**, *76* (3), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.08.019>.
- (9) El Moll, H.; Zhu, W.; Oldfield, E.; Rodriguez-Albelo, L. M.; Mialane, P.; Marrot, J.; Vila, N.; Mbomekallé, I. M.; Rivière, E.; Duboc, C.; Dolbecq, A. Polyoxometalates Functionalized by Bisphosphonate Ligands: Synthesis, Structural, Magnetic, and Spectroscopic Characterizations and Activity on Tumor Cell Lines. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (14), 7921–7931. <https://doi.org/10.1021/ic3010079>.
- (10) Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12* (5), 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-Y>.
- (11) Bamoharram, F. F.; Ahmadpour, A.; Heravi, M. M.; Ayati, A.; Rashidi, H.; Tanhaei, B. Recent Advances in Application of Polyoxometalates for the Synthesis of Nanoparticles.

- Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* **2012**, *42* (2), 209–230. <https://doi.org/10.1080/15533174.2011.609849>.
- (12) Berbeć, S.; Żołądek, S.; Kulesza, P. J.; Pałys, B. Silver Nanoparticles Stabilized by Polyoxotungstates. Influence of the Silver – Polyoxotungstate Molar Ratio on UV/Vis Spectra and SERS Characteristics. *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *854* (April), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113537>.
- (13) Bian, H.; Zhang, X.; Zhao, H.; Zhang, N. Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles from Polyoxometalates-Immobilized Poly(4-Vinylpyridine)Brushes. *Chinese Chem. Lett.* **2019**, *30* (5), 1097–1099. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.01.030>.
- (14) Zhang, G.; Keita, B.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Sécheresse, F.; Miserque, F.; Nadjo, L. Green Chemistry-Type One-Step Synthesis of Silver Nanostructures Based on Mov-MoVI Mixed-Valence Polyoxometalates. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (24), 5821–5823. <https://doi.org/10.1021/cm7020142>.
- (15) Keita, B.; Zhang, G.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Sécheresse, F.; Miserque, F.; Nadjo, L. Mov-MoVI Mixed Valence Polyoxometalates for Facile Synthesis of Stabilized Metal Nanoparticles: Electrocatalytic Oxidation of Alcohols. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (23), 8145–8148. <https://doi.org/10.1021/jp072828e>.
- (16) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. The Antibacterial Activity of Polyoxometalates: Structures, Antibiotic Effects and Future Perspectives. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>.
- (17) Gao, S.; Wu, Z.; Pan, D.; Lin, Z.; Cao, R. Preparation and Characterization of Polyoxometalate-Ag Nanoparticles Composite Multilayer Films. *Thin Solid Films* **2011**, *519* (7), 2317–2322. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.11.004>.
- (18) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Kandjani, A. E.; Shukla, R.; Bhargava, S. K.; Bansal, V. Synergistic Influence of Polyoxometalate Surface Corona towards Enhancing the Antibacterial Performance of Tyrosine-Capped Ag Nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6* (2), 758–765. <https://doi.org/10.1039/c3nr03806h>.
- (19) Umapathi, A.; Nagaraju, N. P.; Madhyastha, H.; Jain, D.; Srinivas, S. P.; Rotello, V. M.; Daima, H. K. Highly Efficient and Selective Antimicrobial Isonicotinylhydrazide-Coated Polyoxometalate-Functionalized Silver Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *184* (July), 110522. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110522>.
- (20) Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5-100 Nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy. *RSC Adv.* **2014**, *4* (8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>.
- (21) Marques-Da-Silva, D.; Fraqueza, G.; Lagoa, R.; Vannathan, A. A.; Mal, S. S.; Aureliano, M. Polyoxovanadate Inhibition of: Escherichia Coli Growth Shows a Reverse Correlation with Ca²⁺-ATPase Inhibition. *New J. Chem.* **2019**, *43* (45), 17577–17587. <https://doi.org/10.1039/c9nj01208g>.
- (22) Samart, N.; Arhouma, Z.; Kumar, S.; Murakami, H. A.; Crick, D. C.; Crans, D. C. Decavanadate Inhibits Mycobacterial Growth More Potently than Other Oxovanadates.

Front. Chem. **2018**, 6 (NOV), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00519>.

Chapitre III

Nanoparticules hybrides AuNPs@Mo₄Zol₂Mn^{III} comme agents anticancéreux photothermiques

Ce chapitre est consacré à l'élaboration d'assemblages polyoxomolybdates / nanoparticules d'or comme agents anticancéreux et photothermiques. La première partie décrit succinctement le POM Mo₄(Zol)₂Mn^{III}. La deuxième partie présente les résultats obtenus pour ces assemblages sous forme de publication scientifique.

Introduction générale

Le cancer est bien évidemment un problème majeur de santé, et l'efficacité limitée ainsi que les effets secondaires des traitements actuels nécessitent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'élaboration de nanomatériaux aux propriétés anticancéreuses a particulièrement attiré l'attention ces dernières années, ceux-ci devant permettre d'outrepasser les limitations des médicaments actuels¹⁻⁴ notamment en termes de solubilité, de sélectivité et de toxicité. De plus, une nouvelle stratégie consistant en l'utilisation combinée de plusieurs thérapies anticancéreuses et visant à obtenir un effet thérapeutique amélioré comparativement aux thérapies seules se développe. Récemment, des premiers travaux relatifs à l'utilisation de nanomatériaux pour la thérapie combinatoire ont été publiés.⁵

Parmi les nanomatériaux à visée anticancéreuse, ceux basés sur des nanoparticules d'or s'avèrent être des agents particulièrement prometteurs grâce à leurs propriétés remarquables.⁶ En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, les AuNPs sont connues pour être biocompatibles,⁷ modulables (en taille et en forme)^{8,9} et facilement fonctionnalisables.¹⁰⁻¹² Cela permet de les envisager comme biocapteurs,^{13,14} comme vecteurs de médicaments^{15,16} et comme agents de photothermie.¹⁷ Plusieurs études montrent que l'association d'un médicament avec des nanoparticules d'or améliore l'effet thérapeutique global, s'accompagnant d'une diminution de la toxicité, d'une augmentation de l'activité antitumorale et d'un meilleur ciblage en comparaison au médicament seul.¹⁸ Plus récemment l'utilisation de nanoparticules d'or en photothérapie (PTT), où la lumière est utilisée pour traiter de façon locale et non invasive le cancer, s'est révélée être une stratégie judicieuse.¹⁹

La PTT via des nano-objets repose sur l'hyperthermie, une élévation de température locale permettant la dégradation des cellules cancéreuses. En effet, lorsque les AuNPs sont irradiées à une longueur d'onde proche de celle caractérisant leur bande plasmon, les électrons de surface passent de l'état fondamental à un état excité. L'énergie est ensuite réémise en partie sous forme de chaleur. Ceci conduit à un échauffement local, expliquant les propriétés photothermiques des AuNPs.²⁰ Cependant, afin de limiter la destruction des tissus

sains lors de l'irradiation, il est nécessaire d'utiliser des rayonnements électromagnétiques peu absorbés par les tissus, c'est à dire des rayonnement appartenant au domaine du proche infrarouge (NIR : Near-Infrared). Cela correspond aux fenêtres biologiques représentées sur la Figure 1. De façon très importante, il faut noter que dans ce contexte les AuNPs sont particulièrement adaptées car par la modulation de leurs tailles et de leurs formes, il est possible d'obtenir des nano-objets absorbants dans ces domaines.

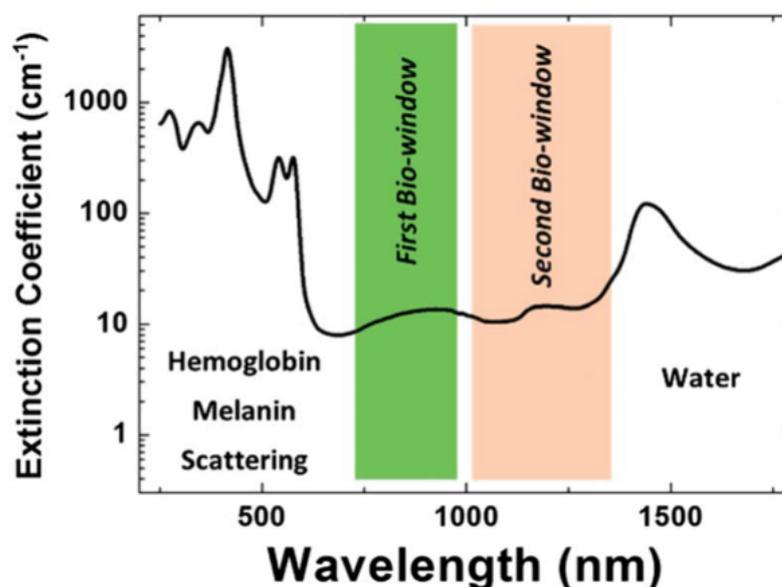


Figure 1: Coefficients d'extinction en fonction de la longueur d'onde des tissus et représentation des deux fenêtres biologiques. Reproduit selon la référence 21.

De nombreux travaux ont montré que les POMs possédaient des propriétés anticancéreuses.²² Il a en particulier été démontré que les POMs fonctionnalisés par des ligands bisphosphonates pouvaient posséder une activité remarquable.²³ De façon notable, il s'est avéré que les POMs fonctionnalisés par des ligands zoledronate étaient particulièrement prometteurs.²⁴ Ceci s'explique aisément considérant que le zoledronate, en dehors d'être un médicament utilisé pour le traitement de l'ostéoporose, possède des propriétés anticancéreuses intrinsèques.²⁵⁻
²⁸ L'activité anticancéreuse du complexe $[(\text{Mo}^{\text{VI}}_2\text{O}_6)_2(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2)\text{OPO}_3)_2\text{Mn}^{\text{III}}]^{5-}$ ($\text{Mo}_4\text{Zol}_2\text{Mn}^{\text{III}}$, avec $\text{Zol} = [\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2)\text{OPO}_3]^{5-}$) contre différentes lignées cellulaires cancéreuses a ainsi été mise en évidence.^{29,30}

Notre étude a consisté à combiner les propriétés anticancéreuses du POM Mo₄(Zol)₂Mn^{III} et l'effet photothermique des nanoparticules d'or. Le POM Mo₄(Zol)₂Mn^{III} incorporant uniquement des ions Mo^{VI}, il n'a pas pu être utilisé comme réducteur pour la synthèse des AuNPs comme c'était le cas dans les chapitres II et le sera dans le chapitre IV. La synthèse des AuNPs a donc été effectuée en deux étapes. Pour cela, une première étape a consisté en la synthèse de nanoparticules d'or citratées. Puis, dans un second temps, les ligands citrate ont été échangés par le POM Mo₄(Zol)₂Mn^{III}. Enfin, après la caractérisation de ces assemblages, des tests ont été effectués afin d'évaluer l'activité anticancéreuse combinée de ces nouveaux nanomatériaux.

Synthèse de nanoparticules hybrides pour des applications anticancéreuses

I. Contributions

Ces travaux sont under review dans ACS applied nanomaterials. Dans ces travaux, j'ai contribué à la synthèse du POM Mo₄(Zol)₂Mn et des nanoparticules hybrides. J'ai effectué les spectres infrarouge et UV-visible, les mesures de DLS et du potentiel ζ, l'acquisition des images TEM et la préparation des échantillons pour l'ICP-OES. Les mesures d'ICP-OES ont été effectuées par F. Bourdreux. Les tests in vitro sur les lignées cancéreuses ont été effectués par C. Wilhelm et par A. Fromain. Les mesures de spectroscopie XPS et le traitement des données ont été fait respectivement par A. Miche et A. Vallée. A. Vallée, A. Dolbecq, P. Mialane et S. Boujday ont supervisé ce travail. A. Vallée a écrit l'article avec l'aide et la correction de l'ensemble des auteurs.

II. Article

Gold/Polyoxometalate Core/Shell Nanoparticles for Combined Chemo-Photothermal Cancer Therapy

S. Tomane,^{a,b} C. Wilhelm,^c S. Boujday,^b A. Fromain,^c A. Miche,^b F. Bourdreux,^a A. Dolbecq,^a P. Mialane^a and A. Vallée*^a

^a Institut Lavoisier de Versailles, UMR CNRS 8180, UVSQ, Université Paris-Saclay, 45, avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles Cedex, France. E-mail : anne.vallee@uvsq.fr

^b Sorbonne Université, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), UMR CNRS 7197, 4 place Jussieu, 75252 Paris, France.

^c Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR CNRS 7057, Université de Paris, 75013 Paris, France.

KEYWORDS Core/shell nanoparticles, Gold nanoparticles, Polyoxometalate, Hyperthermia, Cancer treatment

ABSTRACT

We designed monodisperse and perfectly shaped core/shell AuNP@Mo₄Zol₂Mn nanohybrids consisting of gold nanoparticles functionalized by an antitumoral polyoxometalate incorporating the biologically active zoledronate ligand. After incubation, the nanoparticles readily confined in the endosomal compartments of PC3 human prostate adenocarcinoma cells. Under photothermal

treatment, the metabolic activity drastically decreased at concentrations where the nano hybrids exhibited no anti-cancer activity in the dark, and almost all cancer cells were killed at concentrations at which zoledronate alone was totally inactive. This study evidences for the first time that gold nanoparticles capped by polyoxometalates can represent excellent candidates for combined chemo-photothermal cancer therapy.

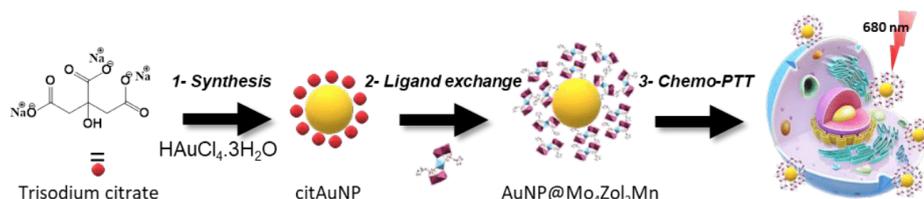
Despite major advances in nanoparticles-mediated treatments of tumors, cancer nano-therapies still require increased efficiency with minimal side effects. To enhance the efficacy of the different modalities, a new trend consisting in combining therapies has emerged these last years. Significantly, the combination of chemotherapy and hyperthermia has shown stronger therapeutic effect compared to stand alone therapy.¹ Due to their easy functionalization allowing couplings with therapeutic agents and their ability to translate absorbed light into thermal energy, gold nanoparticles (AuNPs) have been recognized as first-in-class agents in nanomedicine.^{2,3} Several studies have shown that the combination of drugs with gold nanoparticles improves the drug chemotherapeutic effects and is accompanied by a decrease in toxicity allowing a better accumulation within tumors in comparison to drug alone either by active or passive targeting.⁴⁻⁷ Besides, AuNPs show excellent performances in photothermal therapy (PTT) which are based on local light-driven heat and can be active under biological windows where the blood and tissues are optically transparent.³ Importantly, localized hyperthermia results in enhanced tumor accumulation and intracellular uptake of drugs because it increases the vascular permeability within the tumor and the cell membrane permeability.⁸ This translates into a possible decrease in drug concentration for a similar therapeutic efficacy.

Polyoxometalates (POMs) are negatively charged tunable molecular oxides based on metals in high oxidation states (typically W^{V,VI}, Mo^{V,VI} and V^{IV,V})^{9,10} exhibiting a wide range of properties

including magnetic,¹¹ catalytic,¹² optical¹³ as well as biological including antibacterial¹⁴ and antitumoral¹⁵ activities. Their intrinsic ability to inhibit tumor growth, POMs being able to penetrate cells and reach the cytoplasm,¹⁵ can be further improved due to their characteristics which make them unique with respect to material properties: a) these high-nuclearity systems can form complexes with various metal oxidation states and thus with either strong oxidative or reductive properties; b) their high negative charge allow them to readily interact with cationic entities via electrostatic interactions, and they can thus easily functionalize particles or surfaces; c) they can also be easily functionalized either by additional inorganic fragments or by organic substrates, leading to synergistic effects, d) some POMs only contain metals with a low toxicity, such as molybdenum, and are thus perfectly biocompatible. For instance, the anticancer activity of POM-bisphosphonate complexes such as the [(Mo^{VI}₂O₆)₂(O₃PC(C₄H₆N₂)OPO₃)₂Mn^{III}]⁵⁻ (Mo₄Zol₂Mn, with Zol = [O₃PC(C₄H₆N₂)OPO₃]⁵⁻) zoledronate POM was found to exhibit high antitumoral activity against human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line¹⁶ and human nonsmall cell lung cancer NCI-H460 cells in vitro, and against SK-ES-1 sarcoma tumor cells growth in vivo.¹⁷ Within Mo₄Zol₂Mn, two deprotonated zoledronic acid molecules, a drug (Zometa®) used to treat osteoporosis but also known to exhibit direct and indirect antitumoral effects against a broad variety of tumor cell lines, are connected to an inorganic {Mo^{VI}₄Mn^{III}} core (Figure S1).^{18,19} Importantly, the antitumoral activity of the zoledronate POM, expressed per zoledronate unit, was much higher than that of the zoledronate alone for all the POM's compositions, as the result of a synergistic effect between the inorganic POM core and the bisphosphonate. Besides, it has been demonstrated that POMs can be used as protecting ligands of metallic nanoparticles, including Ag, Pt, Pd and Au NPs.²⁰ In particular, they can play a significant role in the synthesis and the stabilization of Au NPs and also promote applications in

numerous fields such as catalysis, biosensing and medicinal use²¹ through their surface functionalization. For example, antibacterial activities of AuNPs functionalized with Keggin-type POMs²² or polyoxovanadate bisphosphonate molecules²³ as well as cytotoxic effects of AuNP@POM (POM = [Na{(Mo^V₂O₄)₃O₃(SO₃)₄}₂]¹⁵) in B16 (mouse melanoma) cell lines²⁴ have been reported.

In what follows, we intended to combine the multiple features described above by designing and fully characterizing a new nanohybrid based on AuNPs functionalized with Mo₄Zol₂Mn POMs. The biostability of the resulting AuNP@Mo₄Zol₂Mn was evidenced in culture media, and the anticancer activity of this nanohybrid against PC3 human prostate adenocarcinoma cells was then investigated in the dark and under irradiation (Scheme 1). To the best of our knowledge, this work represents the first study devoted to combined chemo-photothermal therapy using a NP@POM nanosystem.



Scheme 1. Schematic representation of the AuNP@Mo₄Zol₂Mn synthetic pathway and chemo-photothermal application.

The synthesis of AuNP@Mo₄Zol₂Mn consists of two steps. Spherical AuNPs were prepared using citrate ions as reducing agents and stabilizers (citAuNP) according to the Turkevich method.²⁵ The citrate anions were then exchanged with Mo₄Zol₂Mn (Scheme 1), as reported previously for the synthesis of AuNP functionalized with Keggin²⁶ or polyoxovanadate anions.²³ The excess of POM was removed by appropriate washing, affording the targeted

AuNP@Mo₄Zol₂Mn nanohybrid. Figure 1a shows the UV-vis spectra of citAuNP and AuNP@Mo₄Zol₂Mn. The colloidal suspension of citAuNP exhibited a red color (Figure 1a, inset) with a localized surface plasmon resonance (LSPR) band located at 520 nm typical of spherical citrate nanoparticles. After their functionalization with Mo₄Zol₂Mn, the NP LSPR band was slightly red-shifted to 528 nm as it has been already observed when citrates are exchanged with POMs on NPs. This has been interpreted in terms of stronger POM-NP interactions compared to citrate-NP ones.²⁷

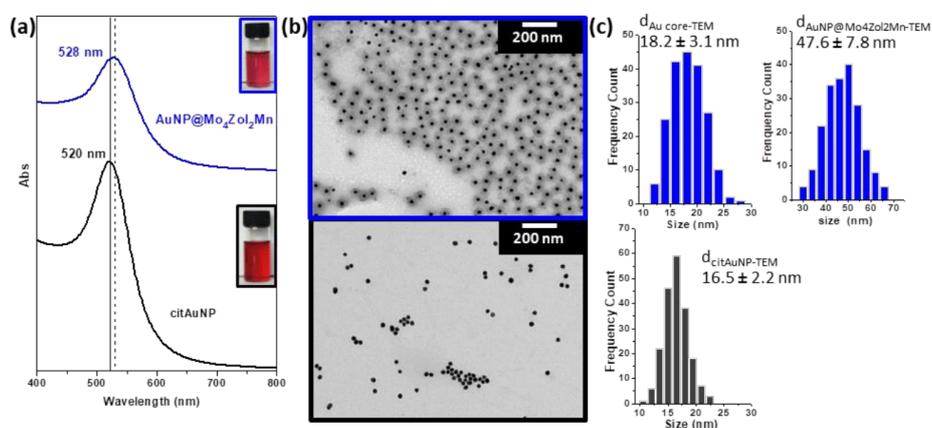


Figure 1. Characterization of citAuNP and AuNP@Mo₄Zol₂Mn: (a) UV-vis spectra and (inset) colloidal suspension pictures; (b) TEM images of citAuNP (bottom) and AuNP@Mo₄Zol₂Mn (top) (c) related particle size distribution histograms.

Dynamic light scattering (DLS) experiments performed on citAuNP and AuNP@Mo₄Zol₂Mn indicated monomodal dispersions with hydrodynamic diameters of 22.6 ± 0.2 and 72.8 ± 2.5 nm and mean zeta potentials of -41.1 ± 1.2 and -26.6 ± 1.4 mV, respectively (Table S1). The zeta potential increase after the ligand exchange with Mo₄Zol₂Mn can be surprising in view of the

high negative charge of the POM but can be explained by the presence of sodium and ammonium counterions (see below) which significantly compensate the negative charge of the functionalized NPs. The measured AuNP@Mo₄Zol₂Mn negative charge is however sufficient to maintain a good colloidal stability. Transmission Electron Microscopy (TEM) images showed the morphologies and distributions of citAuNP and AuNP@Mo₄Zol₂Mn (Figures 1b,c and S2). After their functionalization with Mo₄Zol₂Mn, the spherical citAuNP with an initial average size of 16.5 ± 2.2 nm exhibited a uniform well-defined core/shell structure with an Au core average size of 18.2 ± 3.1 and AuNP@Mo₄Zol₂Mn core/shell structure of 47.6 ± 7.8 nm diameters. Notably, the formation of a shell around the AuNPs observed by TEM after POM functionalization is consistent with the shift of the LSPR band and the increased hydrodynamic diameter observed by DLS. As expected, the hydrodynamic diameter measured by DLS is larger than the one measured by TEM as it takes into account the presence of hydration layers.

Scanning Transmission Electron Microscopy 2D atomic resolution chemical mapping (STEM-XEDS) evidenced the core/shell structure of AuNP@Mo₄Zol₂Mn, with the characteristic elements (Mo, Mn, P) of Mo₄Zol₂Mn surrounding the gold core, and with the presence in the shell of sodium counter-cations (Figure S3). Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectrum of AuNP@Mo₄Zol₂Mn (Figure S4 and Table S2) does not exhibit any band typical of citrate but indicates the presence of Mo₄Zol₂Mn at the surface of the functionalized NPs, confirming the ligand exchange. The Mo=O and Mo-O vibrations characteristic of the POM inorganic core are indeed observed at 997 cm^{-1} and 883 cm^{-1} , respectively, and the P=O and P-O vibrations related to the zoledronate ligands are located at 1288 and 1047 cm^{-1} . Additionally, the presence of a band attributed to NH₄⁺ cations clearly highlights the presence in the hybrid of additional counter-cations arising from the POM

precursor, also compensating the negative charges of the grafted POMs and explaining the relatively low negative charge of the nanoparticles deduced from zeta potential measurements. Additionally, we investigated the potential photoreduction of the Mo₄Zol₂Mn POM under 680 nm laser irradiation by running XPS analyses of AuNP@Mo₄Zol₂Mn before and after irradiation, the results showing no changes in the Mo oxidation state (Figure S5). Inductive Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) also confirmed the presence in AuNP@Mo₄Zol₂Mn of Mo and P in the proportions expected for the Mo₄Zol₂Mn complex, with an experimental P/Mo ratio of 1.1 ± 0.1 (calculated P/Mo ratio = 1). Taken together, these measurements validate that the POM is conserved once deposited on the AuNPs. Finally, ICP-OES was also used to quantitatively determine the POM loading at the surface of the NPs. The experimental Au/Mo ratio for the functionalized spherical gold nanoparticles leads to a value of 93 ± 8 POM/nm² (see Supplementary Information for details). This value clearly indicates the presence of POM multilayers around the gold core, in agreement with the TEM observation of a well-defined POM shell with a thickness of ca. 14.2 ± 3.2 nm.

The photothermal properties of AuNP@Mo₄Zol₂Mn were investigated in aqueous medium. Figure S6 summarizes the heating characteristics as function of Au concentration. The temperature increase amounts to 27°C with [Au]=1mM and the light-to-heat conversion efficiency coefficient (59 ± 5 %) shows that AuNP@Mo₄Zol₂Mn can act as photothermal agent (see Supplementary Information for details).

PC3 human prostate adenocarcinoma cells were selected to evaluate the performances of AuNP@Mo₄Zol₂Mn as antitumor agent. Before carrying out the viability tests of cancer cells in the presence of the nanohybrids, their stability in the culture media, key parameter for biological applications,²⁸ was investigated by DLS (Figure S7). In the RPMI culture medium (RPMI =

Roswell Park Memorial Institute medium) with no additives, AuNP@Mo₄Zol₂Mn formed immediately aggregates with a diameter of 640 nm which increases to 1700 nm after 240 min. To prevent aggregation, RPMI was supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS). The hydrodynamic diameter of the hybrids was then stable, around 130 nm, over the duration of the experiment (250 min). The diameter increase of the nanohybrids in the biological medium compared to the one of 72.8 nm in water reflects the formation of protein corona stabilizing the nanoparticles. Human PC3 cells were thus incubated in RPMI supplemented with serum for 24 hours at different extracellular concentrations in zoledronate, Mo₄Zol₂Mn and AuNP@Mo₄Zol₂Mn, respectively. Alamar Blue assay was used to determine the metabolic activity (see experimental section in the Supporting Information). The resulting dose-response curves shown in Figure 2 provide the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) per zoledronate of each compound (Table 1). First, it can be observed that Mo₄Zol₂Mn is about 5.5 times more active than zoledronic acid against PC3 cells. Such increase of activity was already observed for this POM considering NCI-H460 and MCF7 cell lines after 96 h of incubation.^{16,17} However, as zoledronate is known to produce time dependent inhibition of cell proliferation, it is particularly important to underline that the increase in activity from zoledronate to Mo₄Zol₂Mn is observed herein even after a short period of incubation (24 h) compared to these previous works.²⁹ Furthermore, the dose-response curves of free Mo₄Zol₂Mn and AuNP@Mo₄Zol₂Mn overlap significantly, with an equivalent IC₅₀ for both systems, indicating that AuNP@Mo₄Zol₂Mn retained the high antitumor activity of Mo₄Zol₂Mn. This result also confirmed that Mo₄Zol₂Mn is not altered during the adsorption process on the NPs.

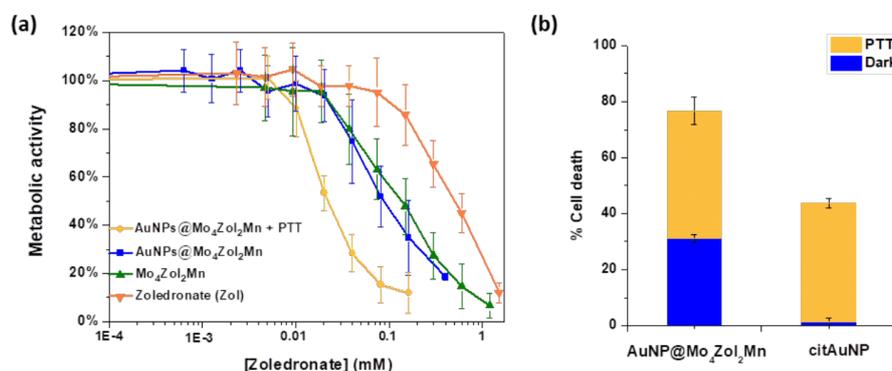


Figure 2. (a) Dose-response curves of the metabolic activity per zoledronate of PC3 cells incubated with free zoledronate (orange curve), Mo₄Zol₂Mn (green curve) and AuNP@Mo₄Zol₂Mn under the presence (yellow curve, PTT) or absence (blue curve) of irradiation (680 nm); (b) histogram showing the contributions of citAuNP and AuNP@Mo₄Zol₂Mn chemotherapy (blue) and PTT with irradiation (680 nm) induced (orange) on PC3 cells death for gold concentration of 78 μM.

