



HAL
open science

Synthèse et fonctionnalisation de nanobâtonnets d'or enrobés de silice AuNR@SiO₂ pour des applications aux biointerfaces

Vincent Pellas

► **To cite this version:**

Vincent Pellas. Synthèse et fonctionnalisation de nanobâtonnets d'or enrobés de silice AuNR@SiO₂ pour des applications aux biointerfaces. Matériaux. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS057 . tel-04101956

HAL Id: tel-04101956

<https://theses.hal.science/tel-04101956>

Submitted on 22 May 2023

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 397

Thèse effectuée au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS)

et à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM)

Synthèse et fonctionnalisation de nanobâtonnets d'or enrobés de silice AuNR@SiO₂ pour des applications aux biointerfaces

Par Vincent PELLAS

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Souhir BOUJDAY et Michèle SALMAIN

Soutenue le 20 mai 2021

Devant un jury composé de :

Roberta BRAYNER	Maîtresse de conférences Université de Paris	Rapportrice
Christophe COLBEAU-JUSTIN	Professeur Université Paris-Saclay	Rapporteur
Christophe HUMBERT	Directeur de recherche Université Paris-Saclay	Examineur
Ali ABOU-HASSAN	Maître de conférences Sorbonne Université	Examineur
Souhir BOUJDAY	Professeure Sorbonne Université	Directrice de thèse
Michèle SALMAIN	Directrice de recherche Sorbonne Université	Co-directrice de thèse
Juliette BLANCHARD	Chargée de recherche Sorbonne Université	Invité

A mes parents et mes grands-parents

Remerciements

Cette thèse de doctorat a été effectuée au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS) et l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM) de Sorbonne Université. Je remercie à ce titre Hélène Pernot, Michèle Salmain et Serge Thorimbert de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de mener à bien mes travaux de thèse. Un remerciement particulier à Hélène Pernot pour ses qualités humaines.

Je tiens tout spécialement à remercier Madame Roberta Brayner et Monsieur Christophe Colbeau-Justin de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail ainsi que Monsieur Christophe Humbert et Monsieur Ali Abou-Hassan pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements et ma gratitude envers ma directrice de thèse Souhir Boujday, pour son soutien depuis mon stage de M2, et d'avoir cru en mes capacités pour me proposer ce sujet de thèse. Je remercie profondément ma co-directrice de thèse Michèle Salmain pour sa disponibilité, ses encouragements et sa bonne humeur sans faille, qui m'ont rendu plus confiant dans la réalisation de mes objectifs. Je leur suis particulièrement reconnaissant pour les connaissances et l'expertise qu'elles m'ont transmises et qui seront un avantage certain pour mon avenir. Leur aide, conseils et honnêteté m'ont été précieux et extrêmement formateur professionnellement. Ce fut une expérience très enrichissante d'avoir pu travailler avec elles.

J'exprime mes sincères remerciements à Juliette Blanchard et Clément Guibert pour leur investissement dans ces travaux de thèse. Je tiens à exprimer ma gratitude pour leur grande disponibilité, leur patience et leurs très bons conseils lors des difficultés que j'ai pu rencontrer. J'ai beaucoup appris à leurs côtés : leur rigueur, nos discussions et leur bonne humeur ont été pour moi une véritable source de motivation.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des membres des deux laboratoires pour leur accueil et leur aide au quotidien. En particulier Sandra Casale pour la partie microscopie électronique, Christophe Méthivier pour l'XPS, Jean-Marc Kraft pour la spectroscopie Raman et Nathalie Fischer-Durant que j'ai sollicité pour la spectroscopie infrarouge. Ils ont su partager leurs compétences et leurs connaissances pour me permettre de pleinement caractériser mes

échantillons. Leurs précieux conseils et leurs expertises ont contribué à l'avancement de ce projet. Je remercie également Annie Mettendorff, Sonia M'barek, Isabelle Vuillaume et Vincent Losinho pour leur bienveillance et ce qu'ils ont fait pour moi sur un plan administratif ou technique. Leur travail facilite l'avancée de la recherche.

Ces années de thèse ont aussi été l'occasion d'exercer une mission d'enseignement auprès des étudiants de l'université. Je souhaite ainsi remercier les équipes pédagogiques et le personnel de l'université pour leur formation et leur implication auprès des étudiants.

Je remercie chaleureusement mes collègues de paillasse, doctorants et post-doctorants Alexis Loiseau, Lu Zhang, Médéric Lequeux, Somia Tomane, Mathieu Nicolas, Sun Young Hur, Mona Soroush, François Payant, Nadia Nazi, Robin Ramos, Anissa Beghennou pour leur esprit de solidarité et d'entre-aide scientifique ainsi que pour nos moments de détente. Je remercie également les étudiants dont j'ai eu le plaisir d'encadrer Anis Ben Ameer, Yoan Mimoun. Une mention spéciale pour David Hu et Yacine Mazouzi avec qui j'ai partagé mon bureau durant ces trois années et qui m'ont supporté tout ce temps, tout en me fournissant en café de temps à autre. Je n'oublierai pas les moments de complicité que nous avons partagés, nos discussions scientifiques et leur soutien dans les moments les plus critiques m'ont été d'une aide précieuse. Je tiens également à remercier le Docteur Youssef Ben M'barek, pour nos incalculables fous rires, toujours là dans les bons comme les mauvais moments et qui est devenu plus qu'un ami au fil des années.

Je tiens également à remercier mes amis de la Basse cour, mes camarades de Paris et d'ailleurs qui ont beaucoup entendu parler de cette thèse et m'ont soutenu avec constance. Un remerciement particulier à Laura pour sa patience et pour m'avoir donné un équilibre indispensable à ma bonne humeur.

Enfin, je tiens à remercier ma mère, mon père, ma sœur et mes grands-parents pour leur amour et encouragements inconditionnels tout au long de mes études. Les mots ne peuvent exprimer à quel point je leur suis reconnaissant.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE I : CONTEXTE ET ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
1. Introduction et historique des nanoparticules d'or	21
2. Propriétés optiques des AuNRs	24
3. Synthèse des AuNRs par ensemencement en milieu de croissance	26
4. Méthodes de modifications de surface et d'enrobage par la silice	28
5. Vue générale du potentiel des AuNR@SiO ₂	32
RÉFÉRENCES	34
CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET OPTIMISATION DE PROTOCOLES D'ENROBAGE DES AuNRs PAR UNE COQUILLE DE SILICE	43
1. Résumé	45
2. Article	46
3. Informations supplémentaires	72
CHAPITRE III : OPTIMISATION DE LA FONCTIONNALISATION ET CONJUGAISON DES AuNR@SiO₂ POUR L'ÉLABORATION D'IMMUNOCAPTEURS LSPR EN SOLUTION	83
PARTIE 1 : ÉTAT DE L'ART	86
1. Modification de surface et fonctionnalisation des AuNR@SiO ₂ par des alkoxysilanes	86
2. Utilisation des AuNR@SiO ₂ comme immunocapteurs LSPR	92
PARTIE 2 : NANOPARTICULES DE SILICE DE TYPE STÖBER : SURFACE MODÈLE POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS DE SILANISATION	99
1. Caractérisations morphologiques et de la charge de surface des SiNPs	100
2. Silanisation des SiNPs par le MPTMS et quantification des fonctions thiol de surface	101
3. Caractérisations morphologiques et de la charge de surface des SiNP-MPTMS ..	105
4. Conclusion de la partie	106

PARTIE 3 : INTRODUCTION DE GROUPEMENTS FONCTIONNELS A LA SURFACE DES AuNR@SiO ₂	108
1. Evaluation de la sensibilité des AuNR@SiO ₂ au changement d'indices de réfraction	110
2. Silanisation des AuNR@SiO ₂ par le MPTMS et le TEBA et quantification des fonctions thiols de surface	111
3. Caractérisation des AuNR@SiO ₂ silanisés	114
4. Conclusion de la partie :	124
PARTIE 4 : GREFFAGE ET QUANTIFICATION D'ANTICORPS A LA SURFACE DES AuNR@SiO ₂	126
1. Marquage d'anti-rIgG par la fluorescéine et conjugaison aux AuNR@SiO ₂	127
2. Estimation du taux de recouvrement par spectroscopie de fluorescence	132
3. Conclusion de la partie	136
PARTIE 5 : ELABORATION D'IMMUNOCAPTEURS LSPR EN SOLUTION	137
1. Préparation et caractérisation des conjugués	138
2. Réalisation d'immunocapteurs LSPR en solution	140
3. Conclusion de la partie	147
CONCLUSION DU CHAPITRE	149
RÉFÉRENCES	151
MATERIELS ET METHODES	161
ANNEXES	172
CHAPITRE IV : VERS UNE APPLICATION DES AuNR@SiO₂ EN MICROSCOPIE INFRA ROUGE POUR L'IMMUNOMARQUAGE CELLULAIRE	183
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	186
1. Principe de l'immunomarquage par un fluorophore	186
2. L'immunofluorescence exaltée	187
3. La spectroscopie Raman exalté pour l'immunomarquage (iSERS)	189
4. La spectroscopie infrarouge exaltée pour l'immunomarquage (iSEIRA)	192
PARTIE 2 : ELABORATION DES SONDES OPTIQUES	193
1. Conjugaison d'anticorps et attachement de la sonde IR aux AuNPs et AuNRs	194
2. Caractérisation du complexe métal-carbonyle à la surface des AuNPs et AuNRs	200
CONCLUSION DU CHAPITRE	203
RÉFÉRENCES	205
MATERIELS ET METHODES	209

ANNEXE	213
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	215

Liste des abréviations

AFM : Microscopie à force atomique
Ag : Antigène
Anti-rIgG : Anticorps anti-IgG de lapin
APTES : (3-Aminopropyl)triéthoxysilane
APTMS : (3-Aminopropyl)triméthoxysilane
ATG-MS : Analyse thermogravimétrique couplée à la spectroscopie de masse
AuNP : Nanoparticule d'or
AuNR : Nanobâtonnets d'or
AuNR@SiO₂ : Nanobâtonnet d'or enrobé de silice
BSA : Albumine de sérum bovin
CFU : Colonie formant unité
CMC : Concentration micellaire critique
CTAB : Bromure de cétyltriméthylammonium
CV : Cristal violet
D.O : Densité optique
Da : Dalton
DDA : Approximation des dipôles discrets
DH : Diamètre hydrodynamique
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
E.coli : Escherichia coli
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab : Fragments de liaison à l'antigène
Fc : Fragment cristallisable
FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine
Fpm : (h⁵-cyclopentadienyl)Fe(CO)₂(h¹-N-maleimidato)
FT-IR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
FWHM : Largeur à mi-hauteur
HER2 : Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
ICP-OES : Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif
IgG : Immunoglobuline G
IP : Indice de polydispersité
IPCM : Institut Parisien de Chimie Moléculaire
IR-SNOM : Microscopie optique en champs proche à diffusion infra rouge
IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée
LBL : Layer-by-layer
LOD : Limite de détection
LRS : Laboratoire de Réactivité de Surface

LSPR : Résonance plasmonique de surface localisée
MCF-7 Michigan Cancer Foundation-7
MCM-41 : Mobil composition of matter numéro 41
MEB : Microscopie électronique à balayage
MEF : Fluorescence exaltée par le métal
MET : Microscopie électronique à transmission
MICA : molécule A lié au complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
MP : 4-mercaptopyridine
mPEG-SH : O-[2 - (3-mercaptopropionylamino)-éthyl]-O'-méthylpolyéthylène glycol
MPTMS : (3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane
NaOL : Oléate de sodium
NHS : N-Hydroxysuccinimide
NP : Nanoparticle
PAA : Acide polyacrylique
PAH : Poly(hydrochlorure d'allylamine)
PB : Tampon phosphate
PEF : Fluorescence exaltée par résonance plasmonique
PEG : Polyéthylène glycol
PM-IRRAS : Spectroscopie IR de réflexion-absorption par modulation de la polarisation
PSS : Polystyrène sulfonate
PVP : Polyvinylpyrrolidone
QCL : Laser à cascade quantique
RA : Rapport d'aspect
Réf. : Référence
RIU : Unité d'indice de réfraction
SBA : Santa barbara amorphous-15
SEIRA : Spectroscopie infrarouge exaltée de surface
SERS : Spectroscopie Raman exaltée de surface
SiNP : Nanoparticule de silice
SK-BR-3 : lignée cellulaire du cancer du sein
SPR : Résonance plasmon de surface
Sulfo-MBS : m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester
TA : Acide thioctique
TEBA : 3-triéthoxysilylbutyraldéhyde
TEOS : Orthosilicate de tétraéthyle
TNB²⁻ : 5-thio-2-nitrobenzoate
UV : Ultraviolet
XPS : Spectrométrie de photoélectrons X

Introduction Générale

Si les révolutions industrielles ont été des vecteurs de la mondialisation, le développement des activités industrielles liées à la consommation, l'accroissement des échanges transfrontaliers et l'urbanisation sont accompagnés de l'augmentation de la pollution environnementale, de l'émergence de maladies nouvelles et d'agents pathogènes. La pandémie actuelle de COVID-19 en est un exemple frappant. Nous sommes donc face à la nécessité permanente de surveiller les matrices environnementales (sols, airs, eaux), alimentaires et biologiques ainsi que de développer des dispositifs analytiques sensibles pouvant déceler des espèces polluantes ou toxiques à l'état de trace.

Les biocapteurs constituent une alternative efficace aux méthodes de détection traditionnelles, car contrairement à ces dernières, ils sont peu coûteux, permettent une utilisation simple ainsi qu'une mesure rapide, tout en offrant la possibilité d'être portables. Selon la terminologie de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC), un biocapteur est défini comme un dispositif intégré capable de fournir des informations analytiques quantitatives ou semi-quantitatives spécifiques en utilisant un élément de reconnaissance biologique en contact direct avec un élément transducteur. Les biocapteurs doivent répondre à un cahier des charges : une grande sensibilité et sélectivité de détection, une stabilité dans les conditions de mesure et dans le temps lors du stockage ainsi que la reproductibilité des analyses.

Les nanoparticules d'or sont l'un des nanomatériaux à base de métaux nobles les plus répandus dans les applications de biodétection en raison de leur biocompatibilité, d'un rapport surface/volume élevé qui améliore la performance de la détection par l'immobilisation de nombreux biorécepteurs et de leurs propriétés optiques uniques. En particulier, la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR), sensible à l'environnement local des particules, permet leur utilisation comme transducteurs de phénomènes d'interactions moléculaires par mesure de la variation de position de la bande LSPR. Bien que les nanoparticules d'or sphériques soient bien adaptées comme transducteurs colorimétriques, l'utilisation de particules d'or anisotropes et en particulier des nanobâtonnets (AuNRs, de l'anglais NanoRods) s'est développée de manière significative car elles offrent un domaine spectral plus large avec un coefficient d'absorption plus élevé. En tirant avantage de leurs propriétés optiques uniques, et de la propriété incomparable des anticorps à se lier à leur antigène avec une haute spécificité et affinité, nous nous sommes intéressés à utiliser les AuNRs comme transducteur et aux anticorps comme biorécepteurs pour concevoir une plateforme de biodétection.

Les immunocapteurs* LSPR en solution, cadre dans lequel s'inscrit ce projet, présentent plusieurs avantages intrinsèques : la lecture de la variation LSPR peut être réalisée simplement soit par un spectromètre UV-Visible standard de laboratoire, soit par un spectromètre portatif adaptable sur un smartphone, voire dans quelques cas à l'œil nu. Ces avantages facilitent grandement leur application au quotidien. De plus, la cinétique de reconnaissance avec leur cible peut être accélérée par un simple mélange de la solution. Enfin, la détection de cette interaction ne nécessite pas d'étapes supplémentaires de séparation ou de lavage.

Les méthodes de synthèse les plus efficaces permettant de contrôler la taille des AuNRs reposent sur l'utilisation du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), un tensioactif cationique favorisant la croissance anisotrope des particules et leur stabilisation. Néanmoins, celui-ci présente un certain nombre d'inconvénients, notamment sa forte adsorption à la surface des particules qui rend difficile son déplacement par des molécules à terminaison thiol ou amine, réaction d'échange qui peut rapidement conduire à l'agrégation des particules. Cette complexité rend le recouvrement des AuNRs par de la silice (AuNR@SiO₂) intéressant car cela permet de stabiliser les particules et d'utiliser la chimie de surface de la silice pour une immobilisation de biorécepteurs via l'utilisation de silanes fonctionnels. De plus, très peu d'articles font mention de l'utilisation de ces nanostructures cœur-coquille dans la conception de biocapteurs LSPR, ce qui rend cette stratégie originale.

Dans ce contexte, l'objectif central de ce travail est d'évaluer la contribution potentielle des AuNR@SiO₂ à la construction d'immunocapteurs homogènes opérant en solution et aux performances analytiques de ces dispositifs en termes de gamme de détection et de limite de quantification. Nous avons réexaminé les conditions de synthèse permettant l'enrobage des AuNRs par une coquille de silice homogène, d'épaisseur et de porosité contrôlée, tout en préservant les propriétés optiques du cœur d'or, avec une attention particulière apportée à la reproductibilité des synthèses. Différentes chimies de surface ont été envisagées pour l'immobilisation des biorécepteurs, avec comme objectif un contrôle au niveau moléculaire de la densité de silanes greffés. Celle-ci doit être importante afin de promouvoir l'immobilisation d'un grand nombre d'anticorps de capture. Ces derniers ont donc été greffés à la surface des AuNR@SiO₂ silanisées, tout en préservant leur structure et leur activité. Les nanosondes obtenues ont été utilisées pour la détection d'un antigène modèle, à savoir l'IgG de lapin. L'interaction anticorps-antigène a été suivie par la variation de la bande LSPR sur le spectre d'extinction UV-Visible des nanoparticules. La compréhension au niveau moléculaire des multiples étapes de conception de ces nanosondes, *via* la combinaison de différentes techniques

*Les immunocapteurs sont définis comme des biocapteurs intégrant des anticorps comme biorécepteur moléculaire

de caractérisation de surfaces permettrait de généraliser les démarches adoptées à d'autres applications utilisant les AuNR@SiO₂

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres. Le 1^{er} chapitre commence par une introduction générale sur les AuNRs, leurs synthèses et leurs propriétés optiques. Ensuite, un état de l'art sur les méthodes d'enrobage par une coquille de silice est présenté ainsi qu'une ouverture sur les différentes applications biomédicales des AuNR@SiO₂. Une partie de ce chapitre provient d'une revue publiée en 2020 dans le journal Biosensors à laquelle j'ai contribué en tant que co-premier auteur. Dans le chapitre 2 est présentée une méthode originale permettant d'obtenir une coquille de silice homogène d'épaisseur et de porosité contrôlée à la surface des AuNRs. Ces résultats ont été soumis à une publication dans le journal Chemistry of Materials et sont présentés sous la forme de l'article correspondant.

Le chapitre 3 est consacré à l'élaboration d'un immunocapteur LSPR pour la détection en solution d'un analyte modèle. Ce chapitre se décompose en cinq parties : la première expose l'état de l'art sur les méthodes permettant l'immobilisation d'anticorps à la surface des AuNR@SiO₂ et fait le point sur les quelques exemples de biocapteurs LSPR reportés dans la littérature. La deuxième présente l'optimisation des protocoles de silanisation sur une surface modèle de nanoparticules de silice et leur transposition aux AuNR@SiO₂ est détaillée dans la troisième partie. Dans la quatrième partie, est décrite l'immobilisation des anticorps. Les bioconjugués obtenus sont utilisés dans la cinquième partie comme nanosondes pour la détection en solution d'un analyte modèle.

Le chapitre 4 constitue une ouverture de l'utilisation des AuNR@SiO₂ pour la détection *in-vitro* de biomarqueurs cellulaires par microscopie infrarouge. Ce chapitre est décomposé en deux parties : la première est une étude bibliographique sur les techniques d'immunomarquage cellulaire utilisant les AuNRs comme agents dopants pour la microscopie de fluorescence et la microscopie Raman, la deuxième décrit la synthèse et la conjugaison de AuNR@SiO₂ et de nanoparticules d'or sphériques (AuNPs) à des anticorps et à un complexe de transition métal-carbonyle (sonde moléculaire). Il s'agira de discuter de l'intérêt des AuNR@SiO₂ par rapport aux AuNPs comme nanostructures exaltant le signal infrarouge du complexe métal-carbonyle. Enfin, une conclusion générale rassemble les principaux résultats ainsi que les perspectives découlant de ces travaux.

Chapitre I : Contexte et étude bibliographique

1. Introduction et historique des nanoparticules d'or

« Je ne prétends pas qu'elles soient d'une grande valeur dans leur état actuel, mais elles sont très suggestives, et peuvent éviter bien des problèmes à tout expérimentateur enclin à poursuivre et à étendre cette ligne de recherche ». C'est en ces termes que Michael Faraday évoqua lors de sa célèbre conférence de 1857 le potentiel applicatif des nanoparticules d'or¹. Il faisait référence à l'extraordinaire capacité de l'or colloïdal à réfléchir, réfracter et absorber la lumière sur la base qu'une "simple variation de la taille des particules donne naissance à une multitude de couleurs différentes". Il est le premier scientifique à établir un lien entre les propriétés optiques et la taille des nanoparticules d'or qu'il obtint par réduction du chlorure d'or par le phosphore blanc dans du disulfure de carbone. Pour ces raisons, certains lui attribuent la naissance des nanotechnologies modernes². Cependant, le terme « nano », attribué à Richard Feynman, n'apparaît qu'en 1959³. Les nanotechnologies se définissent aujourd'hui comme la science et l'ingénierie de systèmes de dimension inférieure à 100 nm et dont les propriétés physico-chimiques découlent directement de leur taille.

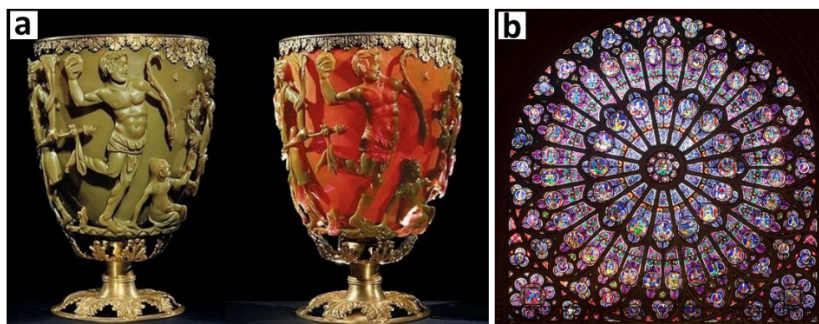


Figure 1 : (a) photographie de la coupe de Lycurgue, sous deux éclairages différents : en réflexion (gauche) et en transmission (droite), d'après⁴. (b) photographie de la rose du midi de Notre Dame de Paris, d'après⁵

Historiquement, l'exploitation de particules nanométriques prend son origine bien avant la compréhension des phénomènes d'interactions rayonnement-matière, notamment pour la décoration et la coloration du verre. Parmi les exemples les plus connus, on trouve la coupe de Lycurgue datant du IV^{ème} siècle, rouge rubis en lumière transmise et verte en lumière réfléchi⁴, ou encore certains vitraux de la cathédrale de Notre Dame de Paris datant du XIII^{ème} siècle (Figure 1a,b). Il faut attendre 1908 pour comprendre l'origine de cette interaction spécifique avec la lumière grâce à la théorie développée par Gustave Mie qui proposa une solution aux équations de Maxwell en expliquant la diffusion du rayonnement électromagnétique par une sphère⁶. Ainsi, lorsque le rayon des nanoparticules d'or est inférieur à la longueur d'onde

lumineuse il se produit l'excitation plasmonique. Leur couleur est rouge rubis en raison de la forte absorption de la lumière verte vers 520 nm, ce qui correspond à la fréquence à laquelle se produit la résonance plasmon de l'or sphérique.

C'est sûrement avec une légère frustration que Faraday nota que « l'état de division de ces particules doit être extrême ; elles n'ont encore été vues par aucun microscope assez puissant ». Il est à noter que les microscopes optiques traditionnels ne permettent pas d'observer les nanoparticules car leur taille est inférieure à la longueur d'onde de la lumière visible. C'est avec l'avènement des techniques de microscopie capables d'imager des nano-objets individuels que démarre l'essor des nanosciences et l'étude des nanoparticules. En 1951, grâce à l'invention du microscope électronique à transmission des ingénieurs allemands Ernest Ruska et Max Knoll, Turkevich et al. ont conclu que les suspensions préparées par Faraday sont constituées de particules d'or sphériques de 6 ± 2 nm de diamètre⁷. Une étude ultérieure de John Meurig Thomas au microscope électronique à haute résolution a montré que ces préparations sont composées de particules de distribution en taille de 3 à 30 nm⁸. Par la suite, l'invention du microscope à effet tunnel (1981) et de la microscopie à force atomique (1985) ont permis de franchir un pas décisif concernant l'étude et le développement des nanomatériaux dans la mesure où ils donnent accès à l'observation et la manipulation à l'échelle atomique de nano-objets sur des surfaces.

Aujourd'hui, les nanotechnologies rassemblent de nombreuses disciplines telles que la chimie, la physique, la biologie, la médecine, les matériaux et sont utilisés dans les domaines de la santé, de l'environnement, des capteurs, de la catalyse ou encore pour le stockage de l'énergie et l'électronique. Les nanoparticules d'or se sont avérées jouer un rôle important dans ces domaines en leur qualité d'éléments de base pour la mise en pratique de ces technologies au quotidien⁹.

Ces effets étant fortement dépendants de la taille, forme et structure des nanoparticules, le contrôle de ces paramètres est devenu l'objectif fondamental des chercheurs en sciences des matériaux désirant des propriétés physico-chimiques spécifiques¹⁰. Cela a entraîné le développement d'une myriade de méthodes de synthèse de nanoparticules que l'on peut classer en deux voies principales : la synthèse par voie descendante et par voie ascendante¹¹. La méthode descendante, communément appelée « top-down », consiste à fragmenter un matériau macroscopique par l'application d'une force extérieure jusqu'à déboucher aux nanostructures souhaitées. Il s'agit d'une méthode physique, la technique de lithographie est un exemple

typique de cette approche¹². La voie ascendante, plus couramment appelée « bottom-up », comprend l'utilisation de méthodes physiques ou chimiques opérant à l'échelle atomique pour assembler des unités de base en objets nanométriques plus grands en phase liquide. La méthode physique consiste à réduire un précurseur d'or par micro-onde, thermolyse ou radiolyse. Pour la voie chimique, la réduction des sels métalliques peut se faire par réduction chimique, électrochimique, photochimique ou encore biologique.

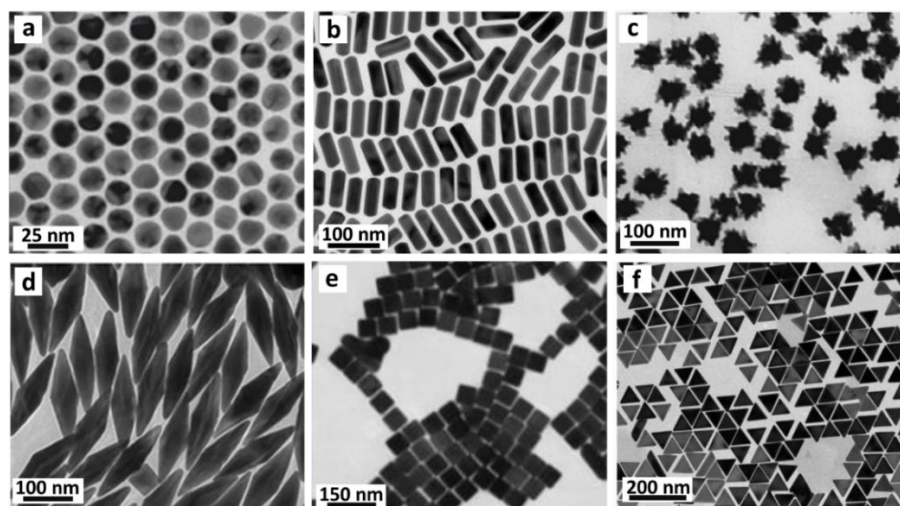


Figure 2 : Variété des nanoparticules d'or pouvant être obtenues par réduction chimique (a) sphères¹³, (b) batonnets¹⁴, (c) étoiles¹⁵, (d) bipyramides¹⁶, (e) cubes¹⁷ et (f) triangles¹⁸.

Quelle que soit la méthode choisie pour l'obtention des nanoparticules, elles doivent répondre à des exigences précises : distribution en taille étroite, quantité minimale de pollution par des formes non désirées, stabilité de la solution colloïdale ainsi que bonne reproductibilité des synthèses. La réduction chimique est la stratégie la plus largement utilisée, elle consiste à réduire un sel d'or par un réducteur en présence d'un agent stabilisant dont le rôle est d'empêcher l'agrégation des particules formées¹⁹. De cette manière, Turkevich a décrit en 1951 la synthèse de nanoparticules d'or sphériques d'environ 20 nm de diamètre par la réduction de HAuCl_4 par les ions citrate qui agissent également comme agents de stabilisation⁷. Depuis, de nombreuses synthèses ont été développées et permettent d'obtenir des nanoparticules d'or dans une multitude de formes telles que : bâtonnet, étoile, triangle, cube, bipyramide, etc (Figure 2). Bien que l'ensemble de ces nanostructures se soient révélés prometteuses, nous nous concentrerons uniquement sur les nanobâtonnets d'or (AuNRs), en raison d'un ensemble de caractéristiques avantageuses telles qu'une synthèse relativement facile, la possibilité d'ajuster avec précision leurs propriétés optiques par un contrôle dimensionnel, leur aptitude à être

internalisés par des cellules cancéreuses (comme par exemple, la lignée cellulaire HeLa avec une internalisation des AuNRs jusqu'à 150 nm de diamètre²⁰), à convertir efficacement l'énergie lumineuse en énergie thermique, à diffuser la lumière ainsi que leur sensibilité aux changements de propriétés diélectriques dans leur environnement proche.

2. Propriétés optiques des AuNRs

La résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) correspond à l'oscillation collective des électrons confinés en surface des particules à la suite d'une irradiation lumineuse directe, lorsque la longueur d'onde de l'onde électromagnétique incidente correspond à la fréquence de résonance du nuage électronique²¹. Celui-ci, chargé négativement, est déplacé par le champ électromagnétique, ce qui donne naissance à un dipôle électrique au sein de la particule. Une attraction coulombienne résultant de ce déplacement induit une force de rappel, définie par la fréquence d'oscillation du nuage électronique. Le phénomène LSPR a deux effets importants : le champ électromagnétique à proximité de la surface est fortement exalté et l'absorption optique de la particule présente un maximum à la fréquence de résonance du plasmon. Dans le cas des AuNRs, l'effet LSPR conduit à deux résonances plasmoniques distinctes appelées résonances transversale et longitudinale, relatif à la polarisation électronique respectivement suivant le petit et grand axe des particules²¹ (Figure 3a). Cette dernière est particulièrement intéressante et a retenu l'attention des chercheurs car sa position peut être ajustée sur une plage très large de longueurs d'onde, du visible au proche infrarouge, approximativement entre 600 et 1800 nm, suivant le rapport d'aspect des particules (défini comme étant le rapport entre la longueur et la largeur géométrique). Une augmentation du rapport d'aspect entraîne un décalage vers le rouge de la bande LSPR longitudinale et son maximum varie linéairement avec le rapport d'aspect²² (Figure 3b). A titre de comparaison, les nanoparticules sphériques ne présentent qu'une bande LSPR puisque que leur forme est isotrope et ne peut être ajustée qu'entre environ 520 et 550 nm en modifiant leur diamètre²². Le comportement optique des AuNRs peut être compris selon la théorie de Gans, il a étendu la théorie de Mie pour expliquer la dépendance de la position de la bande LSPR longitudinale au rapport d'aspect de particules ellipsoïdales^{22,23}. Cette théorie permet également de déterminer la distribution en rapport d'aspect d'une solution de AuNRs présentant une bande LSPR large par une convolution de spectres de AuNRs individuels²⁴. La versatilité de la position de la bande LSPR des AuNRs lui permet d'être ajustée au niveau de la première fenêtre biologique (700 – 980 nm) ou de la seconde (1000 – 1400 nm), dans lesquelles les tissus présentent une

atténuation optique minimum, permettant l'utilisation de lasers proche infrarouge pénétrant plus profondément les tissus biologiques²⁵.

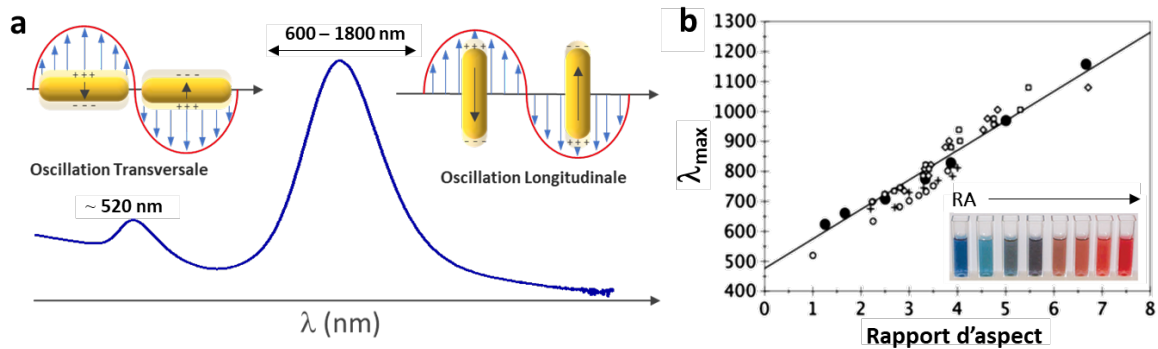


Figure 3 : (a) Spectre d'extinction typique des AuNRs et représentation schématique des oscillations transverses et longitudinales d'après²⁶, (b) Position de la bande LSPR longitudinale λ_{max} en fonction du rapport d'aspect des AuNRs. Résultats d'après : la simulation utilisant la méthode DDA (Discrete Dipole Approximation) (cercles noirs)²³ et données expérimentales issues des travaux de Al-Sayed et al. (cercles ouverts)²⁷, Pérez-Juste et al. (diamants et carrés)²⁸ et Brioude et al. (croix)²³. Insert d'après²⁹.

De ce fait, les AuNRs sont des candidats de choix pour des applications biomédicales³⁰. Leur capacité à absorber la lumière et à convertir ce rayonnement en chaleur par des mécanismes de relaxation permettent la mise en œuvre de techniques exploitant l'effet photothermique comme l'imagerie photo-acoustique³¹ et la thérapie photothermique³². Les AuNRs sont également d'une grande utilité comme marqueurs pour l'imagerie cellulaire en raison de leur capacité à diffuser la lumière bien plus efficacement que les marqueurs organiques classiquement utilisés, tout en étant plus résistants aux phénomènes de dégradation optique³³. De plus, la bande LSPR longitudinale des AuNRs est extrêmement sensible à des changements mineurs de la constante diélectrique/indice de réfraction de l'environnement local comparé aux nanoparticules sphériques³⁴. Cette sensibilité permet la détection d'événements d'interactions moléculaires à proximité de la surface, ce qui a permis le développement de nombreux biocapteurs utilisant les AuNRs comme transducteur²⁶. La dominance des effets d'absorption ou de diffusion de la lumière dépend de la taille des AuNRs^{35,36}. Par conséquent, il est important que ce paramètre soit contrôlé dépendamment de l'application choisie. Ainsi il est généralement admis que les particules les plus larges sont préférées pour les applications en imagerie où la composante de diffusion est essentielle. Par contraste, les AuNRs plus petites améliorent l'absorption des photons pour les applications exploitant l'effet photothermique.

Dans le cas des biocapteurs LSPR, des études ont montré qu'à rapport d'aspect constant, les AuNRs de plus grand volume présentent une profondeur de détection plus importante^{37,38}.

3. Synthèse des AuNRs par ensemencement en milieu de croissance

La plupart des synthèses de AuNRs reposent sur la méthode dite d'ensemencement en milieu de croissance³⁹ (Figure 4A). Ce processus comprend deux étapes séparées : la première consiste, à produire des petites particules sphériques (< 4 nm) appelées germes par la réduction du sel d'or HAuCl_4 par un agent réducteur fort, généralement NaBH_4 . Lors de la deuxième étape, les germes sont introduits dans une solution aqueuse contenant le précurseur d'or, un agent réducteur faible comme l'acide ascorbique et un agent stabilisant, généralement le CTAB, un tensioactif cationique et souvent du nitrate d'argent AgNO_3 , un additif permettant d'ajuster le rapport d'aspect des particules.

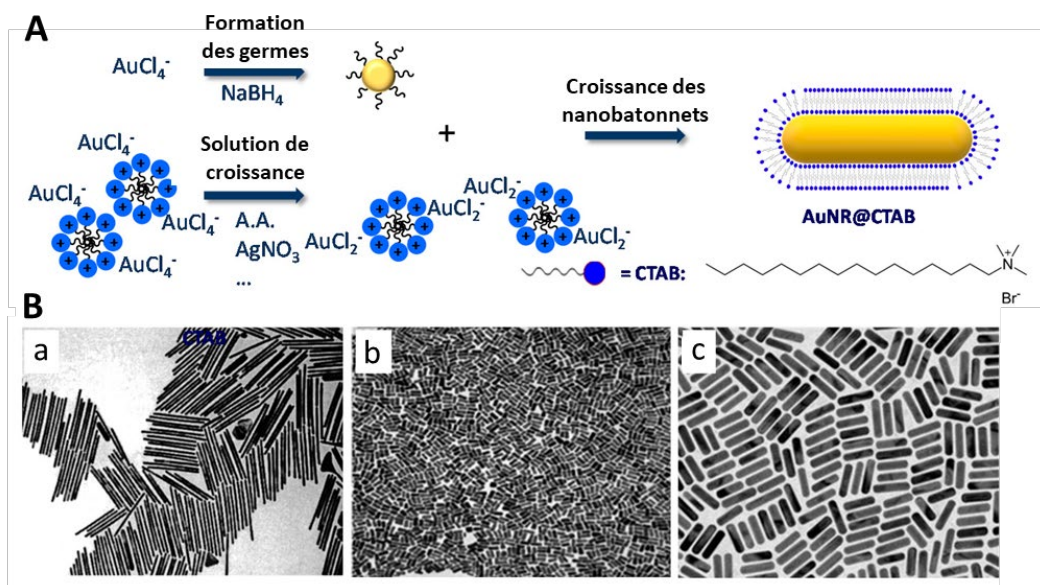


Figure 4 : (A) Représentation schématique de la synthèse de AuNRs par ensemencement en milieu de croissance d'après²⁶. (B) Images MET de AuNRs synthétisés d'après les méthodes de (a) Jana et al.⁴⁰, (b) Sau et al.⁴¹ et (c) Ye et al.⁴².

La méthode réside dans le fait que l'acide ascorbique réduit l' Au(III) en Au(I) mais est trop faible pour réduire Au(I) en Au(0) en absence de germes, ceux-ci agissant comme catalyseur un fois ajoutés. Le CTAB s'adsorbe sur la surface des AuNRs en formant une double couche dense permettant à la fois de diriger la croissance des particules et d'empêcher leur agrégation par répulsion électrostatique⁴³. Cette méthode a pour but d'éviter les étapes de

nucléation non contrôlée lors de la croissance des AuNRs. Cette méthode fait l'objet de nombreux perfectionnements depuis le 1^{er} protocole proposé par Jana et al.⁴⁴ dans le but d'améliorer la monodispersité en taille, la pureté en forme, le rendement de réduction de l'Au(III) ou encore de la mise à l'échelle de la synthèse. Plusieurs facteurs tels que : la température, le pH, la quantité d'acide ascorbique et de nitrate d'argent, la qualité des germes et du tensioactif ou encore la propreté de la verrerie peuvent affecter la composition des produits finaux (polydispersité, impuretés) et doivent être soigneusement contrôlés afin d'obtenir les particules souhaitées⁴⁵. Malgré de nombreuses investigations mécanistiques⁴⁶⁻⁴⁸, la raison sous-jacente à la formation des AuNRs reste discutée, et réussir à reproduire des synthèses à une position de bande LSPR longitudinale donnée est un problème majeur non résolu⁴⁶. Dans la revue parue dans le journal Biosensors en octobre 2020 nous avons discuté de la littérature récente concernant les évolutions de la méthode d'ensemencement en milieu de croissance et des difficultés associées à cette synthèse²⁶. Il apparaît que cette méthode a maintenant atteint un niveau de maturité permettant d'obtenir une homogénéité quasi-parfaite des bâtonnets, comme le montre les images de microscopie électronique à transmission (Figure 4B) de AuNRs, obtenues selon des variantes du protocole d'ensemencement en milieu de croissance proposé par Jana et al.⁴⁰, Sau et al.⁴¹ and Ye et al.⁴².

Plusieurs problèmes influencent et limitent l'application des AuNRs. Le CTAB utilisé en grande quantité lors de la synthèse est connu pour engendrer une importante toxicité cellulaire et interférer avec les processus biologiques⁴⁹. De plus, celui-ci s'adsorbe fortement à la surface des AuNRs, ce qui complique leur chimie de surface et par conséquent le greffage de biorécepteurs, nécessaire au fonctionnement des biocapteurs LSPR ainsi qu'au ciblage de biomarqueurs d'intérêt lors de la mise en place de stratégies thérapeutiques. Plusieurs études rapportent que la toxicité du CTAB est majoritairement causée par la fraction libre en solution⁵⁰. L'excès de CTAB peut être éliminé des AuNRs après synthèse par des cycles répétés de lavage par centrifugation, et élimination du surnageant. La bicouche de CTAB est toujours présente en surface des AuNRs après purification, néanmoins celle-ci peut facilement se désorber de la surface pour pallier le défaut de CTAB en solution, conduisant à l'agrégation irréversible des particules et l'élargissement de la bande LSPR longitudinale. De plus, les AuNRs sont sujets à un remodelage morphologique sous l'effet d'une irradiation laser dans le proche infrarouge pouvant conduire à la perte de leurs propriétés optiques, se traduisant par une faible efficacité photothermique⁵¹. Il est généralement admis qu'un revêtement extérieur est essentiel pour la plupart des applications biomédicales des AuNRs.

4. Méthodes de modifications de surface et d'enrobage par la silice

Diverses modifications de surface ont été développées pour remédier à ces problèmes et reposent principalement sur deux approches : l'échange de ligand et le revêtement de surface. L'échange de ligand se base sur le déplacement des molécules de CTAB en surface par une molécule thiolée possédant une forte affinité pour l'or via la formation de liaisons Au-S stables telles que les chaînes de polyéthylène glycols thiolées, les alcanes thiols ou encore des biomolécules thiolées⁵². Néanmoins, les AuNRs s'agrègent souvent de manière irréversible pendant l'échange de ligands, en raison d'une déstabilisation excessive de la bicouche de CTAB avant que la surface des particules ne soit suffisamment passivée par le ligand à venir⁵². Le revêtement de surface peut se réaliser via l'adsorption électrostatique de polyélectrolytes chargés négativement tels que le polystyrène sulfonate (PSS)⁵³ ou l'acide polyacrylique (PAA)⁵⁴ sur la surface positivement chargée des AuNRs. La méthode dite « couche par couche » (« layer-by-layer », LBL) a également été utilisée car elle permet de conférer à la surface une charge positive ou négative par le dépôt successif de polyélectrolytes chargés négativement (PSS/PAA) et positivement, classiquement avec le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH)⁵⁵. Cette méthode vise à écranter le CTAB en surface des AuNRs afin d'éviter sa désorption. Néanmoins la faible absorption électrostatique des couches de polymères peut entraîner des problèmes de stabilité colloïdale sur le long terme. Le revêtement par la silice est une autre modification de surface qui s'avère bénéfique à bien des égards et qui a été largement utilisé comme matériau pour l'encapsulation des AuNRs. Les AuNRs enrobées par une coquille de silice (AuNR@SiO₂) présentent une stabilité colloïdale accrue en raison des répulsions électrostatiques des groupements silanolates de surface ainsi qu'une meilleure biocompatibilité puisque la silice n'est pas cytotoxique⁵⁶. Enfin, il est possible d'éliminer le CTAB après enrobage par des cycles successifs de purification par centrifugation. Diverses méthodes de synthèse ont permis la formation de nanostructures cœur-coquille tout en exerçant un contrôle sur l'épaisseur et la porosité de la coquille de silice.

Cinq stratégies différentes, sont décrites dans la littérature pour produire ce revêtement : 1) l'échange de ligand entre le CTAB et une molécule fonctionnelle, 2) l'écrantage du CTAB par des polyélectrolytes, 3) le revêtement directement sur la bicouche de CTAB, 4) la microémulsion en phase inverse et 5) la croissance en milieu biphasique. Dans notre revue publiée dans le journal Biosensors, nous avons illustré et discuté en détail des protocoles décrits à ce jour permettant ce revêtement ainsi que les difficultés fréquemment rencontrées lors de ces

synthèses²⁶. Dans la suite de ce manuscrit, les stratégies 1, 2, et 3 plus couramment utilisées sont présentées ainsi que leurs principales limites (Figure 5).

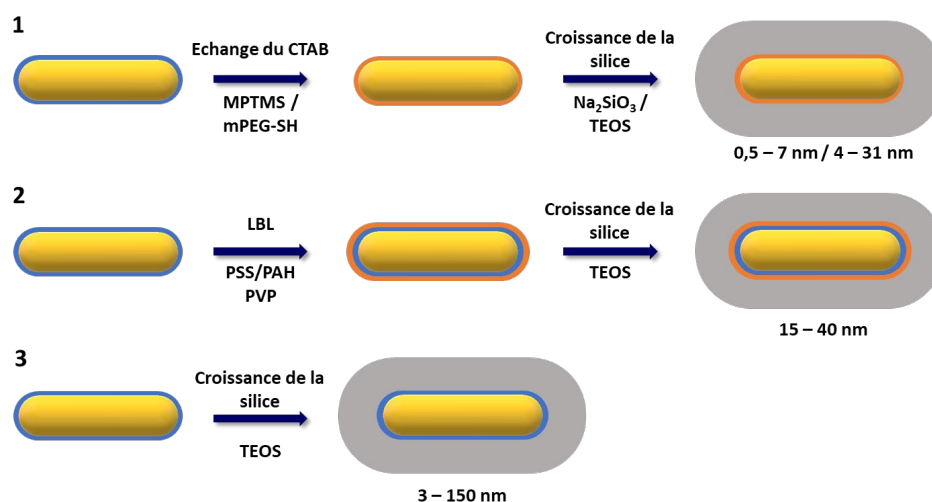


Figure 5 : Principales stratégies existante pour l'enrobage des AuNRs par la silice. (1) échange de ligand entre le CTAB et une molécule fonctionnelle, (2) écrantage du CTAB par des polyélectrolytes (3) revêtement directement sur la bicouche de CTAB. D'après²⁶.

4.1. Echange de ligand entre le CTAB et une molécule fonctionnelle

Brièvement, deux types de ligands thiolés ont été utilisés pour la mise en œuvre de cette stratégie, conduisant à la formation d'une coquille de silice différente en terme d'épaisseur : le MPTMS ((3-mercaptopropyl)triméthoxysilane) et le mPEG-SH ((O-[2-(3-mercaptopropionylamino)éthyl] O'-méthyl-poly(éthylène glycol)). Le MPTMS a été utilisé d'une part : en raison de la forte affinité de la fonction thiol pour la surface de l'or permettant de déplacer le CTAB et d'autre part : la fonction triméthoxysilane crée une surface riche en silanols après hydrolyse, ce qui favorise le dépôt d'une couche de silice par condensation du silicate de sodium en milieu aqueux à pH 10-11⁵⁷. Cette voie permet d'obtenir une coquille de silice fine d'épaisseur modulable entre 0,5 nm et 7 nm en ajustant soit la concentration du silicate de sodium soit le temps de réaction. L'importance d'éliminer le CTAB libre en solution avant la réaction d'encapsulation par la silice a été surlignée au risque d'entraîner la formation de particules de silice non désirée en cours de synthèse. Les micelles de CTAB chargées positivement agissent comme des sites de nucléation pour la formation de nanoparticules de silice n'encapsulant pas de AuNR, par interaction électrostatique avec les monomères de silicate négativement chargés^{58,59}. A notre connaissance, la porosité de ce type de coquille n'a jamais été caractérisée par physisorption de N₂ et est généralement considérée comme non

poreuse⁶⁰. L'inconvénient majeur de cette voie est qu'elle nécessite un temps prolongé de réaction allant de un à six jours pour que la coquille de silice se forme et stabilise les particules. A la manière du MPTMS, la fonction thiol du mPEG-SH permet de déplacer le CTAB tandis que le poly(éthylène)glycol riche en oxygène favorise la formation de la coquille de silice. L'échange de ligand est effectué dans l'eau en présence d'un minimum de CTAB libre (~ 1 mM). Après cette étape, les particules sont lavées pour éliminer les micelles de CTAB et l'excès de réactif, puis sont transférées dans un mélange eau/EtOH pour l'enrobage de silice par hydrolyse et condensation du TEOS (orthosilicate de tétraéthyle) catalysé en milieu basique à pH ≈ 10-11 (méthode Stöber). Après 3h de réaction, les particules résultantes présentent une coquille non poreuse d'épaisseur pouvant être ajustée entre 4 et 31 nm en contrôlant la quantité de TEOS ajoutée⁶¹.

4.2.Ecrantage du CTAB par des polyélectrolytes

La stratégie d'écrantage du CTAB par l'adsorption couche par couche (LBL) de polyélectrolytes chargés décrite précédemment a également été utilisée pour l'enrobage des AuNRs⁶² par la silice. Les AuNRs sont successivement enveloppées par le PSS et le PAH en milieu aqueux, et une dernière couche de polyvinylpyrrolidone (PVP) est ajoutée pour favoriser le transfert des particules en milieu alcoolique et la croissance de la coquille de silice par le procédé Stöber d'hydrolyse et condensation du TEOS en milieu basique. Entre chaque étape de fonctionnalisation, les particules sont lavées pour éliminer l'excès de réactifs ainsi que les micelles de CTAB libres, ce qui conduit à la formation d'une coquille non poreuse. L'épaisseur de la coquille peut être ajustée entre 15 à 40 nm en modulant la quantité de TEOS ajoutée. Cette procédure nécessite de soigneusement contrôler les conditions de réaction telles que la concentration en polyélectrolytes et la force ionique du milieu au risque d'entraîner l'agrégation des particules ou la formation d'une coquille de silice hétérogène. Par ailleurs, celle-ci peut être laborieuse en raison du processus multi-étapes de la synthèse. Alternativement, des AuNRs enrobés d'une coquille de silice d'épaisseur de 2-3 nm ont été obtenues par le dépôt de PVP directement à la surface des AuNRs sans avoir eu besoin de couches intermédiaires de polyélectrolytes⁶³.

4.3.Revêtement direct sur la bicouche de CTAB

La formation d'une coquille de silice directement sur les AuNRs recouverts de CTAB a été décrite la première fois par Gorelikov et Matsuura⁶⁴, il s'agit de la méthode la plus simple

et la plus couramment utilisée. Brièvement, une solution aqueuse de AuNRs recouvert de CTAB est basifiée à $\text{pH} \approx 10-11$, une solution alcoolique de TEOS est ensuite ajoutée (méthode Stöber) et le milieu réactionnel est agité entre un et deux jours. Malgré une procédure apparemment simple, de nombreux paramètres tels que le pH, la concentration en CTAB, alcool, AuNRs et TEOS ont une influence sur l'épaisseur et la morphologie de la coquille de silice. Pour éviter l'agrégation des particules en cours de synthèse, il est important de maintenir une concentration de CTAB autour de sa concentration micellaire critique ($\approx 1 \text{ mM}$) afin de stabiliser les AuNRs par répulsion électrostatique⁶⁴. Les micelles de CTAB en solution conduisent à la formation d'une coquille mésoporeuse faite de pores désordonnés en surface des AuNRs par interaction avec les silicates chargés négativement résultant de l'hydrolyse basique du TEOS. La taille des pores a pu être estimée à 4 nm par MET⁶⁴ et 2,6 nm par physisorption de N_2 ⁶⁵. Dans le même temps, la présence de CTAB libre conduit à la formation de nanoparticules de silice non désirées. Néanmoins, étant petites et légères, celles-ci peuvent être éliminées lors des étapes de purification par centrifugation.

La variation de l'épaisseur de la coquille de silice peut être obtenue de différentes façons : de nombreux auteurs ont mentionné l'augmentation de l'épaisseur de la coquille avec l'augmentation de la concentration en TEOS en solution. Le TEOS peut être ajouté en une seule fois⁶⁶, ou bien être ajouté séquentiellement par petites fractions⁶⁷. Cette dernière a pour but de maintenir la concentration des anions silicate en solution en dessous du seuil de nucléation homogène et éviter la formation de particules de silice indésirables. Une autre possibilité permettant de réduire la formation de nanoparticules de silice est d'ajouter le TEOS en solution à faible débit⁶⁸. Un autre paramètre couramment utilisé pour moduler l'épaisseur du revêtement de silice est la concentration de CTAB. En effet, plusieurs auteurs ont observé qu'à concentration constante de TEOS, l'augmentation de la concentration de CTAB en solution conduit à une coquille de silice plus fine en raison de l'augmentation du nombre de sites de nucléation homogène de nanoparticules de silice^{67,69}. L'épaisseur de la coquille peut également être ajustée en adaptant le temps de réaction. Selon la méthode suivie, l'épaisseur de la coquille varie d'un intervalle de 3 à 150 nm^{68,70}. Les AuNR@SiO₂ préparées via cette stratégie peuvent contenir une quantité importante de CTAB à la surface des AuNRs ainsi qu'au sein des mésopores. Le protocole le plus adapté pour éliminer complètement le CTAB tout en préservant la forme des AuNRs, est, selon Feng et al. une extraction à l'aide d'une solution NH_4NO_3 /méthanol⁷¹.

3.4 Méthodes de caractérisation

Plusieurs techniques sont couramment utilisées pour caractériser les AuNRs et AuNR@SiO₂, d'un point de vue morphologique et structural mais également pour déterminer la composition chimique de la surface. Les principales techniques sont présentées dans le Tableau 1 et pour chacune d'elles sont décrites les informations pouvant être collectées.

Tableau 1 : Techniques (non exhaustives) utilisées pour la caractérisation des AuNRs et AuNR@SiO₂

Technique	Information
Spectroscopie UV-Visible	Signature LSPR : position des maxima d'absorption Polydispersité de l'échantillon : largeur de bande à mi-hauteur Présence d'impuretés de forme : épaulement des bandes d'absorption Quantification [Au(0)] : mesure absorbance à 400 nm
Microscopie électronique en transmission (TEM)	Image de résolution nanométrique : distribution en taille et morphologie des particules, épaisseur et topographie de la coquille de silice
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	Position des pics de diffusion rotationnel et translationnel : stabilité colloïdale, mise en évidence d'étape de fonctionnalisation (éventuellement)
Mobilité électrophorétique (Potentiel zêta)	Charge de surface : mise en évidence d'étape de fonctionnalisation
Spectroscopie de photoélectron X (XPS)	Energie d'émission de photoélectrons : informations structurales ainsi que qualitatives et quantitatives de la composition élémentaire de la surface (profondeur d'analyse ~ 10 nm)
Spectroscopie Raman exaltée de Surface (SERS)	Energie de vibration des liaisons chimiques répondant aux règles de sélection de diffusion Raman : identification des fonctions chimiques à proximité de la surface des particules
Physisorption de N ₂	Isothermes d'adsorption et de désorption : volume poreux, distribution en taille des pores, surface spécifique

5. Vue générale du potentiel des AuNR@SiO₂

Cette morphologie cœur-coquille confère de nouvelles propriétés physico-chimiques aux AuNRs. Il a été démontré que l'encapsulation des AuNRs par une coquille de silice améliore la stabilité photothermique des AuNRs sous irradiation laser en évitant le remodelage du cœur d'or, ce qui permet de préserver ses propriétés optiques⁷². La coquille de silice améliore également l'efficacité de la conversion photothermique et renforce les effets, tels que l'amplitude d'émission photoacoustique⁷³ et l'échauffement des particules⁷⁴. Les AuNR@SiO₂ présentent une surface externe importante pouvant être facilement fonctionnalisée par différents ligands⁷⁵, agents de contraste⁷⁶, biomolécules (e.g. peptides⁷⁷, anticorps⁷⁸, ADN⁷⁹) ou encore polymères sensibles aux stimuli⁸⁰ via l'utilisation de silanes fonctionnels (Figure 6).

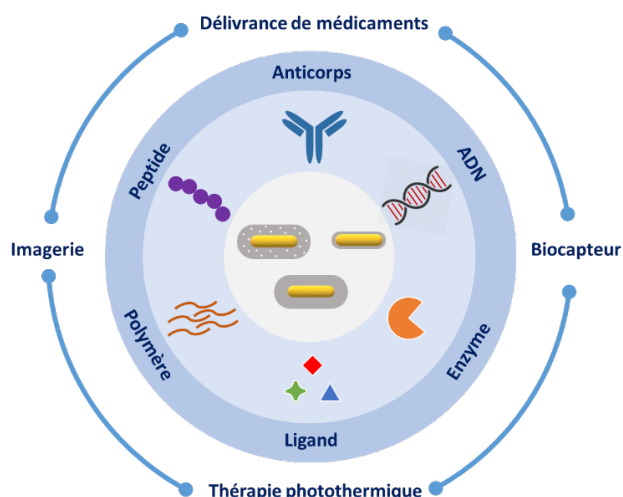


Figure 6 : Illustration schématique des potentielles applications des AuNR@SiO₂ et des différentes modifications de surface possibles.

La nature poreuse de la coquille de silice admet l'encapsulation de molécules d'intérêt thérapeutique, qui permet d'associer les thérapies photothermiques à la chimiothérapie en vue d'une synergie thérapeutique. Les AuNR@SiO₂ ont été énormément développés lorsque des applications thérapeutiques sont envisagées. Ils peuvent agir simultanément comme agents thérapeutiques (chimiothérapie, thérapie photothermique) et comme élément dopant pour l'imagerie biomédicale et cellulaire (e.g. imagerie photoacoustique⁸¹, microscopie en champ sombre et de fluorescence^{82,83}), conduisant au développement de nanosystèmes multifonctionnels⁸⁴.

En ce qui concerne le développement de biocapteurs LSPR, la coquille de silice détermine l'indice de réfraction de l'environnement des AuNRs. Ainsi, le contrôle de l'épaisseur est un paramètre crucial qui affecte la réponse et la sensibilité du capteur. S'il a été démontré qu'une fine coquille de silice (< 5 nm) améliore l'efficacité globale du biocapteur comparé aux AuNRs recouverts de CTAB⁸⁵, seuls deux exemples de biocapteurs LSPR à base de AuNR@SiO₂ sont rapportés dans la littérature^{85,86}. Bien que cet effet apporte un avantage supplémentaire à l'utilisation des AuNR@SiO₂, le contrôle fin de l'épaisseur de la coquille et de sa reproductibilité restent l'un des plus grands défis avant leur expansion pour la biodétection par LSPR.

Références

- (1) Faraday, M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, 147, 145–181. <https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>.
- (2) Thompson, D. Michael Faraday's Recognition of Ruby Gold: The Birth of Modern Nanotechnology. *Gold Bull* **2007**, 40 (4), 267–269. <https://doi.org/10.1007/BF03215598>.
- (3) Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. In *Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology*; Goddard, W. A., Brenner, D., Lyshevski, S. E., Iafrate, G. J., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **2012**; pp 3–12.
- (4) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. The Lycurgus Cup — A Roman Nanotechnology. *Gold Bull* **2007**, 40 (4), 270–277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>.
- (5) Haes, A. J.; Stuart, D. A.; Nie, S.; Van Duyne, R. P. Using Solution-Phase Nanoparticles, Surface-Confined Nanoparticle Arrays and Single Nanoparticles as Biological Sensing Platforms. *Journal of Fluorescence* **2004**, 14 (4), 355–367. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000031817.35049.1f>.
- (6) Wriedt, T. Mie Theory: A Review. In *The Mie Theory: Basics and Applications*; Hergert, W., Wriedt, T., Eds.; Springer Series in Optical Sciences; Springer: Berlin, Heidelberg, **2012**; pp 53–71. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28738-1_2.
- (7) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11 (0), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- (8) Thomas, J. M. Colloidal metals: past, present and future. *Pure and Applied Chemistry* **1988**, 60 (10), 1517–1528. <https://doi.org/10.1351/pac198860101517>.
- (9) Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (1), 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- (10) Pluchery, O.; Carriere, M. Nanoparticules d'or. *Techniques de l'ingénieur Nanomatériaux : propriétés* **2011**, base documentaire : TIB635DUO (ref. article : nm900).
- (11) Jamkhande, P. G.; Ghule, N. W.; Bamer, A. H.; Kalaskar, M. G. Metal Nanoparticles Synthesis: An Overview on Methods of Preparation, Advantages and Disadvantages, and Applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2019**, 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>.
- (12) Fu, X.; Cai, J.; Zhang, X.; Li, W.-D.; Ge, H.; Hu, Y. Top-down Fabrication of Shape-Controlled, Monodisperse Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, 132, 169–187. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.006>.
- (13) Piella, J.; Bastús, N. G.; Puntès, V. Size-Controlled Synthesis of Sub-10-Nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. *Chem. Mater.* **2016**, 28 (4), 1066–1075. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b04406>.

- (14) Ye, X.; Gao, Y.; Chen, J.; Reifsnnyder, D. C.; Zheng, C.; Murray, C. B. Seeded Growth of Monodisperse Gold Nanorods Using Bromide-Free Surfactant Mixtures. *Nano Letters* **2013**, *13* (5), 2163–2171. <https://doi.org/10.1021/nl400653s>.
- (15) Kumar, P. S.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Abajo, F. J. G. de; Liz-Marzán, L. M. High-Yield Synthesis and Optical Response of Gold Nanostars. *Nanotechnology* **2007**, *19* (1), 015606. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/01/015606>.
- (16) Fang, C.; Zhao, G.; Xiao, Y.; Zhao, J.; Zhang, Z.; Geng, B. Facile Growth of High-Yield Gold Nanobipyramids Induced by Chloroplatinic Acid for High Refractive Index Sensing Properties. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 36706. <https://doi.org/10.1038/srep36706>.
- (17) Park, J.-E.; Lee, Y.; Nam, J.-M. Precisely Shaped, Uniformly Formed Gold Nanocubes with Ultrahigh Reproducibility in Single-Particle Scattering and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nano Lett.* **2018**, *18* (10), 6475–6482. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02973>.
- (18) Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzán, L. M. Monodisperse Gold Nanotriangles: Size Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2014**, *8* (6), 5833–5842. <https://doi.org/10.1021/nn500727w>.
- (19) Daruich De Souza, C.; Ribeiro Nogueira, B.; Rostelato, M. E. C. M. Review of the Methodologies Used in the Synthesis Gold Nanoparticles by Chemical Reduction. *Journal of Alloys and Compounds* **2019**, *798*, 714–740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>.
- (20) Gratton, S. E. A.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. The Effect of Particle Design on Cellular Internalization Pathways. *PNAS* **2008**, *105* (33), 11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>.
- (21) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209–217. <https://doi.org/10.1039/B514191E>.
- (22) Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A. Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (16), 3073–3077. <https://doi.org/10.1021/jp990183f>.
- (23) Brioude, A.; Jiang, X. C.; Pileni, M. P. Optical Properties of Gold Nanorods: DDA Simulations Supported by Experiments. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (27), 13138–13142. <https://doi.org/10.1021/jp0507288>.
- (24) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Determination of the Aspect Ratio Statistical Distribution of Gold Nanorods in Solution from a Theoretical Fit of the Observed Inhomogeneously Broadened Longitudinal Plasmon Resonance Absorption Spectrum. *Journal of Applied Physics* **2006**, *100* (4), 044324. <https://doi.org/10.1063/1.2244520>.
- (25) Jaque, D.; Maestro, L. M.; Rosal, B. del; Haro-Gonzalez, P.; Benayas, A.; Plaza, J. L.; Rodríguez, E. M.; Solé, J. G. Nanoparticles for Photothermal Therapies. *Nanoscale* **2014**, *6* (16), 9494–9530. <https://doi.org/10.1039/C4NR00708E>.

- (26) Pellas, V.; Hu, D.; Mazouzi, Y.; Mimoun, Y.; Blanchard, J.; Guibert, C.; Salmain, M.; Boujday, S. Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications. *Biosensors* **2020**, *10* (10), 146. <https://doi.org/10.3390/bios10100146>.
- (27) Al-Sherbini, A.-S. A.-M. Thermal Instability of Gold Nanorods in Micellar Solution of Water/Glycerol Mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *246* (1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.06.038>.
- (28) Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Carnie, S.; Chan, D. Y. C.; Mulvaney, P. Electric-Field-Directed Growth of Gold Nanorods in Aqueous Surfactant Solutions. *Advanced Functional Materials* **2004**, *14* (6), 571–579. <https://doi.org/10.1002/adfm.200305068>.
- (29) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740–2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>.
- (30) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2009**, *21* (48), 4880–4910. <https://doi.org/10.1002/adma.200802789>.
- (31) Mantri, Y.; Jokerst, J. V. Engineering Plasmonic Nanoparticles for Enhanced Photoacoustic Imaging. *ACS Nano* **2020**, *14* (8), 9408–9422. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c05215>.
- (32) Vines, J. B.; Yoon, J.-H.; Ryu, N.-E.; Lim, D.-J.; Park, H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>.
- (33) Tong, L.; Wei, Q.; Wei, A.; Cheng, J.-X. Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects†. *Photochemistry and Photobiology* **2009**, *85* (1), 21–32. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00507.x>.
- (34) 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>.
- (35) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (14), 7238–7248. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.
- (36) Park, K.; Biswas, S.; Kanel, S.; Nepal, D.; Vaia, R. A. Engineering the Optical Properties of Gold Nanorods: Independent Tuning of Surface Plasmon Energy, Extinction Coefficient, and Scattering Cross Section. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (11), 5918–5926. <https://doi.org/10.1021/jp5013279>.

- (37) Tian, L.; Chen, E.; Gandra, N.; Abbas, A.; Singamaneni, S. Gold Nanorods as Plasmonic Nanotransducers: Distance-Dependent Refractive Index Sensitivity. *Langmuir* **2012**, *28* (50), 17435–17442. <https://doi.org/10.1021/la3034534>.
- (38) Nusz, G. J.; Curry, A. C.; Marinakos, S. M.; Wax, A.; Chilkoti, A. Rational Selection of Gold Nanorod Geometry for Label-Free Plasmonic Biosensors. *ACS Nano* **2009**, *3* (4), 795–806. <https://doi.org/10.1021/nn8006465>.
- (39) Perezjuste, J.; Pastorizasantos, I.; Lizmarzan, L.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2005**, *249* (17–18), 1870–1901. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.030>.
- (40) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (19), 4065–4067. <https://doi.org/10.1021/jp0107964>.
- (41) Sau, T. K.; Murphy, C. J. Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution. *Langmuir* **2004**, *20* (15), 6414–6420. <https://doi.org/10.1021/la049463z>.
- (42) Ye, X.; Zheng, C.; Chen, J.; Gao, Y.; Murray, C. B. Using Binary Surfactant Mixtures To Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods. *Nano Letters* **2013**, *13* (2), 765–771. <https://doi.org/10.1021/nl304478h>.
- (43) da Silva, J. A.; Netz, P. A.; Meneghetti, M. R. Growth Mechanism of Gold Nanorods: The Effect of Tip–Surface Curvature As Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2020**, *36* (1), 257–263. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03235>.
- (44) Jana, N. R.; 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**, *13* (18), 1389–1393. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200109\)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F).
- (45) Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6* (21), 4270–4279. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b02123>.
- (46) Burrows, N. D.; Harvey, S.; Idesis, F. A.; Murphy, C. J. Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments. *Langmuir* **2017**, *33* (8), 1891–1907. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03606>.
- (47) Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. *Chemistry of Materials* **2013**, *25* (8), 1250–1261. <https://doi.org/10.1021/cm303708p>.
- (48) Lohse, S. E.; Burrows, N. D.; Scarabelli, L.; Liz-Marzán, L. M.; Murphy, C. J. Anisotropic Noble Metal Nanocrystal Growth: The Role of Halides. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 34–43. <https://doi.org/10.1021/cm402384j>.

