



**HAL**  
open science

# Stratégies d'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique par diffusion Raman exaltée de surface

Antoine Dowek

► **To cite this version:**

Antoine Dowek. Stratégies d'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique par diffusion Raman exaltée de surface. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASF014 . tel-04116115

**HAL Id: tel-04116115**

**<https://theses.hal.science/tel-04116115>**

Submitted on 3 Jun 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.

# Stratégies d'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique par diffusion Raman exaltée de surface

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571, Sciences chimiques : Molécules Matériaux Instrumentation et  
Biosystèmes, 2MIB  
Spécialité de doctorat : Chimie  
Graduate School : Chimie. Référent : faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Lipides : systèmes analytiques et  
biologiques**, Université Paris-Saclay, sous la direction d'**Eric CAUDRON**, MCU-PH, le  
co-encadrement de **Laetitia LÊ**, MCU-PH, et d'**Ali TFAYLI**, PU

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 29 mars 2023, par

**Antoine DOWEK**

### Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Hynd REMITA</b> Docteur, Université Paris-Saclay	Présidente
<b>Igor CHOURPA</b> Professeur, Université de Tours	Rapporteur et examinateur
<b>Catherine PERRIN</b> Professeur, Université de Montpellier	Rapporteur et examinatrice
<b>Eric ZIEMONS</b> Professeur associé, Université de Liège	Examineur

**Titre :** Stratégies d'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique par diffusion Raman exaltée de surface

**Mots clés :** Spectroscopie Raman exaltée de surface, Analyse quantitative, Chimométrie, Médicament

**Résumé :** La spectroscopie Raman est une technique d'analyse rapide, spécifique et non destructive qui permet d'analyser un grand nombre de molécules par la mesure de leurs énergies de vibration. Cependant, la faible proportion de photons diffusés en diffusion Raman (1 sur  $10^8$ ) limite son usage à l'analyse de molécules dont les concentrations sont de l'ordre du  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Afin de s'affranchir de cette limite, ce travail s'intéresse au phénomène de diffusion Raman exaltée de surface (SERS) qui permet une amplification majeure de l'intensité du signal Raman d'une molécule placée à proximité de nanoparticules métalliques (NPs). Cette exaltation a été démontrée depuis de nombreuses années et permet son utilisation pour la détection de molécules à l'état de trace. Le frein actuel au développement de l'utilisation de la SERS est le manque de reproductibilité de l'amplification du signal limitant ainsi les applications quantitatives.

L'objectif de ce travail de thèse est le développement de la SERS en tant que technique analytique spécifique et ultra-sensible pour l'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique, dans le but de déterminer la molécule analysée (analyse discriminante) ainsi que sa concentration (analyse quantitative). Pour répondre à cet objectif, une stratégie d'analyse rationnelle a été développée autour de trois axes : la synthèse reproductible de NPs métalliques sphériques en suspension colloïdale, l'optimisation expérimentale des paramètres d'interaction NPs/analyte et l'optimisation mathématique des données spectrales dans la construction de modèles de prédiction discriminants et quantitatifs adaptés aux données.

La première étude avait pour objectif la construction d'un modèle quantitatif pour le dosage du 5-fluorouracile à partir de NPs d'argent issues de synthèse différentes. Ces différentes synthèses ont conduit à des NPs présentant une variabilité de taille et de forme importante malgré l'optimisation préalable des paramètres de synthèse, soulignant les

difficultés à produire des NPs d'argent de façon reproductible. Les mesures spectrales issues de ces expériences ont toutefois pu être exploitées et ont confirmé la variabilité d'amplification du signal d'une synthèse à l'autre impactant la qualité de la prédiction quantitative. Un outil mathématique, basé sur l'approche des plus proches voisins et la construction d'un modèle de quantification par lot de NPs, a été développé et a grandement amélioré la qualité du modèle de prédiction en réduisant l'erreur relative totale de 16,8 % à 6,3 %.

Face au manque de reproductibilité de la synthèse des NPs d'Ag, les travaux portant sur la noradrénaline et l'adrénaline ont été réalisés à l'aide de NPs d'or en suspension qui ont permis des synthèses plus reproductibles par rapport aux NPs d'argent. L'optimisation expérimentale par plans d'expériences combinée au suivi de l'évolution du signal mesuré au cours du temps a mis en avant l'importance des facteurs : taille des NPs, proportion NPs / analyte et concentration en analyte sur l'amplification de l'intensité du signal et sur l'interaction NPs / analyte. Enfin, dans un dernier travail, la recherche d'un mode d'agrégation innovant médiée par un biopolymère naturel de chitosan a permis de stabiliser dans le temps le signal Raman exalté et d'envisager des mesures de l'adrénaline jusqu'à une concentration de  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans diverses matrices aqueuses.

Au travers de ces différents travaux, les capacités discriminantes de la SERS ont été réaffirmées avec un pourcentage de bien classé de 100 % entre l'adrénaline et la noradrénaline, deux molécules de structure très proche. De plus, des modèles quantitatifs ont pu être développés avec des limites basses de quantification de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  déterminées par la construction de profils d'exactitude, démontrant de ce fait le potentiel de la SERS pour l'analyse quantitative de molécules d'intérêt thérapeutique, ouvrant la voie à de nombreuses applications.

**Title:** Analytical strategies of molecules of therapeutic interest by surface enhanced Raman scattering

**Keywords:** Surface enhanced Raman scattering, Quantitative analysis, Chemometrics, Medicine

**Abstract:** Raman spectroscopy is a rapid, specific and non-destructive analysis technique that enables the analysis of a large number of molecules by measuring their vibrational energies. However, the low proportion of scattered photons in Raman scattering (1 out of  $10^8$ ) limits its use to the analysis of molecules with concentrations in a range of  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . In order to overcome this limitation, this work focuses on the phenomenon of surface exalted Raman scattering (SERS) which allows a major amplification of the intensity of the Raman signal of a molecule placed in the vicinity of metallic nanoparticles (NPs). This enhancement has been demonstrated for many years and allows its use for the detection of trace molecules. The bottleneck to the development of the use of SERS is the lack of reproducibility of the signal amplification thus limiting quantitative applications.

The objective of this thesis is the development of SERS as a specific and ultra-sensitive analytical technique for the analysis of molecules of therapeutic interest, with the aim of determining the analyzed molecule (discriminant analysis) as well as its concentration (quantitative analysis). To meet this goal, a rational analysis strategy has been developed around three axes: the reproducible synthesis of spherical metallic NPs in colloidal suspension, the experimental optimization of the NPs/analyte interaction parameters and the mathematical optimization of the spectral data in the construction of discriminating and quantitative prediction models adapted to the data.

The first study aimed at building a quantitative model for the determination of 5-fluorouracil from silver nanoparticles coming from different syntheses. These different syntheses led to NPs presenting a significant variability in size and shape despite the prior optimization of the synthesis parameters, hence the difficulties to produce silver NPs in a reproducible way.

The spectral measurements resulting from these experiments could however be exploited and confirmed the variability of the signal amplification from one synthesis to another impacting the quality of the quantitative prediction. A mathematical tool, based on the nearest neighbor approach and the construction of a quantification model per NP batch, was developed and greatly improved the quality of the prediction model by reducing the total relative error from 16.8% to 6.3%.

Faced with the lack of reproducibility in Ag NPs synthesis, work on norepinephrine and epinephrine was performed using gold NPs in suspension that allowed more reproducible syntheses compared to silver NPs. The experimental optimization by design of experiments combined with the monitoring of the evolution of the measured signal over time highlighted the importance of the factors: size of the NPs, NPs/analyte ratio and analyte concentration on the amplification of the signal intensity and on the NPs/analyte interaction. Finally, in a last work, the research of an innovative aggregation mode mediated by a natural chitosan biopolymer allowed to stabilize in time the exalted Raman signal and to consider measurements of epinephrine up to a concentration of  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in various aqueous matrices.

Through these works, the discriminative capacities of SERS have been confirmed, with 100% of observations correctly classified between two molecules of very close structures: epinephrine and norepinephrine. Moreover, quantitative models have been developed with low limits of quantification of the order of ten  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  determined by the construction of accuracy profiles, thus demonstrating the potential of SERS for the quantitative analysis of molecules of therapeutic interest opening the way to numerous applications.

## Remerciements

---

Je souhaite remercier ici toutes les personnes qui m'ont encadré, soutenu et accompagné au cours de ces années de thèse ainsi que celles présentes aujourd'hui qui ont accepté de juger ce travail.

Aux Professeurs Catherine Perrin, de l'Université de Montpellier, et Igor Chourpa de l'Université de Tours, merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, merci pour le temps consacré à la lecture et à la critique de ce travail.

Au Docteur Hynd Remita, de l'Université Paris-Saclay, merci de nous avoir ouvert les portes de votre laboratoire et transmis les différents protocoles de synthèse des nanoparticules. Merci d'avoir accepté de juger ce travail en participant à ce jury. Merci également à l'ensemble du laboratoire de l'Institut de Chimie Physique, particulièrement au Professeur Isabelle Lampre.

Au Docteur Eric Ziemons, de l'Université de Liège, merci pour les précieux conseils distillés au cours de ces années et pour le suivi apporté tout au long de ce travail de thèse. C'est un honneur de vous compter parmi ce jury. Merci également aux Docteurs Charlotte De Bleye et Elodie Dumont.

Au Professeur Ali Tfayli, de l'Université Paris-Saclay, merci de m'avoir accompagné dans l'apprentissage des spectroscopies vibrationnelles ainsi que dans l'utilisation du matériel.

Au Docteur Lætitia Lê, difficile de résumer en quelques lignes ce que tu as pu m'apporter tout au long de mon parcours hospitalo-universitaire. Merci pour ton dynamisme, tes conseils, ton soutien et ton accompagnement. Merci d'avoir co-encadré ce travail.

Au Docteur Eric Caudron, un grand merci de m'avoir accompagné dès mes débuts à l'hôpital et à l'université, merci pour ton soutien, tes précieux conseils et de m'avoir judicieusement orienté tout au long de mon parcours. Vous formez, avec Lætitia un excellent binôme, merci pour tout ce que vous m'avez apporté, j'espère continuer encore longtemps travailler avec vous.

Au Professeur Pierre Chaminade, merci de m'avoir toujours accueilli dans votre laboratoire depuis le master 1 et d'avoir soutenu tous mes projets. Merci également à tous les membres du laboratoire « Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques ».

Au Professeur Arlette Baillet, merci d'avoir si vite compris les attentes qui étaient les miennes, merci de m'avoir permis de rencontrer Eric et Lætitia, qui signa le début de cette belle aventure hospitalo-universitaire. Enfin merci pour la gentillesse, l'empathie et la compréhension dont vous avez fait preuve avec moi et tous les étudiants.

Au Professeur Patrice Prognon, merci de m'avoir conseillé et soutenu pendant ces nombreuses années aussi bien à l'Université qu'à l'hôpital. Merci pour l'écoute et l'accueil dont vous avez fait preuves avec moi et l'ensemble des étudiants, des internes ou toutes personnes curieuses venant vous rencontrer.

Au Docteur François-Xavier Legrand, merci d'avoir été présent et réactif pour la caractérisation des nanoparticules. Tu as été d'une grande aide tout au long de ce travail de thèse. Merci pour ton travail et pour tes conseils. Au plaisir de travailler de nouveau avec toi.

Au Professeur Marc Lavielle, merci de nous avoir ouvert les portes du centre de mathématiques appliqués, de nous avoir initié aux statistiques et à l'utilisation du logiciel R. Merci d'avoir accepté de travailler sur cette thématique et de résoudre des problématiques analytiques par des outils mathématiques.

Au Docteur Florent Carn, de l'Université Paris Cité, merci de nous avoir permis de collaborer avec vous durant ce travail de thèse pour une meilleure compréhension des polymères et de leurs interactions avec les nanoparticules. Et au Docteur Florent Voisin, merci pour l'aide apportée à ce travail et le temps passé sur notre thématique de recherche, permettant ainsi de concilier nos travaux de recherches.

Au Docteur Marion Berge, merci pour ton amitié ainsi que ton aide et ton soutien au cours de ce travail de thèse et durant l'internat. Je sais désormais que ce beau sujet va pouvoir continuer avec toi, je te souhaite persévérance et réussite dans ce projet.

Au Docteur Hail Aboudagga, merci pour cette amitié qui a débuté à l'hôpital, merci de m'avoir bien conseillé et orienté durant ces dernières années.

Au Docteur André Rieutord, merci de m'avoir fait si rapidement confiance. Je suis très heureux de cette nouvelle collaboration qui m'a fait bien vite grandir. J'espère une belle réussite pour nos projets à venir. Merci également à toute l'équipe de Gustave Roussy.

A toutes les personnes qui m'ont accompagné durant l'internat, externes, internes, assistants qui ont tant compté pour moi.

Merci à mes amis d'enfance Vincent, Guillaume, Guillaume, Matthieu.

Merci à toute ma famille, qui pensent sans doute que le travail est terminé.

Merci à Cléa de m'avoir accompagné et soutenu au quotidien, merci de m'avoir offert le plus beau des cadeaux.

Merci à Paloma, ma petite fille chérie qui éclaire désormais mon quotidien. Je suis heureux de pouvoir terminer mes études avant que tu ne commences les tiennes. Deux étudiants à la maison ça aurait fait beaucoup.

A tous ceux que j'aurais oublié par écrit mais qui savent compter pour moi, merci.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>12</b>
<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>14</b>
<b>1 GENERALITES.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 PRINCIPES GENERAUX.....</b>	<b>17</b>
1.1.1 LA DIFFUSION RAMAN .....	17
1.1.2 LA DIFFUSION RAMAN EXALTEE DE SURFACE .....	21
<b>1.2 FACTEURS INFLUENTS L'EXALTATION DU SIGNAL RAMAN .....</b>	<b>25</b>
1.2.1 LE SUBSTRAT SERS .....	26
1.2.2 INTERACTION SUBSTRAT SERS / ANALYTE .....	35
<b>1.3 APPORT DES MATHEMATIQUES POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXALTATION ET L'EXPLORATION DES DONNEES SPECTRALES.....</b>	<b>41</b>
1.3.1 OPTIMISATION EXPERIMENTALE DES CONDITIONS D'EXALTATION .....	42
1.3.2 EXPLOITATION MATHEMATIQUE DES DONNEES SPECTRALES .....	43
1.3.3 LE DEFI QUANTITATIF DE LA SERS DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE.....	46
<b>INTRODUCTION A LA PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>49</b>
<b>2 DE LA SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'ARGENT A LA CONSTRUCTION D'UN MODELE QUANTITATIF DU 5-FLUOROURACILE EN SERS .....</b>	<b>51</b>
2.1 CHOIX ET SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'ARGENT.....	52
2.2 OPTIMISATION EXPERIMENTALE.....	54
2.3 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE QUANTITATIF POUR L'ANALYSE SERS DU 5-FLUOROURACILE PRENANT EN COMPTE LA VARIABILITE INTERLOTS DES NANOPARTICULES D'ARGENT.....	60
<b>3 QUANTIFICATION ET ANALYSE DISCRIMINANTE DE L'ADRENALINE ET LA NORADRENALINE EN DIFFUSION RAMAN EXALTEE DE SURFACE .....</b>	<b>87</b>
3.1 OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR L'ANALYSE DE LA NORADRENALINE AVEC DES NANOPARTICULES D'OR .....	87
3.2 CONSTRUCTION DE MODELES MATHEMATIQUES PREDICTIFS ET DISCRIMINANTS POUR L'ANALYSE DE L'ADRENALINE ET DE LA NORADRENALINE AVEC DES NANOPARTICULES D'OR.....	117
<b>4 AGREGATION DE NANOPARTICULE D'OR MEDIEE PAR UN BIOPOLYMERE DE CHITOSAN</b>	

<b>APPLIQUE A L'ANALYSE SERS DE L'ADRENALINE .....</b>	<b>147</b>
<b>5 DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>188</b>
<b>5.1 OPTIMISATION PARAMETRES EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>189</b>
5.1.1 LES NANOPARTICULES SPHERIQUES EN SUSPENSION.....	189
5.1.2 AGREGATION DES NANOPARTICULES SPHERIQUES .....	192
<b>5.2 OPTIMISATION MATHEMATQUES.....</b>	<b>197</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>201</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>203</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Présentation des différents modes de diffusions. $h\nu_0$ : énergie du faisceau de photons incidents, $h\nu_{vibration}$ : énergie de vibration de la liaison.....	18
Figure 2 : Représentation des raies de diffusion Raman en fonction de la fréquence [51], $\omega_0$ : bande Rayleigh, $\omega_0 + \omega_k$ : bande anti-Stokes, $\omega_0 - \omega_k$ : bande Stokes.....	20
Figure 3 : Oscillation des électrons dans la nanoparticule métallique sous l'action de l'onde lumineuse incidente [67].....	22
Figure 4 : Principe de la double exaltation du champ électrique en spectroscopie Raman exaltée de surface [55]. .....	23
Figure 5 : Origine électromagnétique de l'exaltation du champ électrique à la surface des nanoparticules avec deux principaux mécanismes : à gauche, le couplage plasmonique [72] et à droite, l'effet de pointe [73]. Les zones de fortes amplifications du champ sont représentées en rouge.....	24
Figure 6 : Principales valeurs de la partie a) réelle (Re) et b) imaginaire (Im) de la permittivité pour l'argent (Ag), le cuivre (Cu), l'or (Au) et l'aluminium (Al), en fonction de la longueur d'onde incidente [50].....	28
Figure 7 : Longueur d'onde d'excitation des électrons de conduction des principaux métaux utilisés en diffusion Raman exaltée de surface [77]. .....	29
Figure 8 : Origine du phénomène d'effet de pointe. A : cartographie de la norme du champ électrique local $E_{loc}$ (V/m) à proximité d'une particule sphéroïdale de verre (en deux dimensions). Résolution numérique des équations de Maxwell par la méthode des éléments finis (longueur d'onde d'excitation : 500 nm, petit axe : 5 nm, grand axe : 50 nm). B : Champ électrique local $E_{loc}$ (V/m) en fonction de l'éloignement à partir du sommet d'une nanoparticule sphéroïdale [51]. .....	30
Figure 9 : Diversité de taille et de forme des nanoparticules utilisées comme substrats [91]. .....	31
Figure 10 : Évolution, en fonction de la distance $g$ entre les sphères (a), du coefficient d'extinction (b) et du facteur d'exaltation Raman SERS EF (c), pour 2 nanosphères d'or de rayon 25 nm soumises à un champ électrique incident $E_{inc}$ , Le Ru <i>et al.</i> [47]. .....	36
Figure 11 : Images en microscopie électronique en transmission représentant l'évolution de l'état d'agrégation d'une suspension de nanoparticules d'or après l'ajout d'un sel. La barre d'échelle représentée sur chaque image correspond à une longueur de 200 nm [28] .....	38
Figure 12 : Représentation géométrie du domaine d'étude expérimentale à deux facteurs et deux niveaux [111]. Les facteurs sont centrés réduits : niveau haut = +1, niveau bas = -1, moyenne = 0.....	42
Figure 13 : Logigramme récapitulatif de la stratégie expérimentale mise en œuvre au cours des différents travaux. ....	50
Figure 14 : Schéma général de la synthèse de nanoparticules sphériques d'argent selon le procédé de Lee & Meisel ( $Na_3Ci$ : citrate trisodique).....	53
Figure 15 : Spectres UV-visible issus de 5 lots de nanoparticules sphériques d'argent obtenus après optimisation des paramètres de synthèse (vitesse d'agitation = 500 rpm, débit d'ajout du citrate 1% = 2,5 mL.min <sup>-1</sup> , température de chauffage = 180 °C).....	54

Figure 16 : Spectres du 5FU à 1 mg.mL <sup>-1</sup> obtenus en spectroscopie Raman (SR) et en diffusion Raman exaltée de surface (SERS) dans les conditions optimales d'acquisition après correction de la ligne de base.....	55
Figure 17 : Spectres moyens du 5FU des concentrations de la gamme étudiée pendant la phase d'optimisation des conditions expérimentales.....	56
Figure 18 : Évolution de l'intensité de la bande à 786 cm <sup>-1</sup> en fonction de la concentration en 5FU.....	56
Figure 19 : Représentation d'une molécule de citrate à la surface d'une nanoparticule d'argent [145].....	57
Figure 20 : Diagramme de pH pour le citrate en surface des NPs (noté AH <sub>3</sub> , AH <sub>2</sub> <sup>-</sup> , AH <sup>2-</sup> , A <sup>3-</sup> ) et le 5-fluorouracile (HFU/FU <sup>-</sup> ).....	57
Figure 21 : Séquence d'analyse d'un échantillon de 5-fluorouracile en SERS avec un spectromètre Raman portable. Nanoparticules d'argent (AgNPs, volume = 500 µL), 5-fluorouracile (5FU, volume = 100 µL), tampon citrate (0,0125 M, pH = 6, volume = 50 µL).....	59
Figure 22 : Logigramme illustrant la stratégie d'analyse pour la quantification du 5-fluorouracile en SERS à partir de six lots de nanoparticules sphériques d'argent.....	61
Figure 23 : Image en microscopie électronique en transmission (MET) des six lots de nanoparticules d'argent. ....	83
Figure 24 : Diagramme de pH de l'adrénaline et la noradrénaline. ....	89
Figure 25 : Logigramme illustrant la stratégie pour l'optimisation de l'exaltation du signal Raman de la noradrénaline en SERS.....	91
Figure 26 : Synthèses d'AuNPs selon un protocole dérivé de la méthode de Turkevich à ratio constant citrate/or égal à 5. SA : or = 11,2 mg, SB : or = 22,4 mg, SC : or = 44,8 mg.....	112
Figure 27 : Représentation de trois profils caractéristiques de l'évolution de l'intensité du déplacement Raman à 1280 cm <sup>-1</sup> en fonction du temps, caractérisant des profils d'agrégation différents à la concentration 100 µg.mL <sup>-1</sup> . ....	114
Figure 28 : Déroulement des acquisitions en diffusion Raman exaltée de surface pour la construction du jeu de données pour l'analyse de l'adrénaline et la noradrénaline. ....	118
Figure 29 : Stratégie d'analyse pour la discrimination et la quantification d'adrénaline et de la noradrénaline en diffusion Raman exaltée de surface à partir de nanoparticules d'or sphériques en suspension. ....	120
Figure 30 : (A) Représentation des individus dans l'espace des deux premières composantes (Dim1, Dim2) de l'analyse en composante principale (PCA, pour <i>principal component analysis</i> ) pour l'adrénaline (couleur en fonction de la concentration de 10 à 100 µg.mL <sup>-1</sup> ). (B) Cinétique d'évolution de l'intensité du déplacement à 1280 cm <sup>-1</sup> de l'adrénaline à 40 µg.mL <sup>-1</sup> en fonction du temps. Concordance entre l'évolution atypique du signal pour SA1GR2 également caractérisée comme outlier de l'ACP. ....	144
Figure 31 : Stratégie d'analyse de l'adrénaline en SERS à partir de nanoparticules d'or de différentes tailles agrégées par l'intermédiaire d'un polymère de chitosan. ....	150
Figure 32 : Evolution de l'intensité du signal à 1280 cm <sup>-1</sup> jusqu'à 1440 min (24 h) pour	

chacun des niveaux du plan d'expériences : 1 <sup>er</sup> encadré taille des NPs en nm, 2 <sup>ème</sup> encadré concentration en adrénaline en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 3 <sup>ème</sup> encadré volume d'adrénaline en $\mu\text{L}$ .....	185
Figure 33 : Principe de séparation des nanoparticules en fonction de leur taille en fractionnement par couplage flux-force [166].....	191
Figure 34 : Imagerie SERS et visualisation des points chauds [156]. (a) image Rayleigh et SERS d'ABT-DMOP à $5 \times 10^{-7}$ M sans agrégation, la diffusion Rayleigh est bien observée, la SERS est non visible. (b) après ajout de $\text{MgSO}_4$ comme agent d'agrégation, apparition de l'activité SERS.....	192
Figure 35 : Evolution de l'absorbance UV-vis à 785 nm des AuNPs agrégées (ligne en pointillés) et de l'intensité du signal SERS du tiophénol à $1073 \text{ cm}^{-1}$ (ligne pleine) en fonction de la taille des AuNPs [150].....	194
Figure 36: Impact de l'agrégation et de la distance interparticulaire sur le facteur d'exaltation EF et l'intensité du champ moyen $\langle  E_{\text{exc}} ^4 \rangle$ (n agrégats = 30). (a) EF en fonction du type d'agrégat. (b) EF moyen en fonction du type d'agrégat. (c) EF en fonction de la valeur de la résonance plasmon de l'agrégat. (d) Evolution du champ électrique ( $\langle  E_{\text{exc}} ^4 \rangle$ ) en fonction de la distance entre les particules pour un dimère (valeur calculée) [170].....	195

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Capacités prédictives du modèle de régression PLS, représentées par le calcul de la moyenne de l'erreur relative calculée en valeur absolue, en fonction de la concentration et de la synthèse.....	84
Tableau 2 : Capacités prédictives du nouveau modèle développé, représentées par le calcul de la moyenne de l'erreur relative calculée en valeur absolue, en fonction de la concentration et de la synthèse.....	85
Tableau 3 : Récapitulatif des trois conditions de synthèse pour SA, SB et SC dans le but de faire varier la concentration finale en nanoparticules. Dans ces conditions, si la concentration en nanoparticules attendue pour SA est notée $x_1$ , on s'attend pour SB à obtenir $x_2$ et pour SC $x_3$ . Chaque condition est répétée trois fois.....	88
Tableau 4 : Définition du domaine d'étude pour les plans d'expériences trois facteurs, trois niveaux: quantité d'or ( $Q_{Au}$ ) initialement introduite pour la synthèse à ratio quantité d'or / quantité de citrate constant, concentration d'acide chlorhydrique (HCl), ratio volume de la suspension de nanoparticules d'or ( $V_{AuNPs}$ ) / volume de la solution de noradrénaline ( $V_{NOR}$ ).....	89
Tableau 5 : Caractérisation des nanoparticules d'or SA, SB, SC en spectroscopie UV-visible (UV), diffusion dynamique de la lumière (DLS) et en microscopie électronique à transmission (MET), les coefficients de chaque mesure sont indiqués (CV%). .....	113
Tableau 6 : Estimation de la taille des trois lots de nanoparticules d'or (AuNPs) synthétisées par microscopie électronique en transmission (MET), spectroscopie UV-visible (UV-vis), diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les calculs des tailles moyennes sont présentées avec leur intervalle de confiance à 95 % ([ ]) pour la MET et la DLS.....	143

## GLOSSAIRE

<b>5FU</b>	5-Fluorouracile
<b>ACP</b>	Analyse en Composante Principale
<b>ADR</b>	Adrénaline
<b>ALS</b>	<i>Asymmetric Least Square</i>
<b>AgNPs</b>	Nanoparticules d'argent
<b>AuNPs</b>	Nanoparticules d'or
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>CryoMET</b>	Microscopie Électronique en Transmission Cryogénique
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>DLS</b>	<i>Dynamic Light Scattering</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FWHM</b>	<i>Full Width at Half Maximum</i>
<b>ICH</b>	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>IR</b>	Infrarouge
<b>ISO</b>	<i>International Standardization Organisation</i>
<b>LSPR</b>	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
<b>MARE</b>	<i>Mean Absolute Relative Error</i>
<b>MET</b>	Microscopie Électronique en transmission
<b>NOR</b>	Noradrénaline
<b>NPs</b>	Nanoparticules
<b>PLS</b>	<i>Partial Least Square (Regression)</i>
<b>PLS-DA</b>	<i>Partial Least Square – Discriminant Analysis</i>
<b>RMSEP</b>	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
<b>SERS</b>	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>
<b>SR</b>	Spectroscopie Raman
<b>SFSTP</b>	Société Française de Sciences et Techniques Pharmaceutiques
<b>UV-Vis</b>	UltraViolet-visible

## Introduction

---

Les techniques de spectroscopies vibrationnelles, comme la spectroscopie infrarouge (IR) ou la spectroscopie Raman (SR), sont des techniques d'analyse fine de la matière qui mesurent les énergies de vibration et de rotation des molécules et des liaisons moléculaires [1]. Elles permettent d'obtenir une signature spectrale caractéristique de la molécule étudiée qui rend possible sa discrimination, par comparaison à une bibliothèque spectrale. Elles permettent également la détermination de la concentration de l'analyte, par construction préalable d'un modèle de calibration, qui définit la relation mathématique entre tout ou partie du spectre et la concentration de l'analyte. La SR est une technique analytique rapide, non destructive, spécifique qui permet par ses propriétés de focaliser directement le laser au travers d'un contenant. De ce fait, elle a été utilisée dans un contexte hospitalier pour le contrôle de préparations [2–5] directement au travers de leurs conditionnements [6–9]. Si elle a montré des capacités particulièrement intéressantes dans de nombreuses applications [10–16], pour une variété importante de molécules, la sensibilité limitée de la SR, inhérente à la faible proportion de photons diffusés par diffusion Raman [1] reste aujourd'hui une limite de cette technique pour étudier des concentrations en analyte inférieures au milligramme par millilitre. Depuis plusieurs années, en parallèle de l'essor de la connaissance des nanostructures et des nanomatériaux, se développe une technique d'analyse qui permet d'exalter de façon très importante le signal Raman. Cette technique est appelée diffusion Raman exaltée de surface (*SERS, Surface Enhanced Raman Scattering*). La SERS est une technique beaucoup plus sensible que la SR grâce à l'exaltation du signal Raman par l'intermédiaire de nanoparticules (NPs) métalliques encore appelées substrats SERS [17]. Les NPs sont capables d'amplifier très significativement l'intensité du signal Raman en engendrant, à leur surface, des zones de forte exaltation du champ électrique [17], rendant ainsi possible la détection d'analytes à des concentrations très inférieures au milligramme par millilitre.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer la SERS en tant que technique analytique spécifique et sensible pour l'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique, en développant une stratégie d'analyse rationnelle, de la synthèse des NPs, à l'optimisation expérimentale de l'exaltation du signal au développement des modèles mathématiques de prédiction discriminants et quantitatifs afin d'améliorer la reproductibilité du signal exalté. Nous développerons notamment les axes de réduction de la variabilité de l'exaltation du signal Raman qui reste aujourd'hui un frein important au développement de cette technique pour une application quantitative.

Depuis sa découverte dans les années 1970 par Fleischmann [18] et son formalisme expliqué peu après indépendamment par Moskovits [19] et Van Duyne [20], cette technique s'est particulièrement développée dans l'objectif de repousser les limites de détection [21–28], par exemple pour la détection des médicaments dans différents

milieux [27,29,30]. Ces recherches restent cependant réservées aux laboratoires de recherche, dans des conditions déterminées, avec des résultats difficilement reproductibles. Cela s'explique en partie par la très grande diversité des substrats SERS [31] ainsi qu'une très grande hétérogénéité des procédés de synthèse, avec dans la majorité des cas, des protocoles propres à chaque équipe et développés pour une application donnée. Il peut s'agir de NPs de nature métallique différente (argent, or, cuivre, platine ou d'alliages), sur support solide ou en suspension [32] et de multiples formes (sphérique, bâton, fleur, étoile ...). Or, le signal SERS est particulièrement dépendant des caractéristiques physico-chimiques des NPs synthétisées. Par exemple, les NPs anisotropes possèdent une capacité d'exaltation importante comparativement à des NPs sphériques. Les propriétés des NPs dans le cadre d'une utilisation en milieu complexes doivent également être considérées pour assurer une spécificité d'interaction NPs / analyte [31]. Les solutions commerciales actuelles demeurent limitées, avec des coefficients de variation (CV) sur la taille des NPs synthétisées qui peuvent aller jusqu'à 20 % pour des NPs en suspension. Les méthodes de synthèse solide par lithographie [33,34] permettent de synthétiser des NPs de taille et forme plus homogènes mais sont peu abondantes du fait de leur coût, de la vitesse lente de synthèse et du matériel sophistiqué nécessaire pour leur production comme un canon à électrons.

Dans le cadre de ce travail nous avons choisi de synthétiser des NPs sphériques en suspension selon des procédés de synthèse parmi les plus décrits et qui restent encore aujourd'hui, particulièrement utilisées en SERS [32] pour des applications en détection et en quantification [28,35–39]. Cette thématique de recherche était nouvelle pour notre laboratoire, ainsi nous avons pu nous former à la synthèse de NPs sphériques d'or et d'argent en suspension avec l'aide de l'institut de chimie physique (ICP) de l'Université Paris-Saclay. Ces synthèses nécessitent peu de matériels et permettent la synthèse de NPs de tailles variables en jouant sur la quantité des réactifs, la vitesse d'ajout ou encore la température de réaction. De plus, une fois synthétisées, de multiples possibilités subsistent pour modifier leurs propriétés.

Les difficultés de synthèse des NPs ne peuvent expliquer à elles seules les variabilités de l'exaltation observées en SERS. S'agissant d'une exaltation en surface de la NPs, favoriser l'interaction entre les NPs et l'analyte tient également une place prépondérante dans l'analyse en SERS. Cette interaction peut être produite par la génération d'une agrégation [41,42]. L'agrégation induit le rapprochement des NPs ainsi que l'interaction NP / analyte en favorisant les phénomènes d'adsorption de l'analyte à la surface des NPs. L'agrégation peut être médiée de différentes manières, comme par l'ajout d'un sel ou en modifiant les conditions acido-basiques de la suspension ou encore par le greffage d'une molécule ayant une affinité pour les NPs [27,40]. La variabilité du signal SERS est donc multifactorielle et est un frein majeur à son développement, notamment en vue d'une application en quantification, pour la détermination de la concentration de molécules d'intérêt thérapeutique, limitant de fait son utilisation pour des analyses quantitatives performantes [36,43–46].

Notre travail s'articule donc autour de trois axes majeurs d'analyse : la synthèse reproductible de NPs sphériques en suspension, l'optimisation expérimentale des paramètres d'interaction NPs/analyte et la construction de modèles mathématiques adaptées aux données (à partir du signal en SERS).

Après une première partie consacrée à des rappels généraux sur la spectroscopie Raman et aux origines de l'exaltation de l'intensité du signal en SERS, les trois parties suivantes s'appuient sur les différents travaux entrepris dans le cadre de ce travail de thèse et en constituent la partie expérimentale. Les différentes études publiées seront ainsi introduites et interprétées en suivant l'ordre chronologique de notre démarche expérimentale qui s'est affinée au fur et à mesure des résultats obtenus. Dans un premier temps, nous aborderons les difficultés rencontrées pour la production de NPs de taille et de forme homogènes malgré la simplicité apparente des voies de synthèse entreprises, l'impact de la variabilité des NPs au sein de différents lots de synthèse sur les modèles de prédiction de la concentration, ainsi que les moyens mathématiques mis en œuvre pour améliorer ces prédictions. La suite de ce travail sera largement consacrée à l'optimisation des conditions expérimentales, notamment d'agrégation des NPs et son impact sur la reproductibilité et la stabilité du signal, d'abord dans l'eau puis dans différentes matrices aqueuses. Les outils mathématiques utilisés pour la construction des plans d'expériences et des modèles de prédiction seront également détaillés. Enfin, le dernier chapitre sera consacré au bilan et à la discussion de ces différents travaux.

Cette thèse peut donc se lire et se parcourir comme un outil, pour identifier les étapes d'optimisation qui nous paraissent désormais indispensables avant d'entreprendre une étude quantitative en SERS au moyen de NPs sphériques en suspension : caractériser les NPs synthétisées afin d'évaluer leur homogénéité, optimiser les conditions expérimentales d'exaltation par des plans d'expériences en choisissant un mode d'agrégation adapté à la problématique et au milieu d'analyse, caractériser les agrégats formés avec l'analyte dans les conditions de l'analyse, inclure différents lots de synthèse de NPs dans la construction de modèle de prédiction, adapter les modèles mathématiques de prédiction en suivant l'évolution du signal en fonction de la concentration, favoriser une analyse multivariée des données.

La diminution de la variabilité du signal en SERS par l'optimisation expérimentale et mathématique doit permettre son développement pour l'analyse de telles molécules dans différents milieux et constitue une première étape vers une recherche translationnelle. Ce travail s'inscrit dans un projet de démocratisation de la SERS comme technique d'analyse spécifique et quantitative pour l'analyse de molécules thérapeutiques à l'aide d'un spectromètre Raman portable.

# 1 Généralités

---

Dans cette première partie seront détaillés les principes fondamentaux de la SR. Ce préambule apparaît indispensable pour appréhender le fonctionnement de la SERS qui découle directement de l'amplification de l'intensité du signal Raman par l'intermédiaire de nanoparticules métalliques appelées substrats SERS. Il existe une variété très importante de substrats SERS représentés majoritairement par des nanoparticules (NPs). Dans la suite de ce manuscrit, le terme nanoparticule (NP) sera employé pour désigner le substrat SERS. Les phénomènes physicochimiques à l'origine de l'exaltation du signal Raman en SERS seront détaillés afin de dégager les facteurs qui influent le plus sur l'amplification du signal. Nous soulignerons notamment l'importance des NPs (l'influence de leur géométrie, leur taille, leur nature ...) ainsi que l'importance de leur interaction avec les molécules à analyser. Ces différents paramètres seront déterminants pour le phénomène de diffusion Raman exaltée de surface. Cette première partie s'inspire essentiellement des travaux de Le Ru [47], Schatz [48], Hubert [49], Pilot [50] et Le Nader [51].

## 1.1 PRINCIPES GENERAUX

### 1.1.1 La diffusion Raman

La SR fait partie des techniques de spectroscopies optiques vibrationnelles. Elle permet l'analyse de la matière par l'interaction entre un faisceau de photons de même énergie (monochromatique) et la matière analysée. La SR, ou plus exactement le phénomène de diffusion inélastique de la lumière, a été découvert par le physicien indien Sir Chandrashekhara Venkata Râman [52] qui lui valut le prix Nobel de physique en 1930 [53] et indépendamment, par Leonid Mandelstam et Grigory Landsberg [54] en Union Soviétique. En interagissant avec la matière, les photons issus du laser vont être transmis, absorbés ou plus rarement diffusés. La diffusion Raman correspond à des photons diffusés après échange d'énergie avec la matière. Ces échanges correspondent à des modes quantifiés de vibration et de rotation induisant une modification de la répartition des charges au sein de la molécule. Ces niveaux énergétiques très fins, explorés en spectroscopie Raman, permettent une caractérisation détaillée d'un analyte par le spectre Raman ce qui rend cette technique particulièrement spécifique. En vibrant les uns par rapport aux autres sous l'action des photons, les atomes déforment les nuages électroniques formés par les électrons gravitant autour du noyau. La molécule se comporte alors comme un dipôle oscillant ayant la propriété de diffuser des photons dans toutes les directions de l'espace. Une liaison est donc active en Raman si elle est polarisable, c'est-à-dire si les vibrations de

cette liaison induisent un changement du moment dipolaire de la molécule.

Différents modes de diffusion des photons existent comme le rappelle la figure 1.

- > La diffusion Rayleigh, majoritaire (environ  $1/10^4$  photons émis), correspond à la diffusion d'un photon sans modification de son énergie (diffusion élastique).
- > La diffusion Raman, minoritaire (environ  $1/10^8$  photons émis), correspond à la diffusion d'un photon avec modification de son énergie (diffusion inélastique).
  - ◆ Soit le photon cède de l'énergie à la molécule avec laquelle il interagit, c'est la diffusion Raman avec décalage Stokes. Le photon diffusé est moins énergétique que le photon incident.
  - ◆ Soit la molécule cède de l'énergie au photon incident, c'est la diffusion Raman avec décalage anti-Stokes, le photon diffusé est plus énergétique que le photon incident. Ce phénomène est très peu probable car il implique que la molécule soit dans un état excité.

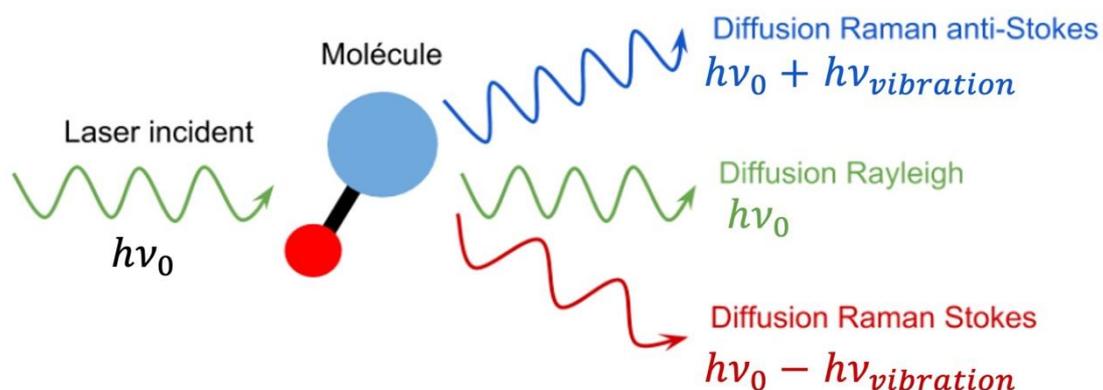


Figure 1 : Présentation des différents modes de diffusions.  $h\nu_0$  : énergie du faisceau de photons incidents,  $h\nu_{vibration}$  : énergie de vibration de la liaison.

Les phénomènes diffusifs peuvent être décrits selon plusieurs approches. La physique classique s'appuie sur les propriétés optiques et électromagnétiques de l'interaction entre lumière et matière. Elle permet de décrire la répartition des charges au sein de la molécule (polarisabilité) ainsi que de prédire les modes de vibration normaux en fréquence en fonction des trois phénomènes de diffusion [51]. Les modes de vibration normaux correspondent aux vibrations internes de la molécule et caractérisent le déplacement des atomes au cours du temps.

Dans le domaine du visible, la longueur d'onde incidente est suffisamment grande en comparaison de la taille de la molécule, pour que le champ électromagnétique de l'onde incidente ( $\vec{E}$ ) soit considéré comme uniforme pour l'ensemble du système (approximation dipolaire). Son équation est représentée ci-dessous (équation 1-1) avec  $\omega_0$  fréquence de l'onde incidente :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad \text{Équation 1-1}$$

Le moment dipolaire induit ( $\vec{p}$ ) représente la modification de répartition des charges sous l'influence du champ externe. Il est directement proportionnel au champ électrique et au tenseur de polarisabilité ( $\vec{\alpha}$ ) (équation 1-2), tenseur d'ordre 2, représenté par une matrice carrée qui reflète la dispersion des charges ou encore la forme du nuage électronique de la molécule. L'équation fondamentale de la diffusion Raman (équation 1-3) dans l'approche classique décrit le moment dipolaire induit et dépend du tenseur de polarisabilité  $\vec{\alpha}$ , du champ électrique  $\vec{E}$ , de l'amplitude de vibration du  $k^{\text{ième}}$  mode à l'équilibre  $Q_{k0}$  et de sa vibration  $\omega_k$ .

$$\vec{p} \approx \vec{\alpha} \cdot \vec{E} \quad \text{Équation 1-2}$$

$$\vec{p} = \vec{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \sum_k \vec{E}_0 Q_{k0} \vec{\alpha}_0' \{ \cos[(\omega_0 - \omega_k)t] + \cos[(\omega_0 + \omega_k)t] \} \quad \text{Équation 1-3}$$

Cette dernière équation permet de comprendre les différents modes normaux de la diffusion Raman, notamment les trois domaines de fréquence de la lumière diffusée. Le premier terme représente la diffusion de Rayleigh, selon laquelle la lumière est diffusée sans changement de fréquence. Le second terme rend compte de la diffusion Raman avec une diminution de la fréquence de la molécule ( $\omega_0 - \omega_k$ , bande Stokes) ou avec une augmentation de la fréquence de la molécule ( $\omega_0 + \omega_k$ , bande anti-Stokes). Elle démontre également la nécessité pour la molécule d'être polarisable, c'est-à-dire que la dérivée du tenseur de polarisabilité ( $\vec{\alpha}_0'$ ) soit non nulle pour qu'un mode soit actif. Les raies de diffusion Raman sont schématiquement représentée sur la figure 2 [51].

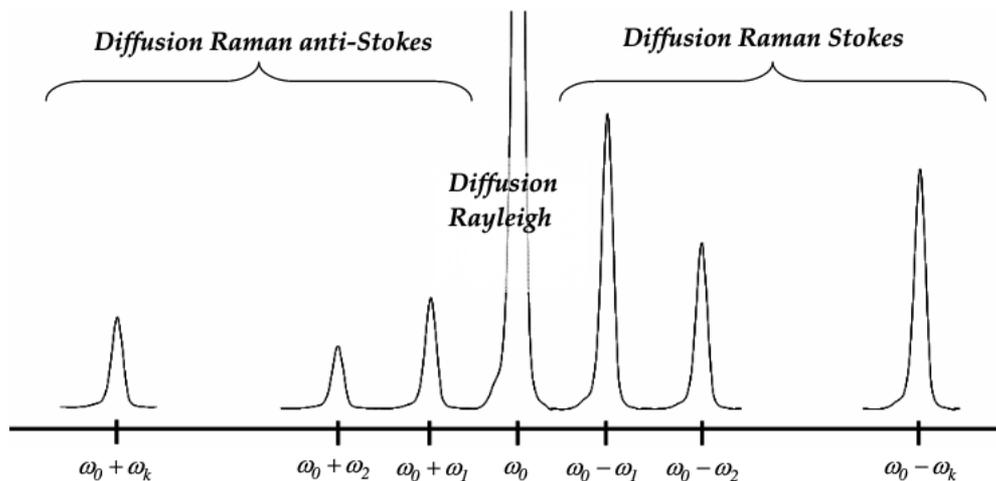


Figure 2 : Représentation des bandes de diffusion Raman en fonction de la fréquence [51],  $\omega_0$  : bande Rayleigh,  $\omega_0 + \omega_k$  : bande anti-Stokes,  $\omega_0 - \omega_k$  : bande Stokes.

Le spectre Raman est la représentation de l'énergie, exprimée en nombre d'onde, des photons issus de la diffusion Raman Stokes soustraite du nombre d'onde correspondant à l'énergie du laser incident. Ainsi, tous les spectres Raman ont la même origine (0) quel que soit la longueur d'onde du laser utilisé et les déplacements mesurés correspondent à la fréquence de la vibration étudiée. Le spectre représente une information spécifique de la structure de la molécule qui constitue sa signature spectrale.

Le nombre de photons Raman mesuré par le détecteur d'un spectromètre est déterminé par l'équation 1-4, où  $P_{Raman}$  est la puissance Raman,  $I$  l'intensité,  $K$  la proportion de photons Raman diffusée par l'échantillon et réellement mesurée par le détecteur,  $N$  le nombre de molécules illuminées par le laser,  $\sigma_k$  la section Raman efficace pour le  $k^{ième}$  mode et correspond à la probabilité d'un photon incident d'être diffusé en diffusion Raman.

$$P_{Raman} = KN\sigma_k I \quad \text{Équation 1-4}$$

En SR, l'intensité du signal est proportionnelle au carré du champ incident [55], une augmentation du champ électrique permet donc une exaltation de l'intensité du signal.

La SR est donc une technique d'analyse de la matière particulièrement intéressante en analyse chimique, puisqu'elle est rapide, non-invasive, non-destructive et spécifique. Elle s'est particulièrement développée dans les laboratoires de recherche, grâce à l'amélioration de la sensibilité des détecteurs, à un coût relativement faible des appareils et à leur miniaturisation qui a permis leur expansion dans de nombreuses disciplines. Par exemple dans le domaine pharmaceutique, la SR a permis la discrimination et la quantification de molécules d'intérêt thérapeutique [2,4,56–60].

Néanmoins sa sensibilité limitée, inhérente à la faible proportion de photons diffusés en diffusion Raman, ne permet pas l'analyse de milieux faiblement concentrés. Cette limite peut être contournée par l'utilisation de NPs métalliques capables d'amplifier de manière considérable le signal Raman d'un analyte. Cette technique est appelée diffusion Raman exaltée de surface (SERS) car il s'agit d'un phénomène d'amplification local du champ électrique à la surface de la structure métallique qui nécessite donc une proximité avec l'analyte pour entraîner une exaltation du signal Raman.

### **1.1.2 La diffusion Raman exaltée de surface**

La SERS permet l'exaltation du signal Raman d'une molécule placée à proximité d'un substrat SERS. Elle fut découverte pour la première fois par Fleischmann [61] qui observa l'amplification du signal Raman de la pyridine au contact d'une électrode d'argent. Cette amplification a d'abord été attribuée à l'augmentation de la surface de contact après plusieurs cycles d'oxydoréduction et donc à la concentration des molécules au niveau de l'électrode. Les équipes de Van Duyne [20] et Creighton [62] ont ensuite décrit l'existence d'un nouveau phénomène d'amplification du signal Raman à la surface de la structure métallique. Ce phénomène a par la suite été détaillé par Moskovits [19,63] comme issu de l'oscillation collective des électrons au sein même des nanostructures métalliques sous l'excitation du laser. A cette composante électromagnétique, Moskovits [63] décrit également une composante chimique qui a été plus récemment détaillée par l'équipe d'Otto [64,65]. Cette composante bien que de contribution moindre, semblerait plus facilement prédictible [66] que celle engendrée par la composante électromagnétique. Dans cette partie, les origines de l'exaltation SERS seront donc présentées en détaillant les phénomènes d'exaltation liés d'une part à la réponse physique du substrat SERS soumis à une onde électromagnétique et d'autre part à l'interaction entre le substrat SERS et l'analyte. Nous présenterons d'abord les principes généraux d'exaltation, puis nous exposerons sur ces bases, les paramètres impactant la réponse en SERS.

#### **COMPOSANTE ELECTROMAGNETIQUE**

La composante électromagnétique est caractérisée par l'interaction entre le champ électrique généré par l'onde électromagnétique du rayonnement lumineux et les électrons libres de conduction de la particule métallique. Sous l'influence du champ électrique incident, les électrons vont osciller librement à la surface de la NP. Cette oscillation, représentée dans la figure 3 [67] est quantifiée et est appelée plasmon [68–70] par analogie avec le photon.

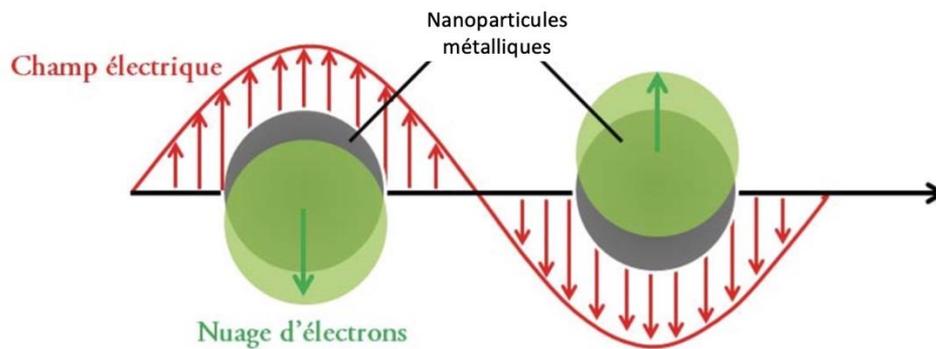


Figure 3 : Oscillation des électrons dans la nanoparticule métallique sous l'action de l'onde lumineuse incidente [67].

Lorsque la taille des NPs métalliques est très inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente, le champ électrique peut être considéré comme uniforme dans l'environnement de la NP. Dans ce cas, tous les électrons oscillent à la même fréquence et se retrouvent confinés à la surface de la NP. Si la fréquence de la source lumineuse excitatrice correspond à la fréquence d'excitation des électrons du métal, alors le plasma d'électrons entre en résonance : c'est le phénomène de résonance plasmon de surface. Ce phénomène génère localement une forte exaltation du champ électrique de départ  $E_0$ . Lorsqu'une molécule se trouve à proximité de la surface de la NP, elle est sous l'influence du nouveau champ noté  $E_{Loc}$  (2). Sous l'effet du rayonnement incident, certains photons vont diffuser par diffusion Raman dans le nouvel environnement. Ces photons Raman peuvent avoir une longueur d'onde  $\lambda_R$  proche de  $\lambda_0$  et interagissent aussi avec la NP. Une seconde amplification du champ se produit alors avec un facteur  $f(\lambda_R)$  qui est le facteur d'amplification du champ  $E_{Loc}$  à la longueur d'onde des photons Raman diffusés  $\lambda_R$  (3). Finalement, le champ  $E_0$  subit une double exaltation comme illustré par la Figure 4 [55]. Les longueurs d'onde  $\lambda_R$  et  $\lambda_0$  étant proches, il est possible de considérer les facteurs d'amplification égaux :  $f(\lambda_0) \approx f(\lambda_R)$ . Au total l'amplification du signal Raman peut être approximée par la puissance quatre [71] de l'amplification du champ électrique. Par conséquent, d'importantes amplifications du signal Raman ont été observées, pouvant aller jusqu'à 10 ordres de grandeur [47] dans certaines conditions spécifiques.

$$E_{Loc} = f(\lambda_0) \cdot E_0 \quad \text{Équation 1-5}$$

$$E_{SERS} = f(\lambda_R) \cdot E_{Loc} \quad \text{Équation 1-6}$$

$$E_{SERS} = f(\lambda_0) \cdot f(\lambda_R) \cdot E_0 \quad \text{Équation 1-7}$$

$$I_{SERS} = f^4(\lambda_0) \cdot I_0$$

Équation 1-8

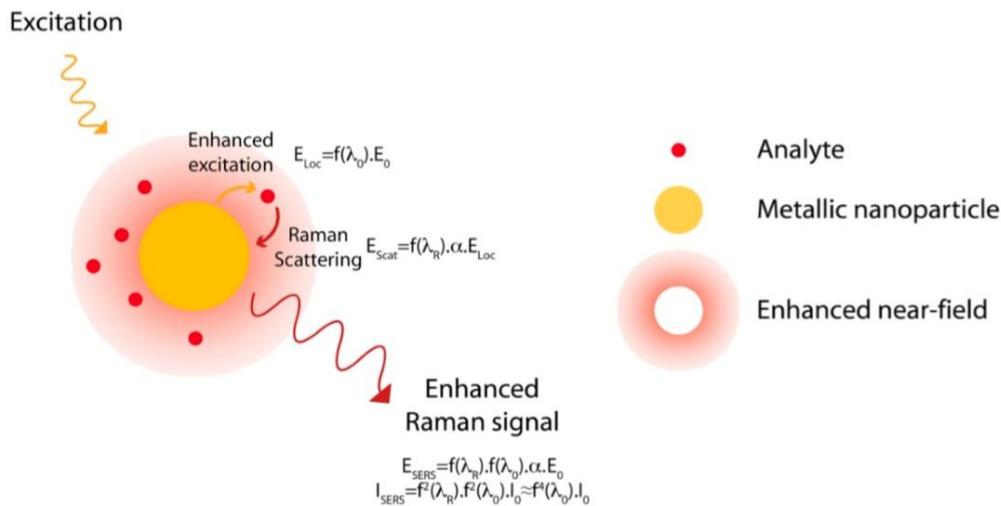


Figure 4 : Principe de la double exaltation du champ électrique en spectroscopie Raman exaltée de surface [55].

L'intensité de l'exaltation électromagnétique dépend principalement du substrat SERS et de son interaction avec la source lumineuse. Les zones de plus forte amplification du signal correspondent aux zones dans lesquelles le champ électrique est le plus intense à proximité des NPs et sont appelées points chauds ou *hot spots* en anglais. Deux phénomènes expliquent l'existence de telles zones comme le montre la figure 5 [72,73] :

- Le couplage plasmonique (Figure 5a) qui correspond au couplage des plasmons de surface. Il se produit lorsque les NPs sont très proches, ce qui a pour effet d'augmenter considérablement l'intensité du champ.
- Les effets de pointe (Figure 5b) qui correspondent à des zones de fortes courbures de la NP où les électrons s'accumulent préférentiellement générant des zones de forte densité électronique.

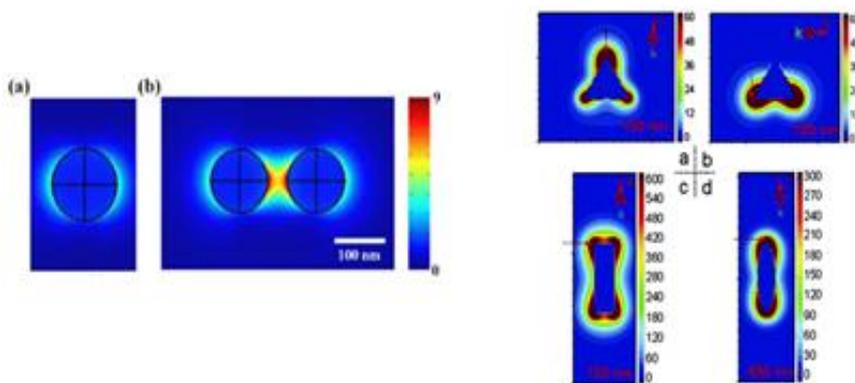


Figure 5 : Origine électromagnétique de l'exaltation du champ électrique à la surface des nanoparticules avec deux principaux mécanismes : à gauche, le couplage plasmonique [72] et à droite, l'effet de pointe [73]. Les zones de fortes amplifications du champ sont représentées en rouge.

L'exaltation du signal sera d'autant plus intense que l'analyte se trouve proche de ces points chauds. L'enjeu est donc double, être en mesure de multiplier les points chauds par couplage plasmonique en générant une agrégation des NPs et/ou par effet de pointe en utilisant des NPs non sphériques, et également d'assurer la présence de l'analyte au niveau de ces zones d'exaltation.

Bien qu'elle représente la majeure partie de l'exaltation en SERS, la composante électromagnétique n'explique pas à elle seule l'importance de l'amplification du signal Raman observé. D'autres théories ont été proposées. Ces phénomènes, d'origine chimique, sont principalement fondés sur les échanges électroniques entre les NPs et les analytes.

#### COMPOSANTE CHIMIQUE

L'exaltation chimique se produit lorsque le substrat SERS et la molécule à analyser sont en interaction. Plusieurs mécanismes ont été décrits [50,64,65] en fonction de l'adsorption des analytes sur les NPs due aux différentes forces d'interaction et de la résultante d'un transfert de charge résonnant ou non résonnant.