Photothermal treatment (PTT) using a 680 nm laser calibrated at 1.7 W/cm² was further applied on cells incubated for 24 h with AuNP@Mo₄Zol₂Mn. At an extracellular zoledronate concentration of 20 μM, Mo₄Zol₂Mn and AuNP@Mo₄Zol₂Mn exhibited no anti-cancer activity, while under irradiation at 680 nm in presence of AuNP@Mo₄Zol₂Mn the metabolic activity decreased to 50%. This clearly highlights a PTT effect under irradiation despite that the LSPR band of the nanohybrid is located at 528 nm. This can be explained by the red shift of the LSPR band of nanoparticles aggregates observed on the absorbance spectrum of AuNP@Mo₄Zol₂Mn internalized in cells and already noticed in a recent work for other gold nanosystems³⁰ (Figure S8). Also, after irradiation in presence of the nanohybrid, the IC₅₀ value is divided by 5

compared to the value determined for a non-irradiated AuNP@Mo₄Zol₂Mn colloidal suspension (Table 1). This evidences gold nanoparticles PTT of AuNP@Mo₄Zol₂M.

While in presence of zoledronate at a 80 μM concentration no anticancer activity was observed, the metabolic activity of PC3 cell incubated with Mo₄Zol₂Mn and AuNP@Mo₄Zol₂Mn at the same zoledronate concentration decreased to ~55% in the dark. Moreover, under irradiation in presence of AuNP@Mo₄Zol₂Mn, it decreased sharply to ~15% (Figure 2a). Additionally, for a gold concentration corresponding to that of the AuNP@Mo₄Zol₂Mn sample at 80 μM in zoledronate, the CitAuNPs under irradiation lead only to ~40% of cell death activity of PC3 cells and to ~1% without irradiation (Figure 2b). This shows that combined POM chemotherapy and photothermal therapy using AuNP@Mo₄Zol₂Mn killed almost all cancer cells at concentrations at which pure zoledronate is inactive.

Table 1. IC₅₀^{24h} values per zoledronate for the studied compounds.

Compound	IC ₅₀ ^{24h} [μM] per Zoledronate	IC ₅₀ ^{24h} _{zoledronate} /IC ₅₀ ^{24h}
Zoledronate	500 ± 100	1
Mo ₄ Zol ₂ Mn	140 ± 60	3.6
AuNP@Mo ₄ Zol ₂ Mn	90 ± 30	5.5
AuNP@Mo ₄ Zol ₂ Mn+PTTr	21 ± 3	23.8

Additionally, TEM images of PC3 cells cultured with AuNP@Mo₄Zol₂Mn at 80 μM and 1 μM concentrations in zoledronate are shown in Figure 3. The uptake and resulting dose of AuNP@Mo₄Zol₂Mn internalized in the cells is correlated to the concentration of AuNP@Mo₄Zol₂Mn introduced in the cells culture as it can be seen on the TEM images and the

gold concentration obtained by ICP after cells washing (for AuNP@Mo₄Zol₂Mn high dose 0,084±0,07 pg_{Au} per cell and for low dose 3,64±0,5 pg_{Au} per cell, Figure S9). These images highlight that the nanoparticles were confined in the endosomal compartments of the cells. It also demonstrates that increasing the dose leads to an increase of the number of endosomes containing the nanoparticles, but not to a marked increase of the density of the nanoparticles within the endosomes, which also appears high, whatever the dosing. It confirms the intracellular confinement of the nanohybrids and justifies the PTT activity of AuNP@Mo₄Zol₂Mn under 680 nm irradiation.

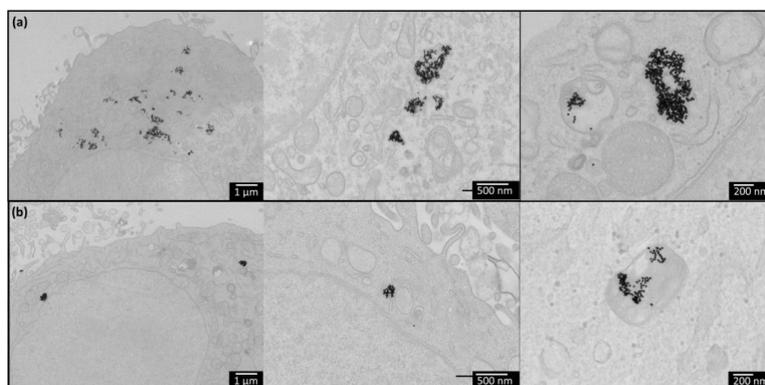


Figure 3. TEM images of AuNP@Mo₄Zol₂Mn immediately after internalization in cancer cells for (a) 80 μM and (b) 1 μM in zoledronate concentrations.

In conclusion, this work demonstrates that well defined AuNP@Mo₄Zol₂Mn core/shell nanoparticles can be prepared by citrate exchange with the Mo₄Zol₂Mn antitumoral POM on preformed AuNPs. The new nanohybrids have been thoroughly characterized *via* TEM, DLS, UV-Vis, ATR-FTIR, ICP-OES and STEM 2D atomic resolution chemical mapping experiments. These characterizations showed that the nanohybrids form ca. 48 nm diameter monodispersed spherical core/shell nanostructures. The anti-cancer activity studies of AuNP@Mo₄Zol₂Mn

against PC3 human prostate adenocarcinoma cells evidenced that the composite is stable in a culture medium and retains the POM high antitumor activity. Photothermal treatments in the first biological window were applied on cells incubated with AuNP@Mo₄Zol₂Mn and showed that at a concentration where the composite exhibited no anti-cancer activity in the dark the metabolic activity of PC3 cell decreased to 50% under irradiation. To the best of our knowledge, this is an unprecedented demonstration that gold nanoparticles capped by polyoxometalates represent excellent candidates for combined chemo-photothermal cancer therapy. This study thus opens perspectives for the development of efficient new anti-cancer Au@POM nanomaterials, considering that organic-inorganic POMs incorporating ligands presenting antitumoral activities higher than that of zoledronate can be elaborated allowing optimizing the PTT effect.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Materials and methods, characterization techniques and additional characterization results.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Anne Vallée : anne.vallee@uvsq.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS, the Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines and a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program no. ANR-11-IDEX-0003-02 and CHARMMMAT ANR-11-LABX-0039

REFERENCES

- (1) Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. Hyperthermia in Combined Treatment of Cancer. *Lancet Oncol.* **2002**, *3* (8), 487–497. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5).
- (2) Beik, J.; Khateri, M.; Khosravi, Z.; Kamrava, S. K.; Kooranifar, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Gold Nanoparticles in Combinatorial Cancer Therapy Strategies. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *387*, 299–324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.025>.
- (3) Riley, R. S.; Day, E. S. Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Applications and Opportunities for Multimodal Cancer Treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2017**, *9* (4), e1449. <https://doi.org/10.1002/wnan.1449>.
- (4) Pu, Y.; Zhao, Y.; Zheng, P.; Li, M. Elucidating the Growth Mechanism of Plasmonic Gold Nanostars with Tunable Optical and Photothermal Properties. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (14), 8599–8607. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01354>.
- (5) Gibson, J. D.; Khanal, B. P.; Zubarev, E. R. Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, No. 24, 11653–11661.
- (6) Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. Mediating

- Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles through Design. *Nano Lett.* **2009**, *9* (5), 1909–1915. <https://doi.org/10.1021/nl900031y>.
- (7) Choi, C. H. J.; Alabi, C. A.; Webster, P.; Davis, M. E. Mechanism of Active Targeting in Solid Tumors with Transferrin-Containing Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (3), 1235–1240. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914140107>.
- (8) Raeesi, V.; Chan, W. C. W. Improving Nanoparticle Diffusion through Tumor Collagen Matrix by Photo-Thermal Gold Nanorods. *Nanoscale* **2016**, *8* (25), 12524–12530. <https://doi.org/10.1039/c5nr08463f>.
- (9) Lauinger, S. M.; Yin, Q.; Geletii, Y. V.; Hill, C. L. Polyoxometalate Chemistry. In *Advances in Inorganic Chemistry*; van Eldik, R., Cronin, L., Eds.; Academic Press, 2017; pp 117–154.
- (10) Dolbecq, A.; Dumas, E.; Mayer, C. R.; Mialane, P. Hybrid Organic-Inorganic Polyoxometalate Compounds: From Structural Diversity to Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 6009–6048. <https://doi.org/10.1021/cr1000578>.
- (11) Oms, O.; Dolbecq, A.; Mialane, P. Diversity in Structures and Properties of 3d-Incorporating Polyoxotungstates. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (22), 7497–7536. <https://doi.org/10.1039/c2cs35148j>.
- (12) Wang, S. S.; Yang, G. Y. Recent Advances in Polyoxometalate-Catalyzed Reactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (11), 4893–4962. <https://doi.org/10.1021/cr500390v>.
- (13) Ma, P.; Hu, F.; Wang, J.; Niu, J. Carboxylate Covalently Modified Polyoxometalates: From Synthesis, Structural Diversity to Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *378*, 281–

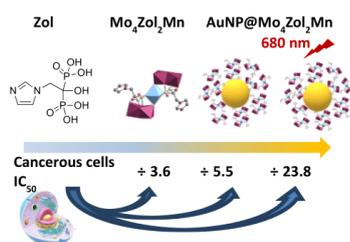
309. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.02.010>.
- (14) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. The Antibacterial Activity of Polyoxometalates: Structures, Antibiotic Effects and Future Perspectives. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>.
- (15) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (10), 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>.
- (16) Saad, A.; Zhu, W.; Rousseau, G.; Mialane, P.; Marrot, J.; Haouas, M.; Taulelle, F.; Dessapt, R.; Serier-Brault, H.; Rivière, E.; Kubo, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Polyoxomolybdate Bisphosphonate Heterometallic Complexes: Synthesis, Structure, and Activity on a Breast Cancer Cell Line. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10537–10547. <https://doi.org/10.1002/chem.201406565>.
- (17) Boulmier, A.; Feng, X.; Oms, O.; Mialane, P.; Rivière, E.; Shin, C. J.; Yao, J.; Kubo, T.; Furuta, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Anticancer Activity of Polyoxometalate-Bisphosphonate Complexes: Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Results. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (13), 7558–7565. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01114>.
- (18) Green, J. R. Bisphosphonates : Preclinical Review. *Oncologist* **2004**, *9* (suppl 4), 3–13.
- (19) Zekria, J.; Mansour, M.; Karim, S. M. The Anti-Tumour Effects of Zoledronic Acid. *J. Bone Oncol.* **2014**, *3* (1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2013.12.001>.
- (20) Wang, Y.; Weinstock, I. A. Polyoxometalate-Decorated Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (22), 7479–7496. <https://doi.org/10.1039/c2cs35126a>.

- (21) Jameel, U.; Zhu, M.; Chen, X.; Tong, Z. Recent Progress of Synthesis and Applications in Polyoxometalate and Nanogold Hybrid Materials. *J. Mater. Sci.* **2016**, *51* (5), 2181–2198. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9503-1>.
- (22) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Shukla, R.; Bhargava, S. K.; Bansal, V. Fine-Tuning the Antimicrobial Profile of Biocompatible Gold Nanoparticles by Sequential Surface Functionalization Using Polyoxometalates and Lysine. *PLoS One* **2013**, *8* (10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079676>.
- (23) Tomane, S.; López-Maya, E.; Boujday, S.; Humblot, V.; Marrot, J.; Rabasso, N.; Castells-Gil, J.; Sicard, C.; Dolbecq, A.; Mialane, P.; Vallée, A. One-Pot Synthesis of a New Generation of Hybrid Bisphosphonate Polyoxometalate Gold Nanoparticles as Antibiofilm Agents. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1* (9), 3400–3405. <https://doi.org/10.1039/c9na00401g>.
- (24) Gabas, I. M.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; Fuenteb, J. M. de la. In Vitro Cell Cytotoxicity Profile and Morphological. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 1039–1047.
- (25) Stevenson, P. C.; Turkevich, J.; Hillier. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday. Soc.* **1951**, *11* (c), 55–75.
- (26) Wang, Y.; Neyman, A.; Arkhangelsky, E.; Gitis, V.; Meshi, L.; Weinstock, I. A. Self-Assembly and Structure of Directly Imaged Inorganic-Anion Monolayers on a Gold Nanoparticle. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17412–17422. <https://doi.org/10.1021/ja907815d>.
- (27) Lica, G. C.; Browne, K. P.; Tong, Y. Y. Interactions between Keggin-Type Lacunary Polyoxometalates and Ag Nanoparticles: A Surface-Enhanced Raman Scattering

Spectroscopic Investigation. *J. Clust. Sci.* **2006**, *17* (2), 349–359.
<https://doi.org/10.1007/s10876-006-0062-0>.

- (28) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle Colloidal Stability in Cell Culture Media and Impact on Cellular Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287–6305. <https://doi.org/10.1039/c4cs00487f>.
- (29) Chang, J.; Wang, W.; Zhang, H.; Hu, Y.; Yin, Z. Bisphosphonates Regulate Cell Proliferation, Apoptosis and pro-Osteoclastic Expression in MG-63 Human Osteosarcoma Cells. *Oncol. Lett.* **2012**, *4* (2), 299–304. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.723>.
- (30) Plan Sangnier, A.; Van de Walle, A.; Aupaure, R.; Fradet, M.; Motte, L.; Guénin, E.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Endosomal Confinement of Gold Nanospheres, Nanorods, and Nanoraspberries Governs Their Photothermal Identity and Is Beneficial for Cancer Cell Therapy. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4* (4), 1900284. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900284>.

SYNOPSIS



Supporting Information

Gold/Polyoxometalate Core/Shell Nanoparticles for Combined Chemo-Photothermal Cancer Therapy

S. Tomane,^{a,b} C. Wilhelm,^c S. Boujday,^b A. Fromain,^c A. Miche^b, F. Bourdreux,^a A. Dolbecq,^a P. Mialane^a and A. Vallée*^a

^a Institut Lavoisier de Versailles, UMR CNRS 8180, UVSQ, Université Paris-Saclay, 45, avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles Cedex, France. E-mail : anne.vallee@uvsq.fr

^b Sorbonne Université, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), UMR CNRS 7197, 4 place Jussieu, 75252 Paris, France.

^c Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR CNRS 7057, Université de Paris, 75013 Paris, France.

Materials. Sodium molybdate dihydrate, sodium citrate, gold(III) chloride trihydrate and manganese(III) acetate dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich. Ammonia solution (32% in water) was obtained from VWR. Zoledronic acid H₂O₃PC(C₄H₅N₂)(OH)PO₃H₂ (Zol) and (NH₄)₅[(Mo^{VI}₂O₆)₂(O₃PC(C₄H₆N₂)OPO₃)₂Mn^{III}].10H₂O (Mo₄Zol₂Mn) were synthesized according to reported procedures. 1–3 Milli-Q water (18 MΩ, Millipore, France) was used for

the preparation of gold nanoparticles. All glassware used was cleaned with aqua regia and carefully rinsed with Milli-Q water before use.

PC-3 cells were purchased from ATCC and cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C with 5% CO₂.

Synthesis

Citrate protected gold nanoparticles (CitAuNP)

The colloidal gold nanoparticles were prepared following the method introduced by Turkevich.⁴ 95 mL of a chloroauric acid HAuCl₄ (267 μM) solution were refluxed for 30 min and 5 mL of a sodium citrate (34 mM) solution added. The reduction of the gold ions by the citrate ions was completed after 5 min. The solution was further refluxed for 30 min and then left to cool to room temperature. Then, the colloidal solution was centrifuged at 14500 rpm for 15 min, and the colorless supernatant removed. The nanoparticles were dispersed in 5 mL of Milli-Q water, affording spherical nanoparticles with an average diameter of *ca.* 16.5 ± 2.2 nm.

Ligand exchange citrate gold nanoparticles with Mo₄Zol₂Mn (AuNP@Mo₄Zol₂Mn)

10 mL of an aqueous solution of Mo₄Zol₂Mn (1 mM) were added with stirring to a vial containing 10 mL of an aqueous suspension of citrate-protected gold nanoparticles prepared as described above. The solution was stirred overnight at room temperature. Afterwards, the nanoparticles were centrifuged at 10000 rpm for 10 min and the colorless supernatant was removed. The colloidal solution was dispersed in 20 mL of Milli-Q water.

Characterization Techniques

ATR-FTIR spectroscopy measurements were performed on a Nicolet 30 ATR 6700 FT spectrometer with scan range from 4000 to 400 cm⁻¹.

UV-Visible spectroscopy spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 750.

Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry: P, Mo, and Au contents in aqueous sample and in the cells were determined on previously acid digested samples in aqueous solution on an Agilent Technologies 700 Series ICP-OES instrument. The digestion procedure was carried out by the addition of a 0.5 mL 10% HNO₃:HCl (v/v) solution to 0.5 mL of each nanoparticle solution. After the digestion process overnight, the samples were diluted with 4 mL of 2.5% HNO₃/HCl (v/v) and 2 mL of MilliQ water.

Transmission Electron Microscopy: Transmission electron microscopy measurements were performed using a JEOL JEM-1011 microscope operating at an accelerating voltage of 100 kV. The TEM grids were prepared by depositing 10 µL of a particle suspension on a carbon-coated copper grid and dried at room temperature. STEM mode coupled with X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy (X-EDS) was used to perform elemental mapping (JEOL JEM-2100). X-EDS analysis was realized with an Oxford Instrument SDD detector of 80 mm². X-ray spectra were recorded and processed with Aztec software. The nanoparticles size distribution was calculated by measuring a minimum of 200 particles using the ImageJ software. For TEM imaging of cellular samples, after incubation with nanoparticles, the cells were detached with trypsin and fixed in 5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour and washed with cacodylate buffer. Samples were then contrasted with Oolong Tea Extract (OTE) cacodylate buffer, followed by post-fixation with 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate. A series of dehydration baths, from 30% to 100% were then performed before embedding the cell

pellets in epoxy resins. The resins were finally sectioned (70 nm), and sections were placed on copper grids for observation with a Hitachi HT 7700 TEM operating at 80 kV. Dynamic Light Scattering:

Dynamic Light Scattering: Batch mode hydrodynamic size (diameter) measurements were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS. A minimum of three measurements per sample were made.

Zeta Potential Measurements: A Malvern Zetasizer Nano ZS instrument was used to measure zeta potential at 25°C for all samples. Samples prepared for the DLS measurements were loaded into a pre-rinsed folded capillary cell for the zeta potential measurements. A minimum of three measurements per sample were made.

Photothermia in Water: Aqueous measurements were made in 0.5 mL Eppendorf tubes containing 50 µL of nanoparticles solubilized in water. Concentrations ranged from [Au] = 0.25 mM to [Au] = 1 mM. Each sample was illuminated with a 680 nm laser (Laser Components S.A.S France) positioned 4.5 cm with power density in between 0.3 to 1.7 W cm⁻². Temperature elevation was recorded with an infrared thermal imaging camera (FLIR A6751) in real time.

X-Ray Photoelectron Spectroscopy: XPS analyses were performed using an Omicron Argus X-ray photoelectron spectrometer, equipped with a monochromated AlK α radiation source ($h\nu = 1486.6$ eV) and a 280 W electron beam power. The emission of photoelectrons from the sample was analyzed at a takeoff angle of 45° under ultra-high vacuum conditions ($\leq 10^{-9}$ mBar). Spectra were carried out with a 100 eV pass energy for the survey scan and 20 eV pass energy for the Mo 3d region. Binding energies were calibrated against the C 1s (C-C) binding energy at 284.8 eV and element peak intensities were corrected by Scofield factors. The peak areas were determined

after subtraction of a Shirley background. The spectra were fitted using Casa XPS v.2.3.15 software (Casa Software Ltd, U.K.) and applying a Gaussian-Lorentzian (70%/30%) functions.

Cytotoxicity assay: Nanoparticles were internalized by PC3 cells in a 96-well plate for 24 hours. Six conditions were compared. Firstly, cells were kept in culture for 24 hours as control condition. Secondly, culture medium was enriched with zoledronate molecules, with concentrations ranging from 10⁻⁶ to 1.5 mM. Thirdly, culture medium was enriched with Mo₄Zol₂Mn at concentrations comprised between 10⁻⁶ to 1.5 mM in zoledronate. Fourthly, culture medium was enriched with AuNP@Mo₄Zol₂Mn at concentrations comprised between 10⁻⁶ to 1.5 mM in zoledronate. Fifthly, culture medium was enriched with citAuNP at concentration of 76 μM in gold. Finally, cells supplemented with AuNP@Mo₄Zol₂Mn and CitAuNP were exposed to a laser 680 nm at 1.7 W/cm² during 10 minutes. In a previous study by some of us, this 1.7 W/cm² laser power was efficient to induce tumor growth inhibition in vivo without exhibiting nonspecific phototoxicity.⁵ In addition, this value is lower than the power used in many in vivo studies.⁶⁻⁸

After 24 hours, the culture medium was replaced by 200 μL of RPMI without phenol red, supplemented with 10% Alamar Blue. After 2 hours the plate was analyzed with a multimode plate reader (Enspire Perkin Elmer) at an excitation wavelength of 570 nm and a fluorescence detection at 585 nm. Metabolic activity was determined by comparison with control cells.

UV-Vis Spectra in Cells: Cells were cultured on 12 mm diameter glass coverslips. Culture medium was supplemented with the AuNP@Mo₄Zol₂Mn nanoparticles at zoledronate concentrations of 80 μM. After incubation, cells were washed with RPMI supplemented with 10% FBS, and then eight glass coverslips were overlaid in 24-well plate and the spectrum was measured with an EnSpire Multimode Plate Reader Perkin Elmer.

Calculation method of the coverage ratio:

The POM/Au⁰ nanoparticle coverage ratio σ was calculated considering the following formula:

$$\sigma = \frac{N_{POM}}{N_{AuNps} S_{AuNps}}$$

where N_{POM} is the total number of POM molecules by liter, N_{AuNps} the total number of gold nanoparticles by liter and S_{AuNps} the surface of one gold nanoparticle, with:

$$N_{POM} = \frac{w_{Mo} N_A}{M_{(Mo)} \times 4}, w_{Mo} \text{ being the molybdenum mass concentration.}$$

N_{AuNps} is equal to the number of Au atoms by liter divided by the number of Au atoms in a particle and can be written:

$$N_{AuNps} = \frac{w_{Au} N_A}{M_{(Au)} V_{AuNps} / V_{Au}}, V_{AuNps} = \frac{\pi d^3}{6} \text{ (d = nanoparticle average diameter (nm)) being the}$$

volume of one gold nanoparticle and $V_{Au} = \frac{M_{Au}}{N_A \rho_{Au}}$ the volume of a gold atom.

The equation can thus be written:

$$\sigma = \frac{N_{POM}}{N_{AuNps} S_{AuNps}} = \frac{w_{Mo} d N_A \rho_{Au}}{24 M_{Mo} \times w_{Au}}$$

With $S_{AuNps} = \pi d^2$ and w_V and w_{Au} being measured by ICP.

Calculation method of the light-to-heat conversion efficiency coefficient:

The light-to-heat conversion efficiency coefficient was calculated as follows, as described in

other works: $\eta = \frac{\Delta T * m_W * C_w * B}{P_0 - \frac{P_0}{10^A}}$ with ΔT = the temperature increase (at plateau), m_W the mass of

the sample assimilated to the mass of water, C_w the specific heat capacity of water (4185 J/g/K),

P_0 the incident power brought by the incident laser, A the absorbance of the sample (calculated

using Beer-Lambert law and extinction coefficient $\epsilon=568 \text{ M}_{\text{Au}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and B the constant rate of heat dissipation. This last parameter of dissipation to the external environment can directly be inferred from the decreasing temperature curve when the laser is turned off: $B = \frac{-1}{t} \cdot \ln \left(\frac{T(t)-T_0}{T_m-T_0} \right)$, being equal in our experimental conditions to $B=(8.6 \pm 1.6) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Taken together, the analysis of the temperature curves (heating and relaxation) at different doses and laser power density provided an average conversion coefficient $\eta = (59 \pm 5) \%$.

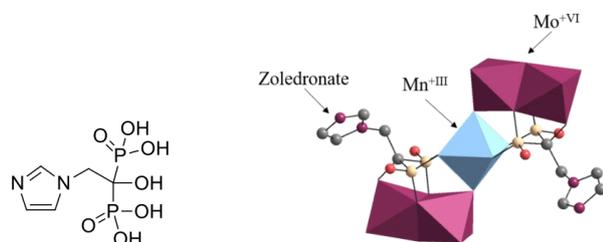


Figure S1. Representation of zoledronic acid (left) and structure of Mo₄Zol₂Mn (right). Purple polyhedra = MoO₆, blue polyhedron = MnO₆, yellow spheres = P, grey spheres = C, purple spheres = N, red spheres = O.

Table S1. Hydrodynamic diameter and zeta potential of citAuNP and AuNP@Mo₄Zol₂Mn.

Nanoparticles	D _H (nm)	Polydispersity	Mean zeta potential (mV)
citAuNP	22.6	0.2	-41.1 ± 1.2
AuNP@Mo ₄ Zol ₂ Mn	72.8	2.5	-26.6 ± 1.4

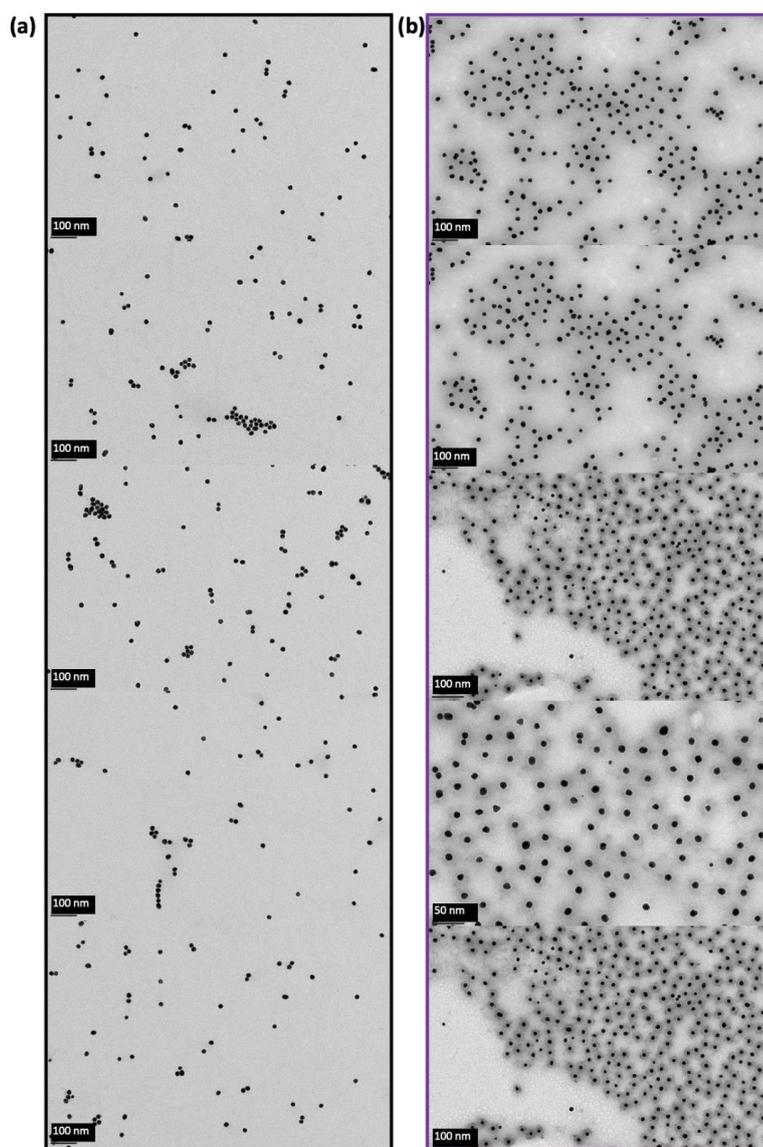


Figure S2. TEM images used to obtain the size histograms of (a) citAuNP and (b) AuNP@Mo₄Zol₂Mn.