- (49) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1* (3), 325–327. <https://doi.org/10.1002/sml.200400093>.
- (50) Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708. <https://doi.org/10.1002/sml.200801546>.
- (51) Link, S.; Burda, C.; Mohamed, M. B.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Laser Photothermal Melting and Fragmentation of Gold Nanorods: Energy and Laser Pulse-Width Dependence. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103* (9), 1165–1170. <https://doi.org/10.1021/jp983141k>.
- (52) Indrasekara, A. S. D. S.; Wadams, R. C.; Fabris, L. Ligand Exchange on Gold Nanorods: Going Back to the Future. *Particle & Particle Systems Characterization* **2014**, *31* (8), 819–838. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400006>.
- (53) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2115–2120. <https://doi.org/10.1021/ja057254a>.
- (54) Kirui, D. K.; Krishnan, S.; Strickland, A. D.; Batt, C. A. PAA-Derived Gold Nanorods for Cellular Targeting and Photothermal Therapy. *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11* (6), 779–788. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100050>.
- (55) Gole, A.; Murphy, C. J. Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Immobilization. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (6), 1325–1330. <https://doi.org/10.1021/cm048297d>.
- (56) Li, Z.; Zhang, Y.; Feng, N. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Classification, Drug Loading, Pharmacokinetics, Biocompatibility, and Application in Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2019**, *16* (3), 219–237. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575806>.
- (57) Obare, S. O.; Jana, N. R.; Murphy, C. J. Preparation of Polystyrene- and Silica-Coated Gold Nanorods and Their Use as Templates for the Synthesis of Hollow Nanotubes. *Nano Lett.* **2001**, *1* (11), 601–603. <https://doi.org/10.1021/nl0156134>.
- (58) Pérez-Juste, J.; Correa-Duarte, M. A.; Liz-Marzán, L. M. Silica Gels with Tailored, Gold Nanorod-Driven Optical Functionalities. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *226* (1–3), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2003.11.013>.
- (59) Li, C.; Li, Y.; Ling, Y.; Lai, Y.; Wu, C.; Zhao, Y. Exploration of the Growth Process of Ultrathin Silica Shells on the Surface of Gold Nanorods by the Localized Surface Plasmon Resonance. *Nanotechnol.* **2014**, *25* (4), 045704. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/4/045704>.
- (60) Li, J. F.; Tian, X. D.; Li, S. B.; Anema, J. R.; Yang, Z. L.; Ding, Y.; Wu, Y. F.; Zeng, Y. M.; Chen, Q. Z.; Ren, B. Surface Analysis Using Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nat. Prot.* **2013**, *8* (1), 52. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.141>

- (61) Fernández-López, C.; Mateo-Mateo, C.; Álvarez-Puebla, R. A.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Highly Controlled Silica Coating of PEG-Capped Metal Nanoparticles and Preparation of SERS-Encoded Particles. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13894–13899. <https://doi.org/10.1021/la9016454>.
- (62) Graf, C.; Vossen, D. L. J.; Imhof, A.; van Blaaderen, A. A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica. *Langmuir* **2003**, *19* (17), 6693–6700. <https://doi.org/10.1021/la0347859>.
- (63) Nallathamby, P. D.; Hopf, J.; Irimata, L. E.; McGinnity, T. L.; Roeder, R. K. Preparation of Fluorescent Au–SiO₂ Core–Shell Nanoparticles and Nanorods with Tunable Silica Shell Thickness and Surface Modification for Immunotargeting. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (32), 5418–5428. <https://doi.org/10.1039/C6TB01659F>.
- (64) Gorelikov, I.; Matsuura, N. Single-Step Coating of Mesoporous Silica on Cetyltrimethyl Ammonium Bromide-Capped Nanoparticles. *Nano Lett.* **2008**, *8* (1), 369–373. <https://doi.org/10.1021/nl0727415>.
- (65) Liu, J.; Kan, C.; Cong, B.; Xu, H.; Ni, Y.; Li, Y.; Shi, D. Plasmonic Property and Stability of Core-Shell Au@SiO₂ Nanostructures. *Plasmonics* **2014**, *9* (5), 1007–1014. <https://doi.org/10.1007/s11468-014-9708-1>.
- (66) Zhang, R.; Zhou, Y.; Peng, L.; Li, X.; Chen, S.; Feng, X.; Guan, Y.; Huang, W. Influence of SiO₂ Shell Thickness on Power Conversion Efficiency in Plasmonic Polymer Solar Cells with Au Nanorod@SiO₂ Core-Shell Structures. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep25036>.
- (67) Yoon, S.; Lee, B.; Kim, C.; Lee, J. H. Controlled Heterogeneous Nucleation for Synthesis of Uniform Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with Tailorable Rotational Diffusion and 1 Nm-Scale Size Tunability. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (8), 4731–4736. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00724>.
- (68) Wu, W.-C.; Tracy, J. B. Large-Scale Silica Overcoating of Gold Nanorods with Tunable Shell Thicknesses. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (8), 2888–2894. <https://doi.org/10.1021/cm504764v>.
- (69) Abadeer, N. S.; Brennan, M. R.; Wilson, W. L.; Murphy, C. J. Distance and Plasmon Wavelength Dependent Fluorescence of Molecules Bound to Silica-Coated Gold Nanorods. *ACS Nano* **2014**, *8* (8), 8392–8406. <https://doi.org/10.1021/nn502887j>.
- (70) Cong, H.; Toftegaard, R.; Arnbjerg, J.; Ogilby, P. R. Silica-Coated Gold Nanorods with a Gold Overcoat: Controlling Optical Properties by Controlling the Dimensions of a Gold–Silica–Gold Layered Nanoparticle. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4188–4195. <https://doi.org/10.1021/la9032223>.
- (71) Feng, J.; Wang, Z.; Shen, B.; Zhang, L.; Yang, X.; He, N. Effects of Template Removal on Both Morphology of Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorod and Its Biomedical Application. *RSC Adv.* **2014**, *4* (54), 28683–28690. <https://doi.org/10.1039/C4RA03122A>.
- (72) Chen, Y.-S.; Frey, W.; Kim, S.; Homan, K.; Kruizinga, P.; Sokolov, K.; Emelianov, S. Enhanced Thermal Stability of Silica-Coated Gold Nanorods for Photoacoustic Imaging and

Image-Guided Therapy. *Opt. Express, OE* **2010**, *18* (9), 8867–8878. <https://doi.org/10.1364/OE.18.008867>.

(73) Chen, Y.-S.; Frey, W.; Kim, S.; Kruijzinga, P.; Homan, K.; Emelianov, S. Silica-Coated Gold Nanorods as Photoacoustic Signal Nanoamplifiers. *Nano Lett.* **2011**, *11* (2), 348–354. <https://doi.org/10.1021/nl1042006>.

(74) Hu, J.-J.; Cheng, Y.-J.; Zhang, X.-Z. Recent Advances in Nanomaterials for Enhanced Photothermal Therapy of Tumors. *Nanoscale* **2018**, *10* (48), 22657–22672. <https://doi.org/10.1039/C8NR07627H>.

(75) Renner, A. M.; Ilyas, S.; Schlößer, H. A.; Szymura, A.; Roitsch, S.; Wennhold, K.; Mathur, S. Receptor-Mediated In Vivo Targeting of Breast Cancer Cells with 17 α -Ethinylestradiol-Conjugated Silica-Coated Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2020**, *36* (48), 14819–14828. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02820>.

(76) Duan, Q.; Yang, M.; Zhang, B.; Li, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Wang, J.; Zhang, W.; Sang, S. Gold Nanoclusters Modified Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods: Enhanced Photothermal Properties and Fluorescence Imaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2021**, *215*, 112111. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112111>.

(77) Li, C.; Feng, K.; Xie, N.; Zhao, W.; Ye, L.; Chen, B.; Tung, C.-H.; Wu, L.-Z. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with Designable Anchor Peptides for Chemo-Photothermal Cancer Therapy. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3* (6), 5070–5078. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c00311>.

(78) Xiao, Q.; Lu, Y.; Chen, M.; Chen, B.; Yang, Y.; Cui, D.; Pan, B.; Xu, N. Antibody-Conjugated Silica-Modified Gold Nanorods for the Diagnosis and Photo-Thermal Therapy of *Cryptococcus Neoformans*: An Experiment In Vitro. *Nanoscale Research Letters* **2018**, *13* (1), 77. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2487-4>.

(79) Sendroiu, I. E.; Warner, M. E.; Corn, R. M. Fabrication of Silica-Coated Gold Nanorods Functionalized with DNA for Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensing Applications. *Langmuir* **2009**, *25* (19), 11282–11284. <https://doi.org/10.1021/la902675s>.

(80) Gong, B.; Shen, Y.; Li, H.; Li, X.; Huan, X.; Zhou, J.; Chen, Y.; Wu, J.; Li, W. Thermo-Responsive Polymer Encapsulated Gold Nanorods for Single Continuous Wave Laser-Induced Photodynamic/Photothermal Tumour Therapy. *Journal of Nanobiotechnology* **2021**, *19* (1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00754-8>.

(81) Bayer, C. L.; Chen, Y.-S.; Kim, S.; Mallidi, S.; Sokolov, K.; Emelianov, S. Multiplex Photoacoustic Molecular Imaging Using Targeted Silica-Coated Gold Nanorods. *Biomed. Opt. Express, BOE* **2011**, *2* (7), 1828–1835. <https://doi.org/10.1364/BOE.2.001828>.

(82) Wu, Q.; Chen, L.; Huang, L.; Wang, J.; Liu, J.; Hu, C.; Han, H. Quantum Dots Decorated Gold Nanorod as Fluorescent-Plasmonic Dual-Modal Contrasts Agent for Cancer Imaging. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *74*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.010>.

(83) Han, H.-W.; Joe, A.; Jang, E.-S. Reduced Cytotoxicity of CTAB-Templated Silica Layer on Gold Nanorod Using Fluorescence Dyes and Its Application in Cancer Theranostics.

Journal of Industrial and Engineering Chemistry **2021**, *96*, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.01.020>.

(84) Rodrigues, C. F.; Jacinto, T. A.; Moreira, A. F.; Costa, E. C.; Miguel, S. P.; Correia, I. J. Functionalization of AuMSS Nanorods towards More Effective Cancer Therapies. *Nano Res.* **2019**, *12* (4), 719–732. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2286-y>.

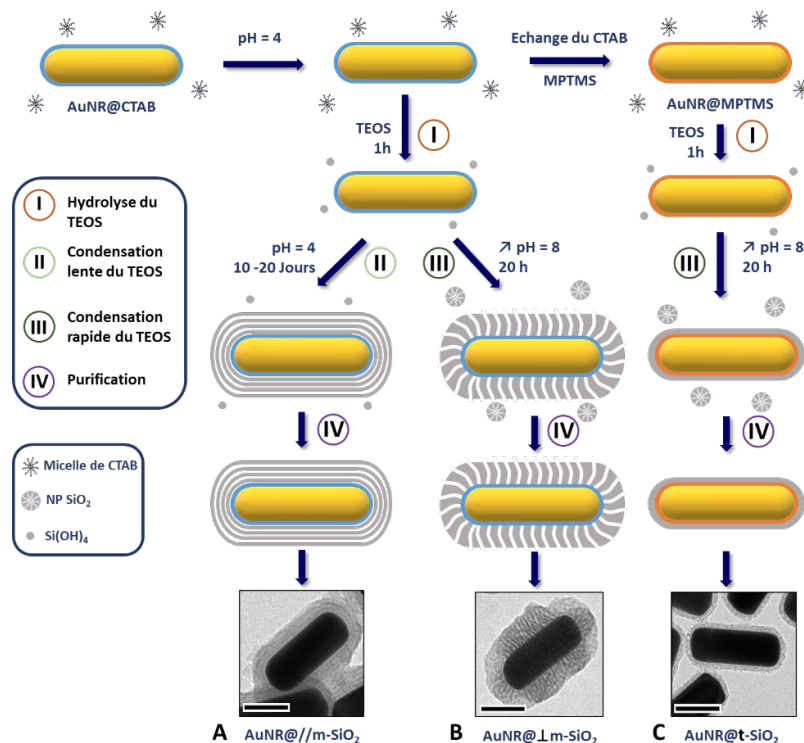
(85) Song, L.; Zhang, L.; Huang, Y.; Chen, L.; Zhang, G.; Shen, Z.; Zhang, J.; Xiao, Z.; Chen, T. Amplifying the Signal of Localized Surface Plasmon Resonance Sensing for the Sensitive Detection of Escherichia Coli O157:H7. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 3288. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03495-1>.

(86) Wang, C.; Ma, Z.; Wang, T.; Su, Z. Synthesis, Assembly, and Biofunctionalization of Silica-Coated Gold Nanorods for Colorimetric Biosensing. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16* (13), 1673–1678. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500898>.

**Chapitre II : Synthèse et optimisation de
protocoles d'enrobage des AuNRs par une
coquille de silice**

1. Résumé

Ce chapitre traite de l'optimisation de protocoles de synthèse pour l'enrobage des AuNRs par une coquille de silice. Le travail réalisé est présenté sous la forme d'un article soumis au journal scientifique *Chemistry of Materials*. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les protocoles décrits dans la littérature se basent sur le processus Stöber d'hydrolyse et de condensation du TEOS nécessitent des conditions strictement basiques (pH = 10 - 11). A pH élevé, les réactions d'hydrolyse et de condensation ont lieu simultanément avec une cinétique rapide. Cependant, en ajustant le pH, il est possible de séparer ces deux réactions et d'obtenir un meilleur contrôle sur la croissance de la coquille de silice autour des AuNRs. Notre approche repose sur la modulation du pH au sein du milieu réactionnel : à pH acide (pH = 4), la cinétique de la réaction de condensation du TEOS est lente, alors qu'elle est rapide dans des conditions basiques (pH = 8). Trois protocoles (notés A, B et C) ont été optimisés conduisant à la production d'AuNR@SiO₂ avec une coquille de silice épaisse, modulable entre 13 - 21 nm et dont la porosité est orientée soit parallèlement (AuNR@//m-SiO₂, protocole A), soit perpendiculairement (AuNR@⊥m-SiO₂, protocole B) à la surface des AuNRs selon les conditions de pH. Cette approche a également permis de synthétiser des coquilles de silice ultrafines comprises entre 2 et 5 nm (AuNR@t-SiO₂, protocole C) en utilisant le MPTMS comme amorce de surface avant la condensation du TEOS.



Différentes concentrations de TEOS ont été étudiées afin de contrôler l'épaisseur de la coquille de silice et l'analyse approfondie par MET des solutions colloïdales y compris avant l'étape de purification, a permis de mieux comprendre le processus de revêtement et sa dépendance au pH. A pH 8 et en présence d'un large excès de TEOS, la nucléation de la silice s'est produite non seulement à la surface des AuNRs mais aussi de manière homogène, conduisant à la formation de petites (<10 nm) nanoparticules de silice (NP SiO₂). Inversement, à pH 4 et pour une concentration de TEOS identique, la nucléation homogène de la silice est assez retardée pour empêcher la formation de NP SiO₂. Le maintien d'une concentration de CTAB suffisamment élevée (1,6 mM) est primordiale pour stabiliser par répulsion électrostatique les AuNR@SiO₂ et NP SiO₂ formées lors de la synthèse. Ces dernières étant peu denses, il est possible de les éliminer par centrifugation différentielle lors d'une étape de purification. La caractérisation par SERS et XPS des AuNR@SiO₂ obtenues après purification a mis en évidence l'élimination quasi complète du CTAB cytotoxique présent à la surface des particules ainsi qu'au sein de la porosité. Les techniques de caractérisation usuelles aux colloïdes plasmoniques telles que la spectroscopie UV visible, la zêtamétrie et la DLS ont été utilisées afin de confirmer la stabilité colloïdale des particules obtenues. D'une part, l'obtention par spectroscopie UV-visible de spectres d'absorption bien définis démontre une conservation des propriétés optiques du cœur d'or après enrobage. D'autre part, une charge de surface d'environ - 30 mV mesurée de zêtamétrie révèle la présence de groupements silanolates de surface qui garantissent la stabilité colloïdale des particules par répulsion électrostatique. Enfin, l'absence de particules agrégées est confirmée par des mesures de DLS.

L'ensemble de ce travail a permis d'établir une nouvelle méthode de synthèse pour l'enrobage des AuNRs par une coquille de silice d'épaisseur contrôlable via l'ajustement de la concentration en précurseur de silice et de l'utilisation de MPTMS comme amorce avant la condensation du TEOS. Nous avons montré qu'il est également possible de contrôler l'orientation de la porosité au sein de coquille, perpendiculairement ou parallèlement par rapport à la surface en ajustant le pH du milieu réactionnel. Le contrôle de l'orientation de la porosité au sein de la coquille pourrait s'avérer intéressant quant au relargage de molécules d'intérêt lors de l'élaboration de stratégies thérapeutiques et l'élimination du CTAB lors du lavage facilitera l'utilisation de ces particules en milieu biologique. Enfin, la formation d'une fine coquille offre un potentiel prometteur pour le développement de biocapteurs LSPR.

2. Article

pH-modulated Protocols for Silica Growth on Gold Nanorods with Controlled Thickness and Oriented Porosity

Vincent Pellas^{1,2}, Juliette Blanchard¹, Clément Guibert¹, Jean-Marc Krafft¹, Michèle
Salmain², Souhir Boujday¹

¹ Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.

² Sorbonne Université, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 4 place Jussieu F-75005 Paris, France.

KEYWORDS: Gold nanorods, silica coating, core-shell, porosity.

ABSTRACT:

The coating of gold nanorods with a silica shell (AuNR@SiO₂) is an effective way to extend their use in a wide variety of applications. A silica shell offers indeed numerous advantages as it provides more stability, frees the surface from toxic cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and preserves the rod shape under photothermal conditions. We introduce herein a new approach to perform this coating based on dissociation of tetraethylorthosilicate (TEOS) hydrolysis and condensation reactions. This dissociation is achieved by a pH modulation of the reaction medium, and, depending on selected pH conditions, we obtained AuNR@SiO₂ with thick silica shell having an organized mesoporosity aligned either parallel (AuNR@//m-SiO₂) or perpendicular (AuNR@⊥m-SiO₂) to the AuNR surface. Moreover, when MPTMS is used as a surface primer prior to TEOS condensation, ultrathin and homogeneous silica shells (AuNR@t-SiO₂) of controllable thickness in the range 2-6 nm, are produced. We also established the robustness of these protocols for addition of excess of TEOS: while formation of core-free SiO₂ nanoparticles at high TEOS concentration is evidenced by TEM analysis before the purification procedure, their total elimination during the purification step is made possible by the addition of a suitable amount of CTAB to ensure the colloidal stability of the core-free and core-shell nanoparticles. Complete elimination of CTAB is demonstrated by SERS spectroscopy when ligand exchange of CTAB by MPTMS is first carried out.

INTRODUCTION

Gold nanorods (AuNRs) are now, and over several decades, established as central items for biological applications. Their ability to absorb light upon irradiation originates from the collective oscillation of electrons in the conduction band of the gold surface; it results in two localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) bands called the transversal and longitudinal bands (t-LSPR and l-LSPR) they correspond to the resonance along the short and long axes of the particle, respectively.^{1,2} The position of l-LSPR band can be finely tuned from 600 and up to 1800 nm by controlling the particle aspect ratio.³ This versatility is of high interest for biomedical applications such as photothermal therapy because of the minimal absorption of blood and human tissues in this region.⁴ Moreover, the position of l-LSPR band displays a higher sensitivity to the variation of the local dielectric environment compared to the LSPR band of spherical nanoparticles, making AuNRs of particular interest for the development of LSPR biosensors.^{5,6} The extensive development of synthetic protocols enables the preparation of particles with desired and controlled properties, mainly using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as surfactant, surface stabilizer, and shape inducing agent.⁷ However, the cytotoxicity of CTAB and its interferences with biological processes, restrict the biomedical applications of AuNRs.⁸⁻¹⁰ Besides the damaging effect of CTAB, AuNRs are not stable under irradiation and reshape into spherical nanoparticles¹¹. To overcome these limitations, the growth of a silica shell on AuNRs, also referred as silica coating, is the most promising route and has expanded tremendously over the last decade as it allows to eliminate or screen CTAB while preserving AuNRs' shape and therefore, their optical properties. Few materials are as universal and versatile as silica in terms of porosity, thickness and surface modification.¹² Silica coating of AuNRs to generate core-shell particles (AuNR@SiO₂) has proven to: reduce aggregation and toxicity,^{13,14} enhance the thermal stability,^{15,16} and provide a convenient surface for subsequent functionalization.^{6,17,18}

Depending on the desired application, the specifications for the silica shell can be radically different. Indeed, the growth, on AuNRs, of a thick mesoporous porous shell (AuNR@m-SiO₂) is preferred for drug delivery applications as it enables drug encapsulation within the pores and its release through light irradiation of the gold core.¹⁹ On the other hand, for applications such as LSPR biosensing, the proximity of the bioreceptor to the gold core is mandatory,^{20,21} therefore a thin homogeneous layer is required to maintain the transducing abilities of AuNR@SiO₂.⁶

Over the last decades, several methods were reported for AuNRs coating with silica. The Stöber process, initially used to synthesize monodisperse silica spheres *via* a base-catalyzed hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate (TEOS), provides the basis for silica coating on inorganic nanoparticles.²² Gorelikov and Matsuura were the first to adapt this procedure to directly coat CTAB-stabilized AuNRs with a mesoporous silica shell.²³ Since then, numerous articles have been published on the coating of AuNRs with silica either directly,^{24–28} or using a surface primer such as 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS),²⁹ 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTMS),^{30–32} O-[2-(3-Mercaptopropionylamino)ethyl]-O'-methylpolyethylene glycol (mPEG-SH)³³ or polyelectrolyte layers³⁴ prior to silica shell formation. We have recently surveyed the variety of synthetic methods that have been developed to encapsulate AuNRs with silica shell and discussed the multiple issues left to overcome for this achievement. Among other issues, it is still needed to further improve the coating protocols to allow for: mastering the shell homogeneity, precisely predicting its thickness, controlling its porosity, and avoiding the homogeneous nucleation of silica spheres.⁶ We have therefore undertaken to set up simple and robust methods to coat AuNRs with silica, as part of our endeavors to develop LSPR biosensors.

In what follows, we report new protocols allowing for controlling both pore organization and shell thickness of silica-coated gold nanorods (AuNR@SiO₂) based on a pH modulation of the reaction medium during the coating step. Our approach relies on the fact that the pH of the reaction medium determines the rates of the two sol-gel reactions responsible for deposition of SiO₂: TEOS hydrolysis and condensation. In acidic conditions, the kinetics of TEOS condensation reaction is slow, while it is fast under basic conditions.³⁵ We show here the impact of a kinetically-controlled condensation of silica on shell formation and on pores organization. Different Au/TEOS ratios were investigated and the in-depth analysis at each elemental step, including before purification, allowed us to analyze the coating process and master its dependency to the pH. This approach was applied to the production of AuNR@SiO₂ with controlled thicknesses and porosities. In the protocols developed herein, mesoporous silica shells, with a thickness tunable in the range 13 to 21 nm can be achieved, and, depending on the pH conditions, we can direct the orientation of the silica porosity to be either perpendicular to the AuNRs surface (AuNR@⊥m-SiO₂) or, for the first time, to the best of our knowledge, parallel to the surface (AuNR@//m-SiO₂). With the same approach we also synthesized ultrathin silica shells (AuNR@t-SiO₂) of tunable thickness in the range 2 to 6 nm, using MPTMS as a surface primer prior to TEOS condensation. The mechanisms of silica growth are

well-discussed here relying on a very large set of characterization techniques and allow us to precisely discuss several aspects among which the fate of CTAB and homogeneous nucleation of silica nanoparticles. We believe that through the protocols optimized in this work, the specification sheet for the silica shell can be fulfilled whatever the intended application of the final AuNR@SiO₂ materials.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials: Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\geq 99.99\%$; HAuCl₄·3H₂O) was purchased from Alfa Aesar. Sodium borohydride (98%; NaBH₄), Sodium hydroxide (NaOH), Cetyltrimethylammonium bromide (BioUltra $\geq 99.0\%$; CTAB), (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (95%; MPTMS), Tetraethyl orthosilicate ($\geq 99.0\%$; TEOS) were purchased from Sigma-Aldrich. Silver nitrate ($\geq 99\%$; AgNO₃), Ascorbic acid ($\geq 99.0\%$) were purchased from Honeywell, Fluka. Sodium oleate ($\geq 97.0\%$; NaOL) was purchased from TCI Chemicals. Hydrochloric acid (37%; HCl) was purchased from VWR chemicals. Millipore ultrapure water (18.2 M Ω cm) was used throughout the experiments.

Gold nanorods synthesis: AuNRs were synthesized following a seed-mediated growth method using a binary surfactant system.³⁶ Briefly, the seed solution was prepared by mixing 5 mL of 0.50 mM HAuCl₄·3H₂O with 5 mL of 0.2 M CTAB aqueous solutions. Then, 0.6 mL of freshly prepared ice cold 10 mM NaBH₄ solution was diluted to 1.0 mL with water and then injected to the Au^{III} – CTAB solution under vigorous stirring (1000 rpm) for 2 min to form the gold seeds. The seed solution was matured at 30 °C for 30 min before use. The growth solution was then prepared by dissolving 9 g of CTAB (~ 47 mM) and 1.234 g of NaOL (~16 mM) in 250 mL of water at 50 °C. This solution was allowed to cool down to 30 °C and then 18 mL of a 4 mM AgNO₃ solution were added and the resulting solution was kept without stirring for 15 min at 30 °C. Then, 250 mL of 1 mM pre-heated (30 °C) HAuCl₄·3H₂O aqueous solution was introduced into the above solution and allowed to react for 90 min at 700 rpm leading to a color change from dark yellow to colorless. Next, 1.5 mL of HCl 37 wt % was added to lower the pH to 1.5 and stirring was maintained at 400 rpm for another 15 min. 1.25 mL of a 64 mM ascorbic acid aqueous solution was added afterwards, and the solution was briefly stirred for 30 s. Finally, 50 μ L of the seed suspension were injected under vigorous stirring (1000 rpm) in 30 s to initiate the growth. The resulting suspension was then aged undisturbed overnight (12 h) at 30 °C. It was centrifuged the next day at 5600 rcf (relative centrifugal force) for 20 min to remove the excess reactants and the obtained AuNRs were collected and redispersed by

sonication in water. CTAB concentration and temperature are critical parameters to prevent AuNRs from aggregating, therefore AuNRs were transferred directly after centrifugation at 30 °C in 20 mL of pure water; a CTAB concentration of ca. 10 mM can be estimated for this solution, corresponding to a dilution of the fraction of growth solution remaining with the AuNRs after centrifugation with the 20 mL of pure water. Two syntheses of AuNRs have been carried out for this study (20 mL per batch). As previously reported,³⁷ the AuNRs from these two batches differ slightly, although the exact same protocol has been followed for these two syntheses, (Synthesis 1: $L \times l = 113 \times 42$ nm, AR = 2.7; synthesis 2: $L \times l = 102 \times 40$ nm, AR = 2.7, see Figure S 1 in SI for TEM and UV-Vis absorption spectra and Figure S 2 for morphological distribution, DLS and zeta potential). Extended description regarding the synthesis and characterization of the obtained AuNRs is provided in SI.

The yield of gold salt reduction to metallic gold was estimated to ca. 65 % by monitoring the absorbance intensity of AuNRs “raw” solutions at 400 nm (see the part of the experimental section dealing with the analysis of the UV-Vis spectra). Hence, metallic gold concentration was evaluated to $[Au^0] = 8.13$ mM. Based on this concentration in reduced gold and assuming that no AuNRs were lost during the centrifugation steps, it is possible to estimate the molar concentration of AuNRs using a rough estimation of the mean volume of a particle (considered as a cylinder ended with two half spheres) and the average dimensions of the AuNRs obtained from the analysis of the TEM micrographs. This estimated concentration is $[AuNR] = 1.01$ nM for AuNRs from synthesis 1 ($L \times l = 113.4 \times 41.8$ nm). This value is given as an indication and we will refer to the reduced gold concentration as this value remains constant regardless of the batch of AuNRs.

Silica shell growth on gold nanorods (AuNR@SiO₂): Prior to SiO₂ coating, the obtained AuNRs were diluted with 5 mL of pure water to adjust the CTAB and Au⁰ concentrations respectively to 1.1 mM and 6.24 mM (i.e. $[AuNR] = 0.78$ nM). Then the initial pH of the suspensions was adjusted to 4.0 by adding small amount of 0.1 M HCl or NaOH solution using micropipette, these suspensions were stirred for 20 min at 400 rpm. Several protocols were used for silica shell growth as described below.

Protocol A, Coating at pH 4 without primer: 125 μL of 20 % TEOS in MeOH (i.e. final Au/TEOS molar ratio 1/3.62) were added to 5 mL of the above-described aqueous suspension of AuNRs, then the suspension was stirred 20 min at 400 rpm and kept for 1 -19 days at room

temperature without stirring. The resulting core-shells are referred to as (*AuNR@m-SiO₂*).

Protocol B, *Synthesis with pH-swing and without primer*: A volume *x* of 20 % TEOS in MeOH (where *x* = 31, 62 or 124 μ L for a final Au/TEOS mole ratio of 1/0.90, 1/1.80 or 1/3.62, respectively) was added to 5 mL of an aqueous suspension of AuNRs and the solution was stirred 1 h at 800 rpm. Initial gold concentration and initial pH were kept at 6.24 mM and pH = 4, respectively. Then, the pH was increased to 8 by adding 0.1 M NaOH, the solution was stirred for 20 min at 400 rpm and then kept for 20 h at room temperature without stirring. The CTAB concentration was increased to 1.6 mM to enhance the stability. The pH change was done by injecting 0.1 M NaOH with a syringe pump at a constant flow rate of 5 μ L/min until reaching pH 8.0. The resulting core-shells are referred to as (*AuNR@Lm-SiO₂*).

Protocol C, *synthesis with pH-swing and with primer*: 41 μ L of 100 mM MPTMS solution in EtOH were added to 5 mL aqueous solution of AuNRs at pH = 4 and with CTAB concentration of 1.6 mM, and the solution was stirred 3 h at 400 rpm. Then, a volume *x* of 20 % TEOS in MeOH (where *x* = 31, 62 or 124 μ L for a final Au/TEOS mole ratio of 1/0.90, 1/1.80 or 1/3.62, respectively), was added and the suspension was stirred 1 h at 800 rpm. The pH was then increased by injecting 0.1 M NaOH with a syringe pump at a constant flow rate of 5 μ L/min until reaching pH 8.0. The suspension was then stirred for 20 min at 400 rpm and kept afterwards for 20 h at room temperature without stirring. The resulting core-shells are referred to as (*AuNR@t-SiO₂*)

Purification: The day after synthesis, the solutions were sonicated then centrifuged at 7060 ref for 15 min at room temperature. The supernatant was removed, leaving a minimum of liquid in the centrifuge tube; then the sedimented particles were redispersed four times with 25 mL of EtOH and twice with 25 mL of water; particles were collected by centrifugation after each of these redispersions. After the last cycle, the purified core-shell nanostructures were dispersed in 5 mL of water.

UV-Vis Spectroscopy. UV-Visible (UV-Vis) extinction spectra were recorded on a Cary 50 spectrophotometer (Varian, Inc.) and the analysis of colloidal dispersions was performed in the range 400–1100 nm using a cuvette with 1 cm optical path length. Water was used as the blank. According to refs.^{38,39} the Abs₄₀₀ linearly correlates with the Au⁰ concentration and an absorbance of 1.2 at 400 nm corresponds to 100 % reduction of a 0.5 mM gold salt solution. According to this relation, the reduction yield of Au³⁺ was estimated. Mathematical

determination of λ_{max} was done by calculating the first derivative of each spectrum as suggested in refs.^{40,41}

Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (ELS). DLS and ELS measurements were performed using a Litesizer™ 500 apparatus (Anton Paar) equipped with a 658 nm laser operating at 40 mW. The scattered light collection angle was set to 90°. The zeta potential was measured in a Ω - shaped capillary tube cuvette with an applied potential of 150 V.

TEM. Transmission electron microscopy images of AuNRs and AuNR@SiO₂ were obtained using a JEOL JEM 1011 transmission electron microscope (TEM) operating at an accelerating voltage of 100 kV. The samples were prepared by depositing a drop of water-diluted (x 20) particle suspension onto a carbon-coated copper grid and drying the grid at room temperature before imaging. The size distribution of AuNRs and the silica shell thickness of AuNR@SiO₂ was established by counting a minimum of 200 particles and 200 shells by TEM using Image J Software.

SEM. Scanning electron microscopy images were obtained using a SEM-FEG Hitachi SU-70 scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 5 kV; the working distance is around 3.5 mm; in lense secondary electron detector SE(U) was used. The samples were prepared by depositing a drop of water-diluted (x 20) particle suspension on an alumina SEM support with a carbon adhesive tape without being coated.

SERS. Surface Enhanced Raman Scattering spectra were recorded in the 100 - 3450 cm⁻¹ range on a modular Raman spectrometer (Model RXN1, Kaiser Optical Systems, Inc.). It includes a high-powered near-IR laser diode working at 785 nm and a 1024×256 pixels CCD detector showing a 4 cm⁻¹/3 pixels resolution. Spectra were collected on 1.5 mL of undiluted colloidal suspension in a quartz cuvette. The laser output power was 300 mW. For each spectrum, 10 acquisitions of 90 s were recorded to improve the signal-to-noise ratio.

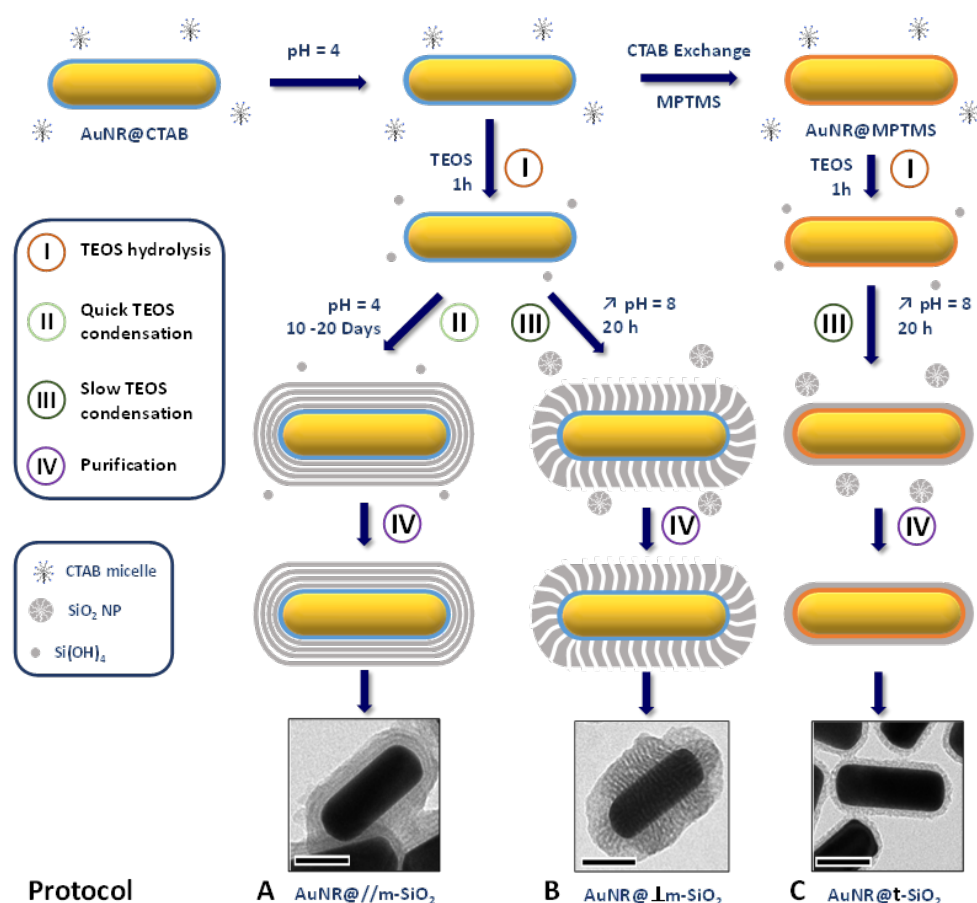
XPS. X-Ray photoelectron spectrometry analyses were performed using a Scienta Omicron Argus X-ray photoelectron spectrometer equipped with an Al K α monochromatic radiation source ($h\nu = 1486.6$ eV) operating at 280 W power. The analysis is performed under Ultra High Vacuum ($\leq 10^{-9}$ mBar). The photoelectrons are analyzed in a direction making an angle of 45° to the surface. The spectra were performed with a passing energy of 100 eV for the general spectrum and 20 eV for the N 1s regions. Spectrum analysis were performed using Casa XPS v.2.3.15 software (Casa Software Ltd, U.K.). 1.5 mL of the purified colloidal suspensions of

AuNR@//m-SiO₂; AuNR@⊥m-SiO₂ and AuNR@t-SiO₂ were concentrated by centrifugation (10 min at 9000 rpm) into a volume of 30 μL. The resulting suspensions were then deposited in 10 μL fractions spaced by a 2 h drying time on different indium substrates before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Gold nanorods synthesis and characterization: The AuNRs used in this study were synthesized following a seed-growth process. Several batches were prepared to assess the reproducibility of the synthesis and characterized by TEM, UV-Vis spectroscopy, DLS and zeta potential measurements (Figure S 1 and Figure S 2). Despite some changes in both width and length from one batch to batch, the resulting l-LSPR bands were always located around 750 nm and the AR was around 2.6 (Figure S 1), a detailed discussion on the reproducibility of the synthesis is given in SI section. AuNRs were also characterized by DLS and zeta potential measurements (Figure S 2). DLS measurements evidence a colloidal stability and, a positive zeta potential (+47 mV) was measured, consistently with the presence of the charged head groups of the CTAB bilayer on the particle surface. Finally, AuNRs were analyzed by SERS (Figure S 3). The spectra were dominated by CTAB bands (see Table S 1 for a detailed assignment of Raman bands).

Silica growth on gold nanorods: silica formation mechanism is governed by the reactions of hydrolysis and condensation of alkoxysilane (Figure S 4). These two reactions are catalyzed at acidic and basic pH (Figure S 5), while most existing protocols stipulate strictly basic conditions (pH=10-11).^{23,25-27} At these high-pH conditions, both hydrolysis and condensation reactions of the alkoxysilane take place simultaneously with fast kinetics. However, by tuning the pH values, it is possible to separate these two reactions and achieve a better control of silica shell growth around AuNRs. These conditions were explored in the three protocols developed herein and depicted precisely in Scheme 1. These three protocols are labeled A, B, and C and lead to samples referenced AuNR@//m-SiO₂, AuNR@⊥m-SiO₂, and AuNR@t-SiO₂, respectively.



Scheme 1: Pathways adopted for the three protocols developed to grow a silica shell on AuNRs, A, B, and C for AuNR@m-SiO₂, AuNR@Lm-SiO₂, and AuNR@t-SiO₂, respectively.

Silica growth on gold nanorods following Protocol A, AuNR@m-SiO₂: In Protocol A, the coating reaction was performed without a primer at pH 4 (Scheme 1), a pH at which the condensation kinetics is significantly slowed down, while the hydrolysis rate is fast (Figure S 5). Moreover, we used a high TEOS concentration (*i.e.* final Au/TEOS mole ratio 1/3.62) and a CTAB concentration of 1.1 mM. The CTAB-capped AuNRs used for this study have average dimensions of 102 × 40 nm (AR = 2.6). The morphology of the silica shell *vs.* the time of reaction was monitored through the analysis of TEM micrographs from samples obtained at different reaction times (Figure 1). Images of the obtained core-shell materials (Figure 1-a, b, c) show a progressive thickening and an improved shell organization when reaction time increases. The mesoporosity of the silica shell is clearly observable and oriented parallel to gold core, hence the AuNR@m-SiO₂ designation. At day 2, a silica shell only partially covers the gold cores. This partial coating is not sufficient to maintain the colloidal stability of the core-shell nanoparticles as we did observe the aggregation of the particles upon their washing in ethanol (the color due to the plasmonic bands disappears). At day 5, the colloidal stability is

improved after washing. However, the silica shell order and homogeneity seem still poor (Figure 1-a). A higher organization is observed starting from day 13 (Figure 1-b, and Figure S 6-a for high resolution large size images). Indeed, TEM micrographs show an ordered silica shell with a thickness of approx. 13.5 (\pm 5.3) nm displaying an “onion shaped” porosity. At day 17, the thickness of the silica shell is not significantly increased but additional protrusions of approx. 6.0 nm can be observed (Figure 1-c and e). Similar protrusions were reported by Wang et al. and assigned to an important depletion of CTAB and silicate in solution.⁴²

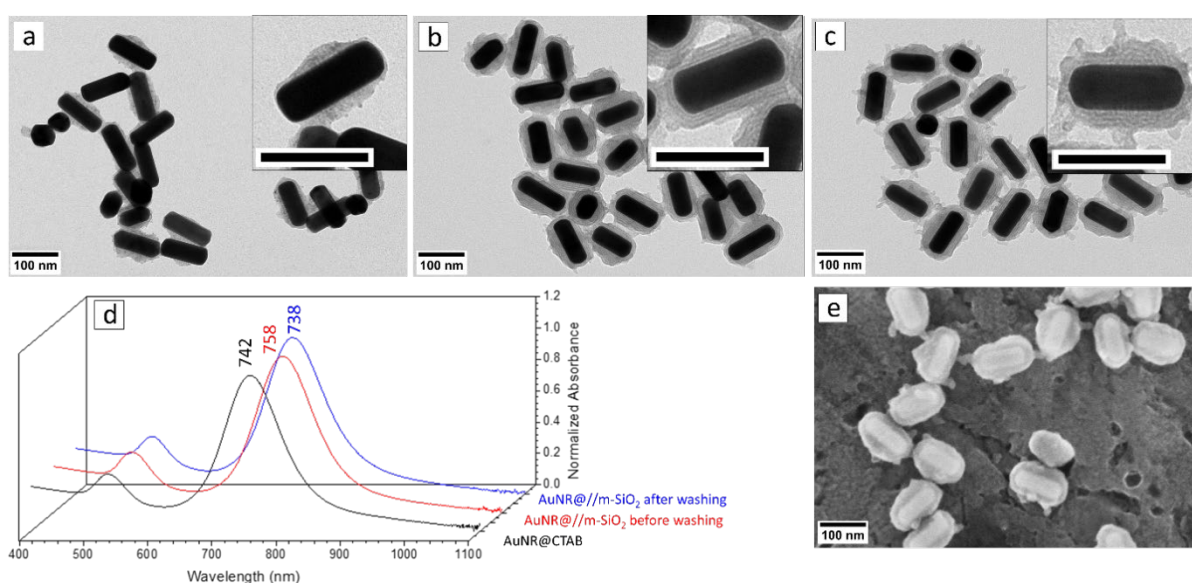


Figure 1: Results for protocol A, AuNR@m-SiO₂: a, b, and c, TEM images taken at different reaction times: 5, 13, and 17 days, respectively. (d) Extinction spectra of the original AuNRs and AuNR@m-SiO₂ before and after washing for 17 days reaction time. Scale bar in the insert corresponds to 100 nm (e) SEM images of (c).

The extent of the reaction was also monitored by measuring the extinction spectrum of the AuNR@m-SiO₂ before purification (Figure 1-d and Figure S 6). Negligible displacement of the LSPR band during the first two days confirms the slow condensation kinetics of silica around the AuNRs in these conditions (Figure S 6-b). A red-shift of the 1-LSPR band from 742 nm (day 1) to 758 nm (day 17) is observed (Figure 1-d) and it can be attributed to a higher refractive index at the AuNRs surface upon formation of a silica shell whose thickness increases upon aging.^{32,43} the 1-LSPR band seems to stabilize around day 13 (Figure S 6-b). DLS measurements shown in Figure S6-c confirm the colloidal stability. After the purification procedure, a large blue shift of the LSPR band from 758 nm to 738 nm is observed (Figure 1-d) possibly due to the removal of CTAB. Indeed, zeta potential measurements recorded before purification of AuNR@m-SiO₂ show a positive value (+32 mV) indicating the presence of CTAB molecules adsorbed on top of the silica layer (Figure S 6-d). Once purified, the zeta

potential of AuNR@m-SiO₂ becomes negative, -30 mV, consistently with silica surface charge and in agreement with the hypothesis of CTAB removal (Figure S 6-c). CTAB removal was further checked by SERS (Figure S 3 and Table S 1). SERS data show a drastic decrease in CTAB signal corroborating the previous assumptions. Finally, XPS analysis were performed to check the presence of residual nitrogen atoms due from the ammonium groups of CTAB, and here again, the obtained spectra (Figure S 7) evidence the absence of nitrogen and further confirm the successful removal of CTAB allowing for the use of these nano-objects within body fluids without suffering from CTAB toxicity.

To better understand the mechanism of silica growth, we undertook to estimate the yield of TEOS involved in the shell growth. Prior to our calculations, we did perform TEM analysis before and after core-shell AuNR@m-SiO₂ purification to see whether some of the TEOS led to a homogeneous nucleation of silica nanoparticles. The images shown in Figure S 6 e and f clearly show that no core-free silica particles were formed. Consequently, the yield of TEOS consumption for the formation of the shell was approximated based on the following calculation: as no uncoated AuNRs were observed, the number of silica shells encapsulating the particles was estimated based on the number of AuNRs in the sample, the thickness of the silica shell and assuming a density of 1.2 g.cm⁻³ for this shell (similar to the density of ordered mesoporous materials such as MCM-41). A yield of TEOS consumption of approximately 25 % can be estimated on day 17 (thickness of the silica shell: 14 nm). This calculation is very rough but it still clearly indicates that a large fraction of initially introduced TEOS does not participate to the formation of the silica shell.

The growth of a silica shell at pH=4 is therefore possible but slow due to the very slow TEOS condensation at this pH. It leads, not only to core-shell particles with thick and homogeneous silica shell that exhibits an unconventional porosity, but also prevents homogeneous SiO₂ nucleation.

Silica growth on gold nanorods following Protocol B, AuNR@*L*m-SiO₂: In Protocol B, the coating is done without primer and with pH-swing (from 4 to 8), the resulting core-shells exhibit a mesoporosity perpendicular to the gold core and are labelled AuNR@*L*m-SiO₂ (Figure 2). As mentioned above, at pH 4, hydrolysis of TEOS is fast, while the condensation reaction is very slow at pH 4 and fast at pH 8 (Figure S 5). Hence, with this protocol these two reactions will occur separately: TEOS will be fully hydrolyzed first (pH=4) with negligible condensation. Then, the condensation of pre-hydrolyzed TEOS will occur rapidly upon increasing the pH to

8. This pH modulation was first done by quickly adding NaOH using a micropipette after TEOS hydrolysis. For this first series of experiments the CTAB concentration was set at 1.1 mM and the results are shown in Figure S 8. At low TEOS concentration (*i.e.* Au/TEOS mole ratio = 1/0.90), the obtained AuNR@1m-SiO₂ have a poorly structured silica shell (Figure S 8-a), while higher TEOS concentrations (corresponding to 1/1.80 and 1/3.62 Au/TEOS mole ratios) allow the formation of a uniform silica shell around the AuNRs along with homogeneous nucleation of core-free SiO₂ (Figure S 8-b and c). Silica shell formation led to very small shift of 1-LSPR band (Figure S 8-d) and to no visual color change of the solution (Figure S 8-a, b, and c). Noteworthy, the purification procedure did not allow to remove the core-free SiO₂ from the final mixture (Figure S 8-b and c).

Alternatively, in view of improving the protocol, the CTAB concentration was increased to 1.6 mM and pH modulation was automated using a syringe pump for NaOH addition. The resulting AuNR@1m-SiO₂ synthesized at low TEOS concentration (corresponding to Au/TEOS mole ratio = 1/0.90, Figure 2-a) show a poorly structured silica shell as previously observed while higher TEOS concentrations (corresponding to 1/1.80 and 1/3.62 Au/TEOS mole ratios) provide a thick and uniform silica shell of 18.4 ± 3.1 and 22.5 ± 3.3 nm, respectively (Figure 2-b,c, and e for SEM; see Figure S 9, for a high resolution large size micrograph) with a porosity oriented perpendicularly to the AuNR surface. Moreover, using these experimental conditions, and unlike working with lower CTAB concentration as described above, core-free silica particles are absent from the samples purified following the same procedure for all Au/TEOS ratios (Figure 2-a,b,c compared to Figure S 9-a,b,c).

The extinction spectra of the AuNR@1m-SiO₂ before and after the purification procedure are shown in Figure 2-d. The 1-LSPR band position is red-shifted when TEOS amount increases for the spectra recorded before purification, as observed for protocol A. In addition, and again as seen for protocol A, the purification procedure induces a blue-shift in the 1-LSPR band position, and stabilizes at 751 nm, independently from silica shell thickness. This blue shift is here again attributed to CTAB removal, further evidenced by the negative zeta potential, -27 mV vs +40 mV before washing (Figure S 9-c), by the Raman and XPS analysis that show a decrease in CTAB bands, and the absence of N1s photopeak, respectively (Figure S 3 and Figure S 7).

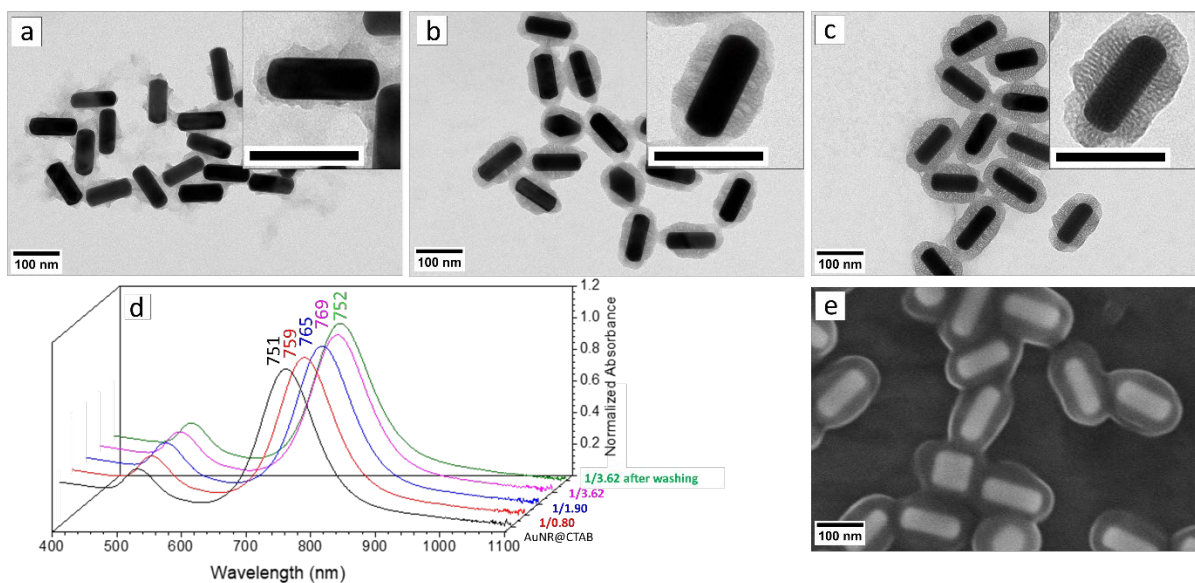


Figure 2: Results for protocol B, TEM images of AuNR@1m-SiO₂ synthesized with controlled NaOH addition and [CTAB] = 1.6 mM using different Au/ TEOS ratios. (a) 1/0.90, (b) 1/1.80 and (c) 1/3.60. Scale bar in the insert corresponds to 100 nm. (d) Extinction spectra of the original AuNRs and AuNR@1m-SiO₂ using different Au/ TEOS ratios before and after washing. (e) SEM image for (c).

As done for protocol A, prior to the estimation of the yield of TEOS involved in the shell growth, the TEM images before and after core-shell AuNR@1m-SiO₂ purification were recorded. The images shown in Figure S 9 reveal the occurrence of homogeneous nucleation of silica particles for Au/TEOS values of 1/1.80 and 1/3.62 (Figure S 9-e and f), but not for Au/TEOS=1/0.90 (Figure S 9-d), as expected from the fact that homogeneous nucleation of silica requires monomers concentration to be higher than a critical value. Moreover, the fraction of these particles visibly increases upon increasing TEOS concentration. Hence, core-free silica particles, thanks to their colloidal stability, their small size and their low density, have been removed during centrifugation. However, to ensure the complete elimination of these silica particles during the washing steps it is important to avoid their agglomeration by increasing the concentration of CTAB in the solution to 1.6 mM since, as seen previously, working with lower CTAB concentration did not allow their removal (Figure S 8-a,b,c).

The yield of TEOS consumption solely for the formation of the shell, calculated based on the above described hypotheses, in solution with 1/1.80 and 3.62 Au/TEOS mole ratios was approximated respectively to 40 % and 28 %, that is slightly higher than the one calculated for protocol A, despite the free silica nanoparticles formation.

Silica growth on gold nanorods following Protocol C, $AuNR@t-SiO_2$: Several groups have reported the use of MPTMS as a surface modifier to displace adsorbed CTAB thanks to the formation of strong Au-S bonds at the gold rod surface, while exposing reactive SiOR and/or SiOH groups at the AuNRs surface. This primer is added prior to hydrolysis and condensation of sodium silicate and this type of protocol usually aims at producing a thin silica shell.^{31,32} We have applied the previously described pH-swing method that separates hydrolysis and condensation steps of TEOS to these MPTMS-capped AuNRs. The concentration of CTAB was set at 1.6 mM and AuNRs used for this study have approximate dimensions of 113×42 nm (AR = 2.7). MPTMS was added first to the AuNRs suspension at pH 4. Under these conditions, MPTMS thiol functions replace CTAB, while the three methoxy groups may undergo hydrolysis to form silanols. This hydrolysis occurs without significant modification of the pH of the suspension. The TEOS was then added to the solution allowing its fast hydrolysis. The pH was then increased up to 8 by addition of NaOH with a syringe pump, allowing the condensation reactions to occur. Figure 3-a,b,c shows representative TEM images of $AuNR@t-SiO_2$ obtained with increasing TEOS concentrations (Au/TEOS mole ratios 1/0.90, 1/1.80 and 1/3.62, respectively), a SEM micrograph for the highest TEOS amount is also shown (Figure 3-f). Using this protocol, well defined silica shells of increasing thickness ($2.1 (\pm 0.4)$, $3.4 (\pm 0.5)$ and $5.7 (\pm 0.9)$ nm) were obtained.

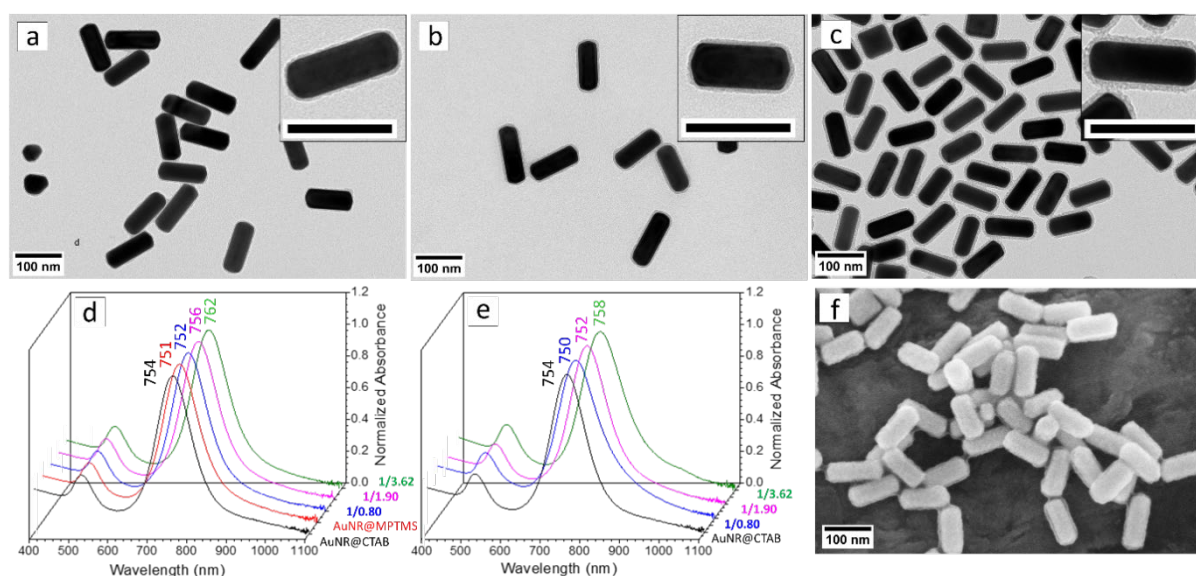


Figure 3: TEM images of $AuNR@t-SiO_2$ synthesized using MPTMS primer and pH monitoring with different Au/TEOS ratios and measurement of silica shell thickness. (a) 1/0.90, (b) 1/1.80 and (c) 1/3.62. Scale bar in the insert corresponds to 100 nm. Extinction spectra of the obtained $AuNR@t-SiO_2$ (d) Before and (e) After washing. (f) SEM image of (c)

The optical properties of these AuNR@t-SiO₂ were investigated by UV-Vis spectroscopy after achievement of the coating reaction, before and after the purification procedure (Figure 3-d,e), maximum of the 1-LSPR band is indicated in the legend next to the corresponding sample. Before the washing cycle (Figure 3-d), a blue shift of the 1- LSPR band upon MPTMS addition suggests ligand exchange with the CTAB double layer and formation of a MPTMS layer at the particle surface. Adding increasing amounts of TEOS led to a gradual red shift of the 1- LSPR band with increasing thickness of the silica shell, as previously observed for protocols A and B. Here again, the purification procedure resulted in a blue shift of 1- LSPR band, assigned to CTAB removal, for all AuNR@t-SiO₂ samples (Figure 3-e). The absence of aggregation pic in the DLS measurement (Figure S 10-a) confirm the colloidal stability of the suspension after washing. Zeta potential measurements of AuNR@t-SiO₂ dispersions before and after washing (Figure S 10-b) confirmed the silica coating of the nanorods, as the charge surface of AuNRs@SiO₂ changed from positive (+ 44 mV) to negative (- 30 mV) after three purification cycles in EtOH and two cycles in water. Such zeta potential at pH 6.5 matches with the zeta potential of silica particles under the same conditions and thus supports the complete removal of CTAB.⁴⁴ CTAB removal for this protocol was also confirmed by SERS and XPS (Figure S 3 and Figure S 7).

TEM images of the reaction mixtures before separation of the AuNR@t-SiO₂ from the supernatant have been recorded (Figure S 10-c to h). For the lowest Au/TEOS ratio, no core-free silica particles were formed (Figure S 10-c). In contrast, the solutions with 1/1.80 and 1/3.62 Au/TEOS mole ratios clearly show the presence of homogeneous silica particles (Figure S 10-d and e). For all Au/TEOS ratios, these particles were removed during purification (Figure S 10-f, g and h). The silica shell thickness being too thin to allow the appreciation of its porosity by TEM, a silica density of 2.2 g.cm⁻³ (corresponding to dense silica) and 1.2 g.cm⁻³ (corresponding to MCM-41-type porous silica) was used to evaluate the yield of TEOS consumption for the formation of the shell. Therefore, the yield was approximated to 5.0 %, 4.5 % and 4.0 % for a porous shell of increasing thickness and to 10.0 %, 8.0 % and 7.0 % for a non-porous shell.

The robustness of the coating protocol was eventually demonstrated by synthesizing AuNR@t-SiO₂ of approx. 3 nm shell thickness from CTAB-capped AuNRs with different sizes using the 1/1.80 Au/TEOS mole ratio procedure (Figure 4). The TEM pictures of core-shell AuNR@t-SiO₂ with 3.2 (± 0.5), 3.3 (± 0.6) and 3.6 (± 0.6) nm uniform shell thickness

synthesized using AuNRs with approximate dimensions of respectively 109×49 , 94×39 and 102×36 nm, show the reproducibility of the protocol regardless of particle size.

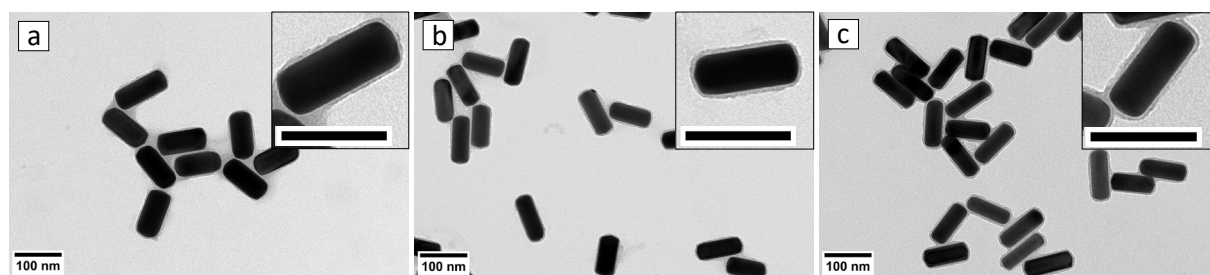


Figure 4: TEM images of AuNR@t-SiO₂ synthesized using MPTMS primer and pH monitoring at 1/1.80Au/TEOS ratio with different AuNRs dimensions (a) 109×49 nm, (b) 94×39 nm and (c) 102×36 nm. Scale bar in the insert corresponds to 100 nm.

Discussion on the three protocols: The AuNR@SiO₂ fabricated in this study have silica shells of controlled thicknesses and pore organization. We summarized in Table 1 the main features of the silica shells resulting from the different strategies we employed for AuNR@SiO₂ engineering. The pH of the working medium determines the hydrolysis and condensation rates of TEOS. Consequently, it significantly affects the final structure of the shell. It determines not only the kinetics of silica growth (on the AuNRs surface and as core-free silica particles by homogeneous nucleation in solution) but also the final pore morphology of the shell. As long as the pH is maintained around 4.0, as done for protocol A, the hydrolysis rate is high, and the hydrolyzed species can undergo slow condensation. During the early stages of the reaction (less than five days), due to the slow condensation kinetics, neither silica particles nor silica shell are detected around the AuNRs. After 5 days, an inhomogeneous silica shell becomes clearly visible indicating the onset of silica formation and after extended reaction time (13 days or more) a mesoporous and thick silica shell is formed. Moreover, for this protocol no core-free silica particle was detected on the TEM images prior or after the purification, and this, despite the relatively small fraction of initially introduced TEOS that is integrated in the silica shells (ca. $\frac{1}{4}$). The absence of homogeneous nucleation of silica particles (despite the high TEOS concentration), suggests that, under conditions that lead to a very slow kinetics of condensation, the homogeneous nucleation of silica is sufficiently delayed to be suppressed in the time frame of our experiments. Surprisingly enough, the silica coating formed at pH=4 develops and unexpected porosity, with pores aligned parallel to the nanorods surface. This is, to the best of our knowledge, the first report of this type of porosity on AuNR@SiO₂. As this coating follows the initial orientation of the CTAB bilayer on the AuNRs surface, one can postulate that, under acidic conditions, the original CTAB bilayer controls the growth of the CTAB/silicate

mesostructure. The reason why this initial orientation is preserved still needs to be investigated. One can however exclude that it originates from the difference in speciation of silicate species in acidic and basic conditions. Indeed, at pH 4, a pH close to the point of zero charge of silica, the density of charge of silicate species is much lower than at pH 8. But, a low density of charge is, on the contrary, expected to favor a high curvature at the silica/surfactant surface and to favor the formation of a hexagonal over a lamellar phase. Therefore, one can propose that this uncommon orientation of the mesostructure is either related to the slow kinetics of condensation or to a low mobility of CTAB under these experimental conditions.

Table 1: Summary of the main characteristics of the AuNR@SiO₂ particles depending on the experimental conditions.

Synthesis protocol	Au/TEOS ratio	[CTAB] (mM)	Reaction time	Shell Thickness (nm)	Porosity	Presence of SiO ₂ NP after washing	Nucleation of SiO ₂ NP
A //m-SiO ₂	1/3.62	1.1	17 days	14	// to the Surface	no	no
	1/0.90	1.1		—*		no	no
	1/1.80	1.1	18h	13	⊥ to the Surface	yes	yes
B ⊥m-SiO ₂	1/3.62	1.1		19		yes	yes
	1/0.90	1.6		—*		no	no**
	1/1.80	1.6	18h	17	⊥ to the Surface	no	yes
	1/3.62	1.6		21		no	yes
C t-SiO ₂	1/0.90	1.6		2.1		no	no**
	1/1.80	1.6	18h	3.4	Non porous	no	yes
	1/3.62	1.6		5.7		no	yes

* Non Homogeneous layer

** [TEOS] in these conditions is below the critical value

When the condensation reaction is performed under mildly basic conditions (pH 8), after an initial hydrolysis step at pH 4, as in Protocol B, silica growth is much faster and the silica coating is formed overnight. The pH-swing method that we apply here for silica shell growth was first proposed by Brinker et al. for the formation of silica gels⁴⁵⁻⁴⁷ and, more recently investigated in detail by Fidalgo et al.⁴⁸⁻⁵⁰ to produce highly porous silica xerogels. The pH conditions of this pH-swing protocol are significantly different from those used in the AuNRs coating processes derived from the initial work of Gorelikov et al. (which are also similar to those used in the classical Stöber process). Indeed, for all these protocols it is necessary to reach a pH for which both hydrolysis and condensation reactions are fast, and these conditions can

only be obtained at relatively high pH (pH=10-11) because hydrolysis is very slow at moderately basic pH (pH=7-9) and, according to Abadeer et al., the growth of a silica shell at moderate pH (pH \leq 9) is not possible.²⁵ Using the pH-swing method, as TEOS is hydrolyzed first at acidic pH, the condensation reaction can be performed in milder conditions (pH 8) and governs the kinetics of formation of the silica shell. Moreover, as explained by Fidalgo et al. this two-step process favors the formation of highly cross-linked silica (with few residual silanol groups) because both acid-catalyzed hydrolysis and basic-catalyzed condensation favor cross-linking.⁴⁹ These changes in the sol-gel chemistry of TEOS may be at the origin of the different morphologies of the pores of the silica shell in our work compared to previously published results (aligned pores with an orientation perpendicular to the AuNRs surface for protocol A compared to a more disordered pore morphology in previous works), but the precise origin of this higher organization of the pores under the conditions we used remains unclear. In the present work we have associated this pH-swing protocol to two different concentrations of CTAB: 1.1 mM (corresponding to the concentration used by Wu et al. in their work²⁶) and 1.6 mM. For samples prepared from the same TEOS concentration, the thickness of the silica coating is in the same range: 13/19 and 17/21 nm for 1.1 and 1.6, respectively (Table 1) and these samples differ only for the presence of core-free silica particles in the purified samples for Au/TEOS ratios of 1/1.80 and 1/3.62. A high CTAB concentration seems therefore mandatory for the successful removal of core-free silica particles, possibly due to a better colloidal stability of these particles when surrounded by CTAB.

The last series of AuNR@SiO₂ associates the use of MPTMS as primer with the pH-swing method, protocol C. A thin and extremely homogeneous silica coating was obtained for all Au/TEOS ratios with a regular increase of the thickness of the silica coating with increasing the amount of TEOS. For these samples, that have been synthesized with [CTAB]=1.6 mM, no core-free silica particles are observed on the purified samples.

In their work, Wu and Tracy have concluded, based on calculations and on the absence of core-free silica particles on their TEM images, that all of the TEOS molecules were consumed to form the silica shells.²⁶ However, their calculation assumes a silica density of 1.7 g.cm⁻³ which, without being impossible, is higher than that expected for a mesoporous material similar to MCM-41 (pore volume between 0.5 and 1 cm³.g⁻¹, which corresponds to much lower densities (between 0.8 and 1.2). If instead of the density of 1.7, a density of 1 is considered in their calculation, a non-negligible amount of silica is not integrated into the silica shells surrounding

gold particles and could be in the form of silica nanoparticles that would have been removed during washing.

For most of the experimental conditions explored in the present work, we observed silica particles formed by homogeneous nucleation. Interestingly, according to the classical model of nucleation and growth, these ultra-small and monodisperse silica nanoparticles are likely formed during a single burst of nucleation with limited further growth due to rapid consumption of all silica precursors.⁵¹ Hence, during these syntheses, silica particles and the silica coating may form simultaneously. This may appear as a drawback of our protocols compared to the classical ones. However, formation of undesired core-free silica particles is not a specificity of our protocols and has been observed for many of the protocols derived from the initial work of Gorelikov.^{25,27,28,52,53} Moreover, these particles, which were observed on the TEM images of the purified samples, may represent only a small fraction of the formed core-free silica particles because, as already stated by Abadeer et al., most of them are, thanks to their lower weight, removed from the samples during purification by differential centrifugation.²⁵ Several of these protocols successfully achieved producing AuNR@SiO₂ samples devoid of silica particles, usually by a careful control of the amount of added TEOS (the formation of these particles is favored at high TEOS concentration) and the speed of addition of the TEOS solution (stepwise^{27,28,32,53} or slow²⁶ addition of TEOS is often used as a means to keep the silica concentration in solution below the homogeneous nucleation threshold). However, while these protocols require a very careful control of the experimental conditions, our work suggests that, rather than focusing on avoiding the homogeneous nucleation of silica, an easier approach could be to choose synthesis conditions that will allow their total elimination during the purification steps. In this approach, CTAB concentration plays a key role: with a CTAB concentration of 1.1 mM, core-free silica particles remain in the purified samples while for [CTAB]=1.6 mM, purified samples are free of silica particles. This CTAB concentration is higher than the values suggested in many protocols (usually below 1.2 mM).^{25,26,28} This major role of the CTAB concentration on the elimination of core-free silica particles can be assigned to the fact that CTAB acts not only as a soft template (leading to the formation of the porous silica coating) but also as a stabilizer of the colloidal particles (AuNR@SiO₂ and core-free SiO₂ particles) present in the solution. With the appropriate amount of CTAB, the positive charge of CTAB molecules present at the surface of core-free and core/shell silica particles leads to a strong electrostatic repulsion between all colloidal particles and prevents aggregation.

CONCLUSIONS

In summary, we have reported a versatile method for the synthesis of core-shell AuNR@SiO₂ nanoparticles with tailored shell thickness and porosity. By modulating the pH of the reaction medium, it is possible to control the silica growth rate and morphological parameters of the shell. Different silica shell thicknesses, from 13 to 21 nm, can be achieved by varying the Au/TEOS ratio. Depending on the pH adopted for TEOS condensation, the orientation of the silica porosity could be tailored to be either perpendicular, or, more originally, parallel to AuNRs surface. Finally, the use of a surface primer allows the formation of ultrathin non porous silica shells with a thickness precisely tunable between 2 and 6 nm by varying Au/TEOS ratio. In all the synthesis methods optimized here, the colloidal stability and optical properties of the plasmonic core were preserved. In addition, we show that the formation of SiO₂ nanoparticles cannot be avoided in alkaline medium when homogeneous nucleation threshold is reached. CTAB plays a major role on the efficacy of removal of SiO₂ nanoparticles during the purification steps. By combining XPS, Raman and zeta potential measurements, we evidence the total removal of cytotoxic CTAB during washing steps, which will facilitate the use of these AuNR@SiO₂ in biological media. The formation of thin silica shell may have promising potential for the development of LSPR biosensors. Furthermore, the original onion-shaped porosity parallel to AuNRs surface developed here will certainly provide interesting vehicles for drug delivery and further release of embedded molecules.

REFERENCES

- (1) Perez-juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2005**, *249* (17–18), 1870–1901. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.030>.
- (2) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2009**, *21* (48), 4880–4910. <https://doi.org/10.1002/adma.200802789>.
- (3) Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A. Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (16), 3073–3077. <https://doi.org/10.1021/jp990183f>.
- (4) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging. *Nature Biotechnology* **2001**, *19* (4), 316–317. <https://doi.org/10.1038/86684>.
- (5) 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>.
- (6) Pellas, V.; Hu, D.; Mazouzi, Y.; Mimoun, Y.; Blanchard, J.; Guibert, C.; Salmain, M.; Boujday, S. Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications. *Biosensors* **2020**, *10* (10), 146. <https://doi.org/10.3390/bios10100146>.
- (7) Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. *Chemistry of Materials* **2013**, *25* (8), 1250–1261. <https://doi.org/10.1021/cm303708p>.
- (8) Mirska, D.; Schirmer, K.; Funari, S. S.; Langner, A.; Dobner, B.; Brezesinski, G. Biophysical and Biochemical Properties of a Binary Lipid Mixture for DNA Transfection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *40* (1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.10.007>.
- (9) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1* (3), 325–327. <https://doi.org/10.1002/sml.200400093>.
- (10) Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708. <https://doi.org/10.1002/sml.200801546>.
- (11) Albrecht, W.; van de Glind, A.; Yoshida, H.; Isozaki, Y.; Imhof, A.; van Blaaderen, A.; de Jongh, P. E.; de Jong, K. P.; Zečević, J.; Takeda, S. Impact of the Electron Beam on the Thermal Stability of Gold Nanorods Studied by Environmental Transmission Electron Microscopy. *Ultramicroscopy* **2018**, *193*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2018.05.006>.