Les NPs et les analytes peuvent interagir via des forces physiques de type Van Der Waals (physisorption) ou par la formation de liaisons ioniques ou complexes (chimisorption). Bien que les liaisons chimiques soient davantage propices à induire des modifications dans la structure électronique de la molécule, ces différents types de liaisons peuvent provoquer des changements dans la répartition des charges électroniques de l'analyte et donc dans la forme du nuage électronique conduisant à des modifications des valeurs des déplacements Raman observés et de leur intensité.

La majorité des théories actuelles mettent également en avant un transfert de charge secondaire à l'interaction NP / analyte entraînant une modification de la structure électronique de l'analyte [64,74]. En effet, lorsque les orbitales frontières de l'analyte sont suffisamment proches du niveau de Fermi du métal, un transfert de charge peut se produire créant un nouvel état électronique. Ce nouvel état peut induire un phénomène de résonance avec la source lumineuse [75] induisant ainsi une amplification importante du signal Raman, comme il a été décrit par Lombardi [76]. Ce phénomène est couramment observé avec l'or et l'argent.

Le phénomène d'exaltation chimique se produit lorsque l'interaction NP / analyte induit un remaniement des couches électroniques responsable d'une modification du tenseur de polarisabilité [63] et lorsque les modifications influent sur la section de diffusion Raman efficace. La composante chimique est responsable d'une amplification du signal d'un facteur  $10^2$  environ [77]. L'exaltation chimique reste difficile à individualiser et à caractériser car elle se produit concomitamment avec les phénomènes électromagnétiques beaucoup plus intenses. Certains auteurs ont proposé des théories communes et complètes sur les différents phénomènes d'exaltation en SERS [78,79]. Les avancées sur la compréhension du phénomène d'exaltation en SERS ont notamment permis de développer la SERS comme technique ultrasensible permettant la détection d'une molécule unique [25,80–82] dans un échantillon, avec des facteurs d'exaltation pouvant atteindre  $10^{14}$  ordres de grandeur dans certaines conditions bien contrôlées, avec des molécules de section efficace importante en Raman comme les colorants [83].

Après avoir brièvement décrit les fondements physiques et les origines de l'exaltation observée en SERS du signal Raman, détaillons désormais les principaux paramètres influençant l'analyse en SERS.

## **1.2 FACTEURS INFLUENTS L'EXALTATION DU SIGNAL RAMAN**

La SERS nécessite une étape supplémentaire indispensable par rapport à la SR : la mise en contact de l'analyte avec le substrat SERS. Cette étape, primordiale pour l'analyse SERS, doit favoriser la présence de l'analyte au niveau des zones de forte exaltation du champ électrique que représentent les points chauds et au plus proche des NPs car l'intensité du champ électrique décroît très rapidement à mesure que l'on s'éloigne de la surface des NPs [84]. Elle nécessite de connaître l'affinité de l'analyte pour les NPs ainsi que les propriétés physico-chimiques des NPs, en particulier l'état de charge à leur surface dans les conditions de l'expérience. Au moment de l'acquisition du signal Raman, le milieu réactionnel est composé de la suspension de NPs, de la solution d'analyte et d'un agent d'agrégation. La maîtrise des conditions optimales d'exaltation est à ce jour l'un des défis du développement des applications en SERS. Le nombre, la taille et la forme des NPs, le rapport des volumes de la solution

d'analyte et de la suspension de NPs, le pH final du milieu, la nature et la quantité de l'agent d'agrégation, le temps de contact, l'ordre d'ajout des réactifs, le temps d'acquisition, la longueur d'onde et la puissance des lasers comptent par exemple parmi les paramètres les plus importants à même d'influencer l'exaltation du signal.

En 2008, Le Ru [47] proposaient une description concise des principales caractéristiques de cette technique d'analyse en s'aidant des lettres qui composent l'abréviation SERS :

Surface (S) : la spectroscopie SERS est une spectroscopie de surface, ainsi la molécule à étudier doit se trouver le plus proche possible des NPs. Ce paramètre primordial en SERS implique des interactions entre les NPs et l'analyte indispensable à l'exaltation.

Enhanced (E) : l'amplification observée est majoritairement due à l'amplification du champ électrique à la surface de la NP, secondaire à l'interaction entre le champ électrique de la lumière et la NP métallique. En fonction des propriétés du métal, les longueurs d'onde d'excitation sont différentes, de même en fonction de la taille et de la forme de la particule. Le choix du substrat SERS ainsi que de la longueur d'onde du laser utilisé sont donc également deux paramètres particulièrement importants.

Raman (R) : la SERS n'est que l'exaltation du signal de diffusion Raman. En conséquence, meilleure est la réponse initiale en Raman, meilleure sera l'exaltation. Cette réponse est proportionnelle à la section efficace décrite au chapitre I.1.

La probabilité de diffusion Raman est dans certains cas augmentée lorsque l'énergie apportée correspond à une transition électronique de la molécule provoquant alors une amplification supplémentaire de l'intensité du signal Raman. Ce phénomène est appelé spectroscopie Raman exaltée de surface de résonance ou SERRS en anglais.

Le dernier S peut servir pour *Spectroscopy* ou *Scattering* : pour désigner plus précisément la technique (spectroscopie) ou le phénomène physique (diffusion).

Cette description synthétique de l'effet SERS permet de distinguer les points clés à maîtriser et à optimiser : la synthèse et le choix des NPs ainsi que leur interaction avec l'analyte.

### **1.2.1 Le substrat SERS**

L'un des paramètres les plus importants en SERS est le substrat SERS. Cette partie est consacrée à la description des propriétés physico-chimiques des NPs qui influent sur l'amplification du signal Raman et constituent de ce fait les principaux paramètres à optimiser : nature du métal, taille, forme, milieu, procédé de synthèse pour obtenir une exaltation SERS intense et reproductible.

## NATURE METALLIQUE

L'origine métallique des NPs s'explique car les métaux contiennent de nombreux électrons capables de se déplacer librement sous l'action d'un champ électrique ; le réseau cationique de la NP métallique étant considéré comme fixe. La propriété des électrons à se déplacer sous l'effet d'un champ électromagnétique externe et soumis à une force de rappel du réseau cationique est à l'origine de l'oscillation quantifiée des électrons sous la forme de plasmon. La physique classique permet de définir et de prévoir la réponse de particules métalliques absorbant un faisceau de photons incident. Cette réponse dépend des propriétés optiques des métaux.

La permittivité, appelée également fonction diélectrique  $\varepsilon(\omega)$  permet de modéliser la réponse de la matière soumise à un champ électrique. Elle caractérise le métal et est composée, selon le modèle de Drude, d'une partie réelle  $\varepsilon'(\omega)$ , qui représente la force de la polarisation induite par le champ électrique externe, et d'une partie imaginaire  $\varepsilon''(\omega)$ , qui reflète les pertes rencontrées lors du déplacement des charges [85] (équation 1-9). Pour un métal, les pertes peuvent être importantes pour des longueurs d'onde ayant des valeurs dans le visible, correspondant à la majorité des lasers utilisés en spectroscopie Raman. Elles sont dues aux interactions avec les particules rencontrées par les électrons durant leur parcours. Il s'agit essentiellement d'interactions électrons / électrons ou électrons / photons, ainsi que de phénomènes diffusifs dus aux défauts du réseau cationique.

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) + i\varepsilon''(\omega) \quad \text{Équation 1-9}$$

Pour une NP sphérique de petit diamètre, les sections efficaces d'absorption ( $\sigma_{Abs}$ ) et de diffusion ( $\sigma_{Dif}$ ) ainsi que le champ électrique interne à la NP ( $E_{int}$ ), peuvent être calculées [86] selon les équation 1-10, Équation 1-11, équation 1-12 où  $k$  est le vecteur d'onde,  $a$  le rayon de la NP et  $\varepsilon_m$  la permittivité du milieu considéré comme non absorbant.

$$\sigma_{Abs}(\omega) = 4\pi k a^3 \text{Im} \left[ \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \right] \quad \text{Équation 1-10}$$

$$\sigma_{Dif}(\omega) = \frac{8\pi}{3} k^4 a^6 \left| \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \right|^2 \quad \text{Équation 1-11}$$

$$E_{int} = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} E_0 \quad \text{Équation 1-12}$$

Selon ces équations, le champ interne dans la NP, les sections efficaces d'absorption et de diffusion sont maximales lorsque le terme  $\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)$  est minimal (pour  $\varepsilon'(\omega) = -2\varepsilon_m(\omega)$ ), ce qui définit la condition de résonance pour les électrons du métal. Dans ces conditions, la valeur du dénominateur devient égale à la fonction diélectrique imaginaire du métal. Les travaux de Palik [87] et Johnson [88] définissent les principales valeurs de la permittivité pour les métaux, respectivement des parties imaginaires et réelles de cette constante, permettant ainsi de définir pour une longueur d'onde donnée les métaux candidats à la meilleure exaltation en SERS. Les métaux nobles possèdent majoritairement des valeurs d' $\varepsilon'(\omega) < 0$  et sont donc de bons candidats à leur utilisation en SERS comme explicité sur la figure 6 [50].

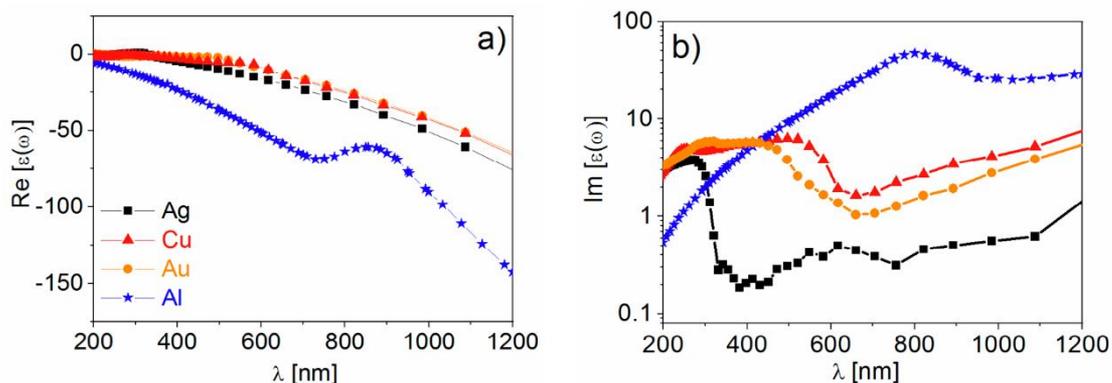


Figure 6 : Principales valeurs de la partie a) réelle (Re) et b) imaginaire (Im) de la permittivité pour l'argent (Ag), le cuivre (Cu), l'or (Au) et l'aluminium (Al), en fonction de la longueur d'onde incidente [50].

Le choix du métal permet donc de s'adapter à la longueur d'onde du laser utilisé. Typiquement les lasers utilisés en SR ont des longueurs d'onde comprises entre 500 et 1100 nm (du visible au proche infrarouge). Les principaux métaux répondant à ce critère sont l'or, l'argent et le cuivre (figure 7) expliquant leur utilisation fréquente en SERS. Ces travaux démontrent également que l'argent a le pouvoir d'exaltation le plus important [85] car sa fonction diélectrique complexe est inférieure à celle des autres métaux. Il est nécessaire de prendre également en compte la stabilité de tels métaux. Par exemple l'argent et le cuivre s'oxydent facilement tandis que l'or est très stable chimiquement. D'autres critères doivent également être pris en compte pour leur utilisation future, comme leur biocompatibilité.

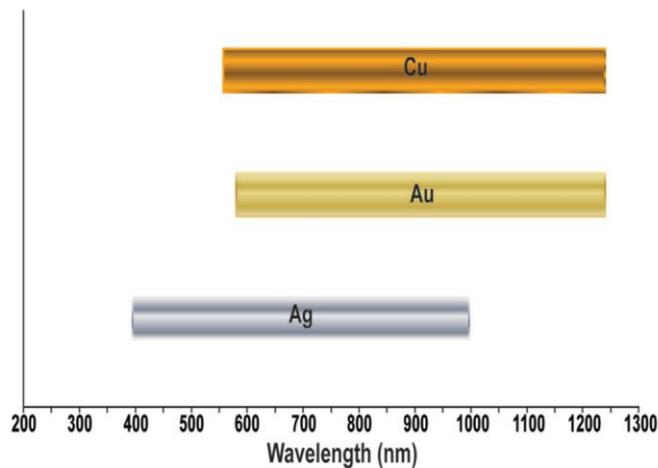


Figure 7 : Longueur d'onde d'excitation des électrons de conduction des principaux métaux utilisés en diffusion Raman exaltée de surface [77].

Les propriétés de conduction des électrons soumis à un champ électrique externe ne permettent pas à elles seules de choisir la nature du métal à utiliser pour une expérience SERS. D'autres facteurs influent également sur l'exaltation du signal, particulièrement la taille et la forme des NPs ainsi que leurs interactions entre elles. En effet, l'exaltation du signal Raman en SERS est fortement dépendante des points chauds dans lesquels l'exaltation du champ électrique est maximale.

### **GEOMETRIE (TAILLE ET FORME)**

L'exaltation électromagnétique est donc dépendante de la nature du métal utilisé mais également de la taille et de la géométrie [89] des NPs. En effet, sous l'effet du champ électromagnétique externe, les électrons des NPs se concentrent préférentiellement dans certaines zones (figure 8 A). Pour des NPs isotropes, sphériques par exemple, les électrons se répartissent uniformément. Pour des structures plus complexes, anisotropes, les électrons se concentrent préférentiellement dans les zones de fort rayon de courbure comme les pointes d'un triangle ou les extrémités d'une ellipse ou d'un bâtonnet. Les phénomènes d'effet de pointe exaltent le champ à la surface des NPs, très localement. Par exemple pour une structure ellipsoïdale (50 nm de grand axe, 5 nm de petit axe, figure 8 A [51]), la valeur du champ calculé à 1 nm de la surface d'une sphère métallique est 5 fois moins grande que celle mesurée à sa surface [51]. Cette valeur a également été déterminé par l'équipe de Massango [90] qui a estimé que la perte d'exaltation était de 80 % à 1 nm de distance de la surface d'une monocouche de nanoparticules d'argent.

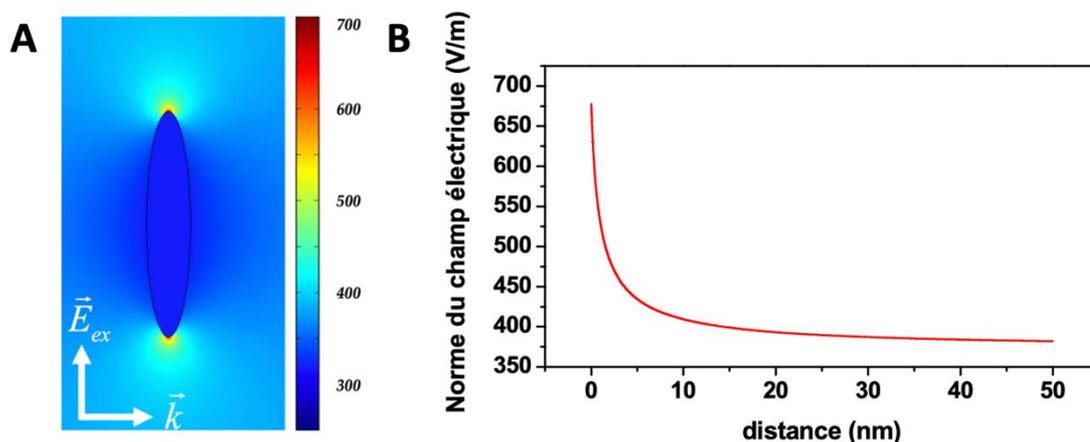


Figure 8 : Origine du phénomène d'effet de pointe. A : cartographie de la norme du champ électrique local Eloc (V/m) à proximité d'une particule ellipsoïdale de verre (en deux dimensions). Résolution numérique des équations de Maxwell par la méthode des éléments finis (longueur d'onde d'excitation : 500 nm, petit axe : 5 nm, grand axe : 50 nm). B : Champ électrique local Eloc (V/m) en fonction de l'éloignement à partir du sommet d'une nanoparticule sphéroïdale [51].

Pour optimiser l'exaltation il est possible d'adapter la longueur d'onde du laser utilisé à la nature du métal et à la géométrie des NPs. Pour des NPs sphériques, il existe un seul mode de résonance, alors que pour des NPs de forme allongée comme des nanobâtons, il existe deux modes de résonance avec un mode transversal et un mode longitudinal de plus grande longueur d'onde d'excitation. Les NPs de formes plus complexes (*i.e.* nanoétoiles, nanooursins, nanoétoiles ...), favorisent les phénomènes d'effet de pointe grâce à la génération de nombreuses zones d'accumulation d'électrons, qui permettent une exaltation supplémentaire. En pratique, pour des NPs en suspension colloïdale la mesure n'est jamais réalisée sur des NPs isolées mais sur des agrégats ou sur des structures de NPs suffisamment complexes pour générer des points chauds par couplage plasmonique au sein de leur structure, comme entre les pétales d'une nanofleur ou les branches d'une nanoétoile.

L'amplitude du champ dépend de la direction du champ électrique par rapport à la NP. Pour un effet optimal, celui-ci doit être parallèle à l'axe de plus grande symétrie du substrat SERS. Pour des NPs en suspension, il est impossible de prévoir les directions des interactions entre le champ électrique et les NPs, d'une part car les NPs sont en mouvement dans la suspension et d'autre part car une double exaltation est observée, issue de la radiation des photons diffusés par diffusion Raman, qui se distribuent dans toutes les directions de l'espace.

Si les protocoles de synthèse de NPs de géométries anisotropes comme les nanoétoiles, nanooursins ou nanofleurs, restent plus complexes et peu efficaces, ces NPs présentent l'avantage de pouvoir s'affranchir de l'étape d'agrégation. Pour des

NPs plus structurées, synthétisées par lithographie sur support solide, la direction du champ incident devra être prise en compte. Plusieurs exemples représentant la diversité de formes des NPs retrouvées dans la littérature sont illustrés sur la figure 9.

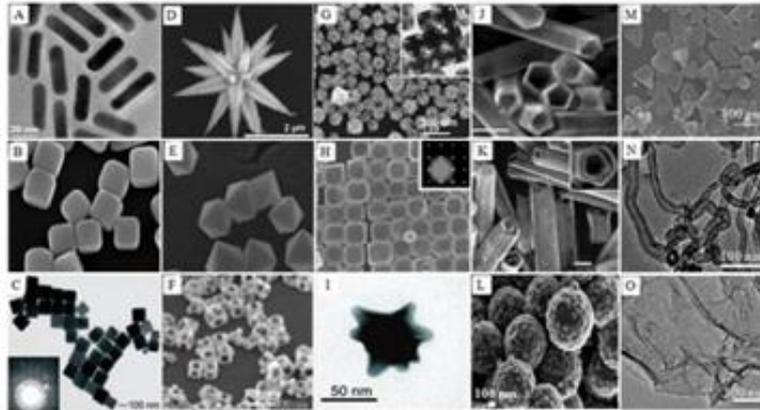


Figure 9 : Diversité de taille et de forme des nanoparticules utilisées comme substrats [91].

Les effets de pointe ne sont pas les seuls effets à entraîner des points chauds, l'interaction et le rapprochement des NPs entres-elles et intraparticulaire permet également l'exaltation intense du champ par couplage plasmonique.

## LES DIFFERENTS TYPES DE SYNTHESSES

### **PROCEDES DE SYNTHESSES**

De nombreux procédés de synthèse [92] existent et permettent de produire une grande diversité de NPs. Deux voies principales de production de NPs peuvent être distinguées :

- la voie descendante (*top down*): elle consiste à produire des NPs à partir d'éléments de plus grande taille, principalement par réduction d'un métal massif à l'état nanoparticulaire. Ce sont des méthodes physiques basées sur le principe de la gravure. Ces techniques sont énergivores, produisent la plupart du temps des NPs isolées et nues qui nécessitent un changement de milieu ainsi qu'une enveloppe de protection. Ces techniques ont un coût important et nécessitent de produire les NPs dans des environnements à faible empoussièremment.
- la voie ascendante (*bottom up*): elle consiste à produire des NPs à partir d'éléments de plus petite taille. Il s'agit, dans ce cas, de construire les NPs à partir de briques élémentaires que constituent les atomes métalliques. Ce sont généralement des méthodes chimiques, basées sur la réduction d'un sel métallique en solution. Celui-ci est dans un premier temps réduit sous forme d'atomes de métal à un degré d'oxydation nul, qui s'agglomèrent pour

constituer des noyaux (aussi appelé germe), c'est la phase de nucléation. La deuxième étape est la phase de croissance durant laquelle les NPs se développent à partir des noyaux préalablement formés. En parallèles les cristaux se stabilisent au fur et à mesure permettant d'obtenir une suspension de NPs stable. Dans certaines conditions de réduction qui produisent des NPs nues, une étape de de stabilisation appelée post-habillage est nécessaire pour éviter l'agrégation des NPs entre elles et leur précipitation. Cette stabilisation est possible grâce à des forces de répulsion entres les NPs. Il peut s'agir soit de forces de répulsion électrostatique liées à la présence de charges en surface, soit de forces de répulsion stérique par la présence de molécules volumineuses, généralement à longues chaînes carbonées à la surface des NPs. D'autres techniques sont également retrouvées comme la lithographie avec notamment l'utilisation de canons à électrons assurant une grande précision [93]. Aujourd'hui, des techniques issues de la nano-impression [94], moins onéreuses et plus simples à mettre en place tendent à se développer.

Au-delà des caractéristiques propres aux NPs, il est important de considérer le milieu dans lequel elles sont présentes. Les méthodes physiques peuvent être réalisées sur des supports solides ou en solution. Les méthodes chimiques génèrent souvent des NPs en milieu liquide sous forme de suspensions colloïdales. Ces suspensions peuvent être secondairement incorporées dans des supports solides comme des gels ou déposées sur des surfaces structurées. Malgré le choix important de NPs, les plus décrites sont les NPs de métaux nobles en suspension (substrats colloïdaux), des substrats déposés sur supports solides et des substrats combinant plusieurs types de NPs (de différentes natures métalliques par exemple) appelés substrats composites. Les NPs à base d'argent ont un plus fort pouvoir d'exaltation tandis que ceux à base d'or sont plus stables. L'association de NPs d'argent et d'or dans une même NP permet de créer des dimères Au/Ag où l'Au va protéger l'Ag de l'oxydation, ce qui permet de rendre l'ensemble plus stable et plus performant.

Dans cette partie, la diversité de NPs utilisables en SERS et leurs différents procédés de fabrication ont été évoqués. Les techniques de synthèse permettant d'obtenir des NPs de taille et de forme plus contrôlés, comme la lithographie, imposent de travailler en zone à atmosphère contrôlée, ont un coût élevé, un rendement faible et demandent du temps pour synthétiser les NPs. Les techniques de synthèse en suspension sont moins onéreuses et permettent de synthétiser rapidement de plus grandes quantités de NPs qui peuvent ensuite être incorporées dans différentes structures ou être utilisées telles quelles. Chacun des procédés de synthèse présente des avantages et des inconvénients. Malgré des techniques de synthèse plus avancées, les synthèses de NPs sphériques en suspension restent les plus utilisées. Cette observation s'explique par l'accès relativement simple, nécessitant peu de matériel et

de moindre coût. Les avantages sont la modularité de la synthèse par le contrôle possible de la taille et de la forme des NPs ou encore par la fonctionnalisation des NPs pour changer leurs propriétés physico-chimiques. De plus, le contrôle des conditions expérimentales permet de moduler les interactions NPs / analyte. Ce constat nous a conduit à travailler à la synthèse de NPs sphériques en suspension d'argent ou d'or dont nous allons détailler la synthèse et les outils pour caractériser les NPs ainsi produites dans la prochaine partie.

### **CAS DES SUSPENSIONS NANOCOLLOÏDALES D'OR ET D'ARGENT**

Les synthèses de nanosuspensions colloïdales font partie des techniques de synthèse *bottom up* et s'appuient sur le même principe : la réduction d'un sel métallique par un agent réducteur. Dans les différents procédés de synthèse existants, l'équilibre doit être trouvé entre la quantité de métal de départ et le pouvoir de l'agent réducteur afin de permettre la formation des germes qui fixeront le nombre de particules dans la suspension ainsi que leur croissance et donc leur taille. Le pouvoir réducteur peut s'ajuster de différentes manières : par la quantité relative d'agent réducteur par rapport au métal, par le choix du réducteur, par la température de la réaction ou tout autre apport d'énergie à la suspension dans les premiers instants de la réaction. Les procédés les plus utilisés sont ceux de Turkevich [95] pour la synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs) et de Lee & Meisel [96] pour la synthèse des nanoparticules d'argent (AgNPs). Ces procédés utilisent le principe de la réduction d'un sel métallique en utilisant le citrate comme agent réducteur. Le citrate est un réducteur doux qui nécessite d'être chauffé pour initier la réduction de l'or ou de l'argent à l'état 0. Le citrate a également un pouvoir stabilisant en recouvrant en surface les NPs formées de charges négatives, la suspension est ainsi stabilisée grâce aux forces de répulsions électrostatiques.

Plus tard, différents travaux ont permis d'améliorer et de contrôler davantage ces procédés. L'équipe de Frens [97] propose de contrôler la taille des NPs en modifiant le ratio or/citrate. De la même façon, les études de Lee & Meisel ont été reprises par Leopold & Lendl [98] qui utilisent l'hydroxylamine comme réducteur. Ce dernier est capable de réduire l'argent à température ambiante. Dans cette expérience, le pH est fixé par l'ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH) et la taille des AgNPs varie en fonction de l'ordre d'ajout et de la vitesse d'ajout des réactifs. Dans la très grande majorité des travaux en SERS utilisant des NPs d'or ou d'argent en suspension, les synthèses proposées sont directement inspirées de ces procédés de synthèses. Chaque équipe fixe ensuite les volumes, la température de chauffage, la vitesse d'agitation de façon plus ou moins arbitraire et explicite. Ces paramètres jouent pourtant un rôle majeur sur la capacité à produire des NPs de taille et de forme homogène et reproductible.

Dans nos travaux, nous avons d'abord travaillé à maîtriser la synthèse d'AgNPs car les NPs d'argent ont le pouvoir d'amplification du champ électrique théoriquement

le plus important par rapport au cuivre et à l'or. Les résultats détaillés dans les différents articles présentent les paramètres préalablement optimisés, notamment la vitesse d'ajout du réducteur, la vitesse d'ajout du mélange, la température et le temps de chauffage. Durant nos études, nous avons ensuite synthétisé des NPs d'or (AuNPs) de différentes tailles. D'abord en utilisant la méthode de Turkevich [95], puis la méthode de Bastus [99] qui permet de synthétiser des AuNPs de tailles croissantes par synthèses successives.

Les NPs ainsi synthétisées ont été caractérisées pour estimer leur forme, leur taille et leur homogénéité. Les techniques de caractérisations les plus utilisées sont la microscopie électronique en transmission (MET), la spectroscopie dans le domaine du visible et de l'ultraviolet (UV-visible) et la diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering* ou DLS).

La MET permet d'observer directement les NPs synthétisées. L'image en MET est obtenue grâce à la mesure par une caméra CCD (*charge coupled device*) d'électrons émis par un canon à électrons, puis focalisés par l'intermédiaire de lentilles électromagnétiques sur l'échantillon. Dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Laboratoire : matière et systèmes complexe (UMR 7057) de l'Université de Paris Cité avec le doctorant Florent Voisin, nous avons utilisé la technique de microscopie électronique en transmission sous milieu cryogénique (cryoMET). L'intérêt de cette imagerie et de pouvoir préserver la structure de départ de l'échantillon à analyser en le gelant rapidement dans de l'éthane liquide, ce qui permet de la figer dans son état natif et d'obtenir la formation d'une glace amorphe et non cristalline. Ces techniques, bien que donnant une image représentant les NPs, ne rendent compte que d'un très faible échantillonnage de la suspension. La DLS et l'UV-visible permettent d'analyser des volumes plus importants et de rendre compte d'un signal mesuré moyen, il est donc plus représentatif de l'ensemble de l'échantillon.

La DLS mesure le diamètre hydrodynamique d'une population de NPs supposées sphériques. Sa mesure est fondée sur la fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée (de l'ordre de la milliseconde) qui se décorrèle au cours du temps. Elle fournit un diamètre apparent qui est toujours une surestimation de la taille de la nanoparticule liée à la couche d'hydratation et sa mesure suppose que les NPs soient parfaitement sphériques, ce qui n'est jamais parfaitement vérifié. La DLS permet également le calcul d'un indice de polydispersité (PDI) permettant de connaître la dispersion en taille de la suspension. Enfin, des appareils bifonctionnels permettent, en plus de la mesure du diamètre hydrodynamique, la mesure du potentiel zéta au moyen d'une cuve contenant une électrode. Le potentiel zéta caractérise la charge à la surface des NPs. Au regard des forces de répulsions électrostatiques, une suspension est considérée comme stable lorsque la valeur absolue du potentiel zéta est supérieure à 30 mV.

L'UV-visible se base sur la mesure de l'absorbance d'un faisceau lumineux, pour

les NPs étudiées, dans le domaine du visible (400-800 nm). La mesure de la longueur d'onde pour laquelle l'intensité de l'absorbance est maximale ( $\lambda_{\max}$ ) permet de calculer la taille des NPs par la théorie de Mie [100], résolution particulière des équations de Maxwell pour des particules supposées sphériques. Le calcul de la largeur à mi-hauteur du maximum d'absorbance (*full width at half maximum* FWHM) reflète la dispersion autour de la taille des NPs. Ces trois techniques doivent autant que possible être utilisées conjointement et permettent par la convergence de leurs résultats d'estimer la taille, la forme et la polydispersité des NPs synthétisées. Les travaux de Haiss et *al.* [101] ont permis de déterminer des équations simplifiées permettant d'estimer la taille (Équation 1-13) et le nombre (Équation 1-14) des NPs présentes en suspension, avec  $B$  et  $C$  des constantes à adapter en fonction du range de taille,  $A_{spr}$  l'absorbance maximale,  $A_{450}$  l'absorbance à 450 nm et  $d$  le diamètre moyen des NPs.

$$Size(nm) = \exp\left(B \times \frac{A_{spr}}{A_{450}} - C\right) \quad \text{Équation 1-13}$$

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left[ -0.295 + 1.36 \exp\left( - \left( \frac{d - 96.8}{78.2} \right)^2 \right) \right]} \quad \text{Équation 1-14}$$

Une fois les NPs caractérisées, il convient d'optimiser les conditions expérimentales pour l'acquisition spectrale et une exaltation optimale. Cette optimisation passe principalement par l'optimisation de l'interaction NPs / analyte.

## 1.2.2 Interaction substrat SERS / analyte

Qu'il s'agisse d'effets chimiques ou électromagnétiques, nous avons vu dans les précédentes parties que l'analyte doit être en interaction avec les NPs pour que l'amplification du signal Raman de la molécule soit optimale. Cette partie est consacrée aux différentes stratégies, principalement fondées sur l'agrégation des NPs et permettant cette interaction. Le rapprochement des NPs sphériques favorise la genèse de points chauds par couplage plasmonique à l'origine du signal Raman exalté à la condition que l'analyte se trouve à proximité. Il est également possible de développer des stratégies plus spécifiques qui permettent d'augmenter l'affinité de l'analyte pour le substrat SERS.

### AGREGATION DES NANOPARTICULES SPHERIQUES

L'objectif de l'agrégation des NPs en suspension est de promouvoir le rapprochement des NPs afin d'optimiser l'exaltation du signal Raman. Plusieurs travaux ont mesuré l'intensité de l'exaltation du champ électrique en fonction de la distance entre deux nanoparticules :

Chung [102] a mesuré l'amplification du champ électrique pour deux nanosphères d'or en suspension en mesurant la relation entre exaltation et distance inter-particulaire. Plus les sphères sont proches, plus les valeurs du champ sont importantes. Il constate également que la valeur de l'énergie de résonance plasmon n'est pas modifiée si l'espace entre deux NPs est supérieur à la taille d'une NPs.

Le Ru *et al.* [47] ont quant à eux étudié l'importance de la distance entre deux NPs, en contrôlant la distance inter-particulaire et leur orientation en fonction du laser incident. Ainsi, pour deux nanoparticules sphériques d'or de 25 nm de rayon entre lesquelles une molécule d'analyte est fixée, l'exaltation du signal Raman varie de  $5 \cdot 10^5$  pour une distance inter-sphère de 10 nm à  $10^{11}$  pour une distance de 1 nm. Ils ont également étudié les modifications des longueurs d'onde d'absorbance du dimère comparativement à une nanosphère seule vers les grandes longueurs d'onde. Le résultat de ces expériences est résumé dans la figure 10.

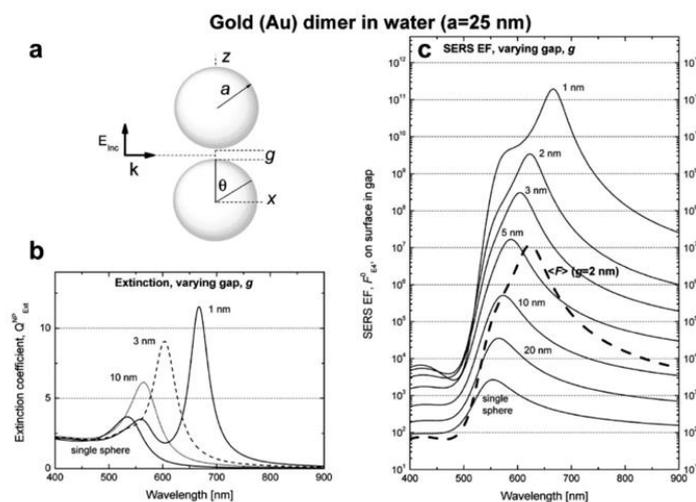


Figure 10 : Évolution, en fonction de la distance  $g$  entre les sphères (a), du coefficient d'extinction (b) et du facteur d'exaltation Raman SERS EF (c), pour 2 nanosphères d'or de rayon 25 nm soumises à un champ électrique incident  $E_{inc}$ . Le Ru *et al.* [47].

Cette étude met en évidence l'importance de la distance entre les NPs dans les suspensions colloïdales sur le facteur d'exaltation en SERS mais également sur la possibilité de modifier les propriétés de résonance plasmon des NPs en générant une légère agrégation et donc d'adapter le dimère ou le degré d'agrégation des NPs,

lorsque cela est possible, par rapport à la longueur d'onde du laser utilisé.

Au-delà de ces expériences réalisées dans des conditions parfaitement contrôlées, la mise en contact des molécules d'analyte et des NPs implique de maîtriser de nombreux facteurs. L'équipe de Faulds [42] a étudié deux colorants benzotriazolés de structures très proches et de section Raman efficace importante, au contact de nanoparticules sphériques d'argent (AgNPs) en suspension. Un colorant A ne générant pas d'agrégation et un colorant B générant une légère agrégation de la suspension. Ils ont étudié dans différentes conditions expérimentales : le déplacement de la résonance plasmon du mélange, l'évolution de la constante diélectrique et l'exaltation du signal Raman des molécules de colorants. Dans ces conditions expérimentales, au plus proche des conditions d'analyses réelles, Faulds met en évidence une amplification du signal plus importante avec le colorant B capable de générer une agrégation. Dans cette étude, il est également démontré la diminution (en valeur absolue) du potentiel zêta avec l'augmentation de la concentration du colorant B, qui provoque la diminution du nombre de charges négatives en surface des AgNPs et leur agrégation. Pour chaque concentration de B, la résonance plasmon de surface des AgNPs est mesurée. La bande plasmonique est déplacée vers les plus grandes longueurs d'onde à mesure que les agrégats croissent par l'ajout de B. Ces résultats combinés à l'utilisation de sources lumineuses de différentes longueurs d'onde, mettent à nouveau en évidence une exaltation accrue lorsque celle-ci est au plus proche de la longueur d'onde de résonance plasmon des AgNPs et des nouveaux agrégats formés.

Les méthodes les plus utilisées pour générer l'agrégation des suspensions de NPs s'appuient sur la diminution des répulsions électrostatiques par (i.) l'ajout d'un sel qui modifie la force ionique de la solution et dont les ions ajoutés se substituent aux ions présents à la surface des NPs (ii.) sur la modification du pH afin de réduire l'état de charge des NPs. Ainsi, Alvarez-Puebla *et al.* [103] analysent l'influence du potentiel hydrogène (pH) sur différentes suspensions de NPs d'or et d'argent et l'influence du pH sur l'exaltation du signal Raman de la pyridine. Pour des AuNPs recouvertes de citrate, lorsque le pH de la suspension diminue, la valeur absolue du potentiel zêta diminue générant une agrégation. Comme expliqué dans l'exemple précédent une augmentation du signal Raman mesuré en SERS de la pyridine est observée. Si la diminution du pH est trop importante, les forces de répulsion sont trop faibles, génèrent la sédimentation de la suspension et la disparition du signal Raman exalté. Pour les AgNPs, la formation d'une couche d'oxydation de l'argent en surface peut se produire à partir de certaines valeurs de pH conduisant à une diminution précoce de l'intensité du signal mesuré en SERS.

L'équipe de Turzhitsky [28] a, quant à elle, étudié la SERS comme outils de détection non spécifique en optimisant les conditions d'agrégation avec différents sels d'halogénures : fluorure de sodium (NaF), chlorure de sodium (NaCl), bromure de sodium (NaBr), iodure de sodium (NaI), bromure de potassium (KBr), chlorure de potassium (KCl) et bromure de lithium (LiBr) à plusieurs concentrations. En outre, cette

analyse a porté sur le suivi au cours du temps par MET de la formation des agrégats, ainsi que l'impact sur le pouvoir d'exaltation des différents sels étudiés sur l'intensité du signal Raman de la caféine. L'étude détaille l'importance de la nature de l'ion halogénure qui interagit à la surface de la NP et prend la place des molécules de citrate. *In fine*, l'agent d'agrégation et sa concentration influent sur l'affinité de l'analyte pour la NP ainsi que sur l'agrégation des NPs par le remplacement des citrates à la surface de la NP par des ions halides et par l'augmentation de la force ionique de la suspension. Dans leurs expériences, ils mettent en évidence que le sel de bromure de sodium semble le plus performant sur l'exaltation du signal. L'évolution au cours du temps du signal SERS après mélange a également été étudiée une fois le NaBr sélectionné. Excepté pour la concentration la plus basse de NaBr utilisée (de 0,25 à 4 M), l'intensité du signal décroît au cours du temps suggérant un processus d'agrégation dynamique. Ce processus génère une agrégation dès le début de l'expérience puis la formation d'agrégat trop volumineux conduit à la sédimentation de la suspension, ce qui est confirmé par l'imagerie MET (figure 11 [28]). L'importance de la séquence d'ajout du sel et des NPs est aussi mis en évidence. Partant du postulat que les molécules d'analytes sont plus petites et se déplacent plus vite que les NPs, elles se retrouvent ensuite piégées dans de nombreux agrégats ce qui génère une agrégation optimale. Ce qui suggère d'ajouter à la suspension d'NPs d'abord l'analyte puis l'agent d'agrégation.

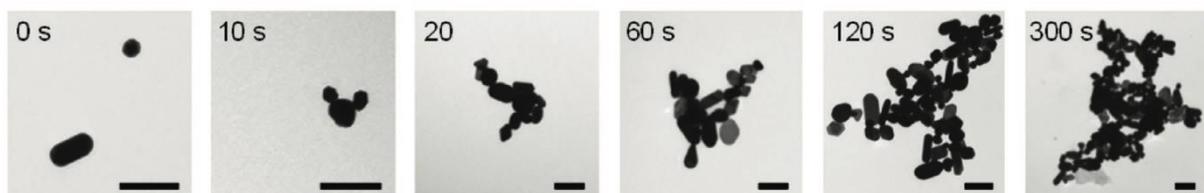


Figure 11 : Images en microscopie électronique en transmission représentant l'évolution de l'état d'agrégation d'une suspension de nanoparticules d'or après l'ajout d'un sel. La barre d'échelle représentée sur chaque image correspond à une longueur de 200 nm [28] .

L'équipe de Wang [39] a très récemment repris cette étude dans le but de quantifier le fentanyl en SERS avec un spectromètre Raman portable en générant l'agrégation d'AgNPs avec différents sels d'halogénure dont du NaBr. Cette fois ci, ils caractérisent le suivi de l'agrégation par DLS et par spectroscopie UV-visible. L'analyse UV-visible montre un déplacement de l'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde suggérant une augmentation de la taille des agrégats au cours du temps. De la même façon, la DLS mesure directement l'augmentation du rayon hydrodynamique des agrégats au cours du temps de 38 à plus de 1000 nm. De plus, le sel doit être choisi en fonction de l'affinité que pourra avoir l'analyte avec l'halogénure en surface de la NPs : le choix du sel peut donc être différent en fonction de l'analyte étudié. Ce choix représente un compromis entre l'importance de l'exaltation et la stabilité du signal. Ainsi dans cette étude, pour le crésyl-violet, le brome est l'halogénure exaltant le plus le signal alors que pour le fentanyl, l'ion iodure est meilleur. Leur choix reste néanmoins le NaBr pour la stabilité du signal obtenu. De même pour le cation, bien que les sels

de potassium exaltent davantage le signal, les sels de sodium sont souvent préférés car ils génèrent un signal en SERS plus stable dans le temps.

Quel que soit la méthode d'agrégation utilisée, sa maîtrise est délicate (génération de dimères, trimères ou d'états d'agrégation plus complexes). Certains auteurs utilisent une agrégation médiée par une molécule spécifique qui peut agir comme connecteur entre les NPs. D'autres encore proposent d'utiliser des molécules ayant une affinité pour les NPs qui comporte un site de reconnaissance spécifique pour l'analyte à étudier. Ces différentes techniques qui impliquent un greffage des NPs pour y lier une molécule d'intérêt capable d'apporter une nouvelle fonction aux NPs sont appelées fonctionnalisation et sont décrites dans la partie suivante.

### **LA FONCTIONNALISATION**

La fonctionnalisation se définit par le greffage à la surface des NPs de nouvelles molécules conférant aux NPs de nouvelles propriétés. Ses objectifs sont multiples : stabiliser les suspensions nanocolloïdales, moduler les propriétés d'interaction des NPs avec les analytes ou leur lier une molécule possédant une signature spectrale caractéristique pouvant être utilisée par la suite comme étalon interne.

Les molécules utilisées pour la fonctionnalisation sont des ligands qui doivent posséder une forte affinité pour le métal constitutif de la NP. Dans le cas de NPs d'or (AuNPs) ou d'argent (AgNPs), les ligands sont habituellement des molécules qui possèdent un groupement thiol ou disulfure. Par exemple, Kalimuthu *et al.* ont démontré par spectroscopie infrarouge que des ligands mercaptothiadiazole remplacent les ions citrate en surface des NPs et les stabilisent par répulsion électrostatique [104]. Certains auteurs [105] proposent d'autres approches en 2 étapes. La première étape consiste en un habillage par des molécules de grande taille type polyéthylène glycol (PEG) pour stabiliser les NPs par exclusion stérique et enlever les charges présentes en surface. Cet habillage en PEG constitue une accroche pour greffer dans un second temps des molécules capables d'interagir avec les analytes d'intérêt. D'autres études se sont intéressées à la perturbation induite par la fonctionnalisation et l'ajout en surface des NPs de nouvelles molécules. Dumont *et al.* [106] ont étudié l'impact du greffage de molécules avec un noyau pyrimidique : pyridine, 2 et 4 mercaptopyridine (2-MP et 4-MP) entre autres sur des AuNPs ou AgNPs. Le suivi de plusieurs paramètres reflétant l'état d'agrégation *i.e.* potentiel zêta, spectres UV, DLS et spectre Raman en SERS des molécules greffées, a permis de démontrer que l'agrégation induite était fonction de la molécule de greffage utilisée, de sa concentration et du solvant constitutif du milieu (eau ou méthanol). Devant le nombre important de paramètres expérimentaux à optimiser pour contrôler la fonctionnalisation des NPs et leur impact sur la perturbation de la suspension, les auteurs suggèrent la mise en place d'une approche expérimentale rationnelle fondée sur les plans d'expériences afin de déterminer les conditions optimales de greffage, en fonction de la problématique étudiée (stabilisation, agrégation, spécificité).

Pour travailler dans des milieux plus complexes comme les milieux biologiques, Panikar *et al.* [107] ont décrit des nanoétoiles d'or greffées avec des molécules de L-cystéine déposées sur du graphène pour le dosage dans le sérum de deux anticancéreux, le paclitaxel et le cyclophosphamide avec des résultats prometteurs. De telles NPs permettent une exaltation intense par leur structure très anisotrope et de s'affranchir du signal induit par les protéines grâce à la présence de L-cystéine en surface. Ces expériences proposent donc une approche pour analyser les molécules en milieu biologique en SERS de façon non spécifique grâce à la fonctionnalisation. Cette dernière minimise le signal parasite induit par les protéines qui ont la capacité de s'adsorber sur les NPs via leur groupement amine primaire, ce phénomène est appelé effet corona [108].

D'autres approches ont été utilisées pour augmenter la spécificité des NPs pour l'analyte. Par exemple, Zhang *et al.* [109] ont synthétisé des AuNPs greffées avec la 4-MP pour la détection de l'héparine dans des milieux complexes en proposant une méthode originale basée sur l'interaction protamine / héparine / AuNPs. En effet l'ajout de protamine induit l'agrégation des AuNPs greffées. L'héparine présente dans les milieux analysés interagit avec la protamine et provoque une diminution de l'agrégation. Ainsi en mesurant l'intensité d'un déplacement Raman caractéristique de l'héparine normalisée par celle caractéristique de la 4-MP et en reliant cette intensité normalisée au logarithme de la concentration en héparine les auteurs développent une méthode de quantification de l'héparine de 0,05 à 20 ng.mL<sup>-1</sup>.

Enfin la fonctionnalisation des NPs par des molécules spécifiques d'un analyte comme des anticorps dirigés contre les molécules étudiées permet d'utiliser les NPs en suspension comme de véritables sondes capables de se fixer spécifiquement à un analyte. La limite de cette approche réside dans la taille importante des anticorps qui bien souvent ne permettent plus d'avoir une exaltation optimale, c'est pourquoi les majorités des *linkers* sont de petites tailles, afin de préserver l'effet SERS qui reste un effet localisé qui décroît rapidement lorsque l'on s'éloigne de la surface de la NPs. On peut également citer l'étude de Shi *et al.* [110] dans laquelle les auteurs détectent des antibiotiques dans des milieux complexes : la néomycine et la norfloxacine par des AuNPs greffées au 4-aminothiophénol puis à des anticorps spécifiques anti-néomycine ou anti-norfloxacine. La préparation ainsi mélangée à la solution à analyser est ensuite déposée sur une bandelette imprégnée d'antigènes de néomycine ou norfloxacine. Plus la concentration en analyte dans la solution analysée est importante moins le signal apparent sur la bandelette est intense. Ces techniques souvent utilisées en immuno-analyse peuvent être couplées à une détection par SERS capable de détecter le 4-aminothiophénol présent à la surface des AuNPs qui se sont fixées sur la bandelette. Ainsi les auteurs améliorent la détection d'un facteur 10 000 comparativement aux méthodes de détection par observation visuelle avec des limites de détection respectivement de 0,33 et 0,55 pg.mL<sup>-1</sup> pour la norfloxacine et la néomycine.

La fonctionnalisation permet également l'amélioration des modèles quantitatifs par l'utilisation d'étalon interne fixé à la surface des NPs. L'équipe de Shen [45] a ainsi travaillé à l'élaboration de NPs composées d'un noyau en or et d'une coquille recouverte d'argent. Entre le cœur formé par l'AuNP et la coquille d'argent, une couche comportant la cystéamine et la 4-MP est greffée. La cystéamine sert de guide et se fixe à l'AuNP et aux atomes d'argent. La 4-MP qui grâce à sa section Raman efficace présente la fonction d'étalon interne. L'intérêt de piéger l'étalon interne dans cette couche est qu'il ne rentrera pas en compétition avec les analytes et sera uniquement le reflet des modifications des conditions expérimentales (milieu d'analyse, condition d'agrégation ...). De cette façon, Shen *et al.* [45] ont réussi à quantifier le 1,4-phébylène diisocynide (molécule présentant une forte affinité pour l'argent et une section Raman efficace importante), le rouge basique (RB9, présentant peu d'affinité pour l'argent et une section Raman efficace importante) et l'acide urique (une molécule retrouvée dans les milieux biologiques avec une faible affinité pour l'argent et un faible signal Raman). Ils ont ainsi mis en évidence que la correction du signal apportée par la 4-MP permettait une amélioration importante des modèles quantitatifs proposés après normalisation du signal des analytes étudiés par l'intensité Raman caractéristique du 4-MP et ce, sur des grandes gammes de concentrations allant de 0,5 à 100 nM, avec une bonne linéarité et une répétabilité de l'ordre de 12 % (CV %).

Dans cette précédente partie, nous avons donc étudié les différentes modulations possibles des propriétés de NPs en suspension. En effet, la fonctionnalisation d'AuNPs ou AgNPs permet de résoudre de nombreuses problématiques, qu'il s'agisse de générer davantage de points chauds, de s'affranchir de la complexité du milieu ou de rendre les NPs spécifiques d'une molécule, ou pour améliorer les modèles quantitatifs.

L'analyse en SERS constitue donc un défi en termes de répétabilité tant les paramètres expérimentaux doivent être finement contrôlés. Une multitude de stratégies sont possibles du choix du substrat SERS (forme, nature, support) aux conditions d'agrégation ou d'interaction NPs / analyte, à la mesure du signal. La partie suivante est consacrée à la présentation des outils mathématiques permettant un développement expérimental rationnel, le traitement mathématique des données spectrales et la validation des techniques d'analyse. Quelques exemples d'analyse quantitative en SERS pour la quantification de molécules d'intérêt thérapeutique y seront détaillés.

### **1.3 APPORT DES MATHÉMATIQUES POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXALTATION ET L'EXPLORATION DES DONNÉES SPECTRALES**

Cette partie est consacrée à présenter différents outils mathématiques pouvant être mis en œuvre afin d'optimiser les conditions d'exaltation de la SERS et de développer des modèles de prédiction qualitatifs et quantitatifs. Dans ces deux cas, l'analyse des spectres Raman exaltés obtenus ne sont pas directement exploitables et une transformation mathématique préalable ou prétraitement est indispensable. Les traitements mathématiques les plus répandus en spectroscopie sont les prétraitements qui consistent à enlever ou réduire le bruit de fond de l'analyse due majoritairement à des perturbations physiques du signal optique comme les phénomènes de diffusions parasites. Les prétraitements utilisées sont la normalisation (par l'intensité d'un déplacement choisi ou par la moyenne des intensités du spectre), la correction de la ligne de base (soustraction à l'ensemble du spectre d'une fonction polynomiale, par régression des moindres carrées), le lissage (le plus courant est l'algorithme de Savitzky-Golay, qui est un lissage polynomiale ajusté sur une fenêtre mobile), enfin les dérivations peuvent être utilisées ce qui réduit les effets additifs et multiplicatifs.

### **1.3.1 Optimisation expérimentale des conditions d'exaltation**

Le contrôle des paramètres expérimentaux tient une place prépondérante dans l'analyse en SERS au vu du nombre très important de paramètres à optimiser. L'analyse expérimentale a pour objectif d'évaluer l'importance des différents paramètres expérimentaux (modifiables par l'expérimentateur) sur une réponse d'intérêt. Les outils mathématiques permettent de bâtir et d'interpréter des plans d'expériences (PE), qui constituent une approche expérimentale rationnelle dont le but est de formaliser l'analyse expérimentale de manière rationnelle par la construction d'un modèle capable d'analyser les liens existants entre la réponse étudiée, les différents facteurs et les facteurs entre eux. Utilisé dans un but exploratoire le PE prend le nom d'analyse d'effets. Lorsque le but est la mise au point d'un procédé connu, le PE permet alors l'optimisation des paramètres expérimentaux. La construction d'un PE se fonde d'abord sur la définition d'un domaine d'étude qui comprend le nombre de facteurs à étudier ainsi que les bornes de chaque facteur qui définissent les différents niveaux du facteur. La formalisation du PE permet d'attribuer au niveau bas la valeur -1, au niveau central la valeur 0 et au niveau haut la valeur +1. Les variables sont ainsi centrées sur zéro et réduites, ce qui uniformise la présentation des résultats indépendamment du domaine expérimental et des facteurs choisis. Par exemple pour un PE à deux facteurs deux niveaux ( $2^2$ ) les points expérimentaux les plus intéressants sont situés aux sommets du domaine d'étude comme représenté sur la figure 12 [111] :

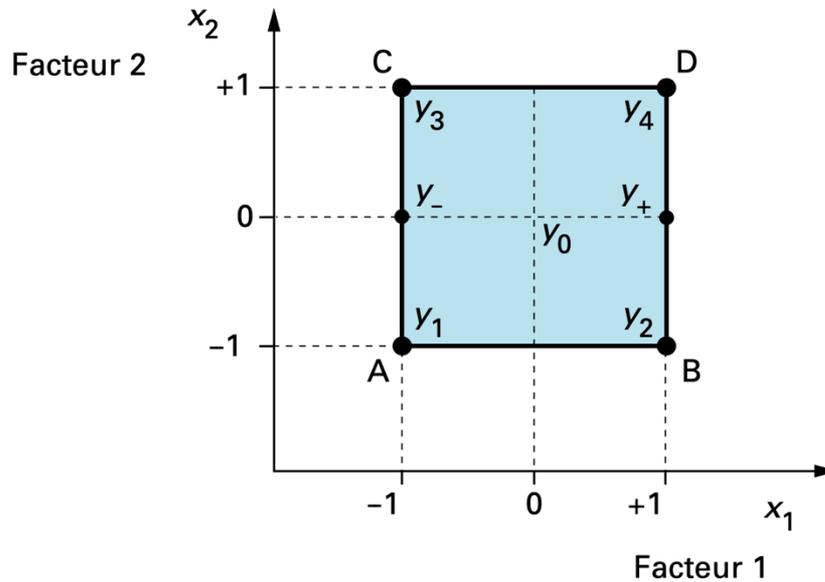


Figure 12 : Représentation géométrique du domaine d'étude expérimentale à deux facteurs et deux niveaux [111]. Les facteurs sont centrés réduits : niveau haut = +1, niveau bas = -1, moyenne = 0.

Quatre expériences sont donc nécessaires pour couvrir l'ensemble du domaine dans ce type de plan à deux facteurs et deux niveaux. L'analyse par PE consiste ensuite à déterminer l'effet des facteurs sur la réponse étudiée et l'effet des facteurs entre eux. L'analyse des effets, ainsi que la validité de la modélisation expérimentale du domaine d'étude, sont déterminées à partir de calculs fondés sur l'analyse de la variance. Il existe une grande variété de PE adaptés à l'analyse d'effets ou l'optimisation en fonction du nombre de facteurs étudiés, du nombre de niveaux et de la complexité de l'analyse. L'intérêt de l'utilisation des PE en SERS se comprend aisément face au nombre important de paramètres expérimentaux rencontrés détaillés dans les paragraphes précédents. Ainsi Mabbot *et al.* [112] proposent une approche par PE pour sélectionner les conditions expérimentales optimales pour l'analyse SERS de la méphédronne. Les facteurs analysés sont la nature du métal des NPs colloïdales synthétisées, la nature du sel à plusieurs concentrations et la valeur du pH. Grâce à l'utilisation d'un plan factoriel fractionné et la réalisation de 288 expériences, ils déterminent quatre conditions expérimentales optimales, pour une limite de détection de  $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . De la même façon, Junior *et al.* [38] ont optimisé la concentration en NaCl, le volume des AuNPs, la concentration en analyte et le pH par l'utilisation d'un plan central composite et la réalisation de 57 expériences pour la détection et la quantification de la nicotinamide et la riboflavine. Si d'autres auteurs, comme De Bleye [113] ou Sallum [114], ont utilisé les PE pour optimiser les conditions expérimentales en analyse SERS, cette approche reste trop peu utilisée et devrait être une condition préliminaire indispensable à l'analyse SERS.

### 1.3.2 Exploitation mathématique des données spectrales

La variabilité du signal mesuré en SERS est, comme précédemment présentée, multiparamétriques et inhérente à son fonctionnement. Cette variabilité importante pour une même expérience rend complexe l'interprétation des données spectrales mesurées. En conséquence, développer des modèles capables de relier le signal SERS à la concentration d'une molécule d'intérêt thérapeutique représente un véritable défi analytique. Dans cette partie sont développées les différentes stratégies dans la construction de modèles mathématiques prédictifs tout en prenant en compte les contraintes liées à l'analyse et à la variabilité de mesure en SERS.

A la complexité expérimentale s'ajoute la complexité de l'analyse spectrale et la gestion d'un grand nombre de données qui rend l'utilisation d'outils mathématiques indispensables dans le traitement des données spectrales afin de développer des modèles capables de prédire la classe et la concentration de l'analyte. Bien que les SR et SERS permettent d'obtenir de nombreuses informations sur l'échantillon, elles ne sont que trop rarement pleinement exploitées en raison de la complexité des signaux obtenus. En effet, les données spectrales sont très riches en information avec plusieurs centaines de données par spectre (couple nombre d'onde / intensité) et l'information spectrale à chaque nombre d'onde ne constitue pas forcément une information pertinente pour l'analyse. En effet, certaines parties du spectre peuvent ne pas contenir d'information (bruit de fond) ou être perturbées par des phénomènes physiques, qui représentent la variabilité liée à l'expérience (température, lumière, focalisation du laser dans l'échantillon, fluorescence...) ou par d'autres bandes adjacentes correspondant à d'autres composants présents dans l'échantillon. C'est le cas notamment des matrices complexes comme les milieux biologiques, mais également lors de l'analyse de médicaments composés d'un principe actif et de divers excipients. L'utilisation d'outils mathématiques dans l'interprétation des données chimiques est appelée chimiométrie [115]. L'analyse mathématique des données spectrales permet d'une part de s'affranchir de l'ensemble des signaux parasites expérimentaux qui constitue le bruit de fond de l'analyse mais permet également la construction des modèles discriminants et quantitatifs.