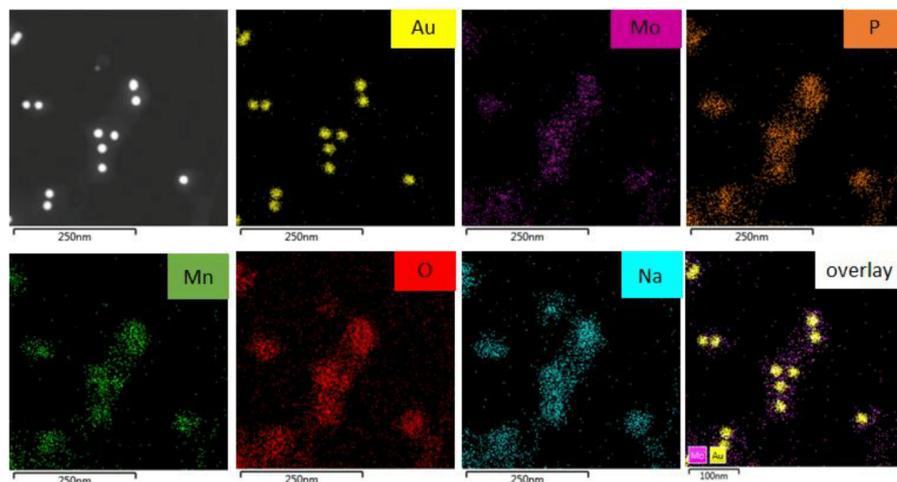


Figure S3. STEM-XEDS elemental map for the AuNP@Mo₄Zol₂Mn nanoparticles.

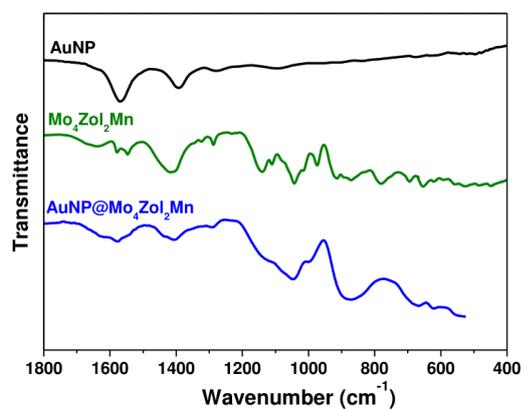


Figure S4. ATR-IR spectra of citAuNP (black), Mo₄Zol₂Mn (green) and AuNP@Mo₄Zol₂Mn (blue).

Table S2. Infrared Frequencies and Vibrational Assignments for of citAuNP, Mo₄Zol₂Mn and AuNP@Mo₄Zol₂Mn.

Assignment	citAuNP	Mo ₄ Zol ₂ Mn	AuNP@Mo ₄ Zol ₂ Mn
ν C=C		1578	1579
ν_{as} COO ⁻	1567		
ν N=C		1544	1538
δ N-H (NH ₄ ⁺)		1415	1405
ν_s COO ⁻	1396		
ν P=O		1288 1140	1288
ν_{as} P-O		1044	1047
ν_{as} Mo=O		974	997
ν Mo-O		915	883
ν_{as} Mo-O-Mo		872	
ν P-C		785	

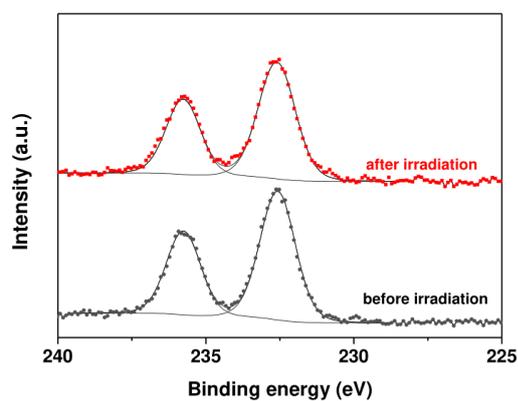


Figure S5. Deconvolution of the XPS spectrum of AuNP@Mo₄Zol₂Mn Mo 3d levels before (bottom) and after (top) laser irradiation (1.7 W/cm², 680 nm). The Mo 3d signal level is typical of Mo in the +VI oxidation state, with Mo 3d5/2 and Mo 3d3/2 binding energy (BE) values at 232.6 (FWHM=1.40eV) and 235.8 eV (FWHM=1.36eV).⁹⁻¹¹

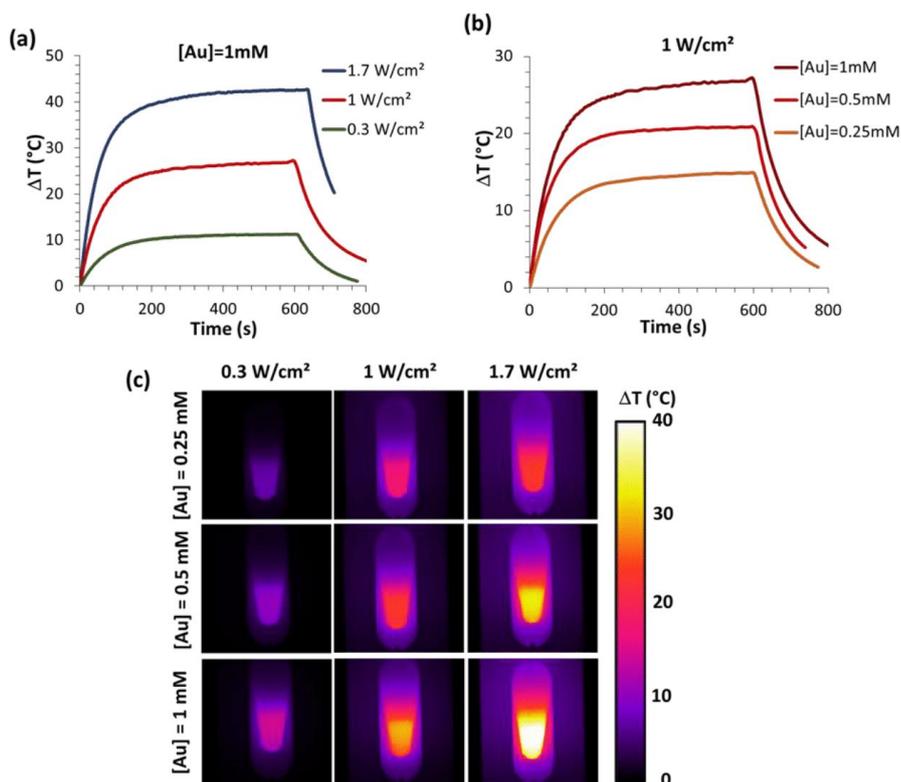


Figure S6. Temperature increase curves of AuNP@Mo₄Zol₂Mn as a function of the laser power (a) and the gold concentration (b) under laser irradiation at 680 nm and corresponding typical IR image at plateau temperature (after 10 minutes of exposure) (c). Note that the temperature relaxation after 10 minutes of heating (laser switched off) is used to calculate the dissipation parameter B for the calculation of the heat to light conversion coefficient h (see Methods above).

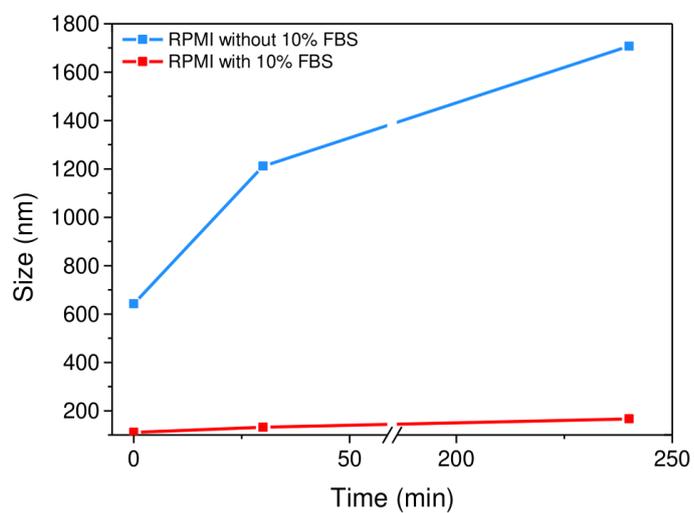


Figure S7. Hydrodynamic diameter of AuNP@Mo₄Zol₂Mn in pure RPMI and RPMI supplemented with 10% FBS over time.

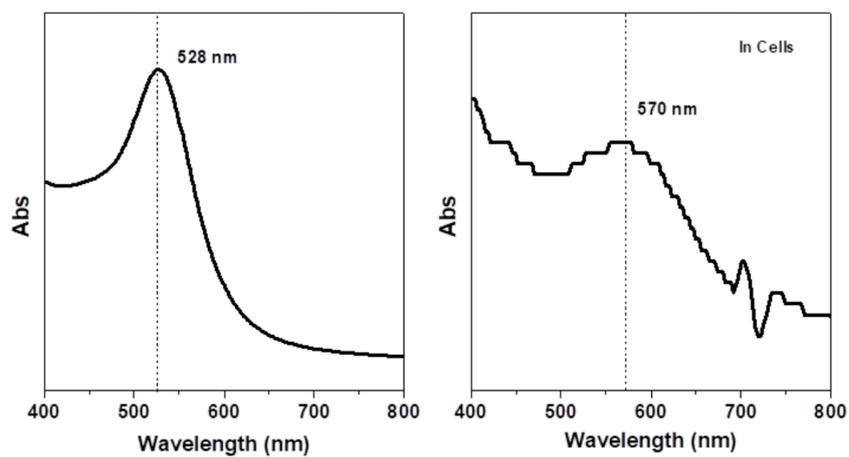


Figure S8. Absorbance spectra of AuNP@Mo₄Zol₂Mn in colloidal suspension (left) and internalized in cells incubated with AuNP@Mo₄Zol₂Mn (right) for a zoledronate concentration of 80 μ M.

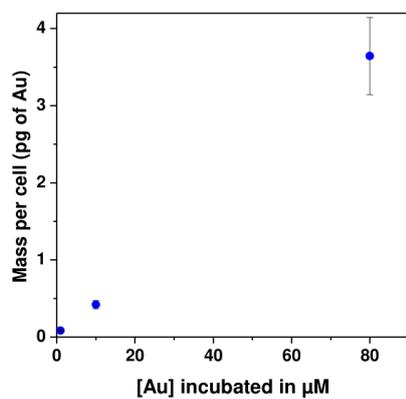


Figure S9. The dose of internalized AuNP@Mo₄Zol₂Mn as a function of the incubation concentration.

References

- (1) Hu, T. L.; Du, W. P.; Hu, B. W.; Li, J. R.; Bu, X. H.; Cao, R. Novel Ag(I) Complexes with Azole Heterocycle Ligands Bearing Acetic Acid Group: Synthesis, Characterization and Crystal Structures. *CrystEngComm* **2008**, *10* (8), 1037–1043.
<https://doi.org/10.1039/b801070f>.
- (2) Kieczkowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I. Preparation of (4-Hydroxy-1-Hydroxybutylidene)Bisphosphonic Acid Sodium Salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An Improved Procedure for the Preparation of 1-Hydroxy-1,1-Bisphosphonic Acids. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8310–8312.
- (3) Boulmier, A.; Feng, X.; Oms, O.; Mialane, P.; Rivière, E.; Shin, C. J.; Yao, J.; Kubo, T.; Furuta, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Anticancer Activity of Polyoxometalate-Bisphosphonate Complexes: Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Results. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (13), 7558–7565. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01114>.
- (4) Stevenson, P. C.; Turkevich, J.; Hillier. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday. Soc.* **1951**, *11* (c), 55–75.
- (5) Plan Sangnier, A.; Preveral, S.; Curcio, A.; K. A. Silva, A.; Lefèvre, C. T.; Pignol, D.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Targeted Thermal Therapy with Genetically Engineered Magnetite Magnetosomes@RGD: Photothermia Is Far More Efficient than Magnetic Hyperthermia. *J. Control. Release* **2018**, *279* (January), 271–281.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.036>.

- (6) Von Maltzahn, G.; Park, J. H.; Agrawal, A.; Bandaru, N. K.; Das, S. K.; Sailor, M. J.; Bhatia, S. N. Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas. *Cancer Res.* **2009**, *69* (9), 3892–3900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4242>.
- (7) Dickerson, E. B.; Dreaden, E. C.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Chu, H.; Pushpanketh, S.; McDonald, J. F.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorod Assisted Near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice. *Cancer Lett.* **2008**, *269* (1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.026>.
- (8) Feng, Y.; Chang, Y.; Sun, X.; Cheng, Y.; Zheng, R.; Wu, X.; Wang, L.; Ma, X.; Li, X.; Zhang, H. Differential Photothermal and Photodynamic Performance Behaviors of Gold Nanorods, Nanoshells and Nanocages under Identical Energy Conditions. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (4), 1448–1462. <https://doi.org/10.1039/c8bm01122b>.
- (9) Douvas, A. M.; Vasilopoulou, M.; Georgiadou, D. G.; Soutati, A.; Davazoglou, D.; Vourdas, N.; Giannakopoulos, K. P.; Kontos, A. G.; Kennou, S.; Argitis, P. Sol-Gel Synthesized, Low-Temperature Processed, Reduced Molybdenum Peroxides for Organic Optoelectronics Applications. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (31), 6290–6300. <https://doi.org/10.1039/c4tc00301b>.
- (10) Grünert, W.; Stakheev, A. Y.; Feldhaus, R.; Anders, K.; Shpiro, E. S.; Minachev, K. M. Analysis of Mo(3d) XPS Spectra of Supported Mo Catalysts: An Alternative Approach. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95* (3), 1323–1328. <https://doi.org/10.1021/j100156a054>.
- (11) Dolbecq, A.; Compain, J. D.; Mialane, P.; Marrot, J.; Sécheresse, F.; Keita, B.; Holzle, L. R. B.; Miserque, F.; Nadjo, L. Hexa- And Dodecanuclear Polyoxomolybdate Cyclic Compounds: Application toward the Facile Synthesis of Nanoparticles and Film

Electrodeposition. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (3), 733–741.

<https://doi.org/10.1002/chem.200800719>.

Références bibliographiques

- (1) Singh, P.; Pandit, S.; Mokkalpati, V. R. S. S.; Garg, A.; Ravikumar, V.; Mijakovic, I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>.
- (2) Cheng, L.; Wang, C.; Feng, L.; Yang, K.; Liu, Z. Functional Nanomaterials for Phototherapies of Cancer. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10869–10939. <https://doi.org/10.1021/cr400532z>.
- (3) Yohan, D.; Chithrani, B. D. Applications of Nanoparticles in Nanomedicine. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10* (9), 2371–2392. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.2015>.
- (4) Dykman, L.; Khlebtsov, N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/c1cs15166e>.
- (5) Beik, J.; Khateri, M.; Khosravi, Z.; Kamrava, S. K.; Kooranifar, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Gold Nanoparticles in Combinatorial Cancer Therapy Strategies. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *387*, 299–324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.025>.
- (6) Jain, S.; Hirst, D. G.; O'Sullivan, J. M. Gold Nanoparticles as Novel Agents for Cancer Therapy. *Br. J. Radiol.* **2012**, *85* (1010), 101–113. <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>.
- (7) Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R. R.; Sastry, M. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir* **2005**, *21* (23), 10644–10654. <https://doi.org/10.1021/la0513712>.
- (8) Sau, T. K.; Murphy, C. J. Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (28), 8648–8649. <https://doi.org/10.1021/ja047846d>.

- (9) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>.
- (10) Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Structure and Colloid Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331* (2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>.
- (11) Majzik, A.; Fülöp, L.; Csapó, E.; Bogár, F.; Martinek, T.; Penke, B.; Bíró, G.; Dékány, I. Functionalization of Gold Nanoparticles with Amino Acid, β -Amyloid Peptides and Fragment. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *81* (1), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.011>.
- (12) Rahme, K.; Chen, L.; Hobbs, R. G.; Morris, M. A.; O'Driscoll, C.; Holmes, J. D. PEGylated Gold Nanoparticles: Polymer Quantification as a Function of PEG Lengths and Nanoparticle Dimensions. *RSC Adv.* **2013**, *3* (17), 6085–6094. <https://doi.org/10.1039/c3ra22739a>.
- (13) Boujday, S.; Briandet, R.; Salmain, M.; Herry, J. M.; Marnet, P. G.; Gautier, M.; Pradier, C. M. Detection of Pathogenic Staphylococcus Aureus Bacteria by Gold Based Immunosensors. *Microchim. Acta* **2008**, *163* (3–4), 203–209. <https://doi.org/10.1007/s00604-008-0024-3>.
- (14) Aldewachi, H.; Chalati, T.; Woodroffe, M. N.; Bricklebank, N.; Sharrack, B.; Gardiner, P. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensors. *Nanoscale* **2018**, *10* (1), 18–33. <https://doi.org/10.1039/c7nr06367a>.
- (15) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>.
- (16) Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J. A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Gold Nanoparticles for the Improved

- Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (13), 4678–4684. <https://doi.org/10.1021/ja908117a>.
- (17) Patro, O. A.; Marti, F.; Blach, D. Gold Nanoparticle-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species during Plasmonic Photothermal Therapy : A Comparative Study for Different Particle Sizes , Shapes , and Surface. **2020**, 2862–2875. <https://doi.org/10.1039/d0tb00240b>.
- (18) Fernandes, N.; Rodrigues, C. F.; Moreira, A. F.; Correia, I. J. Overview of the Application of Inorganic Nanomaterials in Cancer Photothermal Therapy. *Biomater. Sci.* **2020**, *8* (11), 2990–3020. <https://doi.org/10.1039/d0bm00222d>.
- (19) Sangnier, A. P.; Aufaure, R.; Motte, L.; Wilhelm, C.; Guenin, E.; Lalatonne, Y. Hybrid Au@alendronate Nanoparticles as Dual Chemo-Photothermal Agent for Combined Cancer Treatment. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, *9* (1), 2947–2952. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.273>.
- (20) Kim, H. S.; Lee, D. Y. Near-Infrared-Responsive Cancer Photothermal and Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10* (9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym10090961>.
- (21) Jaque, D.; Martínez Maestro, L.; Del Rosal, B.; Haro-Gonzalez, P.; Benayas, A.; Plaza, J. L.; Martín Rodríguez, E.; García Solé, J. Nanoparticles for Photothermal Therapies. *Nanoscale* **2014**, *6* (16), 9494–9530. <https://doi.org/10.1039/c4nr00708e>.
- (22) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (10), 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>.
- (23) Compain, J. D.; Mialane, P.; Marrot, J.; Sécheresse, F.; Zhu, W.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Tetra- to Dodecanuclear Oxomolybdate Complexes with Functionalized Bisphosphonate Ligands: Activity in Killing Tumor Cells. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (46), 13741–13748. <https://doi.org/10.1002/chem.201001626>.

- (24) El Moll, H.; Zhu, W.; Oldfield, E.; Rodriguez-Albelo, L. M.; Mialane, P.; Marrot, J.; Vila, N.; Mbomekallé, I. M.; Rivière, E.; Duboc, C.; Dolbecq, A. Polyoxometalates Functionalized by Bisphosphonate Ligands: Synthesis, Structural, Magnetic, and Spectroscopic Characterizations and Activity on Tumor Cell Lines. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (14), 7921–7931. <https://doi.org/10.1021/ic3010079>.
- (25) Zekria, J.; Mansour, M.; Karim, S. M. The Anti-Tumour Effects of Zoledronic Acid. *J. Bone Oncol.* **2014**, *3* (1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2013.12.001>.
- (26) Tamura, T.; Shomori, K.; Nakabayashi, M.; Fujii, N.; Ryoike, K.; Ito, H. Zoledronic Acid, a Third-Generation Bisphosphonate, Inhibits Cellular Growth and Induces Apoptosis in Oral Carcinoma Cell Lines. *Oncol. Rep.* **2011**, *25* (4), 1139–1143. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1152>.
- (27) Cimini, E.; Piacentini, P.; Sacchi, A.; Gioia, C.; Leone, S.; Lauro, G. .; Martini, F.; Agrati, C. Zoledronic Acid Enhances V02 T-Lymphocyte Antitumor Response to Human Glioma Cell Lines. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2011**, *24* (I), 139–148. <https://doi.org/10.1177/039463201102400116>.
- (28) Reinholz, M. M.; Zinnen, S. P.; Dueck, A. C.; Dingli, D.; Reinholz, G. G.; Jonart, L. A.; Kitzmann, K. A.; Bruzek, A. K.; Negron, V.; Abdalla, A. K.; Arendt, B. K.; Croatt, A. J.; Sanchez-Perez, L.; Sebesta, D. P.; Lönnberg, H.; Yoneda, T.; Nath, K. A.; Jelinek, D. F.; Russell, S. J.; Ingle, J. N.; Spelsberg, T. C.; Dixon, H. B. F.; Karpeisky, A.; Lingle, W. L. A Promising Approach for Treatment of Tumor-Induced Bone Diseases: Utilizing Bisphosphonate Derivatives of Nucleoside Antimetabolites. *Bone* **2010**, *47* (1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.03.006>.
- (29) Saad, A.; Zhu, W.; Rousseau, G.; Mialane, P.; Marrot, J.; Haouas, M.; Taulelle, F.; Dessapt, R.; Serier-Brault, H.; Rivière, E.; Kubo, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Polyoxomolybdate Bisphosphonate Heterometallic Complexes: Synthesis, Structure, and Activity on a Breast Cancer Cell Line. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10537–10547. <https://doi.org/10.1002/chem.201406565>.

- (30) Boulmier, A.; Feng, X.; Oms, O.; Mialane, P.; Rivière, E.; Shin, C. J.; Yao, J.; Kubo, T.; Furuta, T.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Anticancer Activity of Polyoxometalate-Bisphosphonate Complexes: Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Results. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (13), 7558–7565. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01114>.

Chapitre IV

Synthèse de AuNPs sphériques et étoilées utilisant le POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ comme réducteur et stabilisant

Ce chapitre porte sur la synthèse de nanoparticules d'or à partir d'un polyoxomolybdate réduit ($\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$). Dans une première partie la synthèse et la caractérisation du POM hybride $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ seront rapidement présentées. Ensuite une deuxième partie sera consacrée à l'élaboration de nanoparticules d'or sphériques à l'aide du $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ assistée par micro-onde. La dernière partie décrira la synthèse de nanoparticules d'or étoilées à partir du $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$.

Partie 1 : Synthèse et caractérisation du POM hybride $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$

I. Description du POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$

Dans ce chapitre un polyoxomolybdate réduit a été utilisé comme agent réducteur et stabilisant lors de la synthèse des nanoparticules d'or. Nous allons donc dans ce préambule décrire succinctement sa synthèse et sa caractérisation.

Le POM $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}_2]_6[\text{Mo}^{\text{V}}_4\text{O}_8(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)\text{OPO}_3)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$) a été synthétisé selon le protocole décrit par Compain et al..¹ La diffraction sur monocristal a permis d'obtenir sa structure.¹ Ce POM centrosymétrique est constitué de deux unités $\{\text{Mo}_2\text{O}_4\text{Ale}\}$ où le ligand alendronate est connecté aux ions molybdène de façon dissymétrique, un groupement $\{\text{PO}_3\}$ étant monocoordiné à un centre Mo^{V} et le second pontant les ions Mo^{V} via deux atomes d'oxygène (Figure 1). Les six contre-ions diéthylammonium interagissent eux avec le POM via des liaisons hydrogène.

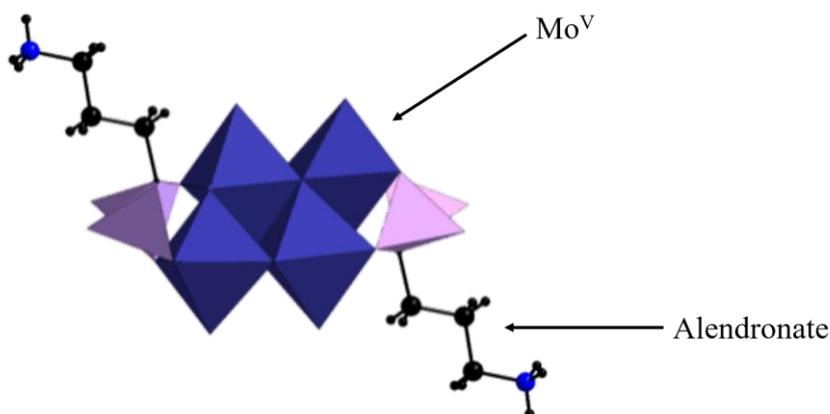


Figure 1: Représentation polyédrique du POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$.

Son spectre infrarouge présente les bandes caractéristiques des groupements bisphosphonates P-O/P=O entre 1025 et 1134 cm^{-1} , les bandes Mo-O/Mo=O relatives au cœur inorganique du POM étant observées entre 892 et 964 cm^{-1} (Figure 2).

Le spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ du complexe $\text{Mo}_4(\text{AlE})_2$ en solution dans l'eau présente un doublet de doublet (30.93, 30.64, 20.19 and 19.91 ppm). Ceci est en accord avec deux atomes de phosphore non équivalents et couplés et suggère donc fortement que ce complexe est stable en milieu aqueux.

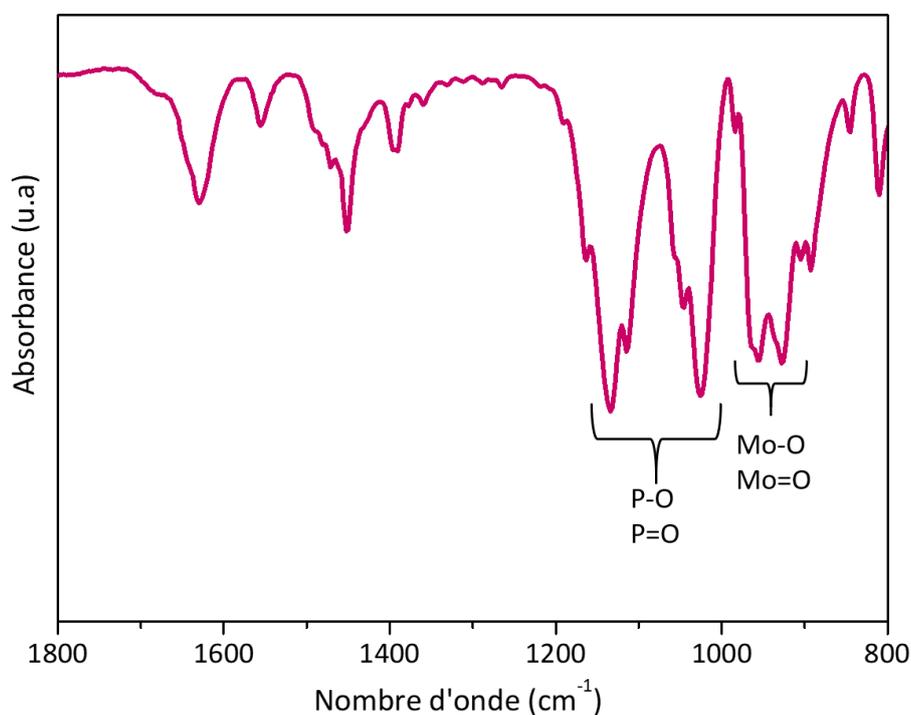


Figure 2 : Spectre infrarouge du composé $\text{Mo}_4(\text{AlE})_2$.

Partie 2 : Synthèse de AuNPs@POMo sphériques par chauffage micro-onde

I. Introduction

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre bibliographique, de nombreux facteurs expérimentaux peuvent influencer sur la taille, la forme et l'homogénéité des nanoparticules d'or. Dans cette partie nous allons nous intéresser au mode de chauffage lors de la synthèse de nanoparticules. En effet, le chauffage « conventionnel » repose sur un transfert de chaleur par conduction et par convection. C'est un chauffage qui présente l'inconvénient d'avoir une répartition de la chaleur inhomogène. Après sa découverte en 1945 par Percy Spencer et son essor dans les ménages français en 1970, le chauffage par micro-onde intègre rapidement les laboratoires de recherche. En effet, le chauffage par micro-onde se caractérise par l'absorption d'un rayonnement électromagnétique par le produit à chauffer, ce qui conduit à un chauffage plus homogène. Il en résulte donc une diminution du temps de réaction, une diminution de la consommation d'énergie et un meilleur contrôle des synthèses.