- (12) Boujday, S.; Lambert, J.-F.; Che, M. Amorphous Silica as a Versatile Supramolecular Ligand for Ni^{II} Amine Complexes: Toward Interfacial Molecular Recognition. *ChemPhysChem* **2004**, *5* (7), 1003–1013. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400008>.
- (13) Mallick, S.; Sun, I.-C.; Kim, K.; Yi, D. K. Silica Coated Gold Nanorods for Imaging and Photo-Thermal Therapy of Cancer Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, *13* (5), 3223–3229. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7149>.
- (14) Wang, Z.; Zong, S.; Yang, J.; Li, J.; Cui, Y. Dual-Mode Probe Based on Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods for Targeting Cancer Cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (6), 2883–2889. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.032>.
- (15) Chen, Y.-S.; Frey, W.; Kim, S.; Homan, K.; Kruizinga, P.; Sokolov, K.; Emelianov, S. Enhanced Thermal Stability of Silica-Coated Gold Nanorods for Photoacoustic Imaging and Image-Guided Therapy. *Opt. Express, OE* **2010**, *18* (9), 8867–8878. <https://doi.org/10.1364/OE.18.008867>.
- (16) Gergely-Fülöp, E.; Zámbo, D.; Deák, A. Thermal Stability of Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with Different Aspect Ratios. *Materials Chemistry and Physics* **2014**, *148* (3), 909–913. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.08.069>.
- (17) Guerrero-Martínez, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. Recent Progress on Silica Coating of Nanoparticles and Related Nanomaterials. *Advanced Materials* **2010**, *22* (11), 1182–1195. <https://doi.org/10.1002/adma.200901263>.
- (18) Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Giri, S.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. *Advanced Functional Materials* **2007**, *17* (8), 1225–1236. <https://doi.org/10.1002/adfm.200601191>.
- (19) Zhang, Z.; Wang, L.; Wang, J.; Jiang, X.; Li, X.; Hu, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Chen, C. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods as a Light-Mediated Multifunctional Theranostic Platform for Cancer Treatment. *Advanced Materials* **2012**, *24* (11), 1418–1423. <https://doi.org/10.1002/adma.201104714>.
- (20) Ben Haddada, M.; Hu, D.; Salmain, M.; Zhang, L.; Peng, C.; Wang, Y.; Liedberg, B.; Boujday, S. Gold Nanoparticle-Based Localized Surface Plasmon Immunosensor for Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Detection. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409* (26), 6227–6234. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0563-8>.
- (21) Loiseau, A.; Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Mazouzi, Y.; Flack, R.; Liedberg, B.; Boujday, S. Core–Shell Gold/Silver Nanoparticles for Localized Surface Plasmon Resonance-Based Naked-Eye Toxin Biosensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (50), 46462–46471. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14980>.
- (22) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26* (1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).

- (23) Gorelikov, I.; Matsuura, N. Single-Step Coating of Mesoporous Silica on Cetyltrimethyl Ammonium Bromide-Capped Nanoparticles. *Nano Lett.* **2008**, *8* (1), 369–373. <https://doi.org/10.1021/nl0727415>.
- (24) Liu, J.; Kan, C.; Cong, B.; Xu, H.; Ni, Y.; Li, Y.; Shi, D. Plasmonic Property and Stability of Core-Shell Au@SiO₂ Nanostructures. *Plasmonics* **2014**, *9* (5), 1007–1014. <https://doi.org/10.1007/s11468-014-9708-1>.
- (25) Abadeer, N. S.; Brennan, M. R.; Wilson, W. L.; Murphy, C. J. Distance and Plasmon Wavelength Dependent Fluorescence of Molecules Bound to Silica-Coated Gold Nanorods. *ACS Nano* **2014**, *8* (8), 8392–8406. <https://doi.org/10.1021/nn502887j>.
- (26) Wu, W.-C.; Tracy, J. B. Large-Scale Silica Overcoating of Gold Nanorods with Tunable Shell Thicknesses. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (8), 2888–2894. <https://doi.org/10.1021/cm504764v>.
- (27) Yoon, S.; Lee, B.; Kim, C.; Lee, J. H. Controlled Heterogeneous Nucleation for Synthesis of Uniform Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with Tailorable Rotational Diffusion and 1 Nm-Scale Size Tunability. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (8), 4731–4736. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00724>.
- (28) DuChene, J. S.; Almeida, R. P.; Wei, W. D. Facile Synthesis of Anisotropic Au@SiO₂ Core-Shell Nanostructures. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (26), 7879–7882. <https://doi.org/10.1039/C2DT30409K>.
- (29) Li, J. F.; Tian, X. D.; Li, S. B.; Anema, J. R.; Yang, Z. L.; Ding, Y.; Wu, Y. F.; Zeng, Y. M.; Chen, Q. Z.; Ren, B. Surface Analysis Using Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nat. Prot.* **2013**, *8* (1), 52.
- (30) Pérez-Juste, J.; Correa-Duarte, M. A.; Liz-Marzán, L. M. Silica Gels with Tailored, Gold Nanorod-Driven Optical Functionalities. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *226* (1–3), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2003.11.013>.
- (31) Obare, S. O.; Jana, N. R.; Murphy, C. J. Preparation of Polystyrene- and Silica-Coated Gold Nanorods and Their Use as Templates for the Synthesis of Hollow Nanotubes. *Nano Lett.* **2001**, *1* (11), 601–603. <https://doi.org/10.1021/nl0156134>.
- (32) Li, C.; Li, Y.; Ling, Y.; Lai, Y.; Wu, C.; Zhao, Y. Exploration of the Growth Process of Ultrathin Silica Shells on the Surface of Gold Nanorods by the Localized Surface Plasmon Resonance. *Nanotechnol.* **2014**, *25* (4), 045704. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/4/045704>.
- (33) Fernández-López, C.; Mateo-Mateo, C.; Álvarez-Puebla, R. A.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Highly Controlled Silica Coating of PEG-Capped Metal Nanoparticles and Preparation of SERS-Encoded Particles. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13894–13899. <https://doi.org/10.1021/la9016454>.
- (34) Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. Silica-Coating and Hydrophobation of CTAB-Stabilized Gold Nanorods. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (10), 2465–2467. <https://doi.org/10.1021/cm060293g>.

- (35) Brinker, C. J. Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1988**, *100* (1), 31–50. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(88\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0022-3093(88)90005-1).
- (36) Ye, X.; Zheng, C.; Chen, J.; Gao, Y.; Murray, C. B. Using Binary Surfactant Mixtures To Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods. *Nano Letters* **2013**, *13* (2), 765–771. <https://doi.org/10.1021/nl304478h>.
- (37) Burrows, N. D.; Harvey, S.; Idesis, F. A.; Murphy, C. J. Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments. *Langmuir* **2017**, *33* (8), 1891–1907. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03606>.
- (38) Scarabelli, L.; Grzelczak, M.; Liz-Marzán, L. M. Tuning Gold Nanorod Synthesis through Prereduction with Salicylic Acid. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (21), 4232–4238. <https://doi.org/10.1021/cm402177b>.
- (39) Hendel, T.; Wuithschick, M.; Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Rademann, K.; Polte, J. In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11115–11124. <https://doi.org/10.1021/ac502053s>.
- (40) Chen, P.; Liedberg, B. Curvature of the Localized Surface Plasmon Resonance Peak. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (15), 7399–7405. <https://doi.org/10.1021/ac500883x>.
- (41) Chen, P.; Tran, N. T.; Wen, X.; Xiong, Q.; Liedberg, B. Inflection Point of the Localized Surface Plasmon Resonance Peak: A General Method to Improve the Sensitivity. *ACS Sensors* **2017**, *2* (2), 235–242. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00633>.
- (42) Wang, W.; Wang, P.; Tang, X.; Elzatahry, A. A.; Wang, S.; Al-Dahyan, D.; Zhao, M.; Yao, C.; Hung, C.-T.; Zhu, X.; Zhao, T.; Li, X.; Zhang, F.; Zhao, D. Facile Synthesis of Uniform Virus-like Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Cellular Internalization. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3* (8), 839–846. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00257>.
- (43) Liz-Marzán, L. M.; Giersig, M.; Mulvaney, P. Synthesis of Nanosized Gold–Silica Core–Shell Particles. *Langmuir* **1996**, *12* (18), 4329–4335. <https://doi.org/10.1021/la9601871>.
- (44) Júnior, J. A. A.; Baldo, J. B. The Behavior of Zeta Potential of Silica Suspensions. *New Journal of Glass and Ceramics* **2014**, *4* (2), 29–37. <https://doi.org/10.4236/njgc.2014.42004>.
- (45) Brinker, C. J.; Keefer, K. D.; Schaefer, D. W.; Ashley, C. S. Sol-Gel Transition in Simple Silicates. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1982**, *48* (1), 47–64. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(82\)90245-9](https://doi.org/10.1016/0022-3093(82)90245-9).
- (46) Brinker, C. J.; Keefer, K. D.; Schaefer, D. W.; Assink, R. A.; Kay, B. D.; Ashley, C. S. Sol-Gel Transition in Simple Silicates II. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1984**, *63* (1), 45–59. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(84\)90385-5](https://doi.org/10.1016/0022-3093(84)90385-5).

- (47) Brinker, C. J.; Tallant, D. R.; Roth, E. P.; Ashley, C. S. Sol-Gel Transition in Simple Silicates: III. Structural Studies during Densification. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1986**, *82* (1), 117–126. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(86\)90119-5](https://doi.org/10.1016/0022-3093(86)90119-5).
- (48) Fidalgo, A.; Ilharco, L. M. Correlation between Physical Properties and Structure of Silica Xerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2004**, *347* (1), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2004.07.059>.
- (49) Fidalgo, A.; Ilharco, L. M. Chemical Tailoring of Porous Silica Xerogels: Local Structure by Vibrational Spectroscopy. *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (2), 392–398. <https://doi.org/10.1002/chem.200305079>.
- (50) Fidalgo, A.; Rosa, M. E.; Ilharco, L. M. Chemical Control of Highly Porous Silica Xerogels: Physical Properties and Morphology. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (11), 2186–2192. <https://doi.org/10.1021/cm031013p>.
- (51) Ding, T.; Yao, L.; Liu, C. Kinetically-Controlled Synthesis of Ultra-Small Silica Nanoparticles and Ultra-Thin Coatings. *Nanoscale* **2016**, *8* (8), 4623–4627. <https://doi.org/10.1039/C5NR08224B>.
- (52) Huang, C.-C.; Huang, C.-H.; Kuo, I.-T.; Chau, L.-K.; Yang, T.-S. Synthesis of Silica-Coated Gold Nanorod as Raman Tags by Modulating Cetyltrimethylammonium Bromide Concentration. *Colloids Surf. A* **2012**, *409*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.06.003>.
- (53) Huang, C.-M.; Chung, M.-F.; Souris, J. S.; Lo, L.-W. Controlled Epitaxial Growth of Mesoporous Silica/Gold Nanorod Nanolollipops and Nanodumb-Bells. *APL Materials* **2014**, *2* (11), 113312. <https://doi.org/10.1063/1.4898415>.

3. Informations supplémentaires

SUPPORTING INFORMATION

I- Gold Nanorod synthesis & characterization:

Figure S 1 shows representative TEM images of AuNRs using the same protocol with picture of the colloidal solution and the corresponding UV-Vis spectra. It has been shown that the high number of experimental parameters, added to the many possible sources of variation from one experimenter to another, make it particularly difficult to obtain AuNRs with similar properties from batch to batch.^{1,2} We found that AuNRs obtained from different growth solutions but synthesized in parallel (same water bath, same seeding solution) have an AR of 2.7 with close maximum absorption wavelength of the longitudinal band (see Figure S 2-c); it is therefore possible to increase the quantity of particles by performing the growth step, in several vials but in the same temperature-controlled water bath (set at 30°C) and using the same seed solution. On the other side, when particles are synthesized on different days, a reproducibility is significantly lower (see Figure S 2-c) and batches cannot be mixed.

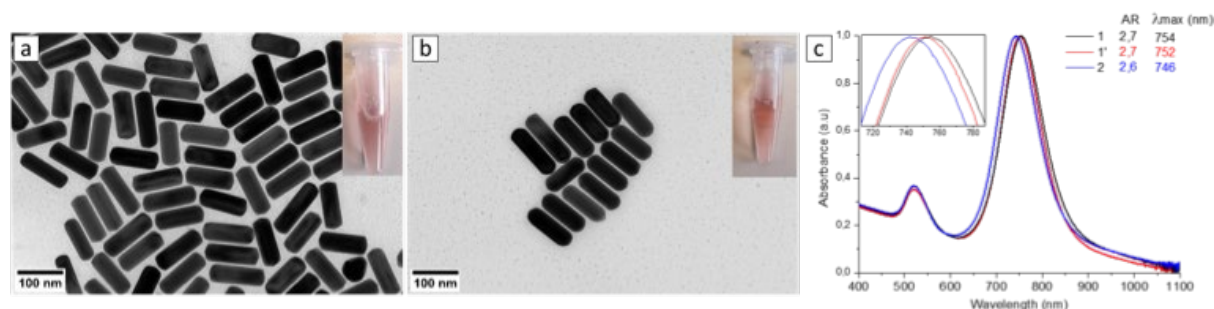


Figure S 1: Representative TEM images of the obtained AuNRs using the same protocol with picture of the colloidal solution in the insert (a) Synthesis 1 $L \times l = 113 \times 42$, (b) Synthesis 2 $L \times l = 102 \times 40$, (c) Corresponding UV-Vis spectra of the obtained AuNRs: black and red curve (synthesis 1) correspond to AuNRs synthesized the same day and blue curve correspond to AuNRs synthesized on a different day (synthesis 2) both in a temperature controlled bath.

The AuNRs obtained from synthesis 1 have an AR of 2.7 ± 0.3 (length: 113.4 ± 7.1 nm, width: 41.8 ± 2.0 nm) and few impurities (*i.e.* spheres, bipyramids) are observed as shown in the TEM image (Figure S 1-a). The typical UV-Vis extinction spectrum of nanorods (Figure S 1-c) shows a weak transverse plasmon band at 533 nm and a thin intense longitudinal plasmon band located in the near-infrared window at 754 nm, with a full width at half maximum (FWHM) of 103 nm, confirming the narrow particle distribution.³ Distribution of their morphological parameters were plotted in Figure S 2-a,b,c. Dynamic light scattering measurements (see Figure S 2-d) show two peaks, the intense peak corresponds to the rotational diffusion of the nanorods, the weaker peak located at 75.3 nm corresponds to its translational diffusion.^{4,5} 72

These measurements do not allow a straightforward determination of the hydrodynamic diameter but the absence of peaks above 75.3 nm allows us to conclude to the good colloidal stability of the particles with no aggregation in water. This is confirmed by the surface charge of +47 mV (see Figure S 2-e) attributed to the positively charged head group of the CTAB bilayer on the particle surface.

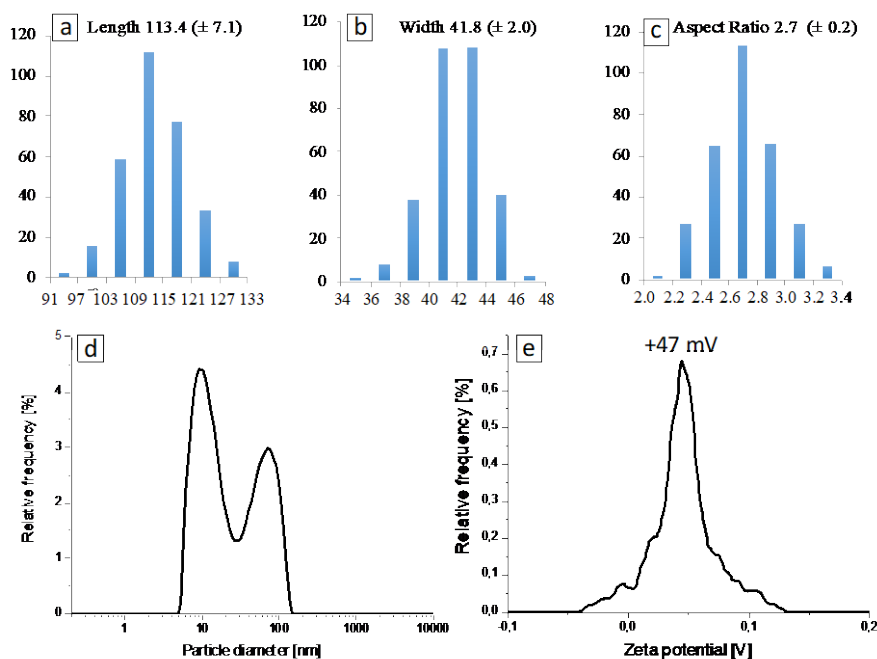


Figure S 2: Statistical distribution of morphological parameters of AuNRs obtained from synthesis 1 (a) Length (b) Width (c) Aspect ratio and associated measurement of (d) Dynamic light scattering and (e) Zeta potential.

For the silica coating step, AuNRs from different batches (and hence with slightly different dimensions) have been used but these small variations in the dimensions of the AuNRs, have no influence on the characteristics of the silica shell.

II- Raman scattering analysis:

SERS spectra of CTAB-capped AuNRs (1.6 mM CTAB), and purified AuNR@1m-SiO₂, AuNR@//m-SiO₂ and AuNR@t-SiO₂ are displayed in Figure S 3 , A complete attribution of the vibrations bands is displayed in Table S 1. A wavelength excitation source of 785 nm was used in order to match the nanorods plasmon resonance, providing enhancement of the evanescent field. Characteristic bands of CTAB were assigned according to previous reports.^{6,7} The strong peaks at 754 cm⁻¹ corresponds to the C-N symmetric stretching of the trimethylammonium headgroup while the bands around 900 cm⁻¹ and 958 cm⁻¹ originates from methyl rocking vibrations and C-N⁺ stretching modes from the trimethylammonium head group. The signals of reduced intensity in the 1000-1400 cm⁻¹ range arises from its long alkyl chain (C-C stretching vibration centered at 1133 cm⁻¹) while CH₂ scissoring mode appearing at 1434 cm⁻¹ may be coupled to CH₃ headgroup deformation. High frequency multiplet between 2838 cm⁻¹ and 3015 cm⁻¹, associated to CH₂/CH₃ stretching modes were also observed. All these bands are clearly visible on the spectrum of AuNRs while none of the characteristic bands of sodium oleate (C=C/C=O vibrations) used in AuNRs synthesis was found in the SERS spectra. The Raman intensity of the C-N symmetric stretching of the trimethylammonium headgroup band at 760 cm⁻¹ decrease which indicates that a significant part of the CTAB has been removed after the purification steps. Nevertheless, the washing procedure fails to remove all the CTAB molecules and we expect the residues to be close from the surface. However, the signals characteristic of CTAB are absent from the spectrum of the washed AuNR@t-SiO₂ prepared using MPTMS as a primer and new bands are observed, located at 630 cm⁻¹, and 750 cm⁻¹, that can be assigned to the stretching vibrations of the propyl chain and the thiol end group (S-C) while the peak at 678 cm⁻¹ can be assigned to the stretching mode of Si-C.⁸ The vibrational spectra in the $\nu(\text{C-H})$ region of the methyl and methylene group gives information about MPTMS and/or TEOS hydrolysis reaction. The band located at 2880 cm⁻¹ and the shoulder at 2930 cm⁻¹ correspond to symmetric and antisymmetric stretching modes of CH₂ while the bands at 2840 cm⁻¹ and 2966 cm⁻¹ may correspond to stretching modes of methyl group. The occurrence of these peaks is consistent with the incomplete hydrolysis of MPTMS/TEOS in these conditions.^{8,9} This is further confirmed by vibrational mode at 1167 cm⁻¹ attributed to CH₃ rocking vibration and vibration at 1089 cm⁻¹ which could correspond to SiO-C antisymmetric stretching.⁽⁵¹⁾ Furthermore, S-H vibration was not observed owing to the formation of Au-S bonds (vibration at 278 cm⁻¹) and an organized monolayer of MPTMS could be hypothesized based on the *trans* configuration of the C-C stretching vibration band at 991 cm⁻¹.^{9,10} Formation

of siloxane network is confirmed with the presence Si-O-Si stretching bands at 521, 795 and a contribution at 1089 cm^{-1} .¹¹

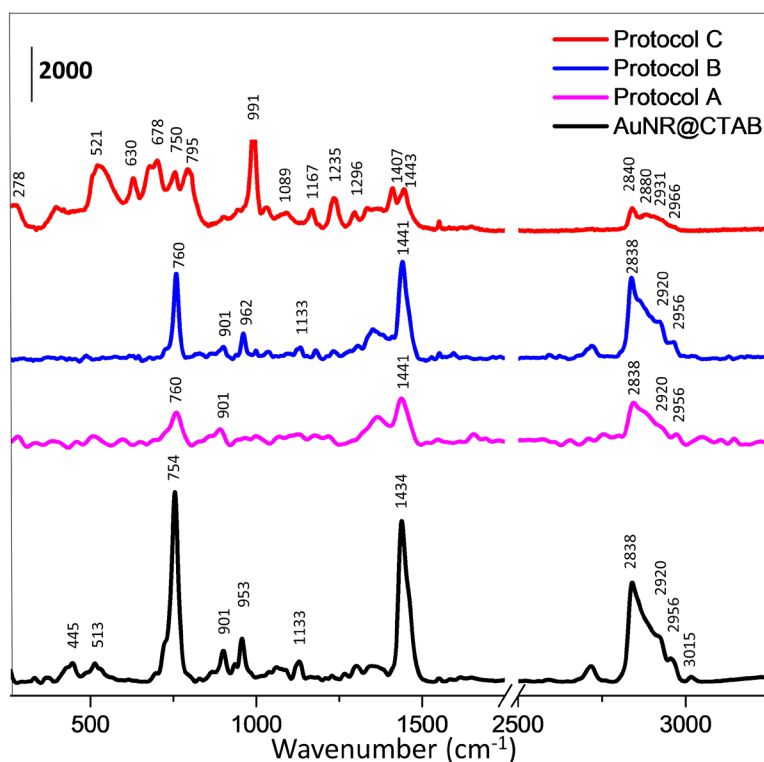


Figure S 3: Raman spectra of CTAB capped AuNRs with $[\text{CTAB}] = 1.6 \text{ mM}$ (black curve), AuNR@m-SiO₂ synthesized following protocol A on day 19 (pink curve), AuNR@l-m-SiO₂ synthesized following protocol B with 1/1.80 Au/TEOS ratio and pH monitoring (blue curve), AuNR@t-SiO₂ synthesized following protocol C with 1/1.80 Au/TEOS ratio using MPTMS primer and pH monitoring (red curve).

Table S 1: Vibration Assignment and Raman Shift Values from SERS Spectra of AuNR-CTAB, AuNR@m-SiO₂ and AuNR@t-SiO₂

Raman Shift (cm ⁻¹) ^a			Assignments ^b
AuNR@CTAB	AuNR@m-SiO ₂	AuNR@t-SiO ₂	
		278 w	Au-S
445 vw			CN ⁺ def
513 vw		521 m	v Si-O-Si
		630 m	v S-C
		678 m	v Si-C
		750 m	v S-C
754 vs	760 s		vs C-N
		795 m	v Si-O-Si
901 w	901 vw		ρ CH ₃ head group + v
958 w			CN
	962 w		
		991 s	v (C-C) _T
		1089 vw	v Si-O-Si / SiO-C
1133 vw	1133 vw		v C-C
		1167 vw	ρ CH ₃
		1235 w	τ CH ₂
		1296 vw	δ CH ₂
		1407 w	δ CH ₂ + CH ₃ head group
1434 vs			
	1441 s		
		1443 w	δ CH ₂
2838 s	2838 s		vs CH ₂
		2841 w	vs CH ₃
		2877 vw	va CH ₂
2920 w	2920 w		v CH ₃ terminal
		2931 vw	v CH ₂
2956 w	2956 w		va CH ₃ terminal
		2966 vw	va CH ₂ /CH ₃
3015 vw	3015 vw		vs CH ₃ head group

^avs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak; vw, very weak.

^bv, stretching; vs, symmetric stretching; va, antisymmetric stretching; ρ, rocking; τ, twisting; δ, scissoring.

II- Mechanism of hydrolysis and condensation of silicates:

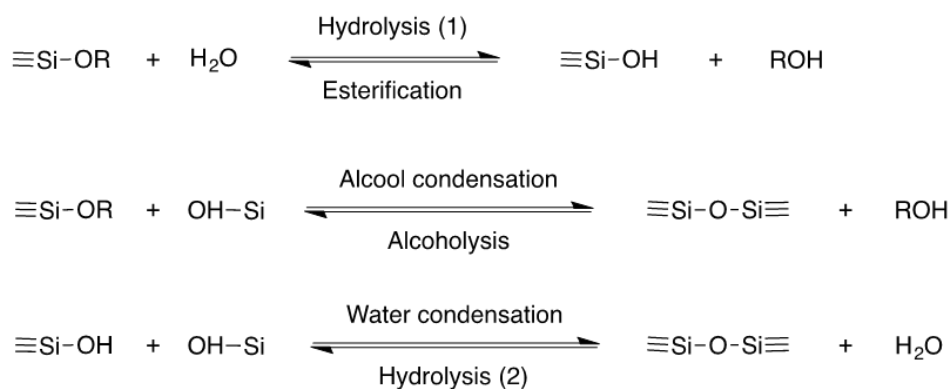


Figure S 4: Reversible sol-gel reactions of alkoxy silane, adapted from ref¹²

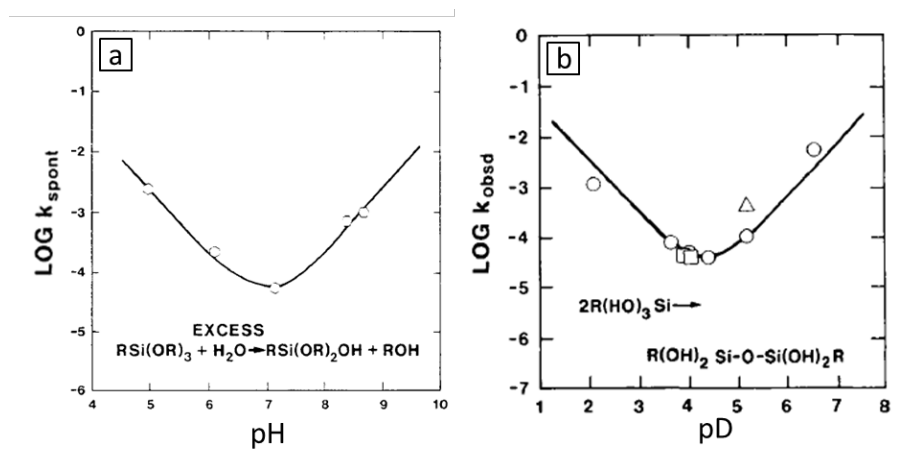


Figure S 5: pH and pD rate profile respectively for the (a) Hydrolysis and (b) Condensation of 3-Glycidyloxypropyl(trimethoxysilane) in aqueous solution adapted from ref.¹²

III- Additional results for protocol A AuNR@m-SiO₂:

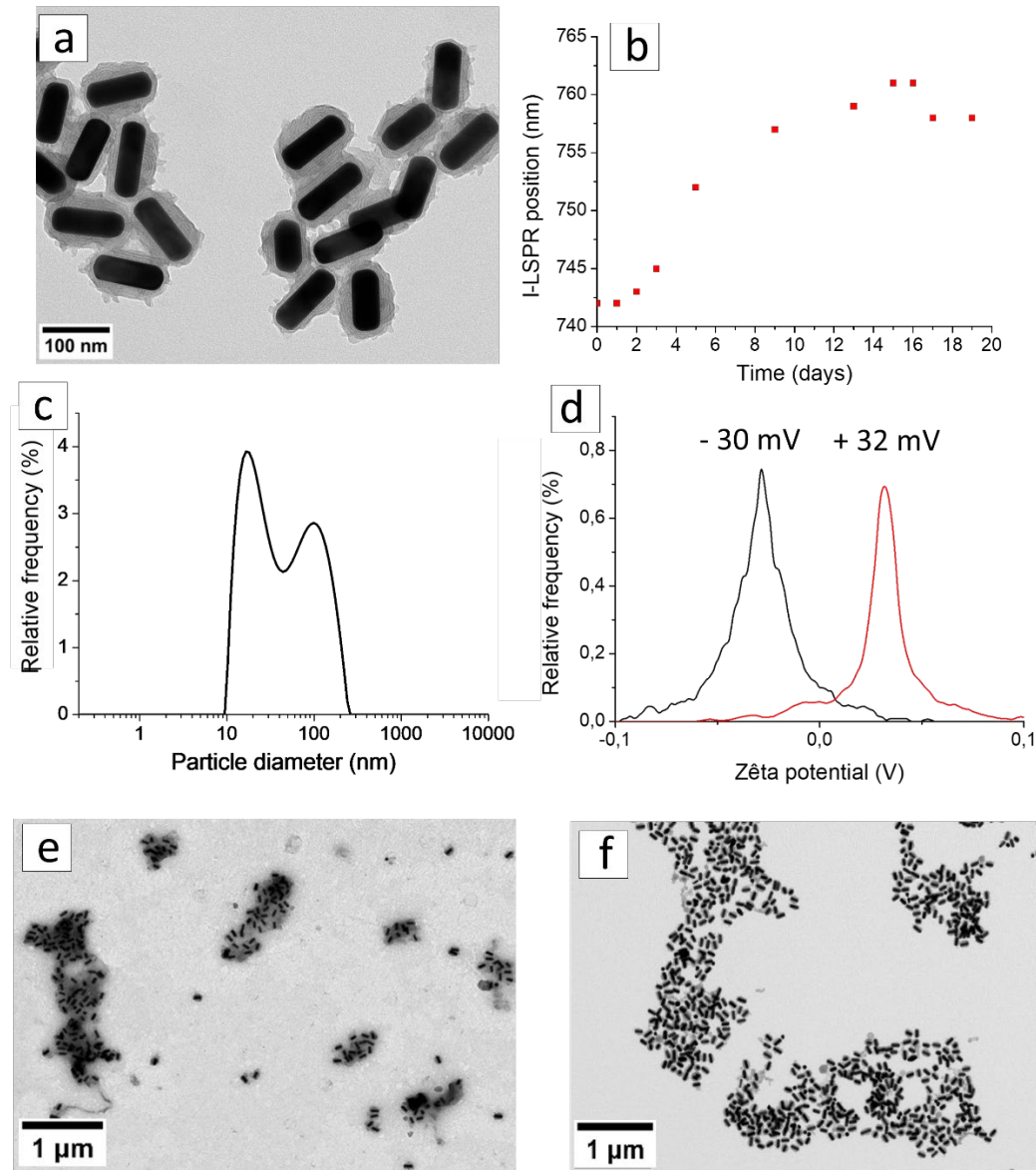


Figure S 6: Results for protocol A, AuNR@m-SiO₂: (a) Larger TEM image of AuNRs@m-SiO₂ obtained in day 13 after purification showing the parallel organization of the mesoporosity regarding the gold surface. (b) I-LSPR band position as function of reaction time, (c) Dynamic Light Scattering and (d) Zeta potential measurements of the obtained AuNR@m-SiO₂ before and after purification in day 13. (e) and (f) TEM image of as-synthesized solution in day 19 before separation of AuNRs@m-SiO₂ from the supernatant and after washing, respectively.

IV- XPS analysis of N1s photopeak:

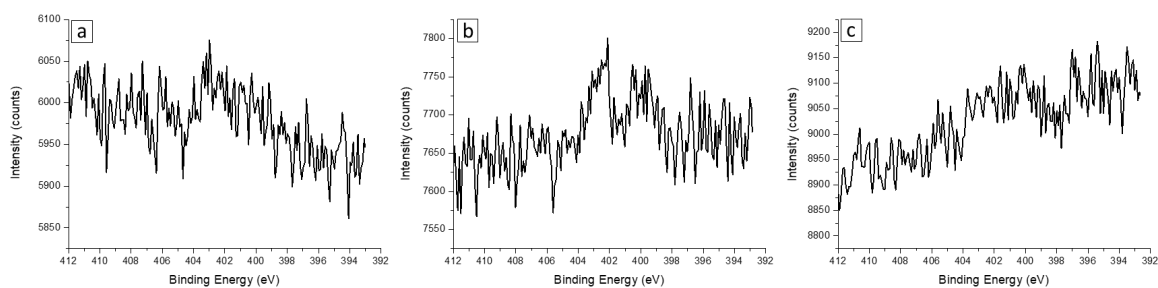


Figure S 7: XP photopeak of N 1s after washing for (a) protocol A AuNR@m-SiO₂ (b) protocol B AuNR@Lm-SiO₂ and (c) protocol C AuNR@t-SiO₂.

IV- Additional results for protocol B AuNR@Lm-SiO₂:

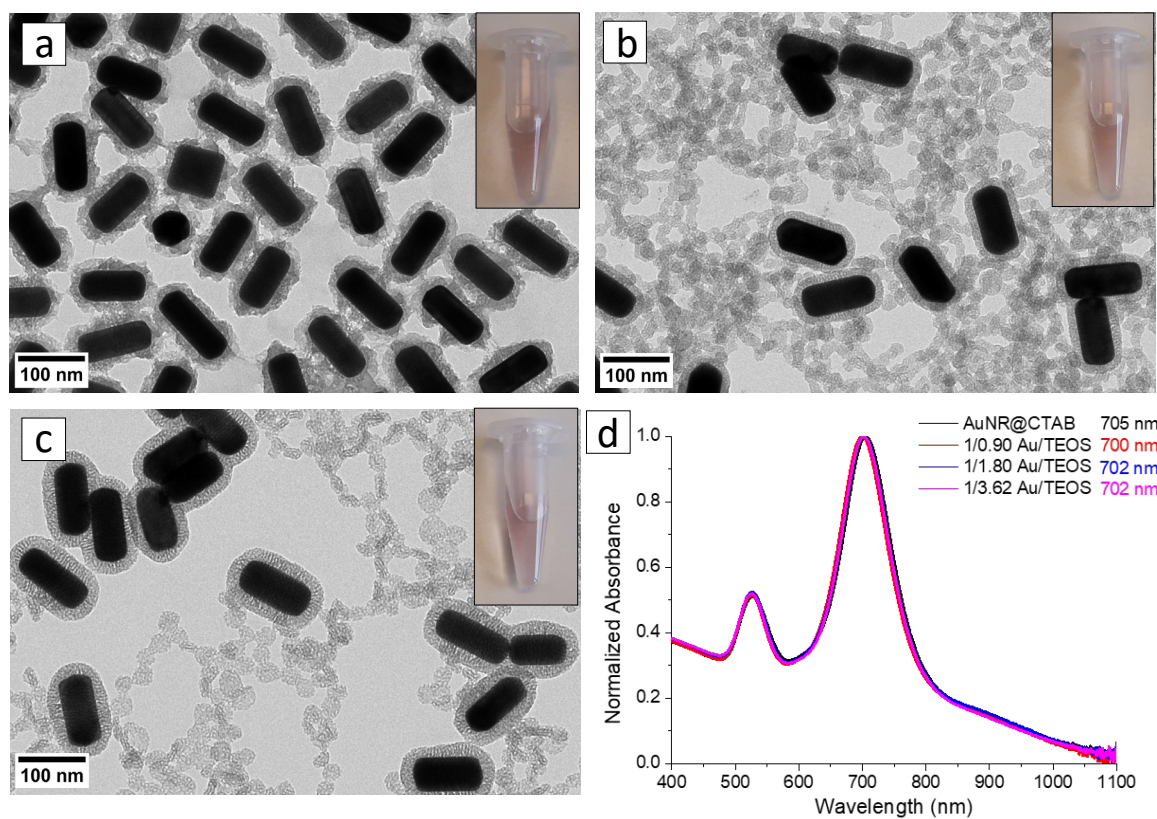


Figure S 8: TEM images and pictures of as synthesized AuNR@Lm-SiO₂ by pH modulation and quick NaOH addition with [CTAB] = 1.1 mM and different Au/ TEOS mole ratios (a) 1/0.90, (b) 1/1.80 and (c) 1/3.62, (d) Extinction spectra of AuNR@Lm-SiO₂.

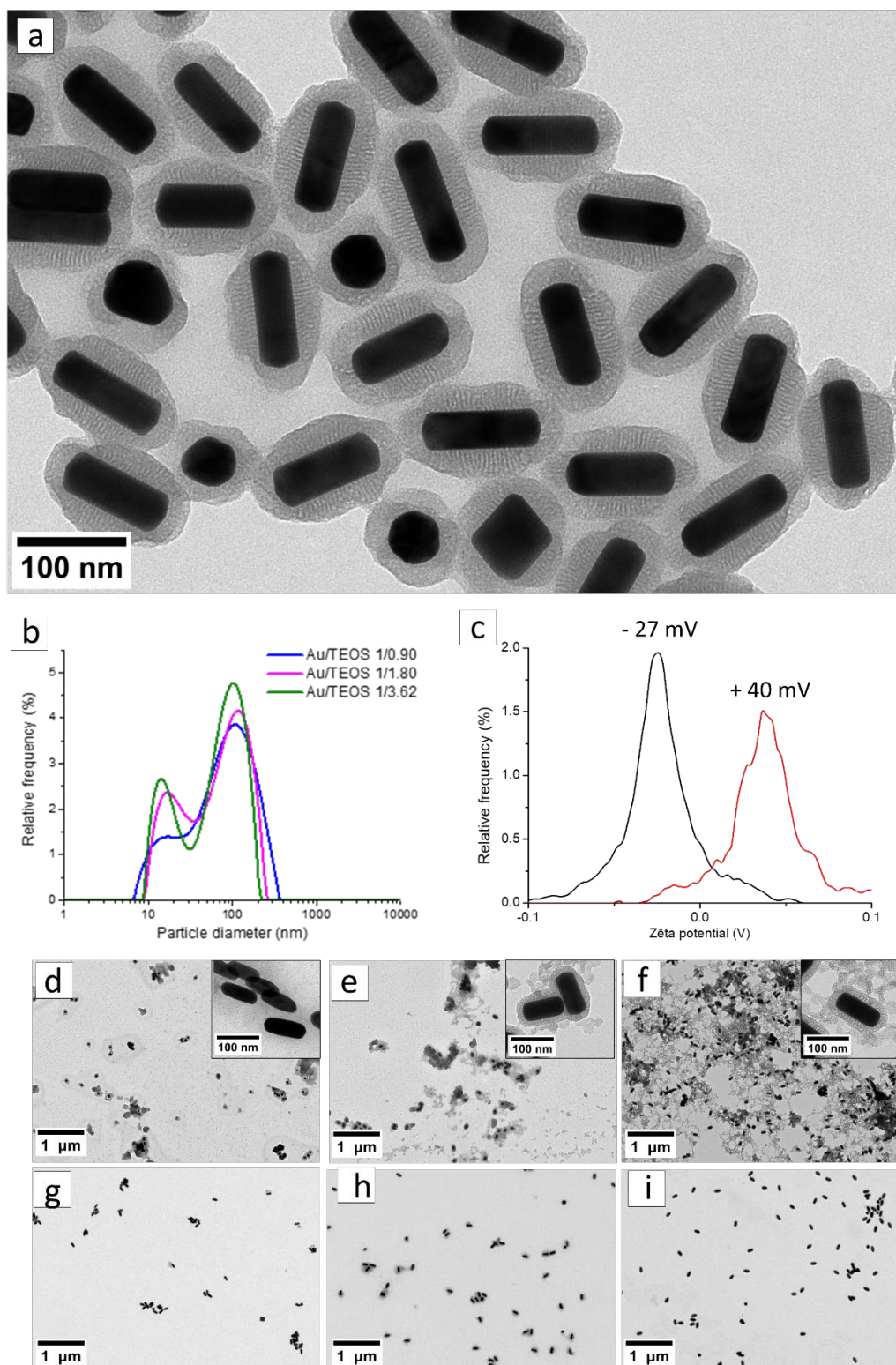


Figure S 9: (a) Large view TEM images of AuNR@1m-SiO₂ obtained with pH monitoring and [CTAB] = 1.6 mM, (b) DLS results for different Au/ TEOS ratio. (c) Typical zeta potential curves for AuNRs@1m-SiO₂ obtained before and after purification. (d) to (f) and (g) to (i) TEM images of as-synthesize solution before separation of AuNRs@1m-SiO₂ from the supernatant and after washing, for Au/TEOS 1/0.90, 1/1.80, and 1/3.62, respectively.

V- Additional results for protocol C $AuNR@t-SiO_2$:

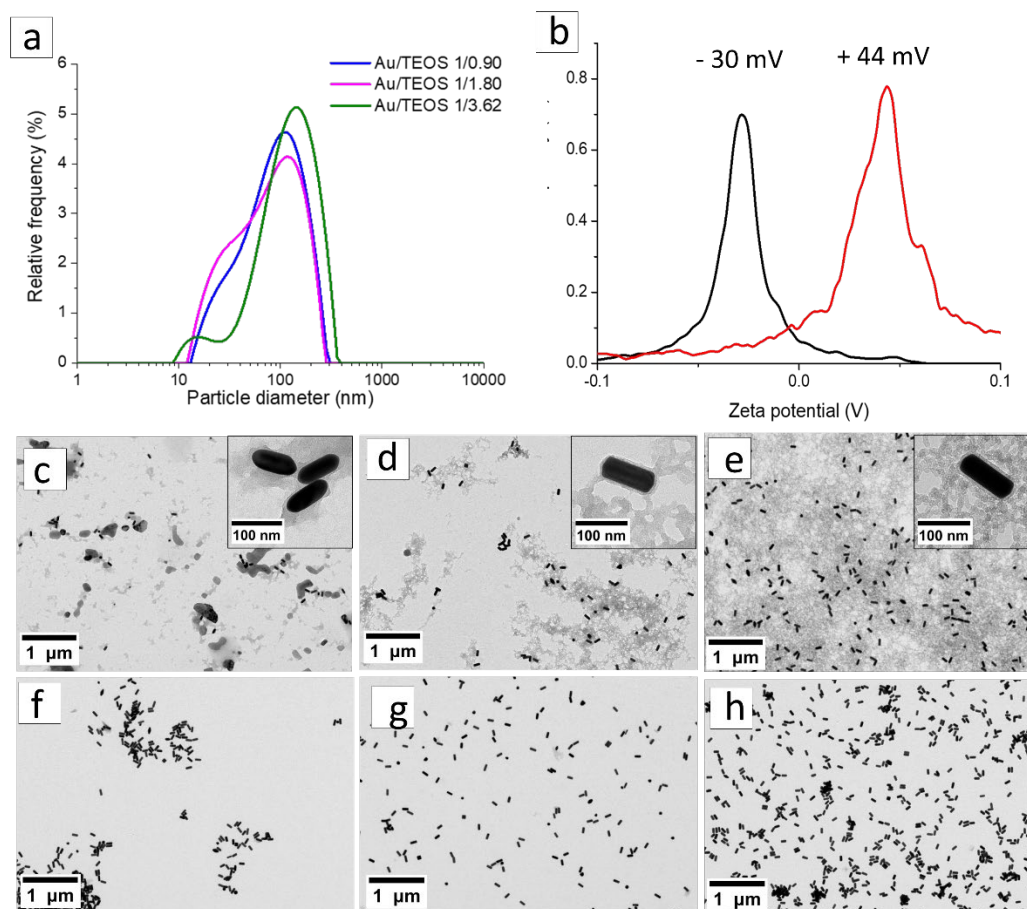


Figure S 10: (a) Dynamic Light Scattering of $AuNRs@t-SiO_2$ after purification with different Au/TEOS ratios in water at pH 6.5. (b) Typical zeta potential curves for $AuNRs@t-SiO_2$ obtained before and after purification. (c) to (h): Large view TEM images of $AuNR@t-SiO_2$ obtained with different before (c, d, and e) and after purification (f, g, and h) for Au/ TEOS ratio of 1/0.90, 1/1.80 and 1/3.62 Au/TEOS, respectively.

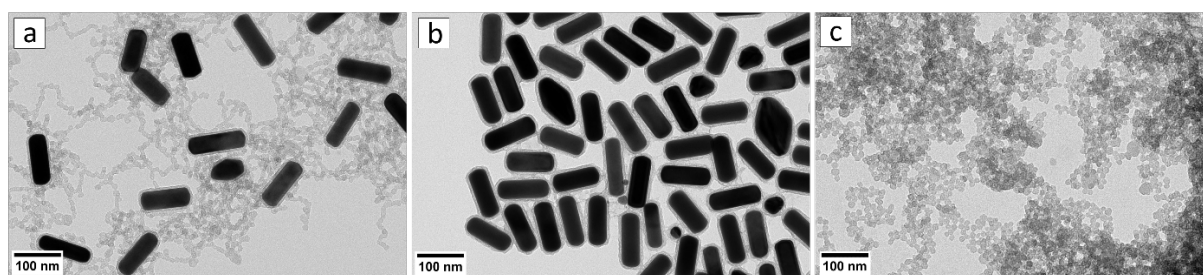


Figure S 11: TEM images of $AuNR@t-SiO_2$ synthesized with 1/3.62 Au/TEOS ratio (a) With [CTAB] = 1.1 mM after purification (b) With [CTAB] = 1.6 mM after purification and (c) Supernatant when 1.6 mM CTAB was used.

REFERENCES

- (1) Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6* (21), 4270–4279. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b02123>.
- (2) Burrows, N. D.; Harvey, S.; Idesis, F. A.; Murphy, C. J. Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments. *Langmuir* **2017**, *33* (8), 1891–1907. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03606>.
- (3) Ye, X.; Zheng, C.; Chen, J.; Gao, Y.; Murray, C. B. Using Binary Surfactant Mixtures To Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods. *Nano Letters* **2013**, *13* (2), 765–771. <https://doi.org/10.1021/nl304478h>.
- (4) Glidden, M.; Muschol, M. Characterizing Gold Nanorods in Solution Using Depolarized Dynamic Light Scattering. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (14), 8128–8137. <https://doi.org/10.1021/jp211533d>.
- (5) Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Lang, P. R. Dynamic Light Scattering of Short Au Rods with Low Aspect Ratios. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (13), 5020–5025. <https://doi.org/10.1021/jp067049x>.
- (6) Lee, S.; Anderson, L. J. E.; Payne, C. M.; Hafner, J. H. Structural Transition in the Surfactant Layer That Surrounds Gold Nanorods as Observed by Analytical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Langmuir* **2011**, *27* (24), 14748–14756. <https://doi.org/10.1021/la202918n>.
- (7) Dendramis, A. L.; Schwinn, E. W.; Sperline, R. P. A Surface-Enhanced Raman Scattering Study of CTAB Adsorption on Copper. *Surface Science* **1983**, *134* (3), 675–688. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(83\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0039-6028(83)90065-1).
- (8) Thompson, W. R.; Pemberton, J. E. Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers of (3-Mercaptopropyl)Trimethoxysilane on Silver: Orientational Effects of Hydrolysis and Condensation Reactions. *Chem. Mater.* **1993**, *5* (3), 241–244. <https://doi.org/10.1021/cm00027a001>.
- (9) Thompson, W. R.; Cai, M.; Ho, M.; Pemberton, J. E. Hydrolysis and Condensation of Self-Assembled Monolayers of (3-Mercaptopropyl)Trimethoxysilane on Ag and Au Surfaces. *Langmuir* **1997**, *13* (8), 2291–2302. <https://doi.org/10.1021/la960795g>.
- (10) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G. Comparison of the Structures and Wetting Properties of Self-Assembled Monolayers of n-Alkanethiols on the Coinage Metal Surfaces, Copper, Silver, and Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (19), 7152–7167. <https://doi.org/10.1021/ja00019a011>.
- (11) Bertoluzza, A.; Fagnano, C.; Antonietta Morelli, M.; Gottardi, V.; Guglielmi, M. Raman and Infrared Spectra on Silica Gel Evolving toward Glass. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1982**, *48* (1), 117–128. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(82\)90250-2](https://doi.org/10.1016/0022-3093(82)90250-2).
- (12) Brinker, C. J. Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1988**, *100* (1), 31–50. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(88\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0022-3093(88)90005-1).

**Chapitre III : Optimisation de la fonctionnalisation
et conjugaison des AuNR@SiO₂ pour l'élaboration
d'immunocapteurs LSPR en solution**

Avant-propos

Ce chapitre contient cinq parties. La première est consacrée à une étude bibliographique sur l'utilisation des AuNR@SiO₂ pour l'élaboration de biocapteurs plasmoniques utilisant un anticorps comme élément de reconnaissance moléculaire (immunocapteurs). Cette partie traite dans un premier temps de l'état de l'art des méthodes permettant le greffage et la caractérisation de silanes fonctionnels à la surface des AuNR@SiO₂; puis de l'immobilisation d'anticorps sur leur surface et enfin des différents dispositifs analytiques LSPR reportés dans la littérature. La deuxième partie porte sur l'optimisation des paramètres expérimentaux pour l'introduction de silanes fonctionnels à la surface de nanoparticules de silice (SiNPs) modèles. Dans la troisième partie, deux différents silanes sont utilisés pour fonctionnaliser les AuNR@t-SiO₂ obtenues dans le chapitre précédent (celles-ci seront appelées AuNR@SiO₂ pour la suite du manuscrit), les greffages sont mis en évidence par différentes techniques de caractérisation. Les particules obtenues sont ensuite utilisées dans la partie quatre pour immobiliser un biorécepteur de type IgG à leur surface ; le nombre de récepteurs sur les différents conjugués est quantifié. Dans la cinquième et dernière partie, les particules conjuguées obtenues sont utilisées comme nanosondes plasmoniques pour l'élaboration d'immunocapteurs en solution permettant la détection d'une cible modèle, l'IgG de lapin.

Partie 1 : Etat de l'art

1. Modification de surface et fonctionnalisation des AuNR@SiO₂ par des alkoxy-silanes

a) Procédé de silanisation

Les propriétés physico-chimiques de la coquille de silice des AuNRs sont déterminées par les groupements silanols et siloxanes présents en surface et au sein de sa structure interne. Le nombre abondant de groupements hydroxyles à la surface des AuNR@SiO₂ rend possible leur fonctionnalisation par des silanes lors d'une réaction de silanisation. Les silanes les plus utilisés sont les alkoxy-silanes, ils possèdent une à trois fonctions hydrolysables ainsi qu'un groupement terminal définissant la fonctionnalité chimique de la surface (Figure 1)¹. Celui-ci peut ensuite être utilisé pour une modification ultérieure des particules lors d'une réaction de couplage avec une molécule d'intérêt.

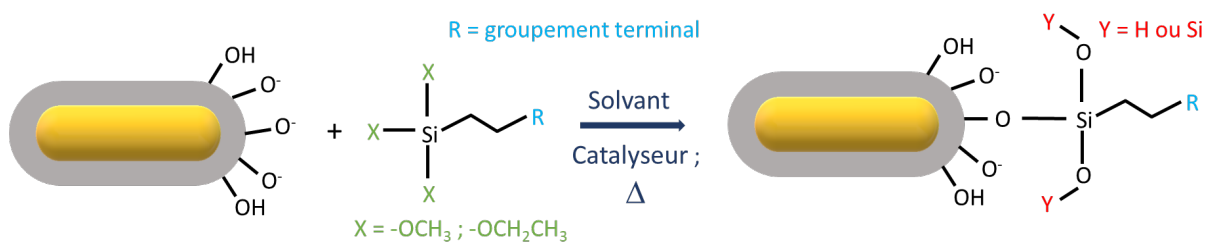


Figure 1 : Schéma général de la réaction de silanisation de la surface de AuNR@SiO₂.

L'introduction de ces fonctions se fait par liaisons covalentes qui aboutissent à la création de ponts siloxanes au cours de réactions sol-gel. Ces réactions ont été introduites dans le chapitre 2 et peuvent être décrites comme une succession de réactions d'hydrolyse et de condensation². Les méthodes et paramètres expérimentaux conduisant au greffage de silanes fonctionnels sur des surfaces d'oxyde de silicium sont bien décrites dans la littérature³⁻⁵. Ainsi, les processus interfaciaux gouvernant la réaction dépendent de nombreux paramètres tels que la nature du silane utilisé⁶, sa concentration⁷, la teneur en eau du milieu⁷, le pH², la température et le temps de réaction⁸. Un contrôle fin de ces paramètres est nécessaire afin de favoriser la réaction de greffage à la surface des particules (condensation hétérogène) et minimiser les réactions de condensation intermoléculaires (condensation homogène). Une importante bibliothèque d'alkoxy-silanes disponibles dans le commerce permet l'introduction d'une grande diversité de groupements fonctionnels comme des amines, aldéhydes, époxydes ou encore

thiols. Classiquement, la silanisation se fait selon deux méthodes : la co-condensation et la post-fonctionnalisation. Ces méthodes initialement développées sur des nanoparticules de silice ont été extrapolées à la silanisation de AuNRs enrobés d'une coquille de silice. Les techniques expérimentales permettant l'observation et la caractérisation de surfaces siliciques ont été résumées par Rimola et al.⁹. Dans les paragraphes ci-dessous sont discutés différents exemples tirés de la littérature de silanes employés pour la fonctionnalisation des AuNR@SiO₂ et les caractérisations de surface permettant la mise en évidence du greffage.

b) Méthode de co-condensation

La méthode de co-condensation implique la synthèse et la fonctionnalisation simultanée de la coquille de silice en surface des AuNRs *via* l'hydrolyse et la condensation d'un ou plusieurs alcoxysilanes fonctionnels et du précurseur de silice dans un mélange éthanol/eau au cours d'une réaction catalysée par la présence de base (NH₄OH ou NaOH). L'ajout d'un alcoxysilane fonctionnel au milieu de réaction peut se faire de manière simultanée¹⁰ ou séquentielle¹¹⁻¹³ à l'ajout du TEOS. Le Tableau 1 présente les principaux paramètres de protocoles de silanisation pour les références citées dans ce paragraphe. Cette méthode permet d'introduire au cours d'une réaction en *one pot* le groupement fonctionnel désiré. De cette manière, Qi et al. ont introduit des fonctionnalités amines au sein de la coquille de silice via l'utilisation de (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). Son incorporation dans la coquille a été mise en évidence par zétamétrie¹³, la charge de surface positive de 15,4 mV à pH 6,0 a été attribuée aux groupements amines protonés. De la même manière, Wang et al. ont introduit des groupements amines via l'utilisation de (3-Aminopropyl)triméthoxysilane (APTMS)¹¹. L'analyse par spectroscopie UV-Visible des particules avant et après introduction de l'APTMS a mis en évidence un déplacement de la bande plasmon longitudinale de 6 nm, attribué à un épaissement de la coquille de silice, néanmoins ils ne fournissent pas d'images de microscopie pour appuyer cette interprétation. L'incorporation de fonctionnalités thiols par le (3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane (MPTMS) a été discutée par Inose et al. au regard de la stabilité colloïdale des particules silanisées dans l'eau ou l'éthanol¹². Alors que la suspension colloïdale conserve sa couleur rose pâle dans l'éthanol, la sédimentation et l'agrégation des particules ont été observées dans l'eau après silanisation. Cela a été attribué à la formation de ponts disulfures inter-particulaires à la suite de l'oxydation des groupements thiols par l'oxygène dissous en milieu aqueux. Par comparaison avec des AuNR@SiO₂ ils ont également observé par microscopie électronique à transmission que l'incorporation de MPTMS en cours

de synthèse ne conduit pas à une augmentation significative de l'épaisseur de la coquille de silice.

Des études menées sur des silices mésoporeuses de type MCM 41 et SBA 15 ont montré que la méthode de co-condensation conduit à une distribution homogène du silane fonctionnel dans la matrice de silice et que l'organisation structurale des pores dépend de la concentration du silane utilisé^{14,15}. Néanmoins, les différences structurales entre les réactifs utilisés conduisent à favoriser la condensation homogène, indésirable, au détriment de la formation de nanostructures multifonctionnelles en raison de cinétiques d'hydrolyse et de condensation différentes. D'autres désavantages de la méthode sont l'élimination incomplète du CTAB présent dans les pores et l'inaccessibilité des groupements fonctionnels piégés dans la matrice de silice¹⁶. Pour ces raisons, la méthode de co-condensation est peu appliquée à la silanisation des AuNR@SiO₂, contrairement à la méthode de post-fonctionnalisation.

Tableau 1 : Paramètres de greffage extraits de la littérature lors de la silanisation des AuNR@SiO₂ par co-condensation ou post-fonctionnalisation d'un silane fonctionnel avec le TEOS comme précurseur de silice.

Référence	Taille AuNR (Lxl) / Epaisseur SiO ₂	Silane fonctionnel	Solvant	[Silane fonctionnel]	Catalyseur	Conditions réaction	Ajout Silane
Silanisation par co-condensation							
Wang et al ¹¹	50 x 20 nm 15 nm	(3-Aminopropyl)triméthoxysilane	EtOH	Np*	NH ₄ OH pH 10	3 h / 80 °C	Séquentiel
Inose et al ¹²	11 x 41 nm 45 nm	(3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane	EtOH/H ₂ O	0,5 mM	NaOH	24 h / 35 °C	Séquentiel
Qi et al ¹³	31 x 8 nm 16 nm	(3-Aminopropyl)triéthoxysilane	EtOH/H ₂ O	Np*	NaOH pH 10	12 h / 30 °C ; 24 h / 45 °C	Séquentiel
Chen et al ¹⁰	122 x 21 nm 40 nm	1,2-Bis(triéthoxysilyl)éthane / (3-Aminopropyl)triéthoxysilane	EtOH/H ₂ O 1/3 (v/v)	4,3 / 0,7 mM	NH ₄ OH	24 h / 35 °C	Simultané
Silanisation par post-fonctionnalisation							
Zeiderman et al ¹⁷	Np*	(3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane	EtOH	17 mM	Acide acétique pH ~ 3,6	24 h / T.A.	-
Sendroiu et al ¹⁸	50 x 10 nm 4 nm	(3-Triméthoxysilyl)butylaldehyde	H ₂ O	100 µM	Basique ~ pH 8	24 h / T.A.	-
Abadeer et al ¹⁹	Np* / 11 à 26 nm	(3-Azidopropyl)triméthoxysilane	EtOH	20 mM	non	10 h / 80 °C	-
Wang et al ²⁰	60 x 15 nm 40 nm	(3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane	H ₂ O	3 mM	non	5 h / T.A.	-
Ma et al ²¹	20 x 5 nm 28nm	(3-Triméthoxysilyl)propylméthacrylate	H ₂ O	525 µM	non	4 h / T.A.	-
Huang et al ²²	46 x 18 nm 9 nm	(3-Aminopropyl)triméthoxysilane	EtOH	Diluée	non	3 h / 80 °C	-
Liu et al ²³	41x 11 nm 16 nm	(3-Aminopropyl)triéthoxysilane	EtOH	5 mM	non	24 h / 60 °C	-

*Np : Non précisé

c) Méthode de post-fonctionnalisation

La méthode par post-fonctionnalisation se réfère à l'introduction de groupements fonctionnels préférentiellement à la surface de AuNR@SiO₂ possédant une coquille de silice préformée et dont le CTAB est généralement éliminé des pores lors d'une étape ultérieure. Cette méthode a permis le greffage d'une variété de fonctions terminales telles que des époxydes¹⁷, aldéhydes¹⁸, azotures¹⁹, thiols²⁰, méthacrylates²¹ et amines^{22,23} par réaction en milieu aqueux ou alcoolique pouvant être catalysée en présence d'acide ou de base. Le Tableau 1 présente les principaux paramètres de protocoles de silanisation reportés dans les références citées ci-dessus. Le greffage de silane azoture a été réalisé par Abadeer et al.¹⁹. Les auteurs ont confirmé la silanisation des particules par spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR) avec l'apparition d'un signal caractéristique du groupement azoture à 2100 cm⁻¹ et les mesures de zétamétrie montrent la neutralisation de la charge de surface des particules (- 32 mV à + 1 mV). Ces techniques ont également été utilisées par Huang et al.²² et Chang et al.²⁴ et pour mettre en évidence les groupements amines à la surface des particules. Les auteurs ont observé une charge de surface positive et les modes de vibration caractéristiques des fonctions amines vers 1600 cm⁻¹. Ces derniers ont également observé par physisorption de N₂ une diminution de la surface spécifique de la coquille de silice de 422 m².g⁻¹ à 142 m².g⁻¹ après greffage d'APTES, concluant à un bouchage des pores²⁴.

Le choix du groupement fonctionnel peut être limité par sa réactivité avec les groupements hydrolysables éthoxy/méthoxy. En effet, pour les silanes dérivés d'acides carboxyliques, on s'attend à une réaction entre le groupe carboxyle et le centre du silicium, entraînant une hydrolyse catalysée par l'acide suivie d'une condensation, ou la formation de cycles par O-acylation²⁵. Pour cette raison, ces silanes ne sont pas disponibles commercialement. Pour résoudre ce problème, Zhang et al.²⁶ ont fait réagir les fonctions amines en surface des AuNR@SiO₂ silanisés par l'APTES avec l'anhydride succinique dans le DMSO en présence de triéthylamine. La mise en évidence du greffage a été faite par zétamétrie (charge de surface évolue de + 30 mV à -20 mV) et par FT-IR avec l'apparition de la vibration d'élongation du C=O vers 1750 cm⁻¹. Alternativement, Cao et al. ont introduit des fonctions acides de surface en utilisant un silane portant une fonction anhydride, l'anhydride 3-(triéthoxysilyl)propylsuccinique²⁷. Les fonctions terminales amine en surface des AuNR@SiO₂ traités par l'APTES ont également été utilisées par Shen et al. pour introduire des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) à la surface des particules en faisant réagir le groupement

N-hydroxysuccinimide (NHS) d'un dérivé PEG bifonctionnel (Masse molaire : 3500 Da)²⁸. Les auteurs ont relevé que la fonctionnalisation des particules a conduit à l'augmentation du diamètre hydrodynamique de 118,6 à 143,9 nm et prévient l'agrégation des particules dans l'eau pendant 24 h. Dans une approche similaire, Wang et al. ont introduit des chaînes de PEG en faisant réagir un dérivé PEG maleimide (Masse molaire : 2000 Da) à la surface des AuNR@SiO₂ préalablement silanisés par le MPTMS²⁰. Les auteurs ont observé que le revêtement PEG conduit à une neutralisation de la charge de surface des particules (de -14,1 mV à - 0,06 mV) et un diamètre hydrodynamique de 41,8 nm.

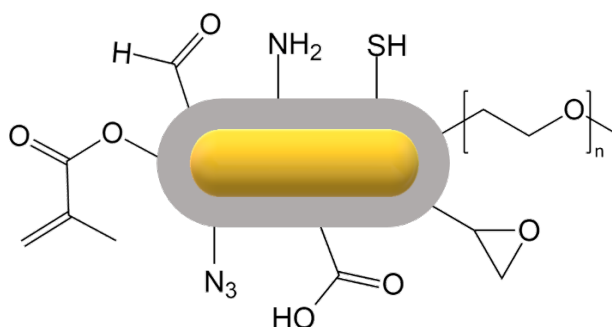


Figure 2 : Groupements fonctionnels pouvant être introduits à la surface des AuNR@SiO₂.

Dans les articles présentés ci-dessus, l'étape de silanisation des particules n'est pas centrale dans l'étude. C'est une étape considérée comme maîtrisée et la caractérisation des fonctions greffées n'est pas souvent réalisée avant les étapes de conjugaison et d'application^{17,18,21,23,28-32}. La diversité des groupements fonctionnels de surface (Figure 2) rend possible l'immobilisation de protéines, polymères, petites molécules ou brins d'ADN par des liaisons covalentes robustes par des réactions de couplage. Concernant les biocapteurs, cadre dans lequel s'inscrit ce travail, la densité de groupes fonctionnels en surface peut affecter la quantité de récepteurs immobilisés et *in fine* impacter les performances du capteur. En effet, la densité surfacique de l'élément de reconnaissance est liée à l'efficacité ainsi qu'à la sensibilité de la détection d'interactions spécifiques.

2. Utilisation des AuNR@SiO₂ comme immunocapteurs LSPR

2.1 Les anticorps, éléments de reconnaissance moléculaire

a) Les anticorps

Les anticorps sont des protéines de type immunoglobuline (Ig) produits par un hôte en réponse à une macromolécule étrangère appelée antigène. Il existe cinq isotypes IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, le plus courant étant l'IgG. Son poids moléculaire est de 150 kDa et sa taille approximative de 12 x 14 x 7 nm³³. Ce sont des glycoprotéines en forme de « Y » composées de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes identiques (Figure 3). L'appariement d'une chaîne lourde et une chaîne légère se fait *via* des ponts disulfures pour former un hétérodimère. Celui-ci s'associe avec un autre hétérodimère identique aussi à travers des ponts disulfures pour former l'immunoglobuline. Les anticorps sont composés de différents fragments : un fragment cristallisable (Fc) et deux fragments de liaison à l'antigène (Fab). Les deux fragments Fab sont reliés au fragment Fc par une région centrale, ce qui leur permet d'avoir une certaine flexibilité vis-à-vis de Fc. Les résidus glucidiques positionnés au niveau du fragment Fc, jouent un rôle dans la stabilité et la fonction de l'anticorps³⁴. Chaque région Fab possède un site identique de liaison à l'antigène lui permettant de se lier de manière spécifique³⁵. La polyvalence de ces sites de reconnaissance pour différentes classes d'antigènes est utilisée dans le développement de banques d'anticorps de spécificités et d'affinités différentes.

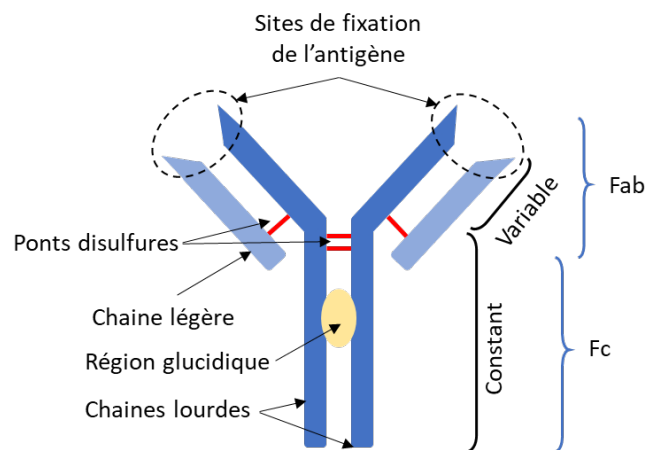


Figure 3 : Schéma général d'un anticorps et de ses principales régions.

Des méthodes d'ingénierie moléculaire exploitent les propriétés structurales des IgG pour les conjuguer à d'autres molécules ou les immobiliser sur des surfaces. Ils peuvent aussi être utilisés sous forme de fragments^{36,37}. Les anticorps se classent suivant leur capacité à reconnaître un ou plusieurs sites (aussi appelés épitopes) à la surface d'un antigène ; on parle alors respectivement d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

b) Interaction Antigène/anticorps

Différents modèles permettent de décrire les interactions antigène/anticorps : le modèle clé-serrure, l'ajustement induit ou de sélection conformationnelle³⁸. Dans le modèle clé-serrure, les deux macromolécules interagissent de manière à minimiser les changements conformationnels à la surface des deux protéines. Ainsi, l'anticorps et l'antigène gardent une structure proche avant et après interaction. Inversement, dans le modèle de l'ajustement induit et de la sélection conformationnelle, les changements de conformation sont importants et renvoient à la plasticité du site de liaison à l'antigène et de la région centrale de l'anticorps ainsi qu'à l'influence du micro-environnement sur la conformation de l'antigène au moment de sa liaison. Cette interaction fait intervenir des interactions faibles non covalentes du type liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, de Van der Waals et hydrophobes³⁸.

La force de l'interaction antigène/anticorps définit l'affinité d'un anticorps pour sa cible, elle peut être déterminée quantitativement par la mesure de la constante de dissociation à l'équilibre (K_d)³⁹. Le K_d caractérise la réaction de dissociation du complexe et est inversement proportionnel à l'affinité de l'anticorps pour son ligand, facteur crucial pour l'élaboration d'immunocapteurs performants et sensibles. En effet, un anticorps plus affiné permettra de détecter de plus faibles quantités d'antigène⁴⁰. Lors de l'étape d'immobilisation des anticorps à la surface des AuNR@SiO₂, aussi appelée conjugaison, il faut veiller à ne pas altérer la conformation de l'anticorps afin qu'il conserve sa capacité à se lier à son antigène avec une grande affinité. Idéalement, l'orientation relative de l'anticorps par rapport à la surface devrait aussi être maîtrisée pour préserver sa capacité à capturer l'antigène à l'interface solide – liquide.

2.2 Méthodes d'immobilisation d'anticorps à la surface des AuNR@SiO₂

Il existe plusieurs méthodes d'immobilisation d'anticorps à la surface des AuNR@SiO₂. La littérature en mentionne deux : la physisorption, qui se réfère à l'adsorption physique à travers des liaisons faibles et la chimisorption, qui correspond à l'adsorption chimique par le biais de liaisons covalentes⁴¹.

a) Physisorption

A pH physiologique, la charge de surface développée par la silice et les anticorps est négative en raison de leur point de charge nul et point isoélectrique respectivement autour de 2-3,5⁴² et 6⁴³. La force motrice responsable de l'adsorption des protéines sur des surfaces est une combinaison d'interactions faibles de type électrostatique, de liaisons hydrogène et de Van der Waals entre les groupements silanolate de surface et les groupements polaires et les acides aminés chargés positivement présents sur certaines localités de la surface des IgG⁴¹. Le pH joue aussi un rôle prédominant sur leur adsorption et orientation³⁶. La physisorption est une méthode facile à mettre en œuvre ne nécessitant qu'une seule étape. Elle a été utilisée par Song et al.⁴⁴ et Zhang et al.⁴⁵ pour immobiliser des anticorps spécifiques d'*E. coli* à la surface des AuNR@SiO₂ en milieu tamponné à pH 7,4. Néanmoins, la chimisorption est une méthode souvent privilégiée afin d'éviter le phénomène de désorption mais aussi pour permettre un meilleur contrôle sur le nombre et l'orientation des sites de reconnaissance.

b) Chimisorption

La chimisorption se réfère à la formation de liaisons covalentes entre la surface des AuNR@SiO₂ et l'anticorps par le biais d'un silane fonctionnel préalablement introduit. La méthode la plus répandue implique l'introduction de silanes terminés par une fonction amine à la surface des particules, suivie du couplage d'une des fonctions carboxyles portées par l'anticorps activée en ester en présence d'un mélange de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de N-hydroxysuccinimide (NHS) et conduisant à la formation de fonctions amides⁴⁶. Cette réaction a également été employée pour le couplage des fonctions amines de l'anticorps avec les groupements carboxyles en surface des AuNR@SiO₂²⁷. Une stratégie en deux étapes a été utilisée par Wang et al., faisant réagir les amines de surface avec le glutaraldéhyde ; les terminaisons aldéhydes sont ensuite disponibles pour les fonctions amines de l'anticorps²⁹. Alternativement, le recours à un silane aldéhyde

permet de réaliser cette réaction en une étape¹⁸. On note qu'aucune de ces méthodes ne permet de maîtriser l'orientation des anticorps à la surface des AuNR@SiO₂ en raison de la présence des fonctions couplées sur différentes régions de l'anticorps.

L'intégration de conjugués AuNR@SiO₂ dans des capteurs électrochimiques^{45,47} et de résonance plasmon de surface (SPR)¹⁸ a été rapportée. Nous nous intéresserons dans la suite uniquement aux immunocapteurs exploitant l'effet LSPR des AuNR@SiO₂.