La première étape du traitement du signal spectral consiste à réduire ou à s'affranchir de la contribution non informative du signal, il s'agit du prétraitement. Les prétraitements, une fois déterminés, doivent être appliqués de manière identique pour l'ensemble des échantillons analysés. Parmi les prétraitements les plus utilisés on citera les plus répandus. Le lissage [116], qui consiste à moyennner ou à construire une fonction sur une fenêtre de points successifs et à la dériver pour simplifier le signal, il permet de s'affranchir du bruit aléatoire présent lors de la mesure, un des algorithmes les plus utilisés et celui de Savitzky-Golay. La réduction de la ligne de base dont le principe est de soustraire au signal de départ une courbe modélisée par une fonction passant au plus près de chaque point expérimental. Pour s'affranchir ou minimiser la variabilité expérimentale, il est également possible de réaliser une normalisation de

l'ensemble du spectre par une intensité d'un déplacement Raman qui comprend nécessairement le bruit de fond expérimental, idéalement il ne doit pas inclure une source de variabilité d'intérêt, comme la concentration d'analyte étudié par exemple. Cette approche est très utile pour enlever les effets additifs purs du bruit de fond. Une fois ces premières corrections appliquées, d'autres outils sont utilisés pour explorer les données, sélectionner les zones les plus riches en informations et construire les modèles prédictifs.

Parmi les méthodes les plus couramment utilisées dans l'analyse des données spectrales, certaines sont dites exploratoires et permettent l'analyse non supervisée des données. La méthode exploratoire d'analyse multivariée la plus répandue est l'analyse en composantes principales (ACP) qui permet de représenter rapidement un jeu de données en générant de nouveaux axes (composantes principales) qui sont des combinaisons linéaires des variables de départ. Ces axes contiennent la plus grande partie de la variabilité du jeu de données. Dans ce nouvel espace, il est aisé de distinguer les individus qui se ressemblent ou qui diffèrent selon les composantes construites. Le pourcentage des variables de départ dans la construction de ces nouveaux axes est également un outil supplémentaire dans l'interprétation des données. Elle permet d'identifier des individus, dans notre cas des spectres issus de la mesure d'un échantillon en SERS, dont le spectre obtenu serait aberrant (*outlier*). Il convient dans un second temps de confronter ces *outliers* avec les données expérimentales pour expliquer la suppression ou la conservation de ces données dans le jeu de données final.

L'analyse mathématique est indispensable dans la construction des modèles de prédiction, qu'il s'agisse de modèles quantitatifs, capables de déterminer la concentration d'un échantillon à partir de sa mesure spectrale, ou de modèles discriminants, capables d'attribuer le spectre d'un échantillon inconnu à une classe correspondant le plus souvent à une molécule, par comparaison à une bibliothèque spectrale de composés connus.

L'analyse discriminante est basée sur la notion de ressemblance, les spectres analysés doivent pouvoir se superposer avec les spectres de référence précédemment mesurés ou connus. Un score de correspondance peut alors être calculé. Généralement il est exprimé de 0 à 1, la valeur de 1 étant l'identité.

L'analyse quantitative est quant à elle basée sur des modèles de régression qui relient deux variables quantitatives. Un étalonnage préalable est alors nécessaire pour construire le modèle de régression. Il permet de relier le signal mesuré au paramètre connu : la concentration en analyte. Le cas de figure le plus couramment retrouvé dans la littérature est l'analyse univariée où une valeur (couramment l'intensité ou l'aire d'un déplacement Raman) est utilisée comme valeur prédictive de la concentration en analyte. Une courbe d'étalonnage est alors construite à partir des données mesurées avec un jeu de calibration dont les échantillons ont une concentration en analyte

connue. La réponse mesurée peut être sélectionnée selon les connaissances chimiques (déplacement Raman caractéristique de l'analyte) ou uniquement sur des aspects mathématiques à partir d'un jeu important de données capable de reconnaître des zones spectrales caractéristiques de l'échantillon donc statistiquement redondantes et différentes du hasard. Bien souvent, des connaissances chimiques et mathématiques sont nécessaires dans le but d'élaborer des modèles discriminants et quantitatifs pertinents et interprétables. La prédiction de la concentration d'un échantillon de concentration inconnue en analyte devient alors possible par le report de l'intensité mesurée sur la courbe d'étalonnage précédemment construite. Ces modèles fondés sur la mesure d'une intensité (ou d'une donnée) ne permettent pas toujours d'obtenir des résultats satisfaisants. C'est pourquoi des modèles plus sophistiqués sont parfois développés permettant de prendre en compte une partie ou la totalité du spectre et ainsi inclure davantage d'informations dans l'analyse. La qualité des prédictions est ainsi la plupart du temps améliorée. De tels modèles sont dits multivariés. L'une des techniques de régression multivariées les plus utilisées en analyse spectrale est la régression des moindres carrés partielle (*partial least square*, PLS) ou régression par projection sur variables latentes (*projection on latent structures*, PLS). Cette technique consiste en une régression linéaire sur des données multivariées et a pour objectif d'expliquer conjointement la variabilité entre les échantillons, c'est-à-dire de trouver les axes de plus grande dispersion (appelés ici variables latentes) des individus et de les corrélés au paramètre étudié. La régression PLS est déclinable pour l'analyse discriminante. Une étape préliminaire est alors nécessaire pour recoder l'information qualitative en information quantitative en codant chaque classe par une combinaison de 0 et de 1. Elle prend le nom d'analyse discriminante PLS ou PLS-DA. Une multitude d'autres modèles mathématiques peuvent être utilisés pour s'adapter aux données. Par exemple, l'utilisation de modèles non linéaires est possible dès lors que la réponse étudiée ne l'est plus. Avec le développement de modèles mathématiques de plus en plus sophistiqués comme l'apprentissage automatique ou l'apprentissage statistique, il apparaît indispensable de travailler conjointement avec des statisticiens et des mathématiciens pour améliorer les performances des modèles de prédiction, aussi bien en identification qu'en quantification.

Cette étape d'optimisation mathématique est donc indispensable tant pour mettre en évidence les informations pertinentes que pour développer les modèles prédictifs. Elle permet de rendre les données mesurées exploitables et de caractériser les zones spectrales d'intérêt. Nous verrons au cours des différents travaux qui vont suivre l'intérêt et les limites des approches multivariées : ACP, PLS, PLS-DA pour construire les modèles prédictifs.

### **1.3.3 Le défi quantitatif de la SERS dans le domaine pharmaceutique**

Grâce au développement des connaissances dans le domaine des nanosciences,

les études sur la SERS ont connu un intérêt croissant notamment dans le domaine pharmaceutique [117]. En cancérologie par exemple, la SERS a été utilisée pour la caractérisation des médicaments en milieu biologique [119], dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique tels que le 5-fluorouracile dans la salive [119], le paclitaxel [120], l'irinotecan et son métabolite le SN-38, le sunitib et la doxorubicine [121] dans le sang [120,122,123] et le méthotrexate dans le plasma [124]. Ou encore pour le contrôle de préparations de médicaments par voie intraveineuse comme des antibiotiques [125–127] et des médicaments anticancéreux [128]-[129]. Bien que l'intérêt pour cette technique d'analyse soit grandissant, les travaux de recherche portent le plus souvent sur l'amélioration des limites de détection dans des matrices toujours plus complexes. Les applications quantitatives dont le but est de relier le signal spectral obtenu en SERS à la concentration sont beaucoup plus restreintes. La comparaison des résultats des travaux issus des différentes équipes est particulièrement difficile tant les conditions expérimentales sont différentes d'une étude à l'autre et la capacité à reproduire les expérimentations reste limitée.

Les études quantitatives menées en SERS sont souvent construites sur un nombre restreint de données issues d'un lot unique de NPs et peu font l'objet d'une validation de méthode analytique rigoureuse. Par exemple, les études de Villa [130], Deng [131] ou Liu [132] proposent des modèles de quantification en SERS à partir de NPs d'or ou d'argent de bases pures (adénine et guanine), de l'aciclovir et de l'oxcarbazépine respectivement, en développant des modèles multivariés dont les mesures sont issues d'un lot unique de NPs. D'autres auteurs tentent d'objectiver la reproductibilité de la prédiction de la concentration à partir de plusieurs lots de NPs mais pour une concentration choisie d'analyte [43] ou sur plusieurs concentrations mais sans tenir compte de la variabilité liée aux lots de NPs dans l'ensemble du jeu de données. C'est le cas des études de Westley [133] qui utilisent la méthode des ajouts dosés pour la quantification de l'acide urique ou de Wang [39] pour la quantification du fentanyl. Ces études s'appuient sur le rapport signal sur bruit pour déterminer les limites de détection et de quantification.

Très peu d'études sont donc construites en SERS à partir d'un jeu de données issu de plusieurs lots de NPs à l'instar de l'équipe de De Bleye *et al.* qui ont quantifié le 4-aminophénol, une impureté retrouvée dans des présentations commerciales de paracétamol, à partir de cinq lots de suspensions nanocolloïdales de NPs sphériques d'argent en utilisant des techniques d'analyses univariées avec une limite de quantification de 0,9 µg/mL et une limite de détection de 0,3 µg/mL. Cette étude propose également une validation analytique complète fondée sur la méthodologie du profil d'exactitude tout comme l'étude de Fornasaro qui a quantifié l'imatinib [134], un médicament anticancéreux utilisé par voie orale, à partir d'un substrat SERS commercial constitué de nano-piliers de silicone recouvert d'argent, combiné à des techniques d'analyses multivariées avec une limite de quantification de 0,636 µg/mL et une limite de détection de 0,210 µg/mL. Ces deux études font parties des rares études à développer cette méthodologie pour valider leurs résultats. Or, pour transposer

l'utilisation d'un outil analytique comme la SERS de l'état de développement à son utilisation en pratique courante, pour des champs d'application aussi exigeant que le domaine pharmaceutique, la validation de méthode par des procédures analytiques rigoureuses est indispensable. Dans les travaux que nous présenterons par la suite, nous avons choisi de nous baser sur la validation de méthode proposée par la Société Française de Sciences Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) qui tente d'unifier, sur la base de plusieurs référentiels issus de l'ISO (organisation internationale de standardisation ou *International Standardization Organisation*), de l'ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) ou encore de l'EMA (European Medicine Agency) et de la FDA (*Food and Drug Administration*), l'expression d'un résultat analytique avec un risque et des critères d'acceptation déterminés. Cette procédure d'analyse est fondée sur le profil d'exactitude et permet d'exprimer l'erreur autour de la mesure en prenant en compte les erreurs systématiques (justesse) et les erreurs aléatoires (fidélité). En effet, la définition de l'exactitude selon la norme ISO 5725 est « l'étroitesse de l'accord entre le résultat de l'essai et la valeur de référence acceptée » et prend donc en considération l'erreur totale de mesure. L'objectif de l'analyste dans cette démarche est de quantifier le plus exactement possible des quantités inconnues d'analyte. Pour cela l'expérimentateur doit d'abord fixer des limites d'acceptation qui définissent la validité de la mesure et qui peuvent être différentes en fonction du domaine étudié. Concrètement, le profil d'exactitude présente, pour chaque concentration analysée, sur une seule figure le biais de mesure (ou le recouvrement) ainsi que l'intervalle de tolérance au niveau  $\beta$ , qui représente la proportion de mesure dans les limites d'acceptation. La valeur de  $\beta$  est fixée par l'analyste en fonction du risque de conclure à tort qu'une mesure future sera comprise dans cette intervalle et est généralement fixée entre 5 à 20 % (5 % pour la détermination de l'incertitude, 20 % pour une analyse biologique).

Les paramètres du profil d'exactitude sont en réalité des estimateurs du vrai biais et de la vraie fidélité et doivent être estimés le plus précisément possible. La SFSTP recommande d'effectuer ces expériences sur des échantillons connus appelés standards de validation. Dans nos travaux, nous avons choisi de considérer aléatoirement les données soit au jeu de calibration, soit au jeu de validation en divisant notre jeu de données en 2/3 pour la calibration et 1/3 pour la validation comme recommandé dans le référentiel de l'EMA sur la stratégie d'analyse en spectroscopie infrarouge.

Nous avons vu tout au long de ce chapitre introductif les fondamentaux en spectroscopie vibrationnelle et en physique des surfaces pour comprendre les origines de l'exaltation du signal Raman en analyse par SERS. Cette présentation a mis en lumière les intérêts majeurs de la SERS en termes de spécificité et de sensibilité, elle possède ainsi des caractéristiques particulièrement intéressantes en tant que technique

analytique et peut être appliquée à une grande diversité d'analyses. Elle met également en avant ses limites, essentiellement représentées par la variabilité du signal mesuré. Cette variabilité a freiné son développement dans l'analyse quantitative et retarde les transpositions pour des applications en vie réelle, comme nouvel outil analytique spécifique et ultrasensible. L'essentiel de ce travail se concentre sur les moyens de maîtrise des sources de variabilité du signal SERS, qu'ils soient expérimentaux ou mathématiques. Les parties expérimentales qui vont suivre seront consacrées aux différentes études que nous avons réalisées. La restitution des travaux réalisés se veut didactique et illustre les différentes stratégies envisagées pour la maîtrise du signal SERS avec trois grands axes d'études : (i.) la synthèse de NPs métalliques, de taille et de forme reproductibles, (ii.) l'optimisation rationnelle des expériences SERS par l'utilisation de plans d'expériences pour une maîtrise des conditions d'agrégation indispensable à l'amélioration de la sensibilité et la reproductibilité du signal, (iii.) et enfin l'utilisation d'outils chimiométriques ou mathématiques pour la construction de modèles prédictifs de discrimination et de quantification à partir de l'analyse de molécules modèles.

## Introduction à la partie expérimentale

---

Dans le premier chapitre de ce travail, la théorie des spectroscopies vibrationnelles Raman et Raman exalté de surface a été présentée ainsi que les axes à optimiser pour un meilleur contrôle du signal en SERS. Nos objectifs principaux sont de construire des modèles quantitatifs et discriminants capables d'une part de déterminer la concentration de molécules d'intérêt thérapeutique en solution à partir du signal mesuré en SERS et d'autre part de reconnaître de manière spécifique un analyte par comparaison à une bibliothèque spectrale. Autour de cet objectif, nous avons construit une stratégie d'analyse qui s'appuie sur trois axes majeurs : la synthèse des nanoparticules en suspension colloïdales, l'optimisation des conditions expérimentales et l'optimisation mathématique. Dans le but de construire les modèles prédictifs les plus robustes possibles, nous avons souhaité inclure différents lots de synthèse de NPs pour chacune de nos études quantitatives afin d'inclure la variabilité liée au procédé de synthèse des NPs. Nous avons choisi de travailler sur des NPs sphériques en suspension synthétisées par réduction d'un sel métallique. Malgré la diversité des substrats SERS retrouvés dans la littérature, cette technique reste l'une des techniques les plus utilisées et présente de nombreux avantages. Elle est notamment peu onéreuse et permet de produire rapidement une quantité importante de NPs avec un équipement relativement standard. En jouant sur les paramètres de synthèse tels que la vitesse d'ajout des réactifs, la température de chauffage, la quantité des réactifs introduits ou encore la vitesse d'agitation, il est possible de synthétiser des NPs de taille variable avec des propriétés d'exaltation différentes. La production des NPs est d'autant plus cruciale que les alternatives commerciales existantes ne proposent que des NPs peu reproductibles avec des variations de taille de l'ordre de 20 % pouvant pénaliser le développement de modèles prédictif notamment quantitatifs. En effet, les NPs en suspension nécessitent une étape d'agrégation afin de générer la rencontre entre les NPs et l'analyte ; et générer les points chauds à l'origine de l'exaltation du signal Raman. Ainsi au-delà des NPs synthétisées, cette étape d'agrégation doit également faire l'objet d'une optimisation pouvant être empirique en évaluant l'effet de chaque paramètre un à un au grès de résultats, ou encore rationnelle par la construction de plans d'expériences et la visualisation de surface de réponse. La stratégie générale d'analyse dans l'ensemble de cette thèse est représentée sur la figure 13.

Nous espérons ainsi, au travers de cette démarche, comprendre davantage l'impact de l'hétérogénéité des NPs synthétisées ainsi que des différents facteurs expérimentaux, notamment ceux influençant l'agrégation de la suspension colloïdale, sur la variabilité de l'exaltation de l'intensité du signal et sur la qualité de la prédiction qui en découle. La meilleure compréhension de ces phénomènes permettra d'apporter une réponse expérimentale ou mathématique par la construction de modèles adaptés aux données et le déploiement de différents outils, qu'ils s'agissent de construire des

modèles uni ou multivariés, linéaire ou non afin d'améliorer les modèles de prédiction, de réduire la variabilité liée à la mesure et d'améliorer la sensibilité de la méthode afin de doser les concentrations en analyte les plus faibles possibles.

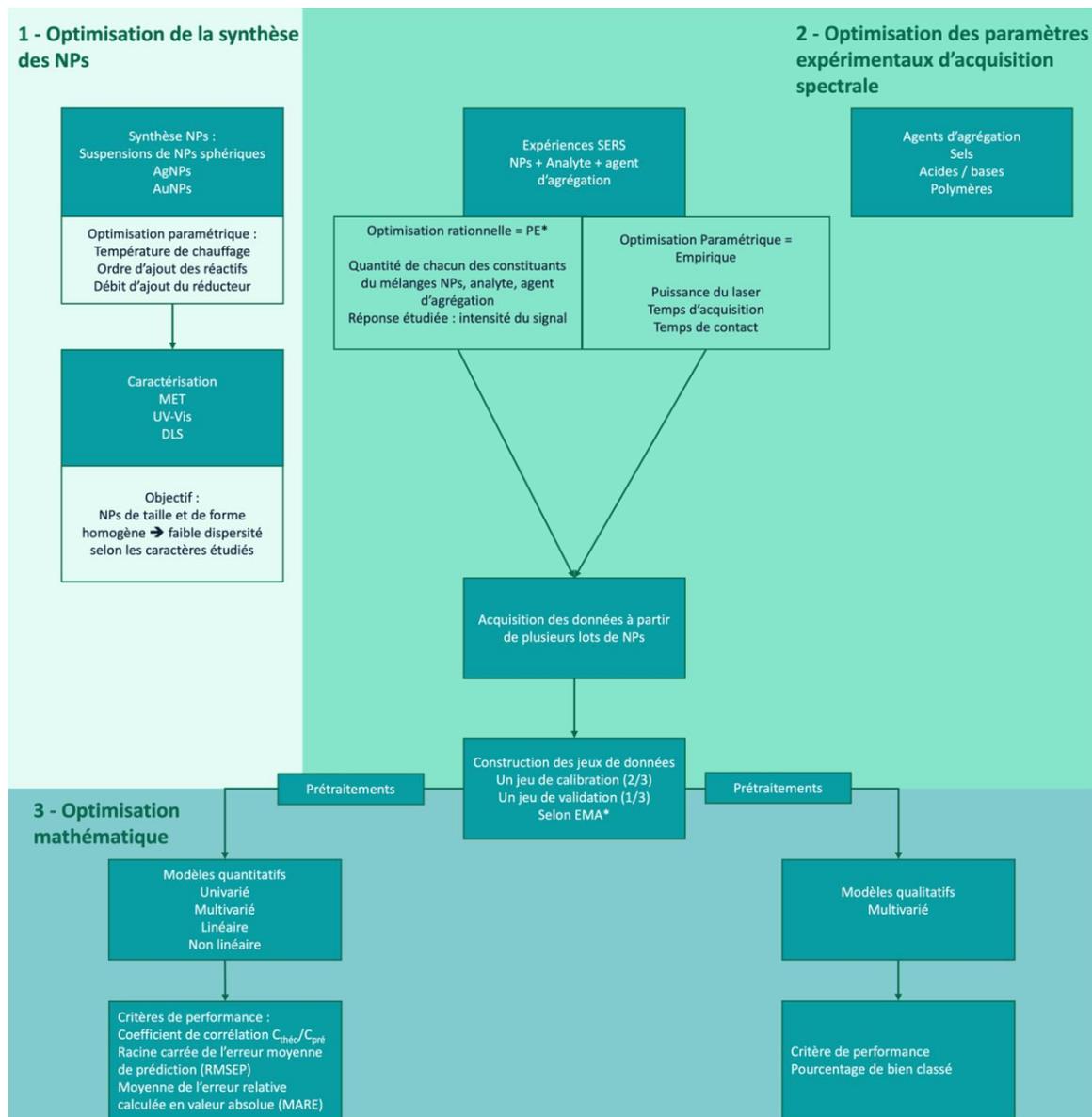


Figure 13 : Logigramme récapitulatif de la stratégie expérimentale mise en œuvre au cours des différents travaux.

Ce chapitre est divisé en trois grandes parties qui suit l'ordre chronologique de réalisation des travaux, et retrace notre parcours de la synthèse des nanoparticules en suspension colloïdale à l'agrégation du système par des polymères de chitosan, sur des molécules d'intérêt thérapeutique comme le 5-fluorouracile (analogue pyrimidique de la classe des antimétabolites indiqué pour le traitement des cancers) et deux catécholamines : la noradrénaline et l'adrénaline largement utilisés dans les établissements de santé.

## 2 De la synthèse de nanoparticules d'argent à la construction d'un modèle quantitatif du 5-fluorouracile en SERS

---

Ce travail a été le premier réalisé sur la thématique de SERS au laboratoire et a été initialement envisagée comme une étude de faisabilité au regard des nombreux défis à relever autour de l'obtention de NPs, leur caractérisation et de la maîtrise des paramètres expérimentaux d'acquisition spectrale pour s'approprier cette technique. Les premiers objectifs de ce travail ont été d'être capable de synthétiser des NPs sphériques sous la forme de suspensions colloïdales, de les utiliser pour exalter le signal Raman d'un analyte choisi grâce au phénomène SERS, de mettre en évidence cette exaltation, d'optimiser les conditions expérimentales d'analyse et de construire des modèles prédictifs de la concentration en analyte à partir de l'intensité des signaux mesurés en SERS et à partir de lots de NPs différents. Dans ce travail, nous avons choisi d'analyser un anticancéreux : le 5-fluorouracile (5FU). Il s'agit d'un antimétabolite, analogue des bases azotées qui possède une base pyrimidique ayant une bonne affinité pour les AgNPs. Le 5FU est très largement utilisé en thérapeutique et est indiqué dans les cancers solides comme les cancers colorectaux, les adénocarcinomes du sein et de l'ovaire, les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures et œsophagiens. Il est également à l'origine d'effets indésirables fréquents qui surviennent chez 15 à 40 % des patients traités. Ces effets indésirables sont potentiellement graves et peuvent être mortels dans 1 % des cas, ce qui pourrait représenter selon l'INCa 1 000 décès annuels [135]. De plus, il existe une forte variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique du 5FU, qui s'explique en partie par un polymorphisme des gènes qui codent pour la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), enzyme responsable de près de 80 % du catabolisme du 5FU. Ainsi la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (SFPT) recommande, en plus de la mesure de l'activité de la DPD avant de débiter le traitement, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) du 5FU. Cette mesure a pour but d'éviter tout risque de sous ou sur dosage, responsable d'une inefficacité thérapeutique ou d'une toxicité majorée du traitement [136]. Plusieurs techniques de dosage du 5FU existent avec des limites de détection comprises entre 6 et 150 ng.mL<sup>-1</sup> et sont réalisées par des techniques de chromatographie liquide couplées à une détection dans l'UV ou par spectrométrie de masse en tandem [137]. De telles techniques sont onéreuses et demandent du personnel qualifié. Disposer d'un nouvel outil d'analyse capable de doser en temps réel le 5FU avec une préparation limitée de l'échantillon par du personnel non spécialisé constitue un réel défi analytique et une alternative intéressante aux techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse. Dans un premier temps, nous avons voulu améliorer la sensibilité et les performances quantitatives par rapport à la SR qui présente une limite basse de quantification de 1,47 mg.mL<sup>-1</sup> [59]. Sur la base des travaux de Farquharson [119], nous avons choisi une gamme de concentrations

comprise entre 1 et 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  correspondant aux concentrations retrouvées dans la salive.

Cette étude se veut être un travail préliminaire pour évaluer la faisabilité d'une quantification en SERS afin de se confronter aux divers obstacles de la SERS et d'identifier les points critiques dans le développement d'une technique quantitative en SERS.

## **2.1 CHOIX ET SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'ARGENT**

La synthèse de NPs sphériques en suspension reste une technique de synthèse particulièrement utilisée car elle permet d'obtenir de manière rapide une quantité importante de NPs. Malgré la simplicité apparente de cette synthèse, de nombreux protocoles existent et illustrent les difficultés de synthétiser des NPs de taille et de forme reproductible [138–144]. En outre les options commerciales de nanosuspensions colloïdales affichent des variabilités sur la taille des NPs de l'ordre de 15 à 20 % (CV %). Ce point est en effet un paramètre clé dans l'analyse en SERS : des variations, même faibles en taille et en forme des NPs, peuvent entraîner de grandes variations d'amplification du signal Raman. En effet, le signal Raman est principalement exalté à proximité des points chauds, eux-mêmes liés à la structure des NPs produites. Nos premières expérimentations en SERS avaient pour but l'optimisation des paramètres de synthèse afin de standardiser le procédé dans le but d'obtenir de façon reproductible des NPs de taille et de forme homogène. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nanoparticules colloïdales d'argent AgNPs car elles possèdent, comme cela a été mentionné dans la partie 1.2, le plus fort pouvoir d'exaltation. La méthode suivie fut celle de Lee & Meisel [96] dont la figure 14 reprend le schéma général. Le sel métallique d'argent de degré d'oxydation un est d'abord dissout puis réduit par le citrate pour donner des atomes métalliques de valence zéro ( $\text{Ag}^0$ ) qui s'agrègent pour former le noyau de la nanoparticule (phase de nucléation). Les noyaux formés peuvent alors croître (phase de croissance) en adsorbant de nouveaux atomes métalliques et former des NPs métalliques. Les ions citrate en solution se fixent à la surface des NPs et jouent également le rôle d'agent stabilisant en favorisant la répulsion des NPs et évite leur agrégation.

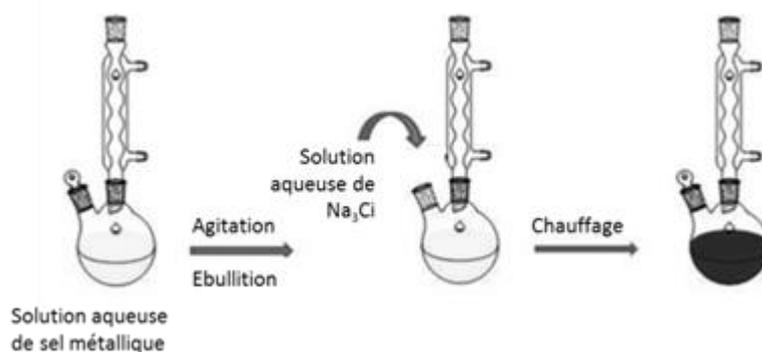


Figure 14 : Schéma général de la synthèse de nanoparticules sphériques d'argent selon le procédé de Lee & Meisel ( $\text{Na}_3\text{Ci}$  : citrate trisodique).

En collaboration avec l'Institut de Chimie Physique de l'Université Paris Sud (UMR 8000, CNRS), nous avons travaillé sur la reproductibilité de synthèse des NPs. Chaque étape de la synthèse a été standardisée et optimisée pour minimiser la variabilité en taille, forme et charge des NPs. Ainsi, 18 mg de nitrate d'argent cristallisé sont pesés puis dissous dans 100 mL d'eau ultrapure et introduits dans un ballon tri-col. Le mélange est porté à ébullition, par chauffage à 180 °C, à l'aide d'un chauffe-ballon électrique muni d'un agitateur magnétique et d'un montage à reflux. Une fois l'ébullition atteinte, 2 mL d'une solution de citrate trisodique dihydraté à 1 % préparée quotidiennement est ajoutée à un débit constant de  $150 \text{ mL.h}^{-1}$  à l'aide d'un pousse seringue électrique. Le mélange est maintenu à ébullition, sous agitation constante à 500 rpm pendant une heure. La solution ainsi obtenue est laissée à refroidir pendant une heure à température ambiante. Pour l'ensemble des synthèses, la verrerie est dédiée et rigoureusement nettoyée à l'eau régale (mélange acide chlorhydrique 37 %, acide nitrique 65 % dans un rapport volumique 3 :1) puis à l'eau ultra-pure entre chaque utilisation. Afin d'évaluer la reproductibilité de synthèse, cinq synthèses consécutives ont été réalisées et caractérisées en spectroscopie UV-visible (figure 15) avec un  $\lambda_{\text{max}}$  moyen à 408,4 nm [407,7 - 409,2 nm] (CV% = 0,5%) et une FWHM égale à 94,6 nm [92,3 - 96,9 nm] (CV% = 6,5%) et en DLS pour une taille moyenne des NPs de 53,1 nm [52,2-54,0 nm]. De nombreux ajustements ont été nécessaires à la maîtrise de cette synthèse. Au vu de nos résultats, il apparaît essentiel de maîtriser la reproductibilité de l'agitation, la température, le débit d'ajout du citrate et le nettoyage à l'eau régale. La maîtrise de ces paramètres a permis d'obtenir un procédé de synthèse reproductible selon les paramètres que nous avons mesurés en spectroscopie UV-visible et en DLS comme présenté précédemment.

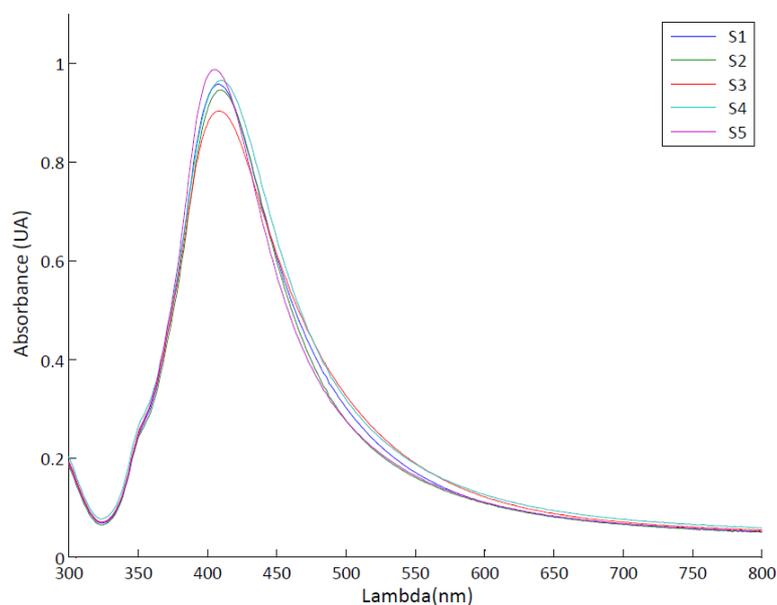


Figure 15 : Spectres UV-visible issus de 5 lots de nanoparticules sphériques d'argent obtenus après optimisation des paramètres de synthèse (vitesse d'agitation = 500 rpm, débit d'ajout du citrate 1% = 2,5 mL.min<sup>-1</sup>, température de chauffage = 180 °C).

Par la suite, un changement de protocole visant à synthétiser un volume de suspension d'AgNPs plus important (250 mL) a été réalisé. Malgré des résultats notamment en termes de reproductibilité concluant jusque-là et ce malgré le respect des proportions de chacun des réactifs introduits, un changement de matériel (ballon neuf, nouveau chauffe-ballon avec contrôle rigoureux de la température, de la cinétique de chauffage et de l'agitation) ainsi qu'un changement de lieu de production des NPs a montré le caractère très peu reproductible de cette synthèse. Dans les nouvelles conditions de production plusieurs lots ont été réalisés sans maîtrise de la reproductibilité. Ces lots de NPs de faible reproductibilité ont cependant été utilisés pour la construction d'un modèle quantitatif pour le dosage du 5FU. Ce travail avait pour but d'évaluer l'effet synthèse ou autrement dit l'impact de la variabilité des NPs des différents lots sur le signal spectral en SERS, son impact sur les modèles de quantification et le cas échéant d'utiliser des outils mathématiques à même de réduire les erreurs de prédictions liées à la synthèse.

## 2.2 OPTIMISATION EXPERIMENTALE

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser les conditions expérimentales afin d'obtenir le signal Raman le plus intense. Nous avons d'abord choisi d'agréger la suspension en utilisant un sel. Le NaCl étant un des solutés de dilution les plus utilisés dans la préparation des médicaments anticancéreux

injectables, son utilisation a été privilégiée. Les conditions d'agrégation ont également été optimisées lors d'une étape préliminaire. L'acquisition spectrale a été réalisée après le mélange successif de la suspension de NPs, la solution aqueuse de 5FU puis de l'agent d'agrégation. Le volume de la suspension d'AgNPs a été fixé à 200  $\mu\text{L}$  (niveau minimum de remplissage des vials utilisés pour permettre la mesure Raman). Le volume de NaCl a été fixé à 10  $\mu\text{L}$  afin de limiter le phénomène de dilution. L'optimisation du volume de 5FU (50, 100 et 200  $\mu\text{L}$ ) et de la concentration du NaCl (0,5, 1 et 2 M) a été réalisée par un plan d'expériences complet à deux facteurs, trois niveaux. L'optimum a été obtenu avec 10  $\mu\text{L}$  de NaCl 1 M et un volume de 5FU de 100  $\mu\text{L}$ . Ces essais ont permis de mettre en évidence l'exaltation du signal Raman, en SERS (figure 16), d'un facteur  $10^4$  pour la bande la plus intense à  $786\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la vibration du cycle pyrimidique. Le facteur d'exaltation a été mesuré à partir du spectre Raman du 5FU à une concentration de  $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour avoir un signal Raman interprétable et du spectre SERS du 5FU à la concentration  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

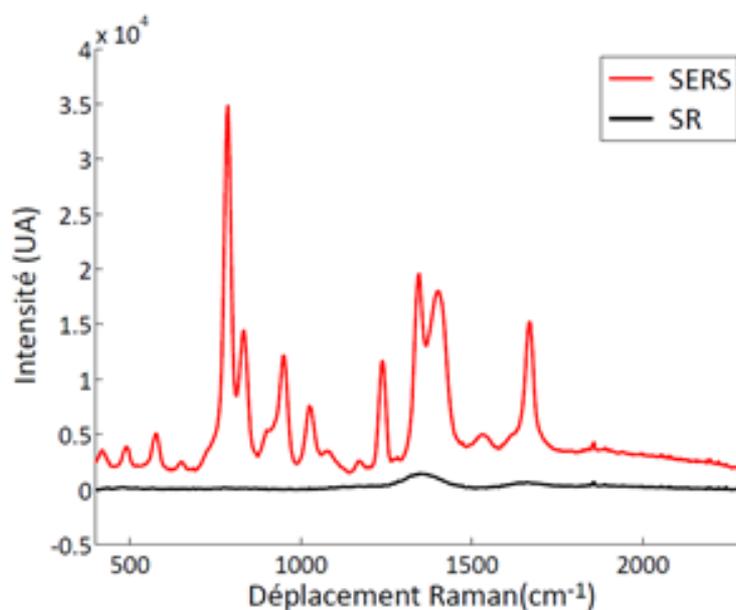


Figure 16 : Spectres du 5FU à  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtenus en spectroscopie Raman (SR) et en diffusion Raman exaltée de surface (SERS) dans les conditions optimales d'acquisition après correction de la ligne de base.

A partir des conditions expérimentales optimisées, différents essais sur une gamme de concentrations de 1 à  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ont été entrepris. L'optimisation du signal ainsi que les essais aux différentes concentrations ont permis de montrer l'influence de nombreux paramètres, comme, le pH du milieu d'analyse, l'ordre d'introduction des différents réactifs ou encore les conditions d'acquisition spectrale (temps de contact 5FU/NPs et temps d'acquisition). Ainsi lors de nos premiers essais et de façon surprenante, nous avons constaté une diminution du signal du 5FU lorsque sa concentration augmentait pour des concentrations comprises entre 1 et  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

(figure 17). Ce résultat peut s'expliquer par les variations de pH de la solution analysée. En effet, plus la solution de 5FU analysée est concentrée, plus le pH de la solution finale est alcalin. La figure 18 exploitant la bande à  $786\text{ cm}^{-1}$  montre une décroissance du signal lorsque la concentration en 5FU augmente, démontrant une diminution de l'interaction entre NPs et le 5FU pour des concentrations croissantes de 5FU.

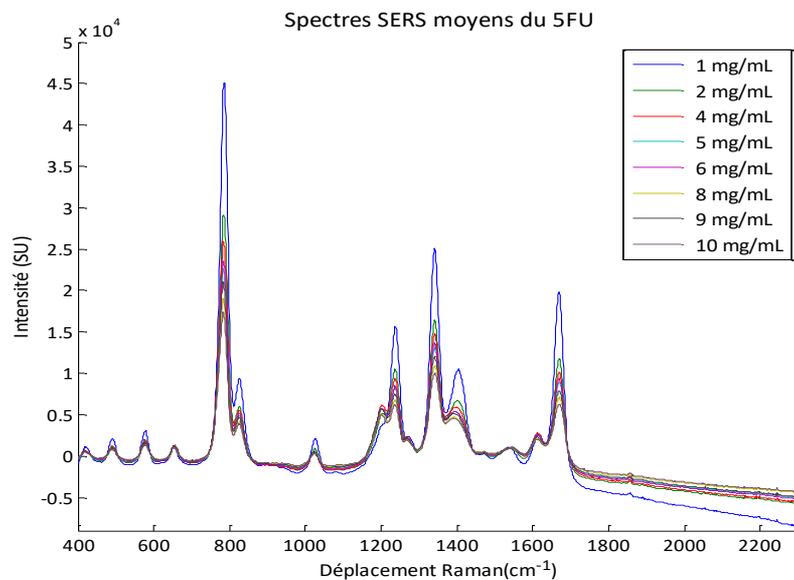


Figure 17 : Spectres moyens du 5FU des concentrations de la gamme étudiée pendant la phase d'optimisation des conditions expérimentales.

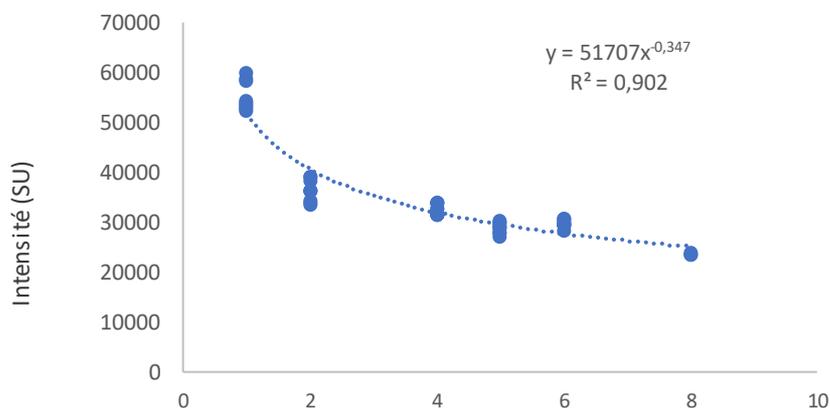


Figure 18 : Évolution de l'intensité de la bande à  $786\text{ cm}^{-1}$  en fonction de la concentration en 5FU.

L'exaltation du signal Raman est un phénomène de surface pour lequel l'interaction entre la surface des NPs et l'analyte à analyser est primordiale. La molécule doit être suffisamment proche de la NPs pour pouvoir bénéficier de l'amplification local du champ électromagnétique. La configuration du citrate à la surface d'AgNPs

synthétisées par réduction par le citrate a été proposée par Munro [145] comme représenté sur la figure 19.

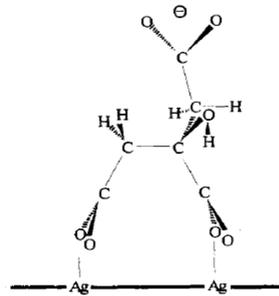


Figure 19 : Représentation d'une molécule de citrate à la surface d'une nanoparticule d'argent [145].

Cette modélisation illustre que la surface des NPs produites par réduction du nitrate d'argent par le citrate de sodium est recouverte de molécules de citrate chargées négativement. L'état de charge des NPs permet de comprendre qu'elles ont une affinité particulière pour les molécules chargées positivement et vont repousser les molécules chargées négativement. Les suspensions nanocolloïdales d'argent ont un pH autour de 7,0. La solution commerciale de 5-fluorouracile utilisée a un pH compris entre 8,6 à 9,4 [146]. Le 5FU est un acide faible de pKa égal à 8,02 [147], ce qui signifie qu'il est majoritairement sous sa forme chargée au pH de la solution commerciale (figure 20). En considérant le pH de la solution commerciale, plus la concentration de la solution analysée est élevée, plus celle-ci a un pH alcalin et donc plus les NPs et le 5FU sont chargés négativement limitant ainsi leur interaction et l'exaltation du signal. *A contrario*, plus la solution de médicament est diluée dans de l'eau, plus le pH est neutre ou proche de celui de la solution de NPs. Le signal sera donc plus intense pour des plus faibles concentrations de 5FU.

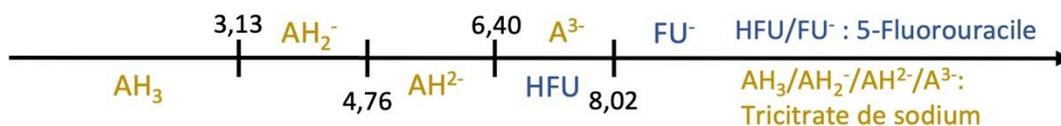


Figure 20 : Diagramme de pH pour le citrate en surface des NPs (noté AH<sub>3</sub>, AH<sub>2</sub><sup>-</sup>, AH<sup>2-</sup>, A<sup>3-</sup>) et le 5-fluorouracile (HFU/FU<sup>-</sup>).

Pour une interaction optimale entre les NPs et le 5FU, les molécules de 5FU doivent être sous forme protonée, non chargée. C'est-à-dire à un pH inférieur à pKa – 1 du 5FU, soit inférieur à un pH 7,0.

A partir de ces résultats préliminaires, nous avons décidé de médier l'agrégation par modulation du pH plutôt que par agrégation saline. Dans cette nouvelle étude,

nous avons voulu également démontrer que le gain en sensibilité mesuré en SERS permettait la quantification de concentrations de 5FU plus basses. Ainsi, nous avons construit des gammes de concentrations de 1 à 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Les concentrations en 5FU analysées étant plus basses, l'effet de l'ajout de la solution de 5FU sur le pH est moins important. Finalement, il a été décidé d'utiliser une solution tampon de citrate de molarité égale à 0,0125 M pour limiter les variations de pH lors de l'ajout du 5FU. L'optimisation du pH de la solution tampon s'est ensuite faite en testant des pH proches des pKa du citrate. L'optimisation expérimentale a montré qu'à pH = 6,0, l'intensité du signal en SERS du 5FU était maximale, c'est donc ce pH qui a été sélectionné. Il est à noter que l'ajout du tampon citrate a un impact sur la force ionique de la solution ainsi que sur le pH. Ces deux paramètres ont un impact sur l'agrégation des AgNPs nécessaire à l'exaltation. Nous avons constaté que l'agrégation générée par le tampon citrate à 0,0125 M pour les pH < 6,0 était trop importante conduisant à une sédimentation des agrégats et une perte de signal très rapide. Dans ces nouvelles conditions, les volumes des différents réactifs ont été optimisés de façon empirique et les conditions retenues sont les suivantes : un volume de la suspension d'AgNPs de 500  $\mu\text{L}$  est ajouté à un volume de la solution de 5FU de 100  $\mu\text{L}$ , après 30 secondes d'agitation un volume de solution tampon citrate 0,0125 M, pH = 6,0 de 50  $\mu\text{L}$  est ajouté.

Le temps de contact nécessaire entre AgNPs / 5FU / tampon a également été optimisé. Ainsi nous avons suivi l'évolution du signal SERS au cours du temps de 0 à 30 min. L'intensité du signal Raman augmente durant les premières minutes avant une stabilisation, puis une diminution du signal. En conséquence, le temps de contact avant d'effectuer la mesure Raman a été fixé à 8 min.

L'ensemble des analyses SERS a été réalisé sur un spectromètre Mira-1<sup>®</sup> (Metrohm, France, figure 21) équipé d'une source laser à 785 nm et une résolution de 12 à 14  $\text{cm}^{-1}$  pour un domaine spectral de 400 à 2300  $\text{cm}^{-1}$ . Il s'agit d'un spectromètre portable, tactile et d'utilisation intuitive, utilisable par du personnel non expérimenté, ce qui facilite son utilisation en routine.

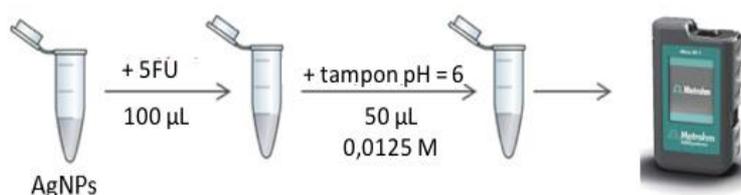


Figure 21 : Séquence d'analyse d'un échantillon de 5-fluorouracile en SERS avec un spectromètre Raman portable. Nanoparticules d'argent (AgNPs, volume = 500  $\mu\text{L}$ ), 5-fluorouracile (5FU, volume = 100  $\mu\text{L}$ ), tampon citrate (0,0125 M, pH = 6, volume = 50  $\mu\text{L}$ ).

### **2.3 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE QUANTITATIF POUR L'ANALYSE SERS DU 5-FLUOROURACILE PRENANT EN COMPTE LA VARIABILITE INTERLOTS DES NANOPARTICULES D'ARGENT**

La démarche de ce travail a été le développement d'un modèle quantitatif en SERS à partir de plusieurs lots de NPs colloïdales produits par une méthode de synthèse standardisée et optimisée. L'analyse quantitative en SERS est peu décrite dans la littérature et se limite le plus souvent à un seul lot de NPs pour la construction des modèles de quantification. L'objectif de ce travail était de montrer, malgré une variabilité importante des NPs, que des modèles mathématiques adaptées peuvent être proposés pour construire des modèles de prédiction quantitatifs performants. Ce type d'analyse en SERS reste peu répandue tant la synthèse de NPs est difficile à contrôler et le signal SERS peu reproductible. Développer un tel modèle a d'abord nécessité l'optimisation de la synthèse d'AgNPs comme explicité dans la précédente partie. Les synthèses de NPs sphériques en suspension colloïdale, bien que d'aspect simple, reste donc difficile à maîtriser et des variations mineures du procédé, du matériel ou des locaux, peuvent avoir un impact majeur sur la reproductibilité du processus et des caractéristiques en taille et en forme des NPs produites.

Le jeu de données a été construit à partir de six lots de synthèse d'AgNPs et des conditions expérimentales optimales décrites précédemment, comme présenté dans la figure 22. Un total de 432 spectres a été mesuré en incluant huit concentrations de 1 à 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , six gammes, trois répétitions de l'expérience SERS et trois mesures successives par échantillon. Le jeu de données a ensuite été successivement randomisé en 2/3 pour la construction des modèles de prédictions et 1/3 pour la validation des modèles comme recommandé par l'EMA. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Talanta et s'intitule : « *A mathematical approach to deal with nanoparticle polydispersity in surface enhanced Raman spectroscopy to quantify antineoplastic agents* ». Les modèles statiques réalisées pour cette étude ont été développés en collaboration avec les Dr. Marc Lavielle et Tom Rhomer de l'Equipe XPOP (équipe mixte INRIA – Ecole polytechnique) du Centre de Mathématiques appliquées de l'École Polytechnique.

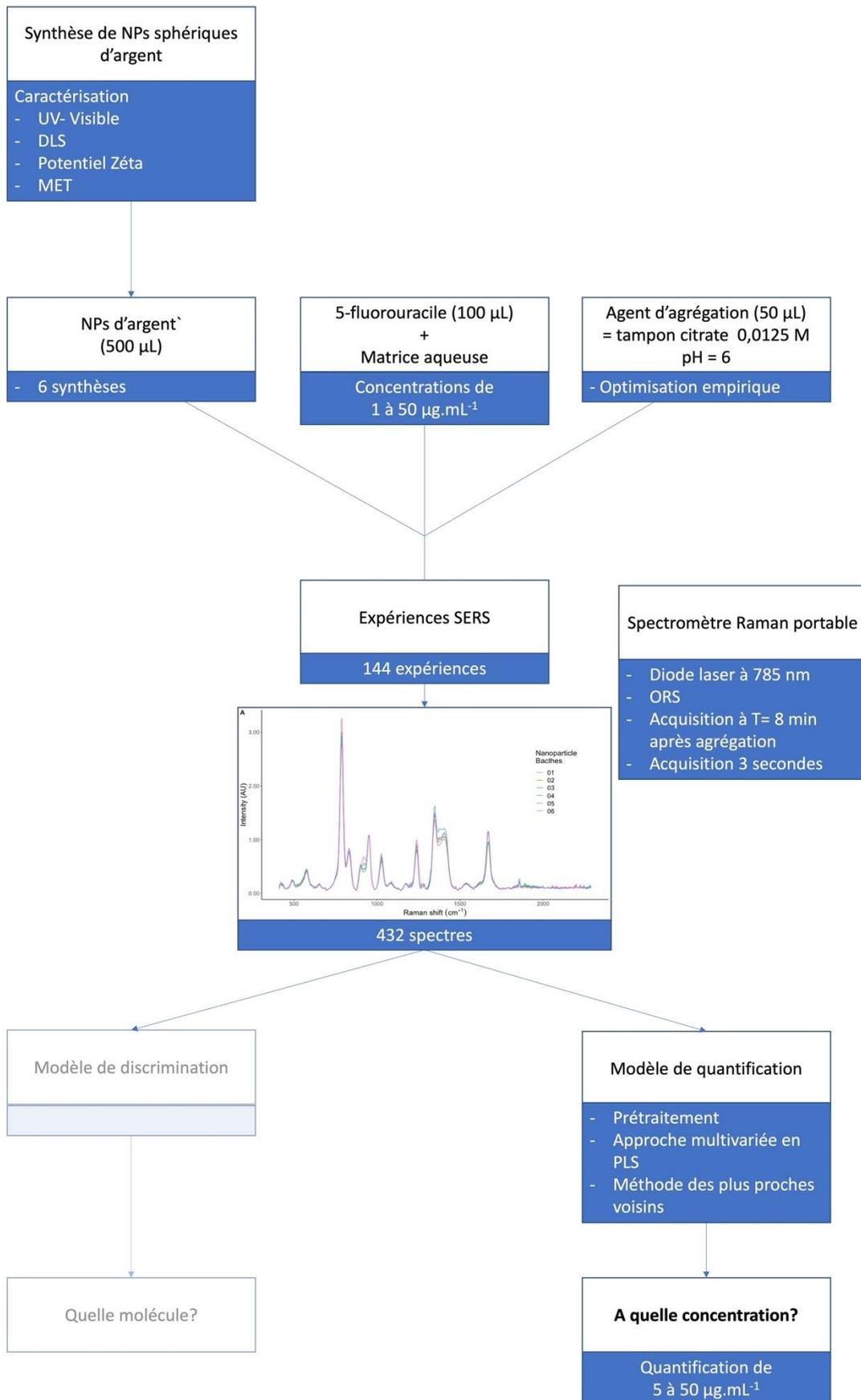


Figure 22 : Logigramme illustrant la stratégie d'analyse pour la quantification du 5-fluorouracile en SERS à partir de six lots de nanoparticules sphériques d'argent.

*A mathematical approach to deal with nanoparticle polydispersity in surface enhanced Raman spectroscopy to quantify antineoplastic agents*

Antoine Dowek<sup>1,2</sup>, Laetitia Minh Mai Lê<sup>1,2</sup>, Tom Rohmer<sup>3,4</sup>, François-Xavier Legrand<sup>5</sup>, Hynd Remita<sup>6</sup>, Isabelle Lampre<sup>6</sup>, Ali Tfayli<sup>2</sup>, Marc Lavielle<sup>3,4</sup>, Eric Caudron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service de Pharmacie, Hôpital européen Georges Pompidou, APHP.Centre Université-Paris, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.

<sup>3</sup>Inria, France.

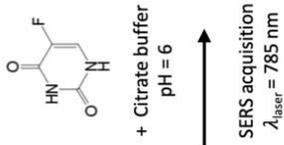
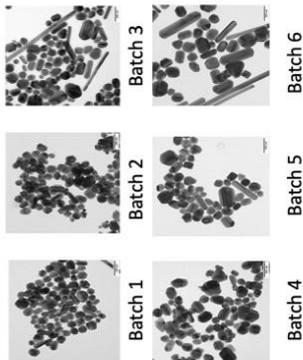
<sup>4</sup>CMAP, Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, France.

<sup>5</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296, Châtenay-Malabry, France.

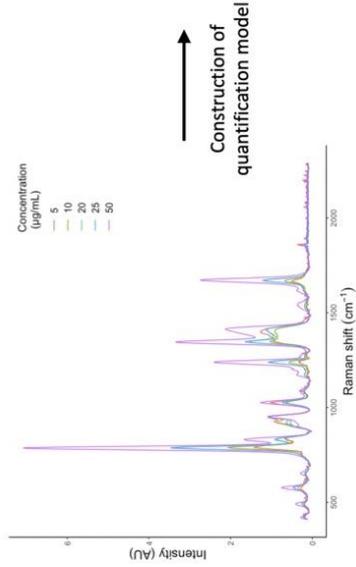
<sup>6</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, UMR 8000, 91405, Orsay, France.

Corresponding author: Antoine Dowek, antoine.dowek@universite-paris-saclay.fr

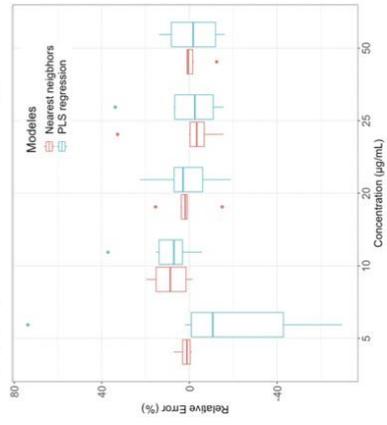
**Silver nanoparticles syntheses**



**SERS spectra**



**Improvement of prediction performances by appropriate mathematical approach**



## **ABSTRACT:**

Antineoplastic agents are, for most of them, highly toxic drugs prepared at hospital following individualized prescription. To protect patients and healthcare workers, it is important to develop analytical tools able to identify and quantify such drugs on a wide concentration range. In this context, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) has been tested as a specific and sensitive technique. Despite the standardization of the nanoparticle synthesis, a polydispersity of nanoparticles in the suspension and a lack of reproducibility persist. This study focuses on the development of a new mathematical approach to deal with this nanoparticle polydispersity and its consequences on SERS signal variability through the feasibility of 5-fluorouracil (5FU) quantification using silver nanoparticles (AgNPs) and a handheld Raman spectrophotometer. Variability has been maximized by synthesizing six different batches of AgNPs for an average size of 24.9 nm determined by transmission electron microscopy, with residual standard deviation of 17.0 %. Regarding low performances of the standard multivariate data processing, an alternative approach based on the nearest neighbors were developed to quantify 5FU. By this approach, the predictive performance of the 5FU concentration was significantly improved. The mean absolute relative error (MARE) decreased from 16.8 % with the traditional approach based on PLS regression to 6.30 % with the nearest neighbors approach (p-value < 0.001). This study highlights the importance of developing mathematics adapted to SERS analysis which could be a step to overcome the spectral variability in SERS and thus participate in the development of this technique as an analytical tool in quality control to quantify molecules with good performances, particularly in the pharmaceutical field.

Key words: Surface Enhanced Raman Spectroscopy, quantitative analysis, antineoplastic agents, nanoparticle polydispersity, non-linear regression

## **INTRODUCTION**

According to the World Health Organization (WHO), cancer is globally the second leading cause of death in 2018, and about one in six deaths is due to cancer. Different strategies are used to treat cancer. The main treatments involve surgery, chemotherapy, immunotherapy, targeted therapy and/or radiotherapy. Although oral treatments tend to develop, chemotherapy is mainly administered by injectable route in healthcare settings. Those drugs are individually prepared in aseptic conditions in specific units, under pharmaceutical supervision in accordance with the medical prescription. In order to limit toxic effects, antineoplastic drug doses are adjusted for each patient according to the type of cancer, their weight, body surface area and clinical condition. Commercialized formulations in the form of freeze-dried powder or high concentrations of drugs are dissolved and/or diluted with sodium chloride (NaCl 0.9 %) or glucose 5 % to obtain the appropriate concentration prescribed by physicians. A control has to be performed on these preparations, in order to guarantee to the patient the right drug at the right dose and therefore reduce medication errors and their consequences, which can lead to increased risk of morbidity and mortality. Even if analytical control of individualized cytotoxic preparations is not required by pharmaceutical regulations, different strategies of control [1] have been developed to ensure the chemical and physical quality of preparations before administration to patient. As a non-invasive, non-destructive and rapid technique, Raman spectroscopy was recently explored to control antineoplastic drug preparations [2–6]. Despite the optimization of this technique, Raman spectroscopy use remains limited by laser-induced fluorescence and low Raman sensitivity that limit the analysis of drugs at low concentrations. Raman spectroscopy was therefore associated to metallic nanoparticles to enhance the spectral signal of the molecule [7]. This technique known as Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) represents a promising tool to analyze drugs at low concentrations. Although the SERS theory is still not perfectly understood, two types of contributions are described in the SERS exaltation [8]: a main contribution independent of the probed molecule due to electromagnetic phenomena induced by the interaction of the laser with metallic nanoparticles, and a low contribution due to chemical mechanisms depending on the nature of the molecule that involve the formation of new molecular states and chemical bonds by direct interaction with the SERS surface. Various metallic nanostructures are described for producing SERS signal [9,10], they are called SERS substrates. In recent years, researches have resulted in extremely low detection limits [11] largely compatible with the analysis of pharmaceutical product. Despite numerous approaches studied to use SERS in pharmaceutical and medical domain [12], only few studies reported consistent SERS analysis for the quantification of analyte [13–15]. The limited number of quantitative studies available reflects the complexity of SERS analysis. Currently, the most important bottleneck remains the management of signal variability induced mainly by two phenomena: the difficulty of synthesizing SERS substrates in a reproducible manner and controlling the contact between the analyte and the SERS

substrate. Although optimization of these steps is possible, it is to be expected that a latent variability still remains. This work is therefore a feasibility study on the various key points to be mastered in SERS analysis, specifically on the data processing, in order to minimize the spectral variability, allowing the quantification of anti-cancer drugs at low concentrations.