Plusieurs études montrent l'intérêt d'utiliser le chauffage par micro-ondes pour la synthèse de nanomatériaux.^{2,3} Ce mode de synthèse permet en particulier une augmentation de la vitesse de nucléation, une amélioration des rendements et une meilleure uniformité en taille et en forme des nanomatériaux obtenus. Différents paramètres ont été étudiés. Le temps de chauffage joue bien évidemment un rôle important. Lee *et al.* ont par exemple obtenu, en utilisant l'acide citrique comme réducteur et le CTAB comme agent stabilisant, des AuNPs de diamètre ~4-nm avec un temps de chauffage de 40 s et de diamètre ~1 nm avec un temps de chauffage de 70 s.⁴ Dans le même esprit, Liu *et al.* ont montré que l'augmentation de la température et du temps de chauffage et l'utilisation d'une rampe de chauffe plus rapide permet la formation de nanoparticules d'or plus petite taille et avec une distribution en taille plus étroite.⁵ Les travaux de Seol *et al.* ont quant à eux mis en évidence qu'imposer une montée rapide en température jouait un rôle clé dans le contrôle de la synthèse d'AuNPs

obtenues par réduction de HAuCl_4 par du citrate de sodium (méthode de Turkevich). Une montée en température supérieure à $50^\circ\text{C min}^{-1}$ a ainsi permis d'obtenir en quelques minutes des AuNPs de diamètre ~ 12 nm possédant une distribution en taille homogène.⁶ Les travaux de Bayazit ont quant à eux montré que l'augmentation de la puissance du micro-onde induisait une diminution de la taille des AuNPs.⁷ Des AuNPs de diamètre inférieur à 10 nm ont ainsi été isolées en utilisant une technologie de micro-flux lors de la synthèse de Turkevich. Ces travaux confirment donc que l'utilisation du chauffage par micro-ondes permet non seulement de contrôler la taille des AuNPs mais aussi d'obtenir ces dernières en quelques minutes, ce qui représente un gain de temps et également une diminution des coûts de synthèse. Par ailleurs, récemment, Cronin *et al.* ont décrit la synthèse de nanoparticules d'or décorées par des POMs en utilisant le chauffage par micro-ondes d'une solution d' $\text{AuNO}_3(\text{PMe}_3)$ dans l'acétonitrile en présence de différents polyoxotungstates ou polyoxovanadates ($[\text{W}_6\text{O}_{19}]^{2-}$, $[\text{H}_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{3-}$, $[\text{H}_4\text{W}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$, $[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$, $[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3\text{O}_{62}(\text{pyrène})]^{6-}$ et $[\text{P}_8\text{W}_{48}\text{O}_{184}]^{40-}$) possédant des contre-ions tetrabutylammonium.⁸ Les auteurs proposent que les POMs permettent d'initier la réduction du précurseur d'or et induisent la croissance contrôlée des nanoparticules. Les POMs de petite taille avec les charges négatives les moins élevées se sont révélés être les plus efficaces pour stabiliser les NPs, alors que pour les POMs les plus gros et les plus chargés, il n'y a pas d'organisation structurée de ces oxydes moléculaires à la surface des NPs. A notre connaissance, hormis cette étude spécifique utilisant un précurseur d'or non conventionnel, un solvant non aqueux, et pour laquelle les POMs ne jouent pas le rôle de réducteur, l'obtention par chauffage micro-ondes de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des POMs n'a pas été décrite dans la littérature. Au cours de cette thèse, nous avons donc exploré la synthèse par chauffage micro-ondes dans l'eau de AuNP@POM en utilisant le polyoxomolybdate hybride $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ décrit ci-dessus.

II. Synthèse de AuNPs@POMo

Le POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ possède quatre centres métalliques réduits Mo^{V} , qui vont permettre la réduction des sels d' HAuCl_4 pour former les nanoparticules d'or.

La mise au point d'une synthèse reproductible conduisant à des AuNPs contrôlées en forme et en taille a nécessité d'optimiser les conditions expérimentales. En nous appuyant sur notre expérience avec le POV $\text{V}_3(\text{Al}_e)_3$ (Chapitre II), nous avons fixé les concentrations en or (1 mM) et en POM (1 mM) de façon à être en large excès de réducteur. Le pH des solutions à lui été fixé à 6 afin d'éviter une détérioration du POMo, celui-ci étant stable à ce pH. Nous avons ensuite testé différentes températures de synthèse afin d'obtenir des AuNPs sphériques de taille contrôlée et homogène.

La Figure 3 représente les spectres UV-visible des AuNPs obtenues pour différentes températures de synthèses par chauffage conventionnel (30°C, 50°C, 70°C et 100°C). À 50°C, 70°C et 100°C, deux bandes plasmon sont observées sur les spectres d'absorption. La première, situé à environ 530 nm, est caractéristique de nanoparticules d'or sphériques. La deuxième, large et située entre 800 nm et 1100 nm, pourrait correspondre à la présence d'agrégats. Lorsque que la synthèse est effectuées à 30°C, la présence d'une seule bande plasmon à environ 530 nm indique l'obtention de particules sphériques.

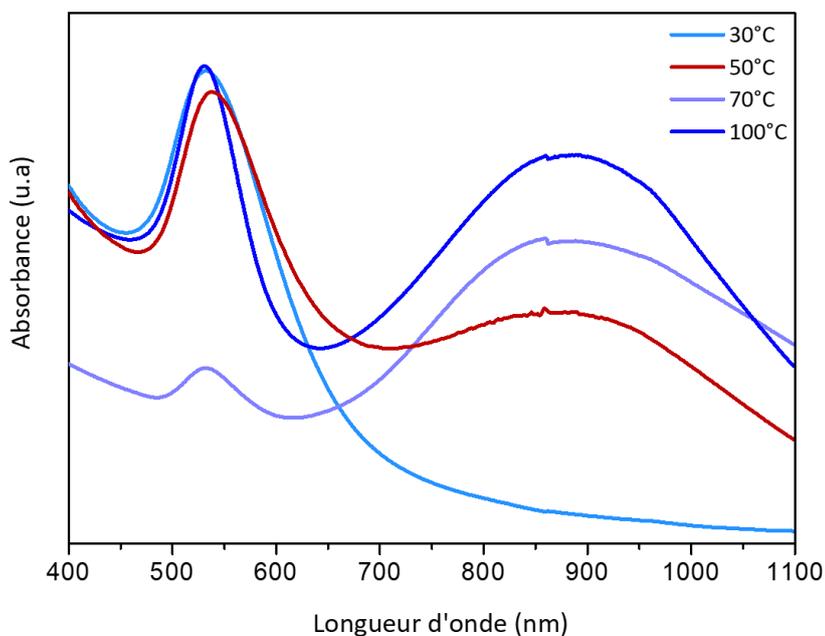


Figure 3: Spectres UV-visible des AuNPs obtenues à 30°C, 70°C et 100°C par chauffage conventionnel.

Nous avons voulu vérifier la reproductibilité de cette synthèse à 30 °C. La Figure 4 représente les spectres UV-visible de plusieurs synthèses à cette température. Une bande plasmon autour de 532 nm est chaque fois observée. Cependant, une forte absorbance entre 800 nm et 1100 nm est observée pour les synthèses n°2 et n°4. Cela suggère la présence d'agrégats et/ou de particules de tailles plus grandes. Quant à la synthèse n°3, un épaulement à 680 nm indique le début d'une agrégation des nanoparticules d'or.

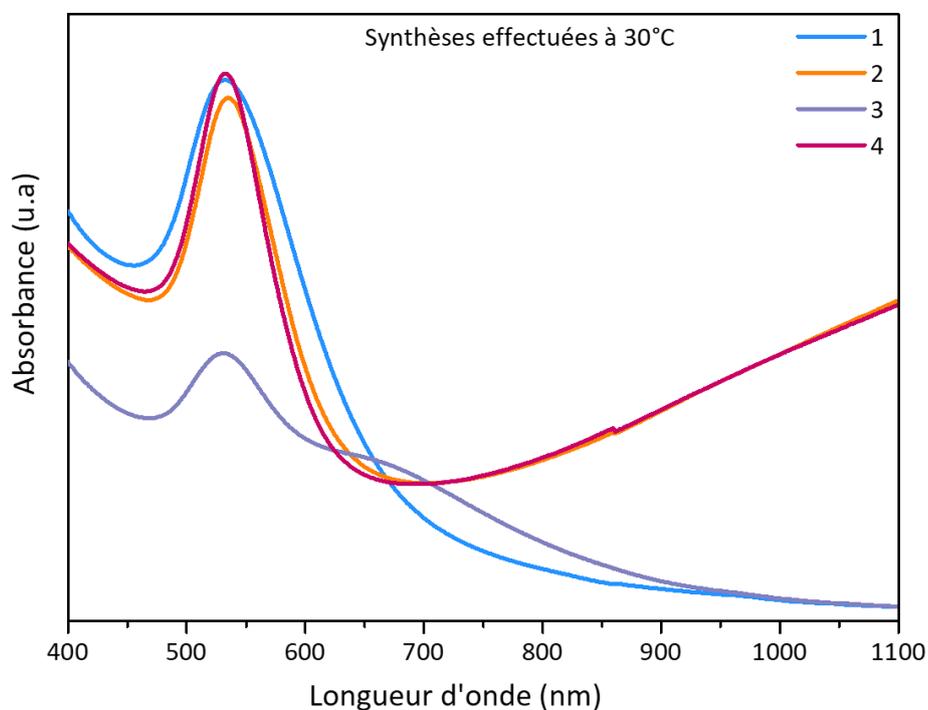


Figure 4: Spectres UV-visible de plusieurs synthèses de nanoparticules d'or à 30°C par chauffage conventionnel.

Nous nous sommes donc tournés vers une voie de chauffage par micro-ondes. La Figure 5 représente les spectres UV-visible et les images TEM des synthèses de nanoparticules d'or à partir du composé $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$ avec un chauffage à 50°C conventionnel et par micro-ondes avec une puissance de 1600 W. Le spectre d'absorption des AuNPs obtenues par chauffage conventionnel met comme décrit ci-dessus en évidence deux bandes LSPR, une première à 538 nm et une seconde bande large entre 800 et 1100 nm. Par microscopie, on observe en

effet des NPs polydisperses. Au contraire, dans les mêmes conditions de synthèse le chauffage par micro-ondes conduit à des nanoparticules homogènes en forme et en taille, présentant une bande LSPR fine située à 538 nm. Cette synthèse est de plus tout à fait reproductible.

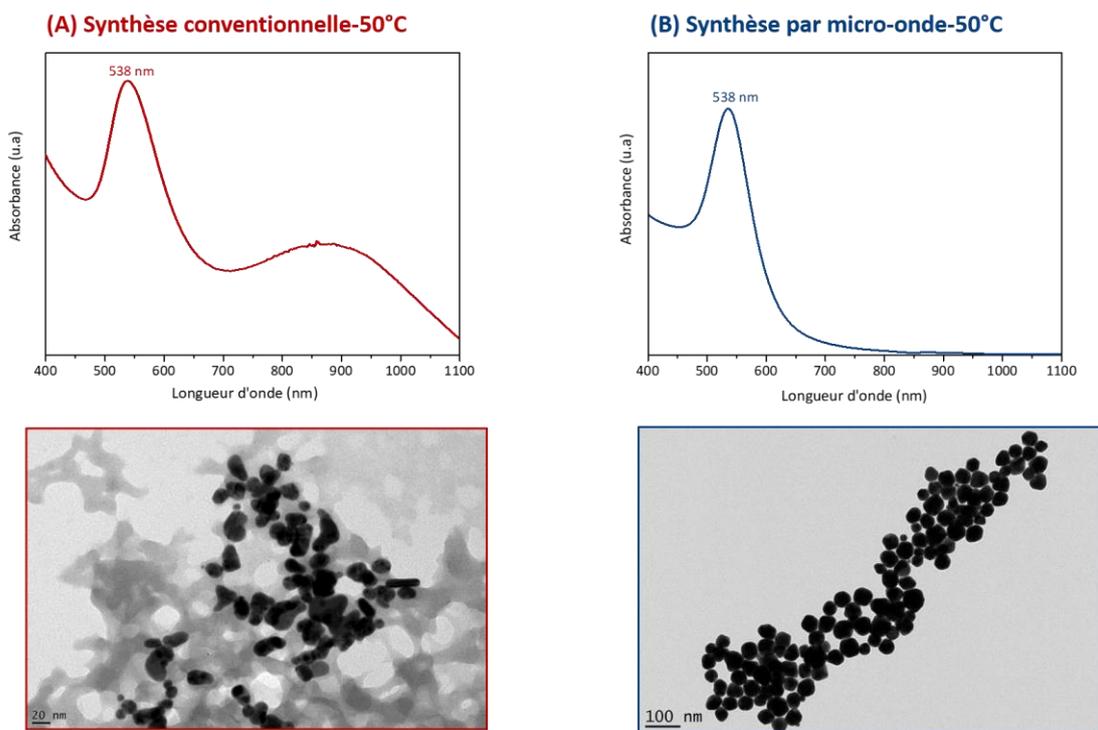


Figure 5: Spectres UV-visible et images TEM des AuNPs@POMo synthétisées par (A) chauffage conventionnel - (B) par chauffage micro-onde à 50°C.

Nous avons ensuite fait varier la puissance du micro-onde et la température de la synthèse. La Figure 6 présente l'évolution de la bande LSPR en fonction de la puissance (6.A) et de la température (6.B). A une température de 50°C l'augmentation de la puissance du micro-onde s'accompagne d'un décalage vers les basses longueurs d'onde et d'un affinement de la bande LSPR, ce qui est interprété par une diminution de la taille des nanoparticules et d'une amélioration de l'homogénéité. Cette tendance est aussi observée pour une augmentation de la température. A une puissance de 1600 W, l'augmentation de la température entraîne en effet une diminution de la taille des nanoparticules comme l'indique le décalage observé vers les basses longueurs d'onde de la bande LSPR.

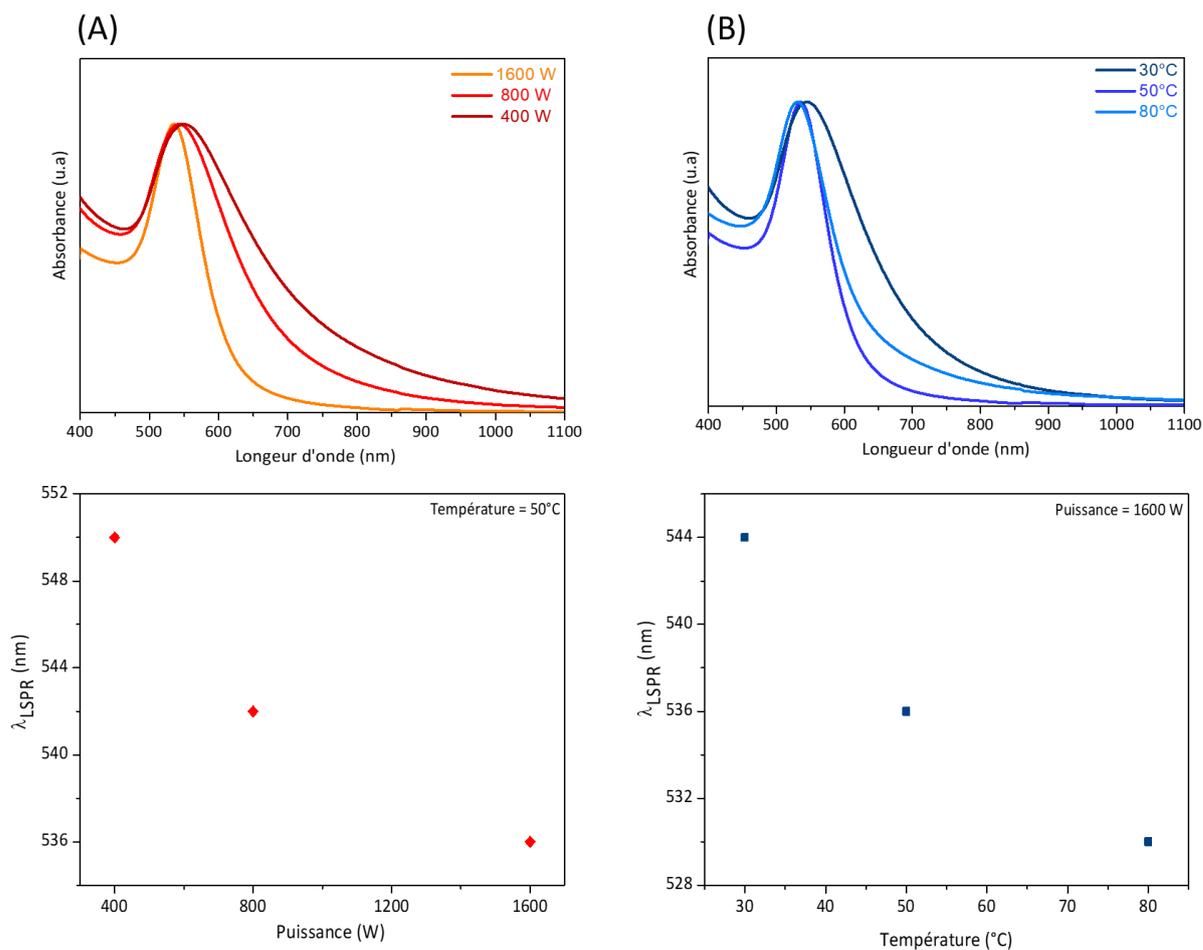


Figure 6: Evolution de la bande LSPR en fonction (A) de la puissance du micro-onde et (B) de la température des AuNP@POMo synthétisées par chauffage micro-onde.

De plus, l'influence de la concentration en POM et du pH de la solution d'or ont également été étudiés. Concernant tout d'abord l'effet de la concentration, on observe sur la Figure 7 que la bande LSPR des AuNPs obtenues avec des concentrations en POM de 2,5 mM et 0,5 mM est plus large que celle obtenue avec une concentration de 1 mM.

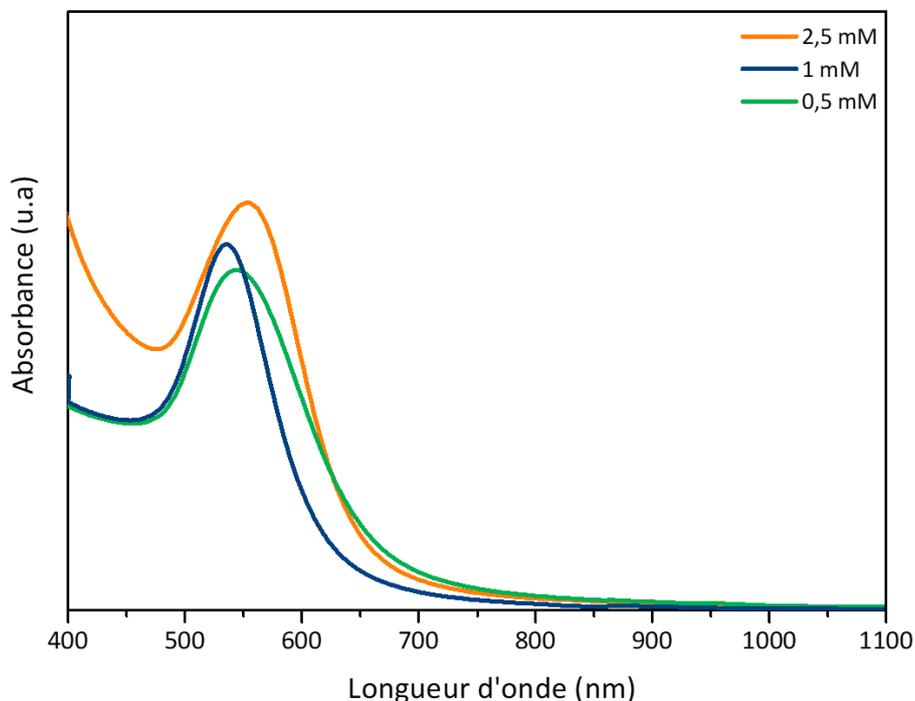


Figure 7: Spectres UV-visible des AuNPs@POMo obtenues par chauffage micro-onde pour différentes concentrations en $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ ($T = 50^\circ\text{C}$, puissance = 1600 W).

La Figure 8 correspond aux spectres UV-visibles des AuNPs obtenues pour différents pH de la solution d'or ($[\text{POM}] = 1 \text{ mM}$). À pH basique ($\text{pH} = 8$), la bande LSPR est large avec un λ_{max} vers 600 nm alors qu'à pH acide ($\text{pH} = 4$) la bande LSPR est mieux définie, avec un λ_{max} identique à la valeur obtenue à $\text{pH} = 6$, mais présentant un épaulement significatif.

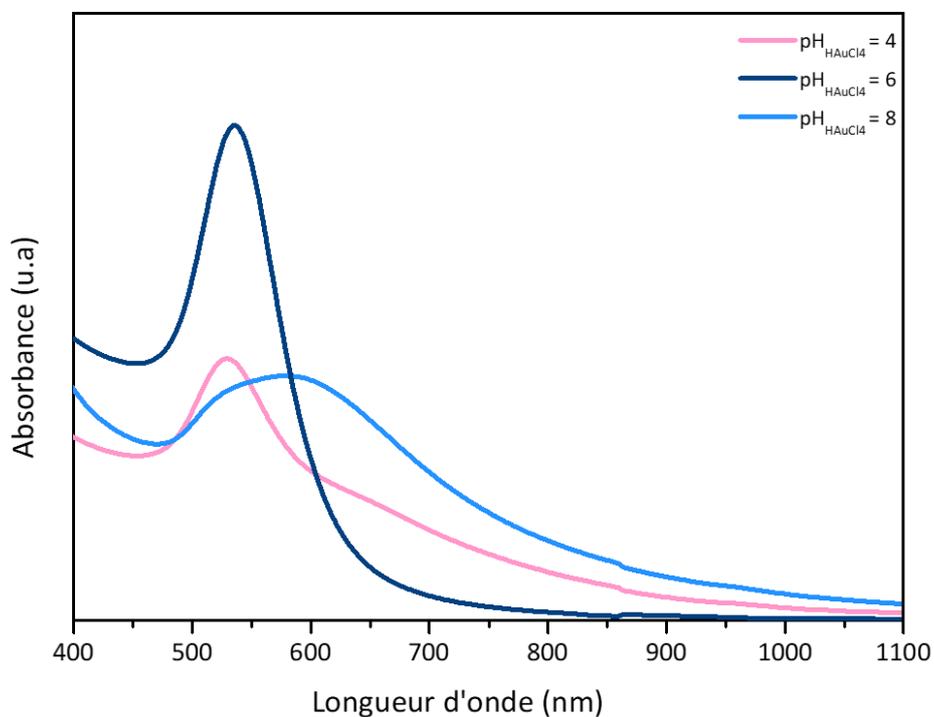


Figure 8: Spectres UV-visible des AuNPs obtenues pour différents pH de la solution mère d' HAuCl_4 ($[\text{POM}] = 1 \text{ mM}$, $T = 50^\circ\text{C}$, puissance = 1600 W).

Les conditions retenues pour la suite de ce travail sont celles conduisant à la bande LSPR la plus fine à 538 nm. Elles correspondent à une puissance de 1600 W et une température de 50°C (pH = 6, $[\text{POM}] = 1 \text{ mM}$) (Figure 9).

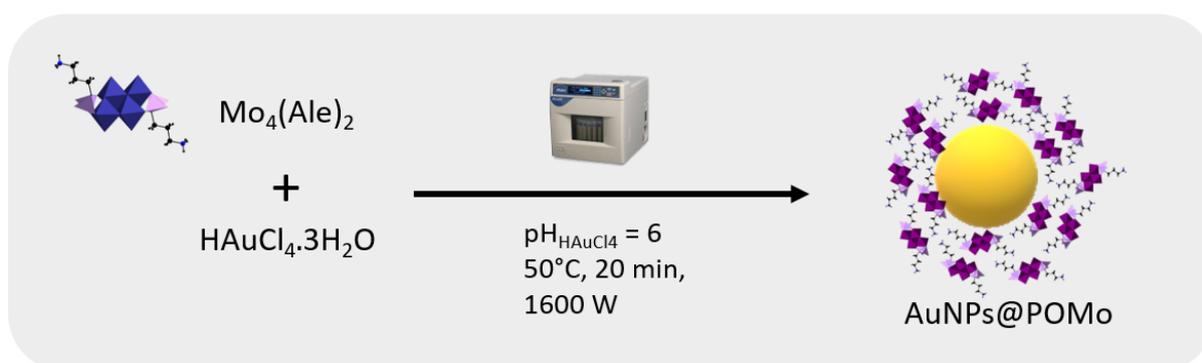


Figure 9: Schématisation de la synthèse des AuNPs à partir du POMo par micro-onde.

Le spectre UV-visible (Figure 10.A) des AuNPs@POMo obtenues dans ces conditions montre une bande LSPR fine (FWHM = 61 nm) à 538 nm, caractéristique de nanoparticules d'or sphériques. La taille et la dispersion des AuNPs@POMo ont été déterminées par microscopie électronique à transmission (TEM) et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure 10.B). Les nanoparticules obtenues possèdent bien une morphologie sphérique (Figure 11), le diamètre déterminé par TEM étant de 28.4 ± 7 nm. La détermination par DLS de la taille des AuNPs@POMo conduit quant à elle à un diamètre de 49.7 ± 0.3 nm. La taille en DLS est ainsi supérieure à la taille déterminée par TEM. Ce résultat était attendu car celle-ci prend en compte les couches d'hydratation et les couches de POM. Enfin, le potentiel ζ des AuNPs@POMo est de -36.2 ± 1.4 mV, ce qui est caractéristique de l'adsorption du POM $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ chargé négativement à la surface des AuNPs.

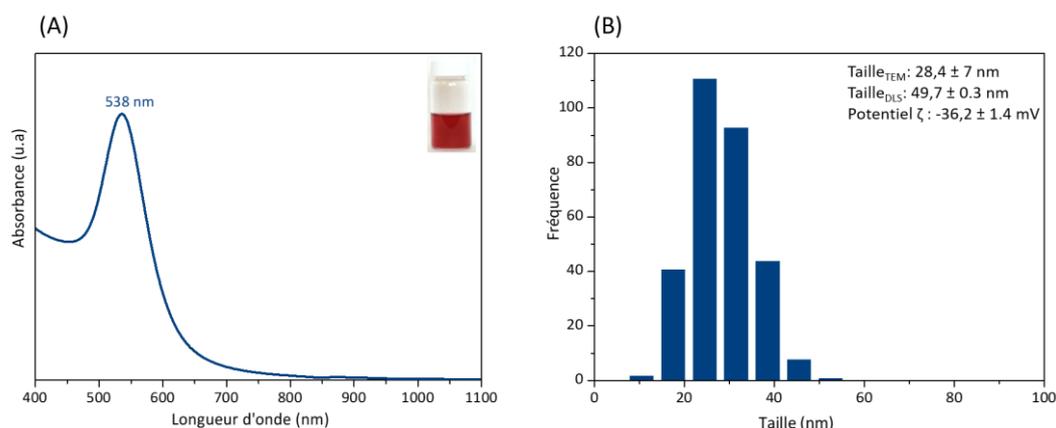


Figure 10: (A) Spectre UV-visible des AuNPs@POMo obtenues par chauffage micro-onde (P = 1600 W, T = 50°C, pH = 6, [POM] = 1 mM). Insert : photo de la suspension colloïdale des AuNPs@POMo ; (B) Histogramme de la distribution en taille des AuNPs@POMo. Insert : tailles moyennes des AuNPs@POMo déterminées par TEM et DLS et valeur du potentiel Zêta.

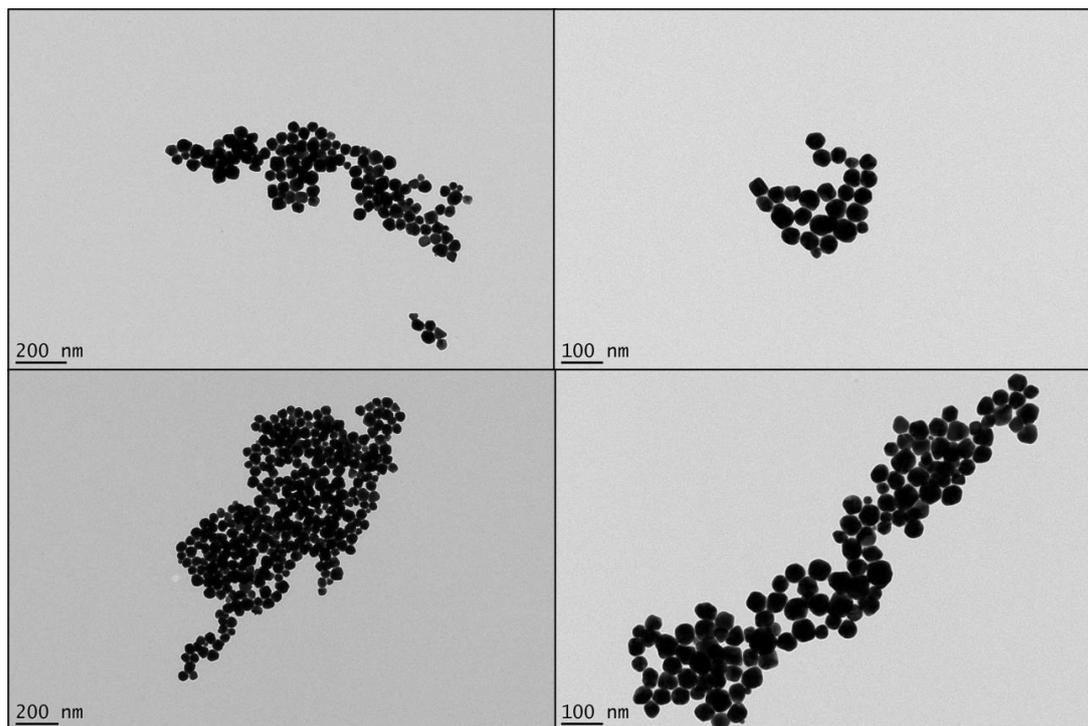


Figure 11: Images TEM des AuNPs@POMo obtenues avec le POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$.