2.3 Les AuNR@SiO₂, transducteurs de reconnaissance moléculaire

Cette technique de transduction exploite l'exaltation du champ électromagnétique du plasmon confiné en surface des AuNRs. En raison de leur forme anisotrope, l'effet LSPR des AuNRs donne lieu à deux bandes plasmoniques : la bande transversale vers 520 nm et la bande longitudinale dont la position est ajustable sur la région du proche infrarouge du spectre électromagnétique⁴⁸. Cette dernière présente un coefficient d'extinction molaire élevé⁴⁹ ($\sim 10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et est particulièrement sensible au changement d'indice de réfraction du milieu environnant, ce qui se manifeste par un déplacement de sa position vers une région de plus basse énergie. La sensibilité à la variation d'indice de réfraction est habituellement exprimée en nanomètre par unité d'indice de réfraction (nm/RIU). Néanmoins l'effet LSPR se dissipe rapidement à mesure que l'on s'éloigne de la surface des particules comme le décrit l'Équation 1⁵⁰. Par conséquent, la bande LSPR longitudinale permet de sonder uniquement les interactions moléculaires dans une région nanométrique entourant la nanoparticule.

$$\Delta\lambda = m \times (n_{\text{adsorbat}} - n_{\text{milieu}}) \times \left(1 - e^{\left(-\frac{2d}{l_d}\right)} \right)$$

Équation 1 : Relation décrivant le déplacement de la bande LSPR en fonction de l'indice de réfraction à proximité des particules. m : le facteur de sensibilité des nanoparticules en nm/RIU, n : indice de réfraction, d : épaisseur de la couche adsorbée en nm et l_d la décroissance du champ électromagnétique en nm.

L'exploitation des propriétés optiques des AuNRs a permis l'élaboration de nombreux biocapteurs,⁵⁰ les derniers développements dans ce domaine ont fait l'objet d'une parution dans la revue Biosensors parue en octobre 2020⁵¹.

L'évolution du facteur de sensibilité des AuNR@SiO₂ recouverts d'une coquille de silice mésoporeuse de 2 à 20 nm a été étudiée en 2017 par Song et al. en mesurant le spectre d'absorption des particules en solution contenant une concentration croissante de glycérol destinée à faire varier l'indice de réfraction du milieu (Figure 4)⁴⁴.

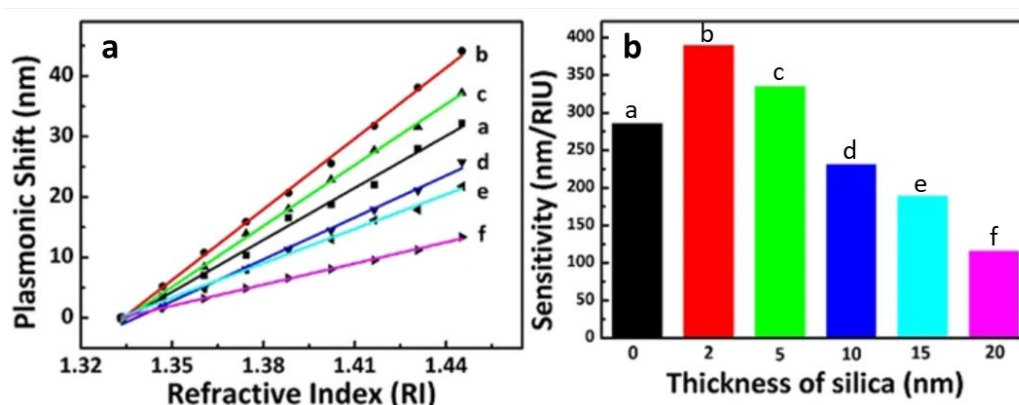


Figure 4 : (a) Comparaison des facteurs de sensibilité à l'indice de réfraction des AuNRs (a) et AuNR@SiO₂ d'épaisseur de coquille croissante de 2 nm à 20 nm (de b à f). (b) Histogramme présentant les différences de sensibilité des AuNRs et AuNR@SiO₂. Images issues de ⁴⁴.

Comme il a été montré sur les AuNRs non recouverts de silice, la sensibilité décroît avec la distance de la surface des particules^{52,53}. Néanmoins, Song et al. ont observé une sensibilité supérieure pour les AuNR@SiO₂ recouverts d'une fine coquille de silice de 2 nm et 5 nm (respectivement de 390 nm/RIU et 340 nm/RIU) par rapport aux AuNRs (290 nm/RIU ; rapport d'aspect 2,9)⁴⁴. Cette augmentation de la sensibilité a été expliquée *via* l'Équation 1 et la faible contribution de d après enrobage conduit à négliger le facteur de l'exponentielle. Cette interprétation est cependant insuffisante au regard de l'épaisseur de la bicouche de CTAB de 3 nm sur les AuNR@CTAB. En effet, l'équation 1 justifierait l'absence d'augmentation de la sensibilité LSPR pour les AuNR@SiO₂ dont l'épaisseur de coquille est comparable à la bicouche de CTAB. Cependant la contribution de d est plus marquée pour des épaisseurs de silice plus importantes, ce qui explique la diminution de sensibilité. Cette étude ouvre un nouveau champ dans le développement de capteurs LSPR à base de AuNR@SiO₂.

A notre connaissance, seules deux études mentionnent l'utilisation de conjugués AuNR@SiO₂-Anticorps pour l'élaboration d'immunocapteurs LSPR : l'une décrit un dispositif de détection de l'antigène en solution⁴⁴, l'autre sur un support solide en verre²⁹.

a) Immunocapteur LSPR en solution

L'étude du facteur de sensibilité a permis à Song et al. de sélectionner les AuNR@SiO₂ recouverts d'une coquille de 2 nm d'épaisseur pour l'élaboration d'un immunocapteur LSPR et la détection d'*E. coli O157:H7* en solution⁴⁴. Des anticorps spécifiques d'*E. coli O157:H7* ont été physisorbés à la surface des AuNR@SiO₂ et l'évolution de la bande LSPR longitudinale après ajout de concentrations croissantes d'*E. coli O157:H7* a été suivie par spectroscopie UV-Visible (Figure 5a).

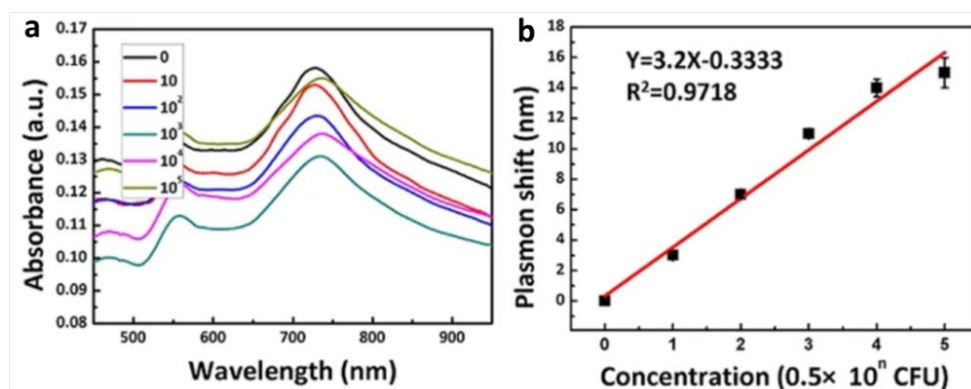


Figure 5 : (a) Spectres UV-visible des conjugués AuNR@SiO₂ après exposition à des concentrations croissantes d'*E. coli* (de 0 à 0,5 × 10⁵ CFU). (b) Régression linéaire du déplacement de la bande LSPR longitudinale en fonction du logarithme de la concentration d'*E. coli O157:H7* ; d'après⁴⁴.

Ils ont montré que les conjugués AuNR@SiO₂ peuvent être utilisés comme sondes LSPR pour la détection d'un pathogène alimentaire à de très faibles concentrations (limite de détection 10 Colonies Formant Unité, CFU) (Figure 5b). La spécificité de l'immunocapteur a été démontrée en utilisant une bactérie salmonelle. Aucun déplacement de la bande LSPR n'a été relevé, soulignant la spécificité de la reconnaissance anticorps-antigène et cela, malgré l'absence d'une étape de blocage des sites d'adsorption non spécifiques à la surface des particules, comme il est communément réalisé lors de la conception de biocapteurs⁵⁴.

b) Immunocapteur LSPR en phase solide

L'élaboration d'immunocapteurs en phase solide nécessite l'immobilisation des AuNR@SiO₂ sur un substrat non absorbant dans la région du visible, généralement une lame de verre ou de quartz (surface silicique). Ce format bénéficie d'un certain nombre d'avantages comparé aux immunocapteurs LSPR en solution : les mesures d'absorbance après liaison de l'antigène étant réalisées à sec, une meilleure sensibilité au changement d'indice de réfraction est attendue, ils sont plus faciles à manier et la lecture de la mesure peut se faire à l'œil nu. A notre connaissance, le seul exemple à ce jour d'immunocapteur LSPR supporté utilisant des AuNR@SiO₂ a été rapporté par l'équipe de Wang et al. en 2006 pour le dosage d'une cible modèle, à savoir l'immunoglobuline G humaine (hIgG)²⁹. La procédure pour l'immobilisation des AuNR@SiO₂ passe par une étape de fonctionnalisation des substrats de quartz par le poly(vinylpyrrolidone) (PVP) (Figure 6a). Les substrats fonctionnalisés ont ensuite été immergés dans une solution éthanolique de particules et celles-ci s'y fixent *via* des interactions faibles entre les groupements silanols en surfaces des AuNR@SiO₂ et les fonctions carbonyles du PVP. La chimisorption de l'anticorps anti-hIgG a été réalisée par l'intermédiaire des fonctions aldéhydes des particules silanisés et des fonctions amines de l'anticorps, suivant l'une des méthodes présentées précédemment.

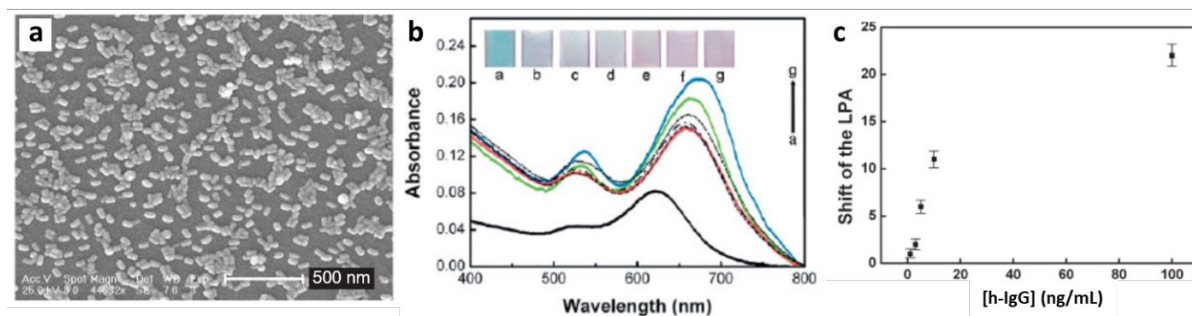


Figure 6 : (a) Image de microscopie électronique à balayage à émission de champ des AuNR@SiO₂ immobilisés sur une lame de quartz fonctionnalisée par la PVP. (b) Spectres UV-Visible et photos des substrats de quartz des (a) AuNR@SiO₂, (b) AuNR@SiO₂- anti-hIgG, (c-g) Conjugués AuNR@SiO₂- anti-hIgG immobilisés en présence de concentrations croissantes d'hIgG (1 à 100 ng/mL). (c) Evolution de la position de la bande LSPR longitudinale des AuNR@SiO₂- anti-hIgG en présence de concentrations croissantes d'hIgG (1 à 100 ng/mL). D'après ²⁹.

De cette manière, ils ont pu détecter à l'œil nu la capture de hIgG par le changement de couleur de la lame de quartz (Figure 6b). Le suivi de la position de la bande longitudinale leur a permis d'atteindre une limite de détection de 1 ng/mL (6,67 pM) (Figure 6c)

Partie 2 : Nanoparticules de silice de type Stöber : surface modèle pour l'optimisation des conditions de silanisation

L'élaboration de biocapteurs LSPR utilisant les AuNR@SiO₂ nécessite une à plusieurs étapes de fonctionnalisation de la coquille de silice.. Cependant, le grand nombre d'étapes conduisant à l'obtention des AuNR@SiO₂ (i.e. synthèses et lavages des AuNR/AuNR@SiO₂) et la faible quantité de matière disponible en fin de synthèse (approximativement 3-5 mg dans nos conditions) sont autant de freins à l'optimisation des conditions de greffage et aux caractérisations de surface. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous proposons d'utiliser des nanoparticules de silice (SiNPs) comme surfaces modèles avant d'envisager la silanisation des AuNR@SiO₂. Les nanoparticules de silice ont l'avantage de pouvoir être produites facilement et en grande quantité (plusieurs grammes), satisfaisant ainsi les besoins requis pour l'optimisation des protocoles de silanisation par la compréhension des paramètres expérimentaux influençant le taux de greffage tout en facilitant leurs caractérisations.

Dans le but de développer un protocole fiable de silanisation à la surface des SiNPs transposable aux AuNR@SiO₂, leurs taille et réactivité de surface doivent approcher celle de la coquille en surface des AuNRs. Ainsi, des nanoparticules de silice non poreuses ont été synthétisées par la méthode de Stöber⁵⁵ adaptée par Napierska et al.⁵⁶. Le choix de la fonction terminale du silane utilisé est aussi important. Bien que l'APTES soit l'un des alkoxysilanes les plus majoritairement utilisés pour la fonctionnalisation de surfaces d'oxydes, celui-ci peut interagir *via* des liaisons électrostatiques et Hydrogène avec la surface, provoquant la formation de multicouches inhomogènes ainsi qu'une mauvaise accessibilité de la fonction amine^{57,58}. De plus, la propriété catalytique de l'amine promeut d'une part la polycondensation intramoléculaire au détriment du greffage et d'autre part, à l'hydrolyse de la liaison siloxane en milieu aqueux, conduisant au détachement de l'APTES de la surface^{59,60}. Ainsi, pour maîtriser la stabilité de la couche de silane et limiter les interactions intramoléculaires, le greffage de MPTMS par post-fonctionnalisation des SiNPs a été privilégié. Les conditions de réaction ont été mises au point de façon à optimiser la densité surfacique de fonctions thiols. L'évaluation systématique de ce paramètre via le dosage chimique par le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ; DTNB) a permis d'appréhender les paramètres expérimentaux conduisant au plus haut taux de greffage. Ces particules ont ensuite été analysées par thermogravimétrie couplée à la spectrométrie de masse (ATG-MS) et par les techniques

d'analyses propres aux suspensions colloïdales : microscopie électronique à transmission (MET), diffusion dynamique de la lumière (DLS), zétamétrie.

1. Caractérisations morphologiques et de la charge de surface des SiNPs

D'après l'analyse des images de microscopie électronique à transmission, les SiNPs synthétisées sont sphériques, non poreuses et de diamètre moyen $126,9 \pm 11,7$ nm (Figure 7a). Le calcul de la taille et l'histogramme de distribution granulométrique sont basés sur le décompte de plus de 300 nanoparticules (Figure 7b). Des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées pour déterminer le diamètre hydrodynamique (DH) ainsi que l'indice de polydispersité (IP) en utilisant la méthode des cumulants. Selon cette méthode, l'IP est une mesure de la variabilité de la distribution en taille des particules. Ainsi, les mesures de DLS indiquent que les SiNPs obtenues présentent un DH de 161 nm et l'IP de 0,09 témoigne de leur monodispersité (Figure 7c). Le DH obtenu par mesure de l'intensité de diffusion en fonction de la distribution de taille est supérieur au diamètre mesuré par TEM. Cela s'explique par l'approximation de Rayleigh qui relie l'intensité de diffusion I d'une particule à son diamètre d selon une proportionnalité en $I \propto d^6$, donnant plus d'importance aux particules de plus grand diamètre lors de l'analyse. Néanmoins, la présence d'un seul pic nous renseigne sur l'absence d'agrégats et la bonne stabilité colloïdale des particules. La charge de surface de la silice est due à la dissociation des groupements silanols à l'interface silice-eau dépendamment du pH du milieu⁶¹. Ainsi, l'analyse du potentiel zêta a permis de mesurer une charge de surface de -53 mV à pH 8,3 attribuée aux fonctions silanolates de surface (Figure 7d) et garantit la stabilité colloïdale par répulsion électrostatique.

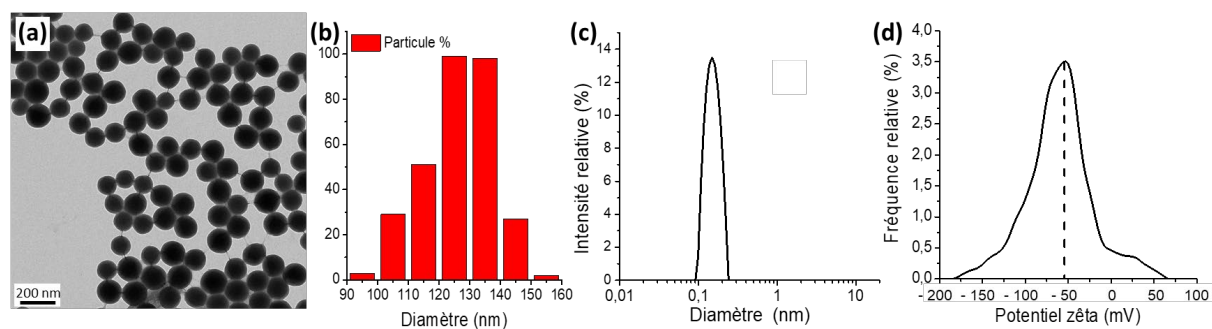


Figure 7 : (a) Image de microscopie électronique à transmission des SiNPs, (b) histogramme de distribution en taille du diamètre des particules, (c) diamètre hydrodynamique obtenu par DLS et (d) potentiel zêta obtenu par mesure de la mobilité électrophorétique à pH 8,3.

Les SiNPs obtenues sont monodisperses et présentent une surface géométrique de 50700 nm². Elles ont été préparées en quantité suffisante (~ 2,1 g de SiNPs) pour l'optimisation des conditions expérimentales du greffage de MPTMS. Le greffage de silanes est souvent réalisé en milieu anhydre dans le toluène afin de minimiser les phénomènes de polycondensation. Or, l'impossibilité de disperser les AuNR@SiO₂ dans un solvant apolaire aprotique nous a conduit à recourir à un mélange éthanol/eau, aussi utilisé dans les réactions de silanisation. En considérant les nanoparticules sphériques synthétisées par la méthode Stöber comme denses ($\rho = 2,2 \text{ g/cm}^3$) et un rayon de 63,5 nm déterminé par MET, la masse d'une nanoparticule de silice est de $2,36 \cdot 10^{-15} \text{ g}$.

2. Silanisation des SiNPs par le MPTMS et quantification des fonctions thiol de surface

Pour permettre l'immobilisation d'une quantité importante de biomolécules, une densité élevée en fonctions réactives -SH est nécessaire à la surface des particules. Il a été montré que la surface de SiNPs synthétisées par le procédé Stöber possède entre 4 et 6 silanols/nm² ⁶²⁻⁶⁵. Ainsi, la quantité de MPTMS à ajouter à la suspension colloïdale de SiNPs a été calculée en se plaçant en large excès de silane (100 molécules de MPTMS par -OH de surface), en considérant la surface géométrique des nanoparticules ainsi qu'une densité moyenne en hydroxyle de surface de 5 OH/nm². Les différentes conditions expérimentales étudiées telles que la composition du solvant, la température et l'utilisation d'un catalyseur acide sont résumées dans le Tableau 2 et les densités surfaciques en fonctions thiol issues des différents protocoles expérimentaux ont été déterminées par dosage chimique au réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque ; DTNB).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des conditions expérimentales (rapport molaire MPTMS/OH : 100/1) et concentrations surfaciques en fonctions thiols déterminées par dosage d'Ellman.

	Rapport v/v EtOH : H ₂ O	Catalyseur	Température	-SH/nm ²	-SH μmol/g
Protocole 1	95 : 5	Non	Ambiante	0,23 (± 0,03)	8,27(± 1,07)
Protocole 2	95 : 5	Non	60°C	1,10 (± 0,20)	39,50 (± 7,18)
Protocole 3	100 : 0	Non	60°C	0,35 (± 0,12)	12,70 (± 4,31)
Protocole 4	95 : 5	Acide formique (pH 4,5)	60°C	0,61 (± 0,17)	21,90 (± 6,01)

Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique classiquement utilisée pour la détection et la quantification de thiols présents au sein de protéines et sur des surfaces d'oxyde de silicium planes ou divisées⁶⁶⁻⁶⁸. Ce composé possède une liaison disulfure réduite stœchiométriquement par un thiol selon une réaction d'échange thiol - disulfure, formant un disulfure mixte et libérant un équivalent de 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB²⁻) pouvant être quantifié par spectroscopie UV-Visible (Figure 8a). Le DTNB absorbe dans la région UV du spectre électromagnétique et son absorbance est négligeable dans la région du visible. Inversement, le TNB²⁻ absorbe dans le visible à 409 nm⁶⁹. On peut donc s'attendre à ce que chaque TNB²⁻ formé résulte de la présence d'un thiol de surface. Par conséquent, l'absorbance à 409 nm est directement corrélée à la concentration surfacique de thiol. Par ailleurs, il a été montré que la méthode permet une sensibilité du dosage de l'ordre du nanomolaire⁷⁰. Les solutions colloïdales de SiNPs étant turbides, une étape de centrifugation après la réaction est nécessaire pour récupérer le surnageant des particules et mesurer l'absorbance du TNB²⁻ en solution. Ce même test colorimétrique nous a aussi permis de nous assurer de l'élimination totale de l'excès de MPTMS à la fin de la silanisation des SiNPs par analyse des solutions de lavage. Le suivi colorimétrique des surnageants a permis d'établir que quatre étapes de lavage à l'éthanol sont nécessaires pour éliminer l'excès de MPTMS non greffé aux particules.

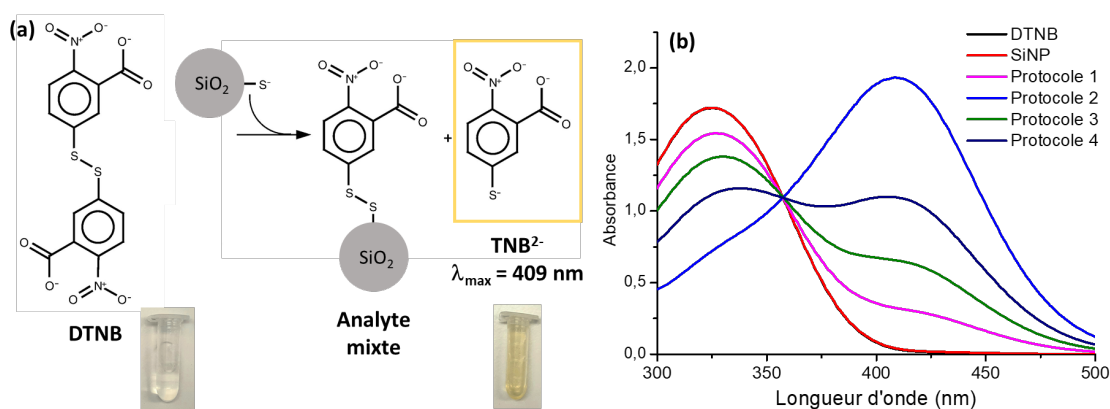


Figure 8 : (a) Principe de la quantification des thiols de surface à l'aide du réactif d'Ellman (DTNB), schéma inspiré de ⁶⁷. (b) Évolution des spectres d'absorption des surnageants à la suite du relavage de TNB²⁻ par SiNP-MPTMS traitées par le réactif d'Ellman (silansations réalisées suivant les conditions résumées dans le Tableau 2).

La quantification des groupements thiols par unité de surface a été faite à partir des mesures expérimentales d'absorbance en utilisant l'Équation 2 et le coefficient d'extinction molaire du TNB²⁻ ($\epsilon = 13450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) préalablement déterminé *via* la courbe d'étalonnage

présentée en Annexe Figure 1. Ces densités surfaciques sont résumées Tableau 2 et les spectres d'absorption associés Figure 8b.

$$\text{SH/nm}^2 = N_A \times \frac{V_s \times \text{Abs}_{409}}{l \times \epsilon_{\text{TNB}} \times m_t \times S}$$

N_A : Nombre d'Avogadro (mol^{-1})

V_s : Volume du surnageant en L

Abs_{409} : Absorbance du TNB mesurée à 409 nm

l : Chemin optique (1 cm)

m_t : Masse totale de l'échantillon de nanoparticule en g

ϵ_{TNB} : Coefficient molaire du TNB ($13450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

S : Surface spécifique d'une nanoparticule en m^2/g ($20 \text{ m}^2/\text{g}$)

Équation 2 : Calcul de la densité de surface de fonctions SH des SiNP-MPTMS.

L'absence de coloration dans le surnageant contrôle (SiNPs non silanisés) démontre la spécificité de la réaction. Les densités surfaciques et les écarts-type associés aux mesures sont le résultat de dosages de lots de synthèses réalisées au minimum en double (Tableau 2). Ainsi, la fonctionnalisation des SiNPs à température ambiante suivant le protocole 1 conduit à une densité de fonctions très faibles de $0,23 (\pm 0,03) \text{ SH/nm}^2$. Cela pourrait être expliqué par une cinétique de condensation très lente du MPTMS à la surface des SiNPs en absence d'activation (température ou catalyseur moléculaire). Ce premier résultat étant jugé non satisfaisant, d'autres conditions réactionnelles telles que l'augmentation de la température, l'utilisation d'éthanol absolu comme unique solvant ou d'un catalyseur acide (pH 4) ont été étudiées en conservant un rapport molaire $\text{MPTMS}/\text{OH} = 100$ constant. L'augmentation de la température à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ conduit à une densité surfacique de $1,10 (\pm 0,20) \text{ -SH/nm}^2$ (protocole 2). L'utilisation d'éthanol absolu ou d'acide formique en milieu contrôlé à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a permis de greffer respectivement $0,35 (\pm 0,12)$ (protocole 3) et $0,61 (\pm 0,17)$ (protocole 4) -SH/nm^2 . Comme rapporté dans la littérature, il apparaît que l'eau est nécessaire (ratio $\text{H}_2\text{O} / \text{MPTMS} : 140 / 1$) pour favoriser le greffage et que l'augmentation de la température accroît la cinétique de condensation. L'utilisation d'un catalyseur acide plutôt que basique a été préféré afin de limiter une polycondensation homogène trop rapide du MPTMS. De plus, à pH 4, l'hydrolyse est rapide et la condensation assez lente pour que les groupes silanols formés soient stables suffisamment longtemps pour se greffer à la surface des particules. Néanmoins ces conditions n'ont pas permis d'augmenter la densité surfacique de fonctions -SH.

L'étude de la répétabilité et de la reproductibilité des dosages colorimétriques des SiNP-MPTMS issues du protocole 2 nous ont permis de conclure à la robustesse du protocole (Annexe Tableau 1) et à l'influence majeure de la température lors de la réaction de silanisation. Ces valeurs de densités surfaciques restent en deçà de celles rapportées dans la littérature pour le même type de particules^{71,72}. Cela pourrait être expliqué par une masse sèche de SiNP-MPTMS surestimée lors du dosage due à la présence d'eau et l'hydratation des particules ou à la persistance de groupements éthoxy du TEOS non hydrolysés à la surface des particules. Par ailleurs, environ 1% de la quantité initiale de MPTMS introduite a été greffée. Cette densité apparaît acceptable au vu de la silanisation des AuNR@SiO₂. Les SiNP-MPTMS ont ensuite été analysées par thermogravimétrie (ATG), cette technique complémentaire permet également d'évaluer la densité surfacique en fonctions thiols.

L'ATG mesure à la fois le flux de chaleur et les variations de poids d'un matériau en fonction de l'augmentation de la température, sous atmosphère contrôlée. Au fur et à mesure que la température augmente, divers composants de l'échantillon sont décomposés et la perte de masse correspondante est calculée. Les variations de masse peuvent être distinguées plus clairement sur la dérivée première de la courbe ATG. Les effluents gazeux sont transférés vers un spectromètre de masse (MS) pour une identification des composants. D'après les résultats obtenus lors de la quantification des fonctions thiol par dosage chimique au réactif d'Ellman, nous attendons une perte de masse pour la décomposition du MPTMS de l'ordre de 2,3 %. L'analyse thermogravimétrique des SiNPs synthétisées suivant le protocole 2 contenant 1,10 ($\pm 0,2$) -SH/nm² est présentée Figure 9, les SiNPs non silanisées sont utilisées comme contrôle.

En observant les courbes ATG et les analyses de gaz des SiNP et SiNP-MPTMS, plusieurs événements résultant d'une perte de masse sont associés à la détection de CO₂, H₂O et SO₂ (Figure 9a). Nous pouvons voir que les pertes de masse inférieures à 120 °C résultent de la perte d'eau physisorbée. Les pertes carbonées entre 120 et 250 °C pourraient être attribuées aux groupements éthoxy du TEOS dans la matrice de silice en raison de son hydrolyse incomplète lors de la synthèse des SiNPs (Figure 9c,d)⁷³. La différence de la perte de masse entre les SiNPs et SiNP-MPTMS entre 250 et 700 °C est de 10,2 % (Figure 9a). Cette valeur apparaît importante au regard de ce qui est attendu pour la décomposition du MPTMS seul. Le dégagement de SO₂, CO₂ et H₂O à 350 °C détecté par l'analyseur de gaz (Figure 9d) a permis de strictement attribuer la perte liée au MPTMS sur la décomposition de la dérivée première de la perte de masse des SiNP-MPTMS (Figure 9b).

La mesure de l'aire sous la courbe du pic à 350°C a permis de calculer une perte de 3,0 %, cette valeur est proche de celle attendue et correspond au greffage de 1,45 -SH/nm² (51,26 μmol/g). Cette estimation de densité, légèrement supérieure à celle déterminée par dosage chimique, pourrait être attribuée à des molécules de MPTMS qui ne seraient pas accessibles au réactif chimique DTNB.

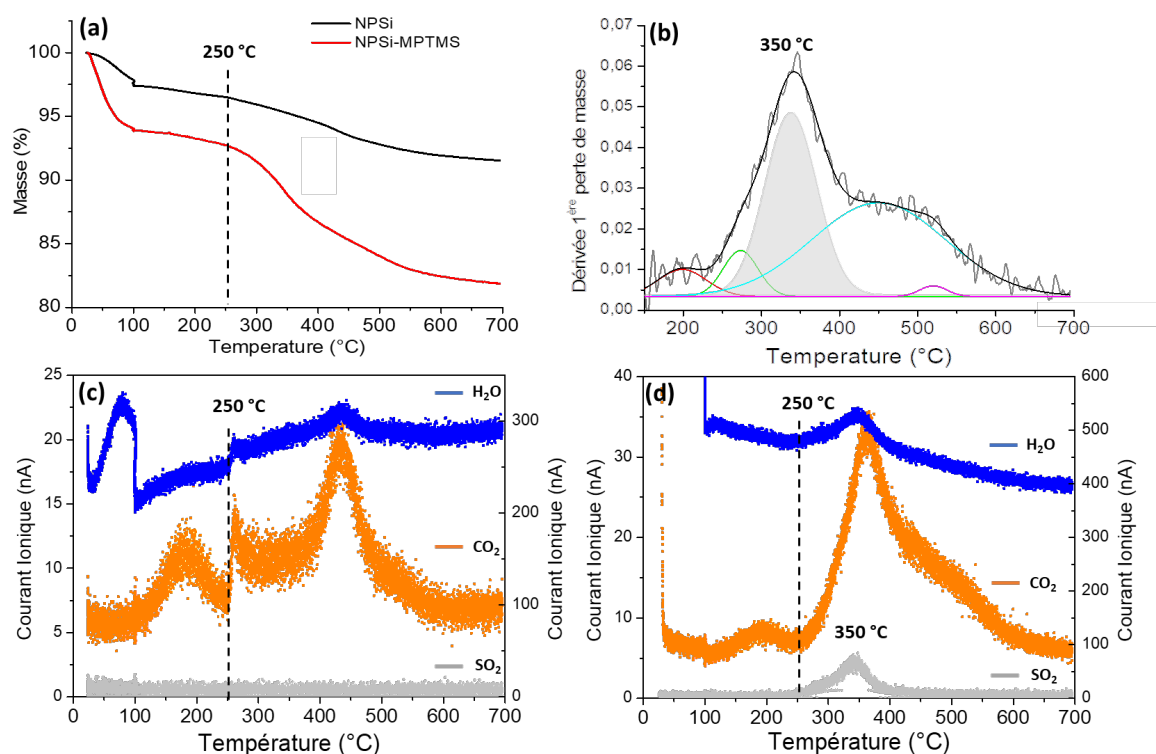


Figure 9 : (a) Courbes ATG mesurées sous flux d'air des SiNPs (14,35 mg d'échantillon) (noir) et SiNP-MPTMS (9,94 mg d'échantillon) (rouge). Un palier de 40 min à 100 °C a été réalisé. (b) Décomposition et intégration de la dérivée de la perte de masse entre 150 et 700 °C des SiNP-MPTMS ($R^2 = 0,9825$). Analyses des gaz issus des mesures ATG (c) SiNP et (d) SiNP-MPTMS.

3. Caractérisations morphologiques et de la charge de surface des SiNP-MPTMS

Les images de microscopie électronique à transmission des SiNP-MPTMS issues du protocole 2 sont montrées Figure 10a. Les nanoparticules présentent une surface homogène et un diamètre de $129,5 \pm 11,2$ nm similaire aux SiNPs avant fonctionnalisation ($126,9 \pm 11,7$ nm). Cela a été confirmé par les mesures DLS établissant un diamètre hydrodynamique moyen de 171 nm. L'absence de pic d'agrégation et l'indice de polydispersité de 0,15 confirment la stabilité colloïdale des particules ainsi qu'une distribution monodisperse (Figure 10b).

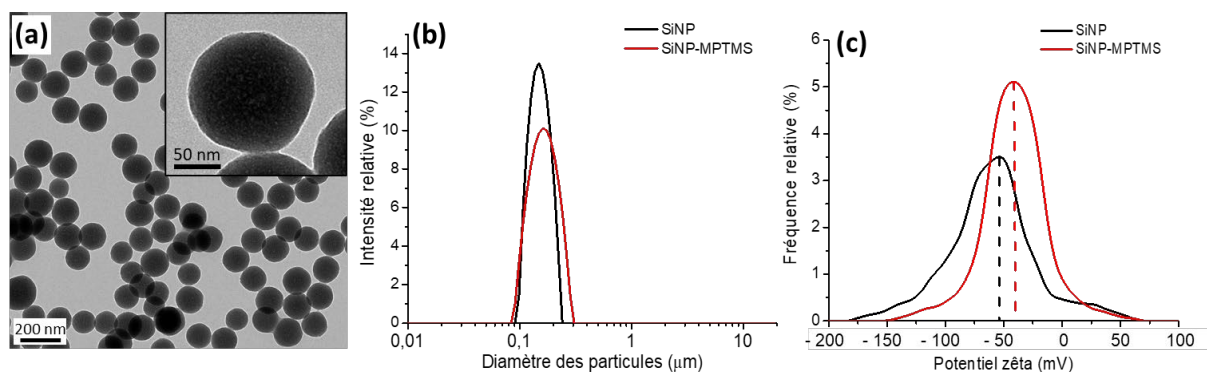


Figure 10 : (a) Images de microscopie électronique à transmission des SiNP-MPTMS obtenues après lavage. Évolution (b) du diamètre hydrodynamique obtenu par DLS et (c) du potentiel zêta obtenu par mesure de la mobilité électrophorétique à pH 8,4, avant et après fonctionnalisation.

La fonctionnalisation des SiNPs par le MPTMS a ensuite été confirmée par mesure du potentiel zêta des particules avant et après fonctionnalisation à pH 8,4 (Figure 10c). En supposant que le pKa de la fonction thiol de surface soit proche du thiol libre (pKa \sim 10,6), on s'attend à ce que la majorité des fonctions en surface soit sous forme neutre protonée à pH 8,4^{74,75}. On observe une diminution de la charge négative en surface des particules de silice de -53 mV à -41 mV que nous attribuons au remplacement des groupes silanolates de surface par un ligand neutre. Par ailleurs, il a été rapporté que les fonctions méthoxy du MPTMS ne s'hydrolysent pas totalement après greffage sur une surface de silice⁷⁶, ainsi il est possible que les charges négatives développées par la surface soient apportées par les groupements silanolates de la coquille de silice. Néanmoins il est difficile de conclure quant au greffage de MPTMS sur la base de mesures de potentiel zêta au regard des différents résultats décrits dans la littérature concernant cette réaction. De plus le pH auquel la mesure est faite est rarement précisée⁷⁷⁻⁸⁰.

4. Conclusion de la partie

Dans le travail expérimental présenté dans cette première partie du chapitre III, la surface des SiNPs a été fonctionnalisée par le MPTMS portant une fonction -SH terminale. L'utilisation de SiNPs comme nanoparticules modèles pouvant être produites rapidement et en quantité importante a permis d'explorer de nombreuses conditions de greffage et facilité leurs caractérisations. La densité de fonctions thiol greffées à la surface des SiNPs après exploration de différents paramètres expérimentaux tels que la température, la composition du solvant et l'utilisation de catalyseur acide ont été discutés. Il est apparu que le contrôle de la température

est primordial pour la silanisation des particules. L'utilisation du réactif d'Ellman pour le dosage des fonctions réactives -SH à la surface des SiNPs est une méthode efficace et sensible qui a permis de sélectionner les conditions expérimentales pour l'introduction de groupements fonctionnels à la surface des AuNR@SiO₂. Ainsi, la fonctionnalisation des SiNPs à 60 °C en présence de 5% d'eau dans l'éthanol, conduit à une densité estimée de 1,10 SH/nm² par dosage chimique au réactif d'Ellman et à 1,43 SH/nm² par ATG. Les particules silanisées suivant le protocole 2 présentent une bonne stabilité colloïdale sans augmenter significativement la taille des particules et la densité de fonctions -SH est suffisante pour envisager la silanisation des AuNR@SiO₂.

Partie 3 : Introduction de groupements fonctionnels à la surface des AuNR@SiO₂

Cette partie est consacrée au greffage de silanes fonctionnels en surface des AuNR@SiO₂ ainsi qu'à leurs caractérisations. Les conditions de fonctionnalisation des SiNPs suivant le protocole optimisé présenté dans la partie 2, a permis l'introduction d'environ 1,26 -SH/nm² en surface. Ces conditions ont été transposées à l'introduction de groupements fonctionnels thiols et extrapolées à l'introduction de groupements fonctionnels aldéhydes en surface des AuNR@SiO₂ par l'utilisation de MPTMS et de 3-triéthoxysilylbutyraldéhyde (TEBA) (Figure 11). Les AuNR@SiO₂ utilisées dans cette étude ont été obtenues *via* la méthode décrite dans le chapitre II. Celles-ci présentent une couche d'accroche de MPTMS à l'interface avec l'or ainsi qu'une coquille fine d'environ 3,5 nm afin de bénéficier de la sensibilité LSPR exaltée à proximité du cœur métallique.

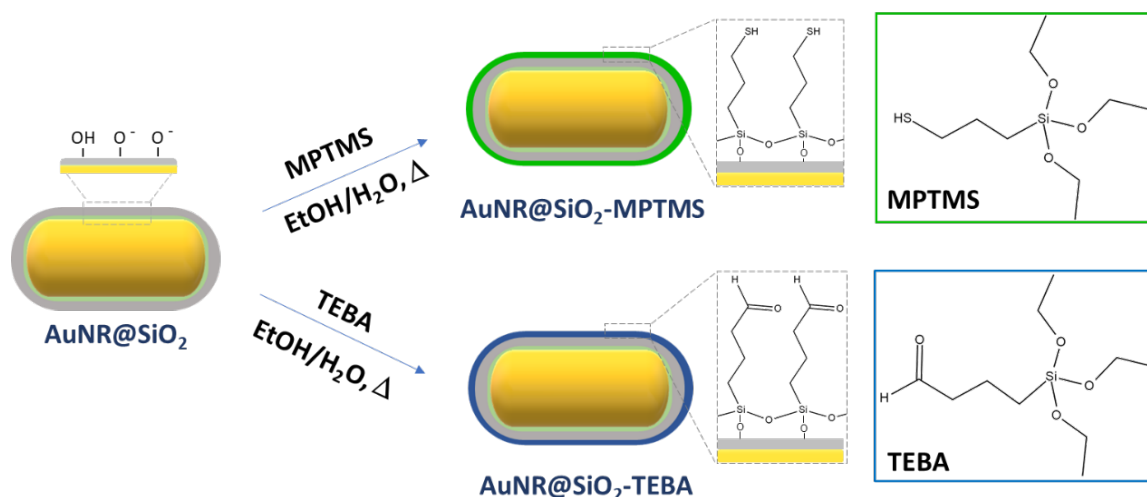


Figure 11 : Schéma général de la réaction de greffage de MPTMS et de 3-triéthoxysilylbutyraldéhyde (TEBA) à la surface des AuNR@SiO₂.

Une fois silanisées, les particules ont été caractérisées par les techniques usuelles aux colloïdes plasmoniques : spectroscopie UV-Visible, diffusion dynamique de la lumière, zétamétrie et la densité surfacique en fonctions -SH par dosage chimique au DTNB. Les particules ont ensuite été caractérisées par spectrométrie de photoélectrons induit par rayonnement X (XPS), par spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS) et par spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS). Les fonctions

chimiques introduites par silanisation pourront être utilisées pour l'immobilisation de biomolécules d'intérêt dans la suite des travaux.

De nombreuses réactions de silanisation ont été réalisées en partant de lots de AuNRs et AuNR@SiO₂ différents en termes de propriétés optiques. Le Tableau 3 ci-dessous résume les différents lots de AuNR@SiO₂ silanisés rencontrés dans les parties 3, 4 et 5 de ce manuscrit.

Tableau 3 : Tableau consignant les dénominations des échantillons utilisés dans des parties 3, 4 et 5 du chapitre III.

AuNR	AuNR@SiO ₂	AuNR@SiO ₂ -MPTMS	AuNR@SiO ₂ -TEBA
Synthèse 1	Lot issu de 1	1a – Partie 3	1a – Partie 3
		1a' – Partie 5	1a' – Partie 5
		1b – Partie 4	1b – Partie 4
Synthèse 2	Lot issu de 2	2a -Partie 3	2a – Partie 3

Deux synthèses de AuNRs réalisées le même jour, en parallèle selon le protocole décrit dans le chapitre 2 ont été utilisées. Les lots de particules obtenus sont reproductibles mais n'ont pas été mélangés. Ils présentent les caractéristiques suivantes : synthèse 1, Lxl = 101,8 (± 6,6) x 39,6 (± 2,1) nm; RA = 2,58 ± 0,2 ; λ_{max} = 719 nm ; synthèse 2, Lxl = 102,4 (± 6,1) x 39,9 (± 1,9) nm ; RA = 2,57 (± 1,9) ; λ_{max} = 720 nm (Annexe Figure 2). Le chiffre « **1** ou **2** » indique le lot de AuNRs utilisé pour l'enrobage par la silice et les silanisations subséquentes. La lettre minuscule « **a**, **a'** ou **b** » indique si la réaction de silanisation a été effectuée en parallèle le même jour, ou un jour différent pour un lot de AuNR@SiO₂ donné. La solution de réactif silane a toujours été préparée fraîchement avant silanisation.

1. Evaluation de la sensibilité des AuNR@SiO₂ au changement d'indices de réfraction

Afin de vérifier les performances des AuNR@SiO₂ à être utilisés comme transducteur pour l'élaboration de biocapteurs LSPR opérant en solution, la sensibilité à la variation d'indice de réfraction des AuNR@CTAB (synthèse 1) et AuNR@SiO₂ (lot 1) a d'abord été évaluée en ajustant le rapport volumique de l'eau et du glycérol en solution de 0 à 0,8 par intervalle de 0,2. Les indices de réfraction des mélanges de solvants ont été calculés à partir de l'équation de Lorentz-Lorenz⁴⁴.

Les spectres d'absorption UV-Visible des AuNR@CTAB et AuNR@SiO₂ présentent un déplacement de bande plasmon longitudinale lorsque le rapport volumique entre le glycérol et l'eau augmente (Figure 12-a,b). La variation de cette position en fonction de l'indice de réfraction du milieu a été tracée et montre une variation linéaire vers les plus grandes longueurs d'onde avec l'augmentation de l'indice de réfraction (Figure 12-c).

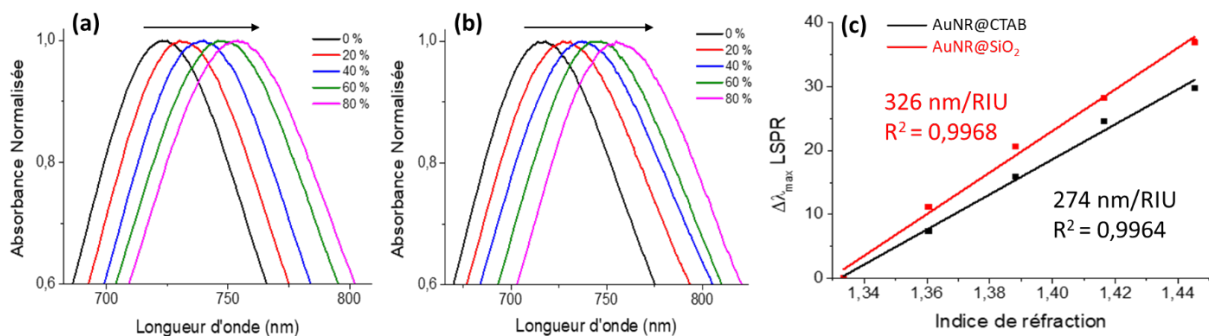


Figure 12 : Spectres d'absorption UV-Vis normalisés de la bande plasmon longitudinale des (a) AuNR@CTAB et (b) AuNR@SiO₂ avec une coquille de 3,6 nm dans des mélanges eau/glycérol de rapport volumique variant de 0 à 0,8 pas intervalle de 0,2. (c) Evolution de la position de bande plasmon longitudinale des AuNR@CTAB et AuNR@SiO₂ en fonction de l'indice de réfraction du milieu.

La valeur de la pente indique la sensibilité des particules aux changements de l'indice de réfraction. On observe que celle-ci est de 274 nm/RIU pour les AuNR@CTAB et que les AuNR@SiO₂ présentent une sensibilité supérieure de 326 nm/RIU. Ces valeurs sont cohérentes avec les observations de Song et al.⁴⁴ discutées précédemment et reflètent la capacité des AuNR@SiO₂ présentant une fine coquille de silice de 3,6 nm à servir de candidat idéal pour l'élaboration de biocapteurs LSPR opérant en solution.

2. Silanisation des AuNR@SiO₂ par le MPTMS et le TEBA et quantification des fonctions thiols de surface

La réaction de silanisation des AuNR@SiO₂ par le MPTMS a été réalisée suivant le protocole optimisé décrit précédemment en considérant la concentration des particules, calculée à partir du coefficient d'extinction molaire des AuNRs ($\epsilon = 3,82.10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; Annexe I supposé constant après fonctionnalisation), la surface géométrique des AuNR@SiO₂ (17300 nm²; Annexe II) dans les conditions suivantes : un ratio molaire MPTMS/OH de surface de 100/1 dans un mélange H₂O/EtOH 95/5 v/v chauffé à 60 °C. Afin d'utiliser le réactif d'Ellman pour le dosage des fonctions thiols en surface des AuNR@SiO₂ malgré la faible quantité d'échantillon, la concentration en AuNR@SiO₂, calculée à partir du coefficient d'extinction molaire, a été adaptée de sorte qu'une surface de $8,11 \times 10^{15} \text{ nm}^2$ engendrerait une absorbance d'environ 0,15 dans un volume de 500 μL en considérant le greffage d'1,26 molécules de MPTMS par nm² et qu'aucune particule n'est perdue lors des étapes de lavages suivant la silanisation. La Figure 13 montre l'absorbance mesurée dans le surnageant issu de la réaction de silanisation 1a, les AuNR@SiO₂ sont utilisées comme témoin de greffage, et le DTNB seul comme référence.

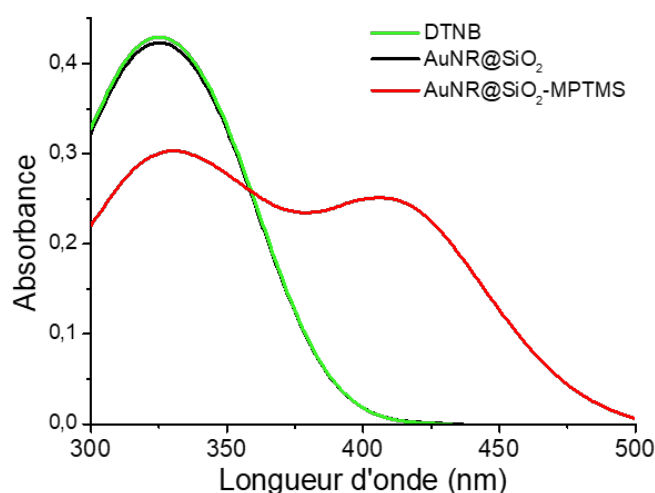


Figure 13 : Spectres UV-vis du DTNB seul et des surnageants des particules silanisées (rouge) ou non (noir) après réaction avec le DTNB et relargage de TNB²⁻.

Le spectre UV-Vis du surnageant des AuNR@SiO₂-MPTMS montre une diminution de l'absorbance du DNTB dans la région UV à la suite de la réaction d'échange thiol – disulfure avec les fonctions -SH du MPTMS en surface et l'absorbance à 409 nm dans la région du visible

correspond au TNB²⁻ relargué en solution. Le greffage est attesté par l'absence de réaction entre le DTNB et les AuNR@SiO₂ non silanisées.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des réactions de dosage effectuées sur différents lots de particules silanisées.

Réaction	Taille AuNRs (nm)	Épaisseur SiO ₂ (nm)	Surface SiO ₂ (nm ²)	[Particules] (pM)	Vol. solution mère (mL)	Abs 409 nm	-SH/nm ²
1	102x40	3,6	17260	72,5	2,4	0,25	3,06
2	102x36	3,5	15670	82,2	2,0	0,142	2,05
3	98x39	3,1	15677	41,8	2,6	0,096	2,09

La quantification de thiols par unité de surface a été déterminée à partir des mesures expérimentales d'absorbance et des coefficients d'extinction molaire du TNB²⁻ ($\epsilon = 13450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et des AuNRs, en faisant l'hypothèse que celui-ci reste constant après greffage. Afin de s'assurer de la reproductibilité du protocole de silanisation, le dosage a été reproduit sur des lots de particules de tailles et d'épaisseurs de coquilles différents (Tableau 4). Une densité surfacique moyenne de $2,4 \pm 0,6 \text{ SH/nm}^2$ a été calculée à partir des mesures expérimentales en utilisant l'Équation 3, ce qui correspond à moins de 1 % de la quantité initiale de MPTMS introduite.

$$\text{SH/nm}^2 = \frac{A_{409} \times V_s}{l \times \epsilon_{\text{TNB}} \times [\text{AuNR@SiO}_2 - \text{MPTMS}] \times V_{\text{AuNR@SiO}_2 - \text{MPTMS}} \times N_A \times S_{\text{AuNR@SiO}_2}}$$

A_{409} : Absorbance du TNB mesurée à 409 nm

V_s : Volume du surnageant en L

l : Trajet optique (1 cm)

ϵ_{TNB} : Coefficient molaire du TNB ($\epsilon = 13450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

$[\text{AuNR@SiO}_2 - \text{MPTMS}]$: Concentration des particules en mol.L⁻¹

$V_{\text{AuNR@SiO}_2 - \text{MPTMS}}$: Volume de AuNR@SiO₂-MPTMS utilisé en L

N_A : Nombre d'Avogadro en mol⁻¹

$S_{\text{AuNR@SiO}_2}$: Surface d'une AuNR@SiO₂ en nm²

Équation 3 : Calcul de la densité de surface de fonctions SH des AuNR@SiO₂-MPTMS

La valeur obtenue est du même ordre de grandeur que celle estimée par Cheng et al. ($4,1 \pm 0,4 \text{ SH/nm}^2$) lors d'une étude de la formation de films de MPTMS à la surface d'un substrat de verre⁷⁴. On notera que la réaction de dosage consomme la quasi-totalité de la solution mère de particules silanisées. Par ailleurs, il n'est pas possible de comparer les densités

de greffage sur AuNR@SiO₂-MPTMS et SiNP-MPTMS en raison de la différence de méthode de détermination de la quantité de particules (respectivement à partir du coefficient d'extinction molaire et de la pesée de particules sèches).

Le protocole de silanisation a ensuite été extrapolé au greffage du silane portant une fonction terminale aldéhyde en faisant l'approximation que le 3-triéthoxysilylbutyraldéhyde (TEBA) possède une réactivité proche de celle du MPTMS. Faute de temps, il n'a pas été possible d'estimer la densité surfacique de fonctions aldéhydes. Des essais ont été réalisés dans ce but en utilisant le test BCA, ce kit est traditionnellement utilisé pour le dosage des protéines et son utilisation a déjà été rapportée pour le dosage indirect d'aldéhydes de surface par spectroscopie UV-Visible^{81,82}. Ainsi la fonction aldéhyde du TEBA a été couplée par amination réductrice avec une amine phénolique : la tyramine, afin de produire des groupements phénols réactifs pouvant réduire le cuivre(II) en cuivre(I). Ce dernier est ensuite complexé par l'acide bicinchoninique conduisant à une absorbance dans le visible à 562 nm (transitions d-d). Une réponse non spécifique des AuNR@SiO₂ non silanisées a été mesurée pouvant être attribuée aux groupements thiols libres emprisonnés au sein de la coquille de silice, suite à la co-condensation du MPTMS et du TEOS lors de l'enrobage. En effet, les thiols sont connus pour interférer avec le test BCA, rendant cette analyse impossible. Il serait envisageable d'évaluer indirectement la densité surfacique de fonctions aldéhyde par couplage avec un BODIPY-hydrazide pouvant être dosé par UV-Vis ou d'émission de fluorescence après clivage de l'hydrazone en milieu acide⁸³. Il serait également possible de l'évaluer directement par l'utilisation d'un chromophore commercial aminé⁸⁴ n'absorbant pas dans la même région que les particules.

3. Caractérisation des AuNR@SiO₂ silanisés

Les AuNR@SiO₂ silanisés par le MPTMS et le TEBA ont été caractérisés par les techniques communes aux suspensions colloïdales et/ou plasmoniques. Les spectres d'absorption UV-Vis, les mesures de DLS et de zétamétrie des lots de particules utilisés dans cette partie (lots 1a, 2a Tableau 3) sont présentées Figure 14 et leurs caractéristiques résumées dans le Tableau 5.

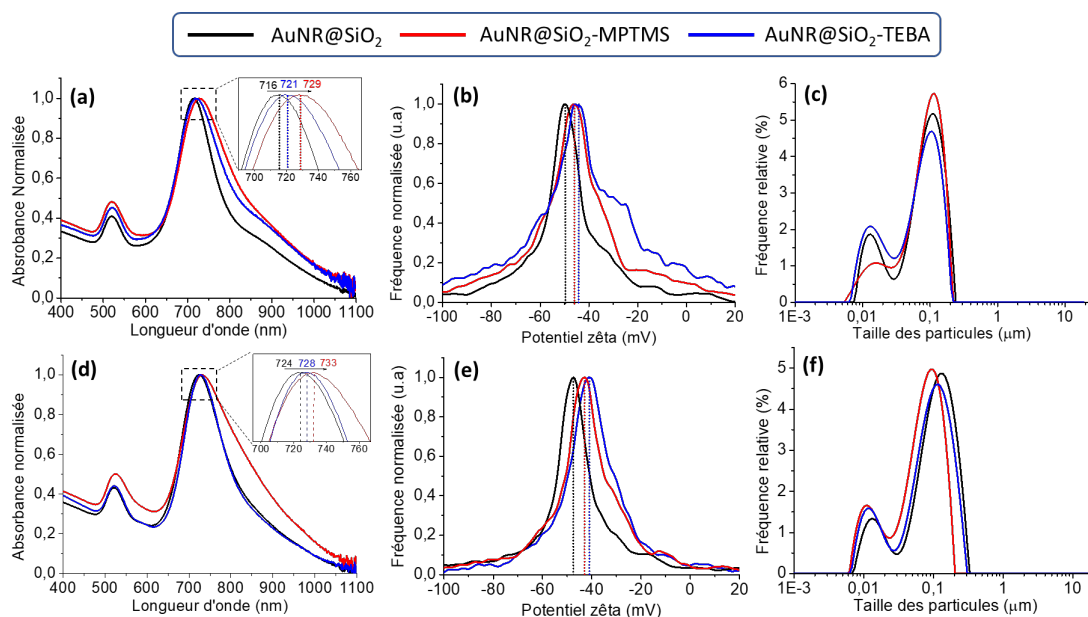


Figure 14 : Caractérisation de séries de AuNR@SiO₂ 1a et 2a avant et après silanisation. Respectivement : (a) (d) spectres UV-visible, (b) (e) pics de diffusion translationnelle et rotationnelle obtenu par DLS diffusion dynamique et (c) (f) mobilité électrophorétique obtenu par zétamétrie à pH 8-9.

Les spectres d'absorption des AuNR@SiO₂ avant et après silanisation ont été normalisés afin de visualiser le déplacement de la position de la bande plasmon longitudinale des particules et son élargissement après fonctionnalisation. Celle-ci se déplace vers le rouge de 13 nm et de 9 nm après greffage du MPTMS et de 5 et 4 nm après greffage du TEBA respectivement pour les séries 1a et 2a en raison du changement des propriétés diélectriques du milieu à la proximité des particules et que la position de la bande transversale reste stable. On note que l'amplitude du déplacement est plus importante dans le cas de la silanisation par MPTMS. On note également une variabilité sur l'amplitude de ce déplacement lorsque les réactions de silanisation sont réalisées des jours différents. Cela pourrait éventuellement être expliqué par une variation du titre du réactif utilisé ou encore du taux d'humidité du laboratoire, les autres paramètres réactionnels (concentration des réactifs, particules, solvants, température) ayant été finement contrôlés lors du greffage.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des propriétés des AuNR@SiO₂ avant et après silanisation des séries 1a et 2a

Echantillon	Position λ_{\max} (nm) / $\Delta\lambda$ (nm)	LMH (nm)	Potentiel zêta moyen (mV)	Pos. Pic Rota. (nm)	Pos. Pic Transla. (nm)	Epaisseur SiO ₂ (nm)
AuNR@SiO ₂ (1)	716 / -	87	- 49,1 ± 0,9	13	110	3,6 ± 0,6
- MPTMS (1a)	729 / 13	113	- 46,3 ± 1,3	15	115	4,7 ± 1,2
- TEBA (1a)	721 / 5	103	- 44,3 ± 1,9	13	110	4,5 ± 0,9
AuNR@SiO ₂ (2)	724 / 0	95	- 45,4 ± 1,5	13	134	4,2 ± 0,5
- MPTMS (2a)	733 / 9	120	- 42,3 ± 1,0	11	96	5,4 ± 1,2
- TEBA (2a)	728 / 4	95	- 41,3 ± 1,1	12	115	5,1 ± 1,0

La bande longitudinale s'élargit asymétriquement dans le rouge pour les particules des séries 1a et 2a silanisées par MPTMS, cet élargissement étant présent lorsque le TEBA est utilisé sur la série 1a mais absent pour la série 2b. L'élargissement asymétrique de la bande plasmon pourrait être attribué à des phénomènes de couplage des particules plasmoniques traduisant la présence de particules agrégées. Thomas et al. ont montré que l'assemblage ordonné des nanobatonnets selon le grand axe des particules (« bout à bout » / *end-to-end*) induit un déplacement vers le rouge de la bande LSPR longitudinale⁸⁵. En revanche lorsque l'assemblage des bâtonnets se fait selon le petit axe des particules (« côte à côte » / *side by side*), Prashant et al. ont montré que la bande plasmon longitudinale se déplaçait vers le bleu et que la bande transversale se déplaçait vers le rouge⁸⁶. Aucun de ces effets ne sont clairement perceptibles sur les spectres UV-Visibles mesurés, de plus, aucun pic attribuable à la présence d'agrégats n'est relevé par mesures DLS (Figure 14c,f), ce qui permet d'exclure cette hypothèse. Un comportement similaire de la bande plasmon longitudinale est observé dans l'étude de Huang sur le spectre d'absorption des AuNR@SiO₂ silanisés par l'APTES et conjugué par l'acide folique²², néanmoins, les auteurs ne proposent pas d'explications à ce phénomène. La stabilité colloïdale des particules n'est toutefois pas affectée comme le renseigne les mesures de DLS (Figure 14c, f).

La charge négative de surface des particules mesurée par zétamétrie à pH 8-9 garantit la répulsion électrostatique entre les particules. Les potentiels zêta augmentent après silanisation passant pour la série 1a de - 49,1 mV à - 46,3 mV (-MPTMS) et - 44,3 mV (-TEBA), pour la série 2a le potentiel passe de - 44,5 mV à 42,3 mV (-MPTMS) et - 41,3 mV (-TEBA) (Figure 14c, e). Cet effet est moins prononcé que lors de la silanisation des surfaces modèles.

Le potentiel des particules silanisées est proche de celui des AuNR@SiO₂, traduisant la persistance de groupements silanolates après fonctionnalisation des particules. Comme énoncé dans la partie 2, différents résultats sont rapportés dans la littérature quant à l'évolution de la charge des nanoparticules de silice après greffage d'un silane neutre. Il en est de même pour les AuNR@SiO₂, Abadeer et al.¹⁹ ont observé la neutralisation de la surface après ajout de 3-azidopropyltriméthoxysilane alors que Kang et al.⁸⁷ ont trouvé que le potentiel reste négatif après ajout de chlorotriméthylsilane quel que soit le pH. Par ailleurs, la charge de surface des particules présentant des terminaisons thiol est plus faible que lors du greffage de silane aldéhyde. Les sulfhydryles de surface apportés par silanisation avec MPTMS peuvent être présents sous la forme neutre thiol ou thiolate négative en fonction du pH du milieu alors que l'aldéhyde du TEBA n'apporte pas de charge quel que soit le pH.

En conclusion, les mesures DLS confirment la stabilité colloïdale des dispersions et le suivi de la position des bandes de diffusion rotationnelle et translationnelle ne permet pas de discuter la modification de la surface des AuNR@SiO₂.

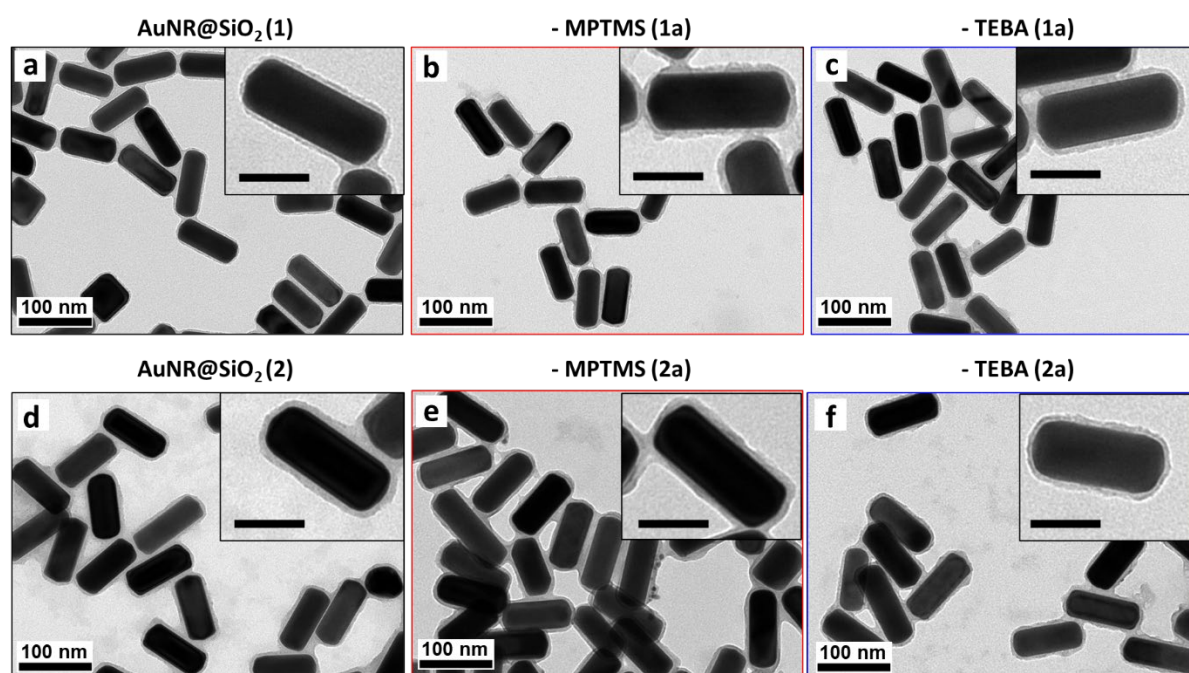


Figure 15 : Images de microscopie électronique à transmission des différents lots de particules utilisés lors de cette étude. Série 1a : (a) AuNR@SiO₂, (b)-MPTMS, (c)-TEBA. Série 2a : (d) AuNR@SiO₂, (e)-MPTMS, (f)-TEBA.

Les images de microscopie électronique à transmission ont été prises afin de mesurer l'évolution de l'épaisseur de la coquille de silice après greffage de MPTMS ou de TEBA (Figure 15). Ces mesures suggèrent que la coquille n'augmente pas de manière significative

après silanisation comme il a été préalablement observé par Inose et al.¹², ce qui est d'importance afin de bénéficier de la sensibilité LSPR à proximité du cœur métallique. Par ailleurs, la formation de nanoparticules issues de la polycondensation homogène des silanes n'a pas été observée comme le renseignent les images des bruts de synthèse avant lavage (Annexe Figure 3). Ce résultat suggère une fonctionnalisation sélective à la surface des AuNR@SiO₂ ainsi qu'une cinétique lente de condensation homogène des silanes dans les conditions choisies. Les silanes non greffés restent solubles dans le mélange EtOH/H₂O. Sur les images Figure 15, il n'est pas possible de différencier les agrégats des effets de séchage des particules sur la grille de microscopie.

Des analyses XPS ont été réalisées pour évaluer la composition chimique de la surface des AuNR@SiO₂, AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA issues de la série 2a et mettre en évidence les greffages. En raison de la grande taille des particules par rapport à la profondeur d'analyse XPS (environ 10 nm), il est possible de considérer le matériau analysé comme un massif. Dans un premier temps, les spectres généraux (Annexe Figure 4) ont permis de relever la présence des différents éléments O, S, C, Si et l'absence d'azote. Les mêmes éléments chimiques sont retrouvés sur les particules avant et après silanisation. Le pic lié aux électrons 3d de l'indium, visible à 445 eV sur l'échantillon AuNR@SiO₂-MPTMS correspond au substrat sur lequel les nanoparticules ont été déposées. Cela n'a pas pu être évité malgré le dépôt d'un lot complet de particules silanisées. Pour distinguer les différents états chimiques du soufre, une décomposition du photo-pic S2p a été effectuée (Figure 16).

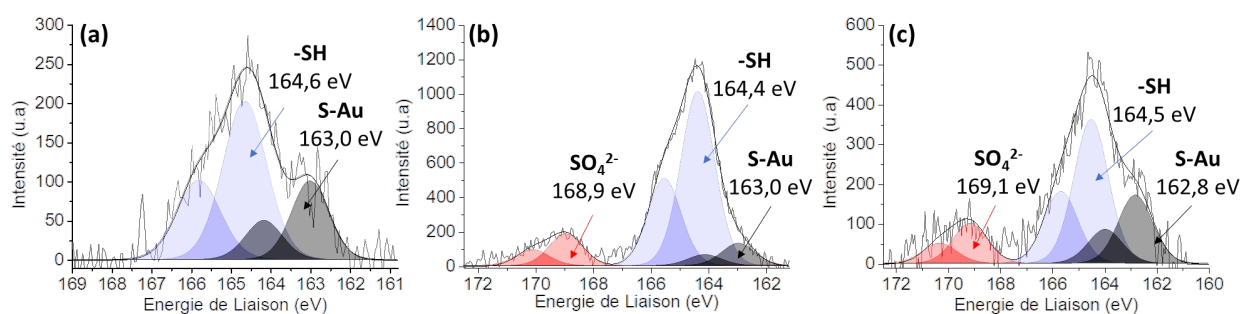


Figure 16 : Spectres XPS du S 2p des AuNR@SiO₂ avant silanisation (a) et après silanisation par MPTMS (b) TEBA (c) issues de la série 2a.

Chaque état chimique est caractérisé par un doublet dû au couplage entre le moment cinétique orbital et le moment magnétique de spin conduisant à une dégénérescence du niveau S2p en 2 sous niveaux 2p_{3/2} et 2p_{1/2}. Pour chaque échantillon analysé, deux pics sont observés à ~ 164,4

eV et $\sim 163,0$ eV. Ils correspondent respectivement aux contributions du soufre libre (-SH) et du soufre lié à l'or (S-Au). Les contributions S-Au des AuNR@SiO₂ sont attribuées au soufre à l'interface avec l'or et proviennent du MPTMS utilisé comme couche d'accroche pour la croissance de la silice. Les contributions du soufre libre sur la Figure 16-a proviennent du MPTMS co-condensé avec le TEOS et se trouvant emprisonné dans la coquille. Celui-ci est inaccessible au milieu environnant, comme l'a révélé l'absence de réaction entre le DTNB et les AuNR@SiO₂ (Partie 2). Une contribution du soufre oxydé est trouvée à plus haute énergie de liaison ($\sim 169,0$ eV) pour les deux lots de particules silanisées (Figure 16-b etc), celle-ci est discuté par la suite.

L'analyse des états chimiques du carbone déterminés par décomposition du pic C1s n'a pas permis de mettre en évidence l'augmentation de la contribution $\underline{\text{C}}=\text{O}$ à 289 eV attendue dans le cas du greffage du TEBA, par ailleurs les mêmes contributions sont retrouvées sur chacun des échantillons analysés (Annexe Figure 5). Les rapports atomiques des éléments analysés ont été estimés afin d'apprécier l'évolution de la composition des particules avant et après greffage (Tableau 6). La quantification du silicium a été effectuée à partir du pic du Si2s plutôt que le Si2p, celui-ci se trouvant dans les pics dus aux plasmons de l'or. Le rapport S/Au augmente significativement après greffage des AuNR@SiO₂ par MPTMS et TEBA, ce résultat confirme le greffage de MPTMS à la surface des AuNR@SiO₂. Le soufre oxydé aurait pu être attribué à l'oxydation des fonctions -SH due à la présence d'oxygène dissous dans le milieu de synthèse. Celle-ci n'est pas évidente à expliquer et pourrait être attribuée à une contamination des surfaces lors de l'analyse, puisque des rapports S/Au identiques entre les AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-TEBA sont retrouvés après que l'apport du soufre oxydé a été corrigé du ratio. Une augmentation du rapport O/Si mesurée pour AuNR@SiO₂-TEBA peut être attribuée à l'oxygène porté par les fonctions aldéhydes de surface. La diminution du rapport O/Si peut s'expliquer par la plus forte atténuation des électrons 1s de l'oxygène dans la couche organique par rapport aux électrons 2p du silicium. Une forte augmentation du taux de carbone est observée pour AuNR@SiO₂-MPTMS, et une diminution pour AuNR@SiO₂-TEBA. Cette évolution est difficile à interpréter au regard de l'analyse du pic C1s (Annexe Figure 5) et pourrait être attribuée à de la contamination organique. L'augmentation des rapports Si/Au après silanisation des particules confirme la condensation de MPTMS et TEBA à la surface des AuNR@SiO₂ mais dans des proportions plus importantes pour MPTMS. Ces rapports atomiques ont été confirmés par l'analyse de particules provenant d'un autre lot de silanisation (Annexe tableau 2). Les rapports S/Au (non corrigés), O/Si et Si/Au suivent la même tendance

alors que les rapports C/Au augmentent après silanisation. Ces analyses viennent confirmer le greffage des silanes MPTMS et TEBA à la surface des AuNR@SiO₂.