In this study, 5-fluorouracil (5FU), one of the main antineoplastic drug used to treat solid tumors and colorectal carcinoma [16], has been analyzed. It is an antimetabolic drug with a pyrimidine ring known to respond in Raman spectroscopy and SERS [17]. Previous studies have established a low limit of quantification (LLOQ) for 5FU in Raman Spectroscopy of 1.47 mg/mL [4] while the low limit of detection (LOD) in SERS has been set at 0.15 ng/mL using silver doped sol-gel as SERS substrate [18]. To introduce variability in our spectral data, six consecutive batches of silver nanoparticles in suspension (AgNPs) were prepared and used without size or shape variability criteria, then an experimental protocol was optimized. Finally, two data processing methods were employed: a standard multivariate approach by partial least square (PLS) regression, and a new mathematical approach trying to reduce spectral variability between batches of AgNPs.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **CHEMICALS**

Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ , crystal, European Pharmacopeia quality) was obtained from Cooper (Melun, France). Trisodium citrate dihydrate ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , European Pharmacopeia quality, 98 %) was obtained from VWR Chemicals (Leuven, Belgium). Citrate buffer were prepared with citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , European Pharmacopeia quality, Merck, Darmstadt, Germany) and sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ , European Pharmacopeia quality, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France). The pharmaceutical formulation of 5-fluorouracil at 50 mg/mL (5FU, PubChem CID: 3385) was obtained from Teva (La Defense, France). Ultra-pure water was generated from Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Aqua Regia used to clean up glassware was obtained by mixing 3 volumes of hydrochloric acid 37 % ( $\text{HCl}$ , European Pharmacopeia quality, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France) and 1 volume of nitric acid 65 % ( $\text{HNO}_3$ , suprapur, Merck, Darmstadt, Germany).

### **SILVER NANOPARTICLES (AGNPs) SYNTHESIS**

The AgNPs used for SERS measurements were synthesized according to the modified Lee and Meisel method [19]. Briefly and each day, 45 mg of  $\text{AgNO}_3$  were dissolved in 250 mL of ultra-pure water and heated to the boiling point. Then, 2.5 mL of a freshly prepared 2 % trisodium citrate (w/v) solution, used as a reducing agent, was added to the  $\text{AgNO}_3$  solution at a flow rate of 2.5 mL/min with vigorous stirring at 500 rpm. The mix solution was left to boil for one hour while refluxing to obtain AgNPs suspension. Prior to each synthesis, all glass material was cleaned with aqua regia. Six independent batches of AgNPs were prepared according to this protocol.

### **CHARACTERIZATION OF AGNPs**

The six batches of AgNPs were characterized by three complementary techniques: transmission electron microscopy (TEM), UV-visible spectroscopy (UV-Vis) and Dynamic Light Scattering (DLS). Drops of nanoparticle suspensions were deposited onto freshly glow-discharged carbon-coated Cu grids. Samples were observed with a JEM 2100-Plus microscope (JEOL, Croissy, France) operating at 200 kV. The electron microscopy images were recorded with a Rio 16 (Gatan<sup>®</sup>) camera. The average AgNPs size was calculated with ImageJ software based on the measurement of 200 AgNPs for each synthesis, measured on different fields. UV-visible spectra from 300 nm to 800 nm of the AgNPs suspension were recorded with one cm path length plastic cells using a Varian Cary 50 UV-Vis (Agilent, Les Ulis, France) and ultra-pure water as reference sample. AgNPs suspensions were diluted ten times with ultrapure water before analysis. Based on UV-Vis spectra, the maximum wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) and the full width half maximum (FWHM) were determined to characterize the size of the nanoparticles and their dispersion respectively. The hydrodynamic diameter of particles was

determined at 25°C by DLS using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) operating at fixed scattering angle at 90°. Measurements were performed in disposable 4 mL cuvettes with 1 cm optical pathway and four optical faces (Sarstedt, Marnay, France) containing an appropriate volume (1 mL) of sample.

The mean results were expressed by the 95 % confidence interval (CI95) and the residual standard deviation (RSD).

#### **SAMPLE PREPARATION BEFORE SERS ANALYSIS**

SERS signal enhancement was first optimized. The pH of the 5FU commercialized solution used is around 9.0. At this pH, the 5FU is negatively charged as well as AgNPs due to citrate at their surface [20]. At pH 9.0, repulsion between 5FU and AgNPs occurs. To promote interactions between 5FU and AgNPs, pH was lowered to make the 5FU neutral and promote AgNPs aggregation. Three different pH values (pH 3.0, 4.0 and 6.0) close to the pKa of citrate were tested for a 5FU solution at 1 mg/mL. Citrate buffer was chosen to avoid adding new chemical specie to the mixture. The maximal SERS signal enhancement was obtained for a buffered pH of 6.0.

The 5FU solutions were prepared by diluting the stock solution in ultra-pure water to obtain solutions from 1 to 50 µg/mL. SERS samples were prepared by adding 100 µL of 5FU solution to 500 µL of freshly prepared AgNPs suspension and vigorously shaking for five seconds. Then, 50 µL of 12.5 mM citrate buffer at pH 6.0 were added to the mixture and stirred for 5 seconds. The same operator prepared a total of six series of SERS samples, one set per day for six days.

#### **RS AND SERS MEASUREMENTS**

Spectra were acquired using the handled Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA, Metrohm, France) equipped with a 785 nm diode generating a maximum of 75 mW on the sample. Analyses were performed using the vial module at a focal length of 0.85 mm using the orbital raster scan (ORS) system. SERS signals were acquired from 400 cm<sup>-1</sup> to 2,300 cm<sup>-1</sup> with a spectral resolution between 12 cm<sup>-1</sup> to 14 cm<sup>-1</sup>. Samples were analyzed in glass vials in triplicate. SERS spectra were acquired after 8 minutes of contact time in order to stabilize SERS signal. The acquisition time was 3 sec with 3 accumulations.

The enhancement of the Raman intensity was estimated by the enhancement factor (EF) [21]. EF is defined by the equation (1) and equates to the ratio of intensities obtained with SERS and Raman conditions corrected by the concentrations. EF was calculated under the same SR and SERS experimental conditions for 5FU at 50 mg/mL for RS acquisition and 5 µg/mL for SERS acquisition.

$$EF = \frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{RS}/C_{RS}} \quad (1)$$

## QUANTITATIVE ANALYSIS

### PARTIAL LEAST SQUARES REGRESSION

In order to develop a quantitative model to predict the 5FU concentration in SERS analysis, a multivariate linear approach based on PLS regression was first explored as the standard method largely used in spectral data processing. PLS consists in constructing the regression model as presented in equation (2), where Y is the response matrix (*i.e.* concentrations), X a matrix of predictors, B a matrix of coefficients and E a residual matrix.

$$Y = XB + E \quad (2)$$

The objective is to construct new variables, called latent variables (LVs), which are linear combinations of initial variables that contain most of the variability and that best correlate these new variables to the response being studied. This technique is particularly appreciated for the processing of spectral data because it allows to get rid of collinearity phenomena and to quickly and concisely visualize the most important spectral areas, *i.e.* those which have the most weight in the construction of the model. According to European Medicines Agency (EMA)[22] all the data were divided into two distinct datasets: a calibration dataset to construct the model and to find the regression coefficients and then a validation dataset for calculation of predictive performance. To illustrate the impact of the AgNPs batches on the predictive performance, different calibration datasets were consecutively constructed with SERS intensities from five batches of AgNPs, the intensities from the last batch serving as validation dataset. In order to construct calibration model with the maximum of robustness and to choose the appropriate number of LVs, a k-fold cross validation was used and consisting to extract randomly k groups of ten spectra from the calibration dataset as a test set to calculate root mean square error of cross validation (RMSECV). A permutation test was then applied to choose the right number of LVs such as no difference between two consecutive RMSECV was calculated.

### NON-LINEAR REGRESSION

Because variability in response across batches of AgNPs was expected, an alternative approach was explored. The objective was to find the function *f* which best fitted the SERS intensities for different concentrations of 5FU and different wavenumbers.

Let  $y_{ijk\ell}$  be the intensity for the  $i^{th}$  series, the  $j^{th}$  concentration of 5FU  $c_j$ , the  $k^{th}$  repetition and the  $\ell^{th}$  wavenumber. Then, the regression model writes

$$y_{ijk\ell} = f(c_j, \theta_{i\ell}) + e_{ijk\ell} \quad (3)$$

where  $\theta_{i\ell}$  a vector of parameters and  $e_{ijk\ell}$  the residual error. Regarding the large concentration range investigated, the following nonlinear regression based on a sigmoidal model was selected (equation (4)).

$$f(c, \theta_{i\ell}) = S_{i\ell} + \frac{(A_{i\ell} - S_{i\ell})}{1 + \exp(-\gamma_{i\ell} (\log(c) - \tau_{i\ell}))} \quad (4)$$

Here,  $\theta_{i\ell} = (S_{i\ell}, A_{i\ell}, \tau_{i\ell}, \gamma_{i\ell})$ , for each series  $i$  and each wavenumber  $\ell$ . The residual errors  $e_{ijk\ell}$  are assumed to be independent and to follow a Gaussian distribution

$$e_{ijk\ell} \sim \mathcal{N}(0, \sigma_{i\ell}^2)$$

where

$$\sigma_{i\ell}^2 = a_{i\ell}^2 + b_{i\ell}^2 f(c, \theta_{i\ell})^2 \quad (5)$$

Maximum Likelihood Estimation (MLE) was used with the training dataset to estimate the parameters of the model for each batch. Once the parameters estimated, an inverse problem has to be solved in order to determine the concentration of a new sample on the basis of experimental acquisition  $y_\ell^{new}$ . For each series  $i$ , the estimated concentration  $\hat{c}_i$  minimizes the weighted quadratic error:

$$e_i(c) = \sum_{\ell=1}^L \left( \frac{y_\ell^{new} - f(c, \theta_{i\ell})}{\sigma_{i\ell}} \right)^2 \quad (6)$$

$$\hat{c}_i = \text{Argmin } e_i(c)$$

Because of the important experimental variability between batches of AgNPs, only the series  $\hat{i}$  of the training dataset which is the closest from the new acquisition is selected and used for estimating the unknown concentration. In other words, the estimated concentration is  $\hat{c} = \hat{c}_{\hat{i}}$  where  $\hat{i} = \text{Argmin } e_i(\hat{c}_i)$ .

A total of 432 spectra were acquired and used to develop quantitative models. For both

models, different pre-treatments were evaluated to improve SERS spectral data such as standard normal variate (SNV), normalization by a specific band, first and second derivatives. To evaluate the predictive performance of the proposed method, the relative error (ER) and the mean absolute relative error (MARE) were calculated using  $N$  test series

$$MARE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|\hat{c}_i - c_i|}{c_i} \quad (7)$$

where  $\hat{c}_i$  is the estimated concentration and  $c_i$  the nominal concentration. The coefficient of determination  $R^2$  was also calculated, where  $R$  is the linear correlation between nominal and predictive concentrations. Finally, to compare both approaches, a statistical test based on variance analysis (ANOVA) were applied with alpha equal to 0.05. All analyses were made with R 3.6.1 software (R *Foundation for Statistical Computing*).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **CHARACTERIZATION OF AgNPs**

A total of six batches of AgNPs suspensions were synthesized and characterized.

UV-Vis spectra presented on the Fig.1 have shown important spectral differences between batches with a decrease of the maximal absorbance intensity and an increase of FWHM. The measure of  $\lambda_{\max} = 421$  nm [CI95: 411-431 nm], FWHM = 127 nm [CI95: 99-156 nm] and of maximum of absorbance with a RSD of 18.9 % confirmed these differences. DLS analyses have shown for the six batches a polydispersity index of 0.56 that is characteristic of inhomogeneous AgNPs size. The average hydrodynamic diameter was equal to 41.20 nm [CI95: 33.80 – 48.60 nm] with RSD = 17.2 %.

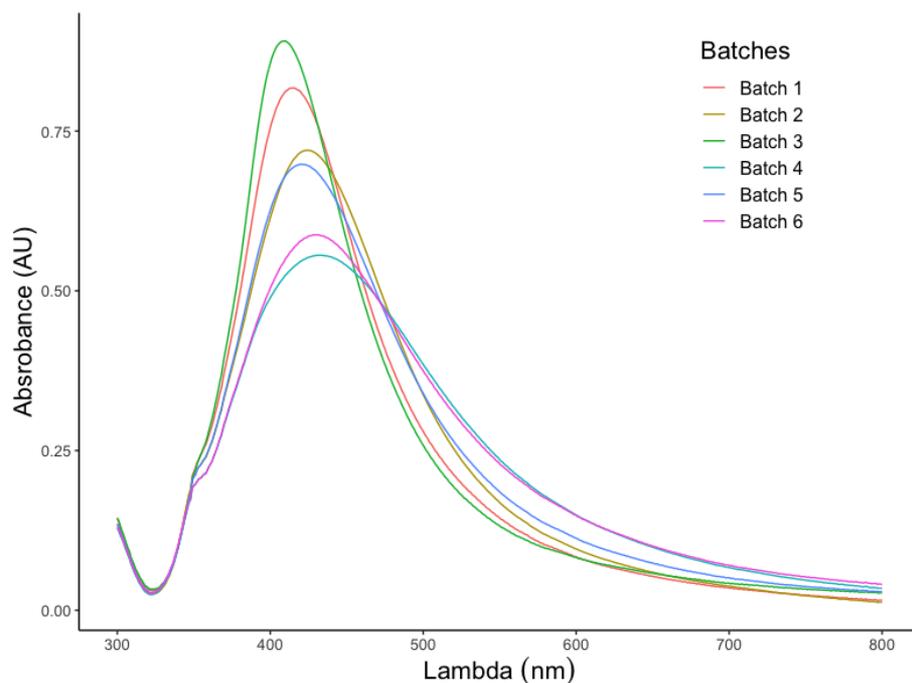


Fig. 1: UV-Vis spectra of the six silver nanoparticle batches.

Secondly samples were analyzed by TEM. TEM images (Fig.2) showed a majority of spherical AgNPs but also demonstrated the heterogeneous particles size and shape of AgNPs suspensions with nanorods or nanofilaments. The average size of AgNPs determined for spherical nanoparticles was 24.9 nm [CI95: 20.9 – 28.9 nm] (RSD 17.0 %). The repartition of size between the six AgNPs batches is represented in the Fig.2 and confirmed conclusions from UV-Vis and DLS about the variability of AgNPs from one batch to another.

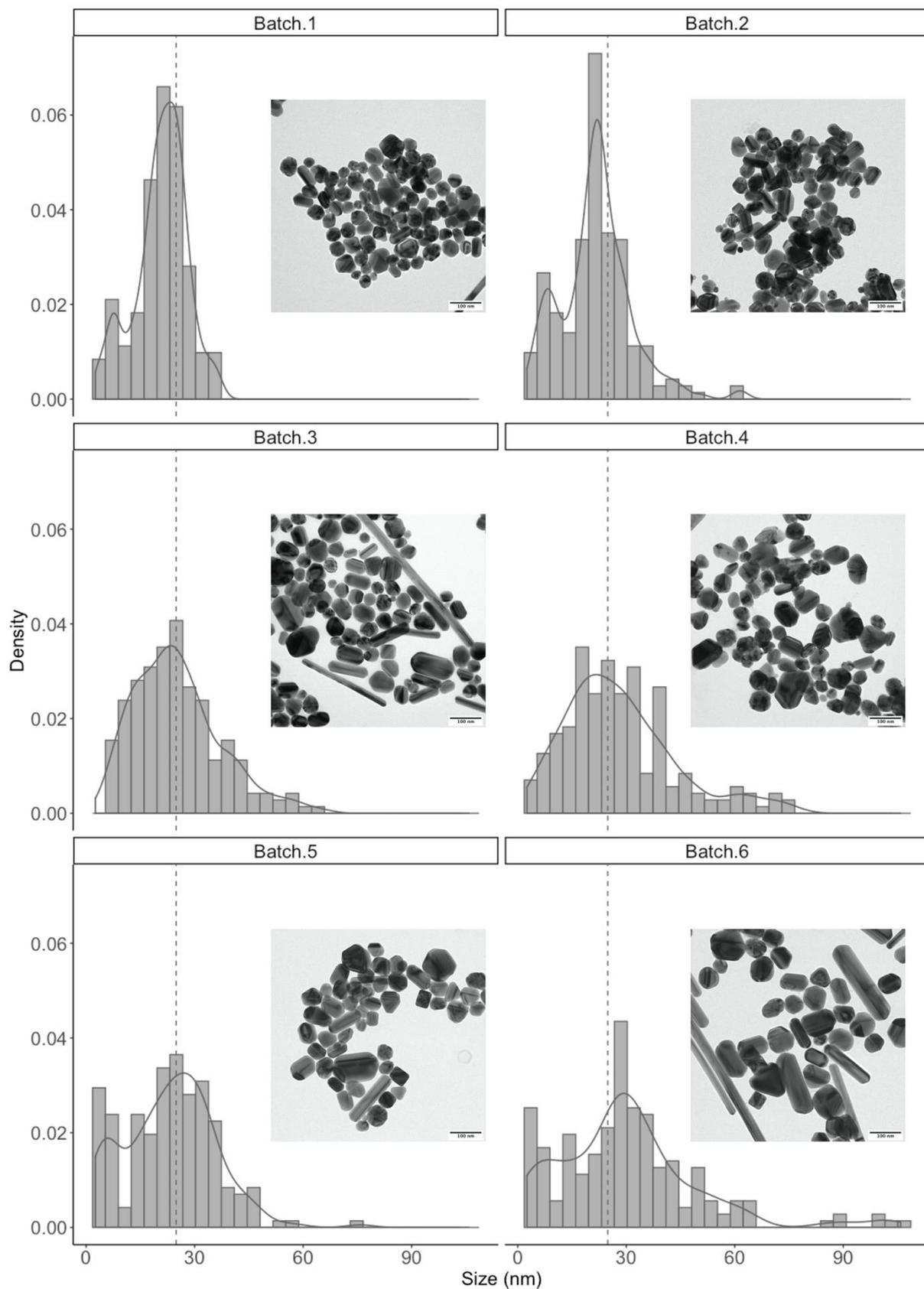


Fig. 2: Repartition of the size associated with transmission electron microscopy images of the six silver nanoparticle suspensions. The dash line represents the mean size.

TEM can be considered as the gold standard method of characterization because it is possible to directly observe the size and the shape of nanoparticles. It should be considered as the most accurate method to estimate the size of AgNPs. However, TEM could only visualize a tiny fraction of the suspension and cannot be used easily because it requires a specific platform with sophisticated materials and specialized workers. UV-Vis and DLS are faster and easier to use but don't give a direct measurement of size and shape. Even so, they can be used to reveal the quality of a synthesis and to compare different batches of AgNPs. UV-Vis allowed to see graphically the quality of synthesis through the thickness of maximum absorbance peak and the value of  $\lambda_{\max}$ . It can also be used to confirm Nps aggregation by following the shift of maximum absorption wavelength. DLS can approximate the size by the calculation of hydrodynamic diameter for spherical nanoparticles, which is always an overestimation of the real size. The higher AgNPs diameter found in DLS can be explained by the heterogeneity in shape of nanoparticles for which the apparent diameter can be much higher than the real diameter; furthermore, the hydrodynamic diameter is always an overestimation of the real one. Nevertheless, the RSD measured with DLS is close from this measured with the UV-Vis maximum of absorbance. By monitoring these indicators, this study confirms the difficulty of producing AgNPs of controlled sizes and shapes by this synthesis method despite same conditions of preparation and respect of a rigorous protocol.

#### **DESCRIPTION OF THE SERS SIGNAL**

In accordance with Farquharson [23] the SERS spectrum of 5FU presented in Fig. 3 is dominated by few peaks characteristic of the 5FU molecule assigned to the pyrimidine ring breathing mode at  $786\text{ cm}^{-1}$ , the trigonal ring plus C-F stretching mode at  $828\text{ cm}^{-1}$ , the ring stretching mode at  $1270\text{ cm}^{-1}$ , the trigonal ring plus C-H stretching mode at  $1339\text{ cm}^{-1}$ , the ring plus N-H wagging mode at  $1400\text{ cm}^{-1}$  and the C=O stretching mode at  $1667\text{ cm}^{-1}$ .

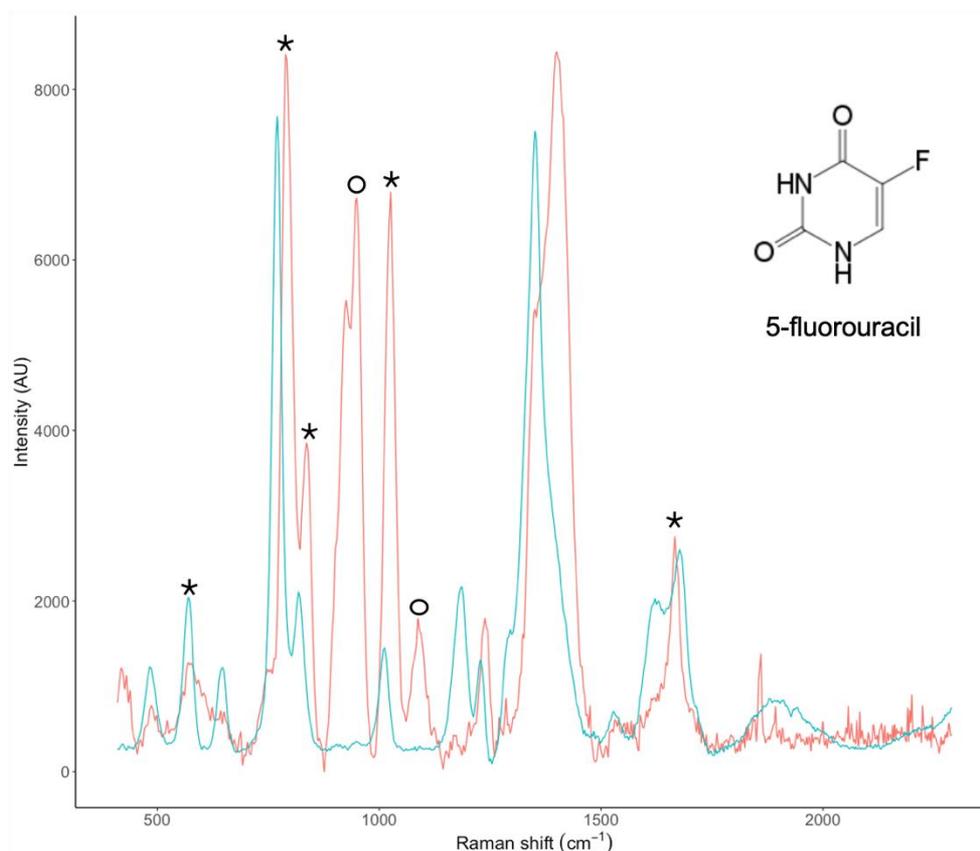


Fig. 3: The (a) Raman spectrum of 5-fluorouracil at 50 mg/mL (blue line) and (b) SERS spectrum (orange line) of 5-fluorouracil at 5  $\mu\text{g/mL}$  after interaction with AgNPs and chemical structure of 5-fluorouracil (AgNPs : silver nanoparticles, SERS : surface enhanced Raman scattering). A pretreatment by asymmetric least square had been done for both spectra. Stars representing Raman shift from 5-fluorouracil, rings representing Raman shift from citrate.

The comparison of SERS and Raman spectra for the 5FU at 5  $\mu\text{g/mL}$  and 50 mg/mL respectively (Fig.3) has shown significant difference in intensities with a maximal enhancement factor observed around  $10^4$  for the strongest band at  $786\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching vibration of the pyrimidine ring breathing that confirmed the interaction between 5FU and AgNPs. In addition to signal enhancement, a displacement of the Raman shift has been observed suggesting conformational changes of the molecule during interaction. This statement associated with shift of the band position (shift of  $16\text{ cm}^{-1}$  in comparison to RS spectrum described by Farquharson) suggested a strong interaction of the pyrimidine group with AgNPs.

The optimization of experimental conditions, in particular thanks to the choice of a pH allowing the analyte and the nanoparticles to be brought closer together [24], has enabled us to reach an enhancement factor of more than  $10^4$ . This EF should be considered as an indicator of the amplification capacity of the Raman intensity of 5FU by colloidal suspension of AgNPs at pH of 6, keeping in mind that it can change from

one wavenumber to another or from one concentration to another as it had been demonstrated by Ricci and *al.* [11].

#### QUANTITATIVE MODEL

The best models were obtained for SERS data corrected by Asymmetric Least Square correction (ALS) [25] and normalized by the intensity of the citrate peak at  $950\text{ cm}^{-1}$  which is present in all samples at constant concentration. Consequently, all SERS spectra were first corrected by these pretreatments for both approaches. An example of SERS spectra obtained with the first batch of AgNPs is represented on Fig.4.

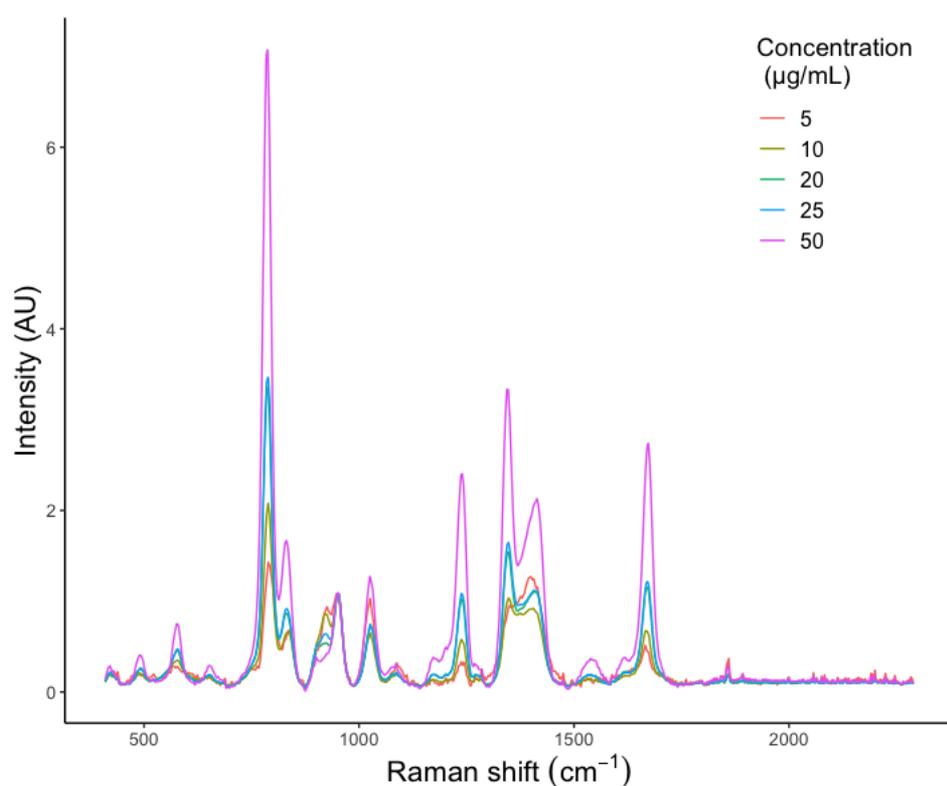


Fig. 4: The SERS spectra of 5-fluorouracil from 5 to 50  $\mu\text{g/mL}$  obtained by interaction with AgNPs of the first colloidal suspension after ALS baseline correction and normalization by the  $950\text{ cm}^{-1}$  band ( ).

#### PLS MODEL

The PLS regression was optimized by a permutation algorithm based on the evolution of the RMSECV calculated with the calibration dataset. As an example, for batches B2 to B6 used as calibration dataset, the best model was obtained for 7 latent variables, which corresponded to a RMSECV of  $3.640\text{ }\mu\text{g/mL}$ . The first latent variable explained 96.9 % of the total variability and seemed to be linked to the 5FU concentration. As shown in Fig.5 this first latent variable is well representative of the 5FU SERS signal

comparing with mean SERS spectra of 5FU at 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for each batch.

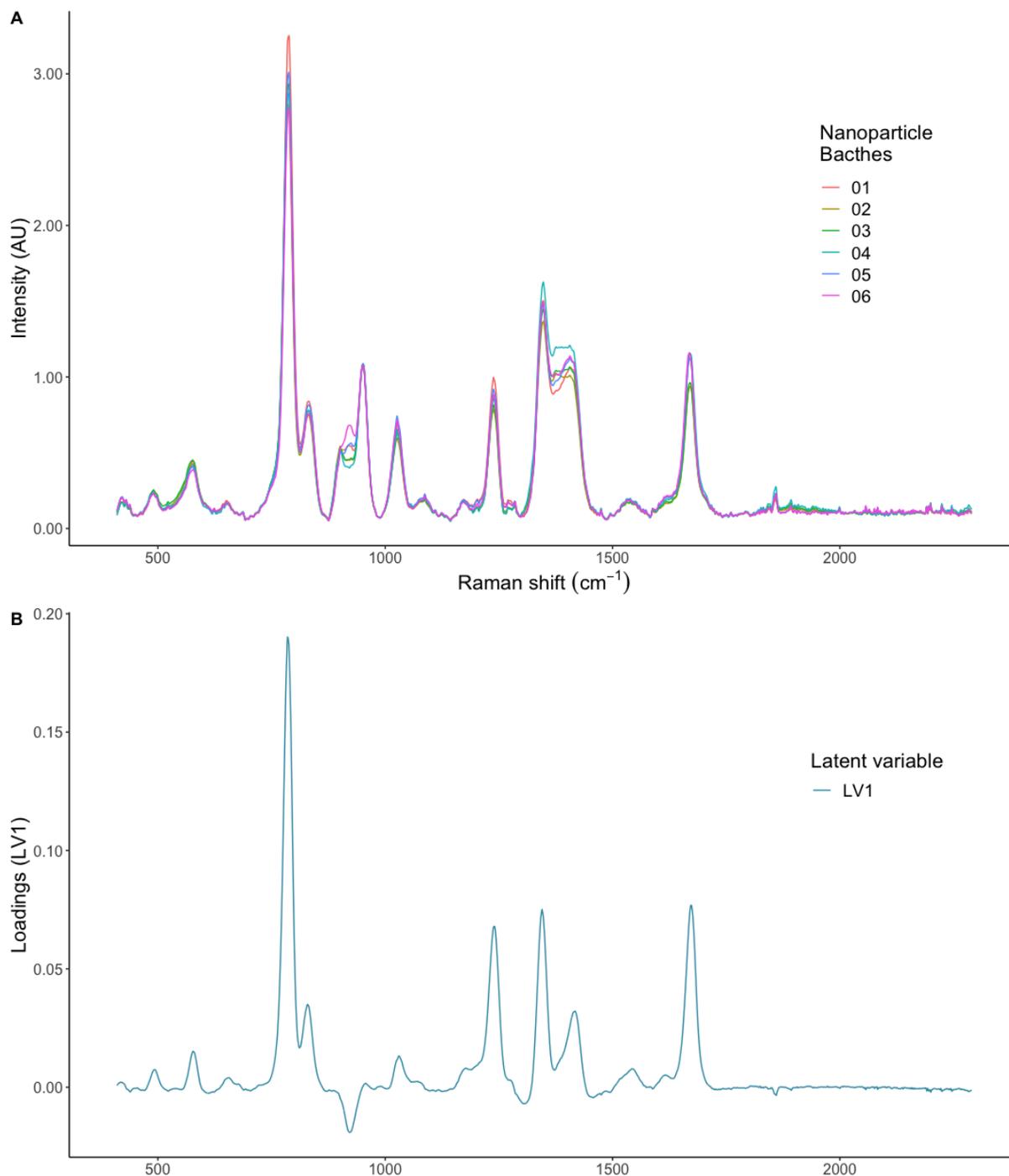


Figure 5: Similarities between the first latent variable (A) and the mean SERS spectra of 5-fluorouracil at a concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the six nanoparticle batches (B)

Based on this model, a MARE of 16.8 % was obtained for a  $R^2$  of 0.9377 between theoretical and predicted concentration. The correlation curve is represented on the Fig.6

## NON-LINEAR REGRESSION

Based on the method previously proposed (Material and methods/Quantitative analysis/Non-linear regression), the mean absolute relative error has significantly decreased to 6.30 % (p-value < 0.001) for a  $R^2$  of 0.9790 between theoretical and predicted concentration. The correlation curve is displayed Fig.6.

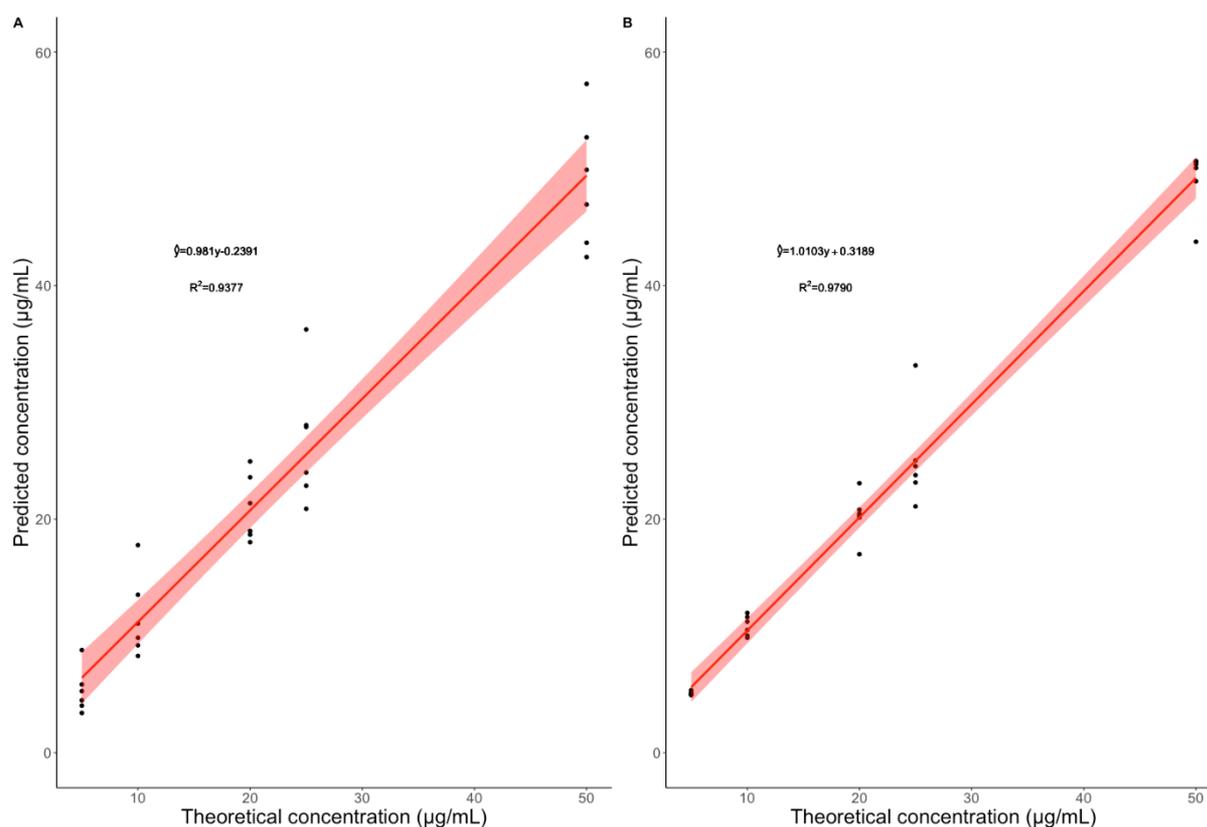


Fig.6: Correlation curve for A: PLS, B: new approach,  $\hat{y}$  represents predicted concentrations,  $y$  theoretical concentrations and  $R^2$  correlation coefficient. The red filled space represented the interval of confidence of the slope at 95 %.

The comparison of prediction quality through calculation of relative error between mathematical models (Fig.7) highlights that the new model is more accurate specifically on the extreme concentrations. The comparison of the prediction capacities by synthesis has shown that, for both models, syntheses S4 and S6 had the most important error.

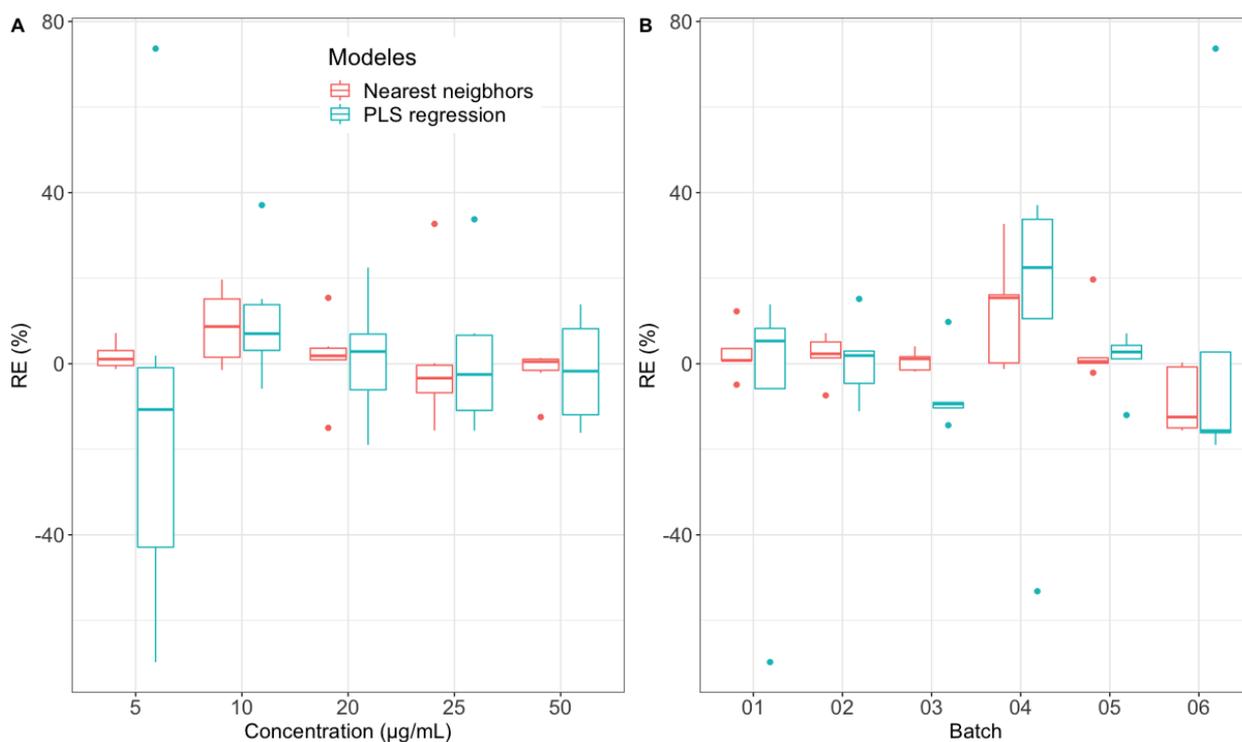


Fig. 7: Relative error (RE) of 5FU predicted concentration as a function of A) the concentrations and B) the silver nanoparticle batches for both the partial least square (PLS) regression and the nearest neighbors approach.

Results show an important variability of ER regarding to AgNPs batches, probably induced by the lack of reproducibility of synthesis. This finding seems to link the AgNPs polydispersity to the quality of concentration prediction from one synthesis to another due to a lack of reproducibility of enhancement signal. Polydispersity and experimental conditions can lead to changing the excitation plasmon wavelength or the condition of aggregation [26] to reach such excitation wavelength, compatible with the wavelength of the laser used to acquire SERS spectra *i.e.* 785 nm here. This impact on the variability is directly highlighted in the PLS model where all batches were used to construct the calibration model. Despite the development of a new mathematical approach, the error of prediction still remained higher for the batches with the most polydisperse AgNPs *i.e.* S4 and S6. It would be interesting to set standard specifications from indicators previously described (specially UV-Vis and DLS) to assert the quality of a synthesis before being used in SERS analysis, but also to accumulate more data, especially on the repetition of SERS experiments for a synthesis at a given concentration to highlight the predictive quality of a synthesis.

## **CONCLUSION**

According to this study, we investigated the surface enhanced Raman scattering using a handheld Raman spectrometer at 785 nm and silver colloidal nanoparticles for the quantification of 5FU in aqueous solution at concentrations a thousand time lower than the low limit of quantification of 5FU with RS. The spectral variability involved by variability of AgNPs from one batch to another and its consequence on prediction have been highlighted. If an improvement of the synthesis reproducibility is possible, the investigation of new mathematical approach taking into account the spectral variability induced by different synthesis of AgNPs seems very convenient for the development of quantitative model in SERS. Further investigations should be conducted to improve prediction performances, specifically by acquiring more experimental data from new AgNPs batches and by applying selection criteria on the quality of batches in terms of size and shape of AgNPs. Other synthesis methods as radiolysis will be also investigated in order to control more precisely the size and the polydispersity of nanoparticles.

## **Acknowledgments:**

The authors would like to thank the Center for Interdisciplinary Research on Medicines from Liège University, specifically Ph.D. Eric Ziemons and Charlotte De Bleye. They would also like to thank Ph.D. Jean-Luc Puteaux from the Plant Macromolecule Research Center of Grenoble for the TEM images. Finally, they are grateful to the public hospitals of Paris for the financial support to Ph.D. Laetitia Lê.

- [1] C. Bazin, B. Cassard, E. Caudron, P. Prognon, L. Havard, Comparative analysis of methods for real-time analytical control of chemotherapies preparations, *Int. J. Pharm.* 494 (2015) 329–336.
- [2] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, A. Baillet Guffroy, P. Prognon, A. Dowek, E. Caudron, Quantification of gemcitabine intravenous drugs by direct measurement in chemotherapy plastic bags using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.062>.
- [3] L.M.M. Lê, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Discrimination and quantification of two isomeric antineoplastic drugs by rapid and non-invasive analytical control using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. 161 (2016) 320–324.
- [4] L.M.M. Lê, M. Berge, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Rapid discrimination and quantification analysis of five antineoplastic drugs in aqueous solutions using Raman spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 111 (2018) 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.046>.
- [5] L.M.M. Le, B. Kégl, A. Gramfort, C. Marini, D. Nguyen, M. Cherti, S. Tfaily, A. Tfayli, A. Baillet-Guffroy, P. Prognon, P. Chaminade, E. Caudron, Optimization of classification and regression analysis of four monoclonal antibodies from Raman spectra using collaborative machine learning approach, *Talanta*. 184 (2018) 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.109>.
- [6] P. Bourget, A. Amin, A. Moriceau, B. Cassard, F. Vidal, R. Clement, The Raman Spectroscopy (RS): A new tool for the analytical quality control of injectable in health settings. Comparison of RS technique versus HPLC and UV/Vis-FTIR, applied to anthracyclines as anticancer drugs, *Pathol. Biol. (Paris)*. 60 (2012) 369–379.
- [7] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* 26 (1974) 163–166.
- [8] E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*, Elsevier, 2008.
- [9] M. Fan, G.F. Andrade, A.G. Brolo, A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta*. 693 (2011) 7–25.
- [10] W. Li, X. Zhao, Z. Yi, A.M. Glushenkov, L. Kong, Plasmonic substrates for surface enhanced Raman scattering, *Anal. Chim. Acta*. 984 (2017) 19–41.
- [11] M. Ricci, E. Trombetta, E. Castellucci, M. Becucci, On the SERS quantitative determination of organic dyes, *J. Raman Spectrosc.* 49 (2018) 997–1005. <https://doi.org/10.1002/jrs.5335>.
- [12] J. Cailletaud, C. De Bleye, E. Dumont, P.-Y. Sacré, L. Netchacovitch, Y. Gut, M. Boiret, Y.-M. Ginot, Ph. Hubert, E. Ziemons, Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 458–472. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.056>.
- [13] C. De Bleye, P.-Y. Sacré, E. Dumont, L. Netchacovitch, P.-F. Chavez, G. Piel, P. Lebrun, Ph. Hubert, E. Ziemons, Development of a quantitative approach using

- surface-enhanced Raman chemical imaging: First step for the determination of an impurity in a pharmaceutical model, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 90 (2014) 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.026>.
- [14] S. Fornasaro, A. Bonifacio, E. Marangon, M. Buzzo, G. Toffoli, T. Rindzevicius, M.S. Schmidt, V. Sergio, Label-Free Quantification of Anticancer Drug Imatinib in Human Plasma with Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12670–12677. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02901>.
- [15] S.L. Kleinman, M.C. Peterman, M. Benhabib, M.T. Cheng, J.D. Hudson, R.E. Mohler, Rapid Quantification of 4,4'-Methylenedianiline by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 89 (2017) 13190–13194. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02936>.
- [16] PubChem, 5-Fluorouracil, (n.d). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3385> (accessed August 22, 2019).
- [17] S. Farquharson, A.D. Gift, C. Shende, P. Maksymiuk, F.E. Inscore, J. Murran, Detection of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 38 (2005) 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.021>.
- [18] S. Farquharson, C. Shende, F.E. Inscore, P. Maksymiuk, A. Gift, Analysis of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 208–212.
- [19] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391–3395.
- [20] C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance Raman scattering, *Langmuir.* 11 (1995) 3712–3720.
- [21] E.C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P.G. Etchegoin, Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 13794–13803.
- [22] Guideline on the use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, (n.d.) 28.
- [23] S. Farquharson, A. Gift, C. Shende, F. Inscore, B. Ordway, C. Farquharson, J. Murren, Surface-enhanced Raman spectral measurements of 5-fluorouracil in saliva, *Molecules.* 13 (2008) 2608–2627.
- [24] R.A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P.J. Goulet, J.J. Garrido, R.F. Aroca, Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced Raman scattering, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 3787–3792.
- [25] P.H.C. Eilers, H.F.M. Boelens, Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing, (n.d.) 24.
- [26] F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, A.E. Shanahan, H.J. Byrne, Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape, *Anal Methods.* 6 (2014) 9116–9123. <https://doi.org/10.1039/C4AY02112F>.

Malgré la standardisation du procédé de synthèse des AgNPs, la caractérisation des lots de NPs en UV-vis, DLS et MET a montré une dispersion de taille et de forme des AgNPs synthétisée, d'un lot de synthèse à l'autre mais également une polydispersité au sein d'un même lot, comme on peut le voir sur les images en MET (figure 23).

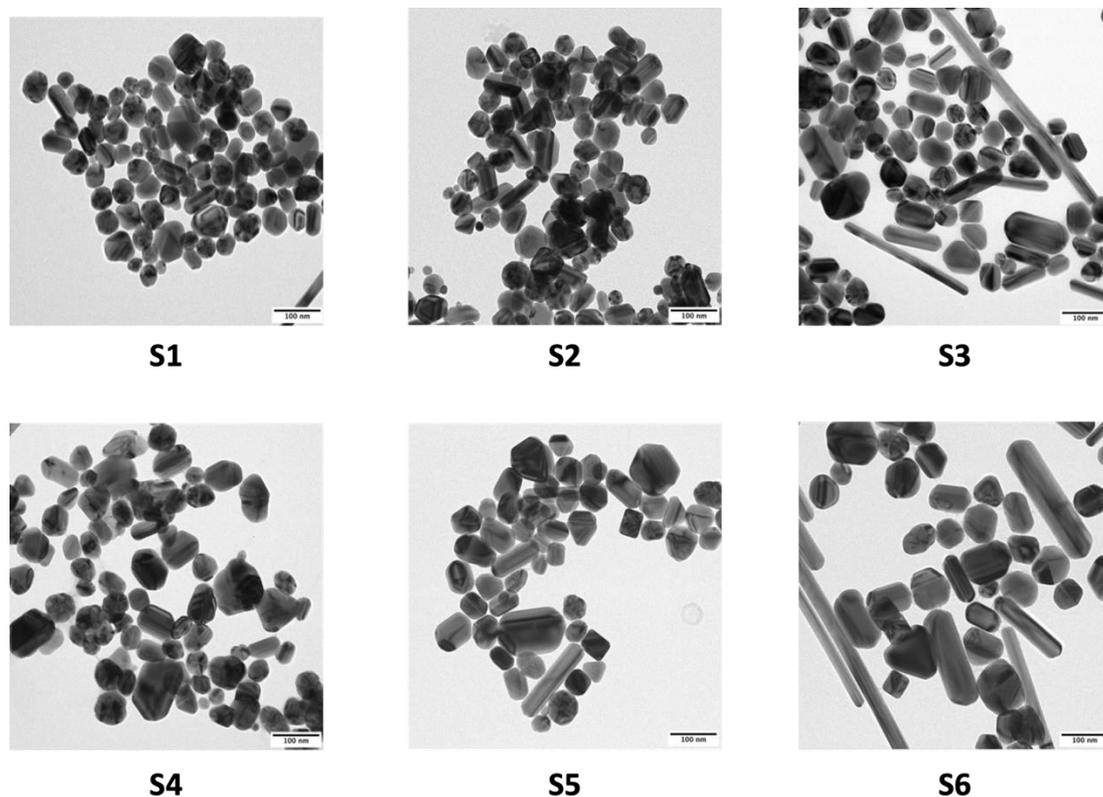


Figure 23 : Image en microscopie électronique en transmission (MET) des six lots de nanoparticules d'argent.

Les AgNPs ainsi synthétisées avaient une taille moyenne, tous lots confondus, de 24,9 nm [20,9 – 28,9 nm] (CV 17,0 %). Ces AgNPs, malgré leur polydispersité, ont été utilisées pour les expériences en SERS en suivant le protocole expérimental précédemment présenté. Ainsi, nous souhaitons observer la corrélation entre polydispersité des NPs et variabilité de l'exaltation du signal Raman. Pour construire les modèles de prédiction de la concentration en fonction du signal, les spectres ont d'abord été prétraités par correction de la ligne de base par un algorithme ALS, puis par correction des décalages en nombre d'onde du déplacement Raman et enfin par normalisation des intensités par l'intensité du déplacement Raman à  $950\text{ cm}^{-1}$ . En effet, cette bande est spécifique au citrate et nous l'avons utilisé en tant qu'étalon interne, puisque sa concentration est identique pour toutes nos expériences. Dans un premier temps, des techniques usuelles de chimiométries ont été appliquées. Un modèle par régression PLS a ainsi été développé. Les capacités prédictives du modèle PLS ont été

déterminées par le calcul de la moyenne des erreurs relatives calculées en valeur absolue (*mean absolute relative error* également appelée MARE) pour une moyenne de 16,7 %. Le détail des MARE calculées en fonction du lot de synthèse à prédire et de la concentration a mis en avant : des erreurs particulièrement importantes pour la concentration la plus faible à  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , mais également des disparités importantes de MARE en fonction des lots de synthèse à prédire. Ainsi, les lots de synthèse S4 et S6 sont les moins bien prédits et S5 est le lot pour lequel les concentrations sont les mieux prédites (tableau 1). Ce résultat est particulièrement intéressant car les lots S4 et S6 sont constitués des NPs les plus polydisperses. Nous avons ainsi confirmé le lien entre la polydispersité des NPs et l'augmentation de la MARE et donc la pénalisation de la qualité de la prédiction.

Tableau 1 : Capacités prédictives du modèle de régression PLS, représentées par le calcul de la moyenne de l'erreur relative calculée en valeur absolue, en fonction de la concentration et de la synthèse.

	Concentrations nominales ( $\mu\text{g/mL}$ )					MARE (%)
	5	10	20	25	50	
S1	69,75	5,83	8,26	5,31	13,88	20,61
S2	1,90	15,15	2,95	11,10	4,60	7,14
S3	9,40	9,75	9,05	10,32	14,39	10,58
S4	53,18	37,08	22,48	33,76	10,54	31,41
S5	12,01	4,29	2,73	7,10	1,13	5,45
S6	73,65	2,72	18,98	15,66	16,14	25,43
<b>MARE (%)</b>	36,65	12,47	10,74	13,88	10,11	16,77

Malgré le frein lié à la variabilité des NPs entre les différents lots, nous avons développé en collaboration avec l'équipe XPOP une approche non linéaire reposant sur l'analyse des "plus proches voisins" et la construction d'un modèle mathématique par lot de synthèse. Dans cette approche, un modèle non linéaire de type sigmoïdal a été construit avec les données spectrales issues de chaque synthèse. Une fois les modèles construits, la résolution d'un problème inverse a permis de déterminer la concentration d'un nouvel échantillon à partir des données expérimentales acquises  $\bar{y}_{\ell}^{new}$ . Au vu de la forte variabilité expérimentale observée entre les synthèses, les plus proches voisins ont été utilisés pour prédire la concentration. La série de données  $\hat{c}$  du jeu d'apprentissage la plus proche a été déterminée pour l'erreur  $e_i(c)$  la plus faible (équation 2-1, avec  $\ell$  l'indice du nombre d'onde,  $i$  l'indice de la synthèse,  $\theta_{i\ell}$  les

paramètres de la fonction sigmoïdal,  $c$  la concentration).

$$e_i(c) = \sum_{\ell=1}^L \left( \frac{\bar{y}_{i\ell}^{new} - f(c, \theta_{i\ell})}{g(c, \theta_{i\ell})} \right)^2 \quad \text{Équation 2-1}$$

On choisit alors  $\hat{c} = \text{Argmin } e_i(\hat{c}_i)$  et la concentration estimée est  $\hat{c} = \hat{c}_i$ . Grâce à cette approche les performances de quantification ont été améliorées, avec une diminution de l'erreur totale objectivée par la MARE passant de 16,80 % pour le modèle PLSR à 6,30 % pour le nouveau modèle développé. On constate sur ce modèle une amélioration importante des MARE, notamment pour la concentration à 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Les prédictions réalisées à partir des données spectrales mesurées à l'aide des lot S4 et S6 restent celles avec les erreurs de prédiction les plus importantes (tableau 2). L'amélioration de la prédiction par la construction d'un modèle de régression par lot de NPs met directement en lumière un effet lot de synthèse sur la prédiction de la concentration en analyte à partir des spectres Raman exaltés. L'impact de l'hétérogénéité au sein d'un lot d'AgNPs d'une part et les différences de composition entre les lots d'AgNPs d'autre part sur la variabilité de l'exaltation du signal et par conséquent sur la qualité de la prédiction a donc été démontré au cours de ce travail. L'intérêt de réussir à développer des modèles de prédiction de la concentration en analyte à partir de différents lots de NPs présente, de ce fait, un intérêt majeur.

Tableau 2 : Capacités prédictives du nouveau modèle développé, représentées par le calcul de la moyenne de l'erreur relative calculée en valeur absolue, en fonction de la concentration et de la synthèse.

		<b>Concentrations nominales (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>					<b>MARE (%)</b>
		5	10	20	25	50	
<b>Synthèses</b>	S1	3,55	12,26	0,75	4,91	0,77	4,45
	S2	7,17	5,09	2,31	7,41	1,35	4,67
	S3	1,63	1,46	4,07	1,83	1,14	2,03
	S4	1,24	16,09	15,41	32,68	0,17	13,12
	S5	0,52	19,69	1,37	0,12	2,11	4,76
	S6	0,74	0,30	15,00	15,61	12,47	8,82
<b>MARE (%)</b>		2,48	9,15	6,49	10,43	3,00	6,31

Au cours de ce premier travail, nous avons pu nous familiariser à la synthèse d'AgNPs sphériques en suspension et aux différentes techniques analytiques de caractérisation, observer et optimiser l'exaltation du signal Raman du 5FU et construire un modèle mathématique permettant d'améliorer les performances prédictives de la concentration en se basant sur la construction d'un modèle quantitatif par lot de synthèse. Dans cette étude, nous avons réussi à synthétiser des AgNPs et à les caractériser, puis à exalter le signal Raman du 5FU d'un ordre de grandeur de  $10^4$ . A partir des spectres obtenus avec 6 lots différents de synthèse, nous avons construit un modèle quantitatif suivant l'évolution non-linéaire de l'intensité exaltée en fonction de la concentration. Une régression sigmoïdale couplée à l'approche des plus proches voisins a permis de construire un modèle prédictif de la concentration en 5FU pour des concentrations comprises entre 5 et  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  soit des concentrations de 5FU 1000 fois plus faibles qu'en SR [59] et d'atteindre des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . De plus, il a été mis en évidence des différences de variabilité du signal Raman exalté entre les lots de synthèse en accord avec leur caractérisation (fonction de leur polydispersité, caractérisée en UV-vis, DLS et MET). L'impact important de la qualité de la synthèse de NPs sur l'exaltation Raman et donc sur les performances des modèles de quantification doit donc être pris en considération pour nos expérimentations futures. Ce résultat illustre la difficulté de pouvoir construire des modèles de quantification à l'aide de plusieurs lots d'AgNPs. Une analyse approfondie des données spectrales nous a permis de nous affranchir en partie de la contribution des lots de synthèse sur la variabilité du signal Raman et démontre que l'analyse statistique des données conduit malgré tout à des modèles de prédiction performants. Au-delà de l'amélioration obtenue grâce à une optimisation mathématique, dans nos prochains travaux, nous nous sommes intéressés à réduire la variabilité de l'exaltation expérimentalement : en produisant des NPs de taille et de forme contrôlées et en optimisant les conditions expérimentales, notamment celles ayant un impact sur l'agrégation car, comme nous l'avons déjà évoqué, l'exaltation du signal Raman est un phénomène local qui a lieu lors du rapprochement entre les NPs et l'analyte. La maîtrise de l'agrégation est un paramètre primordial dans l'utilisation de NPs en suspension et la majorité du signal exalté en SERS provient d'un petit nombre d'analytes situés au niveau des points chauds [148]. Des conditions d'agrégation non maîtrisée peuvent donc être à l'origine d'une variabilité importante de l'exaltation du signal Raman.

### 3 Quantification et analyse discriminante de l'adrénaline et la noradrénaline en diffusion Raman exaltée de surface

---

A partir des conclusions issues de notre première étude en SERS, deux axes d'amélioration ont été dégagés : l'utilisation de NPs de taille et de forme plus homogènes et l'optimisation des conditions expérimentales pour obtenir d'une part le signal en SERS le plus intense et d'autre part pour comprendre les différents facteurs à l'origine de la variabilité du signal. Afin d'explorer ces axes d'études, nous nous sommes intéressés à l'adrénaline et la noradrénaline qui sont deux neurotransmetteurs, activateurs du système nerveux sympathique, présents naturellement dans notre organisme et utilisés en thérapeutique en tant que médicaments d'urgence. Ces molécules par leurs propriétés physico-chimiques, leurs intérêts thérapeutiques et physiologiques, sont de bons candidats à une analyse en SERS. De plus, leurs structures sont très proches et ne diffèrent que par un groupement méthyl. Dès lors, il était particulièrement intéressant de les utiliser pour construire des modèles discriminants, capables de les différencier pour confirmer les performances de la SERS en termes de spécificité. Ce nouveau travail avait pour objectif l'analyse qualitative et quantitative de l'adrénaline et de la noradrénaline en SERS. Ce travail est divisé en deux parties. Une première partie dédiée à l'optimisation des conditions expérimentales par la réalisation de plans d'expériences, en choisissant des facteurs jugés importants pour l'agrégation et l'exaltation du signal Raman. Cette première partie a été réalisée sur la noradrénaline. Au vu de la structure très proche de la noradrénaline et de l'adrénaline, il est attendu que les résultats obtenus pour la noradrénaline soient transposables pour l'adrénaline. Une deuxième partie consacrée au développement de modèles discriminant et quantitatif à partir des paramètres précédemment optimisés et de trois lots de synthèse de NPs. Dans ces nouveaux travaux, des NPs d'or ont été synthétisées, car bien qu'ayant des capacités d'exaltations moindres, leur synthèse est souvent décrite comme plus reproductible.