La présence d'un POM hybride contenant des ligands Ale à la surface des AuNPs a été confirmée par spectroscopie infrarouge (IR) et par spectroscopie de photoélectrons des rayons X (XPS). Le spectre IR (Figure 12) des AuNPs@POMo montre en effet les bandes caractéristiques des groupements phosphonates P-O à 1039 cm^{-1} et des groupements Mo=O et Mo-O à 927 cm^{-1} à 882 cm^{-1} , respectivement. Ces bandes sont légèrement décalées par rapport aux bandes observées sur le spectre IR du POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$.

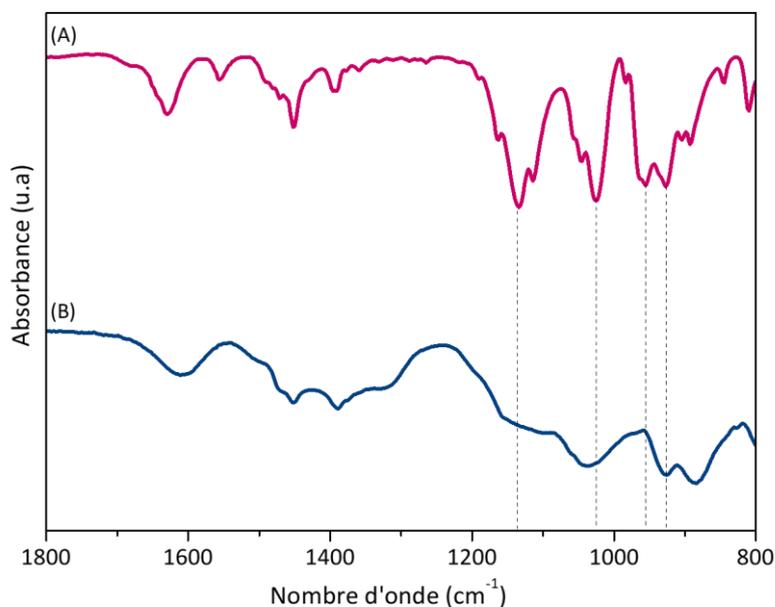


Figure 12: (A) Spectre infrarouge du POM $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$. (B) Spectre infrarouge des AuNPs@POMo.

La Figure 13 montre les spectres XPS du Mo 3d du POM $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$ et des AuNPs@POMo lavées. On remarque dans les deux cas la présence d'un doublet caractéristique du Mo 3d. Concernant le POM, on observe le pic du Mo $3d_{5/2}$ à 232,4 eV et le pic du Mo $3d_{3/2}$ à 235,6 eV, ceux-ci étant caractéristiques d'ions molybdène au degré d'oxydation +V.⁹⁻¹¹ Le spectre correspondant aux nanoparticules d'or fonctionnalisées présente lui un pic du Mo $3d_{5/2}$ à 233,7 eV et le pic du Mo $3d_{3/2}$ à 236,8 eV. Ces pics sont donc décalés vers les hautes énergies. Ce décalage est caractéristique d'un changement d'oxydation du Mo^V en Mo^{VI} .^{10,11} Ce résultat est tout à fait cohérent avec l'oxydation du POM lors de la réduction du sel d'or pendant la synthèse. De plus, nous pouvons noter qu'aucune composante à basse énergie caractéristique du Mo^V n'est observée, confirmant qu'après lavage des nanoparticules les POMs présents à la surface des nanoparticules sont tous oxydés.

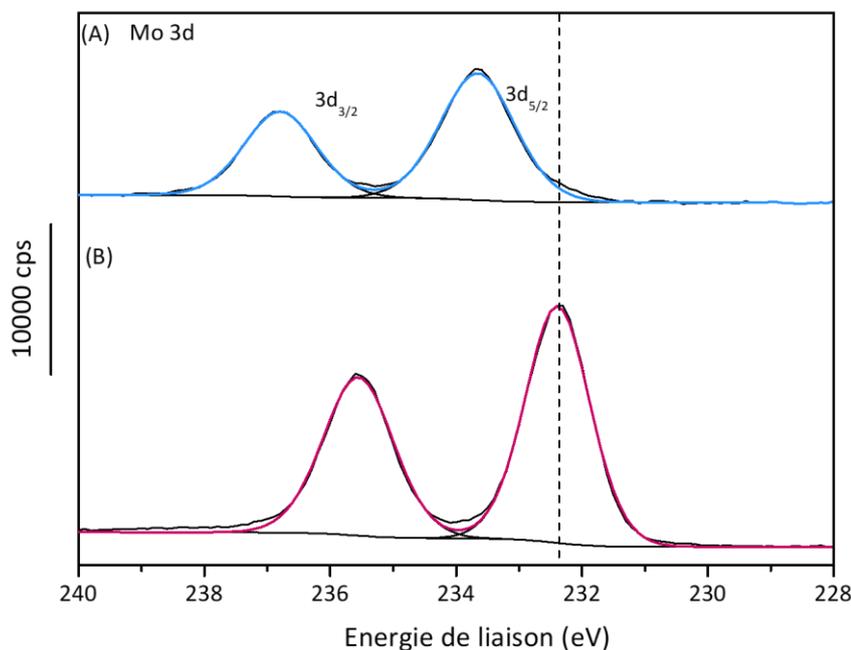


Figure 13: Spectres XPS du Mo 3d (A) des AuNPs synthétisées à partir du POM $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ et (B) du POM $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$.

Les mesures d'ICP-OES effectuées sur le composite AuNPs@POMo indiquent également la présence des éléments constituant le POM, avec un rapport atomique P/Mo de 1.02 ± 0.05 , en accord avec le rapport attendu pour le POMo P/Mo = 1. Ces résultats confirment donc la présence du composé $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ oxydé à la surface des AuNPs. Nous ne pouvons cependant proposer de structure définie concernant ce complexe.

Enfin, nous avons travaillé à l'optimisation de la procédure de nettoyage des AuNPs. Pour cela, plusieurs conditions ont été testées. La Figure 14 représente le spectre UV-visible des AuNPs@POMo avant lavage et après centrifugation 15 min. à 14500 rpm dans un tube en polypropylène et redispersion dans l'eau ultrapure. Après cette étape de lavage, une deuxième bande plasmon large apparaît entre 600 nm et 1000 nm. De plus, la solution change de couleur, passant de la couleur rouge à la couleur violette. Ceci est indicatif d'une agrégation des nanoparticules.

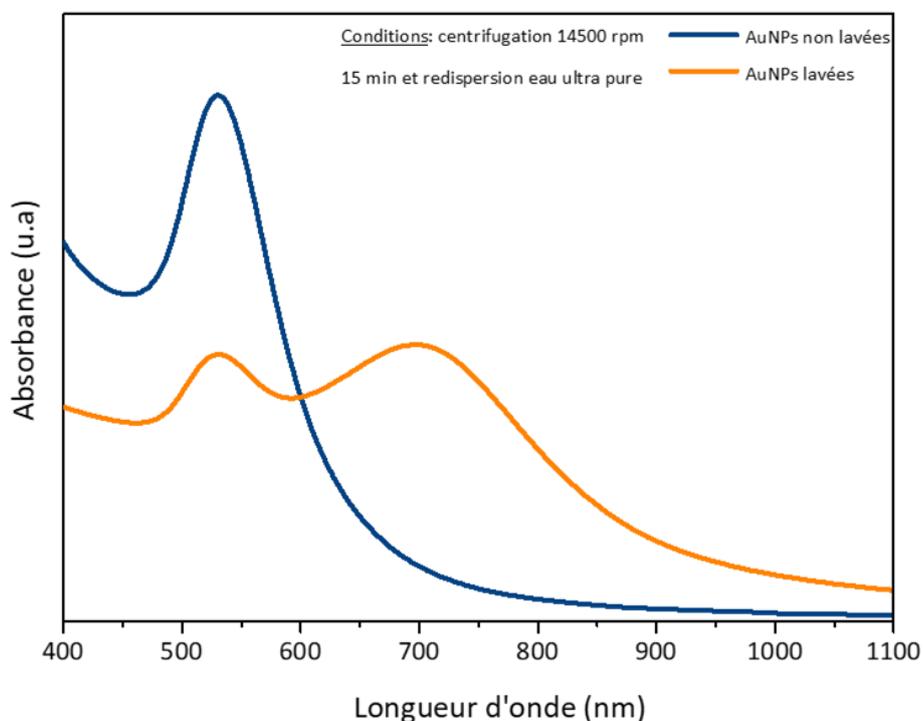


Figure 14: Spectre UV-visible des AuNPs@POMo avant lavage (courbe bleue) et après centrifugation 15 min. à 14500 rpm dans des tubes en polypropylène et redispersion dans l'eau ultrapure (courbe orange).

Lorsque l'on centrifuge moins vite et plus longtemps (6500 rpm pendant 30 minutes, Figure 15), le même phénomène est observé, avec l'apparition de la seconde bande LSPR, large et localisée entre 600 nm et 1100 nm. Cette condition de lavage a été testée sur trois échantillons, conduisant systématiquement à l'apparition de cette seconde bande LSPR, celle-ci étant cependant plus ou moins intense suivant les échantillons traités.

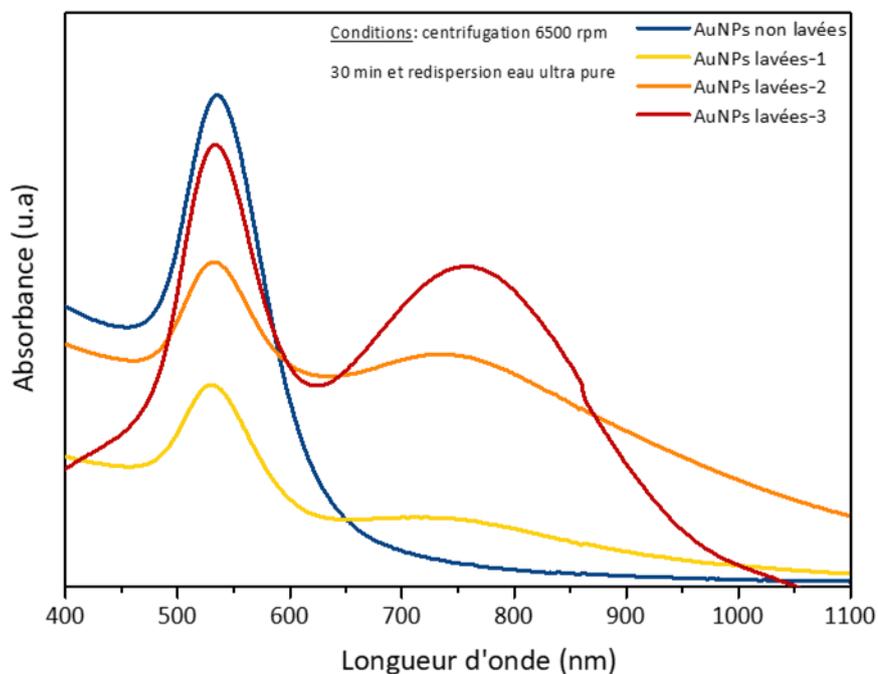


Figure 15: Spectre UV-visible des AuNPs@POMo avant lavage (courbe bleue) et après centrifugation 30 min. à 6500 rpm dans des tubes en polypropylène et redispersion dans l'eau ultrapure selon trois essais différents (courbe jaune, orange ou rouge).

De plus, nous avons observé que lorsque l'on centrifuge les AuNPs@POMo dans les tubes en polypropylène considérés, un film gris de nanoparticules se dépose à la surface du tube, film que l'on ne réussit pas à redisperser. Nous avons alors considéré des tubes à centrifugation en verre. La Figure 16 représente le spectre UV-visible obtenu après centrifugation pendant 10 minutes à 6000 rpm et redispersion dans l'eau ultra pure. On observe que le spectre UV-visible est alors similaire à celui des NPs non lavées, avec cependant une diminution de l'absorbance due à une perte de nanoparticules lors du retrait du surnageant. Le paramètre fondamental permettant d'obtenir des AuNPs@POMo lavées et redispersable est donc la nature du tube utilisé pour la centrifugation.

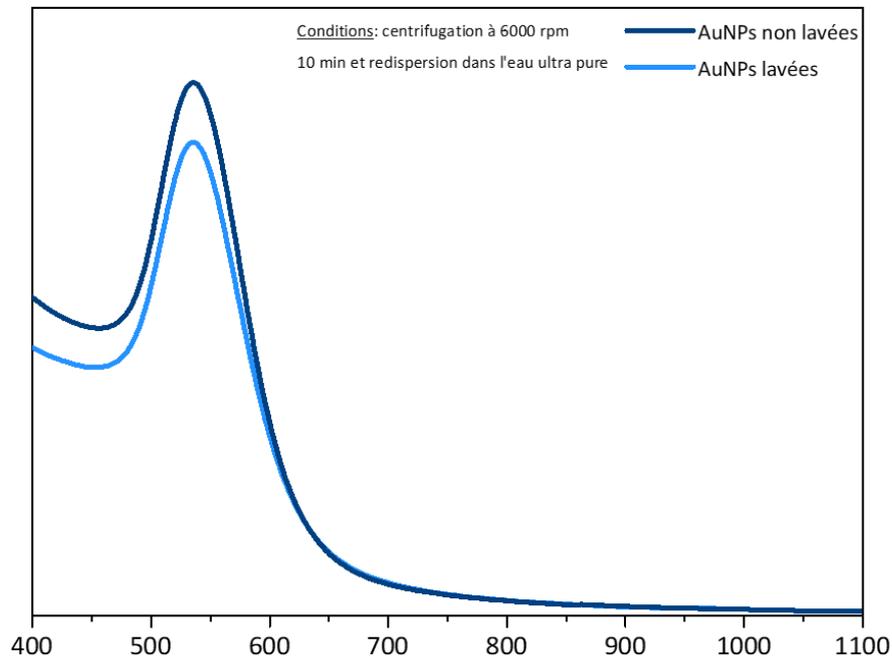


Figure 16: Spectre UV-visible des AuNPs@POMo avant lavage (courbe bleu foncée) et après centrifugation 10 min. à 6000 rpm dans des tubes en verre et redispersion dans l'eau ultrapure (courbe bleu claire).

III. Conclusion

En conclusion, nous avons pu mettre au point un protocole synthétique très reproductible de nanoparticules d'or sphériques monodisperses décorées par un POMo, en utilisant comme précurseur le POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ réduit et fonctionnalisé par un ligand alendronate. Lors de la synthèse, celui-ci sert à la fois de réducteur et d'agent stabilisant. De plus, ces NPs n'ont pu être obtenues que par chauffage en conditions micro-ondes, mode qui à notre connaissance n'avait jamais été considéré pour la synthèse de ce type d'assemblage. En effet, malgré de nombreux essais, il n'a pas été possible d'obtenir de manière reproductible de telles nanoparticules via un chauffage thermique classique. De plus, nous avons montré que la température et la puissance du micro-onde impactaient notablement la synthèse des AuNPs, permettant en particulier un contrôle de leur taille. Par ailleurs,

une des principales difficultés rencontrées dans ce type d'étude est le nettoyage des AuNPs. Nous avons cependant pu déterminer les meilleures conditions afin de nettoyer nos AuNPs sans qu'elles s'agrègent. Le composite AuNPs@POMo synthétisé a été caractérisé par de nombreuses techniques. Il a ainsi été possible de démontrer la présence du POMo à la surface des AuNPs par XPS et par spectroscopie infra-rouge. Les analyses XPS ont également permis de mettre en évidence le changement de degré d'oxydation du molybdène lors de la synthèse, le molybdène(V) étant totalement oxydé en molybdène(VI). Enfin, nous avons évalué l'activité antibactérienne du composite AuNPs@POMo sur les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Nos premiers essais n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence un effet antibactérien sur les souches étudiées. Pour la suite de ce projet, il sera judicieux d'augmenter la concentration en composite et/ou d'évaluer les propriétés antibactériennes sur d'autres souches.

Partie 3 : Synthèse de nano-étoiles d'or en utilisant le POM $\text{Mo}_4(\text{AlE})_2$ comme précurseur

I. Introduction

Comme cela a été décrit dans le chapitre bibliographique, les propriétés des nanoparticules d'or dépendent notablement de leur morphologie. L'équipe de Murphy a mis au point les premières synthèses de nano-bâtonnets d'or par le procédé de « nucléation-croissance ».¹² Ce procédé a de plus permis d'obtenir ces nano-objets avec une grande homogénéité en forme et en taille. Cette méthode en deux étapes consiste tout d'abord à élaborer des nanoparticules d'or sphérique (les germes) de quelques nanomètres. Ensuite, une étape de croissance à partir de ces germes et en présence de stabilisants comme l' AgNO_3 ou le CTAB (bromure de cétrimonium) conduit à l'obtention de la morphologie désirée. L'utilisation de ces additifs permet en effet de bloquer certaines facettes des germes de type sphérique afin d'orienter la croissance et d'obtenir une forme anisotrope, mais de plus, ils stabilisent la forme obtenue via des répulsions électrostatiques.¹³ Plusieurs travaux¹⁴⁻¹⁶ ont montré qu'il était possible d'obtenir des nano-étoiles d'or à partir de cette méthode. Cependant, la présence de surfactants toxiques comme le CTAB à la surface des nano-étoiles limite leur utilisation dans le domaine biomédical.^{17,18} C'est pour cela que Yuan et *al.* ont développé des synthèses de nano-étoiles sans surfactants.¹³ Cependant, les nano-étoiles obtenues ne sont pas stables. Il est donc nécessaire d'y ajouter un agent stabilisant comme le polyéthylène glycol par exemple. D'autres voies de synthèse utilisant des tampons de Good comme l'HEPES,^{19,20} l'EPPS^{21,22} et le MOPS²³ ont permis la synthèse de nano-étoiles d'or (AuNSs) en une seule étape et sans surfactant. Dans ces synthèses le tampon joue le rôle de réducteur du sel d'or et d'agent directeur de forme pour former les nanostars.

Dans les travaux présentés ci-dessous, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une méthode originale de synthèse de nano-étoiles en utilisant le POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ comme réducteur et stabilisant.

II. Synthèse de nano-étoiles d'or par nucléation-croissance

La procédure de synthèse des nano-étoiles d'or (AuNSs) est adaptée du protocole de Yuan et *al.*¹³ Pour notre étude, le composé $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ est utilisé comme réducteur et stabilisant. Il faut noter que, comme dans le cas de la synthèse des nanosphères, lors de la réduction des sels d'or les centres Mo^{V} du POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ sont oxydés en Mo^{VI} et la structure du complexe initial évolue. La Figure 17 schématise la procédure suivie pour obtenir des nano-étoiles d'or à partir du POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$. C'est une synthèse en deux étapes. La première consiste à former des nanoparticules d'or sphériques de 16 nm de diamètre (germes) en utilisant le citrate comme réducteur et stabilisant. Une solution de citrate de sodium est ainsi ajoutée à une solution d'or, la couleur de la solution évoluant de jaune à gris et enfin rouge vin, cette dernière étant caractéristique de nanoparticules d'or sphérique d'environ 15-16 nm. Les nanoparticules obtenues sont alors nettoyées par centrifugation et redispersées. La seconde étape consiste à utiliser ces germes comme points de nucléation pour former les nano-étoiles d'or. Pour cela, des solutions d' AgNO_3 , de $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ et d' HAuCl_4 sont ajoutées à la solution de germes. L'utilisation d' Ag^+ est courante dans les synthèses par nucléation-croissance. Cependant, le rôle d' Ag^+ dans ces synthèses reste encore mal compris. Il a cependant été proposé que lors de cette seconde étape, l'argent ajouté va s'adsorber sur certaines facettes des germes d'or afin de bloquer la croissance et permettre une croissance anisotrope.²⁴

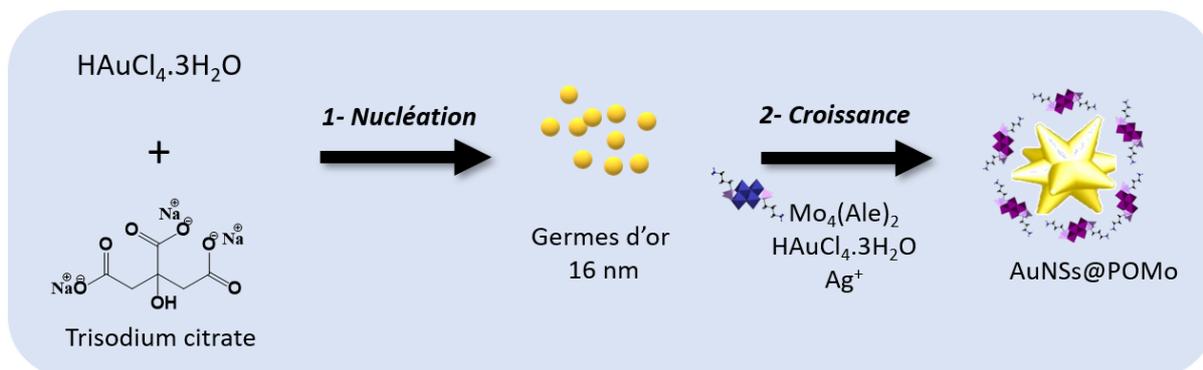


Figure 17: Schématisation de la méthode de "nucléation-croissance"

II.1. Synthèse des germes

La Figure 18 représente le spectre UV-visible des germes obtenus pour la synthèse de nano-étoiles. La présence d'une seule bande LSPR à 523 nm confirme l'obtention de nanoparticules sphériques d'environ 16 nm. Ceci est aussi confirmé par microscopie électronique en transmission (Figure 19). Dans le processus synthétique conduisant à des nano-étoiles, la concentration en germe est un paramètre important. Celle-ci a été évaluée par spectroscopie UV-visible (6,1 nM) et par ICP-OES (8,9 nM). Nous avons considéré la concentration déterminée par ICP, celle-ci étant plus précise.

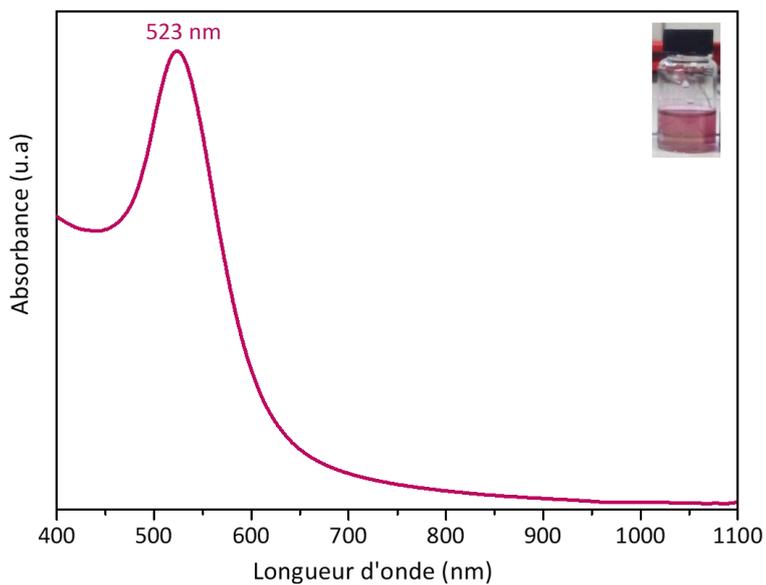


Figure 18: Spectre UV-visible des germes d'or pour la synthèse de nano-étoiles. Insert : photographie de la solution colloïdale obtenue.

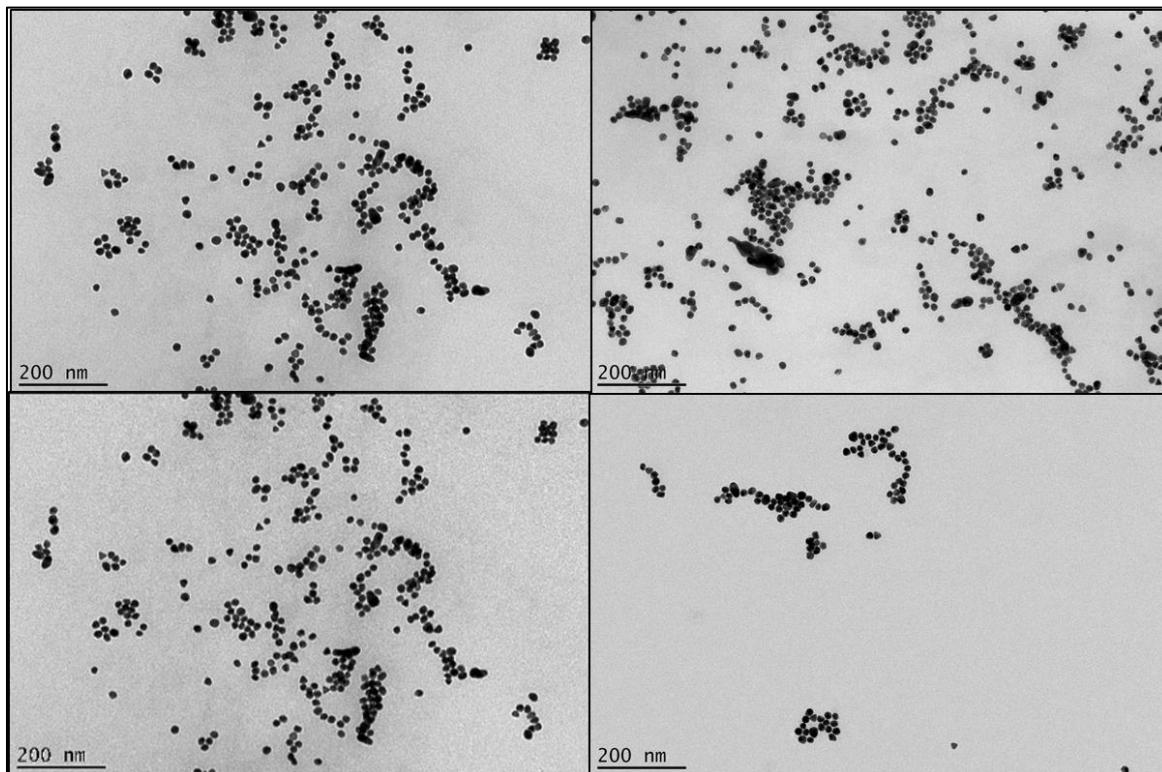


Figure 19: Images TEM des germes d'or obtenus.

Avant d'optimiser la synthèse des nano-étoiles, nous avons réalisé des synthèses témoins afin de justifier l'emploi de chaque réactif (Figure 20). Pour cela, chaque synthèse a été effectuée en l'absence d'un réactif. Aucune de ces synthèses n'a permis l'obtention de nano-étoiles. La synthèse sans AgNO_3 conduit à l'obtention de nanoparticules d'or sphériques avec deux bandes plasmon, la première à 542 nm et la seconde, plus large, entre 750 nm et 900 nm. Les synthèses sans germes, ou sans POM $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ ou sans HAuCl_4 ne permettent pas d'obtenir des nano-objets. Ces résultats montrent que chaque réactif est indispensable à l'obtention du système visé.