Tableau 6 : Rapports atomiques des éléments à la surface des AuNR@SiO₂ avant et après greffage des silanes fonctionnels déterminés par XPS.

Rapports atomiques	AuNR@SiO ₂	-MPTMS	-TEBA
S/Au	0,16	1,17	0,25
S/Au corrigé de S(Ox)	0,16	0,93	0,17
O/Si	2,30	1,73	2,66
C/Au	6,65	10,83	3,66
Si/Au	0,99	2,92	1,13
Épaisseur SiO ₂ (nm)	2,12	4,21	2,53
S-Au/nm ²	3,00	7,25	4,28

L'estimation de l'épaisseur de la coquille de silice avant et après silanisation des AuNR@SiO₂ a ensuite été calculée selon l'Équation 4. Celle-ci augmente de 2,12 nm à 4,21 nm et 2,53 nm respectivement après le greffage de MPTMS et TEBA (Tableau 6). Ces valeurs sont inférieures aux épaisseurs mesurées par microscopie électronique à transmission (AuNR@SiO₂ : 4,2 nm ; -MPTMS : 5,2 nm ; -TEBA : 5,1 nm) en raison du modèle de calcul qui prend en compte une densité de silice n_{Si} élevée alors que celle-ci est certainement inférieure.

$$\frac{I_{Si}}{I_{Au}} = \frac{n_{Si} \times \sigma_{Si} \times \lambda_{Si}^{SiO_2} \times (1 - \exp(-\frac{d}{\lambda_{Si}^{SiO_2}}))}{n_{Au} \times \sigma_{Au} \times \lambda_{Au}^{Au} \times \exp(-\frac{d}{\lambda_{Au}^{Au}})}$$

n_{Si} : Nombre d'atomes de silicium par unité de volume (0,044 at/cm³)

n_{Au} : Nombre d'atomes émetteurs d'or par unité de volume (0,098 at/cm³)

I_{Si} : Aire brute du pic du silicium 2s

I_{Au} : Aire brute du pic de l'or 4f

σ_{Au} : Facteur de sensibilité relatif de l'or (14,34)

σ_{Si} : Facteur de sensibilité relatif du silicium (0,68)

λ_{Au}^{SiO₂} : Libre parcours moyen des électrons de l'or dans la silice (3,8 nm)

λ_{Au}^{Au} : Libre parcours moyen des électrons de l'or dans l'or (1,6 nm)

λ_{Si}^{SiO₂} : Libre parcours moyen des électrons du silicium dans la silice (3,6 nm)

d : Épaisseur de la coquille (Å)

Équation 4 : Calcul de l'épaisseur d'une couche uniforme de silice à partir des mesures XPS.

La densité d'atomes de soufre à l'interface avec l'or S-Au a été estimée selon l'Équation 5 à 3,0 S-Au/nm² pour les AuNR@SiO₂ où le MPTMS a été utilisé comme couche d'accroche lors de l'enrobage (Tableau 6). Cette valeur est en accord avec celle observée pour des monocouches auto-assemblées d'alcanethiols sur or sachant que la densité maximale est de 4 S-Au/nm² ^{88,89}. Celle-ci augmente respectivement à 7,25 et 4,28 S-Au/nm² après greffage du MPTMS et du TEBA à la surface des particules. D'après la formule, il se pourrait que l'aire brute de la composante du soufre lié à l'or prenne aussi en compte une contribution du soufre en interaction avec la silice, ces mesures indiqueraient alors une réorganisation de la coquille de silice lors de la silanisation des particules.

$$d (\text{S} - \text{Au} / \text{nm}^2) = \frac{I_{\text{S}} \times \rho_{\text{Au}} \times \sigma_{\text{Au}} \times \lambda_{\text{Au}}^{\text{Au}}}{I_{\text{Au}} \times M_{\text{Au}} \times \sigma_{\text{S}}} \times 10^{-21} \times N_{\text{A}} \times \cos(\theta)$$

I_{S} : Aire brute du pic du soufre lié à l'or

ρ_{Au} : Densité de l'or (19,3 g.cm⁻³)

σ_{Au} : Facteur de sensibilité relatif de l'or (14,34)

$\lambda_{\text{Au}}^{\text{Au}}$: Libre parcours moyen des électrons de l'orbitale 4f de l'or dans l'or (1,6 nm)

I_{Au} : Aire brute du pic l'or 4f

M_{Au} : Masse molaire de l'or (196,96 g.mol⁻¹)

σ_{S} : Facteur de sensibilité relatif du soufre (1,44)

N_{A} : Nombre d'Avogadro (6,022.10²³ mol⁻¹)

10⁻²¹ : Facteur pour obtenir une densité en nm²

θ : Angle d'analyse (45°)

Équation 5 : Calcul de la densité surfacique de liaisons S-Au pour une couche uniforme de silane à l'interface à partir de mesures XPS.

Ainsi, il est raisonnable de penser que les silanes utilisés se greffent dans des proportions différentes à la surface des AuNR@SiO₂. Le greffage par le TEBA conduit à une silanisation en surface des particules alors que la diffusion du MPTMS conduit aussi au bouchage des pores et à la densification de la coquille. Les quantités de silane utilisées lors des greffages et la quantité de surface à fonctionnaliser sont des paramètres bien contrôlés, il est donc possible de conclure, sur la base des résultats XPS, à une réactivité plus importante du MPTMS par rapport au TEBA.

Les AuNR@SiO₂, AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA ont également été déposées sur une surface d'or pour être caractérisées par PM-IRRAS (Figure 17). On relève de la littérature que l'analyse de suspensions colloïdales de AuNR@SiO₂ est souvent réalisée par spectroscopie infrarouge en transmission^{19,90-92}. Néanmoins, la technique PM-IRRAS a été

utilisée pour l'analyse de couches minces d'oxyde de silicium sur des surfaces d'or réfléchissantes⁹³⁻⁹⁶ et pour l'analyse de multicouches de nanoparticules de silice⁹⁷. Ce mode est particulièrement adapté pour notre système car peu de matière est nécessaire pour l'analyse (une goutte diluée de la solution colloïdale) alors que quelques milligrammes sont souvent requis en transmission.

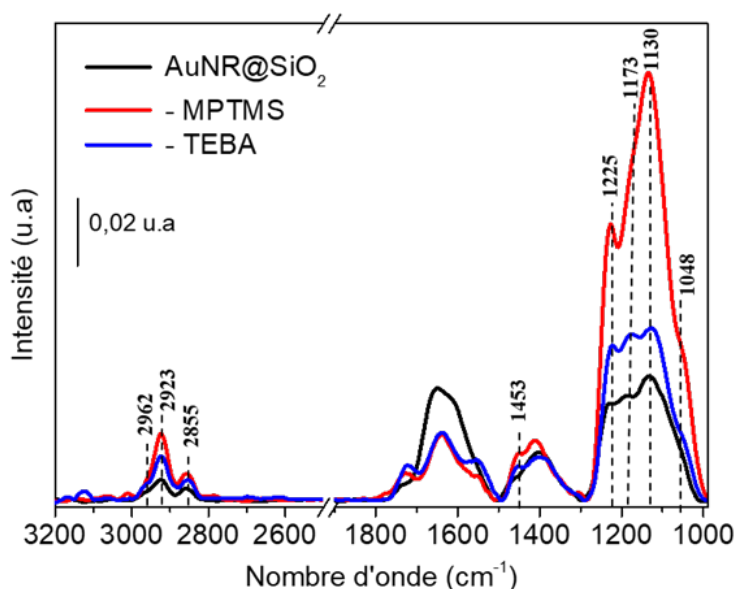


Figure 17 : Spectres PM-IRRAS des AuNR@SiO₂ (noir) et AuNR@SiO₂-MPTMS (rouge) et AuNR@SiO₂-TEBA (bleu).

Dans la région des bas nombres d'onde (1000-1500 cm⁻¹), les spectres PM-IRRAS sont dominés par une absorption importante de la coquille de silice caractérisée par deux doublets à 1225 cm⁻¹ / 1178 cm⁻¹ et 1130 cm⁻¹ / 1045 cm⁻¹. Ces doublets de bandes sont respectivement attribués aux vibrations d'élongation asymétrique $\nu_{as}(\text{Si-O-Si})$ transverses (TO) et longitudinales (LO)^{96,98}. La présence de doublets indique qu'il existe simultanément au moins deux types de structures amorphes de SiO₂ qui diffèrent l'une de l'autre par les angles des liaisons Si-O-Si et leurs intensités reflètent une augmentation de l'épaisseur de la coquille de silice après la réaction de silanisation^{93,96}. La bande située à 1453 cm⁻¹ est attribuée à la vibration de déformation $\delta(\text{CH}_2)$ des méthylènes de la chaîne alkyle des silanes à la surface des particules, cette vibration est plus marquée après réaction de silanisation. Les bandes situées dans la région des hauts nombres d'onde (3000 - 2800 cm⁻¹) sont attribuées aux modes de vibrations d'élongation des liaisons C-H : $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ à 2962 cm⁻¹, $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ à 2923 cm⁻¹ et $\nu_s(\text{CH}_2)$ à 2860 cm⁻¹^{99,100}. Ces bandes pourraient être attribuées au TEOS non hydrolysé ou au MPTMS qui a été utilisé comme couche d'accroche lors de la synthèse des AuNR@SiO₂, ces vibrations sont

plus marquées sur les spectres des particules silanisées AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA. L'absence de la vibration caractéristique du groupement -SH du MPTMS vers 2550 cm⁻¹ était attendue en raison de sa faible intensité en spectroscopie infrarouge. La bande correspondant à la vibration d'élongation du C=O de la fonction aldéhyde du TEBA attendue vers 1730 cm⁻¹ n'a pas non plus été strictement attribuée en raison de la présence de pollution sur les substrats d'or dans la région 1800 - 1500 cm⁻¹.

L'augmentation de l'intensité des bandes de vibrations d'élongation asymétrique $\nu_{as}(\text{Si-O-Si})$ transverses (TO) et longitudinales (LO) des particules silanisées tendent à démontrer un épaissement de la coquille de silice après silanisation des particules ainsi que d'une plus importante silanisation des particules lors de l'utilisation de MPTMS. Alors que l'effet observé aurait pu être attribué à des dépôts de quantité de matière de particules différentes, les résultats XPS viennent soutenir l'effet constaté par spectroscopie infrarouge.

La spectroscopie Raman exaltée de surface a ensuite été utilisée pour analyser les AuNR@SiO₂ silanisées en bénéficiant de l'exaltation du champ électromagnétique local généré par la résonance plasmonique de surface¹⁰¹. Les modifications de la structure électronique des silanes par le transfert de charge des molécules à la surface d'or devraient permettre la mise en évidence des bandes vibrationnelles caractéristiques des groupements greffés. Celles-ci sont visibles sur les spectres Raman des composés purs présentés en Annexe Figure 6a,b (i.e. la vibration d'élongation C=O du groupement aldéhyde du TEBA situé dans la région 1740 - 1720 cm⁻¹ et la vibration d'élongation S-H du groupement thiol du MPTMS situé vers 2550-2600 cm⁻¹). La Figure 18a présente les spectres SERS des AuNR@SiO₂ avant et après silanisation par MPTMS ou TEBA. On relève que les AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA n'ont pas conduit à l'exaltation attendue pour les bandes de vibrations caractéristiques des groupements fonctionnels. En effet, les bandes de vibration observées peuvent être attribuées au MPTMS qui a été utilisé comme couche d'accroche lors de la croissance de la coquille et dont les attributions sont présentées dans le Tableau S1 de la partie supplémentaire du chapitre II. L'absence de la bande de vibration d'élongation du C=O du TEBA était attendue en raison de sa faible intensité sur le spectre Raman du composé pur, traduisant l'orientation non favorable du dipôle par rapport à la surface (Annexe Figure 6b). Cependant, l'absence de la vibration d'élongation du groupement -SH est surprenante. La capacité des AuNR@SiO₂-MPTMS à exalter le signal Raman au-delà de la coquille de silice a donc été vérifiée en utilisant le cristal violet (CV), un colorant organique fréquemment utilisé comme molécule sonde pour

évaluer les propriétés d'exaltation de substrats SERS^{102,103}. Sa formule chimique est donnée en Annexe Figure 6c.

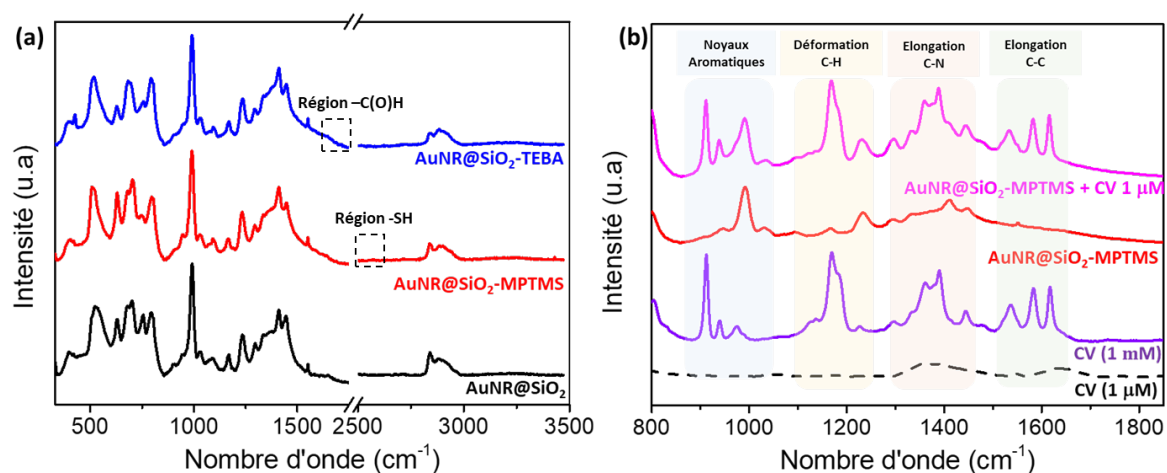


Figure 18 : Spectres SERS réalisés dans l'eau à une longueur d'onde d'excitation laser de 785 nm. (a) des AuNR@SiO₂ (noir) avant et après silanisation par MPTMS (rouge) et TEBA (bleu). (b) Spectre Raman du Cristal Violet à 1 μM (noir) et 1 mM (violet) dans l'eau, et spectres SERS des AuNR@SiO₂-MPTMS seules (rouge) et AuNR@SiO₂-MPTMS en présence de 1 μM de cristal violet (rose).

Les spectres Raman du CV à 1 mM et 1 μM et les spectres SERS des particules en présence de 1 μM de CV sont montrés Figure 18b. L'acquisition des spectres SERS a été réalisée dans l'eau, les particules sont donc orientées de manière aléatoire et leurs spectres SERS sont représentatifs de toutes les orientations possibles dont la moyenne est calculée sur l'ensemble de l'acquisition. Quatre groupes associés à différents modes de vibrations ont été déduits du spectre du CV à 1 mM (Figure 18b) : les vibrations du squelette des noyaux aromatiques entre 900 et 1000 cm⁻¹, les vibrations de déformation C-H des noyaux aromatiques, les vibrations d'élongation C-N entre 1350-1400 cm⁻¹ et les vibrations d'élongation C-C situés au-dessus de 1500 cm⁻¹^{104,105}. Ces bandes ne sont pas identifiables sur le spectre à 1 μM en raison d'une concentration trop faible et reflète la limite de détection du CV en solution. On retrouve sur le spectre SERS de la solution contenant les AuNR@SiO₂-MPTMS et le CV à 1 μM les bandes de vibration caractéristiques du CV. Ces observations confirment la capacité des particules à exalter le signal Raman d'une molécule active au-delà de la couche de silice. Cette propriété peut être caractérisée par le facteur d'exaltation (FE), défini comme le rapport des intensités des signaux SERS et Raman par molécule de colorant. Celui-ci a été évalué selon l'Équation 6¹⁰⁶ :

$$FE = \frac{I_{SERS} \times C_N}{I_N \times C_{SERS}}$$

I_{SERS} : Intensité SERS de la bande à 1618 cm⁻¹ du CV en solution à 1 mM (4416)

I_N : Intensité Raman de la bande à 1618 cm⁻¹ du CV à 1 μM (3640)

C_{SERS} : Concentration du CV dans l'échantillon SERS (1 μM)

C_N : Concentration du CV dans la solution diluée (1 mM)

Équation 6 : Relation permettant de calculer le facteur d'exaltation.

L'intensité de la vibration d'élongation C-C à 1618 cm⁻¹ du CV a été utilisée pour calculer le facteur d'exaltation par les particules. Ainsi, le FE a été estimé à 8,24.10² ce qui est comparable au FE de 1,2.10² calculé par Smitha et al. vis-à-vis de la vibration d'élongation C-C à 1618 cm⁻¹ du CV par des AuNRs de 2,4 de rapport d'aspect¹⁰³. Cette étude tend à montrer que malgré l'activité SERS des particules en solution, les concentrations surfaciques de silane des AuNR@SiO₂ sont trop faibles pour permettre leur identification directe en solution. Une stratégie envisagée serait de déposer les nanostructures à sec sur un substrat. Un fois concentrées, les nanostructures en interactions proches pourraient conduire à l'apparition de régions particulières appelées « points chauds » pouvant fournir des facteurs d'amplification SERS de l'ordre de 10⁸⁻¹⁰⁷.

4. Conclusion de la partie :

L'objectif de cette étude était de maîtriser la condensation des silanes afin de produire à la surface des AuNR@SiO₂ une couche d'accroche aux groupements fonctionnels variés et de concentration surfacique suffisante sans augmenter l'épaisseur de la coquille de silice. Cela a été démontré sur les AuNR@SiO₂-MPTMS, dont la densité de moyenne des fonctions thiols de surface, évaluée par dosage chimique, est de 2,4 ± 0,6 SH/nm². Il n'a pas été possible d'estimer la densité surfacique des fonctions aldéhydes par le test BCA. Il serait néanmoins envisageable de l'évaluer indirectement par UV-Vis ou d'émission de fluorescence après couplage des fonctions aldéhyde avec un BODIPY-hydrazide et clivage de l'hydrazone. Les images de MET ont permis de mesurer une faible augmentation de la coquille de silice d'environ 1 nm après greffage des silanes MPTMS et TEBA. Les mesures d'absorption UV-Vis ont montré une conservation des propriétés optiques des particules après silanisation et les mesures de DLS et de potentiels zêta ont confirmé leur stabilité colloïdale. Les greffages ont été caractérisés par XPS, cette technique a mis en évidence une augmentation des rapports

atomiques S/Au et O/Si respectivement pour le MPTMS et le TEBA. Il n'a pas été possible d'observer par PM-IRRAS et par SERS les bandes de vibration caractéristiques des groupements fonctionnels, néanmoins le PM-IRRAS a permis suivre l'augmentation de l'intensité des bandes de vibrations caractéristiques de la silice après greffage. Cette étude a permis de préparer les surfaces à l'immobilisation covalente d'anticorps en vue de l'élaboration d'immunocapteurs LSPR opérant en solution. Les quantités d'anticorps greffés ont été estimées avant la mise en place des tests de biodétection. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie qui suit.

Partie 4 : Greffage et quantification d'anticorps à la surface des AuNR@SiO₂

Cette partie se consacre au greffage d'un anticorps modèle anti-IgG de lapin produit chez la chèvre (anti-rIgG) à la surface des AuNR@SiO₂ (physisorption) et des AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA (chimisorption) obtenus dans la partie 3 selon le schéma général Figure 19 et de comparer les quantités greffées en surface. Les particules conjuguées ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible, mesures DLS et de zétamétrie. Le taux de recouvrement en anti-rIgG à la surface des particules a été estimé de manière indirecte par spectrofluorimétrie, en mesurant l'intensité de fluorescence des surnageants des particules conjuguées à un anti-rIgG préalablement marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) contenant la fraction d'anticorps n'ayant pas réagi. Cette méthode a initialement été développée par Lu Zhang, ancienne doctorante au sein de notre équipe qui l'a appliquée à des conjugués de nanoparticules d'or sphériques de 13 nm de diamètre¹⁰⁸. Cette méthode a été transposée à la quantification d'anti-rIgG fluorescent à la surface d'AuNR@SiO₂.

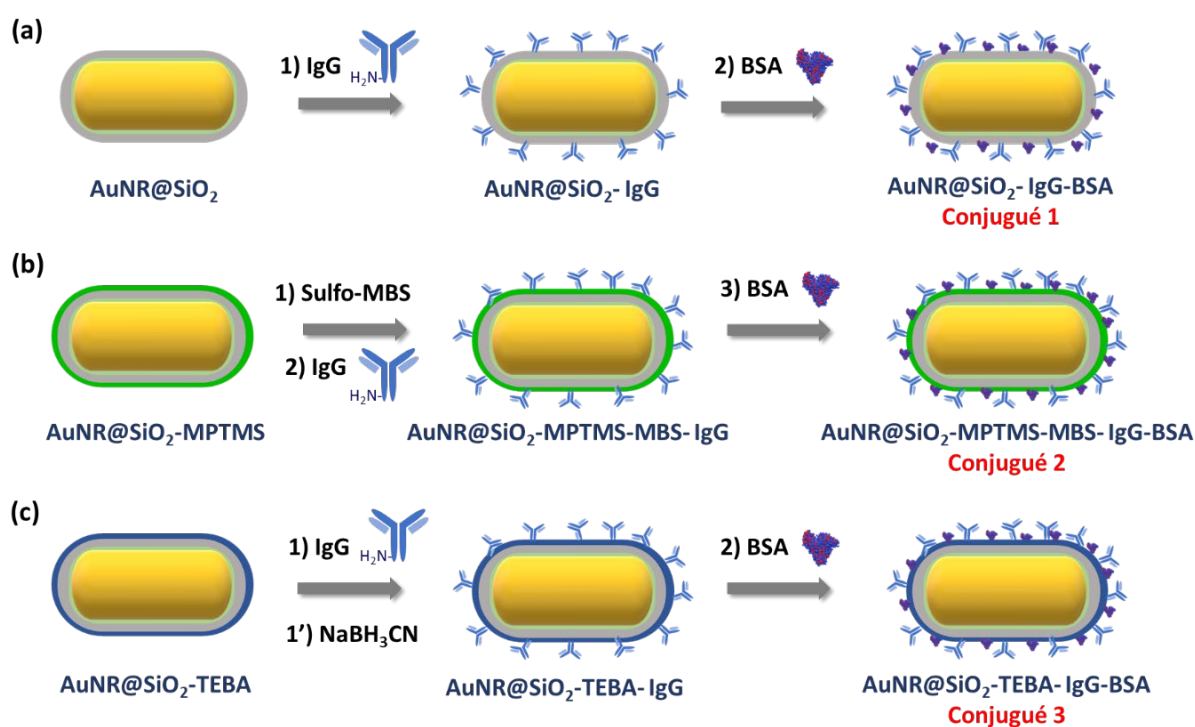


Figure 19 : Schéma général conduisant au greffage d'IgG et au blocage des sites d'adsorption non spécifiques pour (a) physisorption sur AuNR@SiO₂ (conjugué 1), chimisorption sur (b) AuNR@SiO₂-MPTMS (conjugué 2) et (c) AuNR@SiO₂-TEBA (conjugué 3).

1. Marquage d'anti-rIgG par la fluorescéine (FITC) et conjugaison aux AuNR@SiO₂.

Le couplage de l'anti-rIgG et de l'isothiocyanate de fluorescéine se fait *via* les fonctions amines portées par les lysines présentes dans l'anticorps et conduit à la formation de liaisons thiourée (Figure 20). Le ratio F/P définissant le nombre de molécules de fluorescéine par anticorps a été évalué à 2,8.

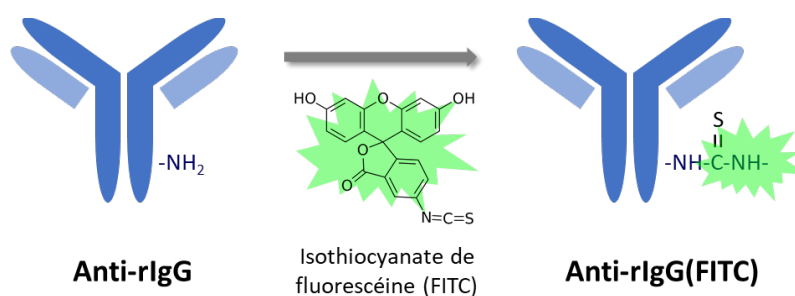


Figure 20 : Illustration du marquage fluorescent de l'anti-rIgG à l'isothiocyanate de fluorescéine d'après ¹⁰⁸.

D'après la littérature, les IgG contiennent approximativement 70 résidus lysines¹⁰⁹, la modification d'environ 3 résidus ne devrait pas significativement affecter la charge globale de l'anticorps ni la nature de son interaction avec la surface des particules. L'anti-rIgG marqué à la fluorescéine a été physisorbé à la surface des AuNR@SiO₂ (conjugué 1), chimisorbé à la surface des AuNR@SiO₂-MPTMS (conjugué 2) et AuNR@SiO₂-TEBA (conjugué 3). Une étape de blocage des sites d'adsorption non spécifique par l'albumine de sérum bovin (BSA) a été réalisée sur tous les conjugués (Figure 19).

Il est attendu que les interactions électrostatiques entre la surface négativement chargée des AuNR@SiO₂ et les acides aminés basiques des IgG permettent la physisorption des anticorps en une étape. Différentes étapes de couplage sont nécessaires pour permettre l'attachement covalent de l'anti-rIgG à la surface des AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA (Figure 21). Le m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester (sulfo-MBS) est un agent de couplage hétéro-bifonctionnel. Il comporte un groupement maleimide pouvant réagir avec les fonctions thiol présentes à la surface des AuNR@SiO₂-MPTMS lors d'une première étape et former des liaisons thioéther stables. Les particules sont ensuite lavées pour éliminer le Sulfo-MBS présent en excès dans la solution, ce qui permet de diriger le couplage des IgG vers les entités sulfo-MBS en surface. L'anti-rIgG est ensuite ajouté pour réagir via ses fonctions amines primaires libres avec les groupements N-hydroxysulfosuccinimide en surface et former des liaisons amides. Les groupements aldéhydes des AuNR@SiO₂-TEBA peuvent

réagir avec les fonctions amines primaires de l'IgG pour former dans un premier temps une base de Schiff. Celle-ci est ensuite stabilisée par réduction au cyanoborohydure de sodium.

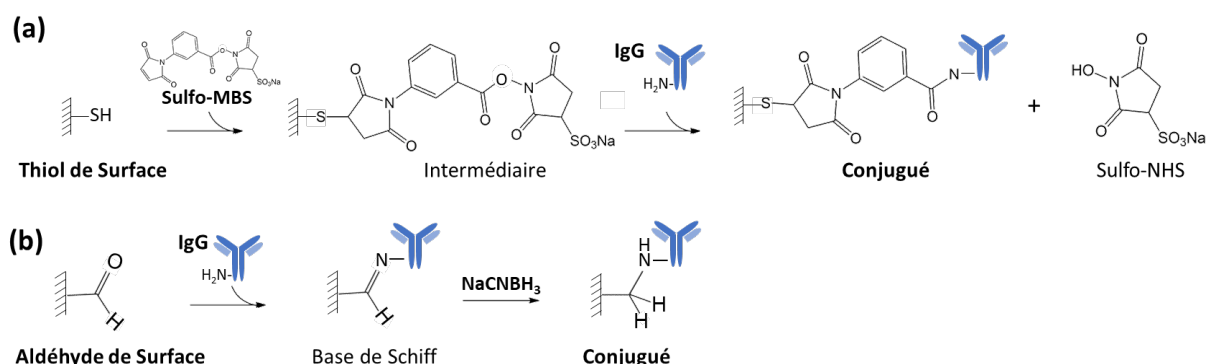


Figure 21 : Schémas réactionnels de réaction entre l'anti-rIgG et (a) les fonctions thiol de surface et (b) les fonctions aldéhyde de surface.

Le suivi des différentes étapes de conjugaison des anticorps anti-rIgG aux AuNR@SiO₂ (conjugué 1), AuNR@SiO₂-MPTMS (conjugué 2) et AuNR@SiO₂-TEBA (conjugué 3) a été réalisé par spectroscopie UV-Visible (Figure 22). Pour cette étude, les différents conjugués ont été réalisés en triple à partir des mêmes lots de AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA (série 1b, Tableau 3) ; la position des bandes LSPR longitudinales est calculée sur le zéro de la dérivée 1^{ère} en utilisant la méthode des 19 points comme il est recommandé dans la littérature¹¹⁰ et les écarts-type associés sont consignés Tableau 7. Cette méthode permet de réduire la propagation du bruit associé à la dérivée première du spectre d'absorption (Annexe Figure 7). On note tout d'abord une différence dans l'amplitude du déplacement et de la largeur à mi-hauteur de la bande LSPR longitudinale des nanoparticules silanisées issues de la série 1b comme cela a été relevé dans la partie 3 lorsque les synthèses sont effectuées à des jours différents. La position de la bande plasmon longitudinale des AuNR@SiO₂ initialement à 716,1 nm se déplace de 9 nm vers le rouge après 1 h 30 d'incubation avec l'anti-rIgG(FITC), indiquant leur adsorption à la surface des particules. Celle-ci se décale vers le rouge de 6 nm supplémentaire après le blocage des sites d'adsorption non spécifiques par la BSA, lavage des particules et leur re-suspension dans le tampon de stockage. La bande LSPR longitudinale des AuNR@SiO₂-MPTMS initialement positionnée à 720 nm se déplace de 2,5 nm après ajout de l'agent de couplage sulfo-MBS et lavage des particules. L'ajout d'anti-rIgG(FITC) entraîne un déplacement vers le rouge supplémentaire de 5,7 nm et le blocage des sites d'adsorption non spécifiques par la BSA induit un déplacement de 5 nm.

La bande LSPR longitudinale des AuNR@SiO₂-TEBA initialement positionnée à 719 nm se déplace vers le rouge de 6,5 nm après addition d'anti-rIgG(FITC); l'ajout de BSA et le lavage des particules induisent un déplacement supplémentaire vers le rouge de 5,2 nm. On note que la physisorption de l'anti-rIgG induit un déplacement plus important de la bande LSPR longitudinale (~ 9 nm) par rapport aux conjugués chimisorbés (~ 6 nm) et que l'ajout d'anti-rIgG(FITC) ne conduit pas à une augmentation significative de la largeur à mi-hauteur.

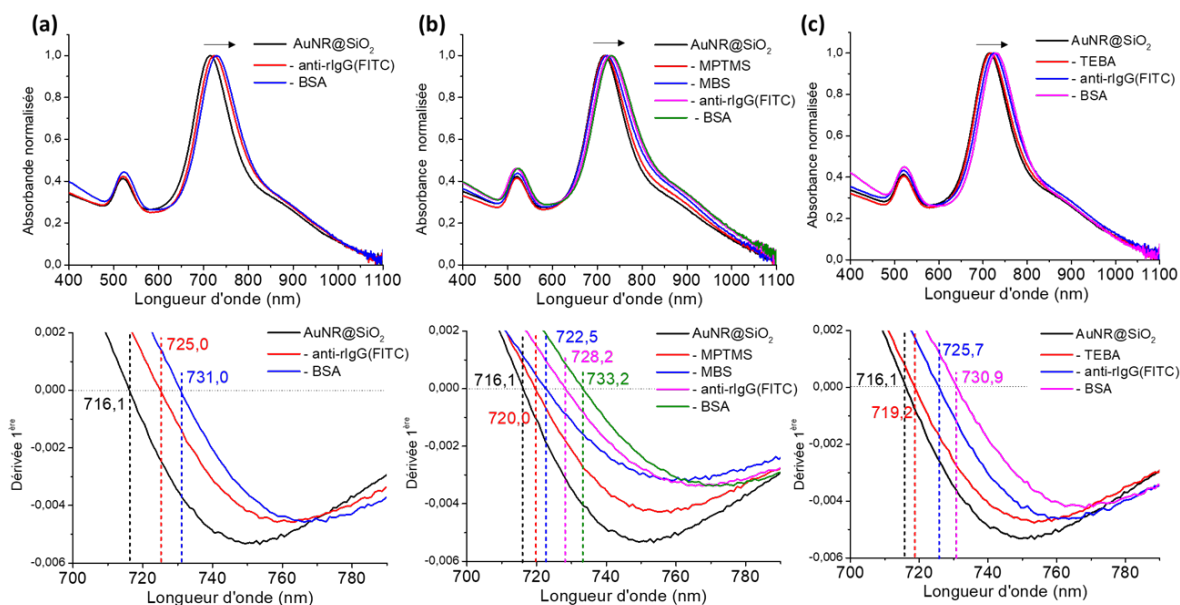


Figure 22 : Spectres UV-visible normalisés (haut) et leur dérivée première (bas) montrant les différentes étapes de conjugaison des (a) AuNR@SiO₂ (conjugué 1), (b) AuNR@SiO₂-MPTMS (conjugué 2), (c) AuNR@SiO₂-TEBA (conjugué 3) issues de la série de silanisation 1b.

Le lot de particules silanisées a été caractérisé par microscopie électronique à transmission (Annexe Figure 8-a,b). L'épaisseur de la coquille de silice est identique à celle rapportée en partie 3 soit 4,6 (\pm 0,7) nm et 4,7 (\pm 1,1) nm respectivement pour les AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA. En revanche, il n'est pas possible d'observer l'anti-rIgG à la surface des particules en raison des sels de phosphate et de grandes quantités de BSA présents dans le tampon de stockage (Annexe Figure 8-c). Des mesures de diffusion dynamique de la lumière et de zétamétrie ont été faites avant et après conjugaison afin de comparer les changements de position des pics de diffusion rotationnelle, translationnelle et des potentiels de surface consécutifs au greffage d'anti-rIgG(FITC). Ces mesures sont résumées dans le Tableau 7 et les graphiques associés aux mesures sont représentés Figure 23.

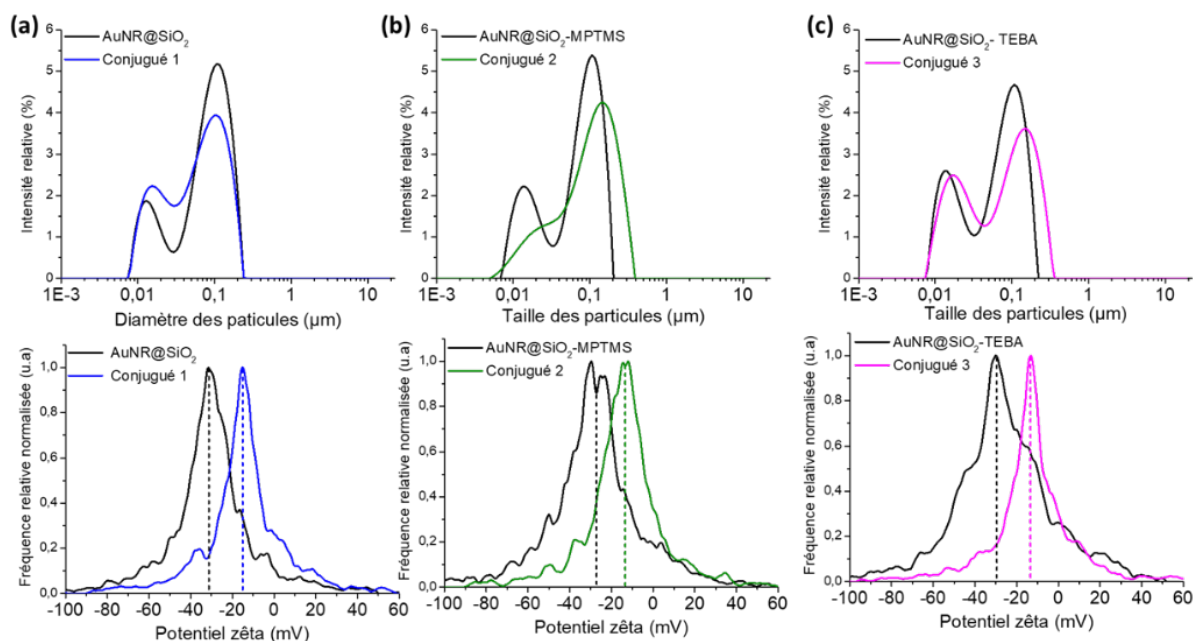


Figure 23 : Mesures de diffusion dynamique de la lumière (haut) et de mobilité électrophorétique à pH 7,4 (bas) des particules avant et après conjugaison d'anti-rIgG(FITC) et blocage des sites d'adsorption non spécifiques par la BSA. (a) AuNR@SiO₂-anti-rIgG (conjugué 1), (b) AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (conjugué 2) et (c) AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (conjugué 3).

Les mesures DLS permettent de conclure sur la stabilité colloïdale des particules après conjugaison des anticorps et blocage des sites d'adsorption non spécifiques. Sur les mesures DLS, il apparaît que la position du pic de diffusion rotationnelle augmente pour les conjugués 1, 2 et 3 et que la position du pic de diffusion translationnelle augmente pour les conjugués 2 et 3, mais pas pour le conjugué 1. A notre connaissance, la littérature ne présente pas d'études DLS concernant les interactions entre AuNRs enrobés de silice et les protéines. Néanmoins, Liu et al. ont mené une étude DLS des interactions entre AuNRs de différents rapports d'aspect (1,4 ; 1,9 ; 2,4 ; 3,0) recouverts de la bicouche de CTAB avec la BSA et des IgG humains¹¹¹. De manière surprenante, aucun effet sur les pics de diffusion rotationnelle et translationnelle n'a été observé sur les AuNRs de rapports d'aspect 1,4 ; 1,9 et 3,0. Pour les AuNRs de rapports d'aspect 2,4 (60 x 25 nm), ils notent une augmentation de la position des pics de diffusion rotationnelle et translationnelle respectivement de 25 nm et 125 nm après interaction avec la BSA et de 4 nm et 10 nm dans le cas d'interaction avec l'IgG humain. Ces augmentations sont attribuées à l'agrégation des AuNRs et à la formation d'une couronne stable de protéines respectivement dans le cas d'interaction avec la BSA et l'IgG humain. En raison de la nature différente des surfaces, il est attendu un comportement différent des interactions entre les protéines et la surface de silice. L'interprétation des résultats DLS dans le cas de particules

anisotropes n'est pas triviale. L'absence de décalage du pic de diffusion translationnelle du conjugué 1 (physisorption) pourrait s'expliquer par une orientation des anti-rIgG à la surface des particules dans une configuration majoritairement couchée (*flat-on*). On note l'absence du pic de la BSA présente dans le tampon de stockage, celui-ci est attendu aux alentours de 10 nm^{112,113} et serait masqué par le pic de diffusion rotationnelle des conjugués. La charge de surface des particules avant et après conjugaison a été mesurée à pH 7,4 dans un tampon phosphate (5 mM). On peut voir une augmentation du potentiel zêta de chaque conjugué aux alentours de -15/ -16 mV. La charge de surface des particules devrait être proche des charges nettes des protéines seules à pH similaire, précédemment mesurées à -16,1 mV pour un IgG de lapin et -10,9 mV pour la BSA¹¹⁴. Les potentiels mesurés sont cohérents avec ceux attendus ainsi qu'avec les potentiels mesurés par notre groupe pour des conjugués de nanoparticules d'or sphériques¹⁰⁸ et des nanoparticules cœur-coquille or@argent¹¹⁵.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif de la position de la bande plasmon longitudinale, des largeurs à mi-hauteur, des positions des pics de diffusion rotationnelle et translationnelle et des potentiels zêta moyens des conjugués AuNR@SiO₂ (conjugué 1), AuNR@SiO₂-MPTMS (conjugué 2), AuNR@SiO₂-TEBA (conjugué 3).

	Etape	λ_{\max} (nm)	LMH (nm)	Pos. Pic rota. (nm)	Pos. Pic transla. (nm)	Potentiel Zêta moyen (mV)
Conjugué 1	AuNR@SiO ₂	716,1	87	13	110	- 32,5 ± 0,9
	- anti-rIgG(FITC)	724,7 ± 0,5	91 ± 2,2	-	-	-
	- BSA	729,6 ± 1,0	92,5 ± 1,6	16	108	- 16,4 ± 0,9
Conjugué 2	-MPTMS	720,0	92	14	110	-28,2 ± 1,5
	- MBS	722,0 ± 0,5	95 ± 0,3	-	-	-
	- anti-rIgG(FITC)	728,4 ± 0,8	96 ± 1,0	-	-	-
	- BSA	732,9 ± 1,0	97 ± 0,8	22	150	-15,8 ± 0,6
Conjugué 3	-TEBA	719,2	89	14	111	- 25,8 ± 1,4
	- anti-rIgG (FITC)	725,2 ± 0,4	90,2 ± 0,3	-	-	-
	-BSA	730,2 ± 0,5	89,7 ± 1,5	17	152	- 15,3 ± 0,5

2. Estimation du taux de recouvrement par spectroscopie de fluorescence

L'estimation du taux de recouvrement en anti-rIgG(FITC) des conjugués 1, 2 et 3 a été déterminée de manière indirecte par spectrofluorimétrie en déterminant la concentration d'anti-rIgG(FITC) dans les surnageants de lavage S1 à S4 collectés après les cycles successifs de purification. La quantité d'anti-rIgG(FITC) lié aux conjugués est considérée comme étant la différence entre la quantité d'anti-rIgG(FITC) de départ et la quantité présente dans les surnageants de lavage. L'émission de fluorescence étant très sensible aux conditions dans lesquelles sont réalisées les mesures (concentration, température) ; deux courbes d'étalonnage ont été réalisées avec des concentrations connues d'anti-rIgG(FITC) de manière à reproduire les environnements (matrices) dans lesquels les mesures de fluorescence ont été faites. La première matrice correspond au surnageant de synthèse S1 comportant 0,5% de BSA issu de l'étape de blocage des sites d'adsorption non spécifiques (Annexe Figure 9). La deuxième matrice correspond aux surnageants de synthèse S2 S3 S4 dans le tampon de stockage comportant 0,25% de BSA (Annexe Figure 10). D'après les équations des droites d'étalonnage, une faible influence du milieu sur la mesure d'émission de fluorescence a été observée. Sur les spectres de fluorescence des surnageants S1 et S2, on observe des intensités de fluorescence plus faibles dans les surnageants issus des conjugués 2 par rapport au conjugué 1 en raison d'un greffage plus important d'anti-rIgG(FITC) à la surface des AuNR@SiO₂-TEBA (Figure 24 a,b). Il n'est néanmoins pas possible de comparer l'intensité de fluorescence mesurée dans le surnageant du conjugué 2 avec les intensités mesurées sur les surnageants des conjugués 1 et 3. Cela a été attribué à la présence d'anti-rIgG(FITC) collé aux parois du tube Eppendorf lors de la conjugaison. Contrairement aux lots 1 et 3 de conjugués, les particules du lot 2 n'ont pas été traitées au bain à ultrasons avant la 1^{ère} étape de lavage. La concentration en conjugués a été calculée d'après l'absorbance des particules au maximum d'absorption de la bande LSPR longitudinale avant l'ajout de l'anti-rIgG(FITC), en faisant l'hypothèse que le coefficient d'extinction molaire des AuNRs reste constant après fonctionnalisation.

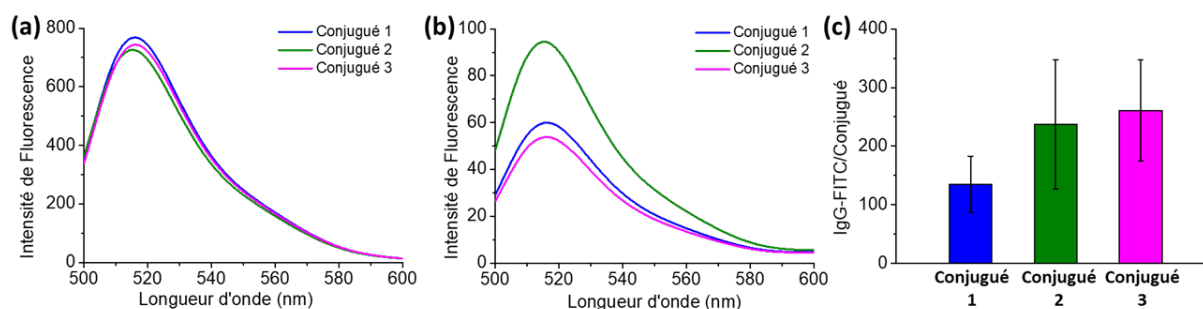


Figure 24 : Spectres d'émission de fluorescence des surnageants S1 (a) et S2 (b) des différents conjugués. (c) Taux de recouvrement en IgG(FITC) par conjugué. La barre d'erreur représente l'écart-type associé aux mesures obtenues en tripliquat sur chacun des conjugués.

Les taux de recouvrement calculés en anti-rIgG(FITC) par particule sont de 135 (± 48) pour la conjugaison par physisorption sur AuNR@SiO₂ (conjugué 1); 238 (± 120) pour la conjugaison par chimisorption sur AuNR@SiO₂-MPTMS (conjugué 2) et 262 (± 86) pour la conjugaison par chimisorption sur les AuNR@SiO₂-TEBA (conjugué 3) (Annexe tableau 3 ; Figure 24 c). Ces valeurs ont été obtenues à partir de la moyenne des intensités de fluorescence sur des tripliquats de chaque conjugué étudié. Bien qu'une attention particulière ait été portée à la préparation des échantillons, les barres d'erreur observées peuvent être le reflet d'une perte d'anti-rIgG(FITC) durant les différentes étapes de lavage. Le taux de recouvrement en anti-rIgG chimisorbé (AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA) est identique et deux fois supérieur à ce qui est trouvé pour le conjugué physisorbé (AuNR@SiO₂). La chimie de surface ne semble pas influencer la quantité d'IgG par nanoparticule dans le cas de la chimisorption. La méthode de couplage utilisée ne permet pas de contrôler l'orientation des IgG en surface ainsi, plusieurs orientations sont possibles. Dans le cas de la physisorption, le taux de recouvrement inférieur pourrait refléter la présence d'anticorps couchés en interaction directe à la surface des particules, espaçant les entités IgG et résultant en une couche moins dense.

A titre de comparaison, le taux de recouvrement théorique moyen d'une monocouche d'IgG a été calculé à partir de la surface d'une nanoparticule (AuNRs nu, AuNRs enrobée de silice et AuNR@SiO₂ silanisée, d'épaisseur moyenne de 3,5 et 4,6 nm respectivement) et la surface moyenne théorique occupée par un anticorps (Figure 25, Tableau 8)³³.

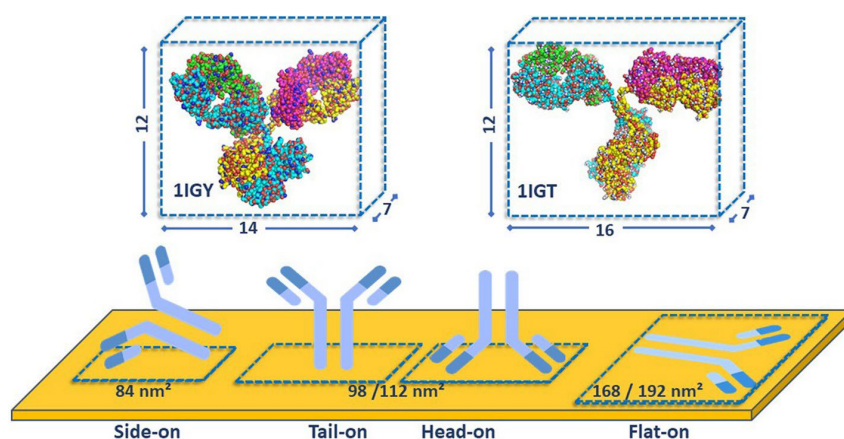


Figure 25 : Projection sur une surface des structures cristallographiques d'IgG1 (1IGY) et IgG2a (1IGT) de souris^{116,117} en fonction de leur surface d'occupation théorique dépendamment de l'orientation de l'anticorps. Schéma tiré de³³.

Les taux de recouvrement sont de 115 ; 155 et 167 IgG/particules pour les AuNRs, AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂ silanisées. Ces valeurs indiquent que les taux mesurés par notre méthode, sont surestimés à l'instar de ce qui avait été précédemment observé sur les conjugués préparés à partir de nanoparticules sphériques¹⁰⁸. Comme il a été dit, les mesures de fluorescence sont sensibles à plusieurs facteurs, notamment la matrice dans lequel est effectué la mesure. Cette différence n'a pas été relevée dans notre étude, une erreur sur la courbe d'étalonnage d'une des deux matrices se répercuterait sur les taux de recouvrement.

Tableau 8 : Taux de recouvrement théoriques en IgG par particule en fonction de leurs orientations possibles sur la surface.

	Taille AuNR/ Epaisseur SiO ₂ (nm)	Surface particule (nm ²)	IgG/particule			Moyenne
			Side-on	Tail-on /Head-on	Flat-on	
AuNR	102x40	12818	153	122	71	115
AuNR@SiO ₂	3,5	17260	205	164	96	155
-MPTMS/TEBA	4,6	18609	222	178	103	167

Les spectres de fluorescence des conjugués ont également été mesurés (Figure 26). On observe qu'ils présentent un profil d'émission similaire à celui de l'anti-rIgG(FITC) avec un maximum à 512 nm et des intensités d'émission de 40, 35 et 38 respectivement pour les conjugués 1, 2 et 3. Ce résultat diffère de celui préalablement relevé par notre groupe pour des AuNPs sphériques pour lesquelles une extinction totale de la fluorescence de l'anti-rIgG(FITC) avait été observée¹⁰⁸. Des solutions de AuNR@SiO₂, AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA non conjugués sont utilisées comme références et l'intensité d'émission est mesurée à concentration équivalente (Figure 26).

On note que les particules non conjuguées présentent un maximum d'émission situé à 502 nm. L'émission de fluorescence AuNRs a préalablement été observée par le groupe de Mostafa El Sayed et attribuée à la recombinaison interbandes de paires électron-trou^{118,119}. L'intensité de fluorescence théorique de l'anti-rIgG(FITC) conjugué aux nanoparticules a été calculée à partir de la concentration des particules après conjugaison, du taux de recouvrement, et de la droite d'étalonnage mimant la matrice 2 (Annexe tableau 3). Elle serait respectivement de 147 ; 197 et 243 pour les lots 1, 2 et 3. En comparant ces valeurs aux intensités de fluorescence expérimentales mesurées Figure 26, on pourrait conclure à une extinction de la fluorescence de l'anti-rIgG(FITC) sur les nanobatonnets d'or. Cela pourrait être attribué à la proximité entre les entités fluorescéine et le cœur métallique et / ou à la proximité entre les entités fluorescéine elles-mêmes. Le groupe de Catherine J. Murphy a montré l'importance de la distance entre un fluorophore et le cœur métallique des AuNRs, en faisant varier cet écart entre 11 et 26 nm par une coquille de silice¹⁹. Ainsi, ils ont conclu à une exaltation de l'intensité d'émission du fluorophore d'un facteur 10 lorsque que celui-ci est distant de 17 nm du cœur métallique. Néanmoins, leurs résultats ont été obtenus dans des conditions particulières : utilisation d'une source d'excitation laser dans le proche infrarouge, près du maximum du pic LSPR longitudinal et du pic d'excitation du fluorophore tout en contrôlant la distance entre les fluorophores. Par ailleurs, leur étude n'inclut pas de données sur les très fines coquilles de silice (< 11 nm).

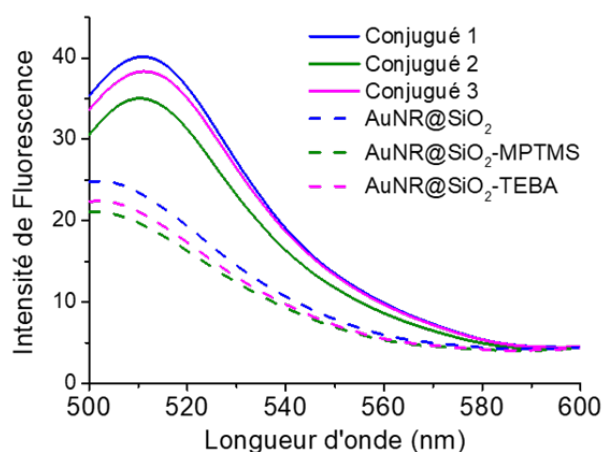


Figure 26 : Spectres de fluorescence des particules conjuguées à anti-rIgG(FITC) et des particules initiales ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$).

Il ne serait pas raisonnable d'estimer des taux de recouvrement par mesure directe de l'émission de fluorescence. En effet, les mécanismes décrivant les interactions entre particules plasmoniques et fluorophores sont complexes, et dépassent le cadre de notre étude.

3. Conclusion de la partie

Dans cette partie, la physisorption de l'anticorps de chèvre dirigé contre l'IgG de lapin a été faite à la surface des AuNR@SiO₂. Cet anticorps a également été immobilisé de manière covalente à la surface de AuNR@SiO₂ possédant des fonctions réactives thiol ou aldéhyde afin de permettre une meilleure stabilité dans le temps de la couche de capture. Les conjugués sont colloïdalement stabilisés par la concomitance de répulsions stériques et électrostatiques dues à la couche de protéine en surface des particules (IgG + BSA). Le taux de recouvrement d'IgG par conjugué a été estimé de manière indirecte par spectrofluorimétrie en mesurant la concentration d'anti-rIgG(FITC) non liée. Les valeurs obtenues sont proches de l'obtention d'une monocouche d'anticorps à la surface des particules. Nous avons trouvé qu'une quantité inférieure d'IgG se greffait par physisorption, ceci résultant peut être d'orientations différentes des anticorps en interaction directe avec la surface de silice, la couche de capture formée serait moins dense que lors de la chimisorption des IgG. L'inconvénient principal de cette méthode de dosage est sa sensibilité aux conditions de mesure pouvant induire des incertitudes dans les résultats obtenus. Le dosage direct par fluorescence de l'anti-rIgG(FITC) lié aux AuNR@SiO₂ permettrait de résoudre ces inconvénients mais nécessiterait au préalable de trouver les bonnes conditions pour dissoudre les AuNRs d'or et la coquille de silice en préservant l'intégrité du fluorophore. Pour évaluer l'apport de la coquille de silice sur le greffage d'anticorps, il aurait été intéressant d'appliquer cette méthode à la quantification d'IgG conjugué aux AuNRs recouverts de CTAB. Dans leur étude, Rostro-Kohanloo et al. ont mesuré par spectroscopie de fluorescence un taux de recouvrement de 2 IgG par AuNR (L x l : 50 x 15 nm) en utilisant des IgG de lapin marqués par le fluorophore Alexa Fluor-488¹²⁰. Néanmoins cette mesure a été réalisée directement sur les conjugués AuNR-IgG marqués et ne tient pas compte des phénomènes d'extinction liés à la surface d'or.

Les conjugués AuNR@SiO₂, AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA présentent maintenant une couche de reconnaissance et peuvent être utilisés comme sondes pour la réalisation de tests de biodétection LSPR en solution de leur antigène, l'IgG de lapin.

Partie 5 : Elaboration d'immunocapteurs LSPR en solution

Ce chapitre traite de l'élaboration de biocapteurs plasmoniques à partir des conjugués élaborés dans la partie 4 possédant à leur surface un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin pour la détection en solution d'un antigène modèle, l'IgG de lapin (Figure 27). La transduction de la reconnaissance moléculaire se base sur les propriétés plasmoniques des AuNRs et la sensibilité de la bande plasmon longitudinale au changement d'indice de réfraction à la proximité des particules. Les conjugués de la partie 4 seront appelés nanosondes tout le long de cette partie. Trois sondes aux chimies de surface différentes ont été élaborées avec un anticorps non marqué : physisorption sur les AuNR@SiO₂ (nanosonde 1) et chimisorption sur les AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA (nanosondes 2/3), la détection a été suivie par spectroscopie UV-Visible et les performances analytiques des différentes nanosondes ont été comparées.



Figure 27 : Schéma général de la détection de l'IgG de lapin par les sondes AuNR@SiO₂ (nanosonde 1), AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA (nanosondes 2/3)

1. Préparation et caractérisation des conjugués

Les lots de particules silanisées AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA utilisés pour cette étude sont issus de la synthèse 1a' (Tableau 3). La procédure suivie conduisant au greffage d'anticorps à la surface des particules est identique à celle présentée dans la partie 4 mais utilise un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin non marqué. Les propriétés de cet anticorps au regard du greffage ne devraient pas être différentes. Le suivi du greffage a été fait par spectroscopie UV-Visible et la lecture du maximum de la bande LSPR longitudinale est faite sur le zéro de la dérivée première du spectre d'absorption, selon la méthode des 19 points (Figure 28).

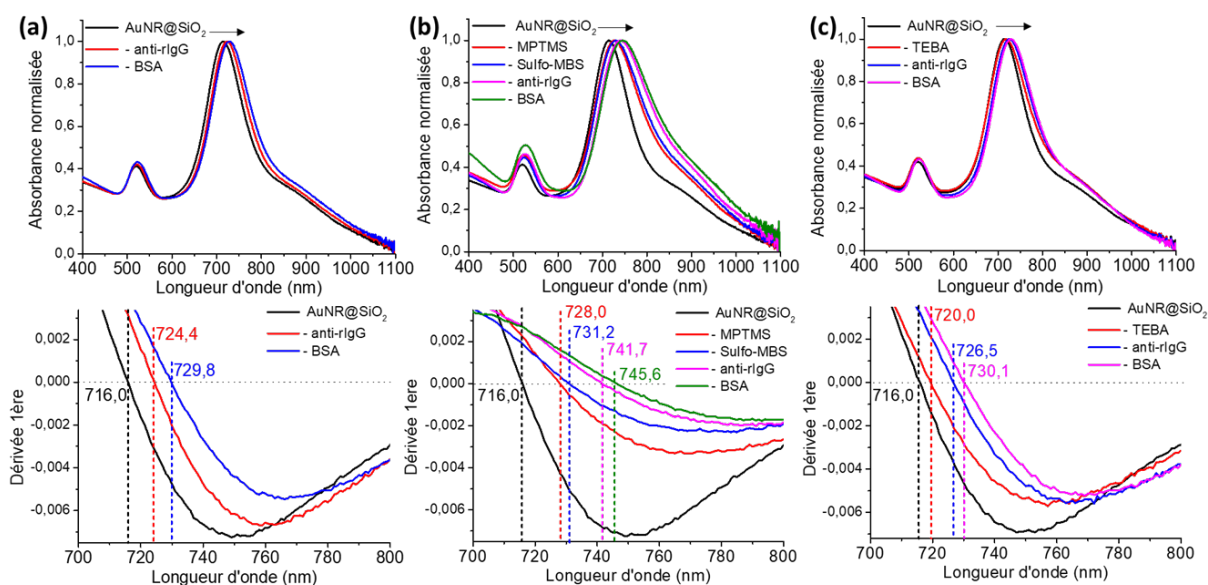


Figure 28 : Spectres UV-visible normalisés (haut) et de leurs dérivées premières (bas) montrant les différentes étapes de conjugaison des (a) AuNR@SiO₂ (nanosonde 1), (b) AuNR@SiO₂-MPTMS (nanosonde 2), (c) AuNR@SiO₂-TEBA (nanosonde 3) issus de la série de silanisation 1a'.

On remarque la bonne reproductibilité des réactions de silanisation lorsque celles-ci sont réalisées le même jour. Les déplacements mesurés sont respectivement de 12 nm et 4 nm pour les AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA., ce qui est proche de ce qui avait été trouvé pour la série 1a de la partie 3 (13 nm et 5 nm). Les lots de particules silanisés présentés dans ici n'ont pas été caractérisés par microscopie électronique à transmission et nous nous référons aux mesures d'épaisseurs de coquilles obtenues pour la série 1a de la partie 3 (i.e. 3,6 nm pour les AuNR@SiO₂ et environ 4,5 nm pour les AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA, Figure 15). Les déplacements mesurés après physisorption de l'anticorps à la surface des AuNR@SiO₂

(nanosonde 1) sont de 8,4 nm auxquels s'ajoutent 5,4 nm lors du blocage des sites d'adsorption non spécifiques par la BSA et lavage des particules. Lors de la conjugaison des AuNR@SiO₂-MPTMS (nanosonde 2), 3,2 nm de déplacement sont observés après réaction avec l'agent de couplage sulfo-MBS auxquels s'ajoutent 10,5 nm supplémentaires lors de greffage de l'anticorps et 3,9 nm après blocage à la BSA et lavage des particules. Enfin pour la conjugaison des AuNR@SiO₂-TEBA (nanosonde 3), le greffage d'anticorps induit un déplacement de 6,5 nm et le blocage par la BSA 3,6 nm. Pour cette étude, les nanosondes 1, 2 et 3 sont synthétisées en double, la position moyenne des bandes LSPR longitudinales est calculée sur le zéro de la dérivée 1^{ère} et les écarts-type associés aux mesures sont consignés Tableau 9.

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière et de zétamétrie sont faites dans le tampon phosphate à pH 7,4 avant et après conjugaison des particules afin de comparer les évolutions des pics de diffusion rotationnelle, translationnelle et des potentiels de surface (Tableau 9). Les résultats obtenus sont reproductibles avec ceux présentés dans la partie 4 au regard de la stabilité colloïdale des particules et de leur charge de surface. On relève toutefois que la conjugaison l'anticorps aux AuNR@SiO₂-MPTMS a induit un déplacement de la bande plasmon de 3 nm de plus que ce qui a été trouvé dans la partie 4.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de la position de la bande plasmon longitudinale, des largeurs à mi-hauteur, des positions des pics de diffusion rotationnelle et translationnelle et des potentiels zêta moyen des sondes 1,2 et 3.

	Etape	λ_{\max} (nm)	LMH (nm)	Pos. Pic rota. (nm)	Pos. Pic transla. (nm)	Potentiel Zêta moyen (mV)
Nanosonde 1	AuNR@SiO ₂	716,0	87	13	110	- 32,0 ± 1,9
	- anti-rIgG	724,5 ± 0,3	90 ± 1,0	-	-	-
	- BSA	729,8 ± 0,1	93 ± 1,0	15	109	- 15,0 ± 0,7
Nanosonde 2	-MPTMS	728,0	115	12	101	-28,0 ± 1,0
	- MBS	730,6 ± 0,5	116 ± 2,0	-	-	-
	- anti-rIgG	740,0 ± 1,7	119 ± 8,0	-	-	-
	- BSA	744,3 ± 1,8	122 ± 9,5	15	132	-15,2 ± 0,6
Nanosonde 3	-TEBA	720,0	98	12	101	- 27,0 ± 1,0
	- anti-rIgG	726,8 ± 0,4	99,2 ± 0,2	-	-	-
	-BSA	730,6 ± 0,6	99,4 ± 0,5	15	133	- 16,2 ± 0,6

2. Réalisation d'immunocapteurs LSPR en solution

Lors de l'élaboration d'immunocapteurs LSPR, il est d'importance que la couche de reconnaissance soit composée d'un nombre suffisant d'anticorps spécifiques de l'antigène cible. En effet, lors des premiers essais de biodétection aucun déplacement de la bande LSPR longitudinal n'a été observé après ajout d'antigène (IgG de lapin) quand l'anticorps de capture immobilisé en surface des AuNR@SiO₂ était la fraction totale d'IgG de chèvre, comportant un mélange d'IgG dont une faible part (non connue) est spécifique à l'IgG de lapin. Ainsi, les nanosondes préparées par la suite comportent à leur surface un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin purifié par affinité. Ainsi, toutes les molécules d'anticorps en surface de la nanosonde sont théoriquement capables de reconnaître l'antigène cible (IgG de lapin). Dans un premier temps, l'antigène à la concentration de 1 µg/ml a été ajouté à des solutions des 3 différentes nanosondes. Afin d'observer la dépendance de la réponse des nanosondes en fonction du temps d'incubation, les spectres d'absorption des mélanges ont été mesurés toutes les 10 minutes pendant 1 h 30, et la position de la bande plasmon longitudinale a été suivie (Figure 29).

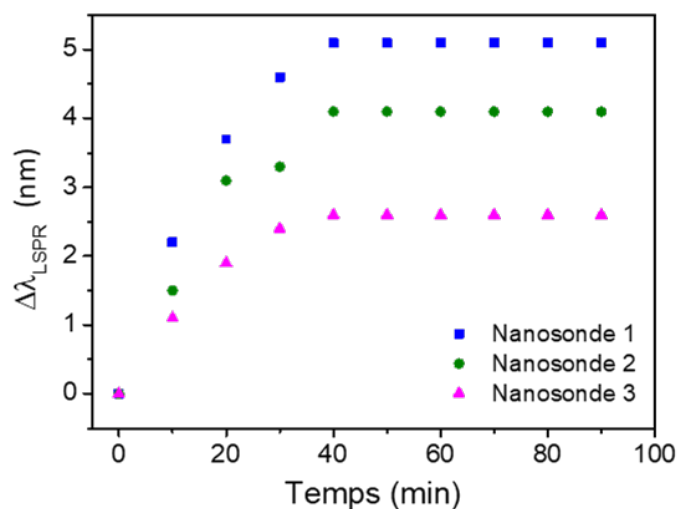


Figure 29 : Evolution de la position de la bande plasmon longitudinale au cours du temps pour AuNR@SiO₂- anti-rIgG (nanosonde 1), AuNR@SiO₂-MPTMS- anti-rIgG (nanosonde 2), et AuNR@SiO₂-TEBA- anti-rIgG (nanosonde 3) après incubation avec l'IgG de lapin.

Le décalage vers le rouge de la bande longitudinale au cours du temps est indicateur de la liaison de l'antigène à la surface des particules. On observe que l'équilibre s'établit dans les 40 premières minutes, ainsi le temps d'incubation séparant les ajouts successifs d'antigène a été fixé à une heure.

Pour cette étude, le pas de mesure a été fixé à 0,3 nm afin de mesurer de petits déplacements de la bande longitudinale. Cela a pour conséquence une diminution du rapport signal sur bruit lors de l'acquisition et se répercute sur les dérivés des spectres d'absorption lorsque la méthode des 19 points est utilisée (Annexe Figure 11). Il a été établi que 259 points permettent une lecture précise de la position de la bande LSPR sur les dérivées premières et secondes des spectres UV-Visible (Annexe Figure 11). Au cours d'une expérience préliminaire, des concentrations croissantes (500 à 1000 ng/mL) d'IgG de lapin ont été ajoutés aux solutions de nanosondes 1, 2 et 3 et la position du maximum du pic de la bande longitudinale est lue au niveau du zéro de la dérivée première en utilisant la méthode des 259 points (Figure 30). Celle-ci se déplace dans le rouge de $\Delta\lambda = 5,0$ nm (nanosonde 1), $\Delta\lambda = 4,0$ nm (nanosonde 2) et $\Delta\lambda = 2,3$ nm (nanosonde 3) après le premier ajout de 500 ng/mL. De manière surprenante, aucun déplacement supplémentaire n'est observé pour des concentrations supérieures d'antigène (750 et 1000 ng/mL), suggérant une saturation des biorécepteurs à la surface des particules atteinte dès 500 ng/mL d'antigène.

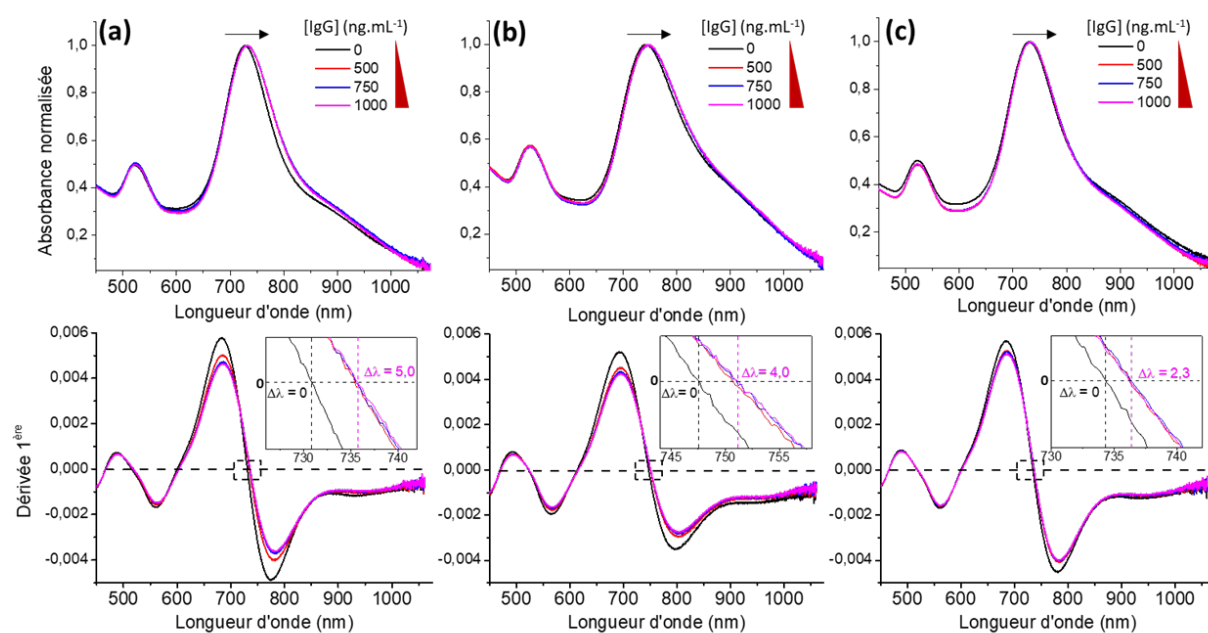


Figure 30 : Spectres d'absorption normalisés (haut) et leurs dérivées premières (bas) des nanosondes après ajouts croissants d'IgG de lapin dans la gamme 500 à 1000 ng/mL. (A) AuNR@SiO₂-anti-rIgG (nanosonde 1), (B) AuNR@SiO₂-MPTMS- anti-rIgG (nanosonde 2) et (C) AuNR@SiO₂-TEBA- anti-rIgG (nanosonde 3). Les inserts dans les spectres des dérivées premières représentent un agrandissement au niveau du point d'inflexion du maximum de la bande LSPR longitudinale.