#### 3.1 OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR L'ANALYSE DE LA NORADRENALINE AVEC DES NANOPARTICULES D'OR

La première étape était la synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs) à partir de la méthode de Turkevich [95] et des méthodes qui en dérivent [97], par réduction de  $\text{KAuCl}_4$  par une solution de citrate. Ainsi, en optimisant les paramètres de la synthèse : vitesse d'ajout du citrate, quantité d'or et quantité de citrate en se basant sur l'étude de Shi [141], le ratio citrate / or a été fixé à une valeur supérieure à 3,5 pour maximiser l'uniformité de taille des NPs. Le  $\text{KAuCl}_4$  dissout dans de l'eau ultrapure est d'abord

introduit dans un ballon tri-col préalablement chauffé à 80 °C, sous agitation, à une vitesse de 900 rpm. La température du chauffe-ballon est ensuite augmentée jusqu'à 140 °C. Une fois l'ébullition atteinte, 4 mL d'une solution de citrate sont ajoutés en une seule fois à l'aide d'une pipette. Le mélange est ainsi maintenu à ébullition 15 min sous agitation constante, puis laissé au repos à température ambiante pendant 1 h. Dans le but d'évaluer l'impact de la concentration des NPs sur l'agrégation, neuf synthèses d'AuNPs ont été produites selon trois conditions différentes (SA, SB, SC) pour lesquelles les quantités d'or ( $Q_{Au}$ ) et citrate ( $Q_{citrate}$ ) sont augmentées à ratio citrate / or ( $Q_{citrate} / Q_{Au}$ ) et à volume constants afin de conserver les mêmes propriétés de réduction. Pour chaque condition, trois synthèses ont été réalisées (tableau 3). Les neuf synthèses ont été caractérisées en UV-vis, MET et DLS.

Tableau 3 : Récapitulatif des trois conditions de synthèse pour SA, SB et SC dans le but de faire varier la concentration finale en nanoparticules. Dans ces conditions, si la concentration en nanoparticules attendue pour SA est notée x1, on s'attend pour SB à obtenir x2 et pour SC x3. Chaque condition est répétée trois fois.

Synthèses	$Q_{Au}$ (mg)	$Q_{citrate}$ (%)	$V_{total}$ (mL)
SA	11,2	1 %	104
SB	22,4	2 %	104
SC	33,6	3 %	104

Le deuxième axe d'étude définit dans notre stratégie d'analyse était l'optimisation des conditions expérimentales. Le choix de l'agent d'agrégation a pris en compte les propriétés physico-chimique des analytes et des AuNPs. Comme pour notre précédent travail, il a été décidé de générer l'agrégation par l'intermédiaire d'un acide. En effet, l'adrénaline et la noradrénaline sont des bases faibles dont la forme acide est chargée positivement ( $pK_a = 8,6$ , figure 24), une diminution du pH augmentera donc la proportion de molécules chargées positivement, favorisant leur interaction avec les AuNPs majoritairement chargées négativement à leur pH initiale ( $pH = 7,0$ ). La diminution des charges en surface des AuNPs, de la même façon que pour les AgNPs, diminuera les forces de répulsions électrostatiques entre les AuNPs générant l'agrégation de la suspension. L'agent d'agrégation que nous avons retenu est l'acide chlorhydrique HCl.

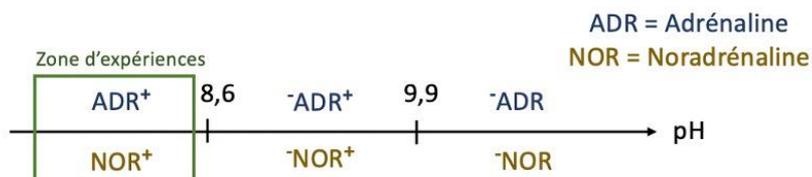


Figure 24 : Diagramme de pH de l'adrénaline et la noradrénaline.

L'objectif principal durant cette première étape était d'optimiser l'intensité du signal SERS de la noradrénaline (NOR) à deux concentrations représentant les concentrations basse et haute de la gamme de concentrations que nous souhaitons par la suite analyser : de 20 à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , afin de prendre en compte l'impact de la concentration en analyte sur l'amplification du signal Raman. D'autres facteurs jugés importants sur l'amplification du signal Raman ont ainsi été définis : la quantité d'or (à ratio  $Q_{\text{citrate}} / Q_{\text{Au}}$  constant) utilisée pour la synthèse, la concentration en agent d'agrégation (HCl) et le rapport entre le volume de NOR et le volume d'AuNPs dans le mélange final analysé ( $V_{\text{AuNPs}} / V_{\text{NOR}}$ ). Ainsi, le domaine d'étude servant de base à la réalisation des différents plans d'expériences à trois facteurs et à trois niveaux est défini dans le tableau 4.

Tableau 4 : Définition du domaine d'étude pour les plans d'expériences trois facteurs, trois niveaux : quantité d'or ( $Q_{\text{Au}}$ ) initialement introduite pour la synthèse à ratio quantité d'or / quantité de citrate constant, concentration d'acide chlorhydrique (HCl), ratio volume de la suspension de nanoparticules d'or ( $V_{\text{AuNPs}}$ ) / volume de la solution de noradrénaline ( $V_{\text{NOR}}$ ).

Niveaux	$Q_{\text{Au}}$ (mg)	[HCl] (M)	$V_{\text{AuNPs}}$ ( $\mu\text{L}$ ) / $V_{\text{NOR}}$ ( $\mu\text{L}$ )
-1	11,2 (SA)	0,3	200 / 400
0	22,4 (SB)	0,5	400 / 200
+1	33,6 (SC)	0,7	465 / 135

Ces différents facteurs ont été sélectionnés pour leur importance attendue sur l'agrégation et sur l'amplification de l'intensité du signal Raman. La concentration des AuNPs doit avoir un impact sur la surface de contact NPs / analyte ainsi que sur l'agrégation. L'étude du rapport de volume NPs / analyte est très peu décrit dans la littérature et est souvent fixé de façon arbitraire à 50 / 50. Pour autant, ce rapport devrait pourtant jouer un rôle important puisqu'il entraîne une dilution des analytes plus ou moins importante impactant ainsi le phénomène d'agrégation et d'exaltation du signal. Enfin, la concentration en agent d'agrégation, *i.e.* l'acide chlorhydrique doit

être également optimisée pour obtenir une agrégation optimale, c'est-à-dire favorisant l'agrégation tout en évitant de générer une agrégation qui conduiraient à une sédimentation et donc à une perte du signal Raman. A partir des facteurs définis et suivant le domaine d'étude présenté dans le tableau 4, des plans de Box-Behnken et des plans factoriels complets ont été construits pour chacun des niveaux de concentration en NOR étudiés. Pour le plan de Box-Behnken, trois répétitions ont été réalisées au centre du modèle pour un total de 15 expériences par niveau de concentration. Pour les plans factoriels complets, nous avons souhaité répéter trois fois chaque expérience afin de prendre en compte la répétabilité de l'exaltation de l'intensité sur l'ensemble des niveaux étudiés, soit  $27 \times 3 = 81$  expériences par niveau de concentration. Au-delà des conditions expérimentales, le temps de contact avant acquisition du signal est un paramètre important à prendre en compte. Le suivi de l'évolution de l'intensité du signal Raman au cours du temps a donc été intégré à l'étude, avec un suivi de l'évolution du signal sur une durée de 4 min, en réalisant une mesure toutes les 8 secondes pour un temps d'acquisition de 3 secondes, soit 31 acquisitions par expérience pour caractériser la cinétique d'agrégation afin de sélectionner à terme le temps d'analyse.

Les plans d'expériences construits ont ensuite été validés statistiquement par différentes méthodes. L'analyse des résidus (partie non expliquée par le modèle), leur distribution doit suivre une loi normale et être homoscedastique. L'analyse de la variance, par comparaison entre variance résiduelle et variance de régression. L'exploration du modèle par l'analyse statistique des effets et par différentes représentations graphiques comme la représentation des courbes d'iso-réponses et des surfaces de réponse permet également de vérifier la cohérence et la validité des modèles construits.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Marion Berge durant son master 2 d'application CACQ-OPEX « Chimie Analytique, Chimiométrie, Qualité - Optimisation des Procédés Expérimentaux » de l'Université de Brest, dans la construction, l'interprétation et la validation des plans d'expériences et constitue son mémoire de master. Ce travail a également fait l'objet d'une publication dans la revue *Spectrochimica Acta Part A* et s'intitule : « *Optimization of experimental conditions by surface enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy with gold nanoparticles in suspensions* ». La stratégie générale d'analyse est résumée dans le logigramme ci-après (figure 25).

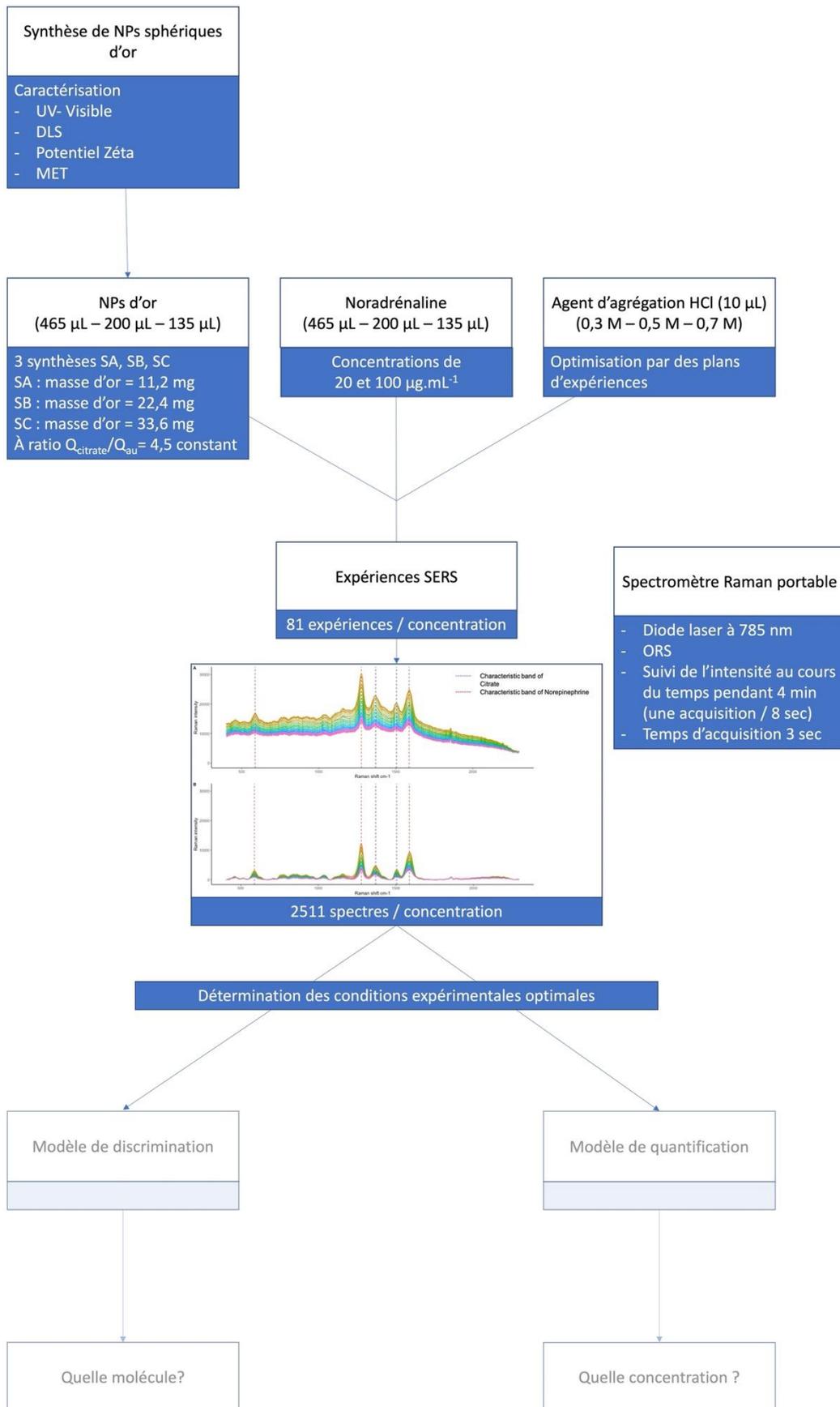


Figure 25 : Logigramme illustrant la stratégie pour l'optimisation de l'exaltation du signal Raman de la noradrénaline en SERS.

## Optimization of experimental conditions by Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectroscopy with gold nanoparticles suspensions

Marion Berge<sup>1,2</sup>, Antoine Doweck<sup>1,2</sup>, Patrice Prognon<sup>1,2</sup>, François-Xavier Legrand<sup>3</sup>, Ali Tfayli<sup>2</sup>, Laetitia Minh Mai Lê<sup>1,2</sup>, Eric Caudron<sup>1,2</sup>

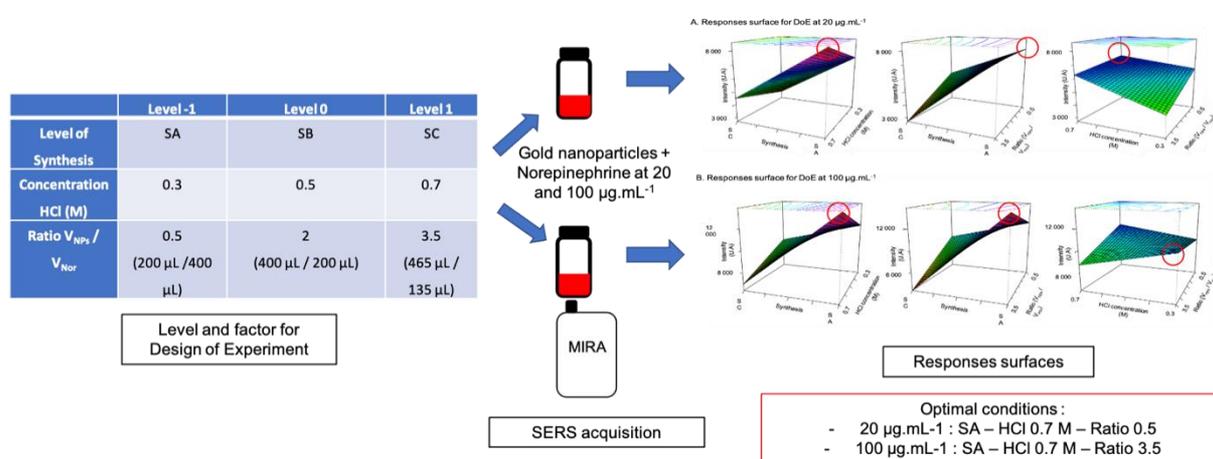
<sup>1</sup>Service de Pharmacie, Hôpital européen Georges Pompidou, APHP.Centre Université-Paris, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296, Châtenay-Malabry, France.

Corresponding author: Marion Berge, marion.berge@universite-paris-saclay.fr

### Graphical Abstract



## **ABSTRACT**

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy is a rapid and innovative analysis technique involving metallic nanoparticles (NPs). The interaction between NPs and norepinephrine gives an exaltation of the Raman signal under certain experimental conditions. The control of the signal exaltation, crucial for sensitive analyses, remains one of the main limitations of this technique. The aim of this work is to optimize the exaltation conditions for an optimal SERS signal at two concentrations of norepinephrine (NOR) and spherical gold NPs in suspension. This first work will fix the optimal experimental conditions essential for the development of robust discriminant and quantitative analysis of catecholamine.

Two complete 3-factors 3-levels experiment designs were performed at  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  norepinephrine concentrations, each experiment being repeated 3 times. The optimization factors were the process of synthesis (variation of the quantity of gold and citrate used for the three synthesis SA, SB and SC) and HCl (0.3 M, 0.5 M, 0.7 M) as well as the volume ratio of NPs and norepinephrine (0.5, 2, 3.5) for SERS acquisition. Spectral acquisitions were performed with a handheld Raman spectrometer with an excitation source at 785 nm. For each sample, 31 acquisitions were realized during 3seconds every 8 seconds. The optimization parameter was the intensity of the characteristic band of norepinephrine at  $1280 \text{ cm}^{-1}$ .

A total of 5,042 spectra were acquired and the pre-treatment selected for all spectra was asymmetric least square combined to a smoothing of Savitsky Golay (ALS – SG). The optimal contact time between norepinephrine and NPs depends on the experimental conditions and was determined for each experiment according to the mean intensity between the three replicates. After interpretation of the experimental designs, the optimal conditions retained were the quantity of gold corresponding to SA and the HCl concentration 0.7 M for the two concentrations of norepinephrine. Indeed, the optimal volume ratio depend on the NOR concentration.

Key words: Chemometric analyses, SERS spectroscopy, Experimental optimization, Experimental by design, Gold nanoparticles

### Highlights:

Rational approach by experimental design to fix optimized experimental parameters in Surface enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy

Importance of controlling aggregation conditions to control SERS signal reproducibility

Different optimized conditions in function of the analyte concentration

## **INTRODUCTION**

Development of innovative analysis techniques enabling the dosage of drugs is a necessity in a hospital setting. Firstly, the objective is to ensure quality control of injectable preparations to guarantee to patients the right drug (identification) at the right dose (quantification), specifically for the most toxic drugs such as chemotherapy. Secondly, analytical methods are used in precise medicine for therapeutic drug monitoring (TDM) to determine the biological concentration of drugs. TDM is particularly suitable for drugs with a narrow therapeutic range. It enables the blood concentration of the drug to be measured to determine whether the drug is effective without being toxic and thus to adjust the dosage of drug to the patient. These issues require specific analysis techniques that cover a wide range of concentrations ( $\text{mg.L}^{-1}$  for quality control;  $\mu\text{g.L}^{-1}$  to  $\text{ng.L}^{-1}$  for TDM or environmental contamination). Raman spectroscopy appears as a good answer to identify and quantify drugs. Several studies have shown the feasibility of quantifying drugs by Raman spectroscopy after sampling [1,2] or directly through a plastic bag [3]. But, despite the quantitative and discriminative capacities of the technique, the lack of sensitivity of the Raman spectroscopy does not answer all quantification needs and particularly for low concentrations.

The use of Surface enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy increases in pharmaceutical applications [4]. SERS is a potentially ultra-fast and cost-effective analytical method requiring a very small sample. SERS is an attractive technique for pharmaceutical applications compared with Raman spectroscopy because SERS measurements typically involve enhancing the Raman signal of an analyte upon adsorption on the surface of a metal nanoparticle. The excitation of local surface plasmons by the incident monochromatic light can lead to Raman enhancement factors ranging from 10<sup>4</sup> to 10<sup>11</sup> in some specific applications [5–7]. SERS is also attractive compared with chromatographic methods since quantitative drug analysis can potentially be performed quickly and with high molecular selectivity.

An important exaltation of the Raman signal is observed when the substrate is in contact with the molecule of interest [8]. This technique has been widely developed for the detection of chemical compounds in many fields such as cosmetics [9], drugs quantification in biologic fluids [10–12] or in the food industry for the detection of chemical substances [13–15]. In pharmaceutical sciences, SERS is used for the control of impurities or the concentration of active ingredient in finished medicines [16,17].

The main drawback to the development of this technique for quantitative applications remains the low reproducibility of the exaltation. Indeed, few of these different studies used several batches [16] of nanoparticles or SERS support or repeated SERS experiment to improve the feasibility (the repeatability, the control of interaction and the robustness) of SERS to be used in quantification.

Another work about the quantification of 5-Fluorouracil by SERS with several batches

of silver nanoparticles (NPs) [18] showed the lack of reproducibility of the SERS signal to develop a quantitative model and the importance of controlling the aggregation mechanism and the interaction between NPs and the analyte to develop a robust quantitative model. Moreover, a performant and predictive quantitative model based on a complex mathematic model was developed to overcome the lack of reproducibility and minimize the synthesis variability.

Consequently, to improve the SERS technique, it is required to determine the various parameters influencing changes on the stability over time and intensity of the SERS signal of colloidal suspensions.

The aim of this study was to assess the usefulness of a DoE approach to optimize the intensity and the stability of the SERS signal to develop robust quantitative models for molecules of therapeutic interest.

The work was based on the study of the interaction between norepinephrine and gold nanoparticles (AuNPs) and the aggregation of AuNPs to obtain the most important enhancement of SERS signal. To reach this objective two conditions are necessary: first, the reproducibility of the synthesis process and second, the control of environmental parameters for the interaction between the AuNPs and the analyte. Moreover, to compare the aggregation conditions depending on analyte concentration, the study was realized for two norepinephrine concentrations at 20 and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . To show that optimal parameters of exaltation was not dependent of the analyte concentration, two full factorial designs with three factors of optimization were realized: the synthesis of gold nanoparticles to obtain three concentrations of nanoparticles, the ratio of volume  $V_{\text{HCl}}/V_{\text{NP}}$ , and the concentration of aggregate agent to obtain the most important enhancement of SERS signal with a good stability of signal over time.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **CHEMICALS AND REAGENTS**

Synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) was performed with potassium tetrachloroaurate ( $\text{KAuCl}_4$ , purity > 98%) obtained from Sigma-Aldrich (Saint – Louis, USA) and trisodium citrate dihydrate ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7, 2\text{H}_2\text{O}$ , 98%) obtained from VWR chemicals (Leuven, Belgium). Solutions of aggregating agents were prepared from hydrochloric acid 1.0 M (HCl, European Pharmacopoeia quality) obtained from VWR chemicals. The commercial norepinephrine (NOR, Figure 1) solution at 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  was acquired from Mylan (Paris, France). Ultra-pure water was generated from Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Aqua regia used to clean up glassware was obtained by mixing 3 volumes of hydrochloric acid 37 % (HCl, European Pharmacopoeia quality, VWR chemicals) and 1 volume of nitric acid 65 % ( $\text{HNO}_3$ , suprapur, Merck, Darmstadt, Germany).

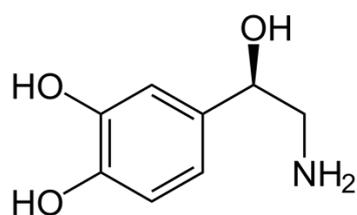


Fig. 1 Norepinephrine molecule.

### GOLD NANOPARTICLES SYNTHESIS

Colloidal suspensions of AuNPs were synthesized by a reduction of gold adding citrate as a reductant and stabilizing agent following the Turkevich method [19] according to standardized and reproducible experimental protocols. Briefly,  $\text{KAuCl}_4$  was diluted in 100 mL of ultra-pure water and heated to  $140^\circ\text{C}$  with stirring at 900 rpm with a stir bare until the boiling point. Then, 4 mL of citrate solution was rapidly added, the mix solution was maintained at  $140^\circ\text{C}$  for 15 minutes. Prior to each synthesis, all glass materials were cleaned with aqua regia. All suspensions were kept away from the light and at  $+4^\circ\text{C}$ .

To evaluate the influence of  $\text{KAuCl}_4$  introduced on the synthesized nanoparticles, increasing quantities of  $\text{KAuCl}_4$  and citrate at 1%, 2% or 3% introduced were evaluated using a constant citrate/gold molar ratio fixed at 5.2 (table1).

Table 2 : Gold nanoparticles synthesis conditions and characterization of the three AuNPs suspension SA, SB and SC

<i>Protocols</i>	<i>SA</i>	<i>SB</i>	<i>SC</i>
<i>KAuCl<sub>4</sub> (mg)</i>	11.2	22.4	33.6
<i>Citrate (%)</i>	1.0	2.0	3.0
<i>Size UV-vis (nm)</i>	18.9	13.8	12.7
<i>Size TEM (nm)</i>	18.7	15.0	13.2
<i>Size DLS (nm)</i>	22.5	18.2	16.9
<i>Conc UV-vis (number of NPs /mL)</i>	$3.2 \times 10^9$	$8.8 \times 10^9$	$14.0 \times 10^9$
<i>PDI</i>	0.097	0.174	0.223

### CHARACTERIZATION OF AuNPs

In order to evaluate the nanoparticles size and the polydispersity of the suspension, nanoparticles colloidal suspensions were characterized by transmission electronic microscopy (TEM), UV visible spectroscopy (UV – vis) and Dynamic Light Scattering (DLS).

A 1:4 diluted suspension of AuNPs was analyzed by UV – visible spectra from 300 to 900 nm. The measurements were performed in a 1 cm plastic cell using a Varian Cary 50 UV – visible (Agilent, Les Ulis, France). The maximum wavelength ( $\lambda_{max}$ ) and the absorbance at 450 nm ( $A_{450}$ ) were acquired to characterize the sizes of AuNPs and their concentrations respectively (eq.1 and eq.2 [20]).

Equation 1 : Equation to calculate the size of AuNPs with UV-vis spectra. B is a constant equal to 3,  $A_{spr}$  corresponding to the maximal absorbance,  $A_{450}$  to the absorbance at 450 nm and C is a constant equal to 2.20.

$$Size(nm) = exp\left(B \times \frac{A_{spr}}{A_{450}} - C\right)$$

Equation 2 : Equation to calculate the number of AuNPs with UV-vis spectra.  $A_{spr}$  corresponding to the maximal absorbance,  $A_{450}$  to the absorbance at 450 nm and d the diameter of NPs.

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left[ -0.295 + 1.36 \exp\left( -\left( \frac{d - 96.8}{78.2} \right)^2 \right) \right]}$$

The hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PDI) of AuNPs was measured at 25°C by DLS using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instrument, England). Samples were observed with a JEM 2100-Plus microscope (JEOL, Croissy, France) operating at 200 kV. The electron microscopy images were recorded with a Rio 16 (Gatan®) camera. The average AuNPs size was calculated using the ImageJ software based on the measurement of 100 AuNPs for each suspension, measured on different fields.

### DESIGN OF EXPERIMENT (DOE)

In order to optimize SERS conditions to analyze norepinephrine using gold nanoparticles suspensions, two designs of experiments including a Box-Behnken and

a full factorial design were tested. Experiments were performed for two concentrations of norepinephrine at 20 and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . DoE were calculated and interpreted using JMP trial 15.1.10. Each factorial design was built for 3 factors at 3 levels (table 2).

Using the Box-Behnken design, a total of 12 experiments were realized with three repetitions for central point (12 experiments + 3 central points). Using the full factorial design, a total of 81 experiments were performed and each experiment was randomly repeated 3 times (27 experiments x 3 repetitions). For both DoE, the optimization criterion was the intensity at 1280  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to the most intensive band of NOR [21]. The objective was to maximize the intensity at 1280  $\text{cm}^{-1}$ .

To obtain an enhancement of the signal, it was important to control the aggregation between AuNPs and the analyte. For this purpose, the two DoE implicating three factors directly implicated in aggregation process: the AuNPs quantities, the HCl concentration and the ratio between AuNPs and analyte volumes. The HCl was added with a constant volume of 10  $\mu\text{L}$  for each experiment.

Table 3 : Factors and levels used for the box-Behnken and the full factorial DoE

	<i>Level -1</i>	<i>Level 0</i>	<i>Level 1</i>
<i>Gold amount for synthesis (mg/100mL)</i>	11.2 (SA)	22.4 (SB)	33.6 (SC)
<i>Concentration HCl (M)</i>	0.3	0.5	0.7
<i>Ratio <math>V_{NPs} / V_{Nor}</math></i>	0.5 (200 $\mu\text{L}$ / 400 $\mu\text{L}$ )	2 (400 $\mu\text{L}$ / 200 $\mu\text{L}$ )	3.5 (465 $\mu\text{L}$ / 135 $\mu\text{L}$ )

To validate the DoE, several criteria must be verified such as variance analysis, the curve predicted intensity vs observed intensity and the aspect of residuals (normality, homoscedastic repartitions, low values).

#### **SAMPLE PREPARATION AND SERS MEASUREMENT**

SERS measurements were realized with a handheld Raman MIRA M-1 (Methrom® Instant Raman Analyser, France). The excitation source was a 785 nm single-mode diode laser generating a maximum of 75 mW on the sample. Analyses were conducted using the lens module at a focal distance of 8 mm with the orbital raster scan (ORS) system. Using ORS system, a tightly focused laser beam scans circularly the sample which contributes to increase the interrogative area on the sample area. This provides

high intensity of spectrum while maintaining high spectral resolution which is particularly interesting for the analysis of elements at low concentration. The spectral region studied was  $400\text{-}2,300\text{ cm}^{-1}$  with a spectral resolution from  $12$  to  $14\text{ cm}^{-1}$ .

NOR commercial solution at  $2\text{ mg.mL}^{-1}$  was diluted in ultra-pure water at  $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . SERS experiments were randomly prepared and analyzed according to the experimental designs presented in section 2.4. For each experiment, AuNPs and NOR were first mixed in a glass vial for 5 seconds and then  $10\text{ }\mu\text{L}$  of HCl was added to the mixed solution and vortexed for 5 seconds. SERS spectra were immediately acquired after preparation. SERS signal were measured from 0 to 4 min every 8 seconds using 3 seconds of acquisition time. A total of 31 SERS spectra for each sample were collected.

#### **DATA ANALYSIS**

Before analysis of DoE, spectral analysis and data analysis were performed with the software RStudio®: R Core Team (2020) (R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), version 1.2.5042. Several pretreatments and a combination of pretreatments as asymmetric Least Square (ALS) were used to correct the baseline, standard Normal Variation (SNV) to correct the additive and multiplicative effect and smoothing of Savitsky Golay (SG) to reduce noise.

The same pretreatment was applied to all SERS spectra acquired for the two DoE. For all experiments, one spectrum over the 31 spectra acquired was selected to interpret the DoE. The contact time was optimized for the highest intensity at  $1280\text{ cm}^{-1}$  with a good coefficient of variation between repetitions of one experiment. The selected responses were then incorporated into DoE.

### **RESULTS**

#### **CHARACTERIZATION OF AuNPs**

A total of three suspensions of AuNPs (SA, SB and SC) was synthesized following the protocols previously described. The characteristics of the three AuNPs suspensions determined by UV-vis, DLS and TEM are presented in the table 1. UV-visible spectra presented in figure 2 showed for each AuNPs suspension a maximum absorption between  $519\text{ nm}$  and  $521\text{ nm}$  (mean =  $517.7\text{ nm}$ ) with a residual standard deviation of  $0.18\%$ .

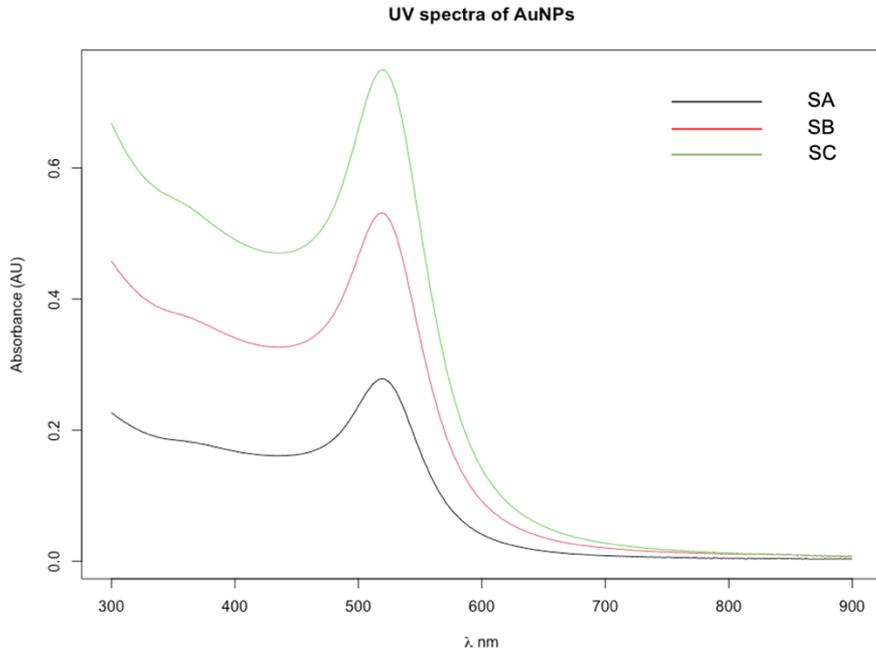


Fig. 2 UV-visible spectra of the different AuNPs suspension.

For the three suspensions of AuNPs, low polydispersity index (PDI < 0.3) was calculated in favor of a low polydispersity of NPs within the suspensions. Diameters estimated with DLS were hydrodynamic diameters of AuNPs, so they were higher than diameters calculated with UV-visible spectra and TEM. The TEM allowed to view the aspect of NPs and to estimate the size considering many nanoparticles. Figure 3 shows the pictures of the AuNPs for each suspension; they were spherical with low polydispersity. As reported to table 1, size of AuNPs decrease from 18,9 nm to 12,7 nm with amount of gold.

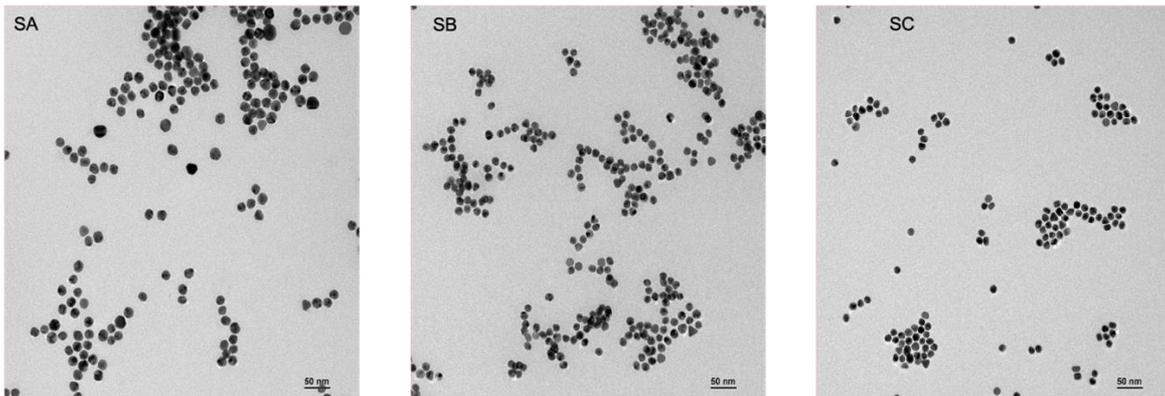


Fig. 3 : TEM images of gold nanoparticles in suspension synthesized according to the three protocols (SA, SB and SC) .

#### SERS SPECTRA DESCRIPTION

A total of 5,042 spectra were acquired (2,511 spectra for each design of experiments).

The 31 acquisitions over the time showed an evolution of the SERS signal on time as shown in figure 4 A. The pretreatment with the best spectra correction (effect and baseline) was ALS with a smoothing of Savitsky-Golay to reduce the noise and to correct the baseline (figure 4 B). All spectra were corrected with the same pretreatment.

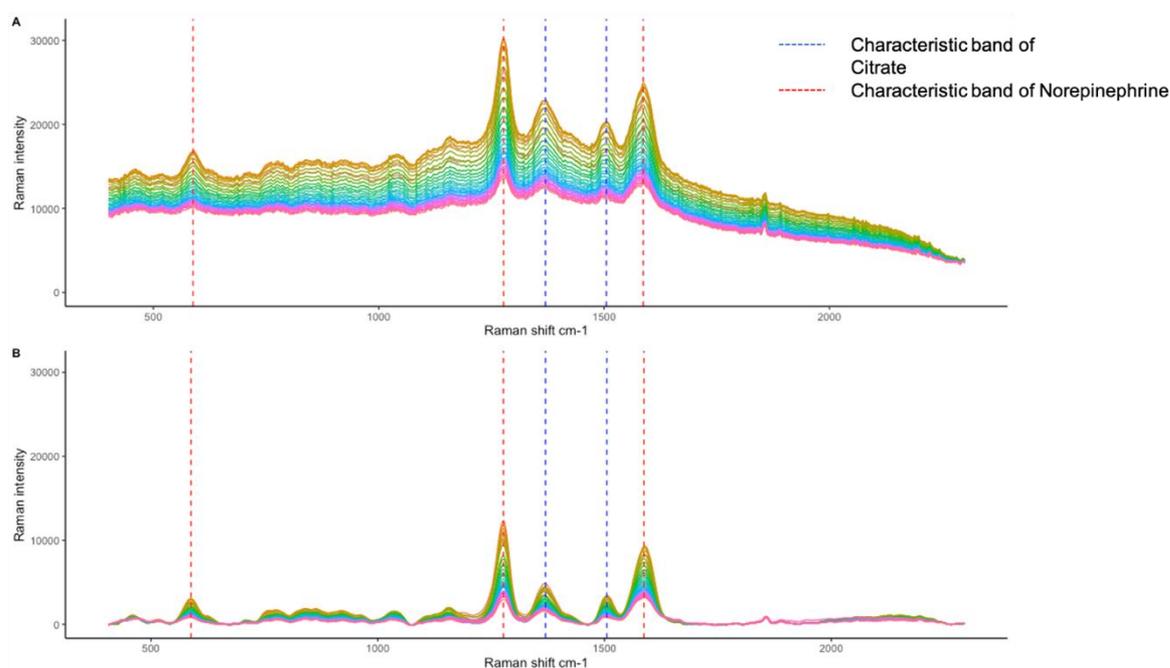


Fig. 4 : SERS spectra of Norepinephrine for the first experiment (levels SB -HCl 0.7 M – Ratio 0.5) of the DoE A) without pretreatment and B) after pretreatment by ALS – SG.

As presented in figure 4, characteristic Raman shifts of citrate and norepinephrine were identified [22–24] : an intense band at  $1280\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the stretching C-O, a band at  $1425\text{ cm}^{-1}$  characteristic of the bound C-N and a band at  $1593\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the stretching C-C of NOR. The peaks identified were known in several studies. One study was published by Munro et al. about the characterization of citrate on silver nanoparticles in SERS [25] and allowed to identify the principal band at  $1417\text{ cm}^{-1}$  corresponding to a carboxylate symmetric stretching ( $\text{ns COO}^-$ ). Another study published by Takenaka [26] allowed to identify a peak around  $1530\text{ cm}^{-1}$  which matches with antisymmetric stretching  $\text{COO}^-$  vibrations.

#### SERS CONTACT TIME

For each experiment, an important influence of the contact time on SERS signal was observed. Figure 5 shows the evolution of the signal for the most intensive band at  $1280\text{ cm}^{-1}$  for three experiments of the full factorial DoE and suggests different kinetics of interaction between AuNPs and NOR. These different kinetics were classified as stable aggregation (Fig. 5A), evolutive aggregation (Fig. 5B) or sedimentation of AuNPs (Fig. 5C). Indeed, an increase of the signal intensity was assimilated to an aggregation

of AuNPs and an improvement of the interaction between AuNPs and NOR. A decrease of intensity over time was related to a sedimentation phenomenon of AuNPs. Figure 5 A was assimilated to an aggregation of AuNPs whereas Figure 5 C was associated to a sedimentation of AuNPs. Figure 5 B was related to low aggregate phenomena with an increase of the intensity and then a decrease until sedimentation of the AuNPs-NOR aggregate.

This result shows that the control of AuNPs aggregation and AuNPs/NOR interaction is complex to reproduce whereas it is an essential element to control in the perspective of a quantitative analysis.

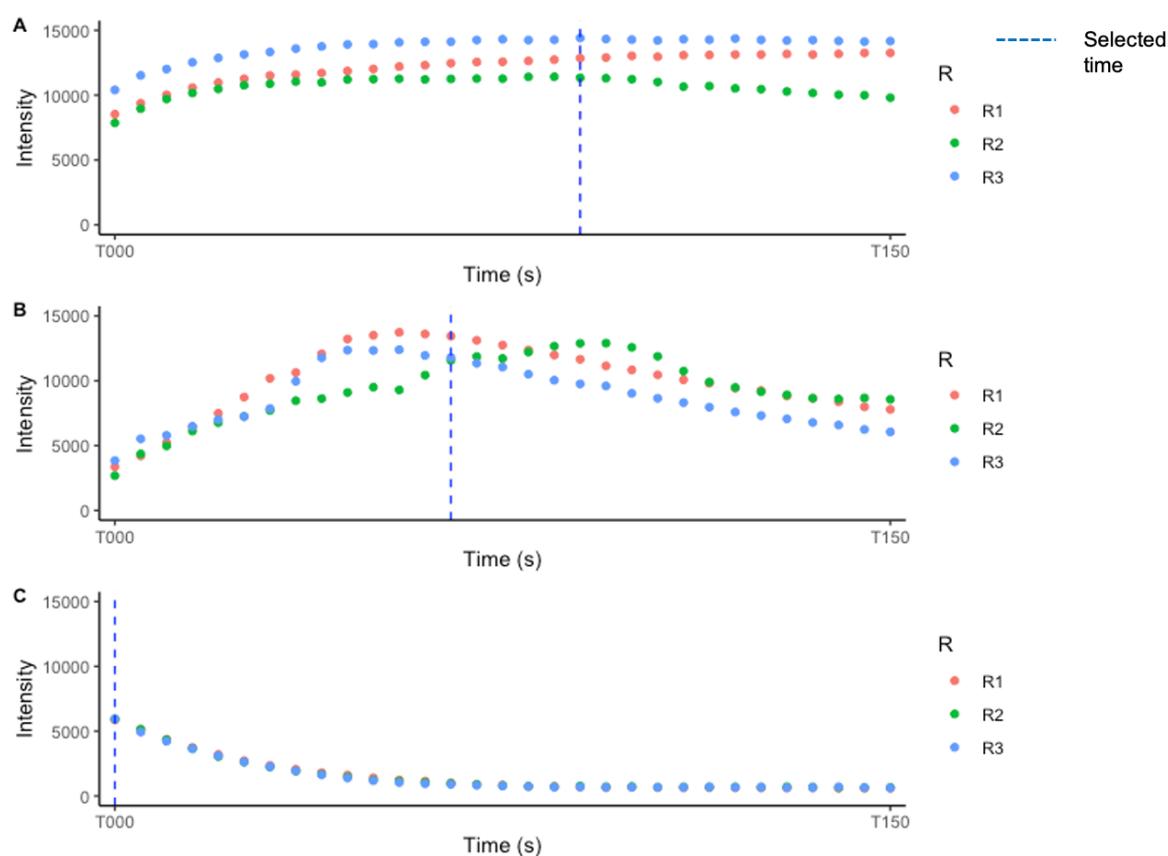


Fig. 5 evolution of the SERS signal over the time for three the repetition (R1, R2, R3) of three different experiments. A- Experiment levels SB – HCl concentration 0.3 M – Ratio 2. B – Experiment levels SA – HCl concentration 0.3 M – Ratio 2. C – Experiment levels SC – HCl 0.7 M – Ratio 3.5. The blue dotted lines represented the time selected for the analysis of DoE.

#### DOE ANALYSIS

For the Box-Behnken analysis, outliers were not removed because there are no repetitions for the experiment. For the full factorial design, evolution of the SERS signal

over the time for the three repetitions was not reproducible: if one repetition of one experiment had a different evolution from the other repetition of the same experiment, the repetition was considered as an outlier and was removed for the full factorial analysis.

As previously observed, various evolution of the SERS signal over the time were observed among the conditions of the DoE. To determine the optimal condition of aggregation for each condition, we selected the time with the maximal mean intensity at  $1280\text{ cm}^{-1}$  as represented fig. 5.

#### BOX-BEHNKEN DESIGN ANALYSIS

First, a Box-Behnken design analysis was evaluated. For the first concentration at  $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , the DoE was validated with a correlation coefficient at 0.96 and a variance analysis significant (p-value = 0.00069). On contrast, the DoE for the concentration at  $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  was not significant (p-value = 0.39). As the objective of the study was to determine the optimal conditions for analysis over a concentration range of 20 to  $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , the Box-Behnken design was not retained and a full factorial design was preferred.

#### FULL FACTORIAL DESIGN ANALYSIS

Using a full factorial design, the DoE was validated for the two concentrations (Table 6). The correlation coefficient ( $R^2$ ) between predicted and observed values was 0,82 and 0,76 for the DoE at  $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively, which reveals a good prediction of the developed model, specifically for SERS measurements. Indeed, there are many sources of uncontrolled or unknown signal variability, which may lead to a lack of linearity and fit between observed and predicted responses by the model. The residuals were also homoscedastic, low and had a normal distribution. The variance analysis (ANOVA) for these DoE was significant (p-value < 0,05): the model error was lowest than the residual error as shown in the table 3.

Table 4 : Table of ANOVA for the two DoE

Intensity $1280\text{ cm}^{-1}$ at $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$				
	Degrees of freedom	Medium square	F exp	p-value
Model	7	4.89E+07	26.49	< 0.0001
Error	57	1.85E+06		
Total	64			

Intensity 1280 cm<sup>-1</sup> at 20 µg.mL<sup>-1</sup>

Model	7	3.09E+07	15.0681	< 0.0001
Error	54	2.05E+06		
Total	61			

The most significant effects in these two DoE were the quantity of AuNPs and the interaction between the quantity of AuNPs and the volume ratio and between the quantity of AuNPs and the concentration of HCl. The two recapitulative tables for all effects are presented in table 4 and 5.

Table 5: Summary table of effect for DoE at 20 µg.mL<sup>-1</sup> (\* = significant effect)

<i>Terme</i>	<i>Estimation</i>	<i>Erreur standard</i>	<i>t ratio</i>	<i>Prob. &gt;  t </i>
<i>Constant</i>	5894.33	184.14	32.01	<0.0001*
<i>Quantity of gold NPs</i>	-1927.82	224.65	-8.58	<0.0001*
<i>HCl concentration</i>	669.38	220.88	3.03	0.0037*
<i>Ratio</i>	-590.83	223.53	-2.64	0.0107*
<i>Quantity of gold NPs*HCl</i>	-79.19	280.13	-0.28	0.78
<i>Quantity of gold NPs*Ratio</i>	-615.20	264.26	-2.33	0.024*
<i>HCl*Ratio</i>	320.04	264.02	1.21	0.23
<i>Quantity of gold NPs *HCl*Ratio</i>	-21.06	323.44	-0.07	0.95

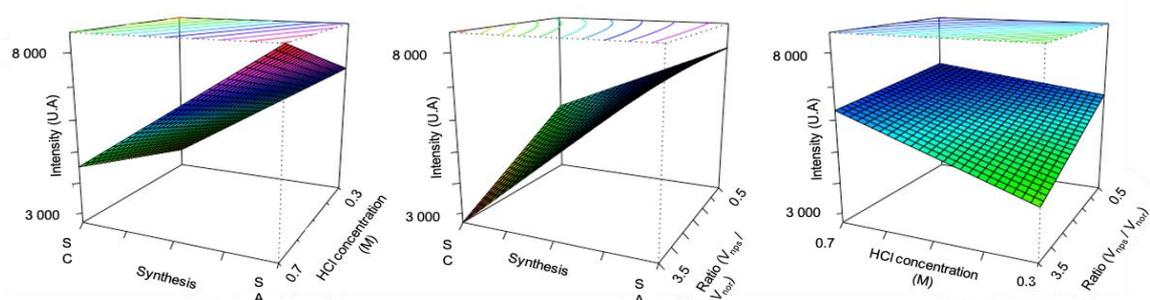
Table 6 : Summary table of effect for DoE at 100 µg.mL<sup>-1</sup> (\* = significant effect)

<i>Terme</i>	<i>Estimation</i>	<i>Standard error</i>	<i>t ratio</i>	<i>Prob. &gt;  t </i>
<i>Constant</i>	10378.21	175.282	59.21	<0.0001*
<i>Quantity of gold NPs</i>	-2268.415	211.57	-10.72	<0.0001*
<i>HCl concentration</i>	-59.86645	213.0975	-0.28	0.78
<i>Ratio</i>	-292.7717	208.822	-1.40	0.17

Quantity of gold NPs *HCl	-1170.13	263.2111	-4.45	<0.0001*
Quantity of gold NPs *Ratio	-1370.023	265.6268	-5.16	<0.0001*
HCl*Ratio	-801.7732	260.0053	-3.08	0.0031*
Quantity of gold NPs *HCl*Ratio	323.5982	337.0268	0.96	0.34

The best response for the DoE at  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was obtained for SA (level -1), HCl 0.7 M (level +1), and a ratio of 3.5 (level +1) as shown by the surface responses shown in figure 6 a. In contrast, the maximization of the SERS signal enhancement obtained at  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was shown on response surfaces (figure 6 b) and corresponded to SA (level -1), HCl 0.7 M (level +1), and a ratio of 0,5 (level -1).

A. Responses surface for DoE at  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$



B. Responses surface for DoE at  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$

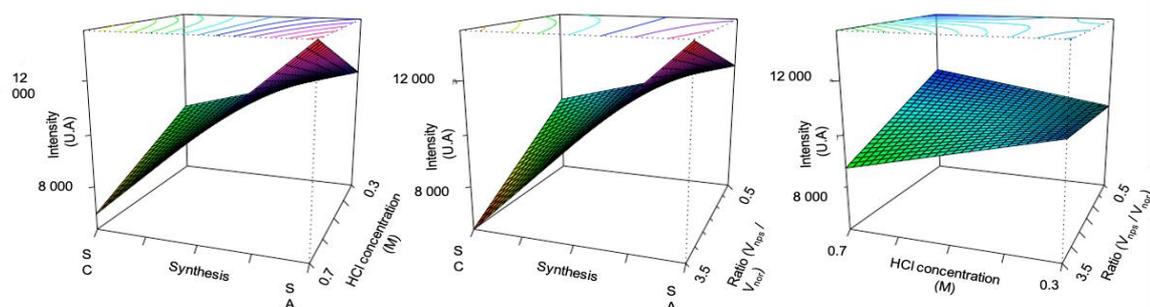


Fig. 6 responses surfaces for the two DoE – Conditions: Synthesis SB – HCl concentration 0.5 M – Ratio 2.0

Finally, optimal conditions depended on the analyte concentration. For the range  $20 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , the optimal conditions were the synthesis SA and the concentration of HCl at 0.7 M. The ratio could be added function of the concentration.

## DISCUSSION

This work showed an original approach using DoE to optimize SERS analysis. In order to obtain a SERS signal, the control the experimental conditions and thus of aggregation is essential to optimise the signal enhancement. Due to the wild sources of variability in the aggregation parameters such as nanoparticle nature, size or concentration, aggregation agent nature or concentration, analyte concentration and volume ratio between the analyte and the NPs solution, the use of a DoE is essential. To limit the number of experiments in this work, only three optimization factors were considered since the nature and size of the AuNPs and the nature of the aggregating agent were fixed. The work focused on the most important factors for aggregation: the ratio  $V_{\text{NPs}} / V_{\text{NOR}}$ , the HCl concentration and the gold amount by synthesis. Two DoE at two extreme concentrations showed that the optimal conditions varied depending on the NOR concentration and showing its role in the aggreation process.

Despite the interest of the DoE to optimize experimental conditions of SERS analysis, this approach was particularly difficult to perform because aggregation conditions depended on optimization parameters. Regarding results, the concentration of AuNPs in suspension probably has a small impact on the SERS intensity comparatively to AuNPs size which was significantly different between the 3 protocols. Since the size decreased with the augmentation of the gold / citrate ratio, the concentration of AuNPs in the suspensions increased (27). To improve the aggregation between the AuNPs and the analyte, an optimization on the size of AuNPs could be realized. The second parameter evaluated by the DoE, the ratio between the volume of AuNPs and the volume of analyte in the sample, also had a small impact on the aggregation and the SERS signal. The last parameter was the HCl concentration which promotes aggregation between nanoparticles and NOR. This parameter is important to control because an excess of HCl leads to a rapid sedimentation and a loss of the SERS intensity, in particular with high concentration of AuNPs. Despite the impact of the contact time between AuNPs and the analyte, this parameter was not integrated as factor in the DoE due to the difficulty to select three levels. Thus, SERS signal was acquired from 0 to 4 min every 8 seconds, 31 SERS spectra were acquired per sample and all times were considered to optimize the contact time. In order to simplify the interpretation of the DoE, one time was selected for each SERS experiment based on the most intensive mean intensity at  $1280 \text{ cm}^{-1}$ .

In addition to promoting aggregation, the data analysis and more particularly data processing such as pretreatment and outliers' identification constitute one of the main elements to interpret SERS spectra and DoE. The objective after preprocessing is to obtain for one experimental condition a stable evolution of SERS signal over time which corresponds to stable aggregation conditions, developing a quantitative model.

Several conditions are necessary: the reproducibility of AuNPs synthesis, the control of aggregation conditions (limitation of saturation phenomenon or sedimentation phenomenon), a good pre-processing of SERS spectra and the withdrawal of outliers before the development of the model.

Finally, to have a SERS detection, the interaction between the NPs and the drug has to be maximal and therefore, the aggregation has to be controlled. This work was based on the optimization of SERS experimental conditions and thus, on the aggregation phenomenon. To obtain a good enhancement of the signal for all samples, robust aggregation is required. Moreover, the study shows that optimal condition varies with the concentration of the drug and therefore, the usefulness of optimizing experimental conditions prior to quantitative analyses according to the concentration range.

## **CONCLUSION**

This study highlights the use of DoE as a powerful tool to optimize SERS signal and SERS sample preparation. The objective of this work was to determine the optimal conditions of analysis in SERS spectroscopy to obtain the most intense enhancement and the optimal experimental conditions to construct quantitative models. Optimal conditions were determined at  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in order to consider quantification over this concentration range. To determine these conditions, several conditions such as reproducibility of the synthesis of gold nanoparticle suspensions, optimization of the aggregation of gold nanoparticles and interaction with norepinephrine are necessary.

This article is thus a first indispensable work to define optimized experimental parameters to reduce SERS signal variability and promote sensibility. Indeed, this study shows the usefulness of a prior optimization of SERS experimental conditions before starting quantitative analyses.

## **Acknowledgments :**

The authors would like to thank the Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry of Liège University, specifically Ph.D. Eric Ziemons and Charlotte De Bleye. The authors would also like to thank NanoBio-ICMG Platform (FR 2607, Grenoble), specifically Jean-Luc Putaux for the TEM images. Finally, they are grateful to ARC for the financial support to Marion Berge.

Formatting of funding sources:

This work was supported by the ARC foundation.

- [1] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, P. Prognon, E. Caudron, Discriminative and Quantitative Analysis of Antineoplastic Taxane Drugs Using a Handheld Raman Spectrometer, *BioMed Res. Int.* 2018 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/8746729>.
- [2] L.M.M. Lê, M. Berge, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Rapid discrimination and quantification analysis of five antineoplastic drugs in aqueous solutions using Raman spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 111 (2018) 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.046>.
- [3] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, A. Baillet Guffroy, P. Prognon, A. Dowek, E. Caudron, Quantification of gemcitabine intravenous drugs by direct measurement in chemotherapy plastic bags using a handheld Raman spectrometer, *Talanta.* 196 (2019) 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.062>.
- [4] J. Cailletaud, C. De Bleye, E. Dumont, P.-Y. Sacré, L. Netchacovitch, Y. Gut, M. Boiret, Y.-M. Ginot, Ph. Hubert, E. Ziemons, Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 458–472. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.056>.
- [5] A. Haddad, M.A. Comanescu, O. Green, T.A. Kubic, J.R. Lombardi, Detection and Quantitation of Trace Fentanyl in Heroin by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12678–12685. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02909>.
- [6] C. Zhang, S. Han, H. Zhao, S. Lin, W.-L.-J. Hasi, Detection and Quantification of Bucinnazine Hydrochloride Injection Based on SERS Technology, *Anal. Sci.* 34 (2018) 1249–1255. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P158>.
- [7] Pilot, Signorini, Durante, Orian, Bhamidipati, Fabris, A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering, *Biosensors.* 9 (2019) 57. <https://doi.org/10.3390/bios9020057>.
- [8] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQUILLAN, RAMAN SPECTRA OF PYRIDZNE ADSORBED AT A SILVER ELECTRODE, *Chem. Phys. Lett.* 26 (n.d.) 4.
- [9] L.F. Sallum, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, R.L. Carneiro, Optimization of SERS scattering by Ag-NPs-coated filter paper for quantification of nicotinamide in a cosmetic formulation, *Talanta.* 118 (2014) 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.039>.
- [10] M.B. Mamián-López, R.J. Poppi, Quantification of moxifloxacin in urine using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate curve resolution on a nanostructured gold surface, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7671–7677. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7200-y>.
- [11] W. Zhu, B.-Y. Wen, L.-J. Jie, X.-D. Tian, Z.-L. Yang, P.M. Radjenovic, S.-Y. Luo, Z.-Q. Tian, J.-F. Li, Rapid and low-cost quantitative detection of creatinine in human

- urine with a portable Raman spectrometer, *Biosens. Bioelectron.* 154 (2020) 112067. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112067>.
- [12] S.-Y. Long, Z.-P. Chen, Y. Chen, R.-Q. Yu, Quantitative detection of captopril in tablet and blood plasma samples by the combination of surface-enhanced Raman spectroscopy with multiplicative effects model: Detection of captopril in tablet and blood plasma samples, *J. Raman Spectrosc.* 46 (2015) 605–609. <https://doi.org/10.1002/jrs.4698>.
- [13] X. Chen, M. Lin, L. Sun, T. Xu, K. Lai, M. Huang, H. Lin, Detection and quantification of carbendazim in Oolong tea by surface-enhanced Raman spectroscopy and gold nanoparticle substrates, *Food Chem.* 293 (2019) 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.085>.
- [14] L. Mandrile, A.M. Giovannozzi, F. Durbiano, G. Martra, A.M. Rossi, Rapid and sensitive detection of pyrimethanil residues on pome fruits by Surface Enhanced Raman Scattering, *Food Chem.* 244 (2018) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.003>.
- [15] Q. Zuo, Y. Chen, Z.-P. Chen, R.-Q. Yu, Quantification of Cadmium in Rice by Surface-enhanced Raman Spectroscopy Based on a Ratiometric Indicator and Conical Holed Enhancing Substrates, *Anal. Sci.* 34 (2018) 1405–1410. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P342>.
- [16] C. De Bleye, E. Dumont, E. Rozet, P.-Y. Sacré, P.-F. Chavez, L. Netchacovitch, G. Piel, Ph. Hubert, E. Ziemons, Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering: From development to method validation, *Talanta.* 116 (2013) 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.084>.
- [17] L.F. Sallum, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, R.L. Carneiro, Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 133 (2014) 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.198>.
- [18] A. Dowek, L.M.M. Lê, T. Rohmer, F.-X. Legrand, H. Remita, I. Lampre, A. Tfayli, M. Lavielle, E. Caudron, A mathematical approach to deal with nanoparticle polydispersity in surface enhanced Raman spectroscopy to quantify antineoplastic agents, *Talanta.* 217 (2020) 121040. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121040>.
- [19] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>.
- [20] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra, *Anal. Chem.* 79 (2007)

4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.