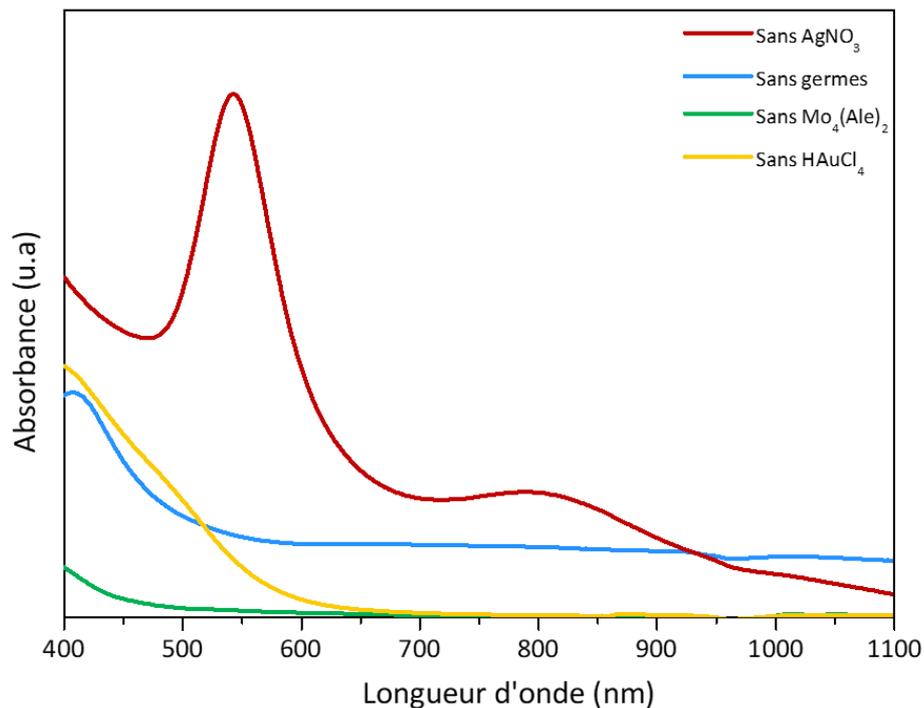


Figure 20: Spectres UV-visible des solutions obtenues en l'absence d'un réactif (AgNO_3 , germes, $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ ou HAuCl_4).

II.2. Synthèse des nano-étoiles d'or (AuNSs) à partir du composé $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$

Comme cela est illustré sur la Figure 17, la synthèse de nano-étoiles se fait en deux étapes. Pour cela, à une solution d' HAuCl_4 (250 μM) sont ajoutés les germes puis l'argent (40 μM) et enfin le POM $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$ (500 μM). Lors de l'ajout du POM $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$ la solution change de couleur, passant d'un jaune très clair à un bleu-vert caractéristique des nano-étoiles. La reproductibilité de la synthèse a été étudiée, et les spectres UV-visible de quatre solutions colloïdales obtenues indépendamment présentent tous une bande LSPR large comprise entre 762 nm et 808 nm caractéristique de la formation de nano-étoiles (Figure 21). Cependant, le maximum en longueur d'onde ainsi que la largeur à mi-hauteur varient d'un échantillon à l'autre. Le mode opératoire doit donc être optimisé.

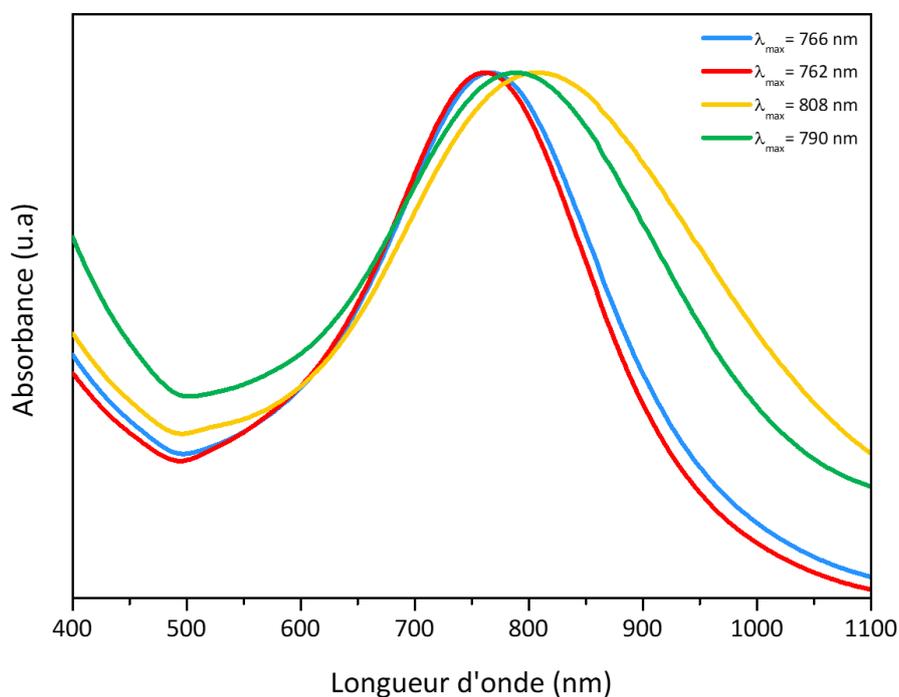


Figure 21: Spectres UV-visible de quatre solutions différentes de nano-étoiles d'or obtenues à partir du POM $\text{Mo}_4(\text{Al})_2$ sans effectuer aucun contrôle des paramètres de synthèse.

Ramsey *et al.* ont montré que la température avait un rôle clé sur de telles synthèses.²⁵ Nous avons donc commencé par étudier ce paramètre. Contrairement à l'étude ci-dessus, les solutions ont donc été thermostatées. Deux températures différentes ont été considérées (5 et 30°C), et les spectres UV-Visible enregistrés chaque fois sur deux échantillons préparés indépendamment (Figure 22). Nous voyons qu'à présent, les synthèses sont reproductibles. On observe également que lorsque la température diminue, un décalage de la bande plasmon vers le rouge est observé ainsi qu'un élargissement de la bande. Cela traduit des différences de morphologie entre les nano-étoiles formées. La synthèse à 30°C étant plus simple à mettre en place, nous avons pour la suite choisit cette température.

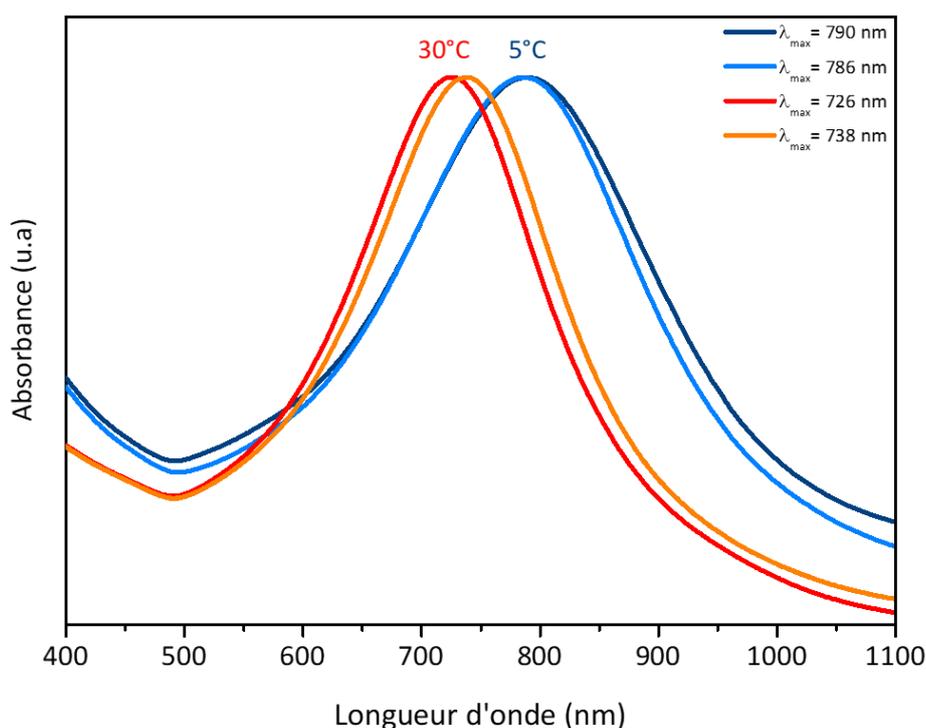


Figure 22: Spectres UV-visible de deux essais de synthèse différents de AuNSs@POMo obtenues à 30 °C (rouge et orange) et 5°C (bleu clair et bleu foncé).

L'influence du temps de réaction sur la formation des AuNSs a également été étudié. Pour cela, un suivi de l'évolution du λ_{max} de la bande LSPR en fonction du temps a été réalisé en

prélevant à des temps précis 500 μl du milieu réactionnel (Figure 23). Un palier est observé à $\lambda_{\text{max}} = 721 \text{ nm}$ après 30 minutes de réaction, la bande plasmon évoluant très peu entre 30 et environ 180 minutes de réaction. Un nouveau shift vers les basses longueurs d'onde est ensuite observé entre 180 et 4500 minutes. Ceci peut être expliqué par une agrégation ou un réarrangement structural des nano-étoiles.

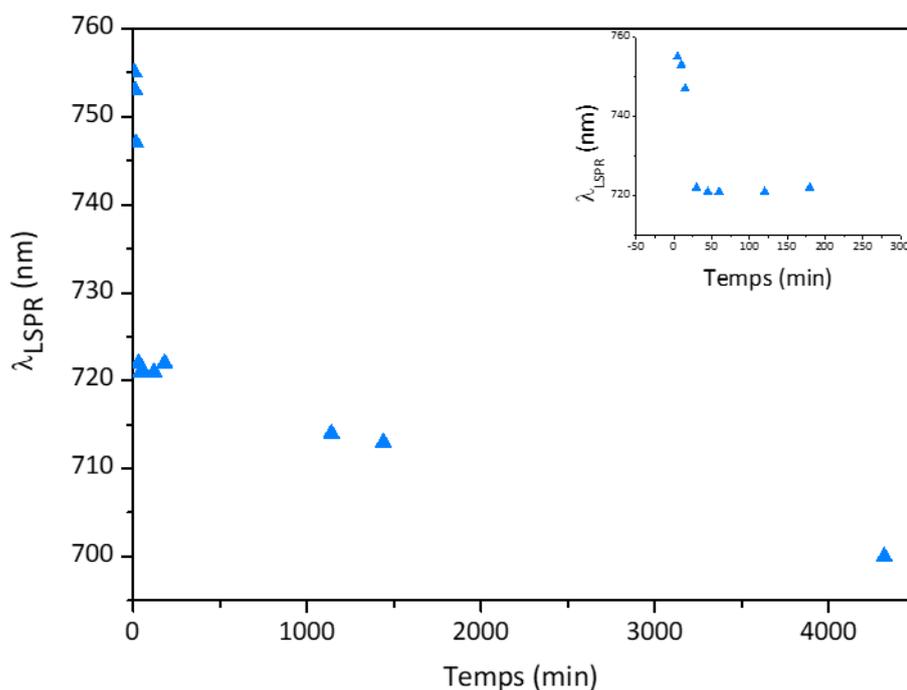


Figure 23: Evolution en fonction du temps de réaction de la longueur d'onde caractérisant la bande LSPR des AuNSs@POMo. En insert, l'évolution de la longueur d'onde sur les 200 premières minutes.

Nous avons donc observé grâce à cette étude cinétique qu'il était également important de contrôler le temps de réaction. Afin d'améliorer la reproductibilité de la synthèse, le temps de réaction a été contrôlé et fixé précisément à 30 minutes. La Figure 24 représente les spectres UV-visible de trois échantillons de nano-étoiles obtenus lorsque la synthèse est chronométrée. Les bandes LSPR caractérisant ces échantillons possèdent des maximums de longueur d'onde proches, allant de 726 nm à 736 nm, et les largeurs à mi-hauteur se superposent parfaitement.

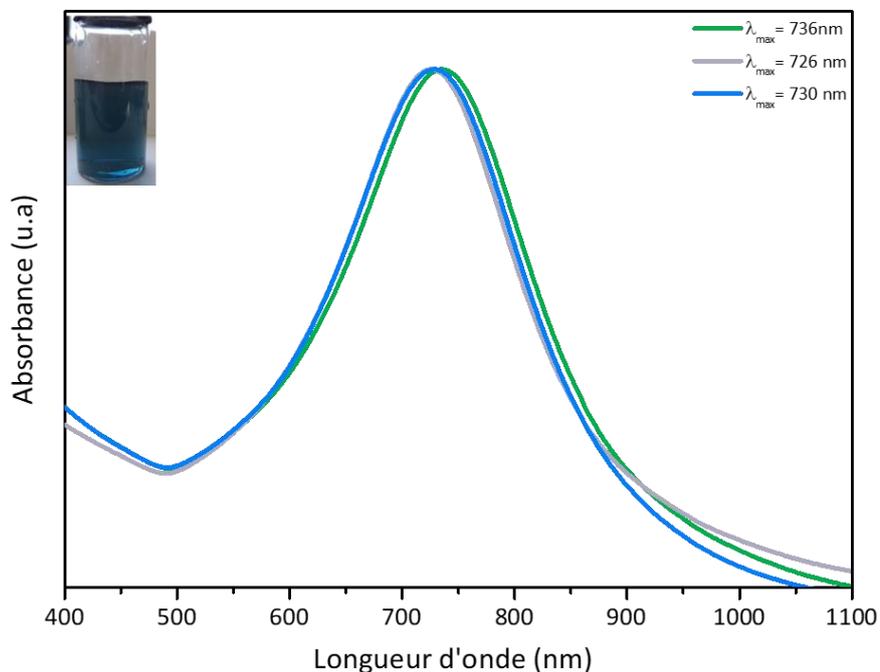


Figure 24: Spectres UV-visible illustrant la reproductibilité des synthèses de AuNSs@POMo en contrôlant la température (30°C) et le temps de réaction (30 min). Insert : photographie de la solution colloïdale bleue obtenue.

Les images de microscopie montrent des nano-étoiles possédant environ cinq branches (Figure 25). Sur ces clichés, il n'est pas aisé de mesurer la taille des branches et la taille du cœur, les particules étant très proches les unes des autres. Cependant, une mesure a été faite à l'aide du logiciel Image J sur une nano-étoile. Les branches ont une taille proche de 68 nm et le cœur de 67 nm.

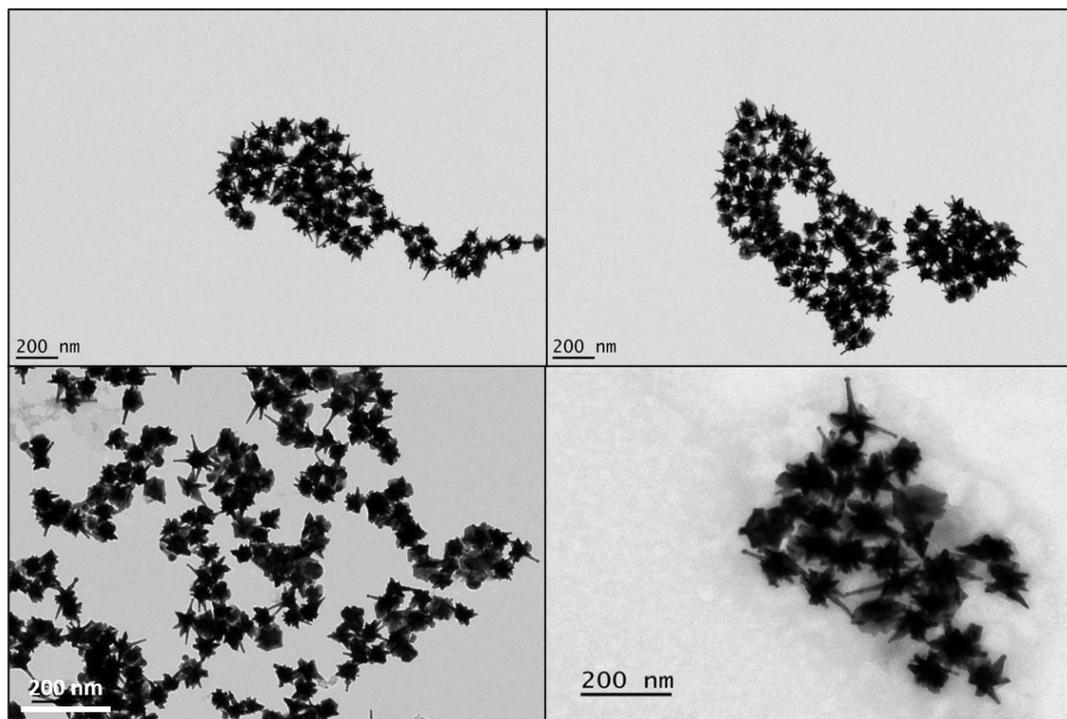


Figure 25: Images TEM des nano-étoiles AuNSs@POMo obtenues après optimisation de la synthèse

La synthèse étant reproductible, et même si un travail est nécessaire afin d'encore améliorer la morphologie des nano-étoiles et de contrôler le nombre de branches, nous nous sommes penchés sur le nettoyage de ces nanoparticules. En effet, avant de tester la potentialité biologique de ces nano-étoiles, cette étape est importante. L'établissement des conditions de nettoyage de nano-étoiles nécessite d'être optimisé. En effet, il a par exemple été montré qu'une centrifugation trop intense pouvait détériorer ces nanosystèmes. De plus, nous avons vu la difficulté qu'il y avait à laver ces systèmes AuNPs/POM/bisphosphonate. Des premiers tests ont été fait avec des micro-tubes en polypropylène. Cependant, comme observé avec les NPs sphériques, lors de la centrifugation les nano-étoiles se déposent à la surface du tube et ne se redispersent plus. Nous avons donc choisi à nouveau d'utiliser des tubes en verre pour éviter ce phénomène.

Le spectre UV-visible des nano-étoiles non lavées est représenté sur la Figure 26. On observe la présence d'une bande LSPR présentant un maximum à 704 nm. Deux échantillons ont

ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 2400 rpm et 6000 rpm, respectivement, puis redispersés dans l'eau ultrapure. Lorsque la solution est centrifugée à 6000 rpm, l'intensité de la bande plasmon diminue très fortement par rapport à celle caractérisant les NPs non lavées (Figure 26). Ceci est dû à une perte de nanoparticules, ces dernières étant difficilement redispersables. Une centrifugation à 2400 rpm semble être un bon compromis entre le nettoyage des solutions colloïdales et la perte des nano-étoiles. Cependant, ces résultats ne sont pas encore reproductibles, et nécessitent d'être améliorés.

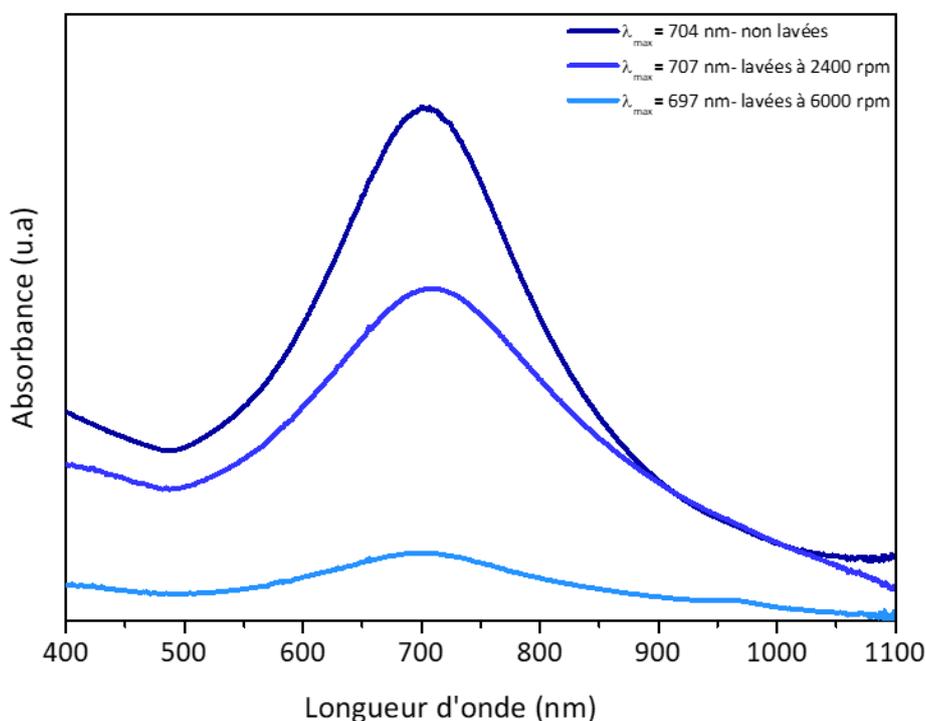


Figure 26: Spectres UV-visible des AuNSs@POMo non lavées (courbe bleu foncé) et lavées à différentes vitesses de centrifugation (courbes bleu clair).

II.3. Modulation de la bande plasmon des nano-étoiles

Un des objectifs de ce projet était d'obtenir un panel de nano-étoiles dont les bandes LSPR seraient localisées dans le domaine du proche infrarouge. Cela permettrait en effet d'envisager différentes applications (biocapteur, thérapie photothermique). La modulation de la bande plasmon peut être obtenue en faisant varier les concentrations en germes d'or ainsi

qu'en or et en argent ajoutés lors de la seconde étape. Une première série de manipulations a été effectuée en faisant varier la concentration en germes. La solution mère de germes, dont la concentration a été déterminée par ICP-OES à 9 nM, a été diluée pour atteindre différentes concentrations. Les spectres UV-Visible des nano-étoiles obtenues à partir de ces solutions de différentes concentrations en germes ont été enregistrés (Figure 27). La courbe violette est relative aux nano-étoiles obtenues à partir de la solution mère de germes et présente une bande plasmon centrée à 613 nm. Après lavage de ces nanoparticules, la bande LSPR se décale vers l'infrarouge à 661 nm. Par ailleurs, on observe que plus la concentration en germes diminue, plus la bande plasmon se décale vers l'infrarouge. De façon remarquable, il est ainsi possible d'obtenir des nano-étoiles dont la bande LSPR varie de 613 nm à 1018 nm.

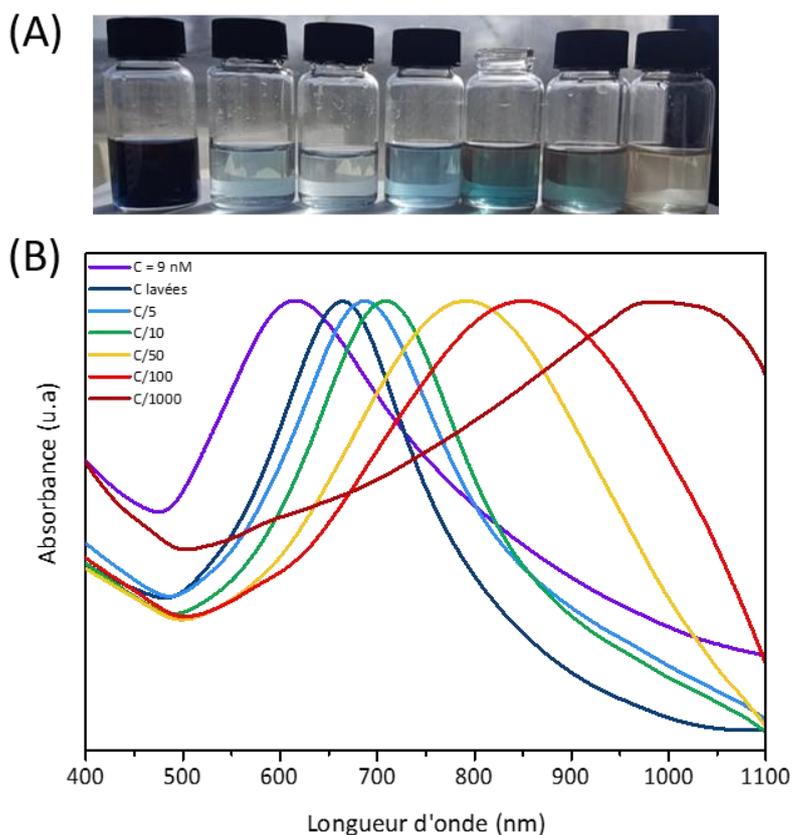


Figure 27: Photographies (A) et spectres UV-Visible (B) des solutions colloïdales d'AuNSs@POMo obtenues à partir de différentes concentrations en germes.

Ce décalage de la bande plasmon traduit aussi une différence dans la morphologie des nano-étoiles. En effet, les images de microscopie de la Figure 28 montrent que plus la concentration

en germe diminue, plus la taille des branches diminue. Cependant, ces résultats doivent être reproduits et un traitement plus approfondi des images de microscopie est nécessaire afin de confirmer cette observation. Enfin, un rapport Mo/P de 1 a été obtenu par ICP-OES (Mo/P calculé = 1) pour les AuNSs obtenues à partir d'une solution en germe de 9 nM. Cela montre que les éléments constituant le POM $\text{Mo}_4(\text{Al}_e)_2$ sont bien présents à la surface de ces nanoparticules.

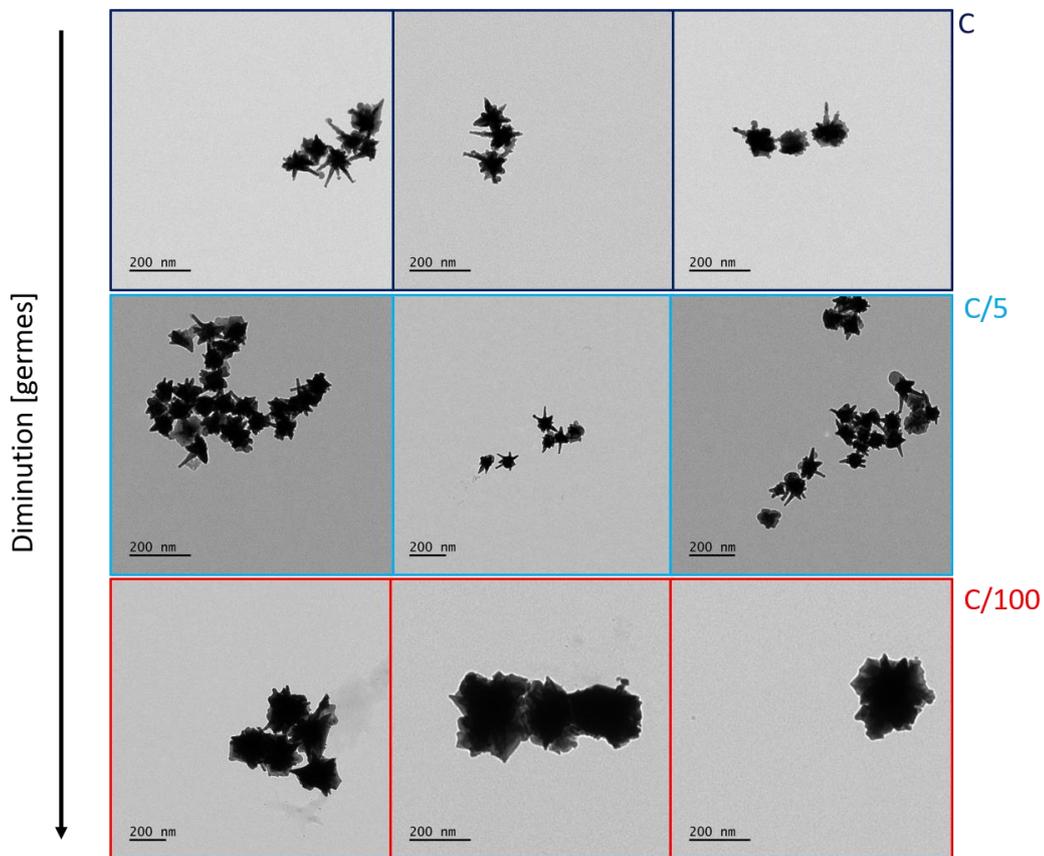


Figure 28: Images TEM des AuNSs@POMo obtenues à partir de solutions en germe d'or de différentes concentrations.

III. Conclusion

Pour conclure, ces travaux ont montré pour la première fois qu'il était possible d'obtenir des nano-étoiles à partir de POMs réduits. Un travail conséquent a été fait pour obtenir des synthèses reproductibles. Il a ainsi été montré qu'il était indispensable de contrôler l'ensemble des paramètres réactionnels (température, concentration en germes et en réactifs et temps). De plus, il a été montré qu'en faisant varier la concentration en germes, il est possible d'obtenir tout un panel de nano-étoiles caractérisées par des bandes LSPR dont le maximum en longueur d'onde est modulé de 613 nm à 1018 nm. Cela permettra donc d'envisager différentes applications pour ces nouveaux systèmes. Par exemple, il est prévu d'étudier l'action combiné d'un POM réduit antibactérien et des propriétés photothermiques liées à la forme étoilée de ces systèmes.