Enfin, nous avons étudié la réponse des nanosondes à l'exposition à des concentrations croissantes d'IgG de lapin dans une gamme allant de 25 à 500 ng/mL. Les spectres d'absorption des nanosondes 1, 2 et 3, leurs dérivées premières et secondes respectives sont présentées Figure 31 a, b, c. Le maximum de la bande LSPR longitudinale (point 2) et de ses deux points d'inflexion (points 1 et 3) y sont présentés, les lignes en pointillés servent de guide pour le regard.

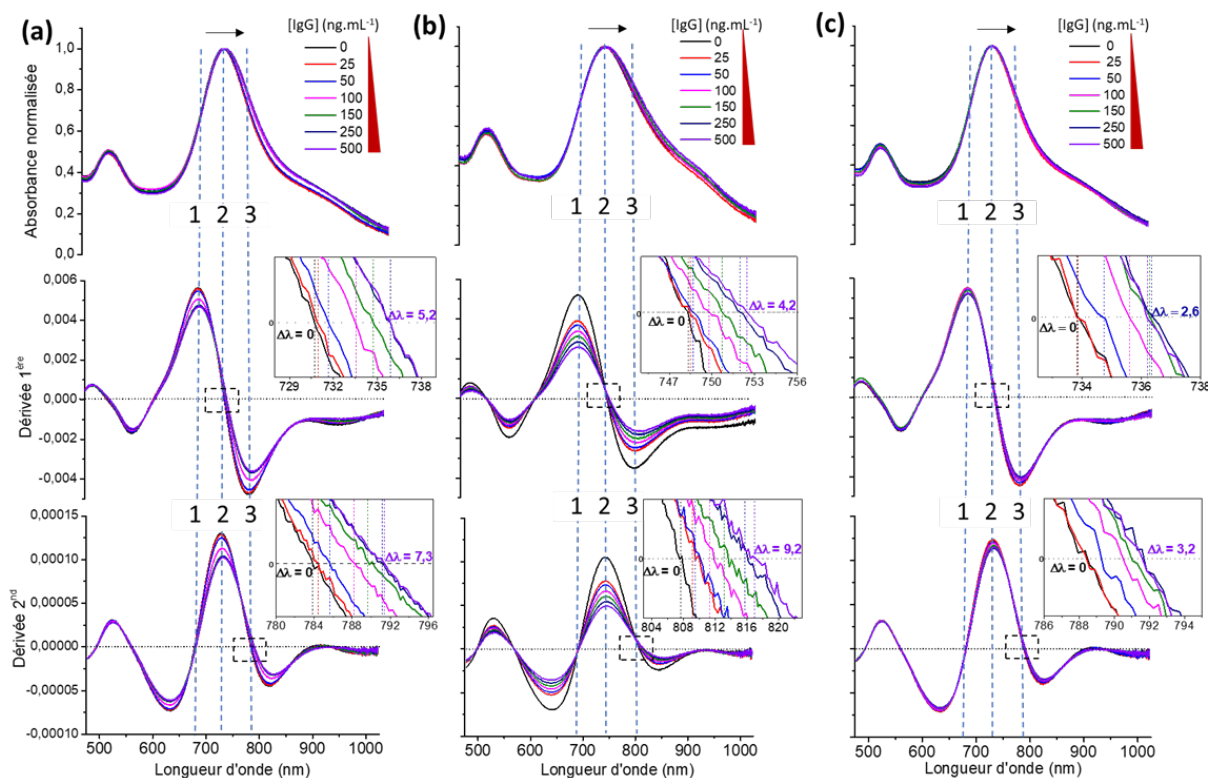


Figure 31 : Spectres d'absorption normalisés (haut), dérivées premières (milieu) et dérivées secondes (bas) des nanosondes après ajouts croissants d'IgG de lapin dans la gamme 25 à 500 ng/mL. (a) AuNR@SiO₂- anti-rIgG (nanosonde 1), (b) AuNR@SiO₂-MPTMS- anti-rIgG (nanosonde 2) et (c) AuNR@SiO₂-TEBA- anti-rIgG (nanosonde 3). Les inserts dans les spectres des dérivées premières et secondes représentent respectivement un agrandissement au niveau du point d'inflexion du maximum de la bande LSPR longitudinale et du deuxième point d'inflexion de la dérivée première .

Un déplacement progressif de la bande plasmon consécutif à l'ajout de quantités croissantes d'IgG de lapin est observé pour chaque nanosonde, les valeurs correspondant au suivi des points 2 et 3 sont résumées dans le Tableau 10. Des déplacements maximaux $\Delta\lambda = 5,2$ nm, 4,2 nm et 2,6 nm sont déterminés à partir des dérivées premières (point 2) respectivement pour AuNR@SiO₂-anti-rIgG (nanosonde 1), AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (nanosonde 2) et AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (nanosonde 3) et des déplacements maximaux $\Delta\lambda = 6,3$ nm, 9,2 nm et 3,2 nm sont observés respectivement sur les dérivées secondes (point 3).

Tableau 10 : Récapitulatif des déplacements de la bande LSPR longitudinale des nanosondes 1, 2 et 3 consécutivement à l'ajout de concentration croissantes d'IgG de lapin suivant les points 2 et 3.

		[IgG lapin] ng/mL					
		25	50	100	150	250	500
Nanosonde 1	pt 2	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,4	2,9 ± 0,1	4,1 ± 0,0	5,2 ± 0,3	5,2 ± 0,2
	pt 3	0,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	4,1 ± 0,2	6,0 ± 0,0	7,0 ± 0,3	7,3 ± 0,3
Nanosonde 2	pt 2	0,3	0,5	1,6	2,5	3,9	4,0 ± 0,2
	pt 3	2	2,6	4,2	5,9	8,3	7,6 ± 2,2
Nanosonde 3	pt 2	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,3	1,4 ± 0,4	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1
	pt 3	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,3

Une meilleure sensibilité est observée pour le suivi du point 3 du fait qu'il tient compte à la fois du déplacement du pic LSPR et de son élargissement, alors que l'élargissement contrebalance le déplacement du point 1¹¹⁰. Ce dernier n'a donc pas été suivi lors de cette étude. L'élargissement de la bande pourrait être attribué à la réticulation des particules par l'intermédiaire de l'IgG de lapin, néanmoins aucun changement de couleur perceptible à l'œil nu n'a été observé pour les solutions colloïdales. Des analyses de DLS réalisées avant et après détection de l'IgG de lapin par les différentes nanosondes sont montrées Figure 32 et l'évolution de la position des pics de diffusion rotationnelle, translationnelle et d'agrégation sont résumés Tableau 11.

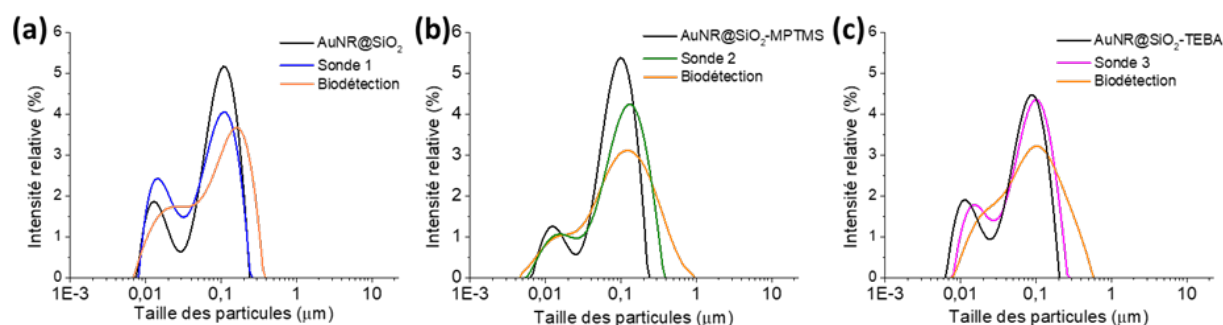


Figure 32 : Mesures de diffusion dynamique de la lumière avant et après ajout d'IgG de lapin pour les différentes sondes étudiées. (a) AuNR@SiO₂-anti-rIgG (Sonde 1) ; (b) AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (sonde 2) et (c) AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (sonde 3)

Une fois de plus, l'interprétation des mesures DLS n'est pas évidente au regard de la forme anisotrope des nanobatonnets. Il apparaît que les sondes en interaction avec leur cible restent colloïdalement stables après la réaction de reconnaissance comme en témoigne l'absence de pic d'agrégation. Néanmoins, un troisième pic proche du pic de diffusion translationnelle semble apparaître vers 500 nm pour la nanosonde 2 et 390 nm pour la nanosonde 3 et pourrait être interprété comme le résultat de la formation de petits agrégats interparticules.

Tableau 11 : Tableau résumant la position des pics observés lors des mesures de diffusion dynamique de la lumière avant et après ajout d'IgG de lapin pour les différentes nanosondes étudiées.

	Nanosonde 1	Détection 1	Nanosonde 2	Détection 2	Nanosonde 3	Détection 3
Pos. Pic Rota. (nm)	14	22	15	15	15	22
Pos. Pic Transla. (nm)	110	167	132	125	101	101
Agrégation (nm)	-	-	-	500	-	390

La spécificité de la détection a été vérifiée par l'ajout d'IgG de souris à la place d'IgG de lapin (Annexe Figure 12). Aucun déplacement de la bande LSPR longitudinale n'a été observé pour les différentes nanosondes, attestant de la spécificité de la détection d'IgG de lapin.

Les courbes tracées Figure 33a,b,c représentent le déplacement de la bande LSPR ($\Delta\lambda$) en fonction de la concentration en IgG de lapin, Les barres d'erreur représentent l'écart-type associé aux mesures à partir de lots de sondes réalisées en dupliquat. Une régression mathématique des données a été faite en utilisant l'équation modélisant l'isotherme de Langmuir (Figure 33), son expression est détaillée en Annexe III. Les performances analytiques des différentes sondes (K_d , LoD, limite de détection) et les paramètres attestant de la justesse du modèle (R^2 , χ^2) sont résumés Tableau 12. La LoD a été calculée en déterminant la concentration conduisant à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois l'écart-type du blanc sur les points 2 et 3.

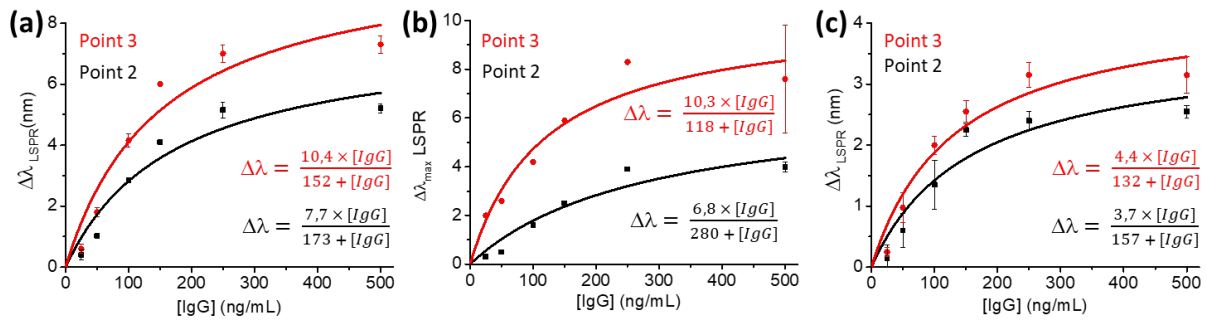


Figure 33 : Evolution de la position de la bande LSPR longitudinale en fonction de la concentration d'IgG de lapin. (a) AuNR@SiO₂-anti-rIgG (nanosonde 1), (b) AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (nanosonde 2), (c) AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (nanosonde 3). La moyenne de chaque valeur de déplacement de bande LSPR a été calculée à partir de deux expériences parallèles et indépendantes et exprimée sous forme d'écart-type. Les équations du modèle de Langmuir pour chaque courbe ont été ajoutées.

Les constantes de dissociation mesurées à partir des mesures de λ au point 3 pour AuNR@SiO₂-anti-rIgG (nanosonde 1), AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (nanosonde 2), AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (nanosonde 3) sont 152 ± 57 ng/mL ($1,01 \pm 0,38$ nM), 118 ± 40 ng/mL ($0,79 \pm 0,27$ nM) et 132 ± 47 ng/mL ($0,88 \pm 0,31$ nM) respectivement. Les limites de détection (LOD) en IgG de lapin ont été respectivement estimées à $5,78$ ng/mL (43 pM) ; $5,28$ ng/mL (35 pM) et $3,92$ ng/mL (26 pM). Ces valeurs de LoD reflètent les hautes performances analytiques des trois systèmes et sont 10 fois plus faibles que les valeurs mesurées avec des systèmes proches pour le dosage de l'IgG humain^{121,122}. Cela tient de la méthode de détermination du LoD faite graphiquement à partir de la concentration la plus faible détectée pour les études de Wang et al. (LoD = $0,4$ nM)¹²¹ et Cao et al (LoD = $0,4$ nM)¹²². Faute de temps, les mesures pour les faibles concentrations d'antigène (25 à 250 ng/mL) avec la nanosonde AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG n'ont pu être reproduites. Par conséquent, l'interprétation des résultats obtenus est à faire avec prudence. En effet, comme l'atteste l'écart-type de la mesure reproduite à 500 ng/mL d'IgG de lapin, il apparaît que l'élargissement de la bande LSPR (point 3) n'est pas reproductible. Cela pourrait venir des différences obtenues lors de la préparation des lots de nanosondes en termes de propriétés LSPR de largeur de bande (Tableau 9).

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des performances analytiques et des paramètres du modèle de Langmuir pour les nanosondes 1, 2 et 3

	nanosonde 1		nanosonde 2		nanosonde 3	
	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
$\Delta\lambda$ à 500 ng/mL (nm)	5,20 ± 0,2	7,30 ± 0,3	4,1 ± 0,1	7,6 ± 2,2	2,55 ± 0,1	3,15 ± 0,3
$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)	7,7	10,4	6,8	10,3	3,7	4,4
K_d (ng/mL)	173 ± 73	152 ± 57	280 ± 135	118 ± 40	157 ± 72	132 ± 47
K_d (nM)	1,15 ± 0,49	1,01 ± 0,38	1,87 ± 0,90	0,79 ± 0,27	1,05 ± 0,48	0,88 ± 0,31
LoD (ng/mL)	14,9	5,8	6,5	5,3	9,6	3,9
LoD (pM)	100	39	43	35	64	26
R^2	0,9301	0,94041	0,92866	0,94043	0,91599	0,94389
χ^2	0,35502	0,55736	0,20159	0,55888	0,10045	0,09849
3*SD (nm)	0,613	0,380	0,147	0,441	0,211	0,126

Au regard des résultats obtenus, il apparaît que la nanosonde AuNR@SiO₂-anti-rIgG est deux fois plus sensible que la nanosonde AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG et que les mesures avec la sonde AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG demanderaient à être reproduites pour valider la sensibilité du capteur aux faibles concentrations d'IgG de lapin. Cet écart pourrait être expliqué par la plus grande proximité des anti-rIgG physisorbés au cœur métallique des AuNRs ou par une couche de capture moins dense résultant en une meilleure accessibilité de la cible aux sites de reconnaissance des anticorps physisorbés (nanosonde 1). Il apparaît que la capture de l'antigène cible se traduit par des déplacements modestes de la bande LSPR. Cela pourrait être lié à la taille importante du biorécepteur et de la cible étudiée ($M_w(\text{IgG}) = 150 \text{ kDa}$) et à la diminution exponentielle de l'exaltation du champ électrique à mesure que l'on s'éloigne du cœur métallique des AuNRs. Ainsi, l'antigène se trouverait partiellement en dehors du volume de détection. Cet effet a été illustré par Tian et al. en comparant les déplacements de la bande LSPR lors de la reconnaissance d'anti-IgG de lapin par des IgG de lapin conjugués en surface de AuNRs de tailles différentes ($L^*1 = 59^*22 \text{ nm}$ et 37^*14 nm) et immobilisés sur un substrat de verre⁵³. Les 4 nm de déplacement observés pour les particules de 37^*14 nm par rapport aux 10 nm des particules de 59^*22 nm sont expliqués une décroissance rapide du champ électromagnétique à la surface des plus petites particules.

A l'échelle du temps de notre expérience, les particules restent stables colloïdalement après détection, alors que la nature polyclonale de l'anticorps pourrait engendrer une agrégation totale des particules par réticulation, comme cela a été observé plusieurs fois avec des AuNRs non recouverts de silice^{121,123,124}. Deux hypothèses peuvent être avancées quant à la stabilité

colloïdale des particules. La méthode de purification par affinité de l'anticorps de capture ferait qu'une population homogène d'IgG aurait été obtenue et ne reconnaîtrait qu'un épitope de l'antigène ou pour des raisons stériques, les sondes ne s'agrègent pas sous l'effet de l'antigène. Bien que la nature de la surface soit différente (AuNRs recouverts d'acide 11-mercaptopundecanoïque) un comportement proche des sondes est observé dans l'étude de Cao et al. avec d'une part un déplacement maximum de 8 nm lors de la détection en solution d'IgG-humain et d'autre part l'aspect de la bande LSPR indique une stabilité colloïdale maintenue après détection, il n'est toutefois pas précisé le degré de pureté de l'anticorps utilisé¹²². Plusieurs pistes sont envisagées pour améliorer la sensibilité de ces sondes en solution : exercer un meilleur contrôle sur l'orientation et le nombre d'anticorps à la surface des conjugués, et évaluer l'accessibilité des sites actifs. Ces paramètres sont primordiaux pour améliorer l'efficacité des sondes lors de la détection car ils peuvent être directement liés à la quantité et à l'accessibilité des sites de reconnaissance en surface. Cet effet a bien été montré sur des conjugués de nanoparticules d'or sphériques^{125,126} par contre, ce type d'études manque sur les AuNRs. Une autre voie d'amélioration serait d'utiliser un biorécepteur de taille plus petite, par exemple un fragment d'anticorps, afin de bénéficier d'une plus grande sensibilité LSPR³³.

3. Conclusion de la partie

Dans cette partie, les nanosondes préparées possèdent une fine coquille de silice (~ 4 nm) et le biorécepteur a été immobilisé sur les particules grâce à des chimies de surface différentes selon la méthode de conjugaison décrite dans la partie 4. Les nanosondes 1, dont l'anticorps a été physisorbé à la surface des AuNR@SiO₂, et les nanosondes 2 et 3 dont l'anticorps a été chimisorbé respectivement sur les AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA, ont été utilisées pour la réalisation d'immunocapteurs LSPR en solution pour la détection d'un antigène modèle, l'IgG de lapin. Le suivi des réactions de biodétection a été réalisé par mesure d'absorption UV-Visible en utilisant un spectromètre de laboratoire. Les réponses en termes de déplacement de la bande plasmon des différentes nanosondes élaborées sont sensiblement les mêmes, voire en deçà de ce que l'on pouvait espérer. Néanmoins, les performances analytiques sont très bonnes au regard des limites de détection : 5,8 ng/mL (43 pM) ; 5,3 ng/mL (35 pM) et 3,9 ng/mL (26 pM) pour AuNR@SiO₂-anti-rIgG (nanosonde 1), AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (nanosonde 2) et AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (nanosonde 3). En considérant l'aspect pratique de ce dispositif analytique, la quantification d'un antigène donné nécessiterait de travailler avec des solutions diluées afin de tomber dans la gamme dynamique des capteurs

(située entre 25-500 ng/mL). Différentes pistes ont été discutées concernant l'amélioration de la sensibilité du biocapteur en solution. Une autre voie envisagée serait d'immobiliser les sondes sur un support solide afin de s'affranchir de l'indice de réfraction du solvant et de réaliser les mesures de détection à sec.

Conclusion du chapitre

L'objectif de cette étude était la mise au point de protocoles robustes et reproductibles pour l'élaboration d'immunocapteurs en solution à partir de nanobatonnets d'or enrobés d'une fine coquille de silice pour la détection d'une cible modèle, l'IgG de lapin.

Après avoir contextualisé notre étude dans la première partie, la deuxième était consacrée à l'étude des conditions de silanisation permettant d'obtenir une couche dense et reproductible de silanes à terminaison thiol sur une surface modèle de nanoparticules de silice sphériques aux propriétés proches des AuNR@SiO₂. La caractérisation systématique par dosage chimique au DTNB des particules obtenues a permis de comparer les densités de silanes greffés et de choisir les conditions expérimentales permettant d'obtenir une densité surfacique de silanes satisfaisante avant de d'extrapoler ces conditions à la silanisation des AuNR@SiO₂. Il s'agit du protocole combinant le chauffage de la solution à 60 °C dans un mélange éthanol/eau (95/5 ; v/v).

Dans la troisième partie, l'extrapolation des conditions expérimentales à la silanisation des AuNR@SiO₂ a permis de greffer des silanes aux fonctionnalités terminales thiol ou aldéhyde en préservant les propriétés optiques des particules et l'épaisseur de la coquille. Le greffage et la stabilité colloïdale des particules ont été mis en évidence par différentes techniques de caractérisation de surface (DLS, zétamétrie, UV-Visible, XPS, PM-IRRAS). Le protocole de dosage des fonctions thiol à la surface des AuNR@SiO₂ mis en place a confirmé la présence d'une couche dense de silane à la surface des particules ($2,4 \pm 0,6$ -SH/nm²). Malgré les tentatives infructueuses d'élaboration d'un protocole de dosage des aldéhydes, nous pensons qu'un dosage indirect en utilisant un BODIPY hydrazide est envisageable. Un contrôle fin des conditions réactionnelles et l'ensemble des caractérisations permettent de conclure sur une réactivité supérieure du silane thiol comparé au silane aldéhyde.

Dans la partie quatre, les particules ont été utilisées afin d'y greffer des anticorps anti-IgG de lapin. Trois voies différentes ont été mises en œuvre pour la conjugaison : la physisorption a permis d'immobiliser les anticorps *via* des interactions faibles et les fonctions amines présentes sur les anticorps ont rendu possible leur chimisorption sur les AuNR@SiO₂ thiolées par l'intermédiaire d'un agent de couplage hétérobifonctionnel. En parallèle, l'immobilisation d'un anticorps a été faite directement par amination réductrice sur les AuNR@SiO₂ portant des fonctions aldéhyde. Le marquage fluorescent des anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine a permis de déterminer le taux de recouvrement par dosage

fluorimétrique de la fraction non liée aux particules. Le taux de recouvrement calculé en surface des conjugués physisorbés est deux fois inférieur aux conjugués chimisorbés et aucune différence significative n'est relevée entre ces derniers, ce qui s'explique par différentes orientations des anticorps, et une densité supérieure à la surface des conjugués chimisorbés.

Enfin, les différents conjugués obtenus ont été utilisés comme nanosondes LSPR pour la détection en solution d'une cible modèle, l'IgG de lapin. La comparaison de leurs performances met en évidence une sensibilité plus importante au changement d'indice de réfraction des conjugués physisorbés en raison d'une couche d'anticorps de capture moins dense et plus proche de la surface d'or comparé aux conjugués chimisorbés. Les limites de détection des différentes sondes situées entre de 26 et 43 pM indiquent une grande sensibilité des capteurs pour la détection d'IgG de lapin. Néanmoins les variations de position de la bande LSPR et la gamme dynamique (25 - 500 ng/mL) sont en dessous de nos espérances pour les systèmes étudiés. Ceci peut s'expliquer par la décroissance du champ électromagnétique et la distance importante entre la surface des particules et la cible de grande taille (coquille de silice + couche de silanisation + couche de capture + antigène ~ 30 nm) et/ou une accessibilité restreinte des sites de reconnaissance à la surface des conjugués.

Dans le prolongement des résultats obtenus et dans le but d'améliorer les performances des immunocapteurs en solution, il serait intéressant d'une part de diminuer la densité de la couche d'anticorps en réalisant la co-condensation du silane fonctionnel avec un silane intercalant (*spacer*), d'autre part, d'améliorer l'accessibilité des sites de reconnaissance en contrôlant l'orientation des anticorps à la surface des AuNR@SiO₂ via leurs oligosaccharides. Ceux-ci peuvent être oxydés afin d'obtenir des aldéhydes pouvant être couplés à une fonction amine ou hydrazide à la surface des particules. Enfin une autre stratégie serait de recourir à des fragments d'anticorps pour diminuer la distance entre le cœur métallique et l'antigène et ainsi bénéficier d'une plus grande sensibilité LSPR lors de la reconnaissance.

Au-delà du format de détection en solution, l'immobilisation des conjugués sur un support solide serait une autre voie d'utilisation des AuNR@SiO₂ permettant d'obtenir une réponse sensible. Des essais ont été réalisés en ce sens mais les résultats n'ont pas été intégrés au manuscrit en raison de la présence d'agrégats de particules sur la surface de verre et perturbant la réponse LSPR. Cela a été expliqué par la méthode de dépôt des particules (drop casting) conduisant à une couche désorganisée et d'agrégats sur le substrat. Ce problème pourra être résolu en effectuant un dépôt sous flux.

Références

- (1) Arkles, B. In *Tailoring surfaces with silanes*; Chem. Tech: Levittown, PA, **1977**; Vol. 7, pp 766–778.
- (2) Brinker, C. J. Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1988**, *100* (1), 31–50. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(88\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0022-3093(88)90005-1).
- (3) Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles: Structural Design and Applications. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (37), 7924–7937. <https://doi.org/10.1039/C0JM00554A>.
- (4) Onclin, S.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N. Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-Assembled Monolayers. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (39), 6282–6304. <https://doi.org/10.1002/anie.200500633>.
- (5) Weetall, H. H. Preparation of Immobilized Proteins Covalently Coupled through Silane Coupling Agents to Inorganic Supports. *Appl Biochem Biotechnol* **1993**, *41* (3), 157–188. <https://doi.org/10.1007/BF02916421>.
- (6) Manzano, J. S.; Wang, H.; Kobayashi, T.; Naik, P.; Lai, K. C.; Evans, J. W.; Slowing, I. I. Kinetics of the Functionalization of Mesoporous Silica Nanoparticles: Implications on Surface Group Distributions, Adsorption and Catalysis. *Microporous and Mesoporous Materials* **2020**, *305*, 110276. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110276>.
- (7) Rostamzadeh, P.; Mirabedini, S. M.; Esfandeh, M. APS-Silane Modification of Silica Nanoparticles: Effect of Treatment's Variables on the Grafting Content and Colloidal Stability of the Nanoparticles. *J Coat Technol Res* **2014**, *11* (4), 651–660. <https://doi.org/10.1007/s11998-014-9577-8>.
- (8) Pasternack, R. M.; Rivillon Amy, S.; Chabal, Y. J. Attachment of 3-(Aminopropyl)Triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* **2008**, *24* (22), 12963–12971. <https://doi.org/10.1021/la8024827>.
- (9) Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Lambert, J.-F.; Ugliengo, P. Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (6), 4216–4313. <https://doi.org/10.1021/cr3003054>.
- (10) Chen, K.; Tao, J.; Shi, W.; Su, X.; Cao, X.; Peng, X.; Bao, L.; Feng, Z.; Zhao, Y.; Mai, X.; Wang, L.; Lu, G.; Teng, Z. Soft Mesoporous Organosilica Nanorods with Gold Plasmonic Core for Significantly Enhanced Cellular Uptake. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *550*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.04.086>.
- (11) Wang, C.; Bao, C.; Liang, S.; Fu, H.; Wang, K.; Deng, M.; Liao, Q.; Cui, D. RGD-Conjugated Silica-Coated Gold Nanorods on the Surface of Carbon Nanotubes for Targeted Photoacoustic Imaging of Gastric Cancer. *Nanoscale Research Letters* **2014**, *9* (1), 264. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-264>.
- (12) Inose, T.; Oikawa, T.; Tokunaga, M.; Yamauchi, N.; Nakashima, K.; Kato, C.; Hatoyama, K.; Kamei, T.; Gonda, K.; Kobayashi, Y. Development of Composite Nanoparticles Composed of Silica-Coated Nanorods and Single Nanometer-Sized Gold Particles toward a Novel X-Ray Contrast Agent. *Materials Science and Engineering: B* **2020**, *262*, 114716. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114716>.

- (13) Qi, Z.; Shi, J.; Zhang, Z.; Cao, Y.; Li, J.; Cao, S. PEGylated Graphene Oxide-Capped Gold Nanorods/Silica Nanoparticles as Multifunctional Drug Delivery Platform with Enhanced near-Infrared Responsiveness. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *104*, 109889. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109889>.
- (14) Colilla, M.; Vallet-Regí, M. 4.429 - Ordered Mesoporous Silica Materials. In *Comprehensive Biomaterials*; Ducheyne, P., Ed.; Elsevier: Oxford, **2011**; pp 497–514. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00140-9>.
- (15) Putz, A.-M.; Almásy, L.; Len, A.; Ianăși, C. Functionalized Silica Materials Synthesized via Co-Condensation and Post-Grafting Methods. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **2019**, *27* (4), 323–332. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1593154>.
- (16) Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (20), 3216–3251. <https://doi.org/10.1002/anie.200503075>.
- (17) Zeiderman, M. R.; Morgan, D. E.; Christein, J. D.; Grizzle, W. E.; McMasters, K. M.; McNally, L. R. Acidic PH-Targeted Chitosan-Capped Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods Facilitate Detection of Pancreatic Tumors via Multispectral Optoacoustic Tomography. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2* (7), 1108–1120. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00111>.
- (18) Sendroiu, I. E.; Warner, M. E.; Corn, R. M. Fabrication of Silica-Coated Gold Nanorods Functionalized with DNA for Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensing Applications. *Langmuir* **2009**, *25* (19), 11282–11284. <https://doi.org/10.1021/la902675s>.
- (19) Abadeer, N. S.; Brennan, M. R.; Wilson, W. L.; Murphy, C. J. Distance and Plasmon Wavelength Dependent Fluorescence of Molecules Bound to Silica-Coated Gold Nanorods. *ACS Nano* **2014**, *8* (8), 8392–8406. <https://doi.org/10.1021/nn502887j>.
- (20) Wang, J.; Bai, R.; Yang, R.; Liu, J.; Tang, J.; Liu, Y.; Li, J.; Chai, Z.; Chen, C. Size- and Surface Chemistry-Dependent Pharmacokinetics and Tumor Accumulation of Engineered Gold Nanoparticles after Intravenous Administration. *Metallomics* **2015**, *7* (3), 516–524. <https://doi.org/10.1039/C4MT00340C>.
- (21) Ma, H.; Shi, J.; Zhu, X.; Zhang, Z.; Li, J.; Cao, S. AuNRs/Mesoporous Silica/Hydroxyapatite Nanovehicles with Thermally Responsive Polymeric Cap for Remotely Controlled Drug Delivery. *Adv Compos Hybrid Mater* **2019**, *2* (2), 242–253. <https://doi.org/10.1007/s42114-019-00082-y>.
- (22) Huang, P.; Bao, L.; Zhang, C.; Lin, J.; Luo, T.; Yang, D.; He, M.; Li, Z.; Gao, G.; Gao, B.; Fu, S.; Cui, D. Folic Acid-Conjugated Silica-Modified Gold Nanorods for X-Ray/CT Imaging-Guided Dual-Mode Radiation and Photo-Thermal Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9796–9809. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.086>.
- (23) Liu, J.; Detrembleur, C.; Pauw-Gillet, M.-C. D.; Mornet, S.; Jérôme, C.; Duguet, E. Gold Nanorods Coated with Mesoporous Silica Shell as Drug Delivery System for Remote Near Infrared Light-Activated Release and Potential Phototherapy. *Small* **2015**, *11* (19), 2323–2332. <https://doi.org/10.1002/sml.201402145>.
- (24) Chang, Y.-T.; Liao, P.-Y.; Sheu, H.-S.; Tseng, Y.-J.; Cheng, F.-Y.; Yeh, C.-S. Near-Infrared Light-Responsive Intracellular Drug and siRNA Release Using Au Nanoensembles with Oligonucleotide-Capped Silica Shell. *Advanced Materials* **2012**, *24* (25), 3309–3314. <https://doi.org/10.1002/adma.201200785>.

- (25) Feinle, A.; Flaig, S.; Puchberger, M.; Schubert, U.; Hüsing, N. Stable Carboxylic Acid Derivatized Alkoxy Silanes. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (12), 2339–2341. <https://doi.org/10.1039/C4CC08025D>.
- (26) Zhang, Z.; Liu, C.; Bai, J.; Wu, C.; Xiao, Y.; Li, Y.; Zheng, J.; Yang, R.; Tan, W. Silver Nanoparticle Gated, Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods (AuNR@MS@AgNPs): Low Premature Release and Multifunctional Cancer Theranostic Platform. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (11), 6211–6219. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00368>.
- (27) Cao, F.; Yao, Q.; Yang, T.; Zhang, Z.; Han, Y.; Feng, J.; Wang, X.-H. Marriage of Antibody–Drug Conjugate with Gold Nanorods to Achieve Multi-Modal Ablation of Breast Cancer Cells and Enhanced Photoacoustic Performance. *RSC Adv.* **2016**, 6 (52), 46594–46606. <https://doi.org/10.1039/C6RA01557C>.
- (28) Shen, S.; Tang, H.; Zhang, X.; Ren, J.; Pang, Z.; Wang, D.; Gao, H.; Qian, Y.; Jiang, X.; Yang, W. Targeting Mesoporous Silica-Encapsulated Gold Nanorods for Chemo-Photothermal Therapy with near-Infrared Radiation. *Biomaterials* **2013**, 34 (12), 3150–3158. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.051>.
- (29) Wang, C.; Ma, Z.; Wang, T.; Su, Z. Synthesis, Assembly, and Biofunctionalization of Silica-Coated Gold Nanorods for Colorimetric Biosensing. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16 (13), 1673–1678. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500898>.
- (30) Jacinto, T. A.; Rodrigues, C. F.; Moreira, A. F.; Miguel, S. P.; Costa, E. C.; Ferreira, P.; Correia, I. J. Hyaluronic Acid and Vitamin E Polyethylene Glycol Succinate Functionalized Gold-Core Silica Shell Nanorods for Cancer Targeted Photothermal Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2020**, 188, 110778. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110778>.
- (31) Liu, X.; Liu, L.; Hu, X.; Zhou, S.; Ankri, R.; Fixler, D.; Xie, Z. Multimodal Bioimaging Based on Gold Nanorod and Carbon Dot Nanohybrids as a Novel Tool for Atherosclerosis Detection. *Nano Res.* **2018**, 11 (3), 1262–1273. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1739-4>.
- (32) Liu, Y.; Xu, M.; Chen, Q.; Guan, G.; Hu, W.; Zhao, X.; Qiao, M.; Hu, H.; Liang, Y.; Zhu, H.; Chen, D. Gold nanorods/mesoporous silica-based nanocomposite as theranostic agents for targeting near-infrared imaging and photothermal therapy induced with laser. *Int J Nanomedicine.* **2015**, 10, 47-61. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82940>
- (33) Zhang, L.; Mazouzi, Y.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2020**, 165, 112370. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>.
- (34) Arnold, J. N.; Wormald, M. R.; Sim, R. B.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, 25 (1), 21–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>.
- (35) Killard, A. J.; Deasy, B.; O’Kennedy, R.; Smyth, M. R. Antibodies: Production, Functions and Applications in Biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1995**, 14 (6), 257–266. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(95\)91618-3](https://doi.org/10.1016/0165-9936(95)91618-3).
- (36) Trilling, A. K.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H. Antibody Orientation on Biosensor Surfaces: A Minireview. *Analyst* **2013**, 138 (6), 1619–1627. <https://doi.org/10.1039/C2AN36787D>.
- (37) Richards, D. A.; Maruani, A.; Chudasama, V. Antibody Fragments as Nanoparticle Targeting Ligands: A Step in the Right Direction. *Chem. Sci.* **2016**, 8 (1), 63–77. <https://doi.org/10.1039/C6SC02403C>.

- (38) Chiu, M. L.; Goulet, D. R.; Teplyakov, A.; Gilliland, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* **2019**, *8* (4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>.
- (39) Steward, M.; Steensgaard, J. *Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance*, Boca Raton: CRC Press.; **1983**.
- (40) Steward, M. W.; Lew, A. M. The Importance of Antibody Affinity in the Performance of Immunoassays for Antibody. *Journal of Immunological Methods* **1985**, *78* (2), 173–190. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90074-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90074-2).
- (41) Limo, M. J.; Sola-Rabada, A.; Boix, E.; Thota, V.; Westcott, Z. C.; Puddu, V.; Perry, C. C. Interactions between Metal Oxides and Biomolecules: From Fundamental Understanding to Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (22), 11118–11193. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00660>.
- (42) Kosmulski, M. The PH Dependent Surface Charging and Points of Zero Charge. VIII. Update. *Advances in Colloid and Interface Science* **2020**, *275*, 102064. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102064>.
- (43) Bremer, M. G. E. G.; Duval, J.; Norde, W.; Lyklema, J. Electrostatic Interactions between Immunoglobulin (IgG) Molecules and a Charged Sorbent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *250* (1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.05.026>.
- (44) Song, L.; Zhang, L.; Huang, Y.; Chen, L.; Zhang, G.; Shen, Z.; Zhang, J.; Xiao, Z.; Chen, T. Amplifying the Signal of Localized Surface Plasmon Resonance Sensing for the Sensitive Detection of Escherichia Coli O157:H7. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 3288. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03495-1>.
- (45) Zhang, X.; Zhang, F.; Zhang, H.; Shen, J.; Han, E.; Dong, X. Functionalized Gold Nanorod-Based Labels for Amplified Electrochemical Immunoassay of E. Coli as Indicator Bacteria Relevant to the Quality of Dairy Product. *Talanta* **2015**, *132*, 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.013>.
- (46) Xiao, Q.; Lu, Y.; Chen, M.; Chen, B.; Yang, Y.; Cui, D.; Pan, B.; Xu, N. Antibody-Conjugated Silica-Modified Gold Nanorods for the Diagnosis and Photo-Thermal Therapy of Cryptococcus Neoformans: An Experiment In Vitro. *Nanoscale Research Letters* **2018**, *13* (1), 77. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2487-4>.
- (47) Zhang, J.-J.; Liu, Y.-G.; Jiang, L.-P.; Zhu, J.-J. Synthesis, Characterizations of Silica-Coated Gold Nanorods and Its Applications in Electroanalysis of Hemoglobin. *Electrochemistry Communications* **2008**, *10* (3), 355–358. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.12.017>.
- (48) Chen, H.; Shao, L.; Li, Q.; Wang, J. Gold Nanorods and Their Plasmonic Properties. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (7), 2679–2724. <https://doi.org/10.1039/C2CS35367A>.
- (49) Park, K.; Biswas, S.; Kanel, S.; Nepal, D.; Vaia, R. A. Engineering the Optical Properties of Gold Nanorods: Independent Tuning of Surface Plasmon Energy, Extinction Coefficient, and Scattering Cross Section. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (11), 5918–5926. <https://doi.org/10.1021/jp5013279>.
- (50) Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V. Gold Nanorod-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *195*, 332–351. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.056>.

- (51) Pellas, V.; Hu, D.; Mazouzi, Y.; Mimoun, Y.; Blanchard, J.; Guibert, C.; Salmain, M.; Boujday, S. Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications. *Biosensors* **2020**, *10* (10), 146. <https://doi.org/10.3390/bios10100146>.
- (52) Nusz, G. J.; Curry, A. C.; Marinakos, S. M.; Wax, A.; Chilkoti, A. Rational Selection of Gold Nanorod Geometry for Label-Free Plasmonic Biosensors. *ACS Nano* **2009**, *3* (4), 795–806. <https://doi.org/10.1021/nn8006465>.
- (53) Tian, L.; Chen, E.; Gandra, N.; Abbas, A.; Singamaneni, S. Gold Nanorods as Plasmonic Nanotransducers: Distance-Dependent Refractive Index Sensitivity. *Langmuir* **2012**, *28* (50), 17435–17442. <https://doi.org/10.1021/la3034534>.
- (54) Lichtenberg, J. Y.; Ling, Y.; Kim, S. Non-Specific Adsorption Reduction Methods in Biosensing. *Sensors* **2019**, *19* (11), 2488. <https://doi.org/10.3390/s19112488>.
- (55) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26* (1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
- (56) Napierska, D.; Thomassen, L. C. J.; Rabolli, V.; Lison, D.; Gonzalez, L.; Kirsch-Volders, M.; Martens, J. A.; Hoet, P. H. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small* **2009**, *5* (7), 846–853. <https://doi.org/10.1002/smll.200800461>.
- (57) Zhu, M.; Lerum, M. Z.; Chen, W. How To Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-Derived Layers on Silica. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 416–423. <https://doi.org/10.1021/la203638g>.
- (58) Kanan, S. M.; Tze, W. T. Y.; Tripp, C. P. Method to Double the Surface Concentration and Control the Orientation of Adsorbed (3-Aminopropyl)Dimethylethoxysilane on Silica Powders and Glass Slides. *Langmuir* **2002**, *18* (17), 6623–6627. <https://doi.org/10.1021/la0203133>.
- (59) Asenath Smith, E.; Chen, W. How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes. *Langmuir* **2008**, *24* (21), 12405–12409. <https://doi.org/10.1021/la802234x>.
- (60) White, L. D.; Tripp, C. P. Reaction of (3-Aminopropyl)Dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *232* (2), 400–407. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7224>.
- (61) Behrens, S. H.; Grier, D. G. The Charge of Glass and Silica Surfaces. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (14), 6716–6721. <https://doi.org/10.1063/1.1404988>.
- (62) Yuan, L.; Chen, L.; Chen, X.; Liu, R.; Ge, G. In Situ Measurement of Surface Functional Groups on Silica Nanoparticles Using Solvent Relaxation Nuclear Magnetic Resonance. *Langmuir* **2017**, *33* (35), 8724–8729. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00923>.
- (63) Zhuravlev, L. T. Concentration of Hydroxyl Groups on the Surface of Amorphous Silicas. *Langmuir* **1987**, *3* (3), 316–318. <https://doi.org/10.1021/la00075a004>.
- (64) Zhuravlev, L. T. The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *173* (1), 1–38. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00556-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00556-2).
- (65) Mueller, R.; Kammler, H. K.; Wegner, K.; Pratsinis, S. E. OH Surface Density of SiO₂ and TiO₂ by Thermogravimetric Analysis. *Langmuir* **2003**, *19* (1), 160–165. <https://doi.org/10.1021/la025785w>.

- (66) Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, *82* (1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- (67) Winther, J. R.; Thorpe, C. Quantification of Thiols and Disulfides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, *1840* (2), 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.031>.
- (68) Al Mahrooqi, J. H.; Mun, E. A.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V. Controlling the Size of Thiolated Organosilica Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34* (28), 8347–8354. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01556>.
- (69) Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. Reassessment of Ellman's Reagent. *Meth. Enzymol.* **1983**, *91*, 49–60. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(83\)91010-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(83)91010-8).
- (70) Quantification of Protein Thiols and Dithiols in the Picomolar Range Using Sodium Borohydride and 4,4'-Dithiodipyridine. *Analytical Biochemistry* **2007**, *363* (1), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.002>.
- (71) Ellison, P. A.; Chen, F.; Goel, S.; Barnhart, T. E.; Nickles, R. J.; DeJesus, O. T.; Cai, W. Intrinsic and Stable Conjugation of Thiolated Mesoporous Silica Nanoparticles with Radioarsenic. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (8), 6772–6781. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14049>.
- (72) Petkova, G. A.; Záruba, K.; Král, V. Synthesis of Silica Particles and Their Application as Supports for Alcohol Dehydrogenases and Cofactor Immobilizations: Conformational Changes That Lead to Switch in Enzyme Stereoselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824* (6), 792–801. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.03.010>.
- (73) Mukherjee, I.; Mylonakis, A.; Guo, Y.; Samuel, S. P.; Li, S.; Wei, R. Y.; Kojtari, A.; Wei, Y. Effect of Nonsurfactant Template Content on the Particle Size and Surface Area of Monodisperse Mesoporous Silica Nanospheres. *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**, *122* (1), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.02.030>.
- (74) Chen, W.-H.; Tseng, Y.-T.; Hsieh, S.; Liu, W.-C.; Hsieh, C.-W.; Wu, C.-W.; Huang, C.-H.; Lin, H.-Y.; Chen, C.-W.; Lin, P.-Y.; Chau, L.-K. Silanization of Solid Surfaces via Mercaptopropylsilatrane: A New Approach of Constructing Gold Colloid Monolayers. *RSC Adv.* **2014**, *4* (87), 46527–46535. <https://doi.org/10.1039/C4RA05583G>.
- (75) Kreevoy, M. M.; Harper, E. T.; Duvall, R. E.; Wilgus, H. S.; Ditsch, L. T. Inductive Effects on the Acid Dissociation Constants of Mercaptans¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (18), 4899–4902. <https://doi.org/10.1021/ja01503a037>.
- (76) Senkevich, J. J.; Yang, G.-R.; Lu, T.-M. Thermal Stability of Mercaptan Terminated Self-Assembled Multilayer Films on SiO₂ Surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2002**, *207* (1), 139–145. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00074-2).
- (77) Lee, C. H.; Park, S. H.; Chung, W.; Kim, J. Y.; Kim, S. H. Preparation and Characterization of Surface Modified Silica Nanoparticles with Organo-Silane Compounds. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *384* (1–3), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.04.010>.
- (78) Malone-Povolny, M. J.; Schoenfisch, M. H. Extended Nitric Oxide-Releasing Polyurethanes via S-Nitrosothiol-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (13), 12216–12223. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19236>.

- (79) Samuel, J.; Raccurt, O.; Poncelet, O.; Auger, A.; Ling, W.-L.; Cherns, P.; Grunwald, D.; Tillement, O. Surface Characterizations of Fluorescent-Functionalized Silica Nanoparticles: From the Macroscale to the Nanoscale. *J Nanopart Res* **2010**, *12* (6), 2255–2265. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9792-x>.
- (80) Chen, F.; Hong, H.; Zhang, Y.; Valdovinos, H. F.; Shi, S.; Kwon, G. S.; Theuer, C. P.; Barnhart, T. E.; Cai, W. In Vivo Tumor Targeting and Image-Guided Drug Delivery with Antibody-Conjugated, Radiolabeled Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, *7* (10), 9027–9039. <https://doi.org/10.1021/nn403617j>.
- (81) Tyllianakis, P. E.; Kakabakos, S. E.; Evangelatos, G. P.; Ithakissios, D. S. Direct Colorimetric Determination of Solid-Supported Functional Groups and Ligands Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **1994**, *219* (2), 335–340. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1273>.
- (82) Ghasemi, M.; Minier, M.; Tatouljian, M.; Arefi-Khonsari, F. Determination of Amine and Aldehyde Surface Densities: Application to the Study of Aged Plasma Treated Polyethylene Films. *Langmuir* **2007**, *23* (23), 11554–11561. <https://doi.org/10.1021/la701126t>.
- (83) Roloff, A.; Nirmalanathan-Budau, N.; Rühle, B.; Borcherdig, H.; Thiele, T.; Schedler, U.; Resch-Genger, U. Quantification of Aldehydes on Polymeric Microbead Surfaces via Catch and Release of Reporter Chromophores. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (14), 8827–8834. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05515>.
- (84) Liu, S. H.; Han, M. Y. Synthesis, Functionalization, and Bioconjugation of Monodisperse, Silica-Coated Gold Nanoparticles: Robust Bioprobes. *Advanced Functional Materials* **2005**, *15* (6), 961–967. <https://doi.org/10.1002/adfm.200400427>.
- (85) Thomas, K. G.; Barazzouk, S.; Ipe, B. I.; Joseph, S. T. S.; Kamat, P. V. Uniaxial Plasmon Coupling through Longitudinal Self-Assembly of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (35), 13066–13068. <https://doi.org/10.1021/jp049167v>.
- (86) Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (37), 18243–18253. <https://doi.org/10.1021/jp063879z>.
- (87) Kang, H.; Haynes, C. Interactions between Silica-Coated Gold Nanorod Substrates and Hydrophobic Analytes in Colloidal Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123* (40), 24685–24697. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b06044>.
- (88) Hinterwirth, H.; Kappel, S.; Waitz, T.; Prohaska, T.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *ACS Nano* **2013**, *7* (2), 1129–1136. <https://doi.org/10.1021/nn306024a>.
- (89) Oger, P.-C.; Piesse, C.; Ladram, A.; Humblot, V. Engineering of Antimicrobial Surfaces by Using Temporin Analogs to Tune the Biocidal/Anti-adhesive Effect. *Molecules* **2019**, *24* (4), 814. <https://doi.org/10.3390/molecules24040814>.
- (90) Song, Z.; Liu, Y.; Shi, J.; Ma, T.; Zhang, Z.; Ma, H.; Cao, S. Hydroxyapatite/Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods with Improved Degradability as a Multi-Responsive Drug Delivery Platform. *Materials Science and Engineering: C* **2018**, *83*, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.012>.
- (91) Song, Z.; Shi, J.; Zhang, Z.; Qi, Z.; Han, S.; Cao, S. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with a Thermally Responsive Polymeric Cap for near-Infrared-Activated Drug Delivery. *J Mater Sci* **2018**, *53* (10), 7165–7179. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2117-7>.

- (92) Zhou, H.; Gao, Y.; Xu, H.; Li, X.; Lü, Y.; Ma, T.; Cai, X.; Li, R.; Wang, X.; Xu, P. Hyaluronic Acid-RGD Peptide Conjugated Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods for Cancer Dual-Targeted Chemo-Photothermal Therapy. *J. Wuhan Univ. Technol.-Mat. Sci. Edit.* **2018**, *33* (2), 512–523. <https://doi.org/10.1007/s11595-018-1853-4>.
- (93) Zawisza, I.; Wittstock, G.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. PM IRRAS Investigation of Thin Silica Films Deposited on Gold. Part 1. Theory and Proof of Concept. *Langmuir* **2007**, *23* (18), 9303–9309. <https://doi.org/10.1021/la063488b>.
- (94) Zawisza, I.; Wittstock, G.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Investigations of Thin Silica Films Deposited on Gold. 2. Structural Analysis of a 1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine Bilayer. *Langmuir* **2008**, *24* (8), 3922–3929. <https://doi.org/10.1021/la703651n>.
- (95) Ramin, M. A.; Le Bourdon, G.; Daugey, N.; Bennetau, B.; Vellutini, L.; Buffeteau, T. PM-IRRAS Investigation of Self-Assembled Monolayers Grafted onto SiO₂/Au Substrates. *Langmuir* **2011**, *27* (10), 6076–6084. <https://doi.org/10.1021/la2006293>.
- (96) Tolstoy, V. P.; Chernyshova, I.; Skryshevsky, V. A. Infrared Spectroscopy of Thin Layer in Silicon Microelectronics. In *Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films*; Hoboken NJ, **2003**; pp 416–475.
- (97) Evans, C. R.; Spurlin, T. A.; Frey, B. L. In Situ FT-IR Measurements of Competitive Vapor Adsorption into Porous Thin Films Containing Silica Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (5), 1157–1164. <https://doi.org/10.1021/ac010990m>.
- (98) Almeida, R. M. Detection of LO Modes in Glass by Infrared Reflection Spectroscopy at Oblique Incidence. *Phys. Rev. B* **1992**, *45* (1), 161–170. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.45.161>.
- (99) Snyder, R. G.; Hsu, S. L.; Krimm, S. Vibrational Spectra in the C–H Stretching Region and the Structure of the Polymethylene Chain. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1978**, *34* (4), 395–406. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(78\)80167-6](https://doi.org/10.1016/0584-8539(78)80167-6).
- (100) Thompson, W. R.; Cai, M.; Ho, M.; Pemberton, J. E. Hydrolysis and Condensation of Self-Assembled Monolayers of (3-Mercaptopropyl)Trimethoxysilane on Ag and Au Surfaces. *Langmuir* **1997**, *13* (8), 2291–2302. <https://doi.org/10.1021/la960795g>.
- (101) Orendorff, C. J.; Gearheart, L.; Jana, N. R.; Murphy, C. J. Aspect Ratio Dependence on Surface Enhanced Raman Scattering Using Silver and Gold Nanorod Substrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (1), 165–170. <https://doi.org/10.1039/B512573A>.
- (102) Yang, N.; You, T.-T.; Gao, Y.-K.; Zhang, C.-M.; Yin, P.-G. Fabrication of a Flexible Gold Nanorod Polymer Metafilm via a Phase Transfer Method as a SERS Substrate for Detecting Food Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (26), 6889–6896. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01702>.
- (103) Smitha, S. L.; Gopchandran, K. G.; Smijesh, N.; Philip, R. Size-Dependent Optical Properties of Au Nanorods. *Progress in Natural Science: Materials International* **2013**, *23* (1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2013.01.005>.
- (104) Sunder, S.; Bernstein, H. J. Resonance Raman Spectrum of a Deuterated Crystal Violet: [P(CH₃)₂N•C₆D₄]₃C+Cl⁻. *Can. J. Chem.* **1981**, *59* (6), 964–967. <https://doi.org/10.1139/v81-140>.
- (105) Persaud, I.; Grossman, W. E. L. Surface-Enhanced Raman Scattering of Triphenylmethane Dyes on Colloidal Silver. *Journal of Raman Spectroscopy* **1993**, *24* (2), 107–112. <https://doi.org/10.1002/jrs.1250240209>.

- (106) Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (37), 13794–13803. <https://doi.org/10.1021/jp0687908>.
- (107) Shiohara, A.; Wang, Y.; Liz-Marzán, L. M. Recent Approaches toward Creation of Hot Spots for SERS Detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2014**, *21*, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.001>.
- (108) Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Direct Quantification of Surface Coverage of Antibody in IgG–Gold Nanoparticles Conjugates. *Talanta* **2019**, *204*, 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.104>.
- (109) Nisnevitch, M.; Firer, M. A. The Solid Phase in Affinity Chromatography: Strategies for Antibody Attachment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2001**, *49* (1), 467–480. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00214-7](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00214-7).
- (110) Chen, P.; Tran, N. T.; Wen, X.; Xiong, Q.; Liedberg, B. Inflection Point of the Localized Surface Plasmon Resonance Peak: A General Method to Improve the Sensitivity. *ACS Sensors* **2017**, *2* (2), 235–242. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00633>.
- (111) Liu, H.; Pierre-Pierre, N.; Huo, Q. Dynamic Light Scattering for Gold Nanorod Size Characterization and Study of Nanorod–Protein Interactions. *Gold Bull* **2012**, *45* (4), 187–195. <https://doi.org/10.1007/s13404-012-0067-4>.
- (112) Pan, B.; Cui, D.; Xu, P.; Li, Q.; Huang, T.; He, R.; Gao, F. Study on Interaction between Gold Nanorod and Bovine Serum Albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *295* (1), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.09.002>.
- (113) Chakraborty, S.; Joshi, P.; Shanker, V.; Ansari, Z. A.; Singh, S. P.; Chakrabarti, P. Contrasting Effect of Gold Nanoparticles and Nanorods with Different Surface Modifications on the Structure and Activity of Bovine Serum Albumin. *Langmuir* **2011**, *27* (12), 7722–7731. <https://doi.org/10.1021/la200787t>.
- (114) Ben Haddada, M.; Hu, D.; Salmain, M.; Zhang, L.; Peng, C.; Wang, Y.; Liedberg, B.; Boujday, S. Gold Nanoparticle-Based Localized Surface Plasmon Immunosensor for Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Detection. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409* (26), 6227–6234. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0563-8>.
- (115) Loiseau, A.; Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Mazouzi, Y.; Flack, R.; Liedberg, B.; Boujday, S. Core–Shell Gold/Silver Nanoparticles for Localized Surface Plasmon Resonance-Based Naked-Eye Toxin Biosensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (50), 46462–46471. <https://doi.org/10.1021/acsaami.9b14980>.
- (116) Harris, L. J.; Larson, S. B.; Hasel, K. W.; McPherson, A. Refined Structure of an Intact IgG2a Monoclonal Antibody. *Biochemistry* **1997**, *36* (7), 1581–1597. <https://doi.org/10.1021/bi962514+>.
- (117) Harris, L. J.; Skaletsky, E.; McPherson, A. Crystallographic Structure of an Intact IgG1 Monoclonal Antibody. Edited by I. A. Wilson. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *275* (5), 861–872. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1508>.
- (118) Mohamed, M. B.; Volkov, V.; Link, S.; El-Sayed, M. A. The ‘lightning’ Gold Nanorods: Fluorescence Enhancement of over a Million Compared to the Gold Metal. *Chemical Physics Letters* **2000**, *317* (6), 517–523. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)01414-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)01414-1).
- (119) Eustis, S.; El-Sayed, M. Aspect Ratio Dependence of the Enhanced Fluorescence Intensity of Gold Nanorods: Experimental and Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (34), 16350–16356. <https://doi.org/10.1021/jp052951a>.

- (120) Rostro-Kohanloo, B. C.; Bickford, L. R.; Payne, C. M.; Day, E. S.; Anderson, L. J. E.; Zhong, M.; Lee, S.; Mayer, K. M.; Zal, T.; Adam, L.; Dinney, C. P. N.; Drezek, R. A.; West, J. L.; Hafner, J. H. The Stabilization and Targeting of Surfactant-Synthesized Gold Nanorods. *Nanotechnology* **2009**, *20* (43), 434005. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/43/434005>.
- (121) Wang, C.; Chen, Y.; Wang, T.; Ma, Z.; Su, Z. Biorecognition-Driven Self-Assembly of Gold Nanorods: A Rapid and Sensitive Approach toward Antibody Sensing. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (24), 5809–5811. <https://doi.org/10.1021/cm0700899>.
- (122) Cao, J.; Galbraith, E. K.; Sun, T.; Grattan, K. T. V. Effective Surface Modification of Gold Nanorods for Localized Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *169*, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.019>.
- (123) Guo, Z. R.; Gu, C. R.; Fan, X.; Bian, Z. P.; Wu, H. F.; Yang, D.; Gu, N.; Zhang, J. N. Fabrication of Anti-Human Cardiac Troponin I Immunogold Nanorods for Sensing Acute Myocardial Damage. *Nanoscale Res Lett* **2009**, *4* (12), 1428–1433. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9415-6>.
- (124) Wang, C.; Irudayaraj, J. Gold Nanorod Probes for the Detection of Multiple Pathogens. *Small* **2008**, *4* (12), 2204–2208. <https://doi.org/10.1002/smll.200800309>.
- (125) Tripathi, K.; Driskell, J. D. Quantifying Bound and Active Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles: A Comprehensive and Robust Approach To Evaluate Immobilization Chemistry. *ACS Omega* **2018**, *3* (7), 8253–8259. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00591>.
- (126) Byzova, N. A.; Safenkova, I. V.; Slutskaya, E. S.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B. Less Is More: A Comparison of Antibody–Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (11), 2737–2746. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00489>.
- (127) Tanuma, S.; Powell, C. J.; Penn, D. R. Calculation of electron inelastic mean free paths (IMFPs) VII. Reliability of the TPP-2M IMFP predictive equation. *Surface and Interface Analysis* **2003**, *35* (3), 268–275. <https://doi.org/10.1002/sia.1526>.

Matériels et méthodes

Instrumentation

- Microscopie Électronique à Transmission (MET)

Les images MET des SiNPs et AuNR@SiO₂ ont été obtenues en utilisant un microscope électronique à transmission (MET) JEOL JEM 1011 fonctionnant à une tension d'accélération de 100 kV. Les échantillons ont été préparés en déposant une goutte de 10 µL de suspension de particules diluées dans l'eau ($DO_{\lambda_{\max}} \sim 0,8$) sur une grille de cuivre revêtue de carbone et en laissant sécher la goutte à température ambiante avant l'imagerie. La distribution en taille des SiNPs et l'épaisseur de la coquille de silice de AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂ silanisés a été établie en comptant un minimum de 300 particules / coquilles respectivement à l'aide du logiciel Image J.

- Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et mobilité électrophorétique (potentiel zêta)

Les mesures DLS et de mobilité électrophorétique ont été effectuées en utilisant un appareil Litesizer™ 500 (Anton Paar) équipé d'un laser à 658 nm fonctionnant à 40 mW.

DLS : L'angle de collecte de la lumière diffusée a été réglé à 90° et le modèle mathématique utilisé pour l'extraction du diamètre hydrodynamique est le modèle des Cumulants. Les indices de réfraction utilisés, présent par défaut dans l'appareil, sont de 1,33 pour l'eau et 1,45 pour la silice. Les analyses des dispersions colloïdales ont été réalisées après sonication, à une concentration de 0,1 mg/mL pour les NPSi et à une $DO_{\lambda_{\max}} \sim 0,008$ des différentes solutions de AuNR@SiO₂ avant et après fonctionnalisation. Sauf mention contraire, les analyses ont été faites dans l'eau Milli-Q, basifiée à un pH compris en 8 et 9 par une solution de NaOH à 0,1 M.

Potentiel zêta : Les analyses ont été faites dans une cuve à tube capillaire en forme de Ω avec un potentiel appliqué de 150 V. L'indice de réfraction de l'eau de 1,33 ainsi que l'approximation de Smoluchowski ont été utilisées. Les analyses des dispersions colloïdales ont été réalisées après sonication, à une concentration de 0,1 mg/mL pour les NPSi et à une $DO_{\lambda_{\max}} \sim 0,8$ des différentes solutions de AuNR@SiO₂ avant et après silanisation. Sauf mention contraire, les analyses ont été faites dans l'eau Milli-Q, basifiée à un pH compris en 8 et 9 par une solution de NaOH à 0,1.

- Spectroscopie UV-Visible

Tous les spectres d'absorption UV-Vis ont été enregistrés sur un spectromètre Cary 50 (Varian, Inc.). Les surnageants des dispersions colloïdales des SiNPs et AuNR@SiO₂ issus de la réaction entre le DTNB des fonctions thiol de surface ont été collectés après un cycle de centrifugation de 10 min à 8000 tr/ et 9000 tr/min respectivement. L'absorbance des surnageants a ensuite été réalisée dans la gamme 300 – 500 nm. Les dispersions colloïdales diluées de AuNR@SiO₂ avant et après fonctionnalisation ont été analysés dans la gamme 400 – 1100 nm à une DO_{λ,max} = 0,8 des différentes dispersions colloïdales. Sauf indication contraire, les spectres ont été enregistrés avec un pas de 1 nm. L'eau Milli-Q a été utilisée comme blanc et la position de la bande LSPR longitudinale et ses points d'inflexion ont été déterminés d'après la référence ¹¹⁰.

- Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse (ATG - MS)

Les analyses thermogravimétriques combinées à la spectroscopie de masse (ATG-MS) ont été réalisées avec un instrument SDT Q600 TA. Une masse d'environ 4 mg d'échantillon dans un creuset en alumine a été chauffée dans un courant d'air (100 ml/min) à une vitesse de chauffage de 7,5 °C/min jusqu'à 700 °C avec un palier d'environ 40 min à 100 °C. Le spectromètre de masse quadripolaire utilisé en sortie de Thermostar (Pfeiffer) est équipé d'un détecteur Faraday. L'analyse est effectuée avec le progiciel Thermosoft.

- Spectrométrie photoélectronique X (XPS)

Les analyses XPS ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre photoélectronique à rayons X Scienta Omicron Argus, équipé d'une source de rayonnement monochromatique d'aluminium Al K α ($h\nu = 1486,6$ eV) fonctionnant à une puissance de 280 W. L'analyse est effectuée sous Ultra Haut Vide ($\leq 10^{-9}$ mBar). Les photoélectrons sont analysés dans une direction faisant un angle de 45° par rapport à la surface. Les spectres ont été réalisés avec une énergie de passage de 100 eV pour le spectre général et de 20 eV pour les régions C 1s, O 1s, N 1s, Si 2s, Si 2p, S 2s, S 2p et Au 4f. Les énergies de liaison ont été calibrées par rapport à l'énergie de liaison de l'Au 4f à 84 eV et les intensités des pics ont été corrigées par les sections efficaces de Scofield. Les intensités des pics ont été déterminées après soustraction d'un fond linéaire (S 2p) et de Shirley. Les décompositions de spectres ont été effectuées à l'aide du logiciel Casa XPS v.2.3.15 (Casa Software Ltd, U.K.) et en utilisant des pics de forme Gaussien/Lorentzien avec un rapport

G/L égal à 70/30. Les libres parcours moyens des électrons ont été déterminés à l'aide du logiciel QUASES - IMFP TPP2M¹²⁷.

- PM-IRRAS

Les spectres PM-IRRAS ont été enregistrés sur un spectromètre Thermo-Scientific Nicolet 5700 commercial. Le faisceau externe a été focalisé sur l'échantillon avec un miroir, à un angle d'incidence optimal de 80°. Un polariseur à grille ZnSe et un modulateur photoélastique ZnSe, modulant le faisceau incident entre les polarisations p et s (instruments HINDS, PEM 90, fréquence de modulation = 50 kHz), ont été placés avant l'échantillon. La lumière réfléchie sur l'échantillon a ensuite été focalisée sur un détecteur MCT refroidi à l'azote. Les spectres présentés résultent de la somme de 256 balayages enregistrés à une résolution de 8 cm⁻¹. Le signal PM-IRRAS est donné par la réflectivité différentielle $\Delta R/R = (R_p - R_s)/(R_p + R_s)$. Ces substrats ont été achetés chez Arrandee (Werther, Allemagne) et sont composés de verre (11 mm × 11 mm) recouverts successivement d'une couche de chrome de 50 nm d'épaisseur et d'une couche d'or de 200 nm d'épaisseur. Les substrats ont été recuits dans une flamme d'hydrocarbure puis successivement rincés à l'eau ultrapure et l'éthanol absolu et séchés sous flux d'azote, suivi par une étape d'ozonation de 20 min.

- Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS)

Les spectres de diffusion Raman exalté de surface ont été enregistrés dans la gamme de 100 à 3450 cm⁻¹ sur un spectromètre Raman modulaire commercial (modèle RXN1, Kaiser Optical Systems, Inc.) en utilisant une cuvette en quartz. Il comprend une diode laser proche IR de haute puissance fonctionnant à 785 nm et un détecteur CCD 1024x256 pixels affichant une résolution de 4 cm⁻¹/3 pixels. La puissance de sortie du laser a été ajustée à 300 mW et 10 acquisitions et 90s ont été enregistrées pour chaque spectre lors des mesures.

- Spectrométrie de Fluorescence :

L'acquisition des spectres de fluorescence a été faite sur un spectrofluorimètre Jasco FP-6200 en utilisant une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique. Les largeurs de bande d'émission/excitation sont de 5 nm et 5 nm. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 480 nm et l'émission a été mesurée entre 500 et 600 nm à une vitesse de 125 nm/min. Les mesures ont été réalisées à une température constante de 20 ± 0,1 °C contrôlée par un module Peltier.

Réactifs

Le Tétraéthyl orthosilicate ($\geq 99.0\%$; TEOS), l'Hydroxyde d'ammonium (25%), le (3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane ($\geq 95\%$; MPTMS) et l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ($\geq 98\%$; DTNB), le cristal violet (CV), le Tris(2-carboxyéthyl) phosphone chlorhydrate ($\geq 98\%$; TCEP), l'ester de m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ($\geq 80\%$; Sulfo-MBS), le cyanoborohydrure de sodium ($\geq 95\%$), le 5-isothiocyanate de fluorescéine ($\geq 90\%$ isomère I; FITC), le Chlorure d'ammonium ($\geq 95.5\%$), l'albumine de sérum bovin ($\geq 98\%$, BSA), IgG de lapin ($\geq 95\%$), le dihydrogèno phosphate de sodium ($\geq 99,0\%$) et le phosphate de sodium anhydre ($> 99,0\%$) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le 3-triéthoxysilylbutyraldéhyde ($\geq 90\%$; TEBA) chez Gelest. Le Glycérol (99,5%), le carbonate de sodium ($\geq 99,8\%$), l'hydrogèno carbonate de sodium ($\geq 99,5\%$), a été acheté chez Humeau. L'IgG polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin (anti-rIgG) purifié par affinité a été acheté chez Jackson Immunoresearch. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau purifiée Milli-Q (Millipore) présentant une résistance de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$.

Protocoles expérimentaux

Partie 2

- Synthèse de nanoparticules de silice (SiNPs)

Les nanoparticules de silice ont été synthétisées d'après la méthode Stöber⁵⁵ adaptée par Napierska et al.⁵⁶. Une solution contenant 200 mL d'éthanol, 5,95 mL d'eau distillée et 9,70 mL d'hydroxyde d'ammonium 25 % dans un flacon borosilicaté de 500 mL est agitée quelques minutes à 450 rpm afin d'homogénéiser la solution. Puis 7,56 mL de TEOS sont rapidement ajoutés au mélange et la solution est agitée à 450 rpm à température ambiante pendant 20 h. Après synthèse, les particules sont lavées 3 fois avec EtOH et 2 fois avec H₂O par des cycles successifs de centrifugation de 25 min à 8000 tr/min. Le produit final est ensuite concentré à 66,0 mg/mL et conservé dans 10 mL d'eau distillée. La concentration des particules en solution a été évaluée en séchant à l'étuve 500 μL de solution à 80 °C pendant 20 h, la mesure a été répétée un minimum de 3 fois.

- Silanisation des NP SiO₂ par le MPTMS

La quantité de MPTMS à ajouter pour un ratio molaire MPTMS/OH de surface a été calculée de la manière suivante :

$$mol_{MPTMS} = 4\pi R^2 \times N_{OH} \times \frac{m_t}{\frac{4}{3}\pi R^3 \times \rho_{SiO_2}} \times \frac{1}{N_A} \times 100 \quad (I)$$

Avec R, le Rayon de la nanoparticule en nm déterminé par MET (63,5 nm) ; N_A, le nombre d'Avogadro (6,022.10²³ mol⁻¹) ; N_{OH}, est le nombre de groupements OH de surface par unité de surface (5 OH/nm²) ; m_t, la masse totale de l'échantillon de SiNPs en g et ρ_{SiO₂}, la densité de la silice (2,2 g/cm³).

A une solution de 45,0 mL à 1,1 mg/mL en nanoparticules de silice dans un flacon borosilicaté de 250 mL est ajouté 164 μL de MPTMS pur (100 eq/OH de surface ; 19,6 mM final) puis la solution est agitée dans le contenant fermé pendant 24 h à 350 tr/min. Après synthèse les suspension sont lavées 4 fois par EtOH par des cycles successifs de centrifugation de 20 min à 9000 tr/min puis concentrées à 20 mg/mL dans l'éthanol. Les différentes conditions étudiées sont résumées dans le tableau ci-dessous.

	EtOH : H₂O (v/v)	Catalyseur	Température
Protocole 1	95 : 5	Non	Ambiante
Protocole 2	95 : 5	Non	60°C
Protocole 3	100 : 0	Non	60°C
Protocole 4	95 : 5	Acide formique (pH 4,5)	60°C

- Quantification des fonctions thiols accessibles par dosage chimique au réactif d'Ellman (DTNB)

La teneur en groupes thiol des nanoparticules SiNP-MPTMS a été déterminée par le dosage au réactif d'Ellman (DTNB). Le coefficient d'extinction molaire du TNB (ε = 13450 M⁻¹.cm⁻¹) a été déterminé grâce à la droite d'étalonnage réalisée avec des solutions de concentrations croissante de 5 à 200 μM de chlorhydrate de cystéine.