- [21] A.S. Moody, B. Sharma, Multi-metal, Multi-wavelength Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Neurotransmitters, *ACS Chem. Neurosci.* 9 (2018) 1380–1387. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00020>.
- [22] A.S. Moody, T.D. Payne, B.A. Barth, B. Sharma, Surface-enhanced spatially-offset Raman spectroscopy (SESORS) for detection of neurochemicals through the skull at physiologically relevant concentrations, *The Analyst.* 145 (2020) 1885–1893. <https://doi.org/10.1039/C9AN01708A>.
- [23] N.Soo. Lee, Y.Zung. Hsieh, R.F. Paisley, M.D. Morris, Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds, *Anal. Chem.* 60 (1988) 442–446. <https://doi.org/10.1021/ac00156a014>.
- [24] M.D. Morris, Resonance Raman spectra of the aminochromes of some biochemically important catechol amines, *Anal. Chem.* 47 (1975) 2453–2454. <https://doi.org/10.1021/ac60364a004>.
- [25] C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering, *Langmuir.* 11 (1995) 3712–3720. <https://doi.org/10.1021/la00010a021>.
- [26] T. Takenaka, Y. Fujiyoshi, N. Uyeda, SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING OF CITRATE IONS ADSORBED ON GOLD SOL PARTICLES, (n.d.) 9.

Les synthèses d'AuNPs ont d'abord été caractérisées en UV-vis et sont représentées sur la figure 26. Sur cette représentation, l'absorbance au  $\lambda_{\max}$  paraît proportionnelle aux conditions de synthèse et augmente avec les quantités d'or et de citrate introduit au départ. Ce résultat laisse présager une bonne corrélation entre l'augmentation de la quantité d'or et de citrate, à proportion constante, et la concentration en AuNPs dans la suspension colloïdales finales.

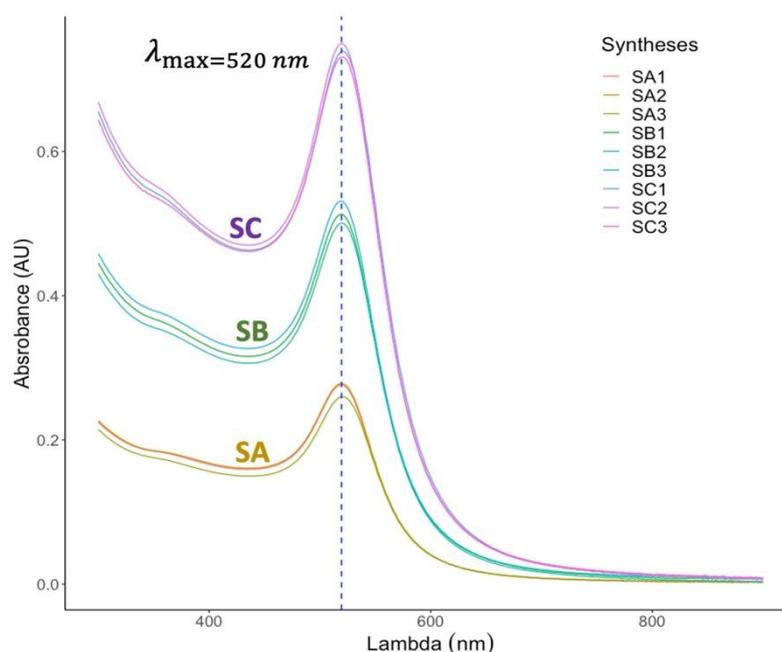


Figure 26 : Synthèses d'AuNPs selon un protocole dérivé de la méthode de Turkevich à ratio constant citrate/or égal à 5. SA : or = 11,2 mg, SB : or = 22,4 mg, SC : or = 44,8 mg.

Finalement, les résultats sur les tailles des AuNPs (tableau 5) pour les différentes conditions n'étaient pas ceux attendus et les différentes synthèses n'avaient significativement pas la même taille. Ce résultat a de fait compliqué l'interprétation des plans d'expérience puisque ce facteur n'est pas uniquement lié à la concentration en AuNPs mais également à la taille de celles-ci. Ces synthèses étaient toutefois de taille et de forme sphérique beaucoup plus homogènes que celles produites à partir de sel d'argent. Ainsi toutes les synthèses ont été considérées comme sphériques et homogènes en taille et en forme, à conditions initiales fixées. Le premier axe d'amélioration étant ainsi validé, ce protocole a été utilisé pour synthétiser les AuNPs dans ce nouveau travail.

Tableau 5 : Caractérisation des nanoparticules d'or SA, SB, SC en spectroscopie UV-visible (UV), diffusion dynamique de la lumière (DLS) et en microscopie électronique à transmission (MET), les coefficients de chaque mesure sont indiqués (CV%).

	<b>SA (nm)</b>	<b>SB (nm)</b>	<b>SC (nm)</b>
<b>UV</b>	19,2	13,9	12,5
<b>(CV%)</b>	(1,07)	(1,7)	(1,9)
<b>DLS</b>	24,0	18,81	17,8
<b>(CV%)</b>	(8,4)	(2,8)	(5,2)
<b>MET</b>	18,8	15,0	12,6
<b>(CV%)</b>	(4,3)	(3,1)	(4,0)
<b>Concentration (NPs/mL)</b>	3,1.10 <sup>8</sup>	8,4.10 <sup>8</sup>	14.10 <sup>8</sup>

Pour la suite des expériences, une synthèse par condition a été sélectionnée en fonction de leur indice de polydispersité (compris entre 0,097 et 0,335). Les synthèses SA2, SB3 et SC2 ont été choisies pour réaliser les expériences en SERS puisqu'elles possèdent les PDI les moins élevés.

Le suivi de l'intensité du signal mesuré au cours du temps, à partir du suivi de l'intensité à 1280 cm<sup>-1</sup>, a révélé des cinétiques d'agrégation / sédimentation différentes en fonction des conditions expérimentales qui peuvent se résumer en trois profils distincts (figure 27) :

- une augmentation de l'intensité du signal au cours du temps puis une stabilisation, suggérant un procédé d'agrégation lent dans les premiers temps puis un plateau plus ou moins long de stabilité de l'agrégat formé,
- une augmentation de l'intensité du signal rapide suivi d'une diminution, suggérant une agrégation rapide suivi d'une instabilité de l'agrégat formé conduisant à une sédimentation,
- une diminution du signal au cours du temps, suggérant une agrégation immédiate suivie d'une sédimentation irréversible des NPs.

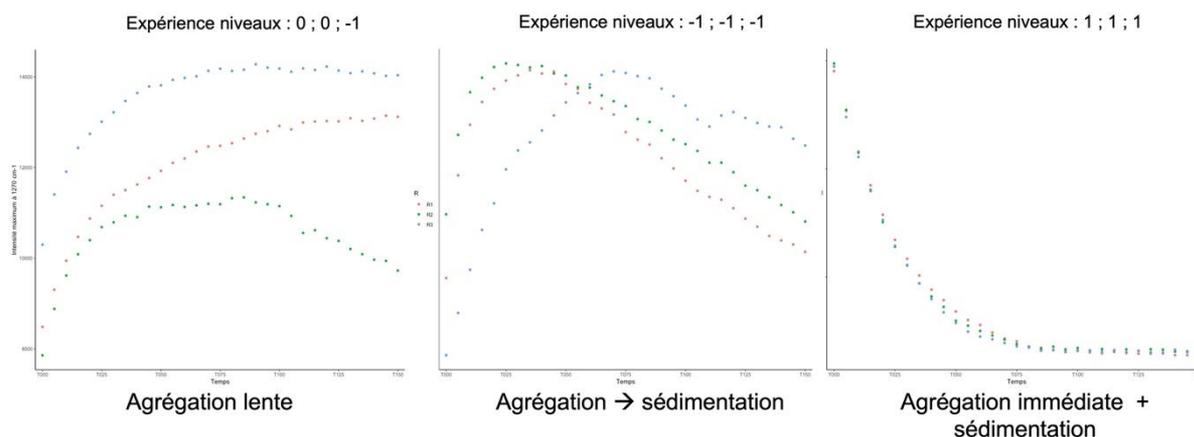


Figure 27 : Représentation de trois profils caractéristiques de l'évolution de l'intensité du déplacement Raman à  $1280\text{ cm}^{-1}$  en fonction du temps, caractérisant des profils d'agrégation différents à la concentration  $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

L'allure des profils cinétiques varie d'une expérience à l'autre. Ce résultat démontre l'impact des différents facteurs étudiés sur l'agrégation du système ainsi que l'impact de l'agrégation sur la variabilité de l'exaltation du signal Raman. Le manque de répétabilité entre les trois répétitions souligne la difficulté à maîtriser l'agrégation dans les conditions étudiées, avec une agrégation médiée par l'introduction du HCl. Dans certaines études [45,149], on retrouve, comme nous l'avons réalisé dans le travail sur l'analyse du 5FU en SERS, une optimisation du temps de contact NPs / analyte à partir de la stabilisation du signal Raman déterminée dans une condition fixée, à un niveau de concentration. Il apparaît dans ce travail que pour des conditions expérimentales différentes, les profils cinétiques sont différents. Ce résultat illustre l'importance de ces facteurs sur l'agrégation. Il n'est donc pas possible dans de telles conditions de sélectionner un temps fixe pour l'ensemble des conditions expérimentales étudiées. A notre connaissance, il s'agit de l'une des rares études dans laquelle cette cinétique est évaluée à différents niveaux de facteurs. En conséquence, cela souligne l'originalité de cette étude et la nécessité de choisir le temps de contact de manière rationnelle pour chaque condition expérimentale. Pour la construction des plans d'expériences, s'est donc posée la question du choix du temps de contact entre AuNPs et NOR. La solution retenue a été de sélectionner, pour chaque expérience, le temps qui maximisait en moyenne l'intensité du signal Raman à  $1280\text{ cm}^{-1}$ . De plus, lorsqu'une des répétitions pour la même expérience était différente des deux autres, cette répétition était considérée comme outlier et était retirée de l'analyse du plan d'expériences. Concernant le plan de Box-Behnken, qui n'inclue que des répétitions au centre du modèle, l'intensité maximale à  $1280\text{ cm}^{-1}$  a été sélectionnée. Une fois cette stratégie établie, les plans d'expériences ont pu être construits et analysés.

Pour le plan de Box-Behnken réalisé à la concentration  $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , l'analyse de la variance n'était pas significative ( $p\text{-value} = 0,39$ ), ce qui n'a pas permis de valider le modèle. Les plans factoriels complets ont quant à eux été validés selon l'ensemble des paramètres statistiques analysés, l'analyse de la variance était significative ( $p\text{-}$

value < 0,05) pour les deux niveaux de concentration. En conséquence, seuls les plans factoriels complets ont été interprétés.

L'optimum pour la concentration de NOR à  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  est obtenu pour la synthèse SA, la concentration d'HCl de 0,7 M et un ratio de 0,5. L'optimum pour la concentration de NOR à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  est déterminé pour la synthèse SA, la concentration d'HCl de 0,7 M et un ratio de 3,5. A cette concentration, seul le facteur synthèse était statistiquement significatif, tandis que toutes les interactions de premier ordre l'étaient.

Au départ, le facteur d'analyse pour les NPs étaient la concentration en NPs. La caractérisation des synthèses SA, SB et SC, a montrée des AuNPs de tailles différentes pour les trois conditions de synthèse. L'effet de ce facteur est significatif pour les deux niveaux de concentration, avec un optimum identifié pour SA, correspondant à la synthèse d'AuNPs la moins concentrée qui est constituée des AuNPs de plus grandes tailles. On peut donc supposer, dans nos conditions expérimentales, que plus la taille des AuNPs est élevée, plus l'exaltation du signal Raman est importante et ainsi identifier le facteur taille des NPs comme facteur intéressant à optimiser pour nos futures expérimentations. Le facteur HCl était également significatif pour la concentration la plus basse et dans les termes d'interaction pour la concentration la plus élevée, ce qui établit l'importance de ce facteur dans l'intensité du signal. De la même manière, le ratio  $V_{\text{NPs}} / V_{\text{Nor}}$  était significatif pour la concentration la plus basse et dans les termes d'interaction pour la concentration à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ces résultats montrent que l'ensemble des facteurs étudiés ont un rôle dans l'agrégation du système et sont liés entre eux.

Contrairement à ce qui pouvait être attendu, les optima déterminés étaient différents en fonction de la concentration en NOR. Ce résultat majeur met en avant le rôle de l'analyte dans l'agrégation du système et implique qu'il doit être pris en compte comme facteur à part entière dans l'expérimentation en SERS. De plus, si la concentration impact en elle-même les capacités d'exaltation du signal cela pourrait expliquer en partie la non-linéarité du signal Raman mesuré en SERS pour des gammes de concentrations étendues. Ce résultat impact également l'optimisation du temps de contact entre les NPs et l'analyte. En effet, puisque la concentration en analyte influe sur l'état d'agrégation de la suspension, il est possible que les cinétiques d'agrégation soient différentes en fonction de la concentration analysée et qu'une optimisation sur ce temps soit nécessaire par niveau de concentration. Ainsi, dans nos prochains travaux une attention particulière sera consacrée à l'évolution de l'intensité du signal en fonction du temps par niveau de concentration afin de sélectionner si nécessaire des temps de contacts différents par concentration sur la base de la sélection de l'intensité maximale mesurée.

Cet article nous a permis de démontrer l'intérêt de l'utilisation des plans d'expériences pour l'optimisation des paramètres expérimentaux principaux

intervenants en SERS. Ainsi, en utilisant des plans factoriels complets, l'effet sur l'exaltation du signal Raman des facteurs : conditions de synthèse d'AuNPs, concentration d'HCl et ratio  $V_{\text{AuNPs}} / V_{\text{Nor}}$  a pu être analysé et l'optimum a été sélectionné. A partir de ces différentes conclusions, l'optimum déterminé pour la concentration à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a été retenu pour les expérimentations futures, soit la sélection des AuNPs les plus grandes, la concentration d'HCl la plus importante et le ratio  $V_{\text{NPs}} / V_{\text{analyte}}$  le plus grand. Ces conditions ont été utilisées pour construire les modèles de prédictions qualitatif et quantitatif pour l'analyse de la noradrénaline et d'adrénaline.

### **3.2 CONSTRUCTION DE MODELES MATHÉMATIQUES PREDICTIFS ET DISCRIMINANTS POUR L'ANALYSE DE L'ADRENALINE ET DE LA NORADRENALINE AVEC DES NANOPARTICULES D'OR**

Pour ce travail, les conditions expérimentales précédemment optimisées ont donc été reprises pour construire un jeu de données pour l'analyse SERS de deux molécules : l'adrénaline et la noradrénaline. L'objectif était de confirmer la capacité de la SERS à discriminer des molécules de structure très proche à différents niveaux de concentration et de construire un modèle quantitatif en SERS pour ces deux molécules en partant de NPs issues de synthèses différentes tout en définissant les meilleures stratégies d'analyses mathématiques pour y parvenir. Dans cet objectif et à partir de nos conclusions précédentes, nous souhaitons mettre en évidence que l'amélioration de la reproductibilité de la taille et de la forme des AuNPs au sein de plusieurs lots de synthèse conduisait à un signal Raman plus reproductible que pour des lots composés de NPs hétérogènes. Ainsi, trois lots de synthèse d'AuNPs, suivant les conditions optimisées précédemment ont été synthétisés.

L'acquisition du jeu de données s'est faite à partir de trois lots de synthèses d'AuNPs. Pour chaque lot, trois gammes ont été réalisées en triplicats, pour neuf concentrations d'analyte comprises entre 10 à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Afin de respecter une gamme par jour pour chaque synthèse et les intervalles entre temps de production de la synthèse et temps d'acquisition, le planning expérimental a été construit comme présenté sur la figure 28.

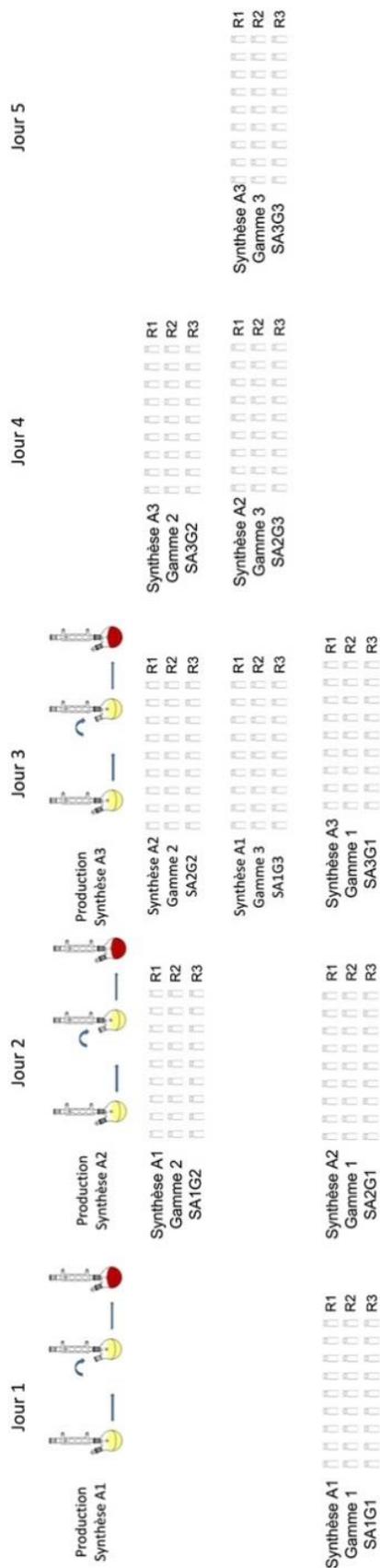


Figure 28 : Déroulement des acquisitions en diffusion Raman exaltée de surface pour la construction du jeu de données pour l'analyse de l'adrénaline et la noradrénaline.

A partir de ces synthèses, les conditions expérimentales optimales retenues dans le travail précédent ont été appliquées. Les mesures ont été réalisées à l'aide du spectromètre portable MIRA pendant 4 min pour suivre l'évolution du signal Raman en fonction du temps. 15 066 spectres ont ainsi été mesurés pour les deux molécules analysées (2x3x3x3x9x31). A partir des données spectrales obtenues, les spectres Raman de l'adrénaline et de la noradrénaline ont été prétraités en appliquant un lissage par SG puis une correction de la ligne de base par ALS. L'évolution de l'intensité à  $1280\text{ cm}^{-1}$  a également été suivie. Des modèles linéaires, logarithmiques, univariés à  $1280\text{ cm}^{-1}$  et multivariés ont été comparés. Pour la validation des modèles prédictifs, les données ont été randomisées en fonction des séries définies pour un couple synthèse/gamme (SAXGX).

L'objectif principal a été de développer des modèles de discrimination et quantification de l'adrénaline et la noradrénaline. De plus, nous avons cherché à répondre à trois questions issues de nos précédents travaux :

- Pour la même condition expérimentale, l'évolution du signal en fonction du temps est-elle stable et reproductible en fonction de la concentration en analyte ?
- La reproductibilité en taille et en forme des NPs permet-elle d'obtenir une amplification du signal Raman plus reproductible ?
- Le gain potentiel en reproductibilité de l'exaltation de l'intensité Raman permettra-t-il une amélioration de la qualité de la prédiction ? L'impact du lot de synthèse aura-t-il une influence sur la qualité de la prédiction de la concentration ? En conséquence, les modèles mathématiques devront-ils comme précédemment être développés en prenant en compte cette variabilité ?

La stratégie globale d'analyse est reprise dans le logigramme présenté ci-dessous (figure 29). Ce travail a été publié dans la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry* et s'intitule : « *Discriminative and quantitative analysis of norepinephrine and epinephrine by surface-enhanced Raman spectroscopy with gold nanoparticle suspensions* ».

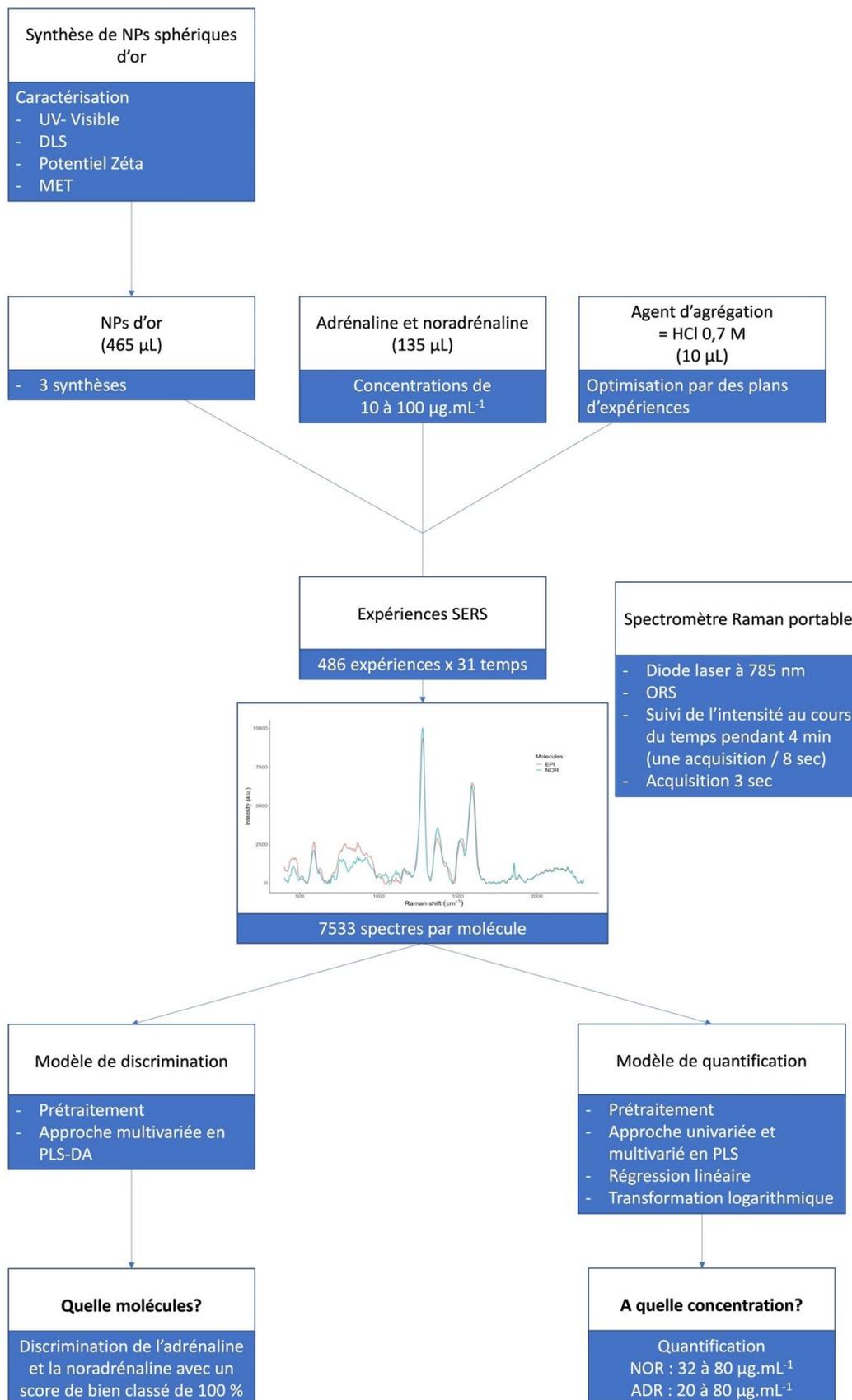


Figure 29 : Stratégie d'analyse pour la discrimination et la quantification d'adrénaline et de la noradrénaline en diffusion Raman exaltée de surface à partir de nanoparticules d'or sphériques en suspension.

*Discriminative and quantitative analysis of norepinephrine and epinephrine by Surface Enhanced Raman Spectroscopy with gold nanoparticle suspensions*

Antoine Dowek<sup>1,2</sup>, Marion Berge<sup>1,2</sup>, Patrice Prognon<sup>1,2</sup>, François-Xavier Legrand<sup>3</sup>, Eric Larquet<sup>4</sup>, Ali Tfayli<sup>2</sup>, Laetitia Minh Mai Lê<sup>1,2</sup>, Eric Caudron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service de Pharmacie, Hôpital européen Georges Pompidou, APHP.Centre Université-Paris, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296, Châtenay-Malabry, France.

<sup>4</sup>Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (LPMC), Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, 91128 Palaiseau, France

Corresponding author: Antoine Dowek, antoine.dowek@universite-paris-saclay.fr

## **ABSTRACT:**

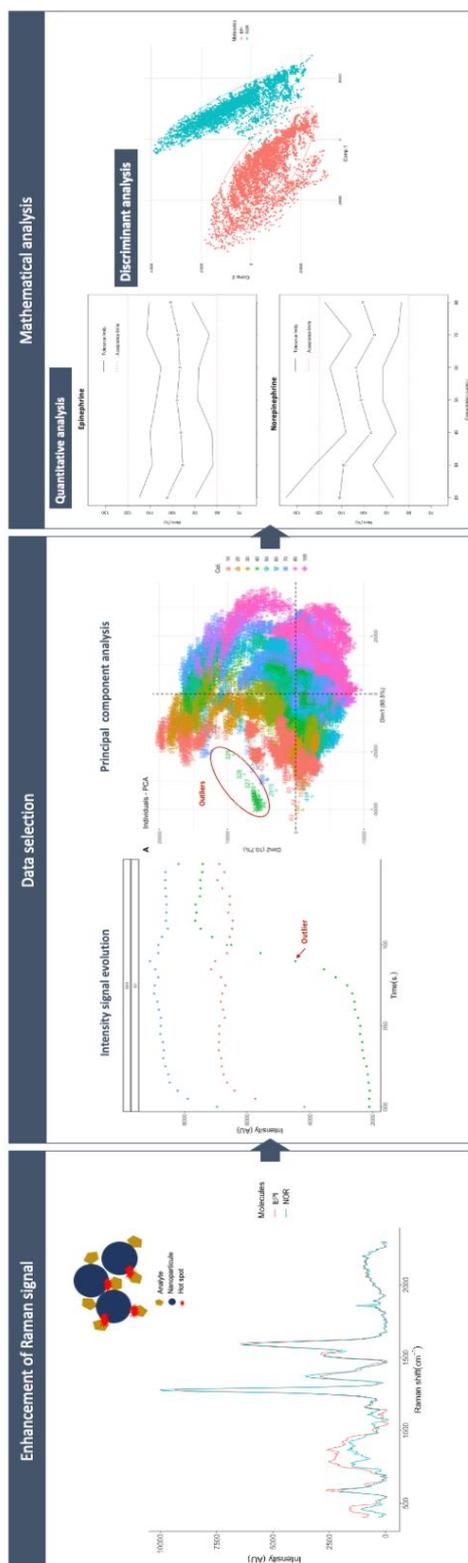
Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a powerful analytical technique capable of increasing the Raman signal of an analyte using specific nanostructures. The close contact between those nanostructures, usually suspension of nanoparticles, and the molecule of interest produces an important exaltation of the intensity of the Raman signal. Even if the exaltation leads to an improvement of Raman spectroscopy sensitivity, the complexity of SERS signal and the numbers of parameters to be controlled conduct to use SERS for detection rather than quantification.

The aim of this study was to develop a robust discriminative and quantitative analysis in accordance with pharmaceutical standards. In this present work, we develop a discriminative and quantitative analysis based on the previews optimized parameters by design of experiments fixed for norepinephrine (NOR) and extended to epinephrine (EPI) which are two very close structure neurotransmitters. Studying the short evolution of the Raman signal intensity over time coupled with chemometric tools allowed to identify the outliers and to remove them from the data set. The discriminant analysis showed an excellent separation of EPI and NOR. The comparative analysis of the data showed the superiority of the multivariate analysis after logarithmic transformation. The quantitative analysis allowed the development of robust quantification models from several gold nanoparticle batches with limits of quantification obtained were 32  $\mu\text{g/mL}$  for NOR and below 20  $\mu\text{g/mL}$  for EPI even though no Raman signal is observable for such concentrations.

This study improves SERS analysis over ultrasensitive detection for discrimination and quantification using handled Raman spectrometer.

Keys words: Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Gold nanoparticles, Quantitative analysis, Discriminative analysis, Mathematical design, neurotransmitters

# GRAPHICAL ABSTRACT:



Raman spectroscopy is a promising technique capable of analyzing a large range of components by recording the vibrational signature of the molecule of interest [1]. It had already been used in several fields such as the pharmaceutical field [2–7]. However, due to lack of sensitivity, the technique to analyze molecules with concentrations of about mg/mL only. To overcome this lack of sensitivity, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) has been applied as a promising technique capable of enhancing Raman signal using metallic nanostructures called SERS substrates [8]. This enhancement could reach  $10^{14}$  [9] in very specific conditions. More commonly, the amplification of Raman signal in SERS is between  $10^4$  to  $10^8$ , which remains a significant improvement in the sensitivity of Raman signal. This technique has therefore developed rapidly as an ultrasensitive detection technique, particularly in the pharmaceutical field, for which a review of literature has recently been published [10]. However, this enhancement is very complex to master. Indeed, it requires a close and stable interaction between the SERS substrate and the molecule of interest. It involves many parameters such as the nature of the SERS substrate (metal, support, geometry, synthesis reproducibility), the interaction between the SERS substrate and environmental matrices, and the interaction between the SERS substrate and the analyte. For this reason, many studies focus only on SERS detection and fewer studies focus on quantification, which remains a particularly challenging field of applications [11]. Current research in SERS tends to focus on the use of more complex nanoparticles (NPs) to improve detection sensitivity and to answer the needs of biological analysis rather than building robust quantitative models that can be used routinely. Only a very small number of studies have described quantification using gold or silver colloidal nanoparticles. Most of them are built with one batch of NPs using univariate [12–14] or multivariate analysis [15]. A few deal with several batches of NPs using univariate [16,17] or multivariate [18] models.

This study aims at mastering the use of spherical gold NPs in suspensions synthesis coupled with experimental conditions previously optimized by design of experiments to develop efficient discriminative and quantitative models from several batches of colloidal NPs and by testing different mathematical approaches.

The first parameter to control for reproducible analysis in SERS is the substrate synthesis. Most documented synthesis are metallic NPs in suspension [19], which are known since the 1950s thanks to the Turkevich [20] synthesis for AuNPs and later Lee & Meisel [21] for silver NPs. These syntheses are well documented but controlling size and shape reproducibility is still a challenge [19,22,23]. The precise control of the synthesis allowing a reproducible size and geometry of the nanoparticles has a major impact on the amplification power in SERS [24]. The second most important parameter is the interaction between NPs and the analyte which implies controlled experimental conditions [25] and being able to reproduce the same interaction from one experiment to another, specifically controlling the NPs surface (charge, molecule,

functionalization) and considering affinity between NPs and the analyte. Finally, to deal with spectral information contained in SERS spectra and link it to discrimination or quantification analysis, data analysis and the use of chemometrics tools [26–29] is needed.

The aim of this work is to construct a large data set for the analysis of two major neurotransmitters in our organism: NOR and EPI, which are two molecules of very close structure, to perform discrimination of the two analytes and quantitative analysis at low concentrations. If a few studies on the detection of catecholamines exist by SERS [30,31], it remains challenging to explore their quantification [32]. This work focuses specifically on how to deal with important amount of data in SERS data processing. The first step was to select the relevant data set by discarding the outliers. Then, the goal was to build different mathematical models capable of reducing the variability of the signal in order to obtain the best predictive models in discrimination and quantification. Finally, the data was put in accordance with French pharmaceutical standards [33] in order to promote SERS as a reliable daily routine technique.

## **EXPERIMENTAL SECTION:**

### **CHEMICALS**

Potassium gold (III) chloride ( $\text{KAuCl}_4$ , purity > 98%, European Pharmacopeia quality) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint – Louis, USA). Trisodium citrate dihydrate ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , European Pharmacopeia quality, 98 %) was purchased from VWR Chemicals (Leuven, Belgium). The pharmaceutical formulation of EPI at 1 mg/mL was obtained from Aguetant (Lyon, France) and NOR 2 mg/mL was acquired from Mylan (Paris, France). Aggregating agent solution have been directly diluted from hydrochloric acid 1 M (HCl, European Pharmacopeia quality, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France). Ultra-pure water was generated from Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Aqua Regia used to clean up glassware was prepared by mixing 3 volumes of hydrochloric acid 37 % (HCl, European Pharmacopeia quality, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France) and 1 volume of nitric acid 65 % ( $\text{HNO}_3$ , suprapur, Merck, Darmstadt, Germany).

### **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF GOLD NANOPARTICLES**

Gold nanoparticles (AuNPs) in suspension were described as easier to control than those with other metals. AuNPs were synthesized by reducing gold adding citrate as a reductant and stabilizing agent following the Turkevich method [20]. According to

Shin et al. [22], the ratio between citrate and gold was modified and fixed at five to promote better homogeneity in size and shape of gold nanoparticles. Chlorohydric acid was then used as an aggregation agent by reduction of charge at the nanoparticle surface.

Briefly, 11.2 mg of  $\text{KAuCl}_4$  were dissolved in ultra-pure water and heated to  $80^\circ\text{C}$  while a solution of trisodium citrate at 1% were prepared. Then  $\text{KAuCl}_4$  solution were heated to  $140^\circ\text{C}$ , citrate solution was added at boiling point in one time. The mixture was under reflux at 900 rpm during 15 min, then the suspension was cooled at room temperature during one hour before analysis. All glass materials were washed with an acidic solution of aqua regia to dissolve traces of metal.

Three different batches of AuNPs suspensions (SA1, SA2, SA3) were prepared and characterized by transmission electron microscopy (TEM), spectral UV analysis (UV), dynamic light scattering (DLS).

Drops of 5  $\mu\text{L}$  of AuNPs samples were deposited onto 200 mesh freshly glow-discharged copper grids covered by a thin carbon film (Agar S160) for TEM observation. After adsorption and drying, the grid was mounted on a side-entry single tilt specimen holder and inserted in the microscope. The gold particles were observed using a Thermo-Fisher Themis 300 transmission electron microscope equipped with a Cryo-Twin (C-Twin) objective lens (Cs: 2.7 mm, Cc: 2.7 mm, focal length: 3.5 mm), using a XFEG electron gun (extraction voltage 4350 V, gun lens 3, emission current 320.2  $\mu\text{A}$ ) at an accelerating voltage of 300 kV, with the following illumination conditions: spot size 5, 2000  $\mu\text{m}$  condenser C1 aperture, 150  $\mu\text{m}$  condenser C2 aperture and no motorized objective aperture was inserted. Images were recorded with a magnification of  $\times 58,000$  on a Thermo-Fisher 4096  $\times$  4096 pixels BM-Falcon III EC CMOS - DDE camera for a -50 nm to -300 nm defocus range. The pixel size of each image is 0.187  $\times$  0.187 nm.

UV-visible spectra from 300 nm to 800 nm of the AuNPs suspension were recorded using a Varian Cary 50 UV-Vis (Agilent, Les Ulis, France) with one cm path length plastic cells and ultra-pure water as reference sample. Based on UV spectra, the maximum wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) was determined to characterize the size of the nanoparticles for each AuNPs batch.

The hydrodynamic diameter of particles was determined at  $25^\circ\text{C}$  by DLS using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) operating at fixed scattering angle at  $90^\circ$ . Measurements were performed in disposable 4 mL cuvettes with 1 cm optical pathway and four optical faces (Sarstedt, Marnay, France) containing an appropriate volume (1 mL) of sample. For each AuNPs batch, three samples were measured in triplicate for a total of nine measurements by batch.

### **SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY CONDITION**

Spectra were acquired with the handled Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA, Metrohm, France) equipped with a 785 nm diode. Analyses were performed using the vial module at a focal length of 0.85 mm. The orbital raster scan (ORS) measured the signal at different points in the sample. SERS signals were acquired from  $400\text{ cm}^{-1}$  to  $2,300\text{ cm}^{-1}$  with a spectral resolution from  $12\text{ cm}^{-1}$  to  $14\text{ cm}^{-1}$ .

The SERS experiments corresponding to optimal conditions were conducted in a glass vial as follow: 135  $\mu\text{L}$  of analyte were added to 465  $\mu\text{L}$  of AuNPs suspension (ratio  $V_{\text{NPs}}/V_{\text{Analyte}} = 3.5$ ) for a final volume of 600  $\mu\text{L}$  and vortexed for 5 sec. Then, 10  $\mu\text{L}$  of HCl 0.7 M were added to the mixture and again vortexed for 5 sec. The samples were directly analyzed by MIRA Raman spectrometer. The acquisitions were performed for 3 sec every 8 seconds during 4 min corresponding to 31 spectra for each sample.

### **DATA SET CONSTRUCTION**

To construct performant quantification and discriminant models for each catecholamine (EPI and NOR), a large data set was acquired.

For each drug, experiments were done using three different batches of AuNPs (SA1, SA2, SA3). For each batch of NPS, analyses were performed with new drug preparation set for three consecutive days of analyses (G1, G2, G3), and prepared each day in triplicate (R1, R2, R3), including nine levels of concentration from 10 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . For EPI and NOR, a total of 486 samples (2 drugs, 3 batches of AuNPs suspensions  $\times$  3 days  $\times$  3 replicates  $\times$  9 concentrations) were analyzed for a total of 15,066 spectra (31 times of analysis per sample).

According to the guidelines of European Medicines Agency (EMA) for infrared spectroscopy analysis, data set was randomly divided by 9 series of data, defined as experiments acquired for one AuNPs batch during one day (SAXGY) in one calibration set (6 series, 2/3 of data) to construct the mathematical predictive model and evaluated cross validation error, and one validation set (3 series, 1/3 of data) independent from calibration data set in order to evaluate the predictive performances of the mathematical model.

### **DATA ANALYSIS**

Raman spectra are complex data to analyze, specifically in SERS analysis which induces variability of enhancement. The Raman signal can be disturbed by many parameters such as spurious diffusion, fluorescence, the structure of container, the size of particles in the suspension. To avoid these physical interactions, spectral pretreatments should be used. In this study, it was chosen to use few pretreatments in order to keep the structure of the original signal. Therefore, the baseline deviation was

corrected by asymmetric least square regression [34] (second derivative constraint equal to 6) and smoothing was applied using Savitzky-Golay method (first order polynomial and a window size equal to 7) to reduce background noise. Moreover, logarithmic base ten transformation was also evaluated because spectral enhancement in SERS can induced spectral transformation and non-linear evolution of the Raman signal with concentration.

Firstly, principal component analysis (PCA) was used to visualize data dispersion, and to individualize atypic results. PCA is an exploratory data analysis tool [35] that creates a new axis called principal components (PC) trying to catch for each component the maximum of variability. PCA is an unsupervised tool based on orthogonal reduction of dimension. Therefore, it's a practical technique capable of exploring a large dataset.

In order to construct the best prediction model, several approaches were tested beginning with a usual approach based on univariate linear regression, which correlates a single intensity of all spectra with the concentration of the analyte. Because Raman spectra are complex to analyze and contain a large amount of information, multivariate analysis was also performed. To develop a quantitative model of prediction, multivariate analysis able to include intensities mostly correlated to concentration were explored such as partial least square regression (PLSR) [36]. PLSR consists in constructing the regression model as shown in Equation 1 (developed for logarithmic transformation too Equation 2), where  $Y$  is the response matrix (concentrations),  $X$  the matrix of predictors,  $B$  the matrix of coefficients and  $E$  the residual error matrix. The goal is to construct new variables, called latent variables (LVs), which are linear combinations of initial variables that contain most of the variability and that best correlate to the response being studied. This technique is particularly appreciated in spectral data processing because it allows to get rid of collinearity phenomena and to visualize the most important spectral areas quickly and concisely, which represent the most weight in the construction of the model.

Equation 1 General equation of PLS regression.

$$Y = X \cdot B + E$$

Equation 2 PLS regression with logarithmic transformation.

$$\log(Y) = \log(X) \cdot B + E$$

Alike for quantitative analysis, PLS was used for discriminant analysis (PLSDA) [37]. Following the same principle as for PLSR, PLSDA is a linear classification model able to predict the class of new samples. Here, the response matrix  $Y$  is qualitative and is internally recoded. Each of the response categories are coded via an indicator variable. The PLS regression is then run as if  $Y$  was a continuous matrix. All data analysis process is sum up in Fig. 1.

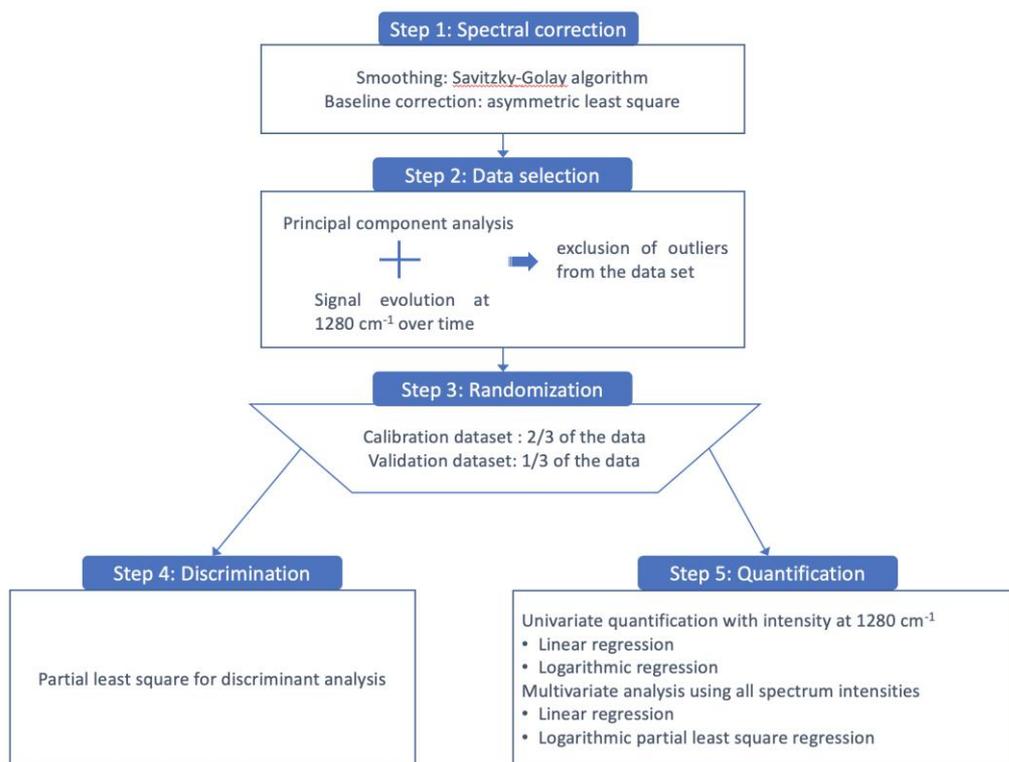


Fig. 1 flow chart of data analysis process from spectral pretreatments to quantification and discrimination steps.

In order to choose the mathematical models developed, different indicators were determined as correlation coefficient  $R^2$  calculated to ensure the correlation between predictors and concentrations, root mean square error (RMSE, Equation 3) and mean absolute relative error (MARE, Equation 4) to compare prediction error calculated regardless the mathematical model used.

The root mean square error of cross-validation was calculated (RMSECV) for calibration data set by k-fold cross validation for groups of 20 (only for PLS regression). This parameter was used to determine the number of latent variables (LV) to be used in PLS models. This number was selected by permutation approach, which selected the lowest number of LVs for which no difference between two consecutive RMSECV were observed.

For validation data set root mean square error of prediction (RMSEP) was calculated to evaluate the robustness of the model. If the model is robust RMSEP should stay stable. Randomization for validation data set was done based on nine series of data defined as experiments acquired for one AuNPs batch during one day for example SA1G1 for a total 84 randomizations. The series used to construct accuracy profile with a 10 %  $\beta$  error and acceptance limits set at 20 % was selected for the lowest RMSEP.

Equation 3 Root mean square error (RMSE);  $y_i$  represents real concentration of analyte and  $\hat{y}_i$  the

estimated concentration.

$$\mathbf{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

Equation 4 mean absolute relative error (MARE);  $y_i$  represents real concentration of analyte and  $\hat{y}_i$  the estimated concentration.

$$\mathbf{MARE} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|y_i - \hat{y}_i|}{y_i}$$

## **RESULTS**

### **CHARACTERIZATION OF AuNPs SUSPENSIONS**

AuNPs suspensions were characterized by three complementary techniques which combined can be considered as a good estimation of AuNPs shape and size. Results of size estimation of NPs are summarized in Table 1.

TEM images (Fig. 2) should be the most relevant estimation of shape and size AuNPs because they allow direct visualization of the shape and size of AuNPs, for a mean size of 16.4 nm [16.2 - 16.6 nm] (n = 180). AuNPs size for each batch was calculated with 60 measurements measured using 10 TEM images.

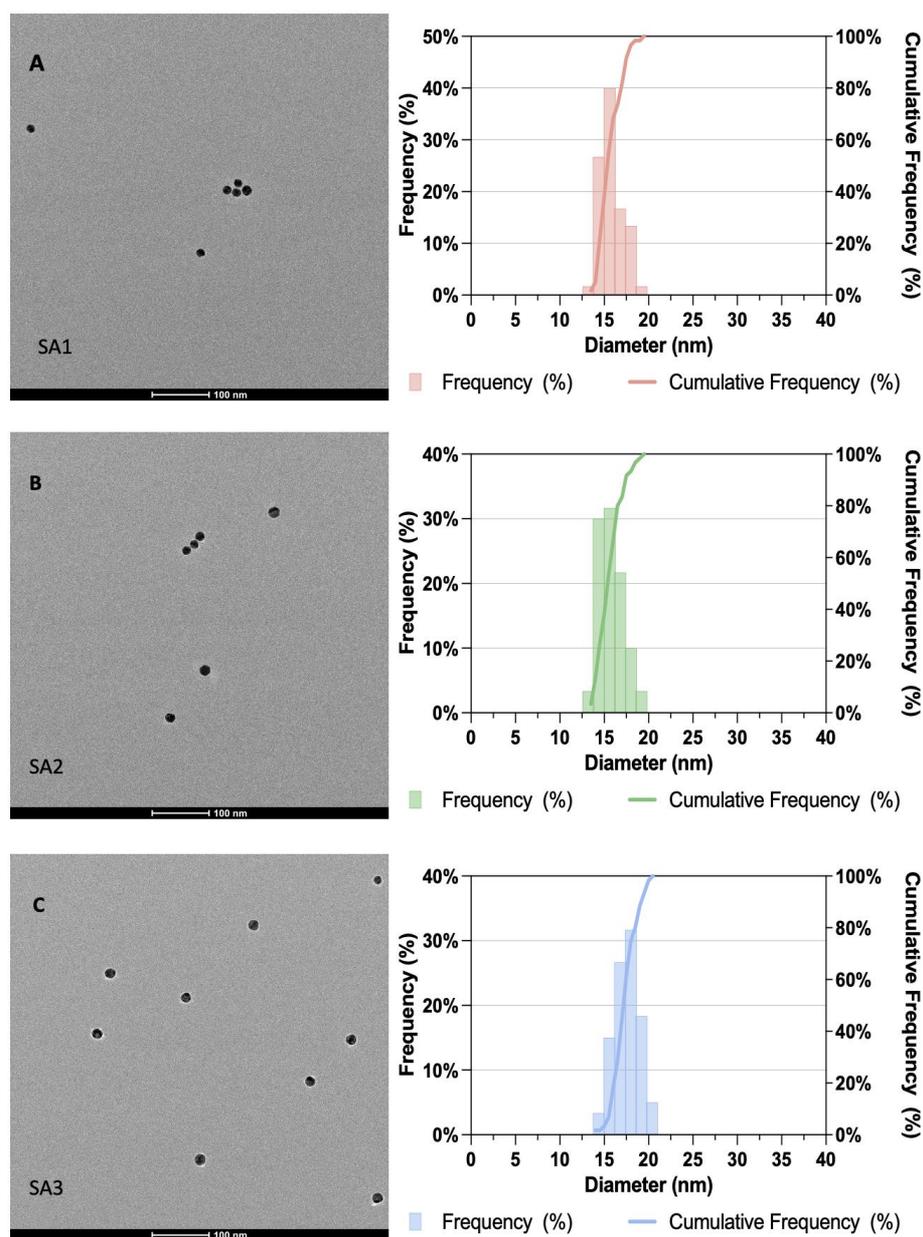


Fig. 2 characterization of the three AuNPs batches by transmission electronic microscopy with on the right repartition of nanoparticle size (n = 60 for each batch) A) SA1, B) SA2, C) SA3.

DLS characterization is illustrated in Fig. 3 A and B by correlation coefficients and by intensity-weighted size distribution for SA1, SA2, SA3. These characterizations show size homogeneity for each batch and similar size between batches. UV-visible spectra between AuNPs batches is well superposed suggesting the homogeneity of NP suspension in the three batches (Fig. 3 C). The lambda at maximum absorbance is close for the three batches suggesting a good batch to batch size reproducibility. UV-visible Spectra are also thin revealing the good homogeneity in AuNPs size for each batch.

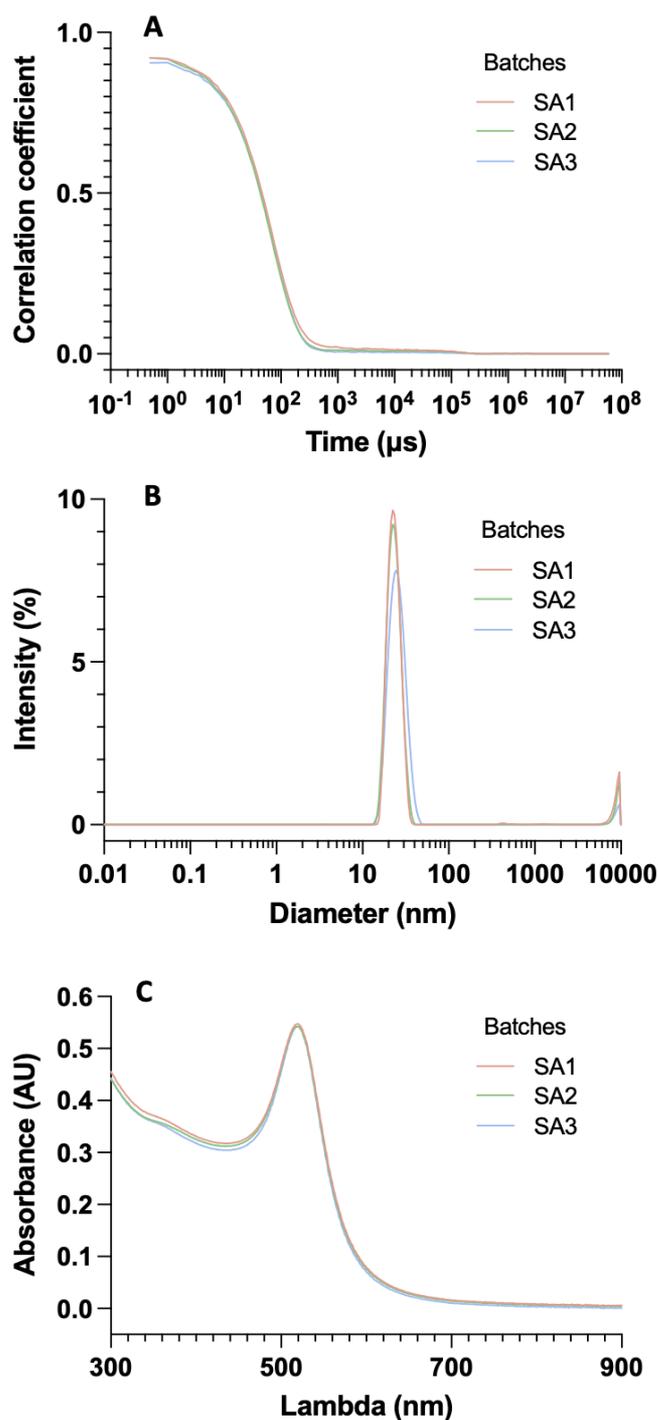


Fig. 3 diffusion light scattering and UV-visible spectroscopy of AuNPs batches (SA1, SA2, SA3) A) correlation coefficient B) intensity-weighted size distribution C) UV-visible absorbance.

Comparatively, DLS is always an overestimation of real size because measuring hydrodynamic diameter. Furthermore DLS confirmed the stability of AuNPs suspension calculating zeta potential for an average zeta at  $-34.3$  mV allowing a repulsion capable

ensuring NPs stability. Calculation of polydisperse index (PDI) by DLS confirmed the low dispersity of AuNPs batches with PDI of 0.15. All three techniques were concordant for spherical monodisperse AuNP suspensions.

Table 1 Size estimation of the three batches of gold nanoparticles SA1, SA2, SA3 by transmission electronical microscopy (TEM), ultraviolet spectroscopy (UV) and dynamic light scattering (DLS). The calculation of mean size is represented, included confidence interval at 95 % ([]) for TEM and DLS.

Batch of AuNPs suspension	TEM (nm)	UV (nm)	DLS (nm)
	Mean [IC95%]		Mean [IC95%]
SA1	15.8 [15.5 - 16.1]	18.5	24.3 [24.0 – 24.6]
SA2	15.9 [15.6 - 16.2]	19.3	23.4 [23.2 – 23.6]
SA3	17.5 [17.2 - 17.8]	21.3	24.5 [24.4 – 24.7]

In conclusion, according to UV, DLS and TEM results, the AuNPs suspension synthesis technique was considered as reproducible, producing stable spherical gold NPs in suspension with homogeneous size of AuNPs (+/- 2 nm) and shape (standard deviation of 9.6 % calculated with TEM measurements).

## EXPLORATION OF THE DATA SET

### SERS ENHANCEMENT

Firstly, Raman spectra were acquired directly from the commercial solution of EPI at 1 mg/mL and NOR at 2 mg/mL and for both drugs: no signal was observed. According to the condition of surface enhanced Raman spectroscopy describe in section "[Surface enhanced Raman spectroscopy condition](#)", an intense signal appeared (Fig. 4). According to several studies in Raman spectroscopy and SERS, Raman shifts were attributed (Table 2) to EPI, NOR [38,39], citrate or its derivatives [40,41] which can still be present in final AuNPs suspension.

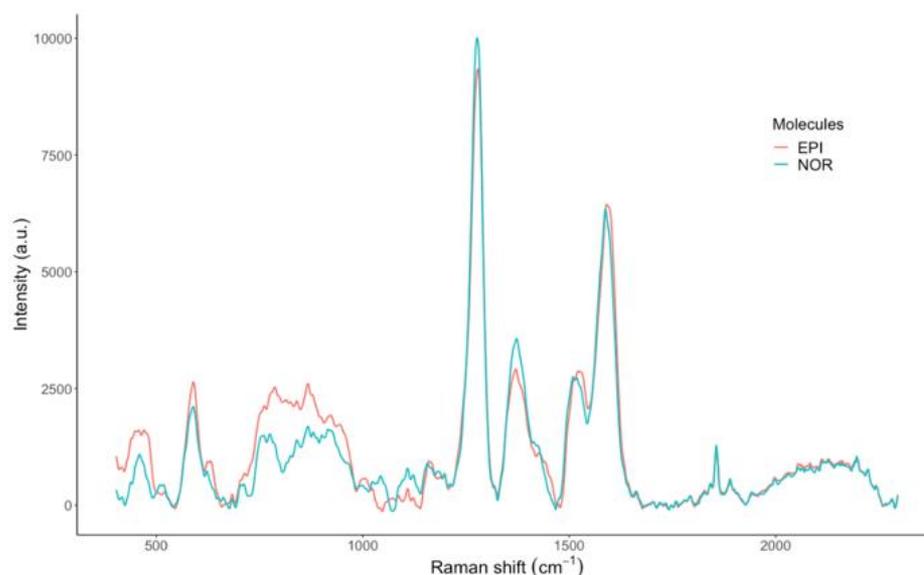


Fig. 4 SERS spectra (experimental conditions described in “Surface enhanced Raman spectroscopy condition”) of epinephrine (EPI, red) and norepinephrine (NOR, blue) at 100 µg/mL (smoothing: Savitzky - Golay, baseline correction: asymmetric least square).

SERS spectra were compared with those obtained in Moody’s studies [39,42,43] who acquired SERS spectra of several neurotransmitters in similar conditions (785 nm laser with AuNPs aggregated by HCl solution, or incorporated in agarose gel) and in Vander Ende work [44], who used polymeric aggregation in order to stabilize SERS signal. Principal Raman shifts presented here were also found in these studies.

Table 2 Relative intensities and attributions of main Raman shift observed in SERS spectra of NOR, EPI and citrate in gold nanoparticle suspensions.

Raman shift (cm <sup>-1</sup> )	Relative intensity	Chemical attribution	Molecule attribution
470	0.18	COO quenching	Citrate / derivative
590	0.28	CC=O stretching	NOR/EPI
630	0.11	COO deformation	Citrate / derivative
790	0.28	Ring breathing	NOR/EPI
870	0.29	C-COO stretching	Citrate / derivative
1000	0.08	C-O stretching	Citrate / derivative
1080	0.01	CCH bending	NOR/EPI

1168	0.09	CO stretching	NOR/EPI
1280	1.00	CO asymmetric stretching	NOR/EPI
1375	0.30	Symmetric COO	Citrate / derivative
1530	0.37	Asymmetric COO	Citrate / derivative
1593	0.74	CC aromatic stretching	NOR/EPI

#### SERS CONTACT TIME

For all samples, 31 spectra were successively acquired to evaluate the impact of time on the aggregation process between AuNPs and the analyte and thus, SERS signal. The Fig. 5 (A.1 and B.1) represents the SERS signal evolution for the 1280 cm<sup>-1</sup> intensity Raman shift for few experiments at 40 µg/mL. For most experiments, the SERS signal evolution increases for the first four measurements, followed by a slight stabilization and a slow decrease for the last measurements. For a few experiments, the evolution of the signal during the experiment was different. These experiments were listed and considered atypical. Parallely, PCA were conducted to explore rapidly all data set.