Cependant, ces travaux nécessitent encore d'être approfondis. Tout d'abord, des caractérisations plus poussées des nano-étoiles sont nécessaires (infrarouge, XPS...) afin de mettre en évidence la présence du POM à la surface des AuNSs. Ensuite, l'étude de l'impact de la concentration en POM et en argent sur la morphologie des AuNSs formées devra compléter l'étude faite sur l'influence de la concentration en germes. Enfin, d'autres POMs réduits possédant des propriétés anticancéreuses et antibactériennes pourront être testés.

Conclusion générale

En conclusion, l'utilisation d'un polyoxomolybdate hybride associant des ions Mo^V et des ligands alendronate a permis l'obtention de deux types de nano-systèmes. Lors de ces deux études, le POM Mo₄(Al_e)₂ sert à la fois de réducteur et de stabilisant. Tout d'abord, des nano-hybrides sphériques NPs@POM ont été obtenus pour la première fois en conditions micro-onde. Un travail exploratoire a été fait afin d'établir un protocole expérimental menant de façon reproductible à des nanosystèmes de taille et de forme contrôlées. Ceux-ci ont été caractérisés par diverses techniques. La spectroscopie UV-visible a confirmé la formation des AuNPs, avec une bande LSPR centrée à 538 nm. La microscopie électronique à transmission a montré que les AuNPs étaient bien de forme sphérique et possédaient une taille de $28,4 \pm 7$ nm. Le potentiel ζ caractérisant la charge de surface des AuNPs est de $-36,2 \pm 1,4$ mV. Sa valeur négative est en accord avec la présence de POM à sa surface. D'autres techniques permettent de confirmer sa présence. La spectroscopie infrarouge permet de mettre en évidence la présence de bandes de vibrations caractéristiques du POM. L'analyse par XPS a également confirmé la présence du POM à la surface des AuNPs, mais aussi l'oxydation des centres molybdène lors de la formation des AuNPs. De plus, en faisant varier la puissance du micro-onde et la température de la synthèse, il est possible de moduler la bande LSPR des nanoparticules obtenues. Cependant à ce jour, aucune activité antibactérienne de ces assemblages n'a pu être démontrée. L'activité antibactérienne dépendant de plusieurs facteurs, notamment le type de souche ou la concentration en principe actif, il serait intéressant pour la suite de ce projet de tester ces AuNPs@POMo pour différentes concentrations mais surtout sur différentes souches. De plus, la synthèse micro-onde peut être envisagée avec d'autres POMs réduits. Le second nano-système a été obtenu par une synthèse en deux étapes dites de « nucléation-croissance ». Cette méthode permet d'élaborer des nanoparticules anisotropes. Des nano-étoiles d'or ont été obtenues pour la première fois à partir d'un POM réduit. La reproductibilité de cette synthèse nécessite que le milieu réactionnel soit thermostaté, que le temps de synthèse soit chronométré et que la concentration des réactifs soit contrôlée. Une fois ces conditions déterminées, nous avons regardé l'effet de la concentration en germes sur la morphologie des nano-étoiles. Lorsque la

concentration en germes diminue, la bande plasmon se déplace vers le proche infra-rouge et la taille des branches des nano-étoiles diminue. Ainsi, des nano-étoiles dont le maximum d'absorption de la bande LSPR varie de 613 nm à 1018 nm ont pu être obtenues. L'avantage d'avoir ce panel de nano-étoiles est de pouvoir les envisager pour différentes applications. Cependant, il reste encore tout un travail de caractérisation de ces nano-étoiles. Par ailleurs, il sera intéressant d'utiliser d'autres POMs réduits comme le polyoxovanadate $\text{V}_3(\text{Al})_3$ par exemple pour former les AuNSs.

Références bibliographiques

- (1) Compain, J. D.; Mialane, P.; Marrot, J.; Sécheresse, F.; Zhu, W.; Oldfield, E.; Dolbecq, A. Tetra- to Dodecanuclear Oxomolybdate Complexes with Functionalized Bisphosphonate Ligands: Activity in Killing Tumor Cells. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (46), 13741–13748. <https://doi.org/10.1002/chem.201001626>.
- (2) Tsuji, M.; Hashimoto, M.; Nishizawa, Y.; Kubokawa, M.; Tsuji, T. Microwave-Assisted Synthesis of Metallic Nanostructures in Solution. *Chem. - A Eur. J.* **2005**, *11* (2), 440–452. <https://doi.org/10.1002/chem.200400417>.
- (3) Bilecka, I.; Niederberger, M. Microwave Chemistry for Inorganic Nanomaterials Synthesis. *Nanoscale* **2010**, *2* (8), 1358–1374. <https://doi.org/10.1039/b9nr00377k>.
- (4) Arshi, N.; Ahmed, F.; Kumar, S.; Anwar, M. S.; Lu, J.; Koo, B. H.; Lee, C. G. Microwave Assisted Synthesis of Gold Nanoparticles and Their Antibacterial Activity against Escherichia Coli (E. Coli). *Curr. Appl. Phys.* **2011**, *11* (1 SUPPL.), S360–S363. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.11.102>.
- (5) Liu, F. K.; Ker, C. J.; Chang, Y. C.; Ko, F. H.; Chu, T. C.; Dai, B. T. Microwave Heating for the Preparation of Nanometer Gold Particles. *Japanese J. Appl. Physics, Part 1 Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.* **2003**, *42* (6 B), 4152–4158. <https://doi.org/10.1143/jjap.42.4152>.
- (6) Seol, S. K.; Kim, D.; Jung, S.; Hwu, Y. Microwave Synthesis of Gold Nanoparticles: Effect of Applied Microwave Power and Solution PH. *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *131* (1–2), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.09.050>.
- (7) Bayazit, M. K.; Yue, J.; Cao, E.; Gavriilidis, A.; Tang, J. Controllable Synthesis of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution by Microwave Assisted Flow Chemistry. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (12), 6435–6442. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01149>.
- (8) Martín, S.; Takashima, Y.; Lin, C. G.; Song, Y. F.; Miras, H. N.; Cronin, L. Integrated

- Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Polyoxometalate Clusters. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (7), 4110–4116. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03013>.
- (9) Dolbecq, A.; Compain, J. D.; Mialane, P.; Marrot, J.; Sécheresse, F.; Keita, B.; Holzle, L. R. B.; Miserque, F.; Nadjo, L. Hexa- And Dodecanuclear Polyoxomolybdate Cyclic Compounds: Application toward the Facile Synthesis of Nanoparticles and Film Electrodeposition. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (3), 733–741. <https://doi.org/10.1002/chem.200800719>.
- (10) Douvas, A. M.; Vasilopoulou, M.; Georgiadou, D. G.; Sultati, A.; Davazoglou, D.; Vourdas, N.; Giannakopoulos, K. P.; Kontos, A. G.; Kennou, S.; Argitis, P. Sol-Gel Synthesized, Low-Temperature Processed, Reduced Molybdenum Peroxides for Organic Optoelectronics Applications. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (31), 6290–6300. <https://doi.org/10.1039/c4tc00301b>.
- (11) Grünert, W.; Stakheev, A. Y.; Feldhaus, R.; Anders, K.; Shpiro, E. S.; Minachev, K. M. Analysis of Mo(3d) XPS Spectra of Supported Mo Catalysts: An Alternative Approach. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95* (3), 1323–1328. <https://doi.org/10.1021/j100156a054>.
- (12) Jana, N. .; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *18* (18), 1389–1393.
- (13) Yuan, H.; Khoury, C. G.; Hwang, H.; Wilson, C. M.; Grant, G. A.; Vo-Dinh, T. Gold Nanostars: Surfactant-Free Synthesis, 3D Modelling, and Two-Photon Photoluminescence Imaging. *Nanotechnology* **2012**, *23* (7).
- (14) Guerrero-Martínez, A.; Barbosa, S.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Nanostars Shine Bright for You. Colloidal Synthesis, Properties and Applications of Branched Metallic Nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (2), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.12.007>.
- (15) Senthil Kumar, P.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Javier García De Abajo,

- F.; Liz-Marzán, L. M. High-Yield Synthesis and Optical Response of Gold Nanostars. *Nanotechnology* **2008**, *19* (1). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/01/015606>.
- (16) Chirico, G.; Borzenkov, M.; Pallavicini, P. *Gold Nanostars: Synthesis, Properties and Biomedical Application*; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20768-1>.
- (17) Jia, Y. P.; Shi, K.; Liao, J. F.; Peng, J. R.; Hao, Y.; Qu, Y.; Chen, L. J.; Liu, L.; Yuan, X.; Qian, Z. Y.; Wei, X. W. Effects of Cetyltrimethylammonium Bromide on the Toxicity of Gold Nanorods Both In Vitro and In Vivo: Molecular Origin of Cytotoxicity and Inflammation. *Small Methods* **2020**, *4* (3), 1–11. <https://doi.org/10.1002/smtd.201900799>.
- (18) Tarantola, M.; Pietuch, A.; Schneider, D.; Rother, J.; Sunnick, E.; Rosman, C.; Pierrat, S.; Sönnichsen, C.; Wegener, J.; Janshoff, A. Toxicity of Gold-Nanoparticles: Synergistic Effects of Shape and Surface Functionalization on Micromotility of Epithelial Cells. *Nanotoxicology* **2011**, *5* (2), 254–268. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.528847>.
- (19) Webb, J. A.; Erwin, W. R.; Zarick, H. F.; Aufrecht, J.; Manning, H. W.; Lang, M. J.; Pint, C. L.; Bardhan, R. Geometry-Dependent Plasmonic Tunability and Photothermal Characteristics of Multibranching Gold Nanoantennas. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (7), 3696–3707. <https://doi.org/10.1021/jp408793a>.
- (20) De Puig, H.; Tam, J. O.; Yen, C. W.; Gehrke, L.; Hamad-Schifferli, K. Extinction Coefficient of Gold Nanostars. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (30), 17408–17415. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03624>.
- (21) Cai, J.; Raghavan, V.; Bai, Y. J.; Zhou, M. H.; Liu, X. L.; Liao, C. Y.; Ma, P.; Shi, L.; Dockery, P.; Keogh, I.; Fan, H. M.; Olivo, M. Controllable Synthesis of Tetrapod Gold Nanocrystals with Precisely Tunable Near-Infrared Plasmon Resonance towards Highly Efficient Surface Enhanced Raman Spectroscopy Bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (37), 7377–7385. <https://doi.org/10.1039/c5tb00785b>.
- (22) Lu, G.; Forbes, T. Z.; Haes, A. J. SERS Detection of Uranyl Using Functionalized Gold Nanostars Promoted by Nanoparticle Shape and Size. *Analyst* **2016**, *141* (17), 5137–

5143. <https://doi.org/10.1039/c6an00891g>.

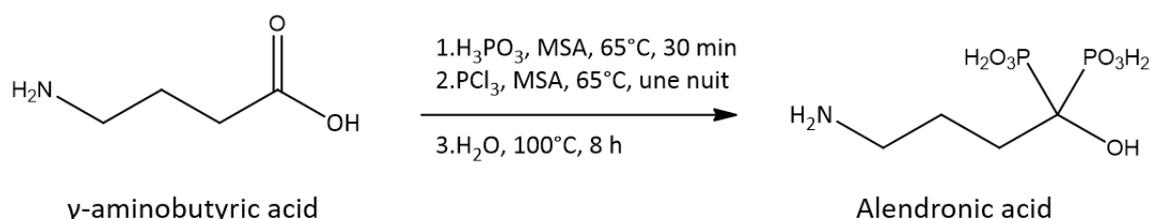
- (23) Chandra, K.; Culver, K. S. B.; Werner, S. E.; Lee, R. C.; Odom, T. W. Manipulating the Anisotropic Structure of Gold Nanostars Using Good's Buffers. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (18), 6763–6769. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b03242>.
- (24) Atta, S.; Beetz, M.; Fabris, L. Understanding the Role of AgNO₃ Concentration and Seed Morphology in the Achievement of Tunable Shape Control in Gold Nanostars. *Nanoscale* **2019**, *11* (6), 2946–2958. <https://doi.org/10.1039/c8nr07615d>.
- (25) Ramsey, J. D.; Zhou, L.; Kyle Almlie, C.; Lange, J. D.; Burrows, S. M. Achieving Plasmon Reproducibility from Surfactant Free Gold Nanostar Synthesis. *New J. Chem.* **2015**, *39* (12), 9098–9108. <https://doi.org/10.1039/c5nj01590a>.

Partie Matériels et Méthodes

I. Synthesis of bisphosphonates (BPs)

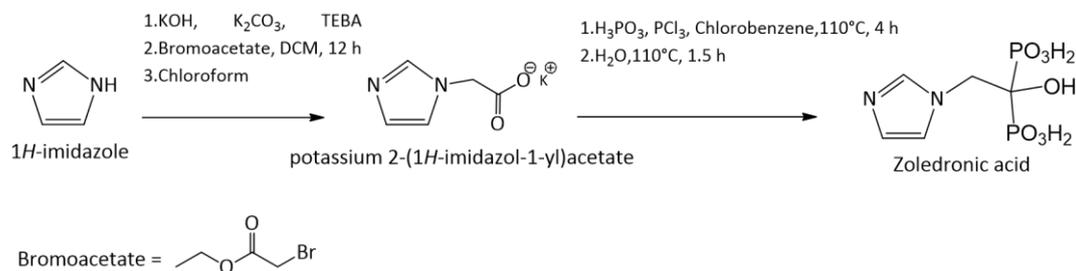
I.1. Synthesis of alendronic acid $\text{H}_2\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2)(\text{OH})\text{PO}_3\text{H}_2$ (Ale)

Alendronic acid $\text{H}_2\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2)(\text{OH})\text{PO}_3\text{H}_2$ (Ale) was synthesized as previously described.¹



γ -Aminobutyric acid (8.80 g, 85.4 mmol) and H_3PO_3 (7.0 g, 85.4 mmol) were dissolved in methanesulfonic acid (MSA, 33 ml) and heated at 65 °C during 30 min. PCl_3 (15.70 ml, 180 mmol) was added dropwise with vigorous stirring and the mixture was heated at 65 °C overnight. The resulting solution was poured into water (150 ml) and the mixture was refluxed for 8 h. After cooling at RT, EtOH (350 ml) was added. After 12 h, the crystals were collected by filtration, washed with water and EtOH. Yield: 61% (13 g, 52.2 mmol, 249 g.mol⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ = 1.9–2.1 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-C-), 2.9 (t, 2H, -CH₂-NH₂) ppm. ³¹P{¹H} NMR (300 MHz, D₂O): δ = 19.21 (s) ppm.

I.2. Synthesis of zoledronic acid $\text{H}_2\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2)(\text{OH})\text{PO}_3\text{H}_2$ (Zol)

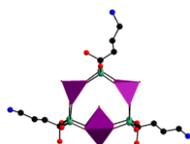


The synthesis was adapted from reported procedures in two steps.^{2,3} To a 500 mL dichloromethane (DCM) solution of imidazole (13.6 g, 200 mmol), potassium hydroxide (13.6 g, 240 mmol), anhydrous K_2CO_3 (27.2 g, 200 mmol) and TEBA (benzyltriethylammonium

chloride, 0.3 g, 1 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. After cooling to 10°C, 16.8 mL (150 mmol) of ethyl bromoacetate were added dropwise with further stirring. After standing at room temperature overnight the mixture was filtered and the solvent of the filtrate was removed under vacuum to obtain a yellow liquid. To this liquid was added 200 mL of water and the admixture was stirred for 12 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and a large volume of chloroform was added to the residue, resulting in the precipitation of 1H-Imidazole-1-acetic acid as a white powder which was isolated by filtration in 12% yield (3.90 g, 24 mmol, M. W.: 164.20 g.mol⁻¹). The latter was dissolved together with H₃PO₃ (4.06 g, 50 mmol) in 13 mL of chlorobenzene by heating at 110°C. The mixture was cooled down to room temperature and PCl₃ (2.88 ml, 33 mmol) was added dropwise before heating again at 110°C for 4 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature and 27 mL of water were slowly added before heating at 110°C for 1.5 h. The mixture was cooled down to room temperature and filtered. The solvent filtrate was removed under vacuum and 85 mL of methanol were added to the residue resulting in precipitation. This suspension was heated at reflux for 16 h and then filtrated while still hot. The resulting white powder was washed with ethanol and diethyl ether. Yield: 34% (1.84 g, 6.7 mmol, M. W.: 272.09 g.mol⁻¹). ³¹P{¹H} NMR (300 MHz, D₂O, 25°C): δ (ppm) = 14.81. ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.64 (s, 1H, -NCHN-), 7.41 (s, 1H, -NCHCHN-), 7.26 (s, 1H, -NCHCHN-), 4.55 (t, 2H, -NCH₂C-). IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 1638 (m), 1580 (w), 1528 (w), 1441 (w), 1290 (w), 1241 (w), 1139 (vs), 1110 (vs), 1089 (vs), 1058 (sh), 981 (w), 926 (s), 889 (s), 737 (m), 698 (sh), 633 (m), 619 (m), 572 (m).

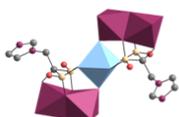
II. Synthesis of POM/BP complexes

II.1. Synthesis of $V_3(\text{Ale})_3$



To a solution of $\text{NaVO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.067 g, 0.55 mmol) in 5 mL of water was added alendronic acid (0.124 g, 0.50 mmol). The solution was stirred for 1 h at room temperature, and triethylamine was added dropwise to $\text{pH} = 6$. Then, the pH was adjusted to 4.7 with 1M HCl. The solution was stirred for 2 h at reflux and then left to evaporate at room temperature. Green crystals were collected after 2 days and washed with 2M NaCl. Yield 0.105 g (52% based on V). Anal. Calc. (found) for $\text{C}_{12}\text{H}_{49}\text{Na}_3\text{N}_3\text{O}_{35}\text{P}_6\text{V}_3$ (1202.41 g mol^{-1}): C 11.97 (12.25), H 4.10 (3.70), N 3.49 (3.53). IR (FTIR): ν (cm^{-1}): 1629 (s), 1508 (w), 1086 (s), 1051(m), 1039(m), 999 (s), 966 (s), 929 (m).

II.2. Synthesis of $\text{Mo}_4(\text{Zol})_2\text{Mn}$

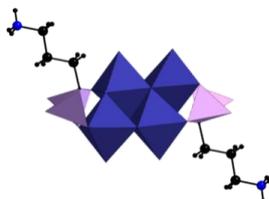


To a solution of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.242g, 1 mmol) in 10 mL of 1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ buffer was added $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.070 g, 0.26 mmol) and zoledronic acid (0.137 g, 0.5 mmol). The solution was stirred for 5 min then NH_3 (33% in water) was added dropwise to $\text{pH} = 7.5$. The solution was left to evaporate and was filtered after 24 h in order to remove a pink precipitate. EDX measurements and IR spectroscopy indicated that the precipitate was a BP complex that did not contain molybdenum. A homogeneous gray crystalline phase of the title compound appeared after 3 days. Yield: 0.080 g (21% based on Mo). Anal. Calc. (found) for $\text{C}_{10}\text{H}_{52}\text{MnMo}_4\text{N}_9\text{O}_{36}\text{P}_4$ (1437.2 g mol^{-1}): C 8.36 (8.88), H 3.65 (3.90), N 8.77 (8.78). IR (FTR): ν (cm^{-1}) = 1575(m), 1546 (w), 1421(s), 1288 (w), 1136(s), 1112(sh), 1045(s), 1018(sh), 973(m), 915(s), 888(s), 790(s), 699(m), 656(m), 619(w), 560(w), 529(m).

II.3. Synthesis of Mo₄(Ale)₂

Preparation of a solution of [Mo₂O₄(H₂O)₆]²⁺: Hydrazine hydrate N₂H₄·H₂O (220 mg, 4.40 mmol) was added to a suspension of MoO₃ (1.15 g, 8.0 mmol) in aqueous HCl (4 M, 40 mL). The mixture was then stirred at 60 °C for 3 h and the resulting deep red solution (0.1 M) was allowed to cool to RT before further use.

Synthesis of [(C₂H₅)₂NH₂]₄[Mo^V₄O₈(O₃PC(C₃H₆NH₃)OPO₃)₂]₂·6H₂O (Mo₄(Ale)₂):



Alendronic acid (0.250 g, 1 mmol) was dissolved in an aqueous solution of [Mo₂O₄(H₂O)₆]²⁺ (0.1 M, 10 mL, 1 mmol) prepared as described above. Diethylamine was added dropwise to pH 7. The resulting deep red solution was filtered and left to evaporate at RT.

Small red crystals were collected by filtration the following day (0.211 g, 48 % based on Mo). ¹H NMR (D₂O): δ = 1.14 (t, 24 H), 1.97 (m, 8H), 2.34 (m, 4 H), 2.96 ppm (q, 16 H); IR: =1558 (w), 1453 (m), 1391 (w), 1165 (s), 1139 (vs), 1113 (s), 1058 (sh), 1046 (s), 1029 (s), 965 (vs), 936 (s), 891 (m), 845 (w), 811 (m), 737 cm⁻¹ (s)

III. Synthesis of Gold nanoparticles (AuNPs)

III.1. Synthesis of citrate-protected gold nanoparticles (AuNPs@Cit)

15 nm AuNPs@Cit

The 15 nm colloidal gold nanoparticles were prepared following the method introduced by Turkevich.⁴ 95 mL of a chlorauric acid HAuCl₄ (263 μM) solution were refluxed for 30 min and 5 mL of a sodium citrate (34 mM) solution added. The reduction of the gold ions by the citrate was completed after 5 min. The solution was further refluxed for 30 min and then left to cool

to room temperature. Then, the colloidal solution was centrifuged at 14500 rpm for 15 min, and the colorless supernatant removed. The nanoparticles were dispersed in Milli-Q water, affording spherical nanoparticles with an average diameter of ca. 15 nm.

47 nm AuNPs@Cit

The 47 nm citrate-protected gold nanoparticles were synthesized mixing a solution A (20 mL of a chlorauric acid HAuCl_4 (360 μM)) and solution B (5 mL of sodium citrate (2 μM)). Solution A and B were heated to 60°C under stirring then mixed. As the solution turned red, the mixture was heated up to 95°C for a few minutes and finally cooled on ice. Then, the colloidal solution was washed like the 15 m citrate-protect gold nanoparticles.

III.2. Synthesis of POMs-Gold nanoparticles assemblies (AuNPs@POMs)

A) Ligand exchange procedure

Functionalization of AuNPs@Cit with $\text{V}_3(\text{Ale})_3$

1.5 mL of an aqueous solution of $\text{V}_3(\text{Ale})_3$ (2.5 mM) were added with stirring to a vial containing 1.5 mL of an aqueous suspension of 15 nm citrate-protected gold nanoparticles (CitNPs). The solution was stirred for 20 h. Afterwards, the nanoparticles were centrifuged at 14500 rpm for 15 min and the colorless supernatant was removed. The colloidal solution was dispersed in 5 mL of Milli-Q water.

Functionalization of AuNPs@Cit with $\text{Mo}_4(\text{Zol})_2\text{Mn}$

10 mL of an aqueous solution of $\text{Mo}_4(\text{Zol})_2\text{Mn}$ (1 mM) were added with stirring to a vial containing 10 mL of an aqueous suspension of 16 nm citrate-protected gold nanoparticles (CitNPs). The solution was stirred overnight at room temperature. Afterwards, the nanoparticles were centrifuged at 10000 rpm for 10 min and the colorless supernatant was removed. The colloidal solution was dispersed in 20 mL of Milli-Q water.

B) Method using POM as reducing and stabilizing agent

Synthesis of AuNPs@POV ($V_3(Al)_3$)

2.5 mL of an aqueous solution of V_3Al_3 (1.7 mM) were added at once to 2.5 mL of an aqueous solution of $HAuCl_4$ (0.5 mM) at pH = 6 adjusted with 0.5 M K_2CO_3 aqueous solution. The reaction was heated to 50°C for 1 hour. Then, the nanoparticles were centrifuged at 4000 rpm for 25 min. The colorless supernatant was removed and the nanoparticles were dispersed in 5 mL of Milli-Q water.

Microwave assisted synthesis of gold nanoparticles with the $Mo_4(Al)_2$ POM (AuNPs@POMo)

10 mL of 1 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ adjusted at pH = 6 with 0.5 M K_2CO_3 and 10 mL of 1 mM $Mo_4(Al)_2$ were mixed in a beaker. This solution was stirred until complete dissolution and then heated to 50°C in a microwave oven at 1600 W power for 20 min (5 min for heating and 15 min for cooling). After the reaction, the color of the solution changed immediately from light yellow to red, indicating the formation of gold nanoparticles. Afterwards, the colloidal solution was centrifuged at 6000 rpm in glass tubes for 10 min and the colorless supernatant was removed. The nanoparticles were dispersed in 20 mL of Milli-Q water.

Synthesis of gold nanostars with $Mo_4(Al)_2$ (AuNSs@POMo)

The first step consists in the synthesis of gold seeds. Their synthesis was adapted from reported procedures.⁵

Nanostars were prepared by a seed-mediated growth method. The seed solution was prepared by adding 15 mL of a 1% citrate solution pre-heated at 60°C to 100 mL of boiling 1 mM $HAuCl_4$ solution under vigorous stirring. The solution was kept at 100°C for 30 min. After the completion of the reaction, the color of the solution changed from yellow to red wine, indicating the formation of gold seeds. The colloidal solution was centrifuged at 14500 rpm for 10 min. The colorless supernatant was removed and the nanoparticles were redispersed in 10 mL of water under sonication (10%, 10 s). The solution was kept at 4°C before use.

The second step consists in the synthesis of the nanostars.

100 μL of the above citrate-stabilized seed solution was added to 10 mL of a 0.25 mM HAuCl_4 solution (to which were added 10 μL of 1 M HCl) in a 250 mL two-necked bottom flask at 30°C under moderate stirring (600 rpm). After 30 s, 100 μL of 4 mM AgNO_3 were added. Then, 20 s later 50 μL of 100 mM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ were added. The solution was stirred for 30 min at 30°C and the colour of the solution turned from light red to blue. Afterwards, the colloidal solution was centrifuged at 3000 rpm in glass tubes for 20 min and the colorless supernatant was removed. The nanoparticles were dispersed in 5 ml of Milli-Q water.

IV. Synthesis of AgNPs@POV ($\text{V}_3(\text{Ale})_3$)

The synthesis of AgNPs@ $\text{V}_3(\text{Ale})_3$ was carried out using the chemical reduction procedure. $\text{V}_3(\text{Ale})_3$ was used as reducing and stabilizing agent of silver nanoparticles. In a typical synthesis, 10 mL of 1 mM AgNO_3 aqueous solution was mixed with 10 mL of 1.7 mM $\text{V}_3(\text{Ale})_3$ aqueous solution at room temperature and under stirring. Immediately, the pH was adjusted to 11 with 0.1 M NaOH. The solution was stirred for 1 h at room temperature. The color of the solution changed from colorless to yellow, indicating the formation of silver nanoparticles.

V. Biological procedures

V.1. Antibiofilm assay

Bacteria cells culture

The gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™) and the gram-positive bacteria *Staphylococcus Epidermidis* (CIP 105 777) were grown on Lysogeny Broth (LB) plates and Mueller-Hinton (MH) plates, respectively, at 37°C for 24 h. A single colony was inoculated in LB or MH medium and grown in shaker incubator at 150 rpm at 37°C. After incubation overnight, bacteria cells were suspended in media. The optical density (OD) at 620 nm was measured by a microtiter plate reader (OD : 0.5-1= 10⁹ colony forming units per mL (CFU/mL)). CFU is used in microbiology to estimate the number of viable bacteria in a sample. Then, 10 µL of this culture was transferred into a fresh tube of 10 mL medium to obtain 10⁶ CFU/mL and incubated with shaking in a microtiter plate reader during 18 h.

Before the biofilm assays, we checked the bacterial growth. There are three phases in the growth curves (Figures 1 and 2):

- 1- Lag phase: During this phase, the microorganisms adjust to their new environment.
- 2- Exponential or log phase: The microorganisms are in rapidly growing and dividing state.
- 3- Stationary phase: All nutrients are used up for the multiplication. This results on the accumulation of waste materials and the environment is unfavourable for the bacterial growth. The reproduction rate will slow down, the cells undergoing division is equal to the number of cell death, and finally bacterium stops its division.