- Dosage des fonctions thiols sur SiNP-MPTMS

Environ 4 mg de nanoparticules sèches ont été hydratés dans 500 μL de tampon phosphate (50 mM, pH 8) et ont été laissées à s'hydrater pendant 1 h. Dans l'intervalle, une solution à 200 μM de DTNB a été préparée dans 10 mL de tampon phosphate 50 mM, pH 8. Après hydratation des particules, 500 μL de solution de DTNB ont été ajoutés à des aliquots de 500 μL de suspension de nanoparticules puis incubé dans l'obscurité pendant 90 min. Les solutions ont ensuite été centrifugées pendant 10 min à 8 000 tr/min. Les mesures d'absorbance sont réalisées sur les surnageants.

Partie 3

- Mesures de sensibilité au changement d'indice de réfraction.

Différentes solutions d'eau/glycérol avec un pourcentage de glycérol allant de 0 à 80 % par intervalle de 20 % ont été préparés dans un volume de 1 mL. Un volume d'environ 15 μL d'AuNR@CTAB ou de AuNR@SiO₂ est ensuite ajouté à chaque solution ($\text{DO}_{\lambda_{\text{max}}} \sim 0,6$) et l'absorbance est mesurée immédiatement après mélange de la solution. Les indices de réfraction ont été calculés avec l'équation de Lorentz-Lorenz :

$$\frac{n_{12}^2 - 1}{n_{12}^2 + 2} = \varphi_1 \frac{n_1^2 - 1}{n_1^2 + 2} + \varphi_2 \frac{n_2^2 - 1}{n_2^2 + 2} \quad (\text{II})$$

Avec n_{12} , l'indice de réfraction du mélange eau-glycérol ; n_1 l'indice de réfraction de l'eau (1,3334) ; n_2 , l'indice de réfraction du glycérol (1.4746) ; φ_1 , la fraction volumique de l'eau, et φ_2 la fraction volumique du glycérol.

- Silanisation des AuNR@SiO₂ par MPTMS

Une solution de AuNR@SiO₂ ($8,11 \times 10^{15}$ nm² de surface ; 15,7 nM ; $\text{DO}_{\lambda_{\text{max}}} \sim 6,0$; 3,0 mL dans un flacon fermé de 8 mL) dans un mélange EtOH : H₂O (95 : 5 v/v) est soniquée 5 min puis est chauffée à 60 °C sous agitation pendant 20 min à l'étuve afin d'homogénéiser la solution. Ensuite, 1,25 μL de MPTMS pur (100 eq/OH de surface ; 2,24 mM final) sont ajoutés à la solution, celle-ci est ensuite agitée pendant ~ 17 heures à 60 °C et 500 tr/min. Les particules

sont lavées 2 fois à l'éthanol et 2 fois à l'eau Milli Q par des cycles successifs de centrifugation de 15 min à 9000 tr/min puis conservées dans 3,0 mL d'eau Milli Q jusqu'à utilisation.

- Silanisation des AuNR@SiO₂ par TEBA

Le protocole permettant la fonctionnalisation des AuNR@SiO₂ par le TEBA a été réalisé dans les mêmes conditions que le greffage de MPTMS décrit ci-dessus en ajustant le volume de TEBA à 1,64 μL (100 eq/OH de surface ; 2,24 mM final).

- Dosage des fonctions thiols sur AuNR@SiO₂-MPTMS

La teneur en groupes thiol des AuNR@SiO₂-MPTMS a été déterminée par le dosage au réactif d'Ellman (DTNB) en utilisant le coefficient d'extinction molaire du TNB : $\epsilon = 13450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. 250 μL d'une solution de AuNR@SiO₂-MPTMS (concentré ~ 10 fois) de concentration connue en suspension dans un tampon phosphate (50 mM, pH 8) sont mélangés à 250 μL de solution de DTNB (50 μM ; 50 mM phosphate, pH 8). Les solutions de nanoparticules sont ensuite incubées dans l'obscurité pendant 90 min puis centrifugées pendant 10 min à 9 000 tr/min. 350 μL du surnageant sont ensuite utilisés pour les mesures d'absorbance.

- Préparation des échantillons pour l'analyse XPS

Les suspensions colloïdales de AuNR@SiO₂ ; AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA ($\text{DO}_{\lambda_{\text{max}}} = 6,0$; 3,0 mL) ont été concentrées par centrifugation (10 min à 9000 tr/min) dans un volume d'environ 30 μL . Celles-ci ont ensuite été déposées par fractions de 10 μL espacées par un temps de séchage de 2 h sur différents substrats d'indium avant analyse.

- Préparation des échantillons pour l'analyse PM-IRRAS

Une goutte de 10 μL des solutions de AuNR@SiO₂ ; AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA ($\text{DO}_{\lambda_{\text{max}}} = 0,8$) a été déposée sur différents substrats d'or et séchés à l'air libre pendant 2 h avant analyse.

- Préparation des échantillons pour l'analyse Raman et SERS

Les spectres SERS ont été collectés sur 1,0 mL de suspension colloïdale de AuNR@SiO₂ ; AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNR@SiO₂-TEBA dans l'eau (DO_{λmax} ~ 5,0). Les spectres Raman du cristal violet ont été collectés dans l'eau à une concentration de 1 mM et 1 μM.

Partie 4

- Conjugaison et quantification des entités fluorescéine par IgG

A une solution d'IgG de chèvre anti-rIgG (2,28 mg/mL, 1 mL) dans un tampon carbonate (0,1 M, pH 9,2) est ajouté par fractions de 10 μL une solution de FITC (50 μL, 1 mg/mL dans le DMSO). La solution a été incubée dans le noir à 4°C pendant 18 h. Une solution de NH₄Cl (25 μL, 2 M) est ajoutée au mélange à une concentration finale de 50 mM et incubée pendant 2 h à 4°C pour arrêter la réaction. Du glycérol (50 μL) est ajouté à une concentration finale de 5 % (v/v). L'excès de FITC non lié aux IgG a été éliminé par 9 cycles de diafiltration dans le tampon PBS en utilisant un filtre ultracentrifuge Amicon (30 kDa d'exclusion). La concentration de FITC dans chaque filtrat a été quantifiée par lecture de l'absorbance à 495 nm. Les cycles de centrifugation et de dilution ont été répétés jusqu'à disparition de FITC dans les filtrats. La concentration du conjugué IgG-FITC est analysée par spectrométrie UV-Visible à partir des mesures d'absorbance à 280 nm (A₂₈₀) et 495 nm (A₄₉₅) d'après l'équation :

$$[\text{IgG}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_{280} - 0,35 \times A_{495}}{1,4} \quad (\text{III})$$

1,4 correspond à l'absorbance à 280 nm d'une solution d'IgG à 1,0 mg/mL à pH 7,0 et 0,35xA₄₉₅ est le facteur de correction dû à l'absorbance de FITC à 280 nm. Le ratio F/P qui définit le nombre d'entités FITC (F) par molécule d'IgG (P pour protéine) dans le conjugué anti-rIgG(FITC) est calculé d'après l'équation :

$$\frac{F}{P} = \frac{2,77 \times A_{495}}{A_{280} - 0,35 \times A_{495}} \quad (\text{IV})$$

- Conjugaison de l'anti-rIgG(FITC) aux AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA

Physisorption sur AuNR@SiO₂ : A une solution de AuNR@SiO₂ (15,7 pM ; DO_{λmax} ~ 0,6 ; ~ 1,50 mL dans tampon phosphate 5 mM ; pH 7,4) est ajouté 15 µL solution d'anti-rIgG(FITC) à une concentration finale de 12 µg/mL. La solution est agitée 1h30 à température ambiante puis la BSA est ajoutée à une concentration finale de 0,5% (w/v) pour bloquer les sites d'adsorption non spécifiques, la solution est agitée 45 min supplémentaires avant les dernières étapes de purification.

Chimisorption sur AuNR@SiO₂-MPTMS : A une solution de AuNR@SiO₂-MPTMS (15,7 pM ; DO_{λmax} ~ 0,6 ; ~ 1,50 mL dans phosphate 5 mM ; pH 7,4) est ajouté 10 µL d'une solution de TCEP à une concentration finale de 1 mM afin de rompre les éventuels ponts disulfures formés entre les particules. Après 1h30 d'agitation, les particules sont lavées 2 fois 10 min à 9000 tr/min et redispersées dans le tampon phosphate. Ensuite, 20 µL d'une solution de Sulfo-MBS sont ajoutés à la solution à une concentration finale de 50 µM. La solution est agitée pendant 1h avant d'être lavée 2 fois 10 min à 9000 tr/min et les particules redispersées dans le tampon phosphate. Enfin, 15 µL d'une solution d'anti-rIgG(FITC) sont ajoutés à une concentration finale de 12 µg/mL. La solution est agitée 1h30 à température ambiante puis la BSA est ajoutée à une concentration finale de 0,5% (w/v) pour bloquer les sites d'adsorption non spécifiques, la solution est agitée 45 min supplémentaires avant les dernières étapes de purification.

Chimisorption sur AuNR@SiO₂-TEBA : A une solution de AuNR@SiO₂-TEBA (15,7 pM ; DO_{λmax} ~ 0,6 ; ~ 1,50 mL dans phosphate 5 mM ; pH 7,4) sont consécutivement ajoutés 15 µL d'une solution d'anti-rIgG(FITC) à une concentration finale de 12 µg/mL puis 20 µL d'une solution de NaBH₃CN à une concentration finale de 300 µM. La solution est agitée ~17 h à température ambiante. puis la BSA est ajoutée à une concentration finale de 0,5% (w/v) pour bloquer les sites d'adsorption non spécifiques, la solution est agitée 45 minutes supplémentaires avant les dernières étapes de purification.

Purification des solutions : Après ajout de BSA, les particules sont lavées quatre fois par des cycles successifs de centrifugation de 10 min à 9000 tr/min. Après chaque cycle, les surnageants sont collectés, donnant les surnageants S1 à S4 et les culots redispersés dans le tampon phosphate contenant 0,25 % de BSA (w/v). Les surnageants S1 à S4 sont centrifugés 15 min

supplémentaires à 15000 rpm afin d'éviter la présence de particules pouvant interférer avec les mesures de fluorescence.

- Quantification des anti-rIgG(FITC) par fluorométrie :

La quantification de la fluorescéine dans les surnageants S1 à S4 et les conjugués obtenus d'après la procédure ci-dessus a été réalisée par spectrofluorimétrie. En raison de la sensibilité du signal d'émission de fluorescence à son environnement, des courbes d'étalonnage dans des matrices reproduisant les conditions des surnageants S1 (tampon phosphate 5 mM ; pH 7,4 ; 0,5 % BSA) et S2,3,4 (tampon phosphate 5 mM ; pH 7,4 ; 0,5 % BSA) ont été réalisées avec des concentrations croissantes d'anti-rIgG(FITC).

Partie 5 :

- Conjugaison de l'anticorps aux AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA

Le même protocole que celui décrit dans la partie 4 a été utilisé pour la conjugaison de l'anticorps aux AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-MPTMS/TEBA. Un IgG de chèvre anti-IgG de lapin purifié par affinité a été utilisé comme anticorps.

- Cinétique de déplacement de la bande LSPR

Aux différentes solutions de nanosondes AuNR@SiO₂-Anti-rIgG, AuNR@SiO₂-MPTMS-rIgG et AuNR@SiO₂-TEBA-rIgG (23,7 pM ; DO_{λ_{max}} ~ 0,9 ; 400 μL) dans des cuvettes en plastique a été ajouté 4 μL d'une solution d'IgG de lapin (dont la concentration a été préalablement déterminé par mesure de l'absorbance à 280 nm avec $\epsilon = 210000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à une concentration finale de 1 μg/mL. Après ajout, les solutions sont rapidement vortexées (~1 sec). Pour observer la dépendance des différentes sondes au temps d'incubation, un spectre d'absorption est mesuré toutes les 10 minutes sur une période de 90 minutes. Pour cette étude le pas de la mesure est de 0,3 nm.

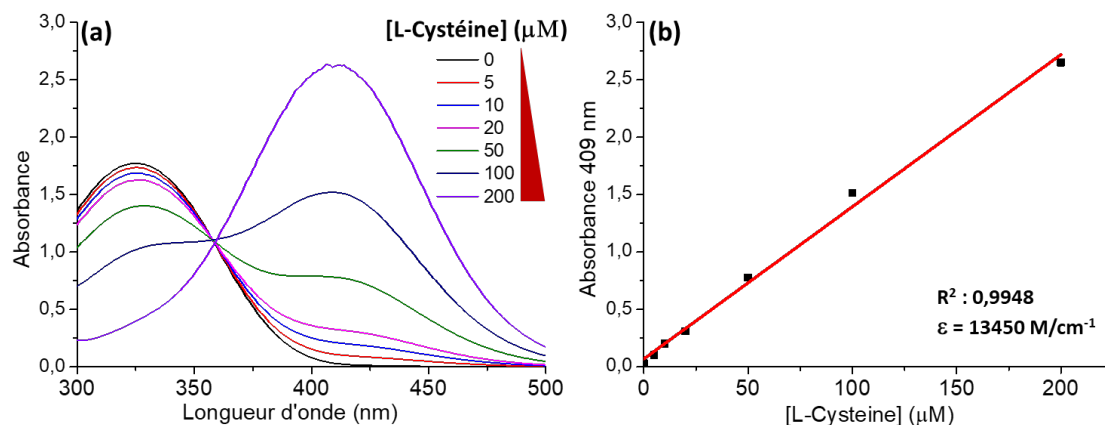
- Réalisation des biocapteurs LSPR en solution

Aux différentes solutions de nanosondes AuNR@SiO₂-anti-rIgG, AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG et AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (23,7 pM ; DO_{λ_{max}} ~ 0,9 ; 400 μL) dans des cuvettes en plastique a été ajouté des aliquots de 4 μL d'une solution d'IgG de lapin diluée. Pour la première série d'expériences, la concentration en IgG de lapin a été modulée sur une gamme de 500 à 1000 μg/mL. La gamme de concentration a été modulée entre 25 à 500 μg/mL pour la deuxième

série d'expériences. Les solutions sont rapidement vortexées (~1 sec) après chaque ajout. Les spectres d'absorption ont été mesurés toutes les heures avec un pas de 0,3 nm.

Annexes

Partie 2

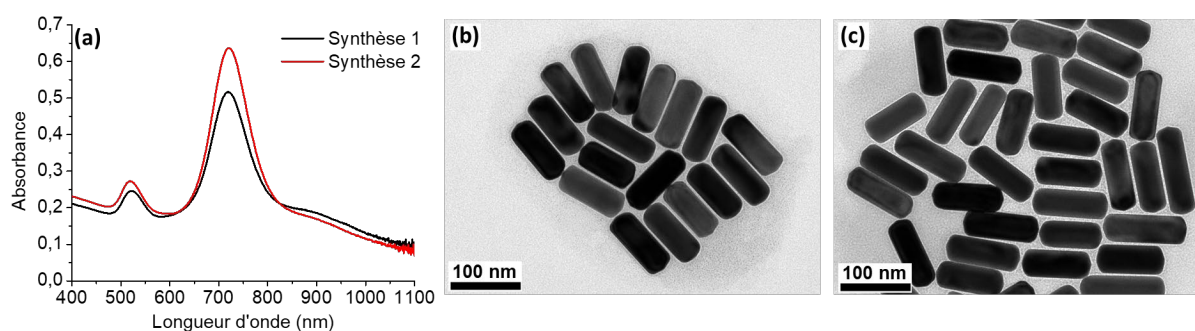


Annexe Figure 1 : (a) Spectres UV-Visible de la réaction entre le DTNB et des concentrations croissantes de cystéine conduisant à la formation stœchiométrique de TNB^{2-} absorbant à 409 nm. (b) Courbe d'étalonnage obtenue d'après les spectres d'absorption

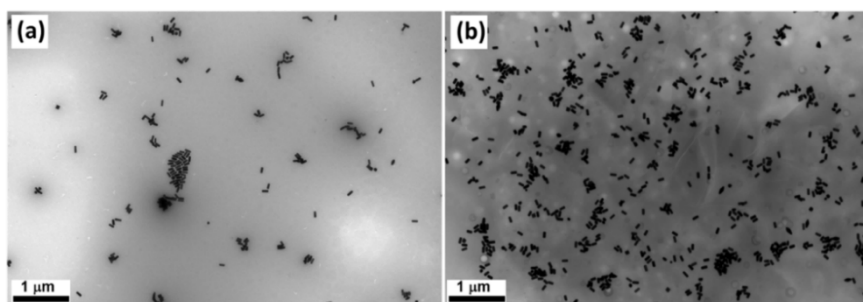
Annexe Tableau 1: Étude de la reproductibilité et la répétabilité des mesures de dosage des fonctions $-\text{SH}/\text{nm}^2$ suivant le protocole 2 de silanisation.

	Greffage 1	Greffage 2	Greffage 3
Mesure 1 ($-\text{SH}/\text{nm}^2$)	0,87	1,21	1,06
Mesure 2 ($-\text{SH}/\text{nm}^2$)	0,91	1,35	1,19

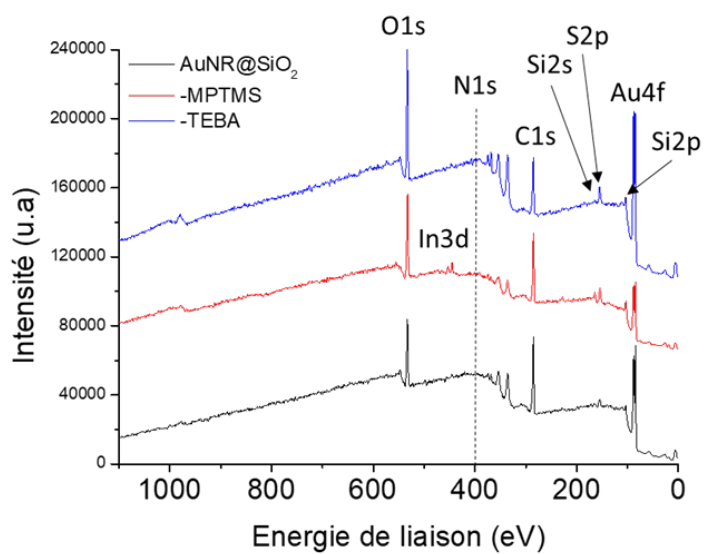
Partie 3



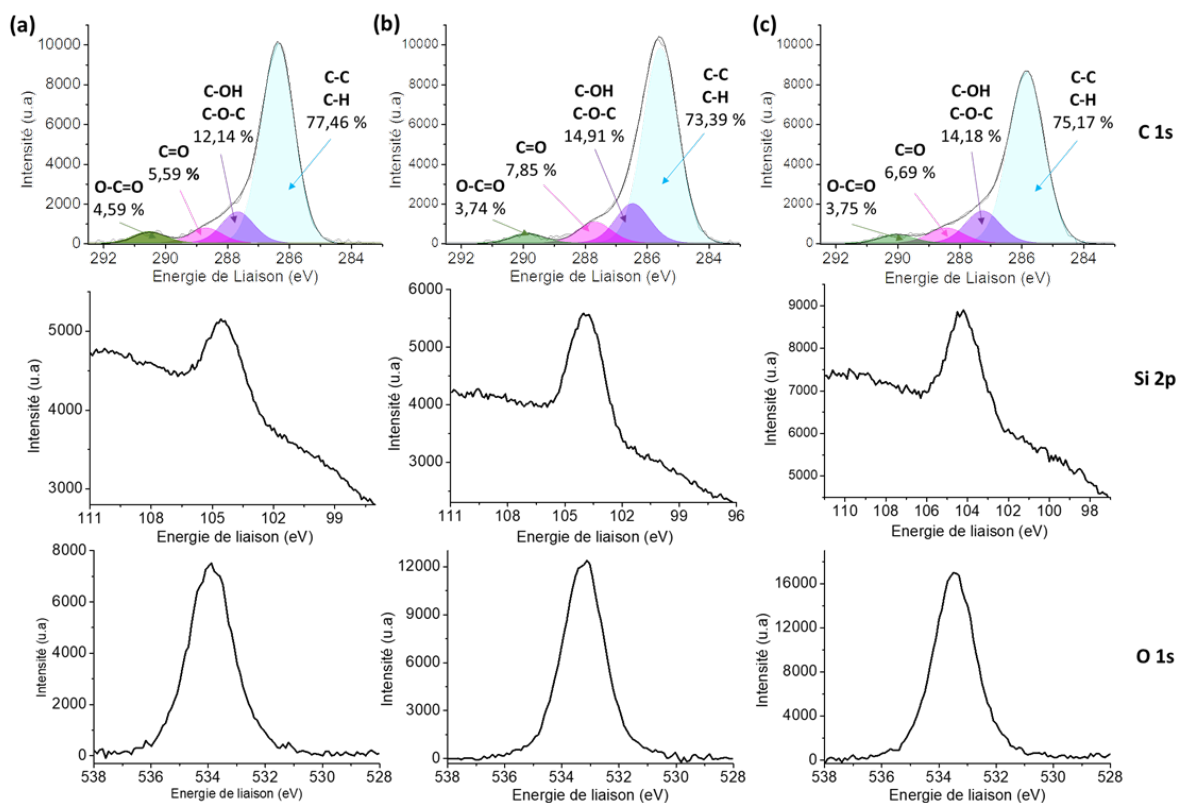
Annexe Figure 2 : (a) Spectres UV-Visible des lots de AuNRs utilisés dans les chapitres III. Images de microscopie électronique à transmission associées aux (b) synthèse 1 et (c) synthèse 2.



Annexe Figure 3 : Images de microscopie électronique à transmission du brut de synthèse (avant lavage) des AuNR@SiO₂ fonctionnalisés par (a) MPTMS ou (b) TEBA.



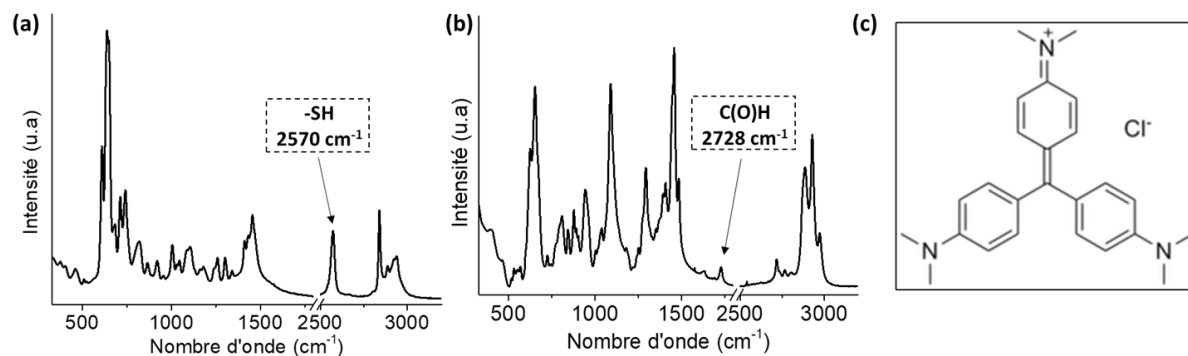
Annexe Figure 4 : Spectres XPS global des AuNR@SiO₂ avant silanisation (noir) et après silanisation par MPTMS (rouge) et TEBA (bleu).



Annexe Figure 5 : Spectres XPS des régions C 1s, Si 2s et O 1s : des AuNR@SiO₂ avant silanisation (a) et après silanisation par MPTMS (b) et TEBA (c).

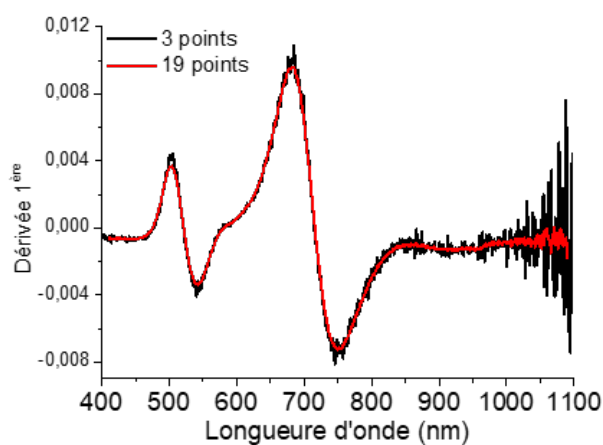
Annexe tableau 2 : Rapports atomiques des éléments à la surface des AuNR@SiO₂ avant et après greffage des silanes fonctionnels déterminés par XPS. Expérience de reproductibilité.

Rapports atomiques	AuNR@SiO ₂	-MPTMS	-TEBA
S/Au	0,16	0,92	0,15
O/Si	2,23	1,67	2,53
C/Au	2,59	4,41	3,99
Si/Au	1,44	2,82	1,62
Epaisseur SiO ₂ (nm)	2,80	4,12	3,12

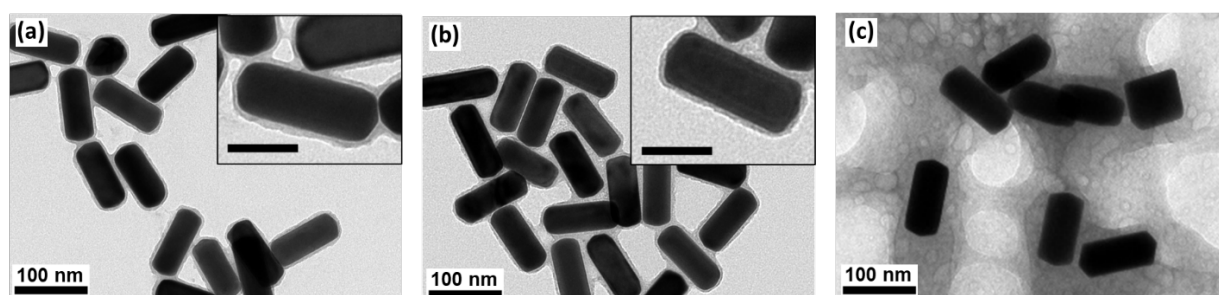


Annexe Figure 6 : Spectre Raman des composés purs (a) MPTMS, (b) TEBA. (c) Structure chimique du Cristal Violet (CV).

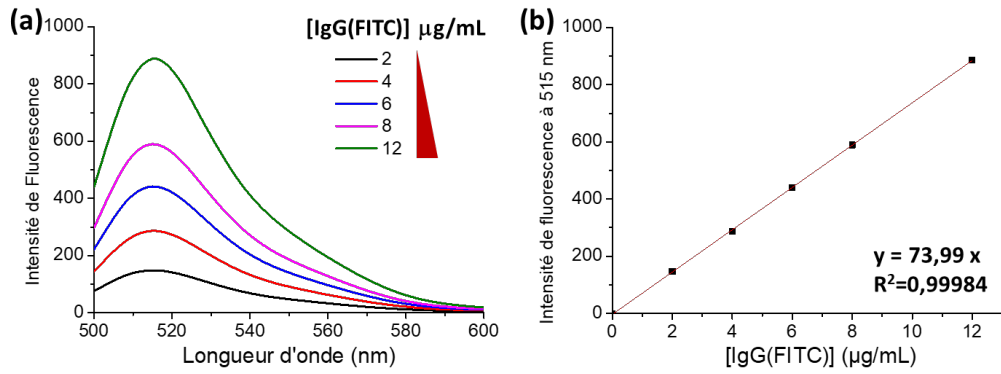
Partie 4



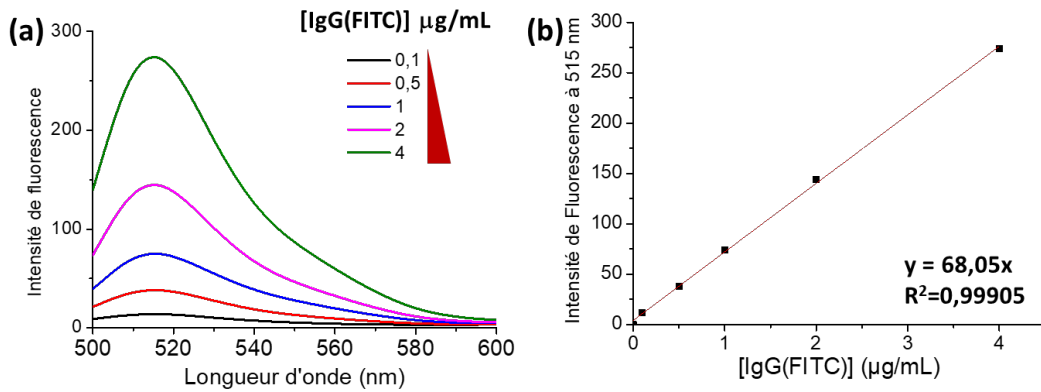
Annexe Figure 7 : Dérivée 1^{ère} du spectre d'absorption des AuNR@SiO₂ utilisant la méthode des 3 et 19 points.



Annexe Figure 8 : Images de microscopie électronique à transmission du lot 1b de silanisation (a) AuNR@SiO₂-MPTMS et (b) AuNR@SiO₂-TEBA (lot de AuNRs Lx1 : 102x40 nm). (c) Conjugué AuNR@SiO₂-MPTMS-IgG dans le tampon phosphate de stockage contenant 0,25 % de BSA (lot de AuNRs Lx1 : 110x50 nm).



Annexe Figure 9 : (a) Spectres d'émission de concentrations connues d'anti-rIgG(FITC) mimant la matrice du surnageant de synthèse S1 contenant 0,5% de BSA ($\lambda_{ex} = 480$ nm). (b) Courbe d'étalonnage d'anti-rIgG(FITC), émission mesurée à 515 nm.

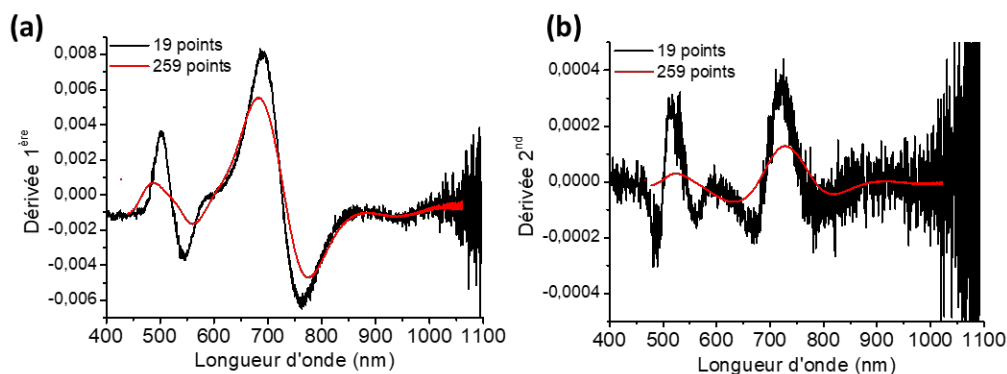


Annexe Figure 10 : (a) Spectres d'émission de concentrations connues d'anti-rIgG(FITC) mimant la matrice des surnageants de synthèse S2, S3, et S4 contenant 0,25% de BSA ($\lambda_{ex} = 480$ nm). (b) Courbe d'étalonnage d'anti-rIgG(FITC), émission mesurée à 515 nm.

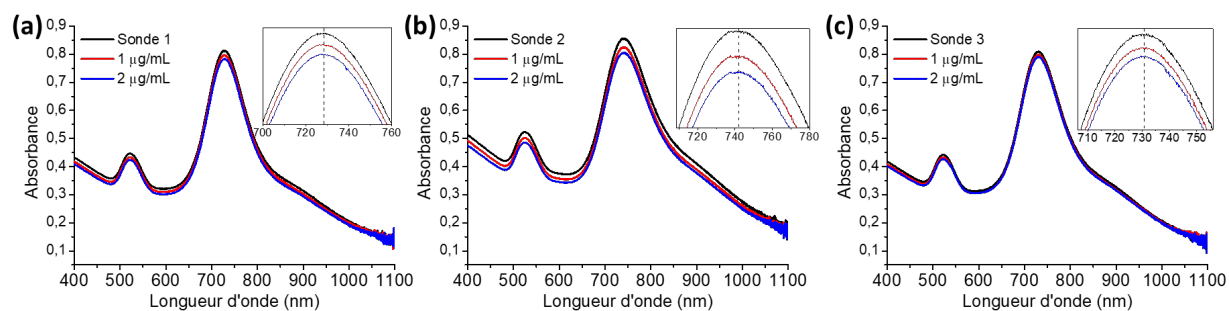
Annexe tableau 3 : Quantification indirecte par fluorescence et mesures directes sur les conjugués.

	Physisorption : Conjugué 1	Chimisorption MPTMS : Conjugué 2	Chimisorption TEBA : Conjugué 3
Quantification indirecte			
Avant conjugaison V = 1,555 mL [Conjugué] = A/(εl)	$[\text{Conjugué 1}] = \frac{0,625}{3,82 \times 10^{10}}$ = 0,0163 nM	$[\text{Conjugué 2}] = \frac{0,491}{3,82 \times 10^{10}}$ = 0,0128 nM	$[\text{Conjugué 3}] = \frac{0,605}{3,82 \times 10^{10}}$ = 0,0158 nM
Equation calibration S1	y = 73,99 x (x en nM)		
[anti-rIgG (FITC)]	y = 756,5 $x = \frac{756,5}{73,99} = 10,2 \mu\text{g/mL}$ = 68,16 nM	y = 713 $x = \frac{713}{73,99} = 9,65 \mu\text{g/mL}$ = 64,24 nM	y = 746 $x = \frac{746}{73,99} = 10,08 \mu\text{g/mL}$ = 67,2 nM
Equation calibration S2-4	y = 68,05 x (x en nM)		
[anti-rIgG(FITC)]	y = 99 $x = \frac{99,0}{68,05} = 1,45 \mu\text{g/mL}$ = 9,67 nM	y = 130 $x = \frac{130,0}{68,05} = 1,91 \mu\text{g/mL}$ = 12,74 nM	y = 88 $x = \frac{88,0}{68,05} = 1,29 \mu\text{g/mL}$ = 8,6 nM
[anti-rIgG(FITC)] lié aux AuNR@SiO ₂ (nM)	80 - 68,16 - 9,67 = 2,2	80 - 64,24 - 12,74 = 3,02	80 - 69,2 - 8,6 = 4,2
Anti- rIgG(FITC)/AuNR@SiO ₂	$\frac{2,2}{0,0163} = 135$	$\frac{3,02}{0,0127} = 238$	$\frac{4,2}{0,00158} = 266$
Fluorescence des conjugués-anti-rIgG(FITC)			
Après conjugaison V = 1,555 mL [Conjugué] = A/(εl)	$[\text{Conjugué 1}] = \frac{0,611}{3,82 \times 10^{10}}$ = 0,0160 nM	$[\text{Conjugué 2}] = \frac{0,465}{3,82 \times 10^{10}}$ = 0,0122 nM	$[\text{Conjugué 3}] = \frac{0,513}{3,82 \times 10^{10}}$ = 0,0134 nM
[IgG(FITC)]	= 0,0160 × 135 = 2,16 nM	= 0,0122 × 238 = 2,90 nM	= 0,0134 × 266 = 3,57 nM
Intensité de fluorescence théorique	= 2,16 × 68,05 = 147	= 2,90 × 68,05 = 197	= 3,57 × 68,05 = 243
Intensité de fluorescence expérimentale	40	35	38,4
Intensité de fluorescence nanoparticules non conjuguées	18,3	16,9	19,4

Partie 5



Annexe Figure 11 : (a) Dérivée 1^{ère} et (b) dérivée seconde du spectre d'absorption des AuNR@SiO₂ utilisant la méthode des 19 et 259 points.



Annexe Figure 12 : Spectres d'absorption des (a) AuNR@SiO₂-anti-rIgG (nanosonde 1) ; (b) AuNR@SiO₂-MPTMS-anti-rIgG (nanosonde 2) et (c) AuNR@SiO₂-TEBA-anti-rIgG (nanosonde 3) après ajout d'IgG de souris non spécifique.

Annexe I : Calcul de la concentration en AuNRs et du coefficient d'extinction molaire

La mesure de l'absorbance à 400 nm d'une solution de AuNRs est directement liée à la concentration d'Au⁰ présent dans la solution par l'équation $y = 2,4 x$ avec y est l'absorbance à 400 nm (sans unité) et x la concentration en Au⁰ (mM) Connaissant les dimensions des AuNRs utilisées, la concentration peut être déduite du rapport du nombre total d'atomes d'or sur le nombre d'atomes d'or par particule :

$$[\text{AuNRs}] = \frac{N_{\text{Total}}}{N_{\text{pp}} \cdot V \cdot N_A}$$

N_{total} : Nombre total d'atomes d'or = $n(\text{Au}^0) \cdot N_A$

Ainsi :

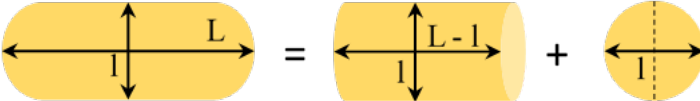
$$[\text{AuNRs}] = \frac{n_{\text{Au}^0}}{N_{\text{pp}} \cdot V} = \frac{[\text{Au}^0]}{N_{\text{pp}}}$$

N_{pp} : Nombre d'atome d'or par particule : $N_{\text{pp}} = \frac{V_{\text{AuNR}}}{V_{\text{atome Au}}}$

Le volume d'un atome d'Au est :

$$V_{\text{atome Au}} = \frac{M_{\text{Au}}}{N_A \cdot \rho_{\text{Au}}} = 1,694 \cdot 10^{-23} \text{ nm}^3$$

$M(\text{Au}) = 196,96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\rho = 19,31 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3} = 19,31 \cdot 10^{-21} \text{ g} \cdot \text{nm}^{-3}$; $N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Avec le volume d'une AuNR : 

Pour la synthèse 1 en Annexe Figure 2 -b, les dimensions mesurées par TEM sont : $L = 102 \text{ nm}$ et $l = 40 \text{ nm}$

$$V_{\text{cylindre}} = \frac{\pi \cdot (L-l) \cdot l^2}{4} = 48,7 \cdot l^2 \quad \text{Et} \quad V_{\text{sphère}} = \frac{\pi l^3}{6} = 0,52 \cdot l^3$$

$$N_{\text{pp}} = \frac{V_{\text{cylindre}} + V_{\text{sphère}}}{V_{\text{atome Au}}} = 6,563 \cdot 10^6 \text{ atomes par batonnet}$$

L'absorbance mesurée à 400 nm des AuNRs issus de la synthèse 1 (Annexe Figure 2) est 0,21, ainsi $[\text{Au}]^0 = 87,9 \mu\text{M}$

$$[\text{AuNRs}] = \frac{[\text{Au}^0]}{N_{\text{pp}}} = 1,34 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Le coefficient d'extinction molaire est donné par la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

l : le trajet optique parcouru par le faisceau dans la solution = 1 cm et A l'absorbance des AuNRs au maximum de la bande plasmon longitudinale = 0,511 ($\lambda_{\text{max}} = 719 \text{ nm}$)

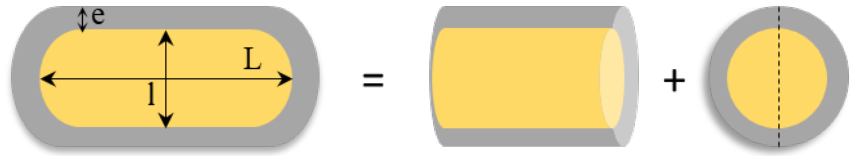
$$\text{Ainsi } \varepsilon = 3,82 \cdot 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Annexe II : Calcul de la surface d'une AuNR@SiO₂

Pour la synthèse 1 (Annexe Figure 2) les dimensions mesurées par TEM sont : $L = 102 \text{ nm}$ et $l = 40 \text{ nm}$ et $e = 3,6 \text{ nm}$.

Ainsi :

Surface AuNR@SiO₂ =



$$\text{Surface du cylindre : } S_{\text{cylindre}} = 2\pi \times \frac{(l+2 \times e)}{2} \times (2 \times e + (L - l)) = 10300 \text{ nm}^2$$

$$\text{Surface de la sphère : } S_{\text{sphère}} = 4\pi \times \left(\frac{l+2 \times e}{2}\right)^2 = 7000 \text{ nm}^2$$

$$\text{Surface AuNR@SiO}_2 = 17300 \text{ nm}^2$$

Annexe III :Modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir a été développé initialement pour décrire l'adsorption réversible d'une monocouche de gaz sur une surface homogène. Dans ce modèle, on considère que les sites d'adsorption sont identiques et que les molécules adsorbées n'interagissent pas entre elles. Il est fréquemment utilisé pour décrire l'adsorption de protéines et l'équation est la suivante :

$$q_{eq} = \frac{q_{max} \times K_L \times C_{eq}}{1 + K_L \times C_{eq}}$$

Avec q_{eq} la quantité adsorbée à l'équilibre, q_{max} quantité maximale adsorbée à saturation de la monocouche, K_L la constante de Langmuir est liée à l'enthalpie de l'adsorption et C_e la concentration de l'adsorbat en solution à l'équilibre. Cette équation peut être transformée en une expression linéaire :

$$\frac{1}{q_{eq}} = \left(\frac{1}{K_L \times q_{max}} \right) \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_{max}}$$

Appliqué à la variation de déplacement de la bande LSPR, l'équation est la suivante :

$$\frac{1}{\Delta\lambda} = \left(\frac{1}{K_a \times \Delta\lambda_{max}} \right) \times \frac{1}{C} + \frac{1}{\Delta\lambda_{max}}$$

Avec $\Delta\lambda$ la variation de la position de la bande plasmon, C la concentration de l'antigène, $\Delta\lambda_{max}$ la position maximum de la bande LSPR et K_a la constante d'affinité

**Chapitre IV : Vers une application des
AuNR@SiO₂ en microscopie Infra Rouge pour
l'immunomarquage cellulaire**

Avant-propos

Ce chapitre s'inscrit dans la continuité des travaux de Rudolf et al. au cours desquels il a été rapporté la conception d'un immunocapteur pour la détection par spectroscopie infrarouge d'une cible modèle, l'IgG de souris *via* la conjugaison d'anticorps et d'une sonde métal-carbonyle à la surface de nanoparticules d'or sphériques¹. Dans l'optique d'utiliser ces objets comme sondes pour l'immunomarquage de protéines cellulaires visualisables en imagerie par microscopie IR, notre équipe a été contactée par Aris Polyzos de l'institut de biophysique moléculaire et de bioimagerie intégrative au laboratoire Lawrence Berkeley à Berkeley aux États-Unis afin de préparer ces conjugués. En raison de la surface importante AuNR@SiO₂ comparée aux particules sphériques (AuNPs) les plus couramment utilisées (~13 nm), il est possible d'augmenter la concentration surfacique de sonde métal-carbonyle et donc d'augmenter le signal IR résultant. De plus, l'amplification du champ électromagnétique à proximité de la surface des particules pourrait permettre de conduire à une exaltation de l'intensité des bandes d'absorption de la sonde IR (effet SEIRA), conduisant à une sensibilité de détection plus importante en microscopie IR.

Ce chapitre comporte deux parties : la première est consacrée à une étude bibliographique succincte dédiée à l'immunodétection de biomarqueurs cellulaires par microscopie *via* l'utilisation de nanoparticules métalliques conjuguées à un anticorps et une sonde moléculaire exploitant des phénomènes d'exaltation plasmonique de surface (i.e. PEF : fluorescence exaltée par résonance plasmonique ; SERS : spectroscopie Raman exaltée de surface et SEIRA : spectroscopie infrarouge exaltée de surface). La deuxième partie est dédiée à la présentation des résultats préliminaires sur la synthèse et la caractérisation des conjugués anticorps + sonde métal-carbonyle à la surface de nanoparticules d'or sphériques et de nanobatonnets d'or enrobés de silice.

Partie 1 : Etude bibliographique

1. Principe de l'immunomarquage par un fluorophore

Un dosage immunologique (immunoessai) est un test biochimique permettant de détecter la présence ou de mesurer la concentration d'un analyte dans une matrice complexe *via* l'utilisation d'anticorps. Les immunomarquages basés sur une détection par fluorescence combinée à des techniques de microscopie ou à la cytométrie de flux sont de loin les plus répandus dans le domaine de la recherche biologique et médicale, non seulement pour étudier la localisation, la dynamique des cellules et de leurs composants mais permettent aussi la détection, la quantification et la localisation de molécules ou macromolécules spécifiques (biomarqueurs). La méthode directe se distingue de la méthode indirecte suivant que le fluorophore est conjugué à un anticorps primaire ou secondaire² (Figure 1). La méthode directe emploie un anticorps primaire marqué et directement dirigé contre la cible d'intérêt. La méthode indirecte requiert l'utilisation de deux anticorps, un anticorps primaire non marqué et un anticorps secondaire marqué et dirigé contre l'anticorps primaire. Cette dernière est la plus populaire car un seul anticorps marqué est nécessaire pour le ciblage de différentes substances, ce qui permet de réduire les coûts, de plus elle permet d'amplifier le signal fluorescent du fait que plusieurs anticorps peuvent se lier à l'anticorps primaire (Figure 1).

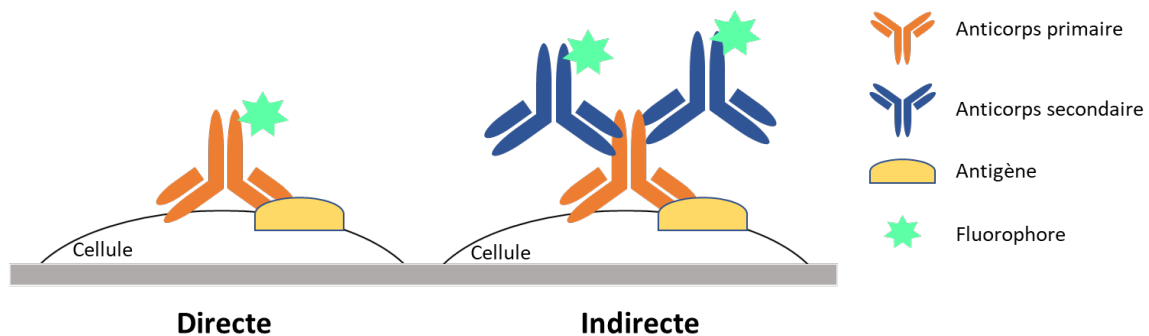


Figure 1 : Illustration du principe d'immunofluorescence directe et indirecte.

Bien que la microscopie de fluorescence offre une bonne résolution (< 200 nm en largeur et 600 nm en profondeur pour un microscope confocal),³ elle souffre d'un certain nombre de limitations, telles que : le faible rendement de fluorescence, la photodégradation du fluorophore, le faible rapport signal sur bruit en raison de reconnaissances non spécifiques des anticorps ou encore de la fluorescence naturelle de l'espèce étudiée (autofluorescence)⁴. Ces limitations vont directement impacter la sensibilité des mesures ; ainsi les biomarqueurs

présents en faible quantité ne pourront pas être identifiés. Nous nous intéresserons par la suite aux différentes techniques d'immunomarquage combinant techniques de microscopie pour la visualisation et l'étude de marqueurs cellulaires *in vitro* et un élément plasmonique pour l'exaltation du signal détecté. Quand cela est possible, un accent sera mis sur les études recourant aux AuNRs comme élément plasmonique.

2. L'immunofluorescence exaltée

Parmi les dispositifs permettant de surmonter les inconvénients de l'immunofluorescence classique, les substrats nanostructurés et particules colloïdales plasmoniques sont un moyen efficace d'exalter les propriétés optiques des fluorophores grâce au couplage entre le plasmon en surface du métal et les fluorophores à proximité. Ce phénomène est appelé fluorescence exaltée par le métal (MEF)⁵ ou fluorescence exaltée par résonance plasmonique (PEF)⁶. Globalement, il apparaît que ce phénomène se produit lorsque les fluorophores sont excités à une distance proche de la surface métallique comprise entre 5 et 90 nm et que la fluorescence est éteinte lorsque ceux-ci sont en contact direct ou à proximité (< 5 nm) de la surface ou lorsqu'ils sont proches les uns des autres^{7,8}. Ainsi les nanostructures métalliques peuvent augmenter de plusieurs centaines de fois l'intensité de fluorescence. Cependant la distance idéale conduisant au maximum d'exaltation dépend du matériau étudié, du fluorophore et des conditions expérimentales d'acquisition. Différents substrats plasmoniques ont été élaborés afin d'exalter l'émission de fluorescence pour des applications en imagerie cellulaire⁹⁻¹¹. Leur intégration dans une pratique quotidienne de biodétection et d'imagerie est restreinte de par : l'élaboration de substrats complexes sur lesquels sont déposés des structures métalliques nanométriques, la faible stabilité des anticorps à température ambiante en milieu non aqueux¹², et l'incompatibilité de ces substrats lors de procédures bioanalytiques couramment utilisées.

Ces inconvénients ont récemment été surmontés par l'équipe de Luan et al. lors d'une étude où ils rapportent l'élaboration AuNR@SiO₂ conjugués au fluorophore 800CW (composite appelé *plasmonic-fluor*) pour une myriade d'applications immunologiques se basant sur la fluorescence¹³. Le composite *plasmonic-fluor* se compose d'AuNRs (L*1 = 83*24 nm ; λ_{\max} = 760 nm) recouverts en surface par une coquille de silice de $6,3 \pm 1,4$ nm sur laquelle a été physisorbé un conjugué BSA-Biotine-fluorophore 800CW (Figure 2a). L'intensité de fluorescence du composite *plasmonic-fluor* est 6700 (\pm 900) fois supérieure au fluorophore seul. Ils ont souligné l'importance du chevauchement entre la position de la bande plasmon

longitudinale, les longueurs d'onde d'excitation du laser (785 nm) et d'émission du fluorophore (800 nm) pour obtenir un signal intense. A titre de comparaison, l'exaltation obtenue avec des nanoparticules d'or sphériques de surface similaire (LSPR $\lambda_{\max} = 530$ nm) est 70 fois inférieure à l'intensité de fluorescence du composite.

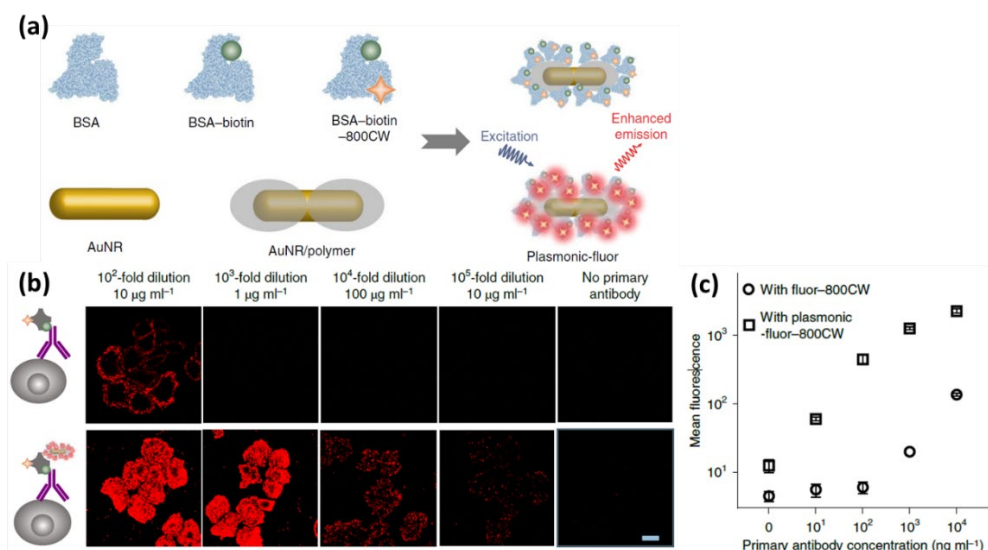


Figure 2 : (a) Illustration schématique de l'élaboration du composite *plasmonic-fluor*. (b) Images de microscopie confocale de cellules cancéreuses du sein (SK-BR-3) marqué par le fluorophore 800CW seul (haut) et par le *plasmonic-fluor* (bas) en présence de différentes concentrations d'anticorps primaire anti-ErbB2. La barre d'échelle est de 10 nm. (c) Graphique montrant l'intensité de fluorescence des cellules SK-BR-3 marquées par le fluorophore 800CW seul ou avec le *plasmonic-fluor*, les barres d'erreur représentent des mesures réalisées sur 3 points différents de la cellule.

Les performances de ce dernier ont été démontrées sur des cellules épithéliales modèle du cancer du sein (SK-BR-3) exprimant le récepteur HER2 (Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) via une procédure standard d'immunomarquage (anticorps primaire anti-ErbB2 biotinylé + streptavidine conjuguée au fluorophore 800CW) (Figure 2b). Le composite a permis d'imager le récepteur avec une intensité de fluorescence 100 fois supérieure (20 pM) comparé au fluorophore seul (2 μ M) (Figure 2b,c) tout en diminuant de 100000 fois la concentration de l'anticorps primaire (10 ng/mL) (Figure 2b). Ces travaux ouvrent une nouvelle voie à l'utilisation de colloïdes plasmoniques pour l'amélioration de la sensibilité des outils bioanalytiques existants basés sur l'immunofluorescence.

3. La spectroscopie Raman exalté pour l'immunomarquage (iSERS)

Parmi les techniques d'immunomarquage associées à une surface plasmonique, l'immuno-SERS (iSERS) est une technique qui a gagné en maturité ces dernières années¹⁴. Elle associe la reconnaissance d'un biomarqueur par une interaction anticorps-antigène classique et la détection de l'interaction par la production de signaux de diffusion Raman exaltés par une surface (SERS). Typiquement, un rapporteur SERS se compose de nanoparticules colloïdales plasmoniques permettant d'exalter le signal, d'une ou plusieurs sondes Raman en contact direct avec la surface de signatures spectroscopiques caractéristiques, d'un biorécepteur permettant la liaison à l'antigène cible et souvent d'une coquille protectrice en surface de particules permettant de protéger la sonde Raman du milieu extérieur¹⁵. Parmi les avantages de l'iSERS on liste : l'important facteur d'exaltation pouvant atteindre $\sim 10^{10}$ ce qui permet d'atteindre une sensibilité élevée¹⁶, la fine largeur des bandes de vibration Raman permettant l'identification de plusieurs cibles simultanément (multiplexing)^{17,18}. L'effet SERS est insensible au photoblanchiment et à l'extinction du signal par la surface¹⁹, de plus la faible section efficace de diffusion Raman des molécules d'eau facilite les mesures en milieu biologique. De nombreux rapporteurs SERS ont été développés sur ces principes à des fins bioanalytiques *in vivo* et *in vitro* au niveau moléculaire, de la cellule, des tissus et d'organismes entiers²⁰⁻²².

Parmi eux, certains sont élaborés à partir de AuNRs et appliqués à l'imagerie par microscopie immuno-SERS pour la détection de biomarqueurs cellulaires. Le principe est le même que l'immunofluorescence, à savoir que l'antigène est reconnu par un anticorps marqué, dans ce cas la sonde Raman et son signal SERS permet d'en repérer la localisation. A l'inverse de l'immunofluorescence où la distribution du signal fluorescent est visualisée sur une image prise en une fois sur l'échantillon entier, les images obtenues en iSERS sont le résultat d'une cartographie résolue pixel par pixel. La résolution est inférieure au μm et permet une bonne visualisation des compartiments cellulaires²³. La cartographie Raman consiste à enregistrer le spectre SERS complet en deux dimensions point par point sur l'échantillon cellulaire. L'intensité d'une bande Raman particulière peut être imagée en utilisant un gradient de couleur conduisant à une «carte» montrant l'emplacement des marqueurs sur une zone physique donnée en fonction de l'intensité du signal SERS de la bande²⁴. L'intensité du signal SERS dépend du nombre de sondes détectées par le spot du laser d'excitation. Le phénomène d'autofluorescence peut être minimisé par le recours d'un laser de longueur d'onde d'excitation située entre le rouge et le proche infrarouge. De cette manière, Park et al. ont été capables

d'imager le biomarqueur HER2 présent sur la membrane d'une cellule cancéreuse unique (MCF-7) (Figure 3)²⁵. Lors de cette étude, ils ont étudié la capacité de AuNRs de différents rapports d'aspect (1,6 ; 3,0 ; 4,5) à exalter le signal SERS de la 4-mercaptopyridine (MP). Les nanobatonnets de rapport d'aspect 1,6 ont été sélectionnés en raison de leur capacité à exalter plus fortement le signal SERS. Cela a été attribué au chevauchement spectral entre la position de la bande LSPR longitudinale ($\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$) et la longueur d'onde d'excitation du laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$).

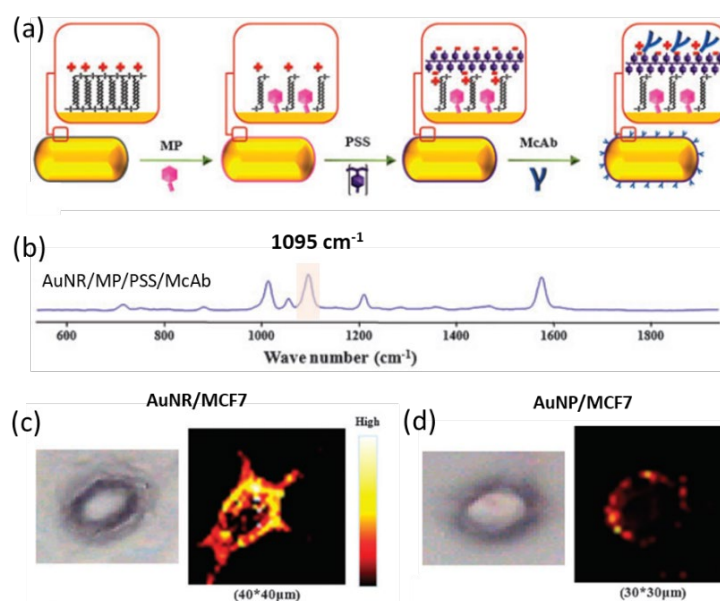


Figure 3 : (a) Représentation schématique du processus de fabrication du rapporteur SERS. (b) Spectre SERS du rapporteur Raman correspondant. (c) cellule MCF-7 en présence du rapporteur SERS AuNR et (d) cellule MCF-7 en présence du rapporteur SERS AuNPs, les photos de gauche représentent les images en champ clair et les images de droite correspondent à la cartographie Raman établie à partir du pic de la sonde situé à 1095 cm^{-1} . D'après la référence²⁵.

Les AuNR-MP ont ensuite été recouverts par le poly(sodium 4-styrene-sulfonate) (PSS) par la méthode de couche par couche afin de conférer à la surface une charge négative et permettre l'immobilisation par physisorption d'un anticorps secondaire anti-lapin (Figure 3a). Les biomarqueurs HER2 marqués par un anticorps primaire de lapin anti-HER2 ont pu être visualisés spécifiquement après incubation avec le conjugué, leur localisation a été mise en évidence par cartographie Raman à partir de la bande à 1095 cm^{-1} de la mercaptopyridine (Figure 3b,c). A titre de comparaison, des conjugués réalisés à partir d'AuNPs sphériques présentent une intensité Raman beaucoup plus faible (Figure 3d).

Pour améliorer la sensibilité de détection de la sonde SERS, Yue et al. ont exploité la capacité de l'argent à exalter fortement le signal Raman en élaborant un rapporteur constitué de nanobatonnets cœur-coquille or-argent (AuNR@Ag), de DTNB comme sonde Raman et d'anticorps primaire anti-MICA (molécule A lié au complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1)²⁶. L'importante exaltation du signal Raman du DTNB en surface des AuNR@Ag comparée aux AuNRs leur a permis de visualiser sélectivement la localisation des biomarqueurs MICA sur des cellules cancéreuses des os. En utilisant ce type de particules, Nima et al. ont pu identifier spécifiquement des cellules tumorales du cancer de sein circulant dans le sang (MCF-7) d'échantillons humains non traités ainsi que les différents biomarqueurs présents en surface via une stratégie multiplexe (Figure 4)²⁷. Les rapporteurs Raman sont constitués de AuNR@Ag décorés de quatre sondes Raman différentes et de quatre anticorps primaires (anti-EpCAM, anti-récepteur-IGF1 β , anti-CD44 et anti-Kreatine18) (Figure 4a). Afin de distinguer les sondes, Nima et al. ont attribué différentes couleurs aux pics individuels caractéristiques sur le spectre des sondes. La superposition des couleurs à l'image optique de la cellule a permis de différencier la cellule cancéreuse MCF-7 des autres cellules présentes dans le sang (Figure 4b).

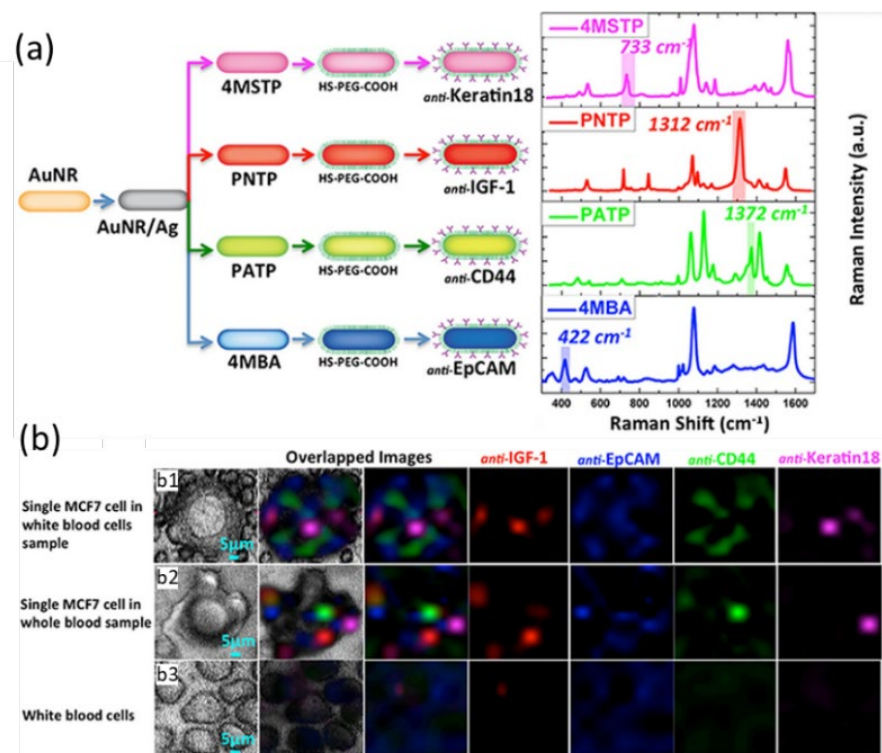


Figure 4 : (a) Représentation schématique du processus de fabrication des quatre rapporteurs SERS et leurs spectres respectifs. (b) Cartographie Raman multi-couleur d'une cellule MCF-7 parmi les globules blancs (1), dans l'échantillon de sang complet (2) et les globules blancs seuls (3). D'après la référence²⁷.

4. La spectroscopie infrarouge exaltée pour l'immunomarquage (iSEIRA)

Une approche étroitement liée et complémentaire à l'effet SERS est l'effet SEIRA (Spectroscopie infrarouge exaltée de surface) qui exploite l'exaltation des modes de vibrations moléculaires à proximité d'une surface plasmonique lorsque le moment dipolaire est perpendiculaire à la surface²⁸. Ces effets sont observés à des longueurs d'onde supérieures à l'effet SERS et les facteurs d'exaltation théoriques maximum de l'ordre de 10^4 sont bien inférieurs de ceux obtenus en SERS.²⁹ Les matériaux supportant l'effet SEIRA sont généralement élaborés sous forme de nanostructures périodiques lithographiées^{30,31}, ou par dépôt de solutions colloïdales sur un support³²⁻³⁴. Un contrôle fin de la géométrie lors de l'élaboration de ces substrats est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs facteurs d'exaltation³⁵. A notre connaissance, il n'existe pas d'études concernant les nanostructures plasmoniques (colloïdes ou surfaces planes nanostructurées) pour l'immunodétection de biomarqueurs cellulaires et leur visualisation par des techniques de microscopie infrarouge. Dans un article récent, Dominici et al. ont étudié l'internalisation cellulaire (lignée de fibroblaste NIH-3T3 de souris) de nanoparticules d'or recouvertes d'une sonde IR (le 4-aminophenol)³⁶, ils ont montré que le signal IR des vibrations C=C des noyaux aromatiques est exalté jusqu'à 200 fois. L'internalisation des nanoparticules a été suivie par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à rayonnement synchrotron (SR-microFTIR). La possibilité de visualiser des constituants cellulaires sur un substrat SEIRA a été démontrée par Chen et al.³⁷. En déposant une cellule cancéreuse humaine (lignée HeLa) sur un substrat plasmonique lithographié, ils ont localisé, sans marquage préalable par une molécule sonde, les vibrations caractéristiques des lipides intracellulaires en cartographiant les bandes de vibrations situées à 1400 cm^{-1} (région située hors de l'absorption par les vibrations des molécules d'eau).

La littérature décrivant l'immunociblage cellulaire par effet SEIRA (iSEIRA) *via* un rapporteur colloïdal marqué fait défaut jusqu'à présent. Le développement des techniques d'imagerie infrarouge allant au-delà de la limite de diffraction *via* le recours à une pointe AFM (Résolution $< 20\text{ nm}$)³⁸ telles que la microscopie à force atomique (AFM-IR) et la microscopie optique en champs proche à diffusion IR (IR-SNOM) et des sources de lumière plus énergétiques telles que le synchrotron ont amélioré les mesures d'absorption infrarouge pour l'obtention rapide d'images spatialement résolues avec un ratio S/B haut³⁹. Leurs implémentations en iSEIRA devraient permettre le développement de nouveaux outils diagnostiques dans les domaines de la biologie et de la recherche médicale.

Partie 2 : Elaboration des sondes optiques.

Les complexes métal-carbonyles sont des complexes organométalliques possédant des ligands CO coordonnés à un métal de transition. Ces complexes présentent des vibrations d'élongation absorbant dans la région allant de 2200-1800 cm^{-1} , cette région est relativement dépourvue d'interférences avec les groupements fonctionnels des composants cellulaires ainsi qu'avec les vibrations de l'eau (située vers 1600 cm^{-1}). Ces propriétés intéressantes en fait des marqueurs spectroscopiques de choix pour l'imagerie en milieu biologique⁴⁰⁻⁴² et dans les immunodosages^{43,44}. La majorité du temps, ces complexes sont utilisés comme marqueurs d'organites cellulaires. Conjugué à une molécule organique exogène, différents compartiments tels que la membrane plasmique, le noyau, l'appareil de Golgi ou encore les mitochondries ont pu être visualisés par microscopie infrarouge^{40,45,46}.

Dans l'objectif de développer un immunomarquage permettant la détection de biomarqueurs cellulaires spécifiques visualisables par des techniques de microscopie infrarouge, des premiers essais de détection par un anticorps secondaire marqué par une sonde métal-carbonyle (~ 8 sondes/anticorps) se sont révélées infructueuses. Cela a été attribué à une quantité insuffisante de sonde pour fournir un signal détectable. Pour surmonter cette difficulté, la stratégie envisagée est de recourir à des nanoparticules d'or dont la surface permet l'ancrage d'un nombre très supérieur de sondes IR et le couplage entre le champ électromagnétique à proximité des particules plasmoniques et les vibrations moléculaires de la sonde IR à travers l'effet SEIRA devrait permettre l'obtention d'un signal IR suffisant. Cet effet a été observé dans une étude de Rudolf et al. parue en 2011 sur des AuNPs sphériques de 10 et 29 nm sur lesquelles ont été chimisorbées des complexes métal-carbonyles à centre Fer⁴⁷. Dans une étude parue en 2013, ils décrivent une méthode permettant de conjuguer des anticorps à ce type de particules pour la conception d'immunocapteurs¹. Cette méthode a été reproduite sur des AuNPs et extrapolée aux AuNRs. Ce chapitre expose les résultats préliminaires obtenus concernant la synthèse et la caractérisation des nanosondes IR. Ces conjugués sont caractérisés par : spectroscopie UV-Visible, diffusion dynamique de la lumière, zétamétrie, infrarouge et par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-OES). Ils seront ensuite envoyés au laboratoire Lawrence Berkeley de l'institut de biophysique moléculaire et de bioimagerie intégrative qui dispose d'un accès à une ligne synchrotron ainsi qu'à des équipements AFM-IR afin de réaliser les expériences d'immunodétection et de visualisation de marqueurs cellulaires.

1. Conjugaison d'anticorps et attachement de la sonde IR aux AuNPs et AuNRs

Les lots de AuNRs, AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂ silanisés par le MPTMS utilisés dans cette étude ont été précédemment caractérisés dans la partie 5 du chapitre III. Pour rappel, les AuNRs ont une taille moyenne de 102*40 nm (Figure 5a), un rapport d'aspect de $2,6 \pm 0,2$ et sont enrobés par une fine coquille de silice de $3,6 \pm 0,6$ nm (Figure 5b). Les images de microscopie électronique à transmission et l'histogramme de distribution en rapports d'aspect (Figure 5c) confirment la monodispersité des particules ainsi que l'homogénéité de l'enrobage de silice. Le lot de AuNR@SiO₂-MPTMS utilisé ici est identique à celui présenté dans la partie 5 du chapitre III (lot 1a'), ces particules présentent une coquille de silice 4,7 nm après silanisation. Les AuNPs sphériques synthétisées sont stabilisées en surface par un mélange citrate/acide tannique et présentent une taille de moyenne de $17,3 \pm 1,6$ nm de distribution homogène (Figure 5a,b,c).

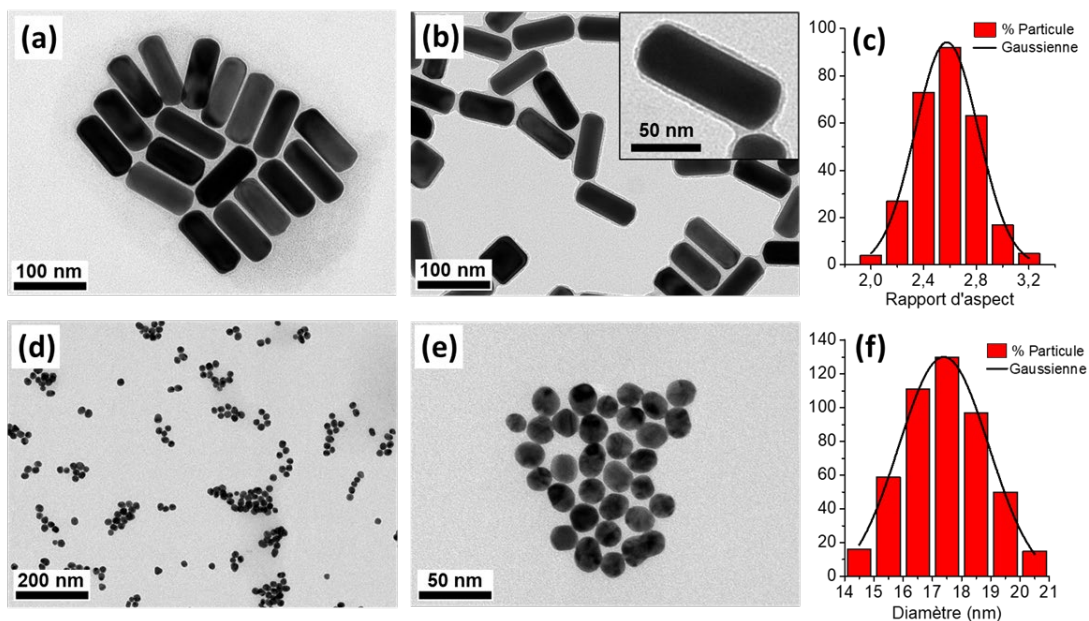


Figure 5 : Images de microscopie électronique à transmission des (a) AuNRs, (b) AuNR@SiO₂, (c) histogramme de la distribution en rapports d'aspect des AuNRs, (d) AuNPs sphériques en plan d'ensemble, (e) AuNPs sphériques plan rapproché et (f) histogramme de la distribution en taille des AuNPs.