For NOR dataset, PC1 (Fig. 5 A.2) which represented 81.4 % of total variance seems to be correlated to the concentration while PC2 (10 % of total variance) individualized a group of samples identified as SA1G1R1 and SA1G1R3. These series also have a different evolution over time. Based on these two results, SA1G1R1 and SA1G1R3 (PCA score plot individualized by SAXGYRZ is available in supplementary information) were considered as outliers and were excluded from the data for qualitative and quantitative analysis.

For EPI, PC1 (Fig. 5 B.2) represented 80.5 % of the variance and seemed to be linked to the concentration of EPI, except for SA1G1R2 40 µg/mL. Likewise, the data SA1G1R2 40 µg/mL confirmed the data as outliers and excluded it for the rest of the analysis.

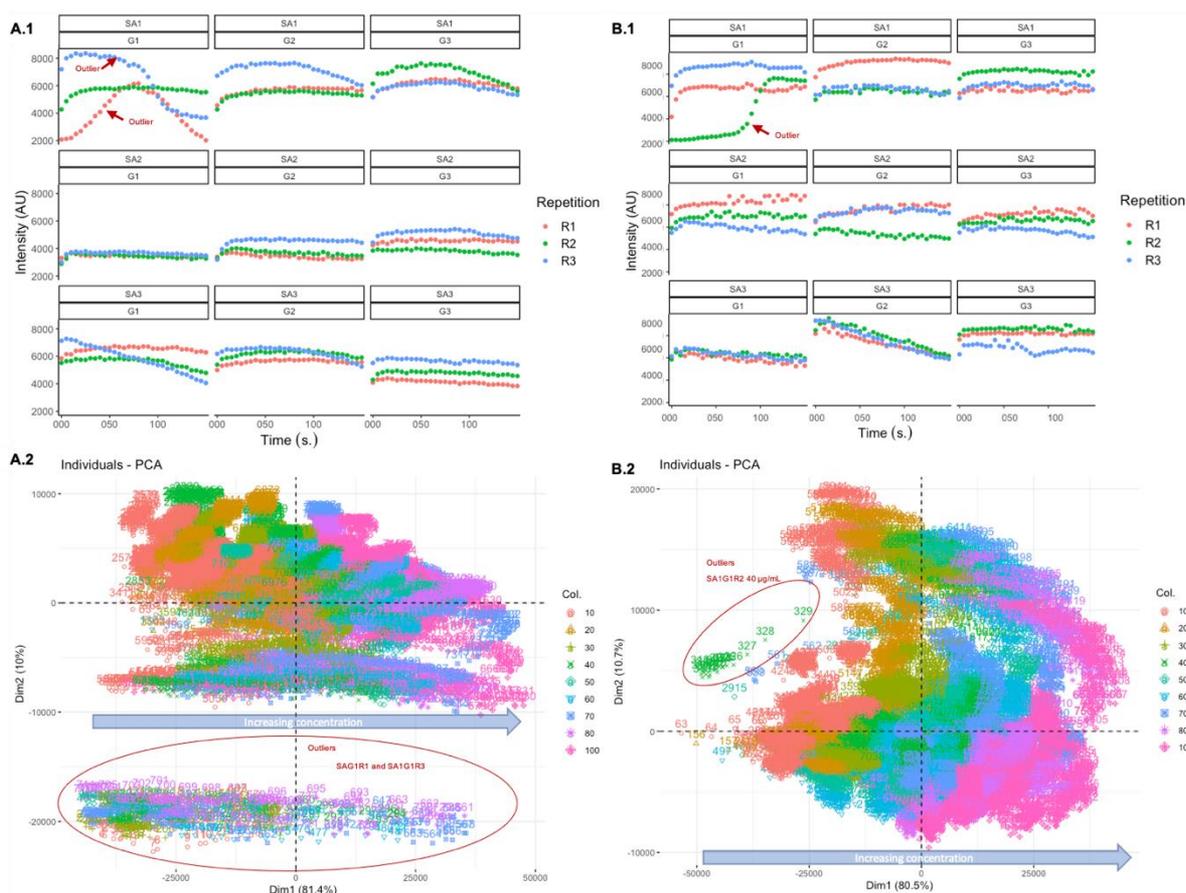


Fig. 5 selection of outliers: A.1 Evolution of the SERS signal at 1280 cm<sup>-1</sup> over the time for norepinephrine at 40 μg/mL, A.2 Principal component analysis for all norepinephrine spectra colored by concentration, B. Evolution of the SERS signal at 1280 cm<sup>-1</sup> over the time for epinephrine at 40 μg/mL, B.2 Principal component analysis for all epinephrine spectra colored by concentration.

For quantitative and discriminant analysis, all outliers identified by PCA and atypical evolution of signal over time was removed. Furthermore, high signal variations at 1280 cm<sup>-1</sup> were observed on the first four measurements for every experiment suggesting a variability in SERS signal in the first seconds of the analysis. The first four data points were excluded from the analysis.

## DISCRIMINANT ANALYSIS

The best PLS-DA models were obtained after ALS and SG pretreatments, for all experiments for NOR and EPI excluding outliers previously described (outliers for NOR: SA1G1R1, S1G1R3; for ADR: SA1GA1R2 40 μg/mL; acquisition time > 15 sec.).

Results are represented, as an example, in Fig. 6. for validation set: SA3G3, SA3G1, SA2G1. The first component determined which samples are NOR or EPI (Fig. 6 A.), while second component seems more linked to the concentration (Fig. 6 B.). Watching loadings (Fig. 6 C.) can define an area in spectra from 750 to 1000 cm<sup>-1</sup> which has an important impact on molecule discrimination. This could be attributed to differences between primary or secondary amine group.

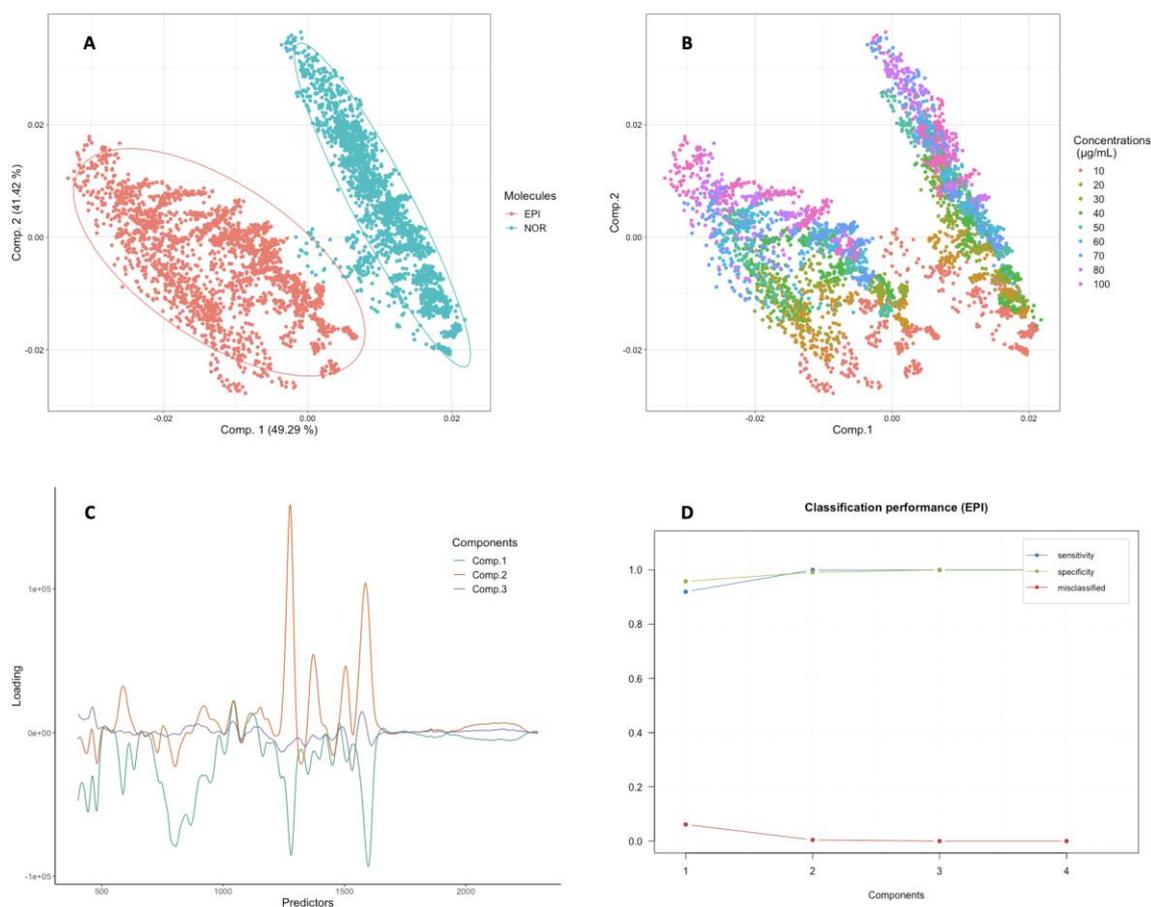


Fig. 6 discriminant analysis, representation of the three first components. A: regrouping molecules, B: regrouping concentrations, C: loadings representation. D: performances of PLS-DA analysis, example for validation set: SA3G3, SA3G1, SA2G1.

Using only three components, the confusion matrix gave an accuracy of 1, therefore 100 % of validation data set (SA3G3, SA3G1, SA2G1) (4,374 spectra) were assigned to the right class, i.e. the right molecule. Performances (Fig. 6 D.) were similar independently of validation data set, for the 84 randomizations with sensitivity of 1, specificity of 1 and 0 misclassified. These experiments confirm the excellent specificity of Raman spectroscopy and prove the ability of SERS to be used to discriminate two neurotransmitters of very close structure.

### QUANTITATIVE ANALYSIS

Univariate analysis at  $1280\text{ cm}^{-1}$  was firstly evaluated based on the evolution of the most intense Raman shift linked to the catecholamines signal. The evolution of this shift as a function of analyte concentration is represented in Fig. 7 A for NOR spectra pretreated by ALS and SG at one time selected (75 sec). Because signal evolution of this Raman shift didn't seem linear, logarithmic to the base 10 transformation was also performed as shown in the Fig. 7 B.

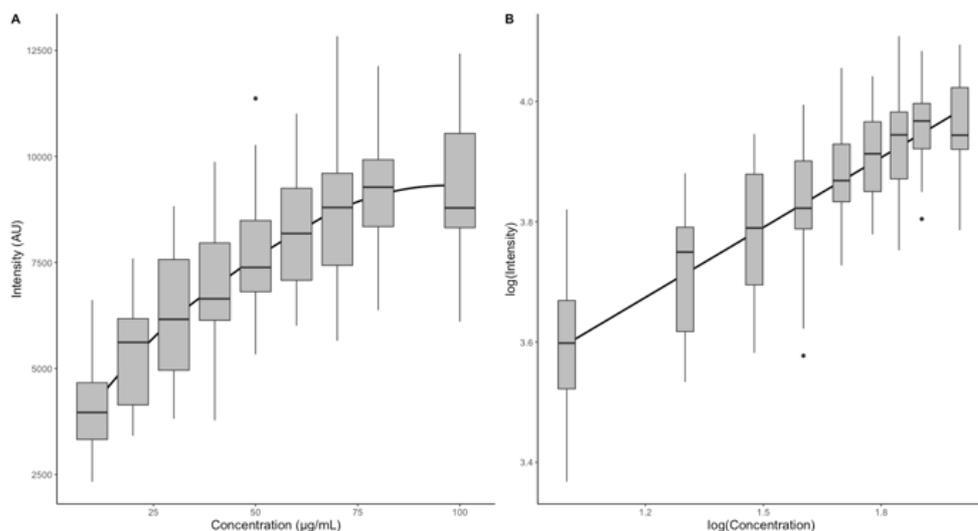


Fig. 7 Evolution of concentration as a function of intensity of 1280 cm<sup>-1</sup> Raman shift (molecule: norepinephrine, time: 75 sec) A: pure, B: with logarithmic transformation

The highest concentration at 100 µg/mL but also the lowest concentration at 10 µg/mL associated to a large variability were removed from the data set to develop quantitative models. Therefore, the focus area has been reduced to 20 µg/mL to 80 µg/mL. Then multivariate analysis including all spectra intensities was performed, using PLS regression, with or without logarithmic transformation. In Table 3, are presented the main results of prediction indicators from all 84 randomizations. The number of latent variables selected by permutation algorithm were comprised between 14 and 16 for all randomizations.

Table 3 Comparison of mean results for 84 randomizations of the data set of R<sup>2</sup>, root mean square error of prediction (RMSEP), mean absolute relative error (MARE) calculated for univariate or multivariate and with or without logarithmic transformation.

Molecule	Model	Y = X.B + E			log(Y) = log(X).B + E		
		R <sup>2</sup>	RMSEP (µg/mL)	MARE (%)	R <sup>2</sup>	RMSEP	MARE (%)
EPI	Univariate at 1280 cm <sup>-1</sup>	0.48	14.94	30	0.54	0.14	26
	Multivariate from 400 to 2300 cm <sup>-1</sup>	0.95	5.47	11	0.96	0.06	9.1
NOR	Univariate at 1280 cm <sup>-1</sup>	0.40	16.06	34	0.50	0.15	29

Multivariate from 400 to 2300 cm <sup>-1</sup>	0.91	7,27	14	0.95	0.06	10
--	------	------	----	------	------	----

Regarding results of predictive indicators, multivariate analysis was preferred, comparison of ER and R<sup>2</sup> between logarithmic and non-logarithmic models are presented in Fig. 8 for EPI and Fig. 9 for NOR.

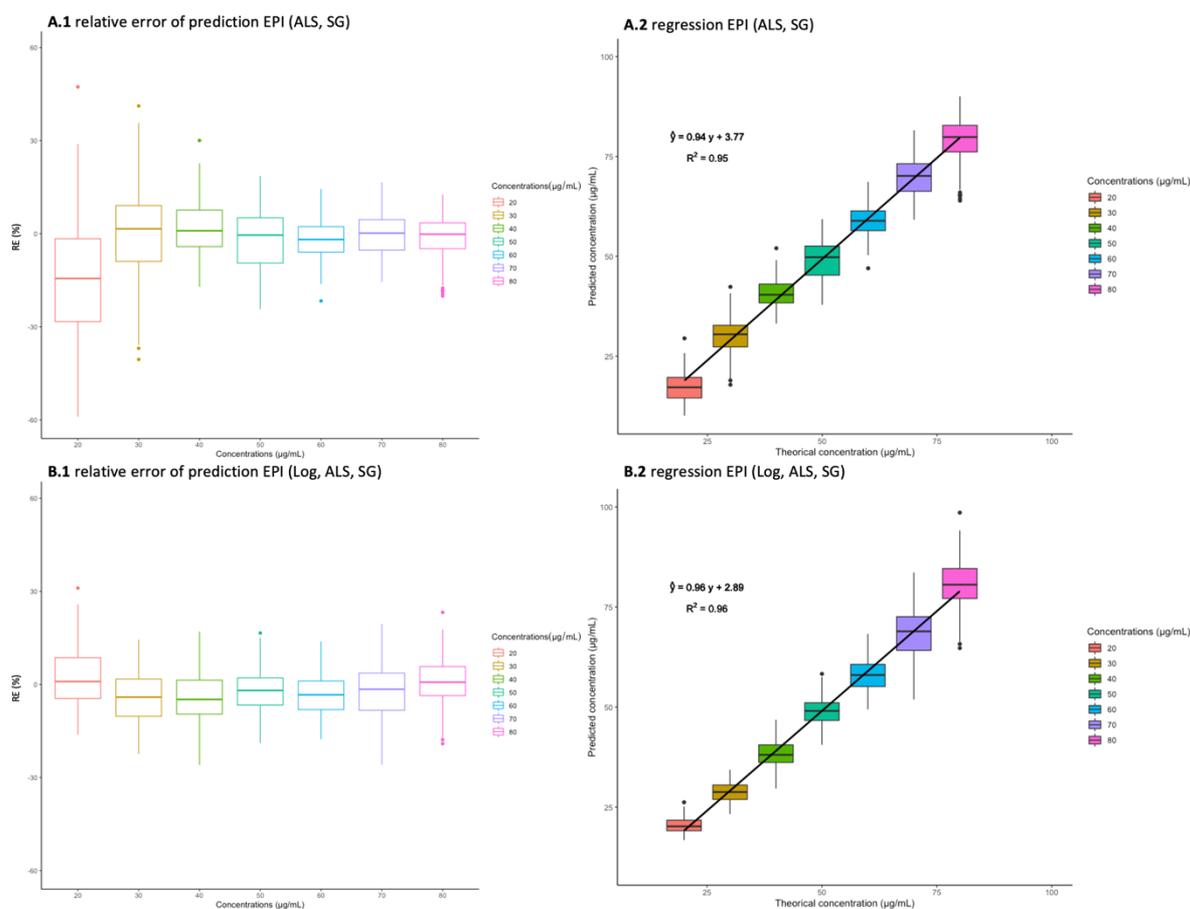


Fig. 8 evolution of relative error for each concentration level and regression curve between predicted and theoretical concentrations for epinephrine (EPI) with (B.1, B.2) and without logarithmic (A.1, A.2) transformation for multivariate analysis.

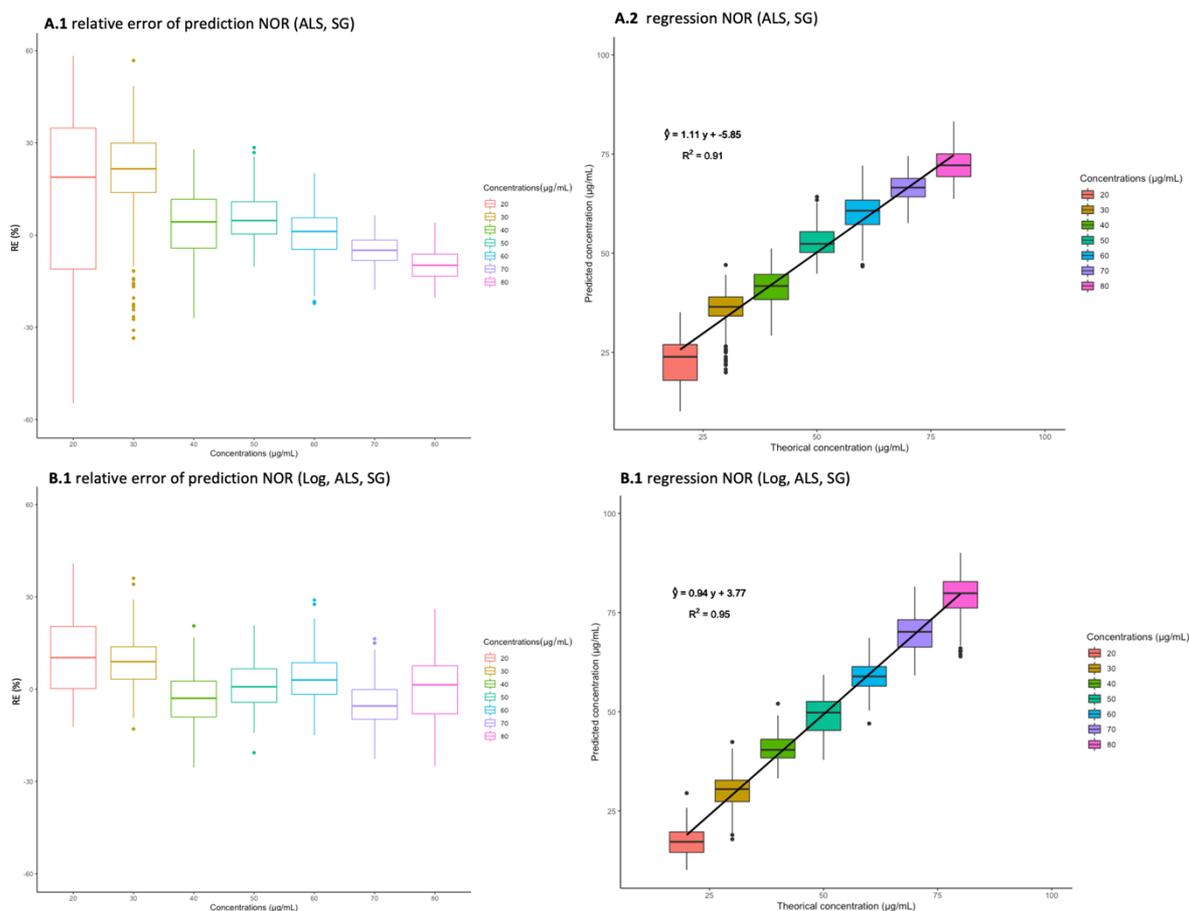


Fig. 9 evolution of relative error for each concentration level and regression curve between predicted and theoretical concentrations for norepinephrine (NOR) with (B.1, B.2) and without logarithmic (A.1, A.2) transformation for multivariate analysis.

The dispersity of RE was higher for lowest concentrations with both approaches. An improvement of RE values was noticed for logarithmic transformation. The regression curve showed a good agreement between theoretical and predicted concentrations with a  $R^2$  superior to 0.9. The logarithmic model reduced RE for every level of concentration.

Based on these results, multivariate analysis with logarithmic transformation was used to build an accuracy profile, the validation data set was chosen for the lowest RMSEP i.e. data from SA1G3, SA2G1, SA2G3 for NOR and SA1G2, SA2G2, SA3G1 for EPI to validate the calibration model. Accuracy profiles constructed from these datasets are presented below Fig. 10.

Low limits of quantification (LLOQ) were determined directly from these profiles as the lowest concentration included between acceptance limits. LLOQ was equal to

32  $\mu\text{g/mL}$  for NOR and 20  $\mu\text{g/mL}$  for EPI.

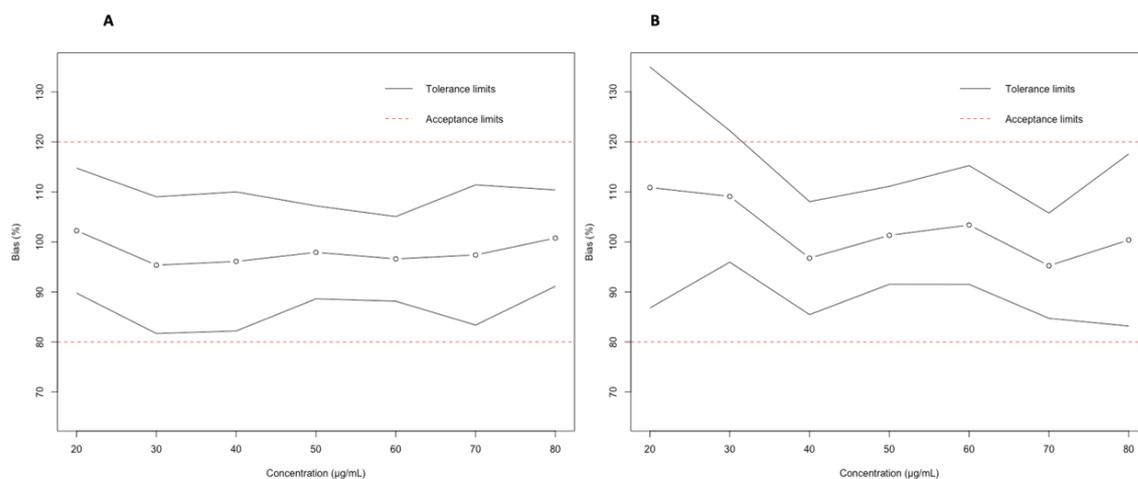


Fig. 10 accuracy profiles of epinephrine (A) and norepinephrine (B), acceptance limits fixed to 20 %, tolerance limits fixed for a  $\beta$  error of 10 %.

## DISCUSSION

The aim of this study was to develop a robust discriminative and quantitative mathematical model for two drugs of interest: EPI and NOR. The focus on data selection and mathematical design aimed at trying to reduce lack of reproducibility induced by experimental variability of SERS signal.

For data selection, monitoring the evolution of the signal of the most intense Raman shift as a function of contact time should probably be the reflect of aggregation between AuNPs and the analyte. For a few seconds the signal increased and highlighted the interaction between these two components, then a slight stabilization was observed before a decrease of the signal, probably due to the beginning of sedimentation, showing the limits of aggregation by HCl. In some cases, the aggregation process takes place in an uncontrolled way and leads to an atypical evolution of the signal as a function of the contact time which can explain the outliers. These observations suggest that the evolution of the signal over time can define if a SERS experiment succeeded or not. The identification of outliers was very important for the construction of efficient quantitative models and atypical samples should then be removed for further analysis.

The discriminant analysis confirmed the specificity of Raman spectroscopy and so SERS. Few pretreatments and components were however needed to perform robust discrimination for the two molecules studied which only differ by one methyl group.

Mathematical design clearly showed the superiority of multivariate approach to deal with spectral data and greatly improved predictors. The important number of LVs

selected by permutation can be explained by the large number of variabilities included in this dataset: several AuNPs batches, days, batches of drugs, level of concentrations, times of acquisition. Quantification was better for EPI than for NOR which may be explained by the important number of outliers removed from NOR dataset (total dataset of 5103 for EPI against 4671 for NOR). Other hypothesis could be that differences observed in 750-1000  $\text{cm}^{-1}$  area may affect quantification performances. Observation of relative error by level of concentration clearly showed the impact of logarithmic transformation at every level of concentration. Quantitative performances demonstrate that SERS can be used as a validated technique for quantification if experimental conditions are controlled, and appropriate mathematical transformation is performed. The next step will be to master analyte and SERS substrate interaction in order to reach higher sensitivity.

## **CONCLUSION**

In this study, we firstly succeeded in synthesizing controlled spherical gold nanoparticles in suspension and validating their homogeneity in shape and size according to TEM, UV and DLS. Then we clearly demonstrated the power of SERS in quantification and discriminant analysis with a handled Raman spectrometer. The specificity of SERS was highlighted with a discriminant analysis capable of perfectly separating two molecules of very close structures. Then we succeeded in quantifying a range of concentrations from 20 to 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for EPI and from 32 to 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for NOR with robust criteria, by firstly selecting experimental conditions by design of experiments and then applying logarithmic transformation to linearize our data before performing PLS regression. Performances should be improved by controlling more precisely the aggregation phenomenon and probably using nanostructures capable or further enhancing Raman intensity.

DECLARATIONS:

CONFLICTS OF INTERESTS/COMPETING INTERESTS: THE AUTHORS DECLARE NO CONFLICTS OF INTEREST.

FUNDING: THIS WORK HAS BEEN SUPPORTED BY THE FONDATION ARC POUR LA RECHERCHE.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors would like to acknowledge financial support for Nan'eau microscope from Ecole Polytechnique, IDEX Paris-Saclay, Equipex Morphoscope 2 and DGA. They also thank the "Centre Interdisciplinaire de Microscopie électronique de l'X" (CIMEX) for the TEM images. Finally, they are grateful to the Fondation ARC (French foundation for cancer research) for the financial support to Marion Berg

Au vu des résultats de caractérisations, les AuNPs issues des différents lots de synthèses peuvent être considérées comme de taille et de forme homogènes (tableau 6).

Tableau 6 : Estimation de la taille des trois lots de nanoparticules d'or (AuNPs) synthétisées par microscopie électronique en transmission (MET), spectroscopie UV-visible (UV-vis), diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les calculs des tailles moyennes sont présentées avec leur intervalle de confiance à 95 % ([ ]) pour la MET et la DLS.

<b>Lot d'AuNPs</b>	<b>MET (nm)</b>	<b>UV-vis (nm)</b>	<b>DLS (nm)</b>
SA 1	15,8 [15,5 – 16,1]	18,5	24,3 [24,0 – 24,6]
SA 2	15,9 [15,6 – 16,2]	19,3	23,4 [23,2 – 23,6]
SA 3	17,5 [17,2 – 17,8]	21,3	24,5 [24,4 – 24,7]

Le suivi au cours du temps de l'intensité du signal Raman a montré, pour la majorité des expériences, des profils similaires (figure 30 B) avec une augmentation du signal dans les premières secondes avant stabilisation du signal, durant les 4 min d'analyse. Il a donc été possible de valider, pour une condition expérimentale donnée que l'évolution du signal Raman au cours des premières minutes en SERS était similaire quel que soit le niveau de concentration. Toutefois des sédimentations visuelles ont été remarquées après plusieurs minutes de repos sans être mesurées. Des études sur des temps plus longs seront donc nécessaires pour pouvoir évaluer la stabilité de l'agrégation dans le temps. Une stabilisation longue permettrait une analyse à distance qui simplifierait dans la pratique l'utilisation de la SERS.

La première étape du traitement de données a été de réaliser une ACP sur l'ensemble des 15 066 spectres afin de représenter des sources identifiables de différence entre les individus. De façon intéressante, les expériences pour lesquelles l'évolution du signal Raman au cours du temps étaient différentes ont été mises en évidence par l'ACP (figure 30 A). Ainsi, l'ensemble des 31 spectres de chacune de ces expériences était regroupé et l'expérience entière était considérée comme différente des autres. De plus, l'ACP est multivariée, elle utilise l'ensemble des données spectrales

dans sa construction, elle apporte donc un poids supérieur pour caractériser une mesure comparativement au seul suivi de l'intensité à  $1280\text{ cm}^{-1}$ . Les deux résultats étant concordants, ces expériences ont été considérées comme des outliers et retirées de l'analyse. L'origine de ces différences observées est probablement due à une perturbation de l'agrégation. Il est toutefois difficile de conclure car les agrégats n'ont pas été caractérisés dans cette étude.

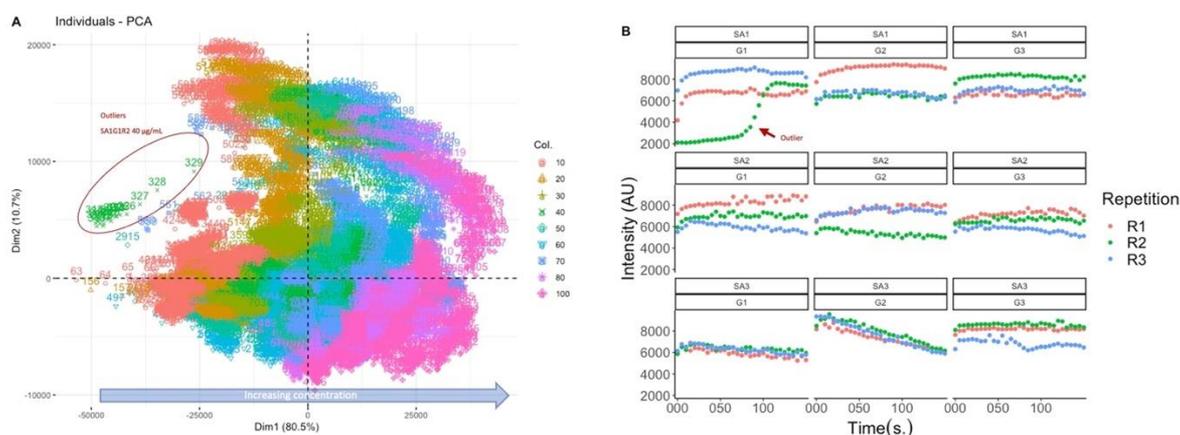


Figure 30 : (A) Représentation des individus dans l'espace des deux premières composantes (Dim1, Dim2) de l'analyse en composante principale (PCA, pour *principal component analysis*) pour l'adrénaline (couleur en fonction de la concentration de 10 à  $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). (B) Cinétique d'évolution de l'intensité du déplacement à  $1280\text{ cm}^{-1}$  de l'adrénaline à  $40\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  en fonction du temps. Concordance entre l'évolution atypique du signal pour SA1GR2 également caractérisée comme outlier de l'ACP.

Afin d'inclure un maximum de spectres dans la construction mathématique des modèles de prédiction, les spectres aux différents temps de contact ont été inclus une fois le signal Raman stabilisé. En conséquence, les quatre premières mesures de chaque expérience, pour lesquelles une évolution de l'intensité du signal Raman est encore observée, ont été retirées de l'analyse.

L'utilisation de modèles mathématiques multivariés comme la régression PLS a permis une amélioration importante des performances prédictives avec une réduction de l'erreur relative d'un facteur 2 à 3 par rapport au modèle univarié. Ceci implique que des zones spectrales supplémentaires à celle de  $1280\text{ cm}^{-1}$  permettent d'affiner la prédiction. L'approche multivariée devrait donc la plupart du temps être entreprise en analyse SERS. La modélisation de l'intensité à  $1280\text{ cm}^{-1}$  en fonction de la concentration en analyte a montré que l'intensité à ce nombre d'onde n'était pas linéaire et semblait tendre vers un maximum. Ainsi, la linéarisation préalable du signal par transformation logarithmique avant l'application de la régression PLS, a permis d'améliorer les performances du modèle, confirmant l'évolution non linéaire du signal en SERS dans nos études. Enfin, un profil d'exactitude avec un risque  $\beta$  fixé à 10 % et un intervalle de tolérance de 20 % a été construit pour chacune des molécules, permettant d'identifier la limite de quantification pour la noradrénaline à  $32\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  et pour l'adrénaline à  $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , alors que le signal Raman de la molécule hors SERS est non détectable à la

concentration 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

Finalement, l'homogénéité de forme et de taille des AuNPs entre les trois lots synthétisés s'est traduit par une absence d'effet synthèse sur l'exaltation de l'intensité Raman. En ce sens, l'analyse de l'ACP n'a pas mis en évidence d'effet « lot de synthèse des AuNPs » dans la dispersion des individus caractérisés par leur spectre SERS. Ainsi, l'approche par les plus proches voisins, développée dans l'article sur le 5FU, n'a pas été nécessaire dans ce travail et des approches plus communes, comme la régression PLS après linéarisation par transformation logarithmique ont suffi à obtenir des modèles de prédiction satisfaisants. Ce résultat illustre de fait qu'un procédé de synthèse maîtrisé conduisant à des NPs de taille et de forme homogènes permet la construction de modèles quantitatifs à partir de différents lots de synthèse de NPs. Ce résultat suggère que la caractérisation des synthèses de NPs avant leur utilisation s'avère indispensable.

Au cours de ce travail nous avons pu exalter le signal Raman de l'adrénaline et de la noradrénaline en SERS en éliminant du jeu de données les outliers par la concordance entre évolution du signal en fonction du temps atypique et analyse en composantes principales des spectres. Les performances du modèle quantitatif ont été améliorées par une optimisation mathématique et la quantification de ces deux molécules par des profils d'exactitude a été validé. Ce travail nous a permis de confirmer l'excellente spécificité de la spectroscopie Raman et particulièrement de la SERS avec un modèle discriminant pour lequel aucune erreur de classification n'a été enregistrée malgré la structure très proche des molécules analysées. De plus nous avons construit un modèle quantitatif en SERS pour les molécules d'adrénaline et de noradrénaline pour des concentrations de l'ordre de la dizaine de µg.mL<sup>-1</sup>, ce qui reste pour la SERS une avancée importante dans le contrôle de la variabilité du signal pour la transposition à la quantification de molécules.

L'ensemble de cette analyse combinée dans ces deux articles permet de conclure sur :

- l'importance de l'agrégation et d'en optimiser les paramètres,
- l'importance de l'évolution du signal dans le temps pour la sélection des données et l'identification des outliers,
- la non-linéarité du signal SERS sur la gamme de concentrations étudiées,
- l'intérêt des modèles multivariés sur la qualité de la prédiction,
- la variabilité résiduelle du signal importante malgré des AuNPs de taille et de forme homogènes, variabilité probablement imputable à un manque de contrôle de l'agrégation par acidification avec l'acide chlorhydrique.

Caractériser les agrégats formés après ajout de l'analyte et de l'agent d'agrégation permettrait d'en apprendre davantage sur l'impact de chacun des réactifs sur la taille des agrégats formés et leur stabilité.

La suite de notre travail s'est donc naturellement portée vers de nouvelles

méthodes d'agrégation avec l'objectif d'obtenir un contrôle accru de l'agrégation et de réduire ainsi davantage la variabilité du signal en SERS. De plus, puisque la taille des AuNPs permet d'amplifier le signal, nous souhaitons synthétiser des AuNPs de plus grande taille afin d'augmenter l'amplification du signal dans le but d'améliorer les limites de sensibilité et de pouvoir ainsi quantifier des concentrations inférieures au  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Un de nos objectifs de départ était de transposer les études quantitatives dans des matrices plus complexes, comme les médicaments contenant des excipients ou les milieux biologiques qui constituent des milieux beaucoup plus complexes, dont les différents constituants vont venir inévitablement interagir avec les NPs et perturber l'agrégation. La rencontre avec l'équipe de Dr. Florent Carn du laboratoire de « matière et systèmes complexes » de l'Université Paris-Cité a permis d'orienter la problématique vers la synthèse d'AuNPs de plus grande taille par des techniques de croissances successives et de médier leur agrégation par des polymères préalablement testés dans différents milieux, dont la robustesse et la stabilité ont été éprouvées.

## 4 Agrégation de nanoparticule d'or médiée par un biopolymère de chitosan appliqué à l'analyse SERS de l'adrénaline

---

Nous avons vu dans le premier chapitre, par l'explication théorique du phénomène d'exaltation, l'importance de l'agrégation des NPs sphériques dans la génération des points chauds par couplage plasmonique et dans la formation d'agrégats nanoparticulaires plus importants qui offrent la possibilité de déplacer la résonance plasmon dans une zone plus favorable aux longueurs des lasers utilisés en spectroscopie Raman. Au cours de nos travaux, nous avons démontré expérimentalement l'importance de l'agrégation sur la sensibilité du signal, notamment au travers des exemples du 5-fluorouracile, de l'adrénaline et de la noradrénaline. Les études de l'évolution du signal en fonction du temps ont montré que différents profils d'agrégation étaient retrouvés en fonction des conditions expérimentales. Malgré une synthèse d'AuNPs standardisée et contrôlée, l'amplification de l'intensité était encore variable pour la répétition d'une même expérience. La conséquence de la variabilité du signal sur la qualité de la prédiction a été démontrée. Dans nos expériences, plusieurs conditions d'agrégation ont été appliquées (tampon citrate pour l'agrégation d'AgNPs dans l'analyse du 5FU, HCl pour l'agrégation d'AuNPs dans l'analyse de l'adrénaline et la noradrénaline) et aucune de ces conditions n'était vraiment satisfaisante en termes de stabilité et de reproductibilité du signal. De plus, l'impact de la concentration en analyte sur l'agrégation des AuNPs a été mis en évidence au travers de l'optimisation expérimentale de l'intensité du signal SERS de la noradrénaline, avec des optima dépendants de la concentration en analyte. Dans de telles conditions, il n'était pas possible d'envisager une transposition dans des matrices plus complexes, contenant des substances pouvant perturber le processus d'agrégation. De nombreux auteurs se sont intéressés à la question de l'agrégation des NPs sphériques en suspension [42,103,150–155] médiées soit par des sels [28,41], soit par modification du pH de la suspension [37,103]. Cette question reste d'actualité et n'a pas encore été tranchée tant les conditions expérimentales, l'analyte et le milieu d'analyse influent sur les conditions d'agrégation. La détermination du choix de l'agent d'agrégation devient alors dépendante des conditions expérimentales et une adaptation quasi unique pour chaque situation doit être trouvée. Disposer d'un système capable d'agréger les NPs de manière stable, reproductible et peu sensible au milieu d'analyse représente donc un enjeu majeur dans l'analyse en SERS. Au cours de cette thèse, nous avons eu l'opportunité de travailler avec l'équipe du laboratoire de « matière et systèmes complexes » de l'Université Paris Cité, qui développe des polymères naturels structurés en vue de contrôler des motifs d'assemblage de NPs métalliques [156–158]. La collaboration entreprise dans le cadre du doctorat de Florent Voisin et de son directeur de thèse, le Dr Florent Carn sur la thématique « Assemblages de nanoparticules d'or avec de longues chaînes polyélectrolytes » avait pour objectif

le développement de méthode d'assemblages d'AuNPs dans l'eau par couplage électrostatique avec de longues chaîne polyelectrolytes, notamment par l'utilisation d'un polymère naturel de chitosan chargé positivement. Les polymères de chitosan ont déjà été utilisés pour l'expérimentation en SERS, mais ils sont davantage utilisés pour la synthèse des AuNPs [159–161] ou comme agent de conjugaison des AuNPs pour des applications autres que la SERS [162,163]. La stratégie développée ici était d'utiliser un polymère de chitosan (PC) chargé positivement pour induire l'agrégation des AuNPs par la neutralisation de leur charge. La séquence se déroule en deux temps. Dans un premier temps la quantité de PC ajoutée permet d'atteindre le voisinage du point isoélectrique pour former des agrégats globalement neutres ce qui permet un couplage avec une distance interparticulaire minimale. Les complexes sont ensuite stabilisés par l'ajout d'un excès de PC.

De plus, durant nos recherches sur l'optimisation des conditions expérimentales, nous avons pu évaluer le rôle de la taille des AuNPs sur l'intensité du signal Raman exalté. En effet, malgré les difficultés d'interprétation liées à la variation de la concentration en AuNPs lorsque la taille des AuNPs était modifiée, une amplification du signal Raman de la noradrénaline, probablement dépendante de la taille des AuNPs, a été observée. Ces résultats étaient concordants avec ceux retrouvés dans la littérature [150]. La synthèse d'AuNPs de tailles supérieures a donc constitué un axe d'étude durant ce travail.

Les objectifs de cette étude étaient *(i.)* d'augmenter l'exaltation du signal Raman de l'adrénaline par l'utilisation d'AuNPs de tailles supérieures à celles que nous avons jusque-là synthétisées ( $> 20$  nm), *(ii.)* d'agréger les AuNPs par l'intermédiaire d'un polymère de chitosan dans le but d'obtenir un signal plus intense et plus stable au cours du temps pour des mesures jusqu'à 120 min *(iii.)* ainsi que d'évaluer la stabilité du signal SERS de l'adrénaline dans des matrices plus complexes que de l'eau pure, comme le chlorure de sodium 0,9 % ou le glucose 5 % qui représentent les solvants les plus utilisés dans la reconstitution et dans la dilution des préparations de médicaments par voie intraveineuse.

La synthèse des AuNPs a été réalisée par croissance successive selon la méthode de Bastus [99]. La production des polymères de chitosan a été adaptée du procédé de synthèse développé par Loubaki [164]. Les AuNPs ont ensuite été agrégées, après l'ajout de l'adrénaline, par l'ajout d'une quantité de PC optimisée, permettant de neutraliser les charges des AuNPs. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'un excès de PC. Un plan d'expériences de type Box-Behnken a été réalisé pour optimiser les conditions expérimentales dans l'eau. Ainsi les facteurs choisis pour l'optimisation étaient : la taille des AuNPs, la concentration en adrénaline et le volume d'adrénaline ajouté. La taille des AuNPs a été choisie pour objectiver le gain en sensibilité pour des AuNPs de tailles comprises de 26 à 54 nm dans un système agrégé par un polymère. Au vu de l'impact de la concentration de la noradrénaline dans notre précédente optimisation expérimentale, nous avons décidé d'inclure la concentration en analyte

comme facteur du plan d'expériences. Enfin le volume d'adrénaline ajouté permet d'objectiver s'il faut privilégier un plus grand volume d'analyte dans la suspension d'analyse finale ou d'AuNPs, il peut être considéré comme l'équivalent du ratio  $V_{\text{NPs}} / V_{\text{analyte}}$  de notre précédent plan.

Comme précédemment, un suivi de l'évolution de l'intensité du signal SERS de l'adrénaline a été réalisé pendant 120 min pour chacune des conditions expérimentales. Le plan d'expériences a été généré pour chaque temps de l'analyse dans le but de déterminer l'influence de chacun des facteurs dans l'évolution du signal au cours du temps.

Enfin, les expériences SERS dans les conditions optimales ont été réalisées dans le NaCl 0,9 % et le G5. Dans le but de mieux comprendre les phénomènes d'agrégation dans cette étude, nous avons caractérisé les agrégats dans les conditions des expériences (après mélange des AuNPs, de l'analyte et du polymère) pour les conditions optimales dans les différents solvants étudiés. La caractérisation a été réalisée par UV-vis, DLS, mesure du potentiel zéta et cryoTEM. Les différentes étapes de cette étude sont résumées dans la figure 31.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Talanta : « *Self-assembly of gold nanoparticles by chitosan for improved epinephrine detection using a portable surface enhanced Raman scattering device* ».

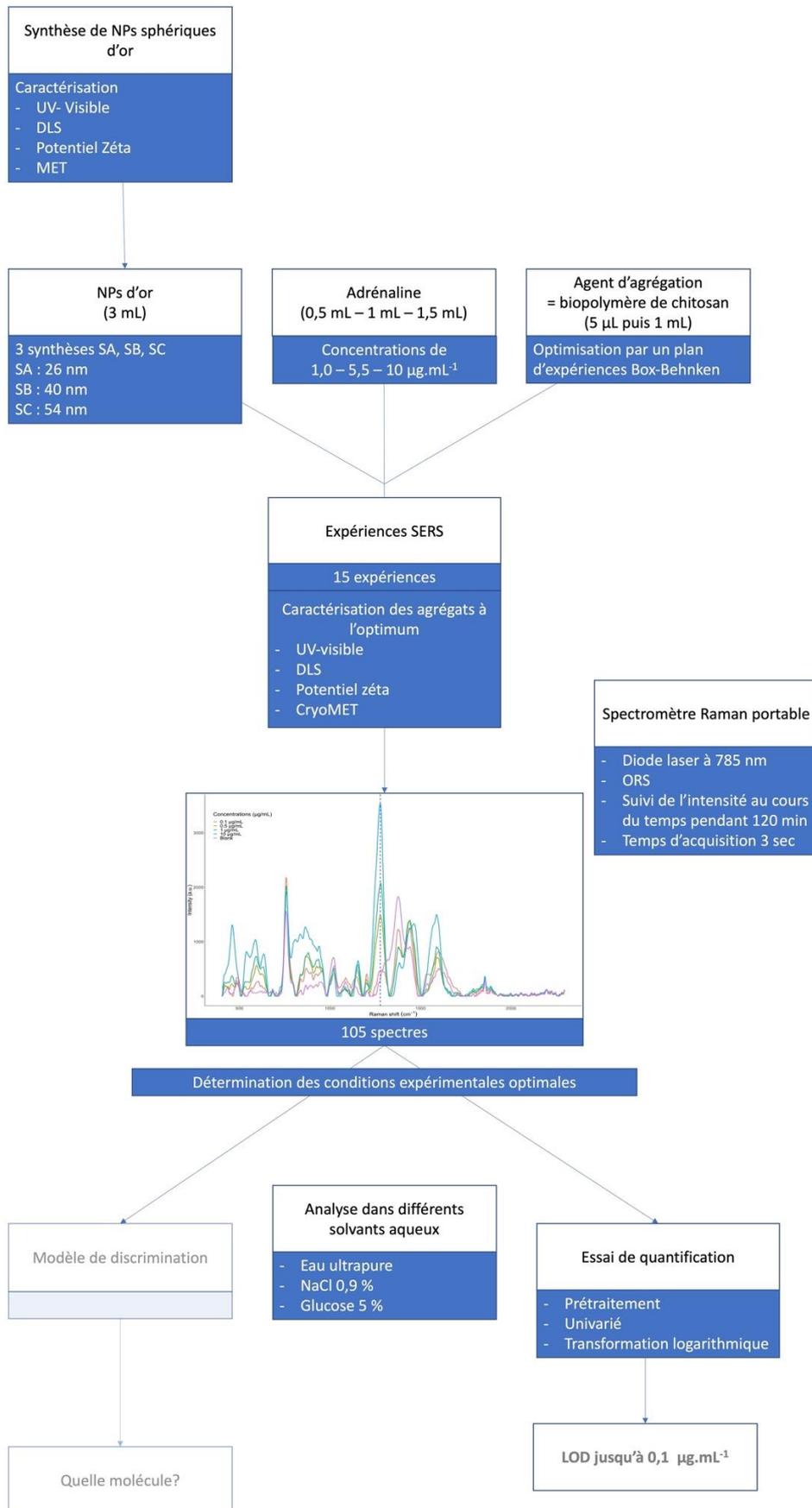


Figure 31 : Stratégie d'analyse de l'adrénaline en SERS à partir de nanoparticules d'or de différentes tailles agrégées par l'intermédiaire d'un polymère de chitosan.

*Self-assembly of gold nanoparticles by chitosan for improved epinephrine detection using a portable surface enhanced Raman scattering device*

Antoine Dowek<sup>1,2</sup> and Florent Voisin<sup>3</sup> (equal contribution), Laetitia Le<sup>1,2</sup>, Céline Tan<sup>1</sup>, JM Mallet<sup>4</sup>, Florent Carn<sup>3\*</sup>, Eric Caudron<sup>1,2\*</sup>

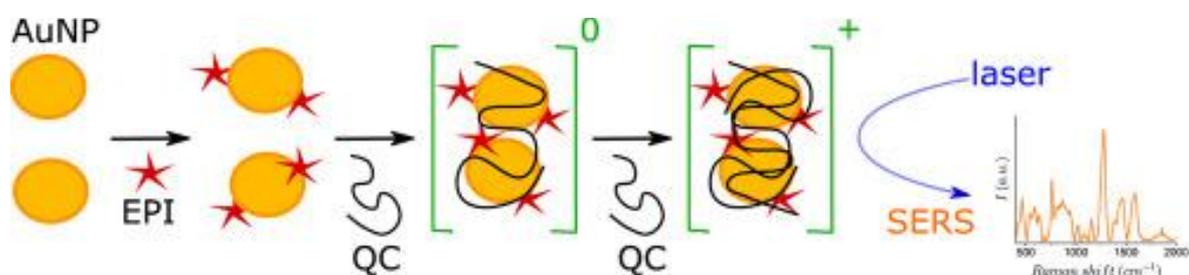
\* Corresponding authors

1 Service de Pharmacie, Hôpital européen Georges Pompidou, APHP. Centre Université Paris cité, 20 rue Leblanc, 75015, Paris, France

2 Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

3 Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR 7057, CNRS, Université Paris Cité, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris Cedex 13, France.

4 Laboratoire des Biomolécules (LBM), UMR 7203, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris



## **ABSTRACT**

Surface enhanced Raman scattering (SERS) has become widely used for identification, quantification and providing structural information about molecular structure in low concentrations as it allows signal Raman enhancement using metallic nanoparticles (NPs). Controlling interaction between analyte and NPs is a major point for the optimization of signal exaltation in SERS analysis. The objective of this study is the improvement and the control of SERS analysis by aggregation / self-assembly optimization of AuNPs using quaternized chitosan. The interest of this approach is to allow stable and reliable measurements with a simple and low cost approach compatible with a massive use in the field. In this work, we used design of experiments by Box-Behnken design to fix optimized conditions to increase signal sensibility of epinephrine water solutions. We also tested SERS signal stability in isotonic sodium chloride 0.9 % and glucose 5 % matrices.

Our results demonstrate that globally neutral AuNPs aggregates were stabilized at a nanometric size by the subsequent addition of polyelectrolyte chains and allows for significant Raman signal enhancement of epinephrine. We succeed to prepare the SERS active material and measure a stable signal of epinephrine at a concentration as down as  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in less than 5 min. The signal remained stable and exploitable for at least two hours. Our results reveal a strong correlation between intensity and logarithm of the concentration (concentration before dilution from 0.1 to  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) suggesting a possible quantification. Furthermore, the signal of epinephrine at  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  were also exploitable and stable in complex media as isotonic sodium chloride 0.9 % and glucose 5 %. This represents a particularly interesting application that would allow direct analysis of drugs complex media and open the way to analysis in biological samples.

Key words: SERS, gold, nanoparticles, neurotransmitters, self-assembly, polyelectrolytes.

## INTRODUCTION

The development of sensitive and mobile analytical methods is a current challenge to identify and quantify analytes on-line, in a timely manner, in contrast to classical methods confined in laboratory such as mass or optical absorption spectroscopy associated to chromatographic analysis [1–3]. Such methods are particularly needed in pharmaceutical manufacturing processes to prepare intravenous drug at the hospital to ensure the right drug at the right dose before injection to the patient [4–7]. It is also important to monitor the concentration of physiologic, pathogenic [8,9] (such as cancer biomarkers), or therapeutic agents in circulating body fluids [10–13] (such as blood, urine or sputum) to adapt patient care and drug in real time. The frequent measurement of trace quantities by hospital staff on this type of minimally invasive liquid biopsy requires methods that are reliable, cost-effective and quick to implement.

Several works have compared standard methods as high pressure liquid chromatography to faster technique as Raman spectroscopy [1,2] or have developed Raman spectroscopy to analyze medicines such as antineoplastic agents [5]. In fine, Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) appeared to have the potential to combine sensitivity, selectivity, and portability for a limited cost. Indeed, in optimized conditions the amplification of the inelastic Raman scattering in close vicinity of plasmonic nanostructures could reach  $10^{14}$  [14] allowing the detection and identification of a single molecule at concentration as low as  $10^{-15}$  M [15]. As signal amplification results from both electric field amplification and optimal electronic interaction between the substrate and the analyte, plasmonic nanostructures active for SERS must have regions where the electric field is amplified (*i.e.* the gap or tip effect) and where the analyte can access to interact with the substrate [16]. Moreover, the amplification factor depends on the wavelength of the incident light and is maximized at the surface plasmon resonance. For biomedical applications, a challenge is to prepare active SERS substrates with plasmon resonance in the near infrared (NIR) region of 650–900 nm to minimize absorption by water or by biomolecules such as haemoglobin or melanin [17]. Yet, fifty years after its discovery [18], quantification analysis by SERS [19] is still challenging due to the large number of parameters influencing the enhancement of Raman signal [20]: nature, size and shape of SERS substrate, interaction between nanostructure and analyte, environmental interaction, wavelength of the exciting light. For example, Massango and *al* [21] demonstrated that at 1 nm of NP surface electromagnetic exaltation decrease of 80 %. Thus, despite its great potential, the use of SERS is currently limited to exploratory studies in research laboratories. In this article, we focus on one of the sources of limitation regarding the preparation of the SERS substrate. In the perspective of repeated *in situ* measurements, the controlled aggregation of plasmonic particles in colloidal suspensions has an advantage over solid plasmonic substrates, which are more expensive and appear to be more suitable for laboratory

measurements than for repeated measurement. In recent years, several studies have shown how aggregates obtained by destabilizing a suspension of gold particles using an increase in ionic strength [22] or a decrease in pH [23,24] can allow the quantification of analytes. However, a disadvantage of this type of approach is the instability of the signal over time due to the continuous growth of the aggregates and their sedimentation [24,25]. Obviously, many methods can be used to obtain aggregates of finite size and possibly of controlled structure [22,26–32]. However, if we exclude the methods requiring a functionalization of the particles or the application of an external force field because of their cost and the difficulty of implementation, the approaches based on electrostatic assemblies seem the most promising.

According to a large-scale European multi-instrument interlaboratory study [33], gold nanoparticles in suspension should be optimal for reproducible quantitative analysis by SERS with laser working at 785 nm. In this study, we have assembled citrate coated gold nanoparticles (AuNPs) in nanometric aggregates (*i.e.* dimers and oligomers) by electrostatic complexation with long polycationic chains (PEL) of biological origin (*i.e.* chitosan). This choice was motivated by the possibility of forming small oligomers that facilitate access of the analytes to the hot spots and that present a maximum of absorption around 800 nm. The originality of our method of assembly is to first form globally neutral aggregates around isoelectric point (IEP), to allow coupling with minimum inter-particle distance, before stabilizing the globally neutral complexes by the subsequent addition of polyelectrolyte chains. Interestingly, the small amount of polyelectrolyte involved in the aggregation and stabilization does not induce any change in the structure and optical properties of the aggregates before and after stabilization. Overall, the 2-step process of particle assembly by manual mixing followed by a measurement with a standard portable Raman spectrometer allows to obtain a result in about 2 minutes with pre-prepared stock solutions. Our approach is similar to the one developed in recent years by Van Duyne' and Schatz' groups [34] to form oligomers of gold particles by aggregating AuNPs with a salty solution in the presence of an analyte molecule and then halting the aggregation with poly(vinylpyrrolidone). The originality of our proposal is to use a widely available natural polyelectrolyte as a coupling and stabilizing agent instead of a synthetic non-ionic polymer. *A priori*, the advantage is to make the approach sustainable and to increase the stabilizing power by overcharging the aggregates with a strong polyelectrolyte. Furthermore, our measurements were carried out using a portable Raman spectrometer, which can facilitate the evaluation of our results from an application perspective. Our main result is that small oligomers (*i.e.* average aggregation number,  $N_{ag} \sim 2$ ) obtained by stabilization of globally neutral aggregates provide stable and reproducible Raman signals over a period of at least 1h after sample preparation allowing the detection of epinephrine (EPI) in milliQ water down to a concentration of at least  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Moreover, we show that the signal is preserved and even exalted in complex media such as isotonic sodium chloride at 0.9 % (NaCl 0.9 %) and glucose 5 % (G5) use to prepare infusion preparations at the hospital. Experiments were explored and optimized by Box-Behnken design of experiments [35]

(BBD) to find experimental conditions that maximize enhancement of Raman signal intensity and stability over time.

## **EXPERIMENTAL**

### **CHEMICALS**

Gold (III) chloride trihydrate ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , > 99.99 %), trisodium citrate dihydrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99$  %), acetone ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , 99.5 %), quaternized chitosan (QC) was synthesized from chitosan ( $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$ , degree of N-deacetylation  $\approx 75$  %,  $M_w \approx 358$  kg/mol according to size exclusion chromatography) purchased from Sigma-Aldrich. Glycidyltriméthylammonium chloride, noted GTMAC ( $\text{C}_6\text{H}_{20}\text{ClNO}$ , 80 % in water) was purchased from Tokyo Chemical Industry. Epinephrine (EPI) was purchased from Aguettant and was prepared in different media: water, isotonic sodium chloride at 0.9 % (NaCl 0.9 %) and glucose 5 % (G5) obtained from Fresenius-Kabi. All solutions were prepared with milliQ water ( $\rho = 18.2$  M $\Omega$ .cm) that has never been stored for more than 24 hours.