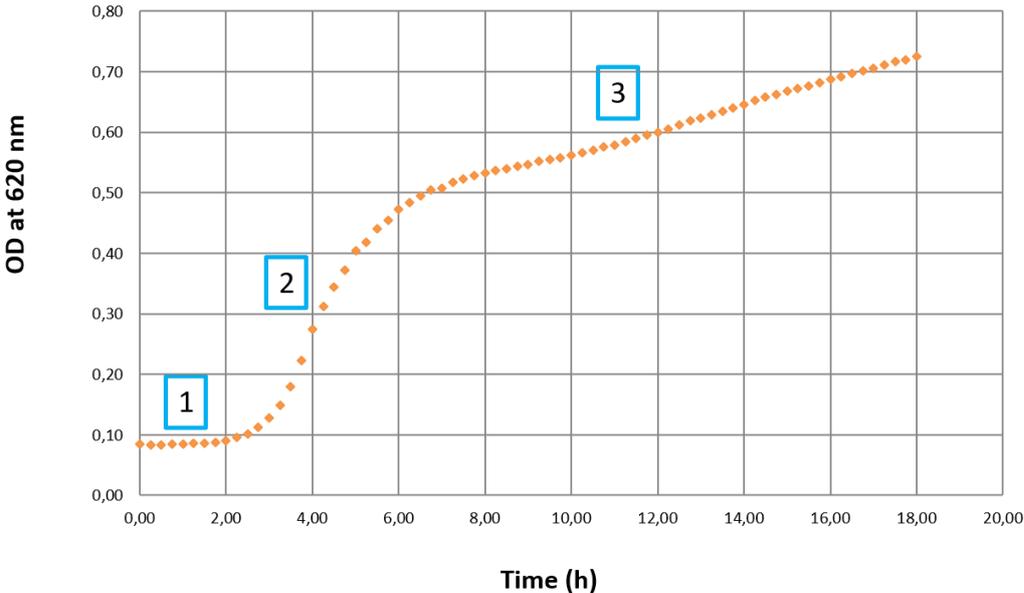


Figure 1: Growth curve of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

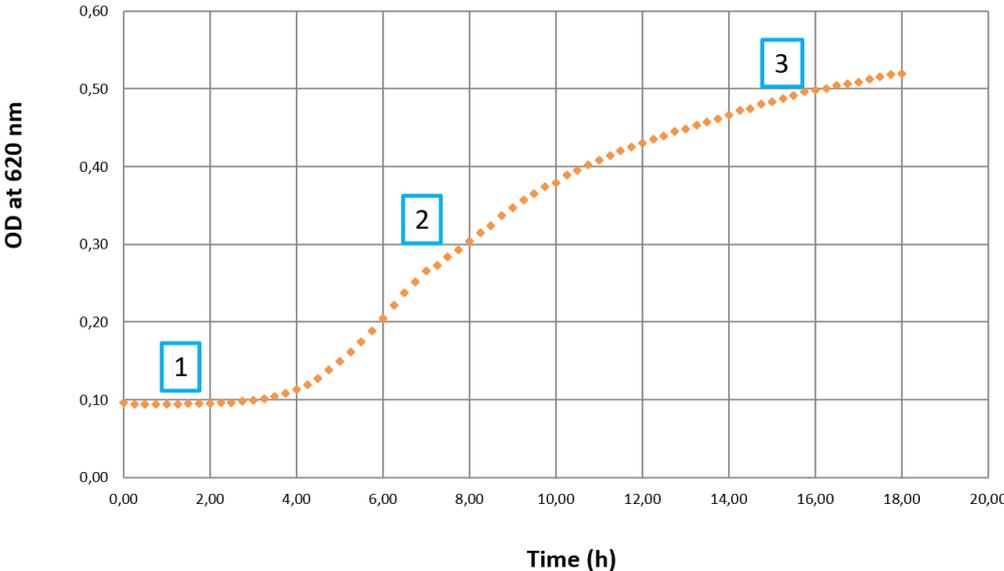


Figure 2: Growth curve of *Staphylococcus epidermidis* CIP 105777

Biofilm assays

Biofilm assays were carried out following the procedure described by H. Mu et al.⁶ 100 μ L (10^6 CFU) of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* solutions were added to individual wells of a sterile 96-well microtiter plates. The plates were incubated at 37 °C for 24 h to allow biofilm formation. Then, the supernatant containing non-adhered cells was removed and the wells were washed three times using 0.9% (w/v) NaCl solutions. Afterwards, existing biofilms were incubated at 37 °C in 90 μ L of culture medium and 10 μ L of each nanoparticle solution for 24 h or 48 h. Bacteria incubated with medium only were used as control. After different incubation times the media from each well were removed with a pipette and the plates were gently washed three times with 0.9% NaCl solutions. The plates were air dried at room temperature. Then the biofilm was stained by adding 100 μ L of crystal violet (1%, w/v) for 20 min. Excess crystal violet was gently removed by washing. The biofilm material was then solubilized in 150 μ L of acetic acid and quantified by measuring the OD₆₂₀ using a microtiter plate reader (Multiskan TM FC, ThermoFisher Scientific). All assays were performed at least 10 times. Data were expressed as mean \pm standard deviation. The values of the experimental groups were compared with the control group. Statistical significance was analyzed by Students's T-test to detect the presence of statistically significant differences (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). All assays were performed at least 10 times.

Observation of bacterial morphology by microscopy

Bacterial morphology analyses were carried out by SEM-FEG imaging, in order to visualize the potential effect of functionalized gold nanoparticles upon contact with bacteria. Since SEM-FEG observations is a high vacuum technique, gold surfaces were prepared by fixing bacterial state using glutaraldehyde reticulation. Thus, surfaces were immersed 2 h in 2.5%

glutaraldehyde (v/v in PBS) solution. After PBS rinsing, surfaces were gently dried using ethanol solutions of increasing concentrations (25, 50, 75, 96 and 100%) before being dried.

V.2. Cytotoxicity assay

Nanoparticles were internalized by PC3 cells in a 96-well plate for 24 hours. Six conditions were compared. Firstly, cells were kept in culture for 24 hours as control condition. Secondly, culture medium was enriched with zoledronate molecules, with concentrations ranging from 10^{-6} to 1.5 mM. Thirdly, culture medium was enriched with Mo₄Zol₂Mn at concentrations comprised between 10^{-6} to 1.5 mM in zoledronate. Fourthly, culture medium was enriched with AuNP@Mo₄Zol₂Mn at concentrations comprised between 10^{-6} to 1.5 mM in zoledronate. Fifthly, cells were exposed to a laser 680 nm at 1.7W/cm² as laser only control cells. Finally, cells supplemented with AuNP@Mo₄Zol₂Mn were exposed to a laser 680 nm at 1.7 W/cm² during 10 minutes. After 24 hours, the culture medium was replaced by 200 µL of RPMI without phenol red, supplemented with 10% Alamar Blue. After 2 hours the plate was analyzed with a multimode plate reader (Enspire Perkin Elmer) at an excitation wavelength of 570 nm and a fluorescence detection at 585 nm. Metabolic activity was determined by comparison with control cells.

UV–Vis Spectra in Cells

Cells were cultured on 12 mm diameter glass coverslips. Culture medium was supplemented with the AuNP@Mo₄Zol₂Mn nanoparticles at zoledronate concentrations of 80 µM. After incubation, cells were washed with RPMI supplemented with 10% FBS, and then eight glass coverslips were overlaid in 24-well plate and the spectrum was measured with an EnSpire Multimode Plate Reader Perkin Elmer.

VI. Characterisation techniques

NMR

¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AC-300 spectrometer operating at 300 MHz. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) downfield from internal TMS. The

following abbreviations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; quint, quintet; m, multiplet; dd, doublet of doublets; td, triplet of doublets; br., broad signal.

^{31}P NMR spectra were recorded in 5 mm tubes with ^1H decoupling by using a Bruker AC-300 spectrometer operating at 121.5 MHz. ^{31}P chemical shifts were referenced with respect to an external standard, 85% H_3PO_4 , using the convention that low-field, paramagnetic, deshielded values are positive (IUPAC δ -scale).

Infrared spectroscopy

FT-IR of powders and crystals: Infrared (IR) spectra were recorded on a Nicolet 30 ATR 6700 FT spectrometer. Relative intensities are given after the wavenumber as: vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak; sh., shoulder, br., broad.

X-ray Powder Diffraction

Room temperature X-Ray powder diffraction: X-ray powder Diffraction spectra were monitored using a Bruker D5000 diffractometer using $\text{Cu K}\alpha_1$ radiation (1.54059 Å).

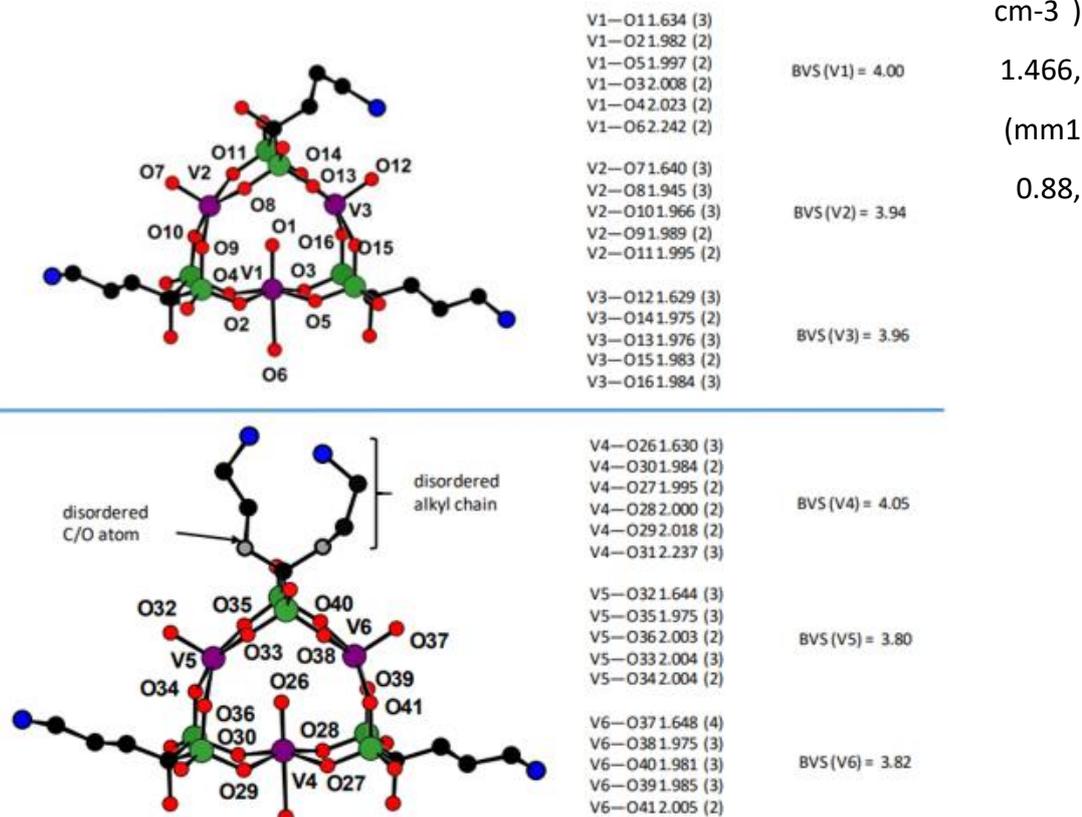
Single-crystal X-ray Diffraction

V_3Al_3

The data were measured at the XALOC beamline of the ALBA synchrotron ($\lambda = 0.72931$ Å) at 100 K using a MD2M single axis diffractometer (Maatel, France) and a Pilatus 6M detector (Dectris, Switzerland). The crystal was taken directly from its solution, mounted with a drop of Paratone-N oil and immediately put into the cold stream of dry N_2 on the goniometer and kept at 100 K with a CryoStream 700 (Oxford Cryosystems, UK). X-ray diffraction data were collected in rotation steps of 1° over a total range of 360° . The X-ray diffraction images were indexed, integrated and scaled using the XDS package^{7,8} and scaled with SCALA from the CCP4 suite.⁹ The structure was solved with the SHELXT¹⁰ structure solution program, using the

Intrinsic Phasing solution method. The model was refined with version 2018/3 of SHELXL¹¹ using Least Squares minimisation. Empirical formula: $C_{12}H_{27}N_3Na_3O_{32.75}P_6V_3$, formula weight (g): 1144.97, crystal system: triclinic, space group: P-1, a (Å) = 13.241(3), b (Å) = 18.055(4), c (Å) = 21.996(4), α (°) = 99.43(3), β (°) = 90.12(3), γ (°) = 90.58(3), V (Å³) = 5187.2, Z = 4, ρ_{calc} (g

=
μ
) =
data



(parameters): 27527 (1066), $R_{int} = 0.106$, $GOF = 1.02$, $R_1(>2\sigma(I)) = 0.134$, $wR_2 = 0.341$. The complete data can be found in the cif file (CCDC 1926180). There are two independent molecules in the unit cell (Figure 1), which differ by the position of the alkyl chain of one of the alendronate ligand. In the first molecule, the ligands are not disordered while in the second molecule the ligand is disordered over two positions with equal occupancy factors.

Figure 3: Ball-and-stick representations of the two independent molecules in the structure of the polyoxovanadate $V_3(Ale)_3$, V-O bond distances and bond valence sums for the vanadium ions. Purple spheres = V, green spheres = P, red spheres = O, black spheres = C, blue spheres = N, H atoms have been omitted for clarity.

UV-visible spectroscopy

Electronic absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda-750 spectrometer using 0.1 cm or 1.0 cm calibrated glass cells.

Dynamic Light Scattering (DLS) – ζ -potential measurements

DLS : Batch mode hydrodynamic size (diameter) measurements were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS. A minimum of three measurements per sample were made.

ζ -Potential : A Malvern Zetasizer Nano ZS instrument was used to measure zeta potential at 25°C for all samples. Samples prepared for the DLS measurements were loaded into a pre-rinsed folded capillary cell for the zeta potential measurements. A minimum of three measurements per sample were made.

Transmission Electron Microscopy (TEM) & Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) coupled with X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy (X-EDS) measurements

TEM measurements were performed using a JEOL JEM 1011 microscope operating at an accelerating voltage of 100 kV. The TEM grids were prepared by depositing 10 μ L of a particle suspension on a carbon-coated copper grid, and dried at room temperature. The nanoparticles size distribution was calculated by measuring a minimum of 300 particles using the ImageJ software.

STEM mode coupled with X-ray Energy-Dispersive Spectroscopy (X-EDS) was used to perform elemental mapping (JEOL JEM-2100). X-EDS analysis was realized with an Oxford Instrument SDD detector of 80 mm². X-ray spectra were recorded and processed with Aztec software.

Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)

P, Au, Mo or V contents were determined on previously acid digested samples in aqueous solution on an Agilent Technologies 700 Series ICP-OES instrument. The digestion procedure was carried out by the addition of a 0.5 mL *aqua regia* solution to 0.5 mL of each nanoparticle solution. After the digestion process overnight, the samples were diluted with 9 mL of 2.5% HNO₃/HCl (v/v).

ICP-OES Chapter 3: Gold/Polyoxometalate Core/Shell Nanoparticles for Combined Chemo-Photothermal Cancer Therapy

For the quantification of zoledronate ligand in our samples we encountered difficulties of reproducibility. For the same synthesis conditions, we assessed different concentration of zoledronate (from 2.8 μM to 27.8 μM). The first hypothesis to explain this variability is a problem with the digestion process. To check this hypothesis we tested three procedures:

- a. Aqua regia
- b. Diluted aqua regia
- c. H₂SO₄/HNO₃ (1 :1, v : v)

We determined three different zoledronate concentrations: 308 μM (process a), 208 μM (process b) and 136 μM (process c). These results are not reproducible. However, using aqua regia for digestion process is the best method for our system. The second hypothesis is that the colloidal solution is not homogeneous. To confirm this hypothesis, we measured the zoledronate concentration of a fully digested sample and of a certain volume of sample taken after the solution has been vortexed. We obtained a zoledronate concentration of 108 μM (fully digested sample) and 102 μM (10 mL digestion). These results are reproducible. To conclude, the sample must be carefully mixed using vortex before further use.

Calculation method of the coverage ratio

The POM/Au⁰ nanoparticle coverage ratio σ was calculated considering the following formula:

$$\sigma = \frac{N_{POM}}{N_{AuNps} S_{AuNps}}$$

where N_{POM} is the total number of POM molecules by liter, N_{AuNps} the total number of gold nanoparticles by liter and S_{AuNps} the surface of one gold nanoparticle, with:

$$N_{POM} = \frac{w_M N_A}{M_{(M)} \times n_M}, w_M \text{ being the considered metal of the POM mass concentration and } n_M$$

the number of the considered metal atoms in the POM

N_{AuNps} is equal to the number of Au atoms by liter divided by the number of Au atoms in a particle and can be written:

$$N_{AuNps} = \frac{w_{Au} N_A}{M_{(Au)} V_{AuNps} / V_{Au}}, V_{AuNps} = \frac{\pi d^3}{6} \text{ (d = nanoparticle average diameter (nm)) being the}$$

volume of one gold nanoparticle and $V_{Au} = \frac{M_{Au}}{N_A \rho_{Au}}$ the volume of a gold atom.

The equation can thus be written:

$$\sigma = \frac{N_{POM}}{N_{AuNps} S_{AuNps}} = \frac{w_M d N_A \rho_{Au}}{6 \times n_M \times M_M \times w_{Au}}$$

With $S_{AuNps} = \pi d^2$ and w_M and w_{Au} being measured by ICP.

Photothermia in Water

Aqueous measurements were made in 0.5 mL Eppendorf tubes containing 50 μ L of nanoparticles solubilized in water. Concentrations ranged from $[Au] = 0.25$ mM to $[Au] = 1$ mM. Each sample was illuminated with a 680 nm laser (Laser Components S.A.S France) positioned 4.5 cm with power density in between 0.3 to 1.7 W cm^{-2} . Temperature elevation was recorded with an infrared thermal imaging camera (FLIR A6751) in real time.

References :

- (1) Kubíček, V.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. Aminoalkylbis(Phosphonates): Their Complexation Properties in Solution and in the Solid State. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, No. 2, 333–344. <https://doi.org/10.1002/ejic.200600615>.
- (2) Hu, T. L.; Du, W. P.; Hu, B. W.; Li, J. R.; Bu, X. H.; Cao, R. Novel Ag(I) Complexes with Azole Heterocycle Ligands Bearing Acetic Acid Group: Synthesis, Characterization and Crystal Structures. *CrystEngComm* **2008**, 10 (8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1039/b801070f>.
- (3) Kieczkowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I. Preparation of (4-Amino-1-Hydroxybutylidene)Bisphosphonic Acid Sodium Salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An Improved Procedure for the Preparation of 1-Hydroxy-1,1-Bisphosphonic Acids. *J. Org. Chem.* **1995**, 60 (25), 8310–8312. <https://doi.org/10.1021/jo00130a036>.
- (4) Stevenson, P. C.; Turkevich, J.; Hillier. A Study of the Nucleation and Growth Processes IN the Synthesis Of. *Discuss. Faraday. Soc.* **1951**, 11 (c), 55–75.
- (5) Yuan, H.; Khoury, C. G.; Hwang, H.; Wilson, C. M.; Grant, G. A.; Vo-Dinh, T. Gold Nanostars: Surfactant-Free Synthesis, 3D Modelling, and Two-Photon Photoluminescence Imaging. *Nanotechnology* **2012**, 23 (7).
- (6) Mu, H.; Tang, J.; Liu, Q.; Sun, C.; Wang, T.; Duan, J. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (November 2015), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep18877>.
- (7) Kabsch, W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, 66 (2), 133–144. <https://doi.org/10.1107/S09074444909047374>.
- (8) Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, 66 (Pt 2), 125–132.

<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.

- (9) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>.
- (10) Lyford, T. S.; Collins, S. P.; Fewster, P. F.; Thomas, P. A. X-Ray Investigation of Lateral Hetero-Structures of Inversion Domains in LiNbO₃, KTiOPO₄ and KTiOAsO₄. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* **2015**, *71*, 255–267. <https://doi.org/10.1107/S2053273315001503>.
- (11) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, *71* (Md), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.

Conclusion générale et perspectives

Ces travaux ont permis l'obtention de plusieurs assemblages nanoparticules/polyoxométallates pour des applications biomédicales. L'utilisation de polyoxométallates réduits et fonctionnalisés par des ligands de type bisphosphonate a abouti à l'obtention en une seule étape de nanoparticules d'or et d'argent sphériques ainsi qu'à l'obtention en deux étapes de AuNPs de type nano-étoiles d'or.

Le premier projet a consisté à synthétiser des nanoparticules d'or à partir du polyoxovanadate $V_3(Al)_3$ en une seule étape. Ces assemblages ont montré de très bonnes propriétés antibiofilm sur deux souches bactériennes. Chaque composant de cet assemblage a contribué à l'efficacité antibactérienne. De plus, ces travaux ont montré l'importance du degré d'oxydation du vanadium vis-à-vis de ses propriétés biologiques. En parallèle à cette étude, des nanoparticules d'argent ont été synthétisées en une seule étape et à température ambiante à partir du même polyoxovanadate. Des premiers résultats ont montré que les AgNPs décorées par le polyoxovanadate $V_3(Al)_3$ inhibaient la croissance de biofilms bactériens. Cependant, ces assemblages nécessitent encore d'être caractérisés plus en profondeur.

Le second projet de ces travaux de thèse était l'élaboration de nanoparticules d'or sphériques par échange de ligands citrates par des POMs pour des applications en photothérapie. Cette synthèse a été effectuée en deux étapes et a permis d'obtenir des core-shell AuNPs/polyoxométallates. Le polyoxométallate $Mo_4(Zol)_2Mn$ utilisé dans ce projet est fonctionnalisé par un ligand zoledronate, qui est connu pour ses propriétés anticancéreuses. Ces assemblages ont été caractérisés par de nombreuses techniques (spectroscopies UV-vis et IR, microscopie TEM, DLS, mesure du potentiel zeta), la nature de la couche de polyoxométallates a en particulier été mise en évidence par STEM 2D. Les nano-composites obtenus ont été testés sur une lignée cellulaire PC3 du cancer humain de la prostate. En conditions photothermiques, les nano-composites AuNPs/ $Mo_4(Zol)_2Mn$ présentent une activité anticancéreuse plus élevée que le zoledronate et les AuNPs sans POM. Par microscopie sur les cellules, nous avons mis en évidence que nos assemblages étaient internalisés dans les cellules.

Enfin, le dernier projet a consisté à utiliser un polyoxomolybdate réduit et fonctionnalisé par des ligands alendronate ($\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$) pour la synthèse de nanoparticules d'or sphériques (AuNPs) et en forme d'étoiles (AuNSs). Pour ces deux études, le POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ est à la fois réducteur des sels d'or et stabilisant des nanoparticules. L'obtention de AuNPs sphériques de forme et de taille contrôlées a nécessité un travail d'optimisation au niveau des conditions de synthèse. Pour la première fois, ce type de nano-hybride a été obtenu par synthèse micro-onde. L'analyse XPS confirme la présence du POM $\text{Mo}_4(\text{Ale})_2$ à la surface des nanoparticules d'or ainsi que le changement de degré d'oxydation du molybdène lors de la formation des AuNPs. Ces assemblages ont été testés sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et n'ont à ce jour pas montré de propriétés antibactériennes notables. Les nano-étoiles d'or ont été obtenues via une voie de synthèse en deux étapes dites de « nucléation-croissance ». Cette méthode est couramment utilisée pour la synthèse de nanoparticules anisotropes. Ce type de nano-étoiles d'or a cependant été obtenu pour la première fois à partir d'un POM réduit. Un travail conséquent a été fait sur l'optimisation de la synthèse afin qu'elle soit reproductible, ainsi que sur le nettoyage des AuNSs obtenues. Enfin, une étude sur l'impact de la concentration en germes a permis de moduler la bande plasmon. Ainsi, nous avons obtenu des AuNSs dont la bande plasmon varie entre 613 nm et 1018 nm. La caractérisation de ces assemblages doit néanmoins être finalisée.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons travaillé essentiellement avec les ligands alendronate et zoledronate. Cependant, le risedronate possède de meilleures propriétés antibactériennes que les deux bisphosphonates cités précédemment. Une des perspectives de ces travaux est donc l'obtention de nanosystèmes comportant des POMs fonctionnalisés par le ligand risedronate. Bien que, comme cela a été décrit dans le chapitre bibliographique, très peu de POMs associés au ligand risedronate ont pu à ce jour être isolés, nous avons avec succès obtenu trois nouveaux polyoxométallates réduits et fonctionnalisés avec des ligands risedronate. L'étude de ces systèmes pour la formation de nanoparticules sera très prochainement effectuée au laboratoire.

Une autre perspective à ces travaux récemment financé par l'ANR est de préparer des nano-étoiles trimodale qui en plus de combiner la chimiothérapie grâce aux POMs et la photothermie dans le NIR grâce à l'utilisation de nano-étoiles utiliserait la capacité des nanoparticules d'or à produire de l'oxygène singulet pour amener une troisième thérapie

Conclusion générale et perspectives

photodynamique. Dans ce projet les POMs seront utilisés comme agents thérapeutiques qui permettent l'élaboration des nano-étoiles et seront également fonctionnalisés par des réservoirs à oxygène singulet pour augmenter l'efficacité en thérapie photodynamique.

Titre : Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates / nanoparticules métalliques pour des applications biomédicales

Mots clés : Antibactériens – Anticancéreux – Nanoparticules - Polyoxométallates

Résumé : Les polyoxométallates (POMs) sont des oxydes moléculaires anioniques constitués de métaux à hauts degrés d'oxydation et qui possèdent de nombreuses propriétés biomédicales (anticancéreuses, antibactériennes, ...). Cependant, les POMs sont souvent instables en milieu biologique et pénètrent difficilement les cellules. Il est donc nécessaire de les combiner à d'autres entités comme les nanoparticules d'or (AuNPs), qui sont biocompatibles, facilement fonctionnalisables et qui permettent de vectoriser les complexes POMs tout en améliorant leur stabilité. Ces travaux de thèse concernent la mise au point de voies de synthèses d'AuNPs fonctionnalisées par des POMs hybrides comportant des ligands bisphosphonates ainsi que l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes et anticancéreuses. Tout d'abord, un nouveau polyoxovanadate réduit possédant des

centres V^{IV} et des ligands alendronate a permis l'obtention en une étape d'AuNPs fonctionnalisées, le POM jouant le rôle de réducteur et d'agent stabilisant. Les propriétés antibiofilm de ces assemblages ont été mises en évidence. Cette étude a ensuite été étendue aux nanoparticules d'argent. Dans un second temps, des nano-composites associant des AuNPs et un polyoxomolybdate fonctionnalisé par un ligand zoledronate aux propriétés anticancéreuses ont été synthétisés. En conditions photothermiques (PTT), ces assemblages se sont révélés efficaces sur une ligne cellulaire du cancer de la prostate (PC3). Enfin, un polyoxomolybdate réduit et fonctionnalisé par un ligand alendronate a permis la synthèse par micro-onde d'AuNPs sphériques mais aussi pour la première fois de forme branchées.

Title : Synthesis and characterization of polyoxometalates / metallic nanoparticles composites for biomedical applications

Keywords : Antibacterials – Anticancer – Nanoparticles - Polyoxometalate

Abstract : Polyoxometalates (POMs), which are anionic molecular oxides containing metals in high oxidation state, exhibit numerous biomedical properties (anticancer, antibacterial, ...). However, POMs are often unstable in biological media and encounter difficulties penetrating cells. It is therefore necessary associating them with other entities such as gold nanoparticles (AuNPs), which are biocompatible and easily functionalized and allow vectorizing POMs while improving their stability. The objective of this PhD work is to develop synthesis pathways of AuNPs functionalized by hybrid POMs containing bisphosphonate ligands, and the evaluation of their antibacterial and anticancer properties. Firstly, a new

reduced polyoxovanadate incorporating V^{IV} ions and alendronate ligands was used to obtain AuNPs in one step, the POMs acting as reducing and stabilizing agents. The antibiofilm properties of the obtained composites were demonstrated. This study was then extended to silver nanoparticles. Then, nano-composites combining AuNPs and a polyoxomolybdate functionalized with zoledronate ligands, which present anticancer properties, were synthesized. Under photothermal (PTT) conditions, these assemblies were shown to be highly active on a prostate cancer cell line (PC3). Finally, a reduced hybrid polyoxomolybdate bearing alendronate ligands allowed the microwave synthesis of spherical AuNPs and for the first time POM functionalized gold nanostars.