Ici la coquille de silice enrobant les AuNR@SiO₂ a plusieurs fonctions : 1) augmenter la stabilité colloïdale des AuNRs, 2) faciliter la fonctionnalisation des AuNRs tout en augmentant la surface fonctionnalisable par rapport aux AuNPs sphériques (18800 nm^2 contre 940 nm^2), 3) la fine épaisseur de la coquille permettra éventuellement de préserver l'effet d'exhalation du signal infrarouge (SEIRA) qui décroît à mesure que l'on s'éloigne du cœur métallique.

Le complexe métal-carbonyle (η^5 -cyclopentadienyl)Fe(CO) $_2$ (η^1 -N-maleimidato) (Fpm) et son dérivé disulfure Fp-SS-Fp (Figure 6) nous ont été fournis par Bogna Rudolf du département de chimie organique de l'Université de Lodz en Pologne. Le complexe Fpm est obtenu par réaction photochimique entre le (η^5 -cyclopentadienyl)Fe(CO) $_2$ I et le maleimide dans le benzène en présence de diisopropylamine⁴⁸. Le dérivé disulfure Fp-SS-Fp résulte de l'addition de la cystamine hydrochlorure sur le groupement éthylénique de Fpm à pH 9-10⁴⁷. Ces complexes de couleur jaune présentent deux bandes d'absorption spécifiques et intenses visibles en spectroscopie infrarouge à 2052 cm⁻¹ et 2003 cm⁻¹ et attribuées aux vibrations d'élongation ν CO des ligands carbonyles. Cette région est généralement exempte de signaux attribuables à l'absorption de biomolécules ce qui rend possible l'utilisation de ces complexes comme rapporteurs d'interactions protéine/protéine.

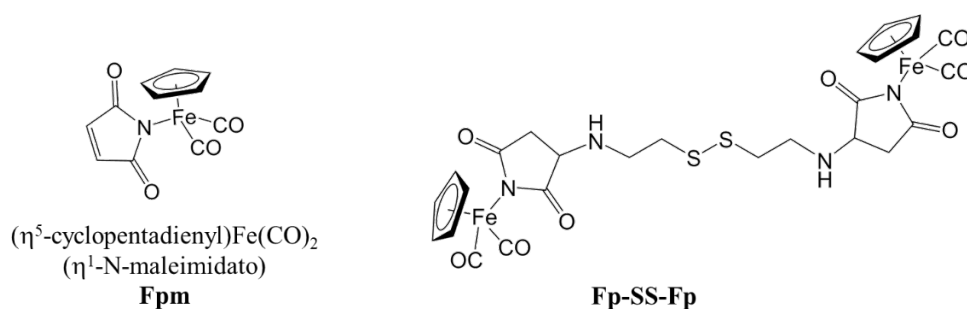


Figure 6 : Structure des complexes Fpm et Fp-SS-Fp.

Un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris (noté ici IgG) ainsi que les complexes de transition Fpm et Fp-SS-Fp ont été chimisorbés respectivement à la surface des AuNR@SiO $_2$ -MPTMS et AuNPs selon le schéma général Figure 7. Les fonctions thiols libres des AuNR@SiO $_2$ -MPTMS à l'interface solide/liquide devraient permettre la chimisorption de la sonde Fpm par addition de Michael avec son ligand maleimide et la formation de liaisons thioéther. Nous avons vu dans les parties 4 et 5 du chapitre III que les IgG peuvent être chimisorbés à la surface des AuNR@SiO $_2$ -MPTMS par l'intermédiaire d'un agent de couplage hétéro-bifonctionnel, le m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester (sulfo-MBS). Une méthode similaire a été employée ici, cependant, afin de favoriser une densité supérieure en sondes Fpm en surface des particules, le sulfo-MBS et Fpm ont été co-introduits dans un ratio molaire 1 : 100. Une fois les particules lavées de l'excès des réactifs, l'IgG de chèvre anti-IgG de souris est immobilisé par formation de liaisons amides résultant de la réaction des groupements N-hydroxysulfosuccinimide en surface des particules avec les fonctions amines de l'anticorps.

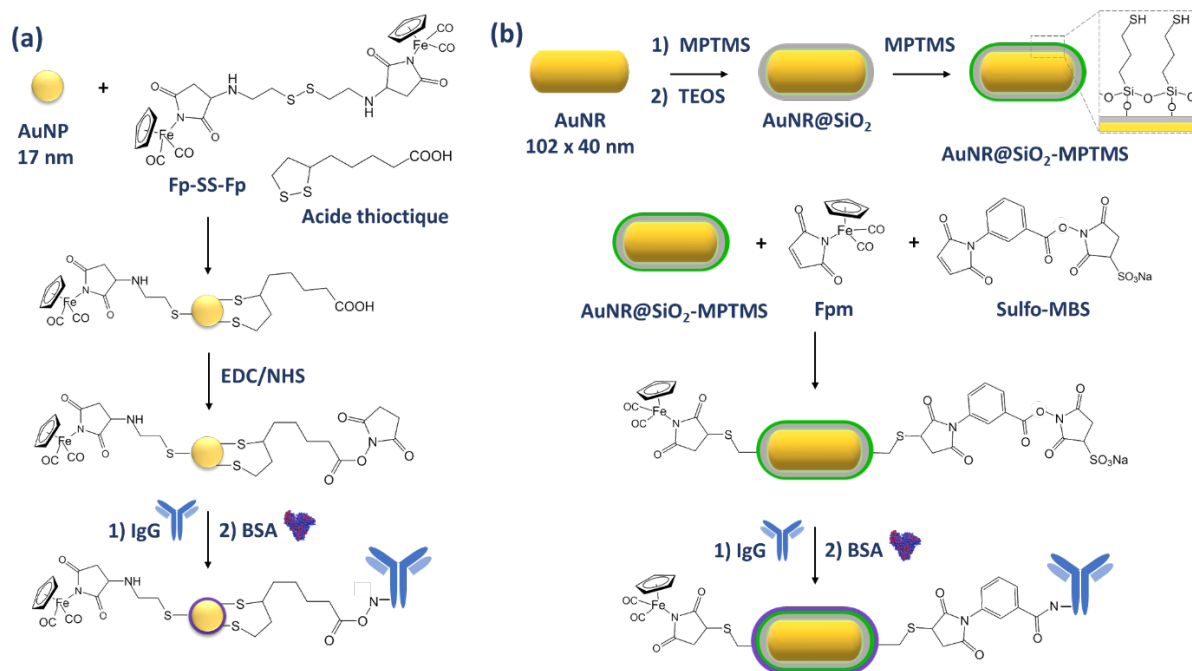


Figure 7 : Stratégies employées pour l'immobilisation des complexes métal-carbonyle et d'anticorps secondaires à la surface des (a) AuNPs et (b) AuNRs.

A l'instar de la méthode proposée par Rudolf et al.¹, un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris (IgG) et le complexe Fp-SS-Fp ont été chimisorbés à la surface des AuNPs. Lors d'une première étape, l'acide thioctique (TA) a été chimisorbé afin d'introduire des fonctions acides carboxyliques de surface après formation de liaisons Au-S. La sonde Fp-SS-Fp a ensuite été co-adsorbée avec le TA, on s'attend alors à un échange partiel entre ces ligands à la surface des particules. Après élimination de l'excès des réactifs, les particules ont été redispersées dans le tampon phosphate à 5 mM, pH 8. Le contrôle du pH et de la force ionique en solution à cette étape est primordial pour maintenir la stabilité colloïdale par répulsion électrostatique. Le pKa de la fonction acide carboxylique de l'acide thioctique libre en solution est de 5,4, ainsi lorsque le lavage est réalisé dans l'eau MilliQ (pH ~ 6,0), nous avons observé l'agrégation irréversible des particules accompagnée de la disparition de la couleur rouge caractéristique de la solution colloïdale. Cela pourrait être attribué à une protonation partielle des fonctions acides résultant en une charge négative de surface moindre. Dans leur étude de 2011, Rudolf et al. ont aussi observé l'agrégation des particules lors de l'étape de lavage par dialyse dans l'eau, ce qui a conduit à l'arrêt de leurs travaux sur cette série de particules⁴⁷. Ce problème a pu être surmonté dans leur étude publiée en 2013 sans toutefois donner de précisions sur les conditions de lavage¹. L'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris a finalement été chimisorbé en surface des AuNPs via l'activation des fonctions carboxyles par un mélange

EDC/NHS suivie du couplage par réaction des amines de l'anticorps. Après couplage des anticorps en surface des AuNR@SiO₂-MPTMS et des AuNPs, une étape de blocage des sites d'adsorption non spécifiques par l'albumine de sérum bovin (BSA) a été réalisée. L'étude de 2013 mentionne aussi une méthode d'immobilisation des anticorps par physisorption à la surface des AuNP-FpSSFp sphériques de 29 nm stabilisée par un surfactant non ionique : le monolaurate de sorbitane polyoxyéthylène (Tween 20)¹. Nous n'avons pas réussi à reproduire ce protocole en raison de l'agrégation irréversible des particules lors de la première étape de centrifugation suivant l'ajout de la sonde FpSSFp.

Le suivi des différentes étapes de fonctionnalisation des AuNRs, et AuNPs a été réalisé par spectroscopie UV-Visible et la stabilité colloïdale a été vérifiée par des mesures de DLS et zétamétrie (Figure 8). Le Tableau 1 résume l'évolution de la position des pics de diffusion, des potentiels zêta ainsi que les déplacements de la position de la bande LSPR longitudinale des AuNRs et de la bande LSPR des AuNPs. Ceux-ci ont été déterminés à partir du zéro de la dérivée première des spectres UV-Visible en utilisant la méthode des 19 points.

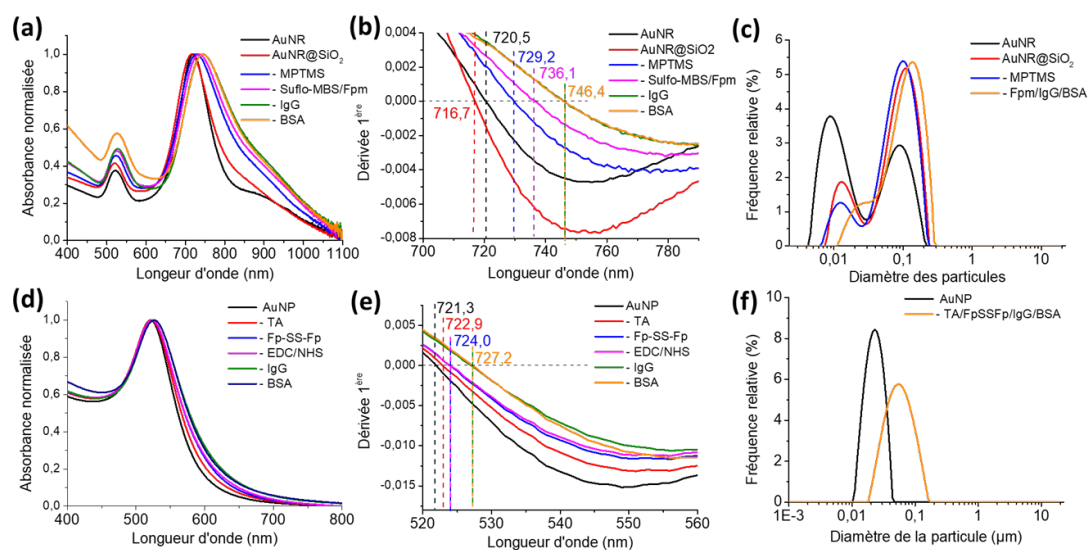


Figure 8 : Spectres UV-Visible normalisés (a/d), leur dérivée première (b/e) et les mesures de diffusion dynamique (c/f) de la lumière montrant l'évolution de la fonctionnalisation des AuNRs et AuNPs respectivement.

La bande LSPR longitudinale des AuNRs se déplace dans le bleu de 3,8 nm après encapsulation par la silice et élimination du CTAB lors du lavage des particules par centrifugation. La silanisation par le MPTMS induit un déplacement de 8,7 nm dans le rouge attribué au greffage du silane en surface ainsi qu'à sa diffusion au sein de la coquille. Le co-greffage de la sonde métal-carbonyle Fpm et de l'agent de couplage sulfo-MBS produit un

décalage de 6,9 nm supplémentaire ; pour rappel de la partie 5 du chapitre III, le greffage de sulfo-MBS seul à la surface de ces particules induit environ 2 nm. Enfin, à la suite du couplage de l'anticorps un déplacement de 10,3 nm vers le rouge est observé; l'ajout de BSA et le lavage des particules n'induisent pas de déplacement supplémentaire. L'élargissement de la bande LSPR longitudinale est constaté à la suite des différentes étapes de fonctionnalisation mais ne témoigne pas de la perte de stabilité colloïdale des particules, ce qui est confirmé par l'absence de pic d'agrégation sur les mesures DLS. L'évolution de la charge de surface des particules mesurée dans le tampon phosphate 5 mM à pH 7,4 témoigne des différentes étapes de fonctionnalisation : un potentiel positif de + 47 mV est mesuré sur les AuNRs et attribué au CTAB présent en surface, celui-ci devient négatif à - 32 mV après enrobage par la silice en raison des groupements silanolates de surface. Après silanisation par le MPTMS le potentiel augmente légèrement à - 28 mV et le co-greffage sur les fonctions thiols libres de l'agent de couplage Sulfo-MBS et de la sonde Fpm n'induit pas de changement de potentiel en raison de la nature non chargée des réactifs. Finalement l'ajout d'anticorps et de BSA induit une augmentation du potentiel zêta à - 16 mV, ce qui est cohérent avec les valeurs rapportées dans le précédent chapitre.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de la position de la bande plasmon longitudinale des AuNRs et du maximum du pic des AuNPs, des largeurs à mi-hauteur, des positions des pics de diffusions et des potentiels zêta moyens.

Etape	λ_{\max} (nm)	Fwhm (nm)	Pic rota. / transla. (nm)	Diamètre hydrodynamique (nm)	Potentiel Zêta moyen (mV)
AuNRs	719	83	9 / 91	-	+ 47,0 ± 0,2
AuNR@SiO ₂	716,7	87	13 / 110	-	- 32,0 ± 1,9
- MPTMS	729,2	115	12 / 101	-	-28,0 ± 1,0
- Sulfo-MBS /Fpm	736,1	118	13 / 121	-	- 26,8 ± 0,7
- IgG/BSA	746,4	122	24 / 137	-	- 16,1 ± 0,3
AuNPs	521,3	60	-	23	- 41,2 ± 2,6
- TA	522,9	62	-	-	-
- FpSSFp / EDC + NHS	524,0	62	-	-	-
- IgG/BSA	527,2	64	-	55	- 18,0 ± 2,0

Le maximum de la bande LSPR des AuNPs sphériques est situé à 521,3 nm (Figure 8d,e) ; le déplacement d'une partie des citrates de surface à la suite de l'ajout d'acide thioctique (TA) entraîne un déplacement dans le rouge de 1,6 nm et l'échange de ligands entre TA et la sonde FpSSFp engendre 1,1 nm supplémentaire soit un total de 2,7 nm pour TA + FpSSFp. On note que cette valeur est inférieure à ce qui a été observée par Rudolf et al. après ajout de TA + FpSSFp sur des AuNPs sphériques de 10 et 29 nm¹, pour lesquels il a été mesuré un décalage de 11 nm. L'activation des fonctions acide carboxylique par l'ajout d'EDC/NHS ne modifie pas la position de la bande LSPR puis l'ajout d'IgG conduit à 3,2 nm de déplacement dans le rouge. On observe que l'ajout de BSA et le lavage des particules ne modifie pas la position de la bande LSPR ; de plus, celle-ci reste fine au cours des différentes étapes de greffage. Le diamètre hydrodynamique des particules évolue de 23 nm (AuNPs) à 55 nm (AuNP-FpSSFp-IgG) (Figure 8f). En considérant la taille moyenne d'un IgG (~13 nm), l'augmentation du diamètre hydrodynamique après adsorption des protéines (IgG + BSA) est cohérent avec l'obtention d'une monocouche de protéines à la surface des particules. Ces résultats sont cohérents avec des résultats précédemment publiés pour des AuNPs sphériques⁴⁹ et AuNP@Ag cœur-coquille sphériques⁵⁰. On note une augmentation de la polydispersité des particules mais l'absence de bande d'agrégation confirme la stabilité des conjugués après fonctionnalisation. Le potentiel zêta mesuré à - 41,2 mV des AuNPs recouverts de citrates évolue à - 18,0 mV après conjugaison, ces résultats sont cohérents avec les résultats préalablement publiés^{49,50} ainsi qu'avec les potentiels mesurés sur les conjugués AuNR@SiO₂ (Chapitre III).

2. Caractérisation du complexe métal-carbonyle à la surface des AuNPs et AuNRs

Les spectres infrarouges des conjugués AuNR@SiO₂-Fpm-IgG et AuNP-FpSSFp-IgG ont été enregistrés en transmission après dépôt d'un volume connu de suspension colloïdale de particules de concentration connue sur une membrane de nitrocellulose (6 mm de diamètre) et séchage à l'air libre. La présence des sondes métal-carbonyle à la surface des conjugués AuNR@SiO₂-Fpm-IgG et AuNP-FpSSFp-IgG a été confirmée par les bandes caractéristiques des vibrations d'élongation νCO sur le spectre infrarouge des colloïdes d'or à 2047 cm⁻¹ et 2000 cm⁻¹ (Figure 9a). On note que le maximum des pics se décale de 5 cm⁻¹ vers les plus bas nombres d'onde après adsorption des complexes à la surface des particules (complexe libre νCO à 2052 cm⁻¹ et 2003 cm⁻¹). La position et l'intensité de ces bandes sont présentées dans le Tableau 2. La spécificité du greffage des sondes Fpm et FpSSFp respectivement à la surface des AuNR@SiO₂-MPTMS et AuNPs a été déterminée en utilisant le complexe Fpm en présence des AuNR@SiO₂ non silanisées et AuNPs tout en maintenant les conditions expérimentales (temps d'incubation, cycles de lavage) identiques. L'absence des pics νCO sur les spectres infrarouge Figure 9a confirme la nécessité de thiols libres à la surface des AuNR@SiO₂ et d'atomes de soufre sur la sonde Fp pour un greffage effectif.

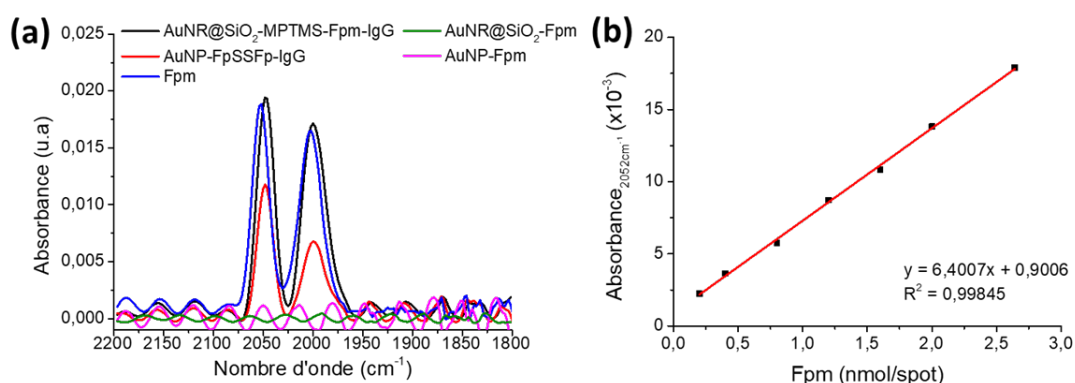


Figure 9 : (a) Spectres infrarouge des conjugués AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG, AuNP-FpSSFp-IgG, Fpm 2,64 nmol/spot, AuNR@SiO₂-Fpm, AuNP-Fpm et (b) droite d'étalonnage en complexe Fpm.

La concentration du complexe métal-carbonyle chimisorbé en surface des AuNRs et AuNPs (Tableau 2) a été déterminée à partir de l'intensité du pic à 2047 cm⁻¹ sur le spectre des conjugués et en utilisant la courbe d'étalonnage du complexe Fpm (Figure 9b). La concentration du conjugué AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG a été calculée à partir du coefficient d'extinction molaire des AuNRs, estimé à $3,86 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ par ICP-OES. On note que celui est identique à ce qui a été estimé dans le chapitre III en considérant l'absorbance à 400 nm des particules

($3,82 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). De plus l'hypothèse selon laquelle le coefficient d'extinction molaire reste constant après fonctionnalisation a aussi été vérifiée par ICP-OES : $\varepsilon(\text{AuNR}@\text{SiO}_2) = 3,52 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\varepsilon(\text{AuNR}@\text{SiO}_2\text{-MPTMS-Fpm-IgG}) = 3,69 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; le détail des calculs est donné en annexe. La concentration en AuNPs sphériques a été calculée à partir du coefficient d'extinction molaire des AuNPs estimé à $\varepsilon(\text{AuNP}) = 6,36 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ d'après la littérature⁵¹. Les ratios Fp/particule sont de 78585 pour les AuNRs et 674 pour les AuNPs, obtenus en divisant la concentration du complexe par la concentration des particules (Tableau 2).

Tableau 2 : Détermination des ratios Fp/particules.

Conjugué	Abs ₂₀₄₇	[Particule] (nM)	[Fp] (μM)	Fp/particule
AuNR@SiO ₂ -Fpm-IgG	0,0195	2,05	161,1	78585
AuNP-FpSSFp-IgG	0,0121	144,0	97,1	674

A titre de comparaison, un ratio théorique maximum de 44544 Fpm/AuNR a été calculé à partir de la surface d'une particule AuNR@SiO₂-MPTMS (18800 nm²) ; d'une densité surfacique en fonctions thiol de 2,4 par nm² (chapitre III partie 3) et un rapport molaire Sulfo-MBS/Fpm de 1 :100. La surestimation du ratio Fpm/AuNR pourrait éventuellement être attribuée à l'effet SEIRA présent à proximité de la surface d'or, comme cela a été envisagé par Rudolf et al. sur les AuNPs sphériques⁴⁷. Dans le cas des AuNPs sphériques de 17,3 nm, ce ratio est plus faible que la valeur mesurée par Rudolf et al. sur des nanoparticules d'or sphériques de 10 nm et 29 nm ($\text{Fp}/\text{AuNP}_{10\text{nm}} = 2540$; $\text{Fp}/\text{AuNP}_{29\text{nm}} = 14300$)¹. Cela pourrait être attribué à un problème d'échange de ligands entre la sonde FpSSFp et l'acide thioctique lors de la fonctionnalisation des particules. En effet, un faible déplacement de la bande plasmon a été relevé à cette étape. Le facteur d'exaltation, défini comme le rapport entre l'intensité d'un signal vibrationnel exalté et l'intensité du signal de référence non exalté³⁰, n'a pas été déterminé à ce stade de l'étude.

Des expériences préliminaires d'ICP-OES ont été effectuées afin de doser les éléments or, fer et silicium au sein des conjugués AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG et AuNP-FpSSFp-IgG. Le dosage de l'or a permis de calculer les coefficients d'extinction molaire des AuNRs avant et après enrobage de silice et conjugaison des particules. Aucune trace des éléments fer et silicium n'a été détectée lors de l'analyse ; nous pensons que le fer a réagi dans le milieu de digestion (HCl/HNO₃) en formant des complexes non solubles dans l'eau et que la silice (SiO₂)

ne s'est pas dissoute dans ces conditions. Un protocole permettant le dosage concomitant des éléments or, fer et silicium est à l'étude, nous pensons que cela est réalisable dans un mélange HF/B(OH)₃ à chaud suivi d'un traitement par HNO₃ ou par un traitement NaOH concentré puis HNO₃. La détermination de la teneur en fer permettra d'évaluer la concentration de la sonde IR en surface des particules. L'intensité théorique du complexe pourra ainsi être déterminée grâce à la droite d'étalonnage ce qui permettra de déterminer le facteur d'exaltation.

Par manque de temps, l'activité de l'anticorps secondaire à la surface des conjugués AuNR@SiO₂-Fpm-IgG et AuNP-FpSSFp-IgG n'a pu être évaluée mais un test immuno-enzymatique ELISA est à l'étude. Il permettra d'évaluer qualitativement la présence d'IgG à la surface des conjugués. Ces conjugués pourront ensuite être envoyés au laboratoire Laurence Berkeley de l'institut de biophysique moléculaire et de bioimagerie intégrative pour la détection par microscopie infrarouge d'un biomarqueur neuronal marqué par un anticorps primaire de souris (Figure 10).

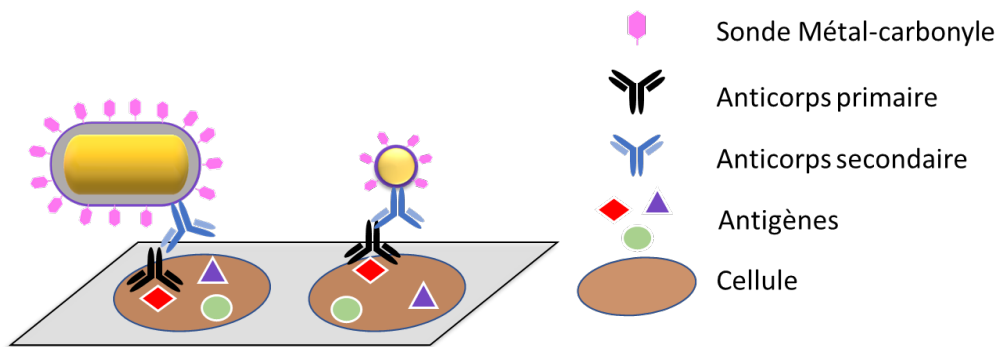


Figure 10 : Illustration schématique de l'immunodétection de biomarqueurs cellulaires par les conjugués AuNPs et AuNRs.

Conclusion du chapitre

Au cours de cette étude préliminaire, un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris et un complexe de transition métal-carbonyle ont été immobilisés à la surface de nanobatonnets d'or enrobés de silice et nanoparticules d'or sphériques. Ces conjugués ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible, Diffusion dynamique de la lumière, zétamétrie et des ratios Fp/particules de 78585 et 674 respectivement pour les AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG et AuNP-FpSSFp-IgG ont été déterminés par infrarouge. Nous avons montré que la coquille de silice en surface des AuNRs permet l'immobilisation d'une quantité importante de sondes infrarouge et la comparaison avec le ratio théorique maximum Fp/particules, calculé à partir de la surface d'une AuNR@SiO₂-MPTMS et d'une densité surfacique en fonctions thiol de 2,4 par nm² suggère un effet SEIRA. Celui-ci pourra être mis en évidence au cours d'expériences complémentaires d'ICP-OES. Nous pensons que les conjugués AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG permettront d'obtenir un signal plus intense en microscopie infrarouge que les conjugués AuNP-FpSSFp-IgG. Après avoir mis en évidence l'aptitude des anticorps à reconnaître leur antigène, ces conjugués seront envoyés au laboratoire Laurence Berkeley de l'institut de biophysique moléculaire et de bioimagerie intégrative où les expériences d'imagerie infrarouge sur des échantillons cellulaires seront réalisées.

Références

- (1) Rudolf, B.; Salmain, M.; Grobelny, J.; Celichowski, G.; Cichomski, M. Preparation of Metallocoarbonyl–Gold–Antibody Bioconjugates for Mid-IR Optical Immunosensing. *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, *734*, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jorgchem.2012.11.017>.
- (2) Storch, W. B. Introduction to the Basic Principles and Techniques of Immunofluorescence. In *Immunofluorescence in Clinical Immunology: A Primer and Atlas*; Storch, W. B., Ed.; Birkhäuser: Basel, **2000**; pp 1–4. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8376-4_1.
- (3) Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* **2014**, *2014* (10), pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>.
- (4) Jeong, Y.; Kook, Y.-M.; Lee, K.; Koh, W.-G. Metal Enhanced Fluorescence (MEF) for Biosensors: General Approaches and a Review of Recent Developments. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *111*, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.007>.
- (5) Geddes, C. D. Metal-Enhanced Fluorescence. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (45), 19537. <https://doi.org/10.1039/c3cp90129g>.
- (6) Li, J.-F.; Li, C.-Y.; Aroca, R. F. Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (13), 3962–3979. <https://doi.org/10.1039/C7CS00169J>.
- (7) Lakowicz, J. R.; Ray, K.; Chowdhury, M.; Szymanski, H.; Fu, Y.; Zhang, J.; Nowaczyk, K. Plasmon-Controlled Fluorescence: A New Paradigm in Fluorescence Spectroscopy. *Analyst* **2008**, *133* (10), 1308–1346. <https://doi.org/10.1039/B802918K>.
- (8) Badshah, M. A.; Koh, N. Y.; Zia, A. W.; Abbas, N.; Zahra, Z.; Saleem, M. W. Recent Developments in Plasmonic Nanostructures for Metal Enhanced Fluorescence-Based Biosensing. *Nanomaterials* **2020**, *10* (9), 1749. <https://doi.org/10.3390/nano10091749>.
- (9) Zhai, Y.; Liu, Q.; Cai, W.; Cao, S.; Li, Y. Metallic Nanofilm Enhanced Fluorescence Cell Imaging: A Study of Distance-Dependent Intensity and Lifetime by Optical Sectioning Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 14, 2760–2768 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.9b11390>.
- (10) Yuan, B.; Jiang, X.; Yao, C.; Bao, M.; Liu, J.; Dou, Y.; Xu, Y.; He, Y.; Yang, K.; Ma, Y. Plasmon-Enhanced Fluorescence Imaging with Silicon-Based Silver Chips for Protein and Nucleic Acid Assay. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *955*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.059>.
- (11) Zhang, J.; Fu, Y.; Liang, D.; Zhao, R.; Lakowicz, J. Enhanced Fluorescence Images for Labeled Cells on Silver Island Films. *Langmuir* **2008**, *24*, 21, 12452–12457 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la801749f>.
- (12) Wang, C.; Tadepalli, S.; Luan, J.; Liu, K.-K.; Morrissey, J. J.; Kharasch, E. D.; Naik, R. R.; Singamaneni, S. Metal–Organic Framework as a Protective Coating for Biodiagnostic Chips. *Advanced Materials* **2017**, *29* (7), 1604433. <https://doi.org/10.1002/adma.201604433>.
- (13) Luan, J.; Seth, A.; Gupta, R.; Wang, Z.; Rathi, P.; Cao, S.; Gholami Derami, H.; Tang, R.; Xu, B.; Achilefu, S.; Morrissey, J. J.; Singamaneni, S. Ultrabright Fluorescent Nanoscale Labels for the Femtomolar Detection of Analytes with Standard Bioassays. *Nature Biomedical Engineering* **2020**, *4* (5), 518–530. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0547-4>.

- (14) Wang, Y.; Zhang, Y.; Schlücker, S. Chapter 17 - Immuno-SERS: From Nanotag Design to Assays and Microscopy. In *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*; Ozaki, Y., Baranska, M., Lednev, I. K., Wood, B. R., Eds.; Academic Press, **2020**; pp 485–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818610-7.00017-7>.
- (15) Lane, L. A.; Qian, X.; Nie, S. SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 10489–10529. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00265>.
- (16) Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M.; Fabris, L. A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors* **2019**, *9* (2), 57. <https://doi.org/10.3390/bios9020057>.
- (17) Laing, S.; Gracie, K.; Faulds, K. Multiplex in Vitro Detection Using SERS. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (7), 1901–1918. <https://doi.org/10.1039/C5CS00644A>.
- (18) Rodriguez-Lorenzo, L.; Fabris, L.; Alvarez-Puebla, R. A. Multiplex Optical Sensing with Surface-Enhanced Raman Scattering: A Critical Review. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *745*, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.003>.
- (19) Cialla, D.; Pollok, S.; Steinbrücker, C.; Weber, K.; Popp, J. SERS-Based Detection of Biomolecules. *Nanophotonics* **2014**, *3* (6), 383–411. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2013-0024>.
- (20) Zhang, W.; Jiang, L.; Piper, J. A.; Wang, Y. SERS Nanotags and Their Applications in Biosensing and Bioimaging. *J. Anal. Test.* **2018**, *2* (1), 26–44. <https://doi.org/10.1007/s41664-018-0053-9>.
- (21) Wang, Z.; Zong, S.; Wu, L.; Zhu, D.; Cui, Y. SERS-Activated Platforms for Immunoassay: Probes, Encoding Methods, and Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 7910–7963. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00027>.
- (22) Wang, Y.; Yan, B.; Chen, L. SERS Tags: Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1391–1428. <https://doi.org/10.1021/cr300120g>.
- (23) Griffiths, P. R.; Misco, E. V. Infrared and Raman Instrumentation for Mapping and Imaging. In *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*; John Wiley & Sons, Ltd, **2014**; pp 1–56. <https://doi.org/10.1002/9783527678136.ch1>.
- (24) Gregas, M. K.; Scaffidi, J. P.; Lauty, B.; Vo-Dinh, T. Surface-Enhanced Raman Scattering Detection and Tracking of Nanoprobes: Enhanced Uptake and Nuclear Targeting in Single Cells. *Appl Spectrosc* **2010**, *64* (8), 858–866. <https://doi.org/10.1366/000370210792081037>.
- (25) Park, H.; Lee, S.; Chen, L.; Lee, E. K.; Shin, S. Y.; Lee, Y. H.; Son, S. W.; Oh, C. H.; Song, J. M.; Kang, S. H.; Choo, J. SERS Imaging of HER2-Overexpressed MCF7 Cells Using Antibody-Conjugated Gold Nanorods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (34), 7444–7449. <https://doi.org/10.1039/B904592A>.
- (26) Yue, J.; Liu, Z.; Cai, X.; Ding, X.; Chen, S.; Tao, K.; Zhao, T. Bull Serum Albumin Coated Au@Agnanorods as SERS Probes for Ultrasensitive Osteosarcoma Cell Detection. *Talanta* **2016**, *150*, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.065>.
- (27) Nima, Z. A.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Mustafa, T.; Watanabe, F.; Nedosekin, D. A.; Juratli, M. A.; Fahmi, T.; Galanzha, E. I.; Nolan, J. P.; Basnakian, A. G.; Zharov, V. P.; Biris, A. S. Circulating Tumor Cell Identification by Functionalized Silver-Gold Nanorods with Multicolor, Super-Enhanced SERS and Photothermal Resonances. *Scientific Reports* **2014**, *4* (1), 4752. <https://doi.org/10.1038/srep04752>.

- (28) Osawa, M.; Ataka, K.-I.; Yoshii, K.; Nishikawa, Y. Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy: The Origin of the Absorption Enhancement and Band Selection Rule in the Infrared Spectra of Molecules Adsorbed on Fine Metal Particles. *Appl. Spectrosc.*, **AS** **1993**, *47* (9), 1497–1502.
- (29) Hartstein, A.; Kirtley, J. R.; Tsang, J. C. Enhancement of the Infrared Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45* (3), 201–204. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.201>.
- (30) Neubrech, F.; Huck, C.; Weber, K.; Pucci, A.; Giessen, H. Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy Using Resonant Nanoantennas. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (7), 5110–5145. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00743>.
- (31) Pucci, A.; Neubrech, F.; Weber, D.; Hong, S.; Toury, T.; Chapelle, M. L. de la. Surface Enhanced Infrared Spectroscopy Using Gold Nanoantennas. *physica status solidi (b)* **2010**, *247* (8), 2071–2074. <https://doi.org/10.1002/pssb.200983933>.
- (32) Yin, H.; Li, N.; Si, Y.; Zhang, H.; Yang, B.; Wang, J. Gold Nanonails for Surface-Enhanced Infrared Absorption. *Nanoscale Horiz.* **2020**, *5* (8), 1200–1212. <https://doi.org/10.1039/D0NH00244E>.
- (33) Li, N.; Yin, H.; Zhuo, X.; Yang, B.; Zhu, X.-M.; Wang, J. Infrared-Responsive Colloidal Silver Nanorods for Surface-Enhanced Infrared Absorption. *Advanced Optical Materials* **2018**, *6* (17), 1800436. <https://doi.org/10.1002/adom.201800436>.
- (34) Repp, S.; Lopez-Lorente, Á. I.; Mizaikoff, B.; Streb, C. Hybrid Gold Nanoparticle–Polyoxovanadate Matrices: A Novel Surface Enhanced Raman/Surface Enhanced Infrared Spectroscopy Substrate. *ACS Omega* **2020**, *5* (39), 25036–25041. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01605>.
- (35) Neuman, T.; Huck, C.; Vogt, J.; Neubrech, F.; Hillenbrand, R.; Aizpurua, J.; Pucci, A. Importance of Plasmonic Scattering for an Optimal Enhancement of Vibrational Absorption in SEIRA with Linear Metallic Antennas. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (47), 26652–26662. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08344>.
- (36) Domenici, F.; Capocéfalo, A.; Brasili, F.; Bedini, A.; Giliberti, C.; Palomba, R.; Silvestri, I.; Scarpa, S.; Morrone, S.; Paradossi, G.; Frogley, M. D.; Cinque, G. Ultrasound Delivery of Surface Enhanced InfraRed Absorption Active Gold-Nanoprobes into Fibroblast Cells: A Biological Study via Synchrotron-Based InfraRed Microanalysis at Single Cell Level. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 11845. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48292-0>.
- (37) Chen, C.-K.; Chang, M.-H.; Wu, H.-T.; Lee, Y.-C.; Yen, T.-J. Enhanced Vibrational Spectroscopy, Intracellular Refractive Indexing for Label-Free Biosensing and Bioimaging by Multiband Plasmonic-Antenna Array. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *60*, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.019>.
- (38) Huth, F.; Govyadinov, A.; Amarie, S.; Nuansing, W.; Keilmann, F.; Hillenbrand, R. Nano-FTIR Absorption Spectroscopy of Molecular Fingerprints at 20 Nm Spatial Resolution. *Nano Lett.* **2012**, *12* (8), 3973–3978. <https://doi.org/10.1021/nl301159v>.
- (39) Wrobel, T. P.; Bhargava, R. Infrared Spectroscopic Imaging Advances as an Analytical Technology for Biomedical Sciences. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (3), 1444–1463. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05330>.

- (40) Clède, S.; Policar, C. Metal–Carbonyl Units for Vibrational and Luminescence Imaging: Towards Multimodality. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21* (3), 942–958. <https://doi.org/10.1002/chem.201404600>.
- (41) Kong, K. V.; Lam, Z.; Goh, W. D.; Leong, W. K.; Olivo, M. Metal Carbonyl–Gold Nanoparticle Conjugates for Live-Cell SERS Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (39), 9796–9799. <https://doi.org/10.1002/anie.201204349>.
- (42) Lin, D.; Lin, Y.-C.; Yang, S.-W.; Zhou, L.; Leong, W. K.; Feng, S.-Y.; Kong, K. V. Organometallic-Constructed Tip-Based Dual Chemical Sensing by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy for Diabetes Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (49), 41902–41908. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b11950>.
- (43) Fischer-Durand, N.; Salmain, M.; Rudolf, B.; Dai, L.; Jugé, L.; Guérineau, V.; Laprèvote, O.; Vessières, A.; Jaouen, G. Site-Specific Conjugation of Metal Carbonyl Dendrimer to Antibody and Its Use as Detection Reagent in Immunoassay. *Analytical Biochemistry* **2010**, *407* (2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.08.027>.
- (44) Fischer-Durand, N.; Salmain, M.; Rudolf, B.; Vessières, A.; Zakrzewski, J.; Jaouen, G. Synthesis of Metal–Carbonyl–Dendrimer–Antibody Immunoconjugates: Towards a New Format for Carbonyl Metallo Immunoassay. *ChemBioChem* **2004**, *5* (4), 519–525. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300800>.
- (45) Hostachy, S.; Policar, C.; Delsuc, N. Re(I) Carbonyl Complexes: Multimodal Platforms for Inorganic Chemical Biology. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *351*, 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.004>.
- (46) Schrage, B. R.; Frisinger, B. R.; Sobek, S. J. S.; Ziegler, C. J. Lipophilic Re(CO)₃pyca Complexes for Mid-IR Imaging Applications. *Dalton Trans.* **2021**, *50* (3), 1069–1075. <https://doi.org/10.1039/D0DT03743E>.
- (47) Rudolf, B.; Salmain, M.; Grobelny, J.; Celichowski, G.; Tomaszewska, E. Synthesis and Characterization of Metallocarbonyl Functionalized Gold Nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *385* (1), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.06.019>.
- (48) Rudolf, B.; Zakrzewski, J. (H⁵-Cyclopentadienyl)Fe(CO)₂-Complex of Maleimide Anion: An Organometallic Carbonyl Probe for Biomolecules Containing HS Groups. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (51), 9611–9612. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(94\)88524-9](https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)88524-9).
- (49) Zhang, L.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Naked Eye Immunosensing of Food Biotoxins Using Gold Nanoparticle–Antibody Bioconjugates. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2* (7), 4150–4158. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00598>.
- (50) Loiseau, A.; Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Mazouzi, Y.; Flack, R.; Liedberg, B.; Boujday, S. Core–Shell Gold/Silver Nanoparticles for Localized Surface Plasmon Resonance-Based Naked-Eye Toxin Biosensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (50), 46462–46471. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14980>.
- (51) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *58* (1), 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>.
- (52) 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).

Matériels et méthodes

Instrumentation

- Spectroscopie UV-Visible

Tous les spectres d'absorption UV-Vis ont été enregistrés sur un spectromètre Cary 50 (Varian, Inc.). Les dispersions colloïdales diluées de AuNPs, AuNRs et AuNR@SiO₂ avant et après fonctionnalisation ont été enregistrés dans la gamme 400 – 1100 nm, avec un pas de 1 nm et à une DO \sim 0,8 au λ_{\max} des différentes suspensions colloïdales. L'eau Milli-Q a été utilisée comme blanc et la position de la bande LSPR longitudinale et ses points d'inflexion ont été déterminés d'après la référence ¹⁰⁷.

- Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et mobilité électrophorétique (potentiel zêta)

Les mesures DLS et de mobilité électrophorétique ont été effectuées en utilisant un appareil Litesizer™ 500 (Anton Paar) équipé d'un laser à 658 nm fonctionnant à 40 mW.

DLS : L'angle de collecte de la lumière diffusée a été réglé à 90 ° et le modèle mathématique utilisé pour l'extraction du diamètre hydrodynamique est le modèle de Cumulants. Les indices de réfraction utilisés, présent par défaut dans l'appareil, sont de 1,33 pour l'eau, 0,20 pour l'or et 1,45 pour la silice. Les analyses des dispersions colloïdales ont été réalisées après sonication à une DO = 0,008 au λ_{\max} des différentes solutions de AuNPs, AuNRs et AuNR@SiO₂ avant et après fonctionnalisation. Les analyses ont été faites dans un tampon phosphate à 5 mM et pH 7,4.

Potentiels zêta : Les analyses ont été faites dans une cuve à tube capillaire en forme de Ω avec un potentiel appliqué de 150 V. L'indice de réfraction de l'eau de 1,33 ainsi que l'approximation de Smoluchowski ont été utilisées. Les analyses des dispersions colloïdales ont été réalisées après sonication à une DO = 0,8 au λ_{\max} des différentes solutions de AuNPs, AuNRs et AuNR@SiO₂ avant et après fonctionnalisation. Les analyses ont été faites dans un tampon phosphate à 5 mM et pH 7,4.

- ICP-OES

La teneur totale en or des particules (AuNRs, AuNR@SiO₂, AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG) a été quantifiée à l'aide d'un spectromètre d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES 5100 SVDV Agilent) de la plateforme ALIPP6, Sorbonne Université, Paris, France. Les 3 échantillons ont été préparés de la manière suivante : à 150 µL de la solution de particules (DO = 0,58) est ajouté 545 µL d'une solution d'eau régale (HCl/HNO₃ ; 2:1 v/v), la solution est agitée 24h puis diluée dans 6 mL d'eau MilliQ. Les solutions sont ensuite diluées 5 fois en fonction du poids initial de l'échantillon par l'ajout d'eau MilliQ acidifiée à 2% d'HNO₃ v/v puis analysées pour obtenir la teneur en or à l'aide du système ICP-OES. Des blancs ont été préparés pour vérifier une possible contamination durant la préparation chimique et durant l'analyse. Une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'étalons mono-élémentaires Au (1001 +/- 3 µg/mL dans 10% HCl, PlasmaCAL), Si (1005 +/- 5 µg/mL dans H₂O et trace HF, PlasmaCAL) et Fe (1003 +/- 3 µg/mL dans 4% HNO₃, PlasmaCAL) dilués dans de l'eau MilliQ acidifiée à 2% d'HNO₃ v/v. Cette gamme va de 0,01052 µg/mL à 0,31311 µg/mL. L'étalon 2 (0,02088 µg/mL) a été utilisé pour vérifier la dérive instrumentale. L'élément or (Au) a été mesuré à partir des raies d'émission à 191,896 nm ; 208,207 nm ; 211,068 nm et 267,594 nm. L'acquisition des données a été effectuée en comptage par seconde (cps) avec trois répétitions pour chaque échantillon. Les données ont été traitées : suppression du bruit de fond (moyenne des blancs) et prise en compte de la dérive instrumentale (interpolation et dérive par rapport aux analyses de l'Etalon 2). Les données sont ensuite converties en µg/mL à l'aide des courbes de calibration pour chaque raie de l'Au analysées. Les données finales correspondent à la moyenne des valeurs des raies d'Au.

- Spectroscopie Infrarouge

Les spectres infrarouges ont été enregistrés avec un spectromètre Tensor 27 (Bruker) équipé d'un support de membrane de 6 mm de diamètre positionné perpendiculairement par rapport au faisceau IR. Les spectres présentés résultent de la somme de 256 balayages enregistrés à une résolution de 4 cm⁻¹ sur une gamme allant de 1800 cm⁻¹ à 2200 cm⁻¹. Une correction de ligne de base linéaire a été réalisé sur le logiciel OPUS.

Réactifs

Le tétrachloroaurate(III) d'hydrogène trihydraté ($\geq 99,99\%$) a été acheté chez Alfa Aesar. Le citrate de sodium dihydraté ($\geq 99\%$), l'acide tannique, le Tris(2-carboxyéthyl) phosphone chlorhydrate ($\geq 98\%$; TCEP), l'ester de m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ($\geq 80\%$; Sulfo MBS), le N-hydroxysuccinimide ($\geq 97\%$; NHS), le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), l'albumine de sérum bovin ($\geq 98\%$, BSA), et l'IgG polyclonal de chèvre anti-IgG de souris ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le complexe métal-carbonyle (η^5 -cyclopentadienyl)Fe(CO)₂(η^1 -N-maleimidato) (Fpm) et son dérivé disulfure Fp-SS-Fp nous ont été fournis par Bogna Rudolf du département de chimie organique de l'Université de Lodz en Pologne. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau purifiée Milli-Q (Millipore) présentant une résistivité de 18,2 M Ω .cm⁻¹.

Protocoles expérimentaux

- Synthèse des AuNR/AuNR@SiO₂/silanisation : se référer aux chapitres II et III
- Synthèse des nanoparticules d'or sphériques (AuNPs)

Les AuNPs sphériques ont été préparées selon la méthode de Slot et Geuze⁵². Deux solutions mères ont d'abord été préparées : la solution A, contenant 1,16 mL de HAuCl₄.3H₂O à 1% (wt) et 79 mL d'eau déionisée et la solution B, contenant 4,5 mL de citrate de sodium à 1% (wt), 0,025 mL d'acide tannique à 1% et 15,5 mL d'eau déionisée. Les solutions A et B sont chauffées à 60 °C puis mélangées sous agitation. Ensuite, le mélange est chauffé à 90 °C, une fois que la solution vire au rouge ; la température est augmentée jusqu'à ébullition et maintenue sous reflux pendant 30 minutes. Enfin, la solution a été refroidie sur un bain de glace et stockée dans un récipient à l'épreuve de la lumière à 4°C jusqu'à utilisation.

- Conjugaison de la sonde Fp-SS-Fp et de l'anticorps aux AuNR@SiO₂-MPTMS

A une solution de AuNR@SiO₂-MPTMS ([23,32 pM] ; DO ~ 0,90 ; $\epsilon = 3,86 \cdot 10^{10}$ M⁻¹.cm⁻¹ ; 2 mL dans le tampon phosphate 5 mM pH 7,4) est ajouté 10 μ L d'une solution de TCEP à une concentration finale de 1 mM afin de rompre les éventuels ponts disulfures formés entre les particules. Après 1h30 d'agitation, les particules sont lavées 2 fois 10 min à 9000 tr/min et redispersées dans le tampon phosphate. Ensuite 10 μ L d'une solution de Sulfo-MBS à 1,33 mM et 30 μ L d'une solution à 44,33 mM de sonde Fpm sont ajoutés au mélange dans un ratio

molaires final Sulfo-MBS/Fpm 1 : 100. Après 1h30 d'agitation la solution est centrifugée deux fois 15 min à 13 000 tr/min, les culots issus de chaque centrifugation sont re-suspendus dans 2 mL de tampon phosphate. Une procédure identique a été utilisée avec les AuNR@SiO₂ afin de vérifier la spécificité du greffage de la sondes Fpm. Les particules sont ensuite traitées par une solution d'anticorps de chèvre anti-souris (concentration finale 11 µg/mL) et agitées à température ambiante pendant 1h. Finalement de la BSA est ajouté à une concentration finale de 0,5 % wt ; après 30 min, la solution est centrifugée deux fois (15 min ; 13 000 tr/min); les culots sont re-suspendus dans un volume final de 2 ml de tampon de stockage (PB 5mM ; pH 7,4 ; BSA 0,25% wt).

3 Conjugaison de la sonde Fp-SS-Fp et de l'anticorps aux AuNPs

Le protocole utilisé est celui publié par Rudolf et al.¹ avec quelques modifications :

A une solution de AuNPs ([1,50 nM] ; DO ~ 0,95 ; 2 mL ; $\epsilon = 6,36 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est ajouté une solution d'acide thioctique (28 µL à 2 mM préparée dans l'EtOH:H₂O 2:8 v/v), le mélange est agité pendant 1h. A l'issue de ce temps, 40 µL de la solution de sonde Fp-SS-Fp à 2 mM sont ajoutés, la solution est agitée pendant 2h avant d'être centrifugée deux fois 15 min à 13 000 tr/min, les culots issus de chaque centrifugation sont re-suspendus dans 2 mL de tampon phosphate (PB) à 5 mM et pH 8. Une procédure identique a été utilisée avec la sonde Fpm afin de vérifier la spécificité du greffage. 15 µL d'une solution d'EDC/NHS à 13,3 mM (mélange 1 : 1 v/v) sont ensuite ajoutés et le mélange est agité pendant 1h à 37 °C avant d'être lavé par deux cycles de centrifugation successif (15 min ; 13 000 tr/min). Les culots sont re-suspendus dans 2 mL de PB (5mM ; pH 8) puis le milieu réactionnel est traité par une solution d'anticorps de chèvre anti-souris (concentration finale 11 µg/mL) et agité à température ambiante pendant 12h. De la BSA est ajouté à une concentration finale de 0,5 % wt, après 30 minutes, la solution est finalement centrifugée deux fois (15 min ; 13 000 tr/min) ; les culots sont re-suspendus dans un volume final de 2 ml de tampon de stockage (PB 5mM ; pH 7,4 ; BSA 0,25% wt).

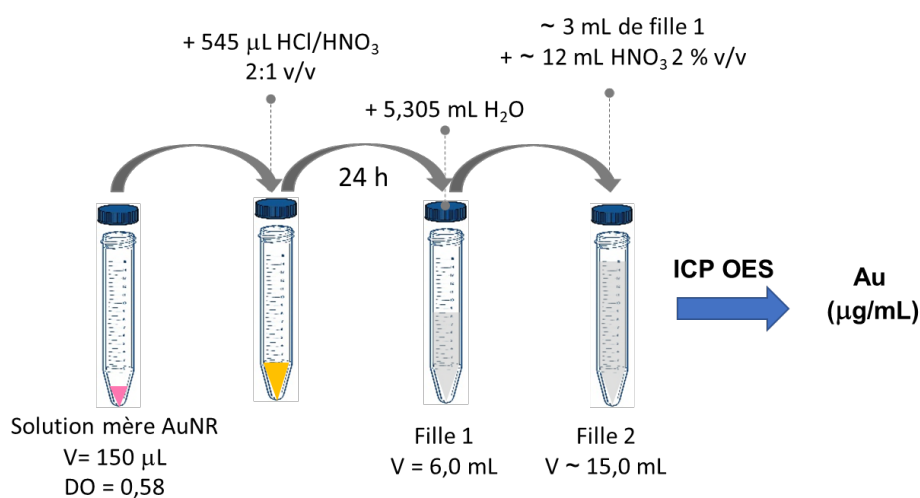
- Quantification de la sonde métal-carbonyle en surface des AuNR@SiO₂ et AuNPs

La courbe d'étalonnage utilisée pour la quantification des en complexe métal-carbonyle a été établie comme suit : des solutions de Fp-maleimide dans la gamme de 0,66-0,05 $\mu\text{mol/mL}$ dans 10 mM de tampon phosphate PB pH 7,2 ont été déposées (4 μL) sur des membranes perforées en nitrocellulose (diamètre 6 mm). Le blanc a été réalisé avec le tampon PB. Les membranes ont été séchées au moins 2h de température ambiante avant l'enregistrement des spectres IR. La courbe d'étalonnage a été construite en traçant l'absorbance à 2052 cm^{-1} par rapport à la concentration des solutions de Fp-maleimide.

La quantification de l'entité Fp à la surface des particules a été effectuée comme suit : les solutions de AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG (DO ~ 0,58), AuNR@SiO₂-Fpm (DO ~ 0,58), AuNP-FpSSFp-IgG (DO~0,98) et AuNP-Fpm (DO~0,98) dans le tampon PB 5mM pH 7,4 ont été concentrées 137 fois dans le cas des AuNR@SiO₂ et 84 fois pour les AuNPs. Puis, deux fois 9 μL ont été déposés sur des membranes de nitrocellulose et séchés à l'air libre. Le blanc a été réalisé avec le tampon PB. Les absorbances à 2047 cm^{-1} ont été utilisées pour calculer la concentration moyenne des entités Fp en utilisant la courbe d'étalonnage établie précédemment.

Annexe

La figure ci-dessous (Annexe Figure 1) présente les étapes suivies lors de la préparation des échantillons analysés par ICP-OES. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) des AuNRs, AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG a été déterminé d'après le dosage de l'élément Au mesuré par ICP-OES de la manière suivante : la concentration massique mesurée par ICP-OES a été convertie en concentration molaire d'après les dilutions consignées dans le tableau ci-dessous (Annexe Tableau 1) et après l'estimation de la masse d'une AuNR ($2,15 \cdot 10^{-15}$ g). Celle-ci a été calculée en multipliant la masse volumique de l'or ($\rho_{\text{Au}} = 1,93 \cdot 10^{-20}$ g/nm³) par le volume d'une AuNR (1114121 nm³) déterminé d'après ses dimensions mesurées par MET ($L \cdot l = 102 \cdot 40$ nm) et en considérant un cylindre et deux demi-sphères. La loi de Beer-Lambert a ensuite permis de déterminer ϵ ; l'absorbance initiale des solutions mère est égale à 0,58, à une longueur d'onde de 719 nm, 717 nm et 746 nm respectivement pour AuNRs, AuNR@SiO₂ et AuNR@SiO₂-MPTMS-Fpm-IgG.



Annexe Figure 1 : Représentation schématique de la préparation des échantillons pour l'analyse ICP-OES.

Annexe Tableau 1 : Analyse élémentaire en Au présent au sein des conjugués et les différents volumes permettant de calculer ϵ

	ICP OES [Au] _{filie2} (µg/L)	V _{filie2} (mL)	[Au] _{filie1} (µg/L)	V _{filie1} prélevé (mL)	[Au] _{mère} (mg/L)	[Au] _{mère} (pM)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
AuNR	98,5	15,149	486,50	3,052	19,46	15,03	$3,86 \cdot 10^{10}$
AuNR@SiO ₂	109,4	15,124	537,90	3,076	21,51	16,60	$3,52 \cdot 10^{10}$
Conjugué AuNR	102,5	15,054	506,90	3,044	20,27	15,70	$3,69 \cdot 10^{10}$

Conclusion générale et perspectives

Les nanobatonnets d'or enrobés d'une coquille de silice sont des nanomatériaux hybrides combinant la stabilité physique et chimique de la silice aux propriétés optiques uniques des nanostructures plasmoniques que sont les nanobatonnets d'or. Ces architectures cœur-coquille ont le potentiel de créer de nouvelles nanoplateformes multifonctionnelles ayant un champ d'applications très varié. Le travail réalisé durant cette thèse a été centré sur le développement d'une nouvelle méthode d'enrobage des AuNRs par une coquille de silice homogène d'épaisseur et de porosité contrôlée pour le développement d'une plateforme de biodétection basée sur les propriétés plasmoniques des AuNRs et destinée à la reconnaissance d'un analyte modèle en solution, l'IgG de lapin.

Tout d'abord, nous avons présenté dans le chapitre 1 une étude de la littérature mettant évidence les stratégies de synthèse existantes pour l'enrobage des AuNRs par une coquille de silice. La relation entre les propriétés morphologiques et structurelles de la coquille de silice pour le développement de biocapteurs ou d'applications thérapeutiques a également été discutée. Pour généraliser leur utilisation, il est essentiel que les AuNRs puissent être produits en quantité suffisante avec des propriétés optiques identiques. Pour satisfaire ces conditions, nous avons proposé dans le chapitre 2, d'augmenter le volume de particules produites en multipliant les synthèses réalisées en parallèle, à partir d'une solution unique de germes et une température homogène. Par la suite, une méthode d'enrobage des AuNRs par la silice a été décrite ; elle se base sur la maîtrise de la cinétique d'hydrolyse et de condensation du précurseur de silice TEOS *via* le contrôle du pH du milieu réactionnel et de l'utilisation du MPTMS comme ligand de surface. L'étude par microscopie électronique à transmission des particules obtenues a mis en évidence trois structures cœur-coquille différentes dépendamment des conditions réactionnelles suivies. A pH 4, le précurseur de silice obéit à une cinétique de condensation lente, conduisant en 17 jours à une coquille de 14 nm d'épaisseur et présentant une porosité singulière orientée parallèlement à la surface des particules. A contrario, lorsque le TEOS est hydrolysé à pH 4 lors d'une première étape et que le pH est ensuite ajusté à 8, le TEOS suit une cinétique de condensation rapide aboutissant en 18h à la formation d'une coquille de silice d'épaisseur contrôlable entre 13 et 21 nm dont la porosité est organisée perpendiculairement à la surface. De cette manière, il a été possible d'obtenir une coquille fine d'épaisseur ajustable entre 2,1 et 5,7 nm en utilisant le MPTMS comme ligand de surface avant hydrolyse et condensation du TEOS. La caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-visible de ces nanostructures AuNR@SiO₂ a mis en évidence le maintien des propriétés optiques du cœur métallique d'or après enrobage. La reproductibilité des synthèses, notamment de l'enrobage des

AuNRs par une coquille fine a été démontrée tout le long de ce manuscrit. Par ailleurs, cette méthode a été employée par un étudiant de master 2 dans le cadre d'un stage de fin d'études au laboratoire, soulignant la robustesse de ce protocole. Si la possibilité de contrôler l'orientation de la porosité de coquille de silice épaisse peut s'avérer être un apport intéressant pour le relargage de molécules thérapeutiques, l'obtention d'une coquille fine est indispensable pour préserver la sensibilité LSPR en raison de la décroissance rapide du champ électromagnétique à proximité des AuNRs.

Par la suite, les AuNR@SiO₂ présentant une coquille de silice de 4 nm d'épaisseur ont été utilisées comme transducteurs pour le développement d'immunocapteurs plasmoniques opérant en solution. Cette approche, décrite dans le chapitre 3 repose sur la sensibilité de la bande plasmon longitudinale au changement d'indice de réfraction dans l'environnement immédiat des AuNRs. Le premier enjeu a été la post-fonctionnalisation des AuNR@SiO₂ par des silanes fonctionnels afin de former des couches denses et reproductibles sans augmenter l'épaisseur de la coquille. L'utilisation de nanoparticules de silice sphériques modèles obtenues par le procédé Stöber, a permis d'optimiser le protocole de silanisation et de déterminer les conditions expérimentales satisfaisant ces conditions. Il s'agit du protocole combinant le chauffage de la solution à 60 °C dans un mélange éthanol/eau (95/5 ; v/v) et un ratio molaire silanes/silanols de surface 100/1. Ainsi, deux silanes différents possédant des fonctions terminales thiol ou aldéhyde ont été greffés. Cette étape a été vérifiée par différentes techniques de caractérisation de surface (zétamétrie, XPS, PM-IRRAS), le dosage des fonctions thiols libres a mis en évidence une couche dense de $2,4 \pm 0,6$ -SH/nm², et un protocole permettant de quantifier la concentration surfacique de fonctions aldéhydes reste encore à mettre au point. L'étape suivante a consisté à conjuguer un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin à la surface des particules par adsorption physique ou par chimisorption. Le greffage covalent, assuré par réaction des fonctions amines des anticorps, a été réalisé soit directement par amination réductrice avec les fonctions aldéhydes de surface, soit en deux étapes sur les particules recouvertes de fonctions thiols par l'intermédiaire d'un agent de couplage hétérobifonctionnel; à noter qu'aucune de ces stratégies ne permet de contrôler l'orientation des molécules d'IgG par rapport à la surface. La détermination du taux de recouvrement en anticorps par dosage fluorimétrique indirect a montré qu'environ 135 ± 48 anticorps se greffent à la surface des particules par physisorption soit deux fois moins que pour les anticorps chimisorbés, respectivement de 238 ± 120 sur les particules présentant des terminaisons thiols et de 262 ± 86 pour les surfaces à terminaisons aldéhydes. Ces résultats suggèrent la formation d'une

couche dense d'anticorps de capture dans le cas de la chimisorption et qu'une partie des anticorps physisorbés en interaction directe avec la surface sont couchés sur les particules. Cependant, les valeurs mesurées apparaissent surestimées par comparaison avec les taux de recouvrement théoriques moyens d'une monocouche d'anticorps : 115 dans le cas de la physisorption, 155 pour particules à terminaisons thiols et 167 pour les terminaisons aldéhydes. Cette surestimation était attendu en raison de la sensibilité intrinsèque de la fluorimétrie aux conditions expérimentales, pouvant induire des incertitudes lors de la mesure. Les trois nanosondes obtenues ont été employées avec succès pour la détection en solution d'IgG de lapin, et l'évolution de la bande LSPR longitudinale après ajout de concentrations croissantes d'antigènes a été suivie un spectromètre UV-visible de laboratoire. Une limite de détection de $5,0 (\pm 1,0)$ ng/mL ($33,3 \pm 6,6$ pM) a été obtenue pour l'ensemble des sondes sur une gamme dynamique de détection allant de 25 à 500 ng/mL. Ces résultats témoignent des bonnes performances analytiques des biocapteurs élaborés. Cependant, l'optimisation de la couche d'anticorps de reconnaissance demeure nécessaire afin d'augmenter la sensibilité LSPR des nanosondes et la gamme dynamique de détection. Par exemple, il est possible de maîtriser l'orientation des anticorps par couplage entre des terminaisons amines en surface des particules et des fonctions aldéhyde issues de l'oxydation sélective la partie oligosaccharidique des anticorps, une meilleure accessibilité des sites de liaison à l'antigène serait alors attendue, conduisant potentiellement à de meilleures performances analytiques. L'utilisation de fragments d'anticorps Fab' au lieu d'IgG entier diminuerait la distance entre la surface plasmonique et l'antigène, conduisant à une meilleure sensibilité LSPR. La diversité des anticorps existants permettrait d'utiliser les stratégies évoquées pour la détection de cibles d'intérêt biologique ou environnemental. Ces tests peuvent également être réalisés à l'aide d'un smartphone équipé d'un spectromètre portatif pour un suivi en temps réel de la réaction de biodétection. L'immobilisation contrôlée des AuNR@SiO₂ sur des surfaces planes représente une des nombreuses perspectives pour accroître la sensibilité de la réponse plasmonique ainsi que pour faciliter le suivi de la réponse colorimétrique par une observation à l'œil nu. Dans le cadre d'une thèse démarrant cette année au LRS, le développement de biocapteurs LSPR intégrant les AuNR@SiO₂ sera poursuivi, plus particulièrement, il s'agira d'étudier la réponse plasmonique de nanoparticules de différentes formes et compositions (AuNR@SiO₂; NP Au@Ag ; NP Ag) immobilisées sur des surfaces en vue de tests de biodétection.

Au-delà des biocapteurs plasmoniques, la mise au point des protocoles d'enrobage des AuNRs par la silice, de silanisation et de biofonctionnalisation sont extrapolables à l'ensemble

des applications nécessitant l'incorporation de bioconjugués. En ce sens, il a été entrepris dans le chapitre 4, la synthèse de bioconjugués AuNR@SiO₂ fonctionnalisés par un anticorps et une sonde moléculaire métal-carbonyle pour la détection *in vitro* de biomarqueurs cellulaires par microscopie infrarouge. La coquille de silice a permis d'une part de faciliter la fonctionnalisation des AuNRs en comparaison aux AuNPs sphériques recouverts par des citrates et d'autre part, la grande surface des AuNR@SiO₂ offre la possibilité d'augmenter la concentration surfacique en sonde métal-carbonyle (ratio sonde/particule 78585 pour AuNR@SiO₂ contre 674 pour AuNP et 8 sondes par anticorps dans le cas d'un marquage direct), ce qui est primordial pour l'obtention d'un signal infrarouge intense détectable par microscopie. Dans le prolongement des résultats obtenus au cours de ce travail, des expériences d'ICP-OES devront être poursuivies pour déterminer la quantité effective de complexes métalliques en surface et ainsi conclure sur l'effet d'exaltation de l'absorption infrarouge de la sonde moléculaire par les nanoparticules. La réalisation d'un test immuno-enzymatique permettra également d'évaluer qualitativement la présence d'anticorps à la surface des conjugués. Ceux-ci pourront ensuite être envoyés à l'institut de biophysique moléculaire et de bioimagerie intégrative à Berkeley aux États-Unis où seront effectuées les expériences d'immunodétection et de visualisation par microscopie à force atomique couplée à la spectroscopie infrarouge par rayonnement synchrotron. Hormis les techniques d'imageries vibrationnelles, il est également envisageable d'exploiter la capacité des AuNR@SiO₂ à diffuser la lumière et à exalter le signal d'un fluorophore à proximité de la surface pour l'imagerie en champ sombre et de fluorescence. La combinaison de ces deux techniques offre potentiellement un outil puissant pour l'identification précise de biomarqueurs cellulaires par imagerie corrélative.

En résumé, les travaux présentés ont montré la capacité des nanobâtonnets d'or enrobés d'une fine coquille de silice à être utilisés comme transducteurs pour la conception de biocapteurs homogènes opérant en solution ; ces nanostructures offrent des perspectives prometteuses pour le développement de futurs outils analytiques. Nous avons aussi mentionné l'intérêt d'une coquille de silice épaisse et poreuse pour le développement de stratégies thérapeutiques associant photothermie et chimiothérapie. Dans le cadre d'un projet de thèse en partenariat entre l'IPCM et le LRS démarré en janvier 2021, la méthode conduisant à l'enrobage des nanobâtonnets par une coquille de silice épaisse et de porosité contrôlée sera appliquée au développement de nanomédicaments. Il s'agira d'encapsuler au sein de la coquille de silice des molécules d'intérêt possédant un centre métallique aux propriétés cytotoxiques, et

d'immobiliser en surface des ligands silane galactose ayant une affinité spécifique pour les cellules cancéreuses hépatiques. Finalement, l'obtention de protocoles robustes d'enrobage par la silice, de silanisation et de conjugaison d'anticorps ouvrent de nouvelles perspectives de recherches touchant les thématiques développées au laboratoire.

Titre : Synthèse et fonctionnalisation de nanobâtonnets d'or enrobés de silice

AuNR@SiO₂ pour des applications aux biointerfaces.

Mots clés : Résonance plasmonique de surface localisée, biocapteurs, nanoparticules d'or, cœur-coquille, sol-gel.

Résumé : Les nanobâtonnets d'or sont des particules plasmoniques présentant des propriétés optiques intéressantes. En particulier, la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) sensible à l'environnement local des particules, permet leur utilisation comme transducteurs de phénomènes d'interactions moléculaires. Cette propriété fait des nanobâtonnets d'or des nanostructures de choix pour la conception de biocapteurs LSPR. Dans cette thèse, nous proposons d'améliorer l'efficacité globale de ces biocapteurs en enrobant ces nanoparticules par une fine coquille de silice. Les conditions de synthèse permettant l'enrobage de nanobâtonnets par une coquille de silice homogène, d'épaisseur et de porosité contrôlée ont été réexaminées et des suspensions stables ont été obtenues tout en préservant les propriétés optiques du cœur d'or. Différentes chimies de surface ont été étudiées permettant l'immobilisation de biorécepteurs IgG, et les nanosondes formées ont permis la détection en solution d'une cible modèle : un IgG de lapin, avec une limite de détection de l'ordre du pM.

La possibilité d'utiliser ces nanostructures cœur-coquille comme agents dopant pour la détection *in vitro* de biomarqueurs cellulaires par microscopie infrarouge est ensuite envisagée. Des résultats préliminaires concernant la caractérisation et fonctionnalisation de ces particules par des biorécepteurs IgG et une sonde moléculaire infrarouge sont présentés.

Title: Synthesis and functionalization of silica coated gold nanorod AuNR@SiO₂ for biointerfaces applications

Keywords: Localized surface plasmon resonance, biosensors, gold nanoparticle, core-shell, sol-gel.

Abstract: Gold nanorods are plasmonic nanoparticles with interesting optical properties. In particular, the localized surface plasmon resonance (LSPR), sensitive to the local environment of the particles, allows their use as transducers of molecular interaction phenomena. This property makes those nanostructures of interest for the design of LSPR biosensors. In this thesis, we propose to improve the overall efficiency of these biosensors by coating these nanoparticles with a thin silica shell. The synthesis conditions allowing the coating of gold nanorods by a homogeneous silica shell of controlled thickness and porosity have been re-examined and stable suspensions have been obtained while preserving the optical properties of the gold core. Different surface chemistries were studied for the immobilization of IgG bioreceptors and the formed nanoprobe allowed the detection in solution of a model target : a rabbit IgG, with a detection limit in the pM range.

The possibility of using these core-shell nanostructures as doping agents for the *in vitro* detection of cellular biomarkers by infrared microscopy is then considered. Preliminary results regarding the characterization and functionalization of these particles by IgG bioreceptors and an infrared molecular probe are presented.