### **GOLD NANOPARTICLES SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION**

Citrate stabilized AuNPs were first synthesized by sequential growth protocol [36]. Briefly, citrate was put into 150 mL of water to obtain a 2.2 mM solution and refluxed at 130 °C, before adding 1 mL of a 10 g.L<sup>-1</sup> solution of  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . The heating was cooled down to 90 °C. The seeds have their size increased by repeating several growing cycles as followed: 55 mL of the solution were withdrawn, followed by the addition of 53 mL of water and 1 mL of a 60 mM citrate solution. Then, 1 mL of  $\text{HAuCl}_4$  were added and the solution was stirred for 30 min. These growing cycles were repeated up to the desired size of AuNPs. Typically, 6 cycles were required to obtain particles with a diameter  $D \approx 54$  nm. Between the seeds and the sixth cycle, calculated [36] gold nanoparticles concentration varies from  $9.0 \times 10^{11}$  NPs.mL<sup>-1</sup> to  $5.8 \times 10^{10}$  NPs.mL<sup>-1</sup>. NPs were characterized in DLS, electrophoretic mobility, ultraviolet visible spectroscopy (UV-Vis) and cryogenic transmission electron microscopy (cryoTEM). The characterization of the NPs used in this study are presented in figure S1 of the supporting information (SI).

### **QUATERNIZED CHITOSAN SYNTHESIS**

QC was synthesized in aqueous medium by ring opening between the chitosan's primary amine and the epoxy cycle of glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC). The protocol was adapted from literature [37].

In a 250 mL two necked round bottom flask, 6 g of chitosan powder was dispersed in

60 mL of milliQ water at 85 °C at reflux with a heating mantle for 2 hours leading to a suspension of partially solubilized chitosan (pH  $\approx$  6.5). Then, 6.20 mL of GTMAC, were added three times every two hours. The viscous yellow mixture was kept under magnetic stirring at 800 rpm during approximately 10 hours. The polymer was precipitated by adding an excess of acetone and washed with acetone several times. After drying in oven at 60 °C for two days, one typically recovers 16 g of the polymer in the form of a yellow vitreous solid. It was then purified by dispersion in milliQ water at pH 6.5 and dialyzed (cutoff  $\sim$  14 kDa) against milliQ water for four days to eliminate unreacted GTMAC. The water was changed every three hours. One finally recovers QC after freeze drying for approximately 24 hours.

### **DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)**

Experiments were carried out with a NanoZS apparatus (Malvern Instrument) operating at  $\lambda = 632.8$  nm and  $P \leq 4$  mW. The fluctuations of the scattered intensity with time, noted  $I(q,t)$ , were measured at fixed angle  $\Theta = 173^\circ$  or, equivalently, at a given scattering wave vector whose norm is  $q = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$  with  $n$  the solvent refractive index. These fluctuations reflect the Brownian motion of the scattering objects.  $I(q,t)$  is first transformed into the normalized time auto-correlation function of the scattered intensity:  $g^{(2)}(q,t)$ . For a diffusive process,  $g^{(2)}(q,t) \sim e^{-2qDt}$  with  $D$  the mutual diffusion coefficient. The hydrodynamic radius,  $R_H$ , of the Brownian objects is determined with the Stokes–Einstein relation. The size distribution was derived from the inverse Laplace transform of the correlation function approximated with the CONTIN algorithm [38].

### **LASER DOPPLER VELOCIMETRY**

Electrophoretic mobility ( $\mu$ ) was measured with a NanoZS apparatus (Malvern Instrument). This set-up operates with an electrical field of  $25 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$  oscillating successively at 20 Hz and 0.7 Hz to reduce the electroosmosis effect due to the surface charge of the capillary cell. The particles' velocity was measured by LASER Doppler velocimetry.

### **ULTRAVIOLET VISIBLE NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY (UV-Vis-NIR)**

Measurements were performed on a Perkin Elmer Lambda 1050 spectrophotometer. 5 mm thickness Hellma cells (quartz) were filled in by the diluted AuNPs, QC and EPI mixtures. The diffuse transmission was measured by collecting the light exiting the sample using an integrating sphere (Perkin Elmer Accessory). Spectra were corrected from the quartz cell filled in with water.

### CRYOGENIC TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (CRYOTEM)

Images were taken on an Ultrascan 1000, 2k x 2 k CCD camera (Gatan, USA), using a LaB6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japan) cryo-microscope operating at 200 kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and to reduce the irradiation during the image capture. The images were recorded at 93 K.

### SAMPLES PREPARATION

The first step of the protocol (mixing step) consists of mixing from 0.5 mL to 1.5 mL of EPI (from  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  to  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) in aqueous solution (milliQ water, NaCl 0.9% or G5) and 3 mL of the citrate coated AuNPs suspension to obtain [AuNPs-EPI]-solvent negative complexes. The pH of the solutions is equal to  $\sim 4$  and is fixed by the pH of the suspension of gold particles. Note that EPI/citrate coated AuNPs interaction at this pH could involve electrostatic coupling and hydrogen bonding. The experiments were performed with particles of different sizes between 26 and 54 nm (*i.e.* average TEM diameter) and concentration from  $3.6 \times 10^{11} \text{ NPs.mL}^{-1}$  to  $5.8 \times 10^{10} \text{ NPs.mL}^{-1}$ . The second step (coupling step) consists of injecting 5  $\mu\text{L}$  of QC ( $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) solution to obtain [EPI-AuNPs-QC] $^0_{\text{solvent}}$  neutral complexes. For the coupling step, the ratio of QC to AuNPs was adjusted to obtain neutral complexes. In a last step, called quenching step, these neutral complexes are stabilized by a second injection of QC (1 mL at  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) to obtain [EPI-AuNPs-QC] $^+_{\text{solvent}}$  stable positive complexes as illustrated in Fig. 1. The concentrations of nanoparticles obtained from the synthesis are theoretical concentrations calculated under the assumptions that: all the gold present in the medium is included in the nanoparticles (*i.e.* 100% synthesis yield), the particles are spherical and gold colloid density is equal to gold in bulk. The concentration of quaternized chitosan to get neutral complexes was determined from the electrophoretic mobility measurements by considering the concentration of chitosan required to obtain zero electrophoretic mobility after complexation with the oppositely charged nanoparticles. Although this is a 3-step process, it is simple to carry out by a non-chemist outside a synthesis laboratory as it only involves mixing at room temperature dilute aqueous solutions. We estimate the total preparation time to be 2 min per sample.

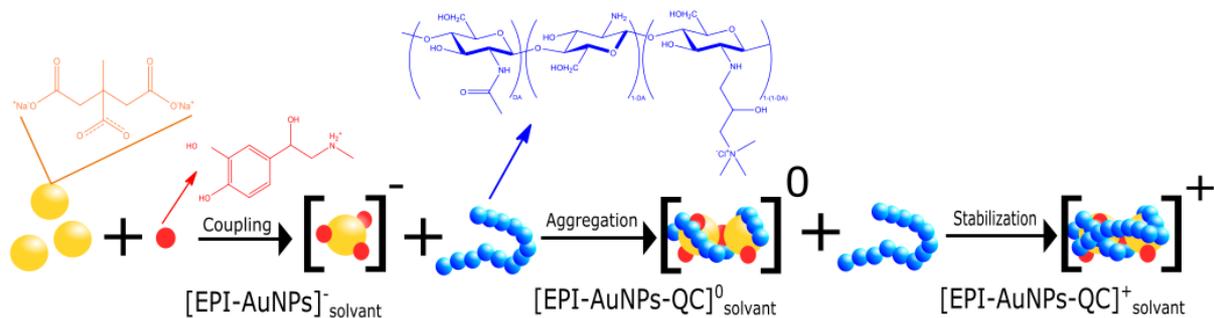


Fig. 1 Schematic illustration of the 3-steps methodology used for the SERS detection of epinephrine (EPI, in red) by electrostatic complexation with quaternized chitosan (QC, in blue) and citrate coated gold nanoparticles (AuNP, in yellow).

In this set of experiments, the concentration before mixing (*i.e.* after quenching step) of the different partners was set:  $[\text{AuNPs}]_{26 \text{ nm}} \approx 3.6 \times 10^{11} \text{ NP.mL}^{-1}$ ,  $[\text{AuNPs}]_{54 \text{ nm}} \approx 5.8 \times 10^{10} \text{ NP.mL}^{-1}$ ,  $[\text{EPI}] = 0 \text{ to } 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $[\text{QC}] = 0.5 \text{ g.L}^{-1}$ .

### SERS SPECTRA COLLECTION

SERS spectra were acquired using handled Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA, Metrohm) equipped with a 785 nm (laser output power 100 mW) diode and a vial module at a focal length of 0.85 mm for a weight of  $\sim 700 \text{ g}$ . Orbital raster scan (ORS) system allowing to measure the signal at different points in the suspensions was used. SERS signals were acquired from  $400 \text{ cm}^{-1}$  to  $2,300 \text{ cm}^{-1}$  with a spectral resolution between  $12 \text{ cm}^{-1}$  to  $14 \text{ cm}^{-1}$ . The SERS measurements were conducted directly after the quenching step (about 30 sec after introducing EPI in the AuNPs suspension) from 0 to 2 hours contact time with an acquisition time of 3 seconds.

For all experiments, SERS spectra were pretreated to avoid signal disturbances. First a Savitzky-Golay algorithm [39] was used for smoothing with first order polynomial and a window size equal to 7 and then asymmetric least square was used to remove spectral baseline [40] with second derivative constraint equal to 6. All pretreatments were generated using R version 4.0.3 (2020-10-10) with packages "baseline" [41] for baseline correction, "pls" [42] for pls regression, "rsm" [43] to generate design of experiments and "ggplot2" [44] for figure construction .

### EXPERIMENTAL OPTIMIZATION OF SERS MEASUREMENTS

To determine experimental optimum conditions using a reduced number of experiments, a Box Behnken [35] design (BBD) based on three factors (the AuNPs size, the EPI concentration in milliQ water solution and the volume of EPI added) with three levels (-1; 0 and +1) was constructed. According to the BBD, the combinations in which all variables are on the highest or the lowest levels [45] were not included. Only

treatment combinations at the midpoints of edges of the process space and at the center including three repetitions to estimate reproducibility were investigated (Table 1) for a total of 15 experiments. To evaluate the SERS signal stability, which reflects mostly the stability of interaction between the AuNPs, QC and EPI, spectra were acquired for each experiment at various acquisition times corresponding to 0, 1, 2, 15, 30, 60 and 120 min. The suspensions were shaken for a few seconds before each measurement to redisperse the aggregates that tend to sediment over time. We emphasize that the aggregates are stable (*i.e.* colloidal stability) but that sedimentation is inevitable due to the particle size and density of the gold element. After mixing, the size of the aggregates and their optical properties are always the same.

Prior to BBD interpretation, SERS spectra were pretreated. Then, the band at  $1,280\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the most intense Raman shift of EPI was used to interpret the DoE. Because it is known that SERS signal can vary with time using AuNPs aggregates [24,25], the surface responses were constructed *i)* at the intensities collected at time = 0 min *ii)* at the maximum intensities from 0 to 120 min or *iii)* at the mean intensities of the seven spectra from 0 to 120 min.

Based on those spectral data, the optimal experimental conditions were determined for the maximal SERS signal. To evaluate most important factors influencing SERS signal stability over time, loss signal was also studied as response factor for each time, using same BBD. All statistical analysis were generated using R version 4.0.3 (2020-10-10).

Table 1 Box-Behnken design: three levels three factors; gold nanoparticles size (AuNPs TEM diameter), epinephrine concentration in milliQ water [EPI]<sub>w</sub>, volume of epinephrine aqueous solution added to the mixture (EPI volume), for a total of 15 experiments including three repetitions of the center point.

<b>Levels</b>	<b>AuNPs size (nm)</b>	<b>[EPI]<sub>w</sub> (µg/mL)</b>	<b>EPI volume (µL)</b>
<b>-1</b>	<b>26</b>	1	500
<b>0</b>	<b>40</b>	5,5	1000
<b>+1</b>	<b>54</b>	10	1500

Parameters studied to validate BBD were conducted by analysis of variance: the regression model is significant if *p-value* < 0.05 coefficient and the lack of fit which measures the mismatch of the surface response constructed and should be non-significant (*p-value* > 0.05). Effects of factors were also calculated and should be significant (*p-value* < 0.05) to have an impact on the response studied. The coefficient

of determination  $R^2$  was also estimated, it allows to determine the agreement between the experimental results and those modeled by the response surface.

#### SENSIBILITY AND INFLUENCE OF COMPLEX MEDIA

Optimized conditions were first used to evaluate the sensibility of EPI detection in ultrapure water solution and secondly, to evaluate the influence of complex media on SERS signal. Concentrations of EPI solutions were tested from  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  to  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for BBD and until  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in sensibility analysis. Experiments were tested in two media largely used to prepare intravenous therapy: NaCl 0.9 % and G5. EPI solutions at  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  were prepared directly in these media instead of water. Then experiments were conducted as previously described. Spectral data were acquired every minute from 0 to 10 min and then at 30, 60 and 120 min to follow the signal evolution in early stages.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

#### **EXPERIMENTAL OPTIMIZATION OF SERS MEASUREMENTS**

Our methodology is based on self-assembly of AuNPs, EPI and QC in water (pH = 4) by electrostatic complexation between the different partners considering that citrate coated AuNPs are anionic (pKa  $\approx$  3.1, 4.8 and 6.4) whereas QC and EPI (pKa  $\approx$  8.6) are cationic. To optimize SERS measurements, BBD analyses were first performed in pure water before considering more complex environments, such as NaCl 0.9 % and G5, in a second part.

We first characterized the evolution of the structure, size and optical properties of the aggregates after the different stages of the assembly process.

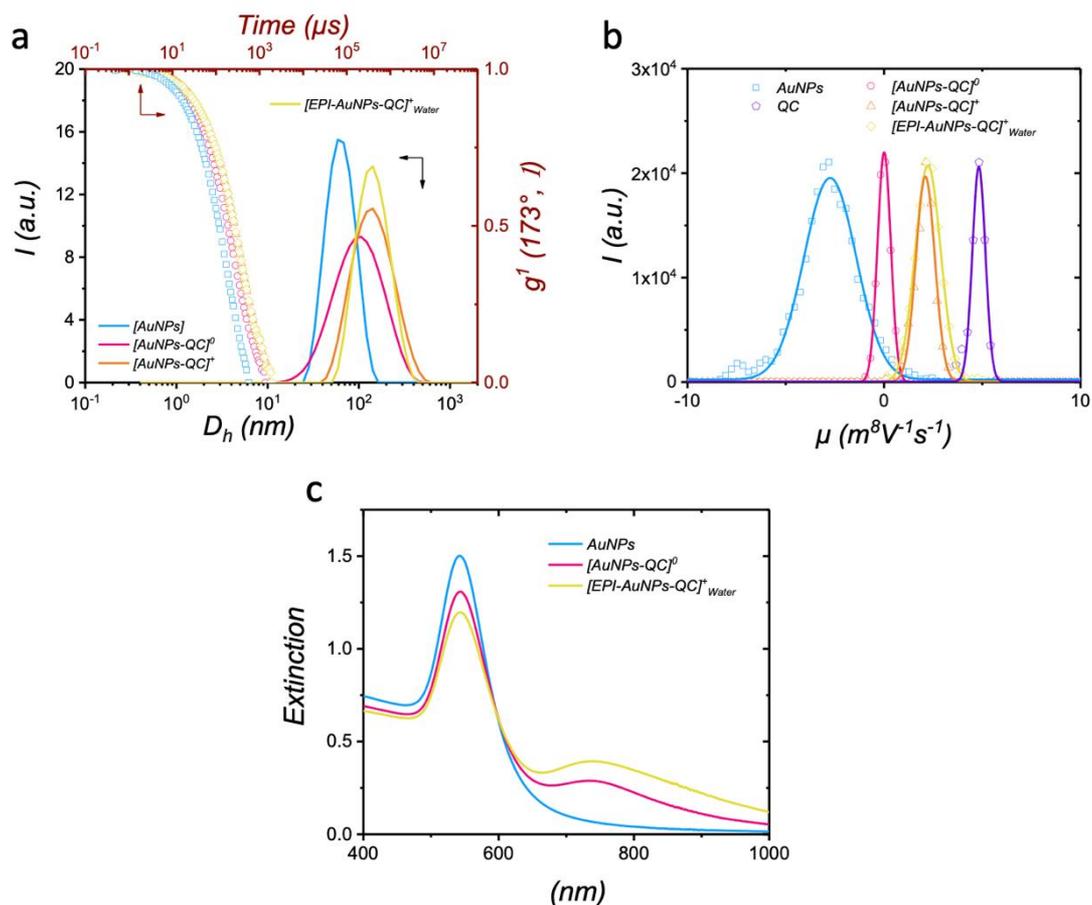


Fig. 16 Characterizations of the system at the different steps in milliQ water with  $[AuNPs]_{54\text{ nm}} = 5.8 \times 10^{10} \text{ NP.mL}^{-1}$ ,  $[EPI] = 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $[QC] = 0.5 \text{ g.L}^{-1}$ . (a) Normalized autocorrelation function  $g^{(1)}(173^\circ, t)$  and corresponding distributions of the hydrodynamic diameters. (b) Distribution of zeta potentials obtained by laser Doppler velocimetry. (c) UV-Vis-NIR spectra. All the sample were characterized directly after mixing.

As shown in Fig. 2, in absence of EPI, the coupling of AuNPs with QC chains around the iso electric point  $[AuNPs-QC]_w^0$  makes it possible to form neutral assemblies of about 100 nm in a few seconds. From an optical point of view, the aggregation is characterized by a decrease of the intensity corresponding to the localized surface plasmon resonance (LSPR) of isolated particles at 524 nm and the apparition of a new plasmon band centered around 750 nm. This second band results from the plasmonic coupling between adjacent particles. In the next step (*i.e.* quenching), the addition of QC enables to obtain a suspension of cationic aggregates whose average hydrodynamic size is slightly increased ( $D_h = 150 \text{ nm}$ ) as well as the absorbance of the second plasmon band. These increases in size and absorbance certainly reflect the progress of the aggregation process in the time between the coupling and quenching steps (*i.e.*  $\Delta t \sim 30 \text{ s}$ ).

Based on this protocol, a BBD was constructed to select the most significant factors that influenced the SERS signal intensity. For the fifteen experiments of BBD, a SERS signal was obtained for EPI from  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  to  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  as shown in figure S2a while no detectable signal was observed by traditional Raman spectroscopy for EPI at  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Furthermore, no SERS signal of epinephrine was observed without chitosan as shown in figure S2b highlighting the necessity to induce aggregation in SERS experiments.

SERS spectra were in accordance with Raman spectra previously described for EPI drug [34,46,47]. BBD was therefore constructed based on the Raman shift at  $1,280 \text{ cm}^{-1}$  which corresponds to the most intense band attributed to EPI. Response of BBD can be visualized rapidly and concisely by response surface (Fig. 3).

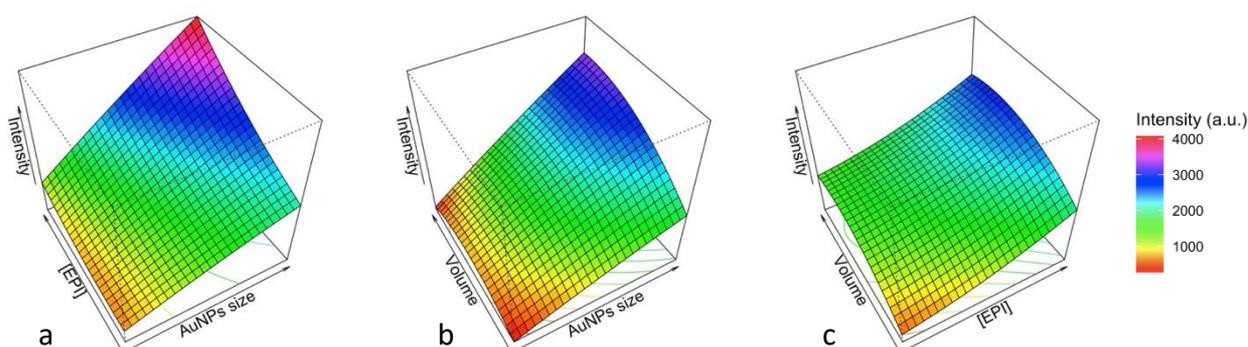


Fig. 17 Response surface from Box Behnken design. Factors: epinephrine concentration ([EPI]) in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , epinephrine volume (Volume), nanoparticle size (AuNPs size) for response corresponding to the  $1280 \text{ cm}^{-1}$  mean intensity from 0 min to 120 min.

All models were significant with  $p$ -value  $< 0.05$ , while effect of factors studied were significant too, except for EPI volume with  $I_{\text{max}}$  model (Table 2). The determination coefficient,  $R^2$ , were higher than 0.94 and confirm the adequation between the model and experimental data. For the three model, the lack of fit was always non-significant ( $p$ -value  $> 0.05$ ) indicating that the model fit well the actual response. Effects of factors were significant ( $p$ -value  $< 0.05$ ) excepted for volume of EPI with response selected on the maximum of intensity for each experiment. There was no significant factor interaction calculated ( $p$ -value  $> 0.05$ ).

Table 2 Parameters of Box Behnken design at  $1280 \text{ cm}^{-1}$  in function of response selection ( $I_0$  intensity at  $t = 0 \text{ min}$  for each experiment,  $I_{\text{Max}}$  maximum of intensity for each experiment,  $I_{\text{Ave}}$  mean intensities): coefficient of determination ( $R^2$ ), lack of fit and  $p$ -value of the effect for

the three studied factors (\* p-value  $\leq$  0.05).

	<b>p-value of model</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Lack of fit</b>	<b>Effect of AuNPs size (p-value)</b>	<b>Effect of EPI concentration (p-value)</b>	<b>Effect of EPI volume (p-value)</b>
<b>I<sub>0</sub></b>	0.0081	0.95	0.2777	0.0006*	0.0057*	0.0113*
<b>I<sub>Max.</sub></b>	0.0123	0.94	0.2607	0.0007*	0.0106*	0.1084
<b>I<sub>Ave.</sub></b>	0.0053	0.96	0.2229	0.0004*	0.0038*	0.0243*

Surface response for the best statistical model, based on mean intensities (Fig. 3), was used to determine optimum conditions or best levels that improve sensitivity *i.e.*, that maximize the intensity at 1280 cm<sup>-1</sup>. Thus, optimum conditions were for the highest nanoparticle size (54 nm), the highest EPI concentration (10 µg.mL<sup>-1</sup>) and the highest volume of EPI (1.5 mL) added.

The robustness of BBD in these experiments has been highlight offering comparable results for the 3 factors at almost all times studied, with significant effects, with a less important effect of EPI volume added. The importance of AuNPs size have also been highlight.

Following evolution of the signal as a function of time has demonstrated a better control of the aggregation process generated by polymers than generated by salts [48] or by acidic solutions [24], for which a fast evolution of the signal is generally found as well as an irreversible overaggregation occurring in the first minutes. This study confirms the observation that polymers can control more properly aggregation process and is in accordance with Van Duyne' and Schatz' groups who shown that using polymer as polyvinylpyrrolidone (PVP) could avoid overaggregation in salty mediated aggregation for analyze of neurotransmitters in SERS [34].

For most of the experiments, a slight decrease of the signal over time is observed without spectral changes, this decrease being stronger for the larger size particles (Figure S3). This evolution should be related to the sedimentation of the aggregates due to the density of the gold. This result was expected because even single particles of this size (*i.e.* D<sub>TEM</sub> = 54 nm) visibly sediment after a few days. That can be explained by a higher sedimentation of larger size nanoparticles. Choosing AuNPs of smaller size

could lead to a more stable signal over time and finding a compromise between stability and sensibility could be noteworthy. However, the stability obtained with AuNPs of 54 nm, and the slow decrease over time is largely compatible for analysis in real time. This work focused on the gain in sensibility and favorize higher AuNPs *i.e.* 54 nm.

Trying to explain which factor could have the most effect on signal evolution, specifically on signal loss, the BBD were performed changing the response study with signal loss from 0 min to 15, 30, 60 and 120 min.

Effects for BBD at first times (15, 30 and 60 min) were non-significant confirming that the Raman signal was stable during early stages. BBD at 120 min (Figure S4) gave an interpretable surface response (p-value = 0.0409,  $R^2 = 0.9047$ , lack of fit = 0.7178) with significative performances, two factors had a significative effect: AuNPs size, with a p-value of 0.002 and volume of EPI added with a p-value equal to 0.038.

#### **SENSIBILITY ANALYSIS**

Beginning at  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of EPI in milliQ water solution, a signal was still observed at  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , compare to a blank solution prepared in the optimal conditions replacing EPI by water (Fig. 4 a). We recall that this concentration of  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  is a concentration before dilution with particles. The final concentration after dilution is  $27.2 \text{ ng.mL}^{-1}$  (*i.e.* 150 nM). As a comparison, it was recently shown by Van Duyne' and Schatz' groups that the detection limit obtained with a Raman microscope and small aggregates (*i.e.* dimers) of gold particles ( $D = 90 \text{ nm}$ ,  $[\text{Au}] = 0.25 \text{ mg Au/mL}$ ) and poly(vinylpyrrolidone) was around 250 nM. Although the results are difficult to compare quantitatively due to methodological differences, it shows the potential of our approach based on bi-sourced compounds and a portable Raman spectrometer.

Regarding these results, a univariate regression curve at  $1,280 \text{ cm}^{-1}$  was constructed (Fig. 4 b) and showing a good linearity between intensity and the logarithm of concentration with a coefficient of determination,  $R^2$  (as the square of correlation coefficient,  $r$ , for linear regression), equal to 0,998. Though this curve was constructed with only four measurements, it is very encouraging as preliminary results to consider further quantification applications at low concentrations of EPI.

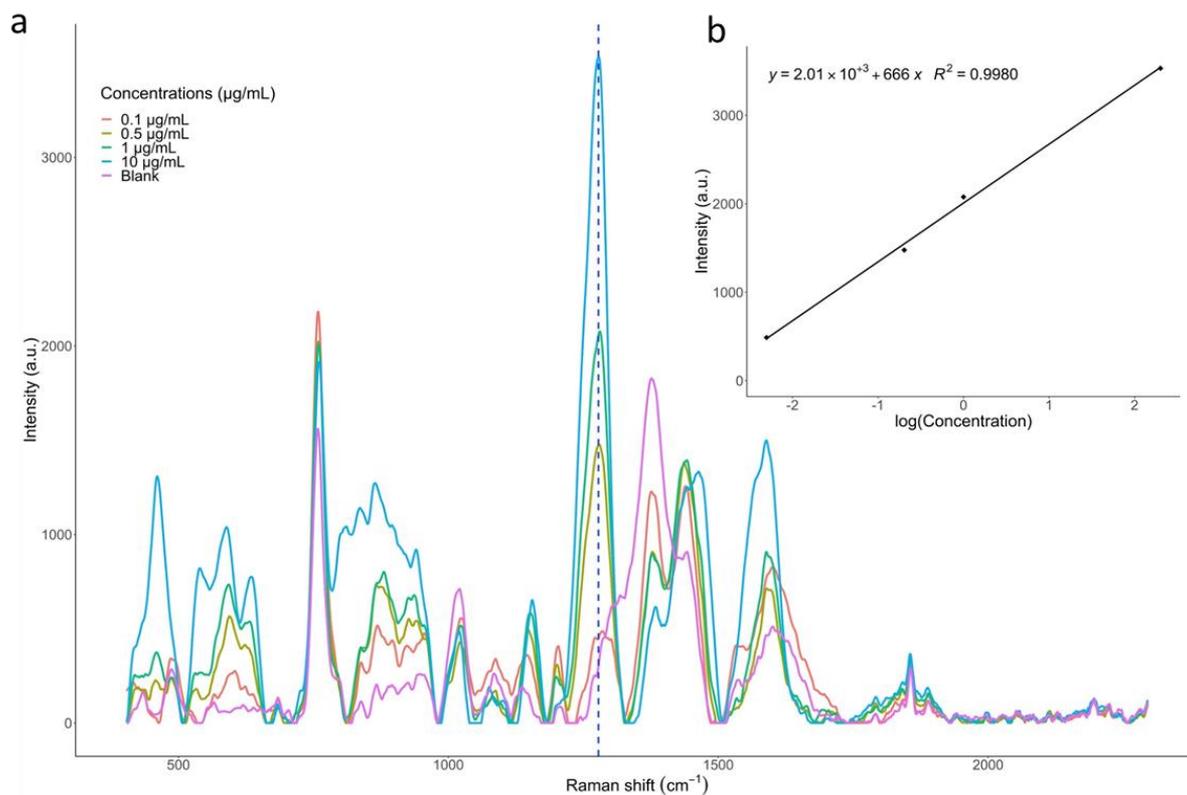


Fig. 18 (a) Pretreated exalted Raman spectra with optimum conditions: nanoparticle size = 54 nm, volume of epinephrine = 1.5 mL (smoothing: Savitzky-Golay, baseline correction: asymmetric least square, Blank:  $[\text{AuNPs-QC}]^+_{\text{water}}$ ). (b) Linear regression between intensities at 1280 cm<sup>-1</sup> and the neperian logarithm of concentration.

### INFLUENCE OF COMPLEX MEDIA

Experiments in more complex media were conducted with previously optimized conditions (experiment +1; +1; +1) corresponding to AuNPs size of 54 nm, [EPI] equal to 10 μg.mL<sup>-1</sup> and a volume of EPI of 1.5 mL. In addition to pure water, two media usually used to dilute or reconstitute intravenous drugs were investigated: NaCl 0.9% and G5. Experiments consisted in determine the gain in term of sensibility and investigating the influence of these media in aggregation process and whether they interact with AuNPs or EPI to disturb Raman signal measured in SERS. Therefore, experiments were measured by UV-vis spectroscopy, DLS and TEM and compare to those acquired with pure water to highlights modifications due to these media on the interaction process.

As shown in (Figure S5), the results obtained in the presence of glucose were very close to those previously obtained in pure milliQ water. The main difference is a small absorbance shift which may reflect the presence of glucose molecules in the vicinity of AuNPs surface. In contrast the results obtained in presence of NaCl are significantly different with a strong increase in aggregate size ( $D_h \sim 665$  nm, Aggregation number  $\sim 40$ ) and infrared absorbance in the NIR domain. This increase

in aggregate size, that could have been anticipated, reflects the acceleration of the aggregation process obtained when the Debye screening length decreases.

Agreement with the hydrodynamic size. These aggregates show an opened fractal. Interestingly, we underline that in all cases the stabilization process is effective in the sense that the size of the aggregates does not change over time after the quenching step.

To shed light on the structure of the aggregates in a non-distorting way, we performed cryogenic transmission electronic microscopy (cryoTEM). As expected from DLS measurements, aggregates formed in water with or without EPI involve a small number of particles with an average aggregation number around 2. The particles appear to be in very close contact (Fig. 5 a) which is consistent with the presence of an absorption band around 750 nm. The presence of EPI and glucose doesn't modify the average aggregation number and the distance between particles within the aggregates (Fig. 5 b).

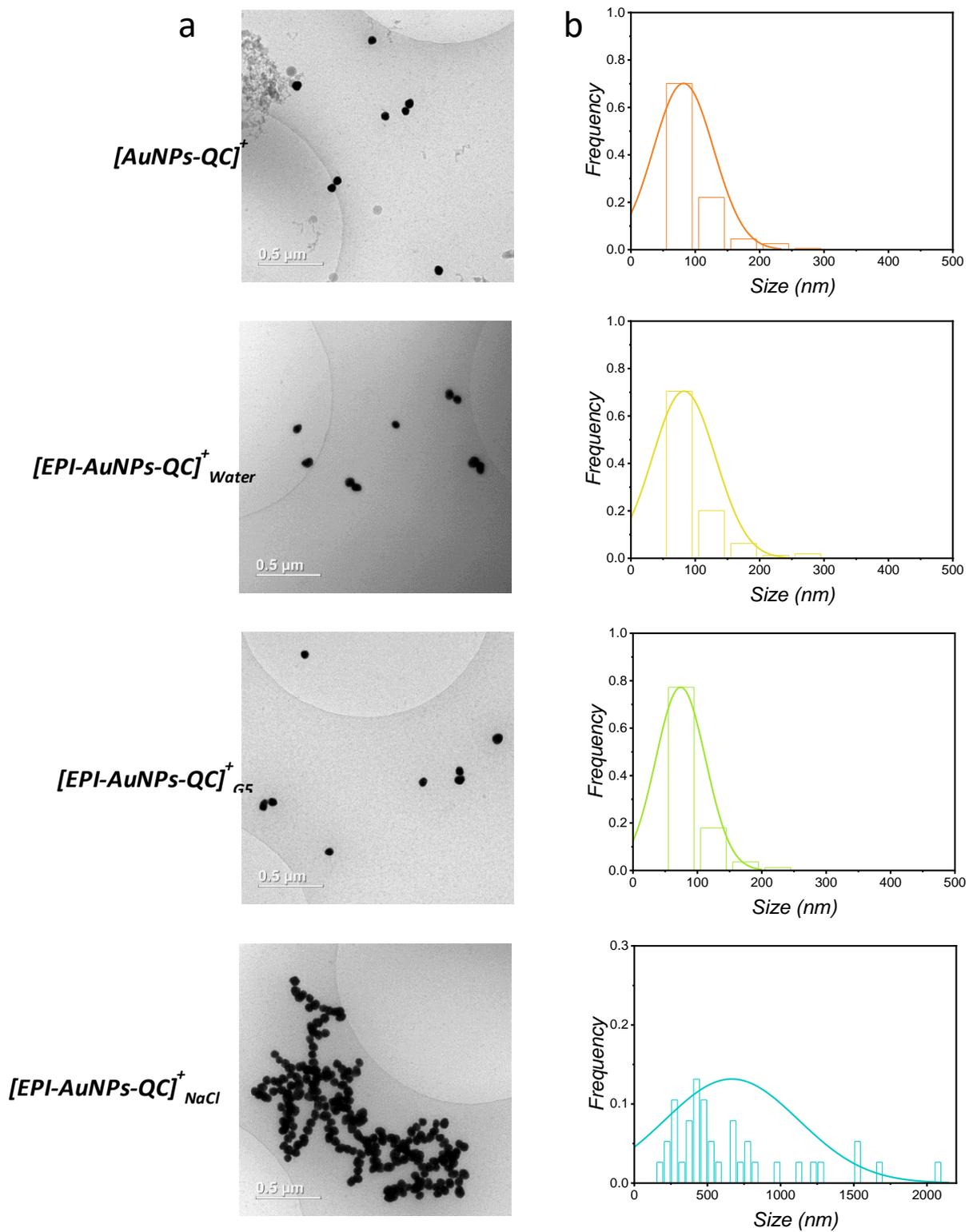


Fig. 19 (a) Typical cryoTEM images of aggregates and (b) size distribution from cryoTEM observations.

The aggregation number increases strongly with the addition of NaCl 0.9 % to reach an average aggregation number around 40 particles per aggregate and an average size close to 600 nm in qualitative agreement with the hydrodynamic size. These aggregates show an opened fractal structure similar to those obtained by diffusion limited cluster aggregation [49].

Overall, we have shown that globally neutral aggregates comprising particles in close contact could be stabilized at a small aggregation number by the subsequent addition of biopolyelectrolyte chains. Stable suspensions with a maximum of absorbance around 750 nm can be obtained rapidly without the size, structure and optical properties being strongly affected by the presence of EPI and/or glucose in the media. In the presence of salt, the size of the aggregates was significantly larger due to charge screening during the coupling step. In the following we will estimate the potential of these aggregates as SERS-active materials.

EPI optimal conditions for intensity (AuNPs size = 54 nm, [EPI] = 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , volume of EPI = 1.5 mL) were also tested in NaCl 0.9 % and G5. Spectra were compared to blanks of polymer in those media and in pure water solution (Fig. 6). Looking at these spectra demonstrates a signal for the intensity previously described at 1280  $\text{cm}^{-1}$ . However, in both cases the Raman signal of EPI is disturbed. For G5, the global intensity decreases but a slight intensity at 1280  $\text{cm}^{-1}$  remains exploitable. While for NaCl 0.9 %, the signal is much more intense with an intensification of Raman shift of all compounds present in the suspension: citrate, QC polymer, and EPI, with a still intense signal at 1280  $\text{cm}^{-1}$ . This global enhancement of Raman signal compared to signal obtain in water is in accordance with cryoTEM, UV-Vis-NIR and DLS characterizations. Addition of NaCl 0.9 % induces aggregate a multiplication of hot spots at the origin of higher enhancement.

Raman shift were attributed based on previous studies on SERS analysis of citrate[50,51] and EPI[52,53]. Focusing on most important Raman shift observed in water and NaCl blanks permitted to attribute Raman shift of polymer or citrate: 760  $\text{cm}^{-1}$ , 1000  $\text{cm}^{-1}$ , 1240  $\text{cm}^{-1}$ , 1380  $\text{cm}^{-1}$ , 1600  $\text{cm}^{-1}$ . The presence of Raman shift at 1000  $\text{cm}^{-1}$  on all spectra suggests an attribution to a molecule present in all experiences, combined with the diminution of the intensity of this shift adding EPI and chemical shift attribution (C-COO stretching) confirms it could be citrate. Attribution of 1600  $\text{cm}^{-1}$  Raman shift at C-C aromatic stretching or C=O asymmetric stretching is in accordance with the observation of this shift in all SERS spectra and can then be attributed to EPI, citrate and chitosan. Finally, only 1280  $\text{cm}^{-1}$  was mostly attributed to EPI while a new Raman shift at 1240  $\text{cm}^{-1}$  appears that could be attributed to the same stretching mode of C-O for secondary alcohol in polymer and glucose (1240  $\text{cm}^{-1}$ ) or tertiary alcohol in EPI (1280  $\text{cm}^{-1}$ ). Observing relative spectral intensities highlighted different exaltation properties as a function of the media, with an intense enhancement of citrate intensities in NaCl 0.9 % and an increase intensity of glucose Raman shift in G5.

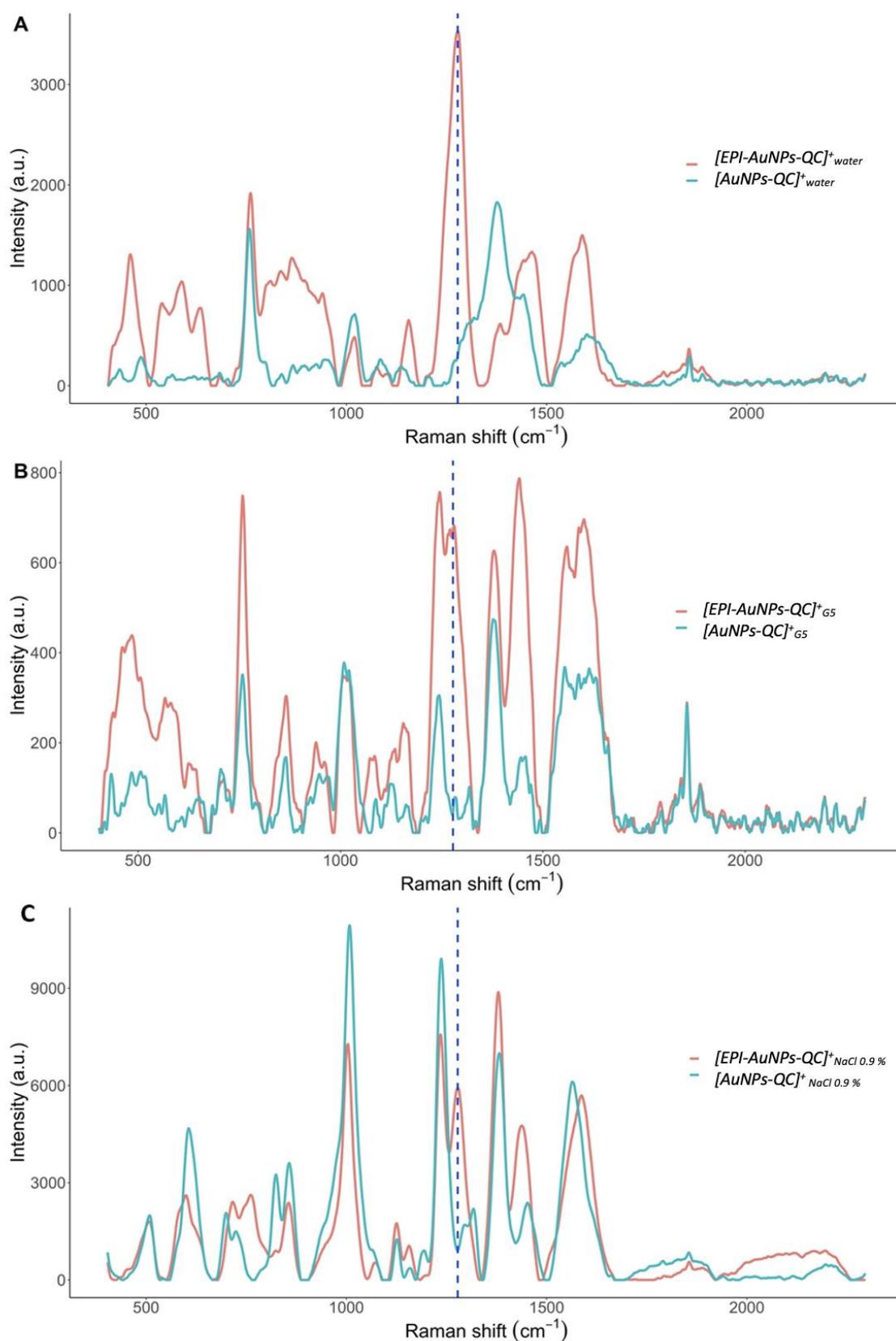


Fig. 20 Pretreated SERS spectra of epinephrine at  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in three media (A) in water, (B) in glucose, and (C) in sodium chloride 0.9%. (smoothing: Savitzky-Golay, baseline correction: asymmetric least square).

Table 3 Chemical and molecule attributions of Raman shift for polymer, citrate, glucose and 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  epinephrine with their relative intensities (RI).

<b>Raman shift (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>RI Ultrapure water</b>	<b>RI G5</b>	<b>RI NaCl 0,9%</b>	<b>Chemical attribution [50,51]</b>	<b>Molecule attribution</b>
<b>760</b>	0.54	0.94	0.29	Ring breathing mode	Polymer, glucose, epinephrine
<b>1000</b>	0.10	0.38	0.79	C-COO stretching	Citrate
<b>1240</b>	0.39	0.93	0.78	CO stretching	Glucose, polymer, epinephrine, citrate (alcohol II)
<b>1280</b>	<b>1.00</b>	0.86	0.67	CO stretching	Epinephrine (alcohol III)
<b>1380</b>	0.16	0.79	<b>1.00</b>	COO stretching	Citrate, polymer
<b>1440</b>	0.35	<b>1.00</b>	0.53	CH stretching	Epinephrine, polymer, glucose
<b>1600</b>	0.38	0.88	0.56	CC aromatic stretching or CO asymmetric stretching	Epinephrine, citrate, chitosan

Despite the larger aggregate size observed in NaCl 0.9%, the stability of the SERS signal of EPI in NaCl 0.9 % were globally stable comparable to these observed in water or G5 over the 120 min of the analyses. (Figure S6). Regarding results, the aggregation process proposed in this study allows the detection of EPI in the two typical infusion media investigated with a signal comparable or even superior to that obtained in milliQ water probably due to the formation of larger fractal aggregates which may increase the concentration of hot spot in the medium.

## **CONCLUSION**

We proposed an electrostatic self-assembly process to reproducibly form small, stable aggregates of gold particles (AuNPs), epinephrine and quaternized chitosan. This simple and inexpensive method allowed us to prepare the aggregate suspensions and perform the measurements in less than 5 min.

Using this technique and applying a rational approach by Box-Behnken design of experiments to fixed optimal parameters allows the detection of a SERS signal characteristic of epinephrine down to a concentration of  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  before dilution with AuNPs (*i.e.*  $27.2 \text{ ng.mL}^{-1}$  or  $150 \text{ nM}$  after dilution) with a commercial device for portable SERS measurements. Our results show a linear correlation between intensity and logarithm of the concentration between 10 and  $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . This suggests a possible quantification with linear model after logarithmic transformation. Furthermore, a signal persists in more complex media practically used to prepare intravenous drugs. This represents a particularly interesting application that would allow direct analysis of drugs in their reconstitution or dilution media.

Author contributions (optional)

Conflicts of interest: There are no conflicts to declare

Acknowledgements (optional)

## REFERENCES

- [1] C. Bazin, B. Cassard, E. Caudron, P. Prognon, L. Havard, Comparative analysis of methods for real-time analytical control of chemotherapies preparations, *International Journal of Pharmaceutics*. 494 (2015) 329–336.
- [2] P. Bourget, A. Amin, A. Moriceau, B. Cassard, F. Vidal, R. Clement, The Raman Spectroscopy (RS): A new tool for the analytical quality control of injectable in health settings. Comparison of RS technique versus HPLC and UV/Vis-FTIR, applied to anthracyclines as anticancer drugs, *Pathologie-Biologie*. 60 (2012) 369–379.
- [3] J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R.A. Alvarez-Puebla, B. Auguie, J.J. Baumberg, G.C. Bazan, S.E.J. Bell, A. Boisen, A.G. Brolo, J. Choo, D. Cialla-May, V. Deckert, L. Fabris, K. Faulds, F.J. García de Abajo, R. Goodacre, D. Graham, A.J. Haes, C.L. Haynes, C. Huck, T. Itoh, M. Käll, J. Kneipp, N.A. Kotov, H. Kuang, E.C. Le Ru, H.K. Lee, J.-F. Li, X.Y. Ling, S.A. Maier, T. Mayerhöfer, M. Moskovits, K. Murakoshi, J.-M. Nam, S. Nie, Y. Ozaki, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, J. Popp, A. Pucci, S. Reich, B. Ren, G.C. Schatz, T. Shegai, S. Schlücker, L.-L. Tay, K.G. Thomas, Z.-Q. Tian, R.P. Van Duyne, T. Vo-Dinh, Y. Wang, K.A. Willets, C. Xu, H. Xu, Y. Xu, Y.S. Yamamoto, B. Zhao, L.M. Liz-Marzán, Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering, *ACS Nano*. (2019). <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224>.
- [4] A. Amin, P. Bourget, F. Vidal, F. Ader, Routine application of Raman spectroscopy in the quality control of hospital compounded ganciclovir, *International Journal of Pharmaceutics*. 474 (2014) 193–201.
- [5] L.M.M. Lê, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Discrimination and quantification of two isomeric antineoplastic drugs by rapid and non-invasive analytical control using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. 161 (2016) 320–324.
- [6] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, P. Prognon, E. Caudron, Discriminative and Quantitative Analysis of Antineoplastic Taxane Drugs Using a Handheld Raman Spectrometer, *BioMed Research International*. 2018 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/8746729>.
- [7] L.M.M. Le, B. Kégl, A. Gramfort, C. Marini, D. Nguyen, M. Cherti, S. Tfaili, A. Tfayli, A. Baillet-Guffroy, P. Prognon, P. Chaminade, E. Caudron, Optimization of classification and regression analysis of four monoclonal antibodies from Raman spectra using collaborative machine learning approach, *Talanta*. 184 (2018) 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.109>.
- [8] J. Wang, K.M. Koo, Y. Wang, M. Trau, Engineering State-of-the-Art Plasmonic

Nanomaterials for SERS-Based Clinical Liquid Biopsy Applications, *Advanced Science*. 6 (2019) 1900730. <https://doi.org/10.1002/adv.201900730>.

[9] M. Zhao, D. Mi, B.E. Ferdows, Y. Li, R. Wang, J. Li, D. Patel, N. Kong, S. Shi, W. Tao, State-of-the-art nanotechnologies for the detection, recovery, analysis and elimination of liquid biopsy components in cancer, *Nano Today*. 42 (2022) 101361. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101361>.

[10] A. Jaworska, S. Fornasaro, V. Sergo, A. Bonifacio, Potential of surface enhanced raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review, *Biosensors*. 6 (2016) 47.

[11] S. Fornasaro, A. Bonifacio, E. Marangon, M. Buzzo, G. Toffoli, T. Rindzevicius, M.S. Schmidt, V. Sergo, Label-Free Quantification of Anticancer Drug Imatinib in Human Plasma with Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12670–12677. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02901>.

[12] S. Fornasaro, S.D. Marta, M. Rabusin, A. Bonifacio, V. Sergo, Toward SERS-based point-of-care approaches for therapeutic drug monitoring: the case of methotrexate, *Faraday Discuss.* 187 (2016) 485–499. <https://doi.org/10.1039/C5FD00173K>.

[13] S.S. Panikar, G. Ramírez-García, S. Sidhik, T. Lopez-Luke, C. Rodriguez-Gonzalez, I.H. Ciapara, P.S. Castillo, T. Camacho-Villegas, E. De la Rosa, Ultrasensitive SERS Substrate for Label-Free Therapeutic-Drug Monitoring of Paclitaxel and Cyclophosphamide in Blood Serum, *Anal. Chem.* 91 (2019) 2100–2111. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04523>.

[14] E.C. Le Ru, M. Meyer, E. Blackie, P.G. Etchegoin, Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot, *Journal of Raman Spectroscopy*. 39 (2008) 1127–1134. <https://doi.org/10.1002/jrs.1945>.

[15] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1667–1670. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>.

[16] D.L. Andrews, *Encyclopedia of applied spectroscopy*, Wiley-VCH Weinheim, Germany, 2009.

[17] R. Weissleder, A clearer vision for in vivo imaging, *Nat Biotechnol.* 19 (2001) 316–317. <https://doi.org/10.1038/86684>.

[18] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters*. 26 (1974) 163–166.

[19] A. Dowek, L.M.M. Lê, T. Rohmer, F.-X. Legrand, H. Remita, I. Lampre, A. Tfayli, M. Lavielle, E. Caudron, A mathematical approach to deal with nanoparticle polydispersity

in surface enhanced Raman spectroscopy to quantify antineoplastic agents, *Talanta*. 217 (2020) 121040. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121040>.

[20] S.E.J. Bell, N.M.S. Sirimuthu, Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1012–1024. <https://doi.org/10.1039/B705965P>.

[21] S.S. Masango, R.A. Hackler, N. Large, A.-I. Henry, M.O. McAnally, G.C. Schatz, P.C. Stair, R.P. Van Duyne, High-Resolution Distance Dependence Study of Surface-Enhanced Raman Scattering Enabled by Atomic Layer Deposition, *Nano Lett.* 16 (2016) 4251–4259. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b01276>.

[22] M.Y. Chan, W. Leng, P.J. Vikesland, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Characterization of Salt-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles, *ChemPhysChem*. 19 (2018) 24–28. <https://doi.org/10.1002/cphc.201700798>.

[23] S. Mabbott, E. Correa, D.P. Cowcher, J.W. Allwood, R. Goodacre, Optimization of parameters for the quantitative surface-enhanced raman scattering detection of mephedrone using a fractional factorial design and a portable Raman spectrometer, *Analytical Chemistry*. 85 (2012) 923–931.

[24] M. Berge, A. Dowek, P. Prognon, F.-X. Legrand, A. Tfayli, L. Minh Mai Lê, E. Caudron, Optimization of experimental conditions by surface enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy with gold nanoparticles suspensions, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* (2021) 120628. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120628>.

[25] A. Dowek, M. Berge, P. Prognon, F.-X. Legrand, E. Larquet, A. Tfayli, L.M.M. Lê, E. Caudron, Discriminative and quantitative analysis of norepinephrine and epinephrine by surface-enhanced Raman spectroscopy with gold nanoparticle suspensions, *Anal Bioanal Chem.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03743-4>.

[26] K. Faulds, R.E. Littleford, D. Graham, G. Dent, W.E. Smith, Comparison of Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Unaggregated and Aggregated Nanoparticles, *Anal. Chem.* 76 (2004) 592–598. <https://doi.org/10.1021/ac035053o>.

[27] L. Guerrini, D. Graham, Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7085–7107. <https://doi.org/10.1039/C2CS35118H>.

[28] S.L. Kleinman, R.R. Frontiera, A.-I. Henry, J.A. Dieringer, R.P. Van Duyne, Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 21–36. <https://doi.org/10.1039/C2CP42598J>.

[29] S. Mabbott, O. Alharbi, K. Groves, R. Goodacre, Application of surface enhanced Raman scattering to the solution based detection of a popular legal high, 5,6-methylenedioxy-2-aminoindane (MDAI), *Analyst*. 140 (2015) 4399–4406.

<https://doi.org/10.1039/C5AN00591D>.

[30] M. Meyer, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Self-Limiting Aggregation Leads to Long-Lived Metastable Clusters in Colloidal Solutions, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 6040–6047. <https://doi.org/10.1021/jp055866b>.

[31] F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, A.E. Shanahan, H.J. Byrne, Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape, *Anal. Methods.* 6 (2014) 9116–9123. <https://doi.org/10.1039/C4AY02112F>.

[32] C. Zhang, X. Liang, T. You, N. Yang, Y. Gao, P. Yin, An ultrasensitive “turn-off” SERS sensor for quantitatively detecting heparin based on 4-mercaptobenzoic acid functionalized gold nanoparticles, *Analytical Methods.* 9 (2017) 2517–2522. <https://doi.org/10.1039/C7AY00494J>.

[33] S. Fornasaro, F. Alsamad, M. Baia, L.A.E. Batista de Carvalho, C. Beleites, H.J. Byrne, A. Chiadò, M. Chis, M. Chisanga, A. Daniel, J. Dybas, G. Eppe, G. Falgayrac, K. Faulds, H. Gebavi, F. Giorgis, R. Goodacre, D. Graham, P. La Manna, S. Laing, L. Litti, F.M. Lyng, K. Malek, C. Malherbe, M.P.M. Marques, M. Meneghetti, E. Mitri, V. Mohaček-Grošev, C. Morasso, H. Muhamadali, P. Musto, C. Novara, M. Pannico, G. Penel, O. Piot, T. Rindzevicius, E.A. Rusu, M.S. Schmidt, V. Sergio, G.D. Sockalingum, V. Untereiner, R. Vanna, E. Wiercigroch, A. Bonifacio, Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Quantitative Analysis: Results of a Large-Scale European Multi-Instrument Interlaboratory Study, *Anal. Chem.* 92 (2020) 4053–4064. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05658>.

[34] E. Vander Ende, M.R. Bourgeois, A.-I. Henry, J.L. Chávez, R. Krabacher, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Physicochemical Trapping of Neurotransmitters in Polymer-Mediated Gold Nanoparticle Aggregates for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 91 (2019) 9554–9562. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00773>.

[35] G.E.P. Box, D.W. Behnken, Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables, *Technometrics.* 2 (1960) 455–475. <https://doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>.

[36] N.G. Bastús, J. Comenge, V. Puntès, Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening, *Langmuir.* 27 (2011) 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>.

[37] E. Loubaki, M. Ourevitch, S. Sicsic, Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride. characterization of modified chitosan by <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, *European Polymer Journal.* 27 (1991) 311–317. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(91\)90111-Z](https://doi.org/10.1016/0014-3057(91)90111-Z).

[38] S.W. Provencher, CONTIN: A general purpose constrained regularization

program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Computer Physics Communications*. 27 (1982) 229–242. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(82\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90174-6).

[39] Abraham. Savitzky, M.J.E. Golay, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures., *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.

[40] P.H.C. Eilers, H.F.M. Boelens, Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing, (n.d.) 24.

[41] K.H. Liland, T. Almøy, B.-H. Mevik, Optimal Choice of Baseline Correction for Multivariate Calibration of Spectra, *Appl Spectrosc.* 64 (2010) 1007–1016. <https://doi.org/10.1366/000370210792434350>.

[42] B.-H. Mevik, Introduction to the pls Package, (n.d.) 24.

[43] R.V. Lenth, Response-Surface Methods in R, Using rsm, *Journal of Statistical Software*. 32 (2010) 1–17. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>.

[44] H. Wickham, Elegant graphics for data analysis, *Media*. 35 (2009) 10–1007.

[45] A. Czyrski, J. Sznura, The application of Box-Behnken-Design in the optimization of HPLC separation of fluoroquinolones, *Sci Rep.* 9 (2019) 19458. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55761-z>.

[46] A.S. Moody, T.D. Payne, B.A. Barth, B. Sharma, Surface-enhanced spatially-offset Raman spectroscopy (SESORS) for detection of neurochemicals through the skull at physiologically relevant concentrations, *Analyst*. 145 (2020) 1885–1893. <https://doi.org/10.1039/C9AN01708A>.

[47] A.S. Moody, B. Sharma, Multi-metal, Multi-wavelength Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Neurotransmitters, *ACS Chem. Neurosci.* 9 (2018) 1380–1387. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00020>.

[48] V. Turzhitsky, L. Zhang, G.L. Horowitz, E. Vitkin, U. Khan, Y. Zakharov, L. Qiu, I. Itzkan, L.T. Perelman, Picoanalysis of Drugs in Biofluids with Quantitative Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Small*. 14 (2018) 1802392. <https://doi.org/10.1002/smll.201802392>.

[49] P. Meakin, Formation of Fractal Clusters and Networks by Irreversible Diffusion-Limited Aggregation, *Phys. Rev. Lett.* 51 (1983) 1119–1122. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.51.1119>.

[50] J.-W. Park, J.S. Shumaker-Parry, Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 1907–1921. <https://doi.org/10.1021/ja4097384>.

[51] C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance Raman scattering, *Langmuir*. 11 (1995) 3712–3720.

[52] A.S. Moody, P.C. Baghernejad, K.R. Webb, B. Sharma, Surface Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy Detection of Neurochemicals Through the Skull, *Anal. Chem.* 89 (2017) 5688–5692. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00985>.

[53] N.Soo. Lee, Y.Zung. Hsieh, R.F. Paisley, M.D. Morris, Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds, *Anal. Chem.* 60 (1988) 442–446. <https://doi.org/10.1021/ac00156a014>.

## Supplementary material

*Self-assembly of gold nanoparticles by quaternized chitosan in solution to improve surface enhanced Raman spectroscopy sensing of epinephrine*

Antoine Dowek<sup>1,2</sup> and Florent Voisin<sup>3</sup> (equal contribution), Laetitia Le<sup>1,2</sup>, Céline Tan<sup>1</sup>, JM Mallet<sup>4</sup>, Florent Carn<sup>3\*</sup>, Eric Caudron<sup>1,2\*</sup>

## GOLD NANOPARTICLES SYNTHESIS

Citrate-stabilized gold nanoparticles were first synthesized in aqueous medium by seeded growth process. The nanoparticles, noted AuNPs have a final concentration of  $5.8 \times 10^{10}$  NP.mL<sup>-1</sup>. DLS measurements revealed a single population of NPs with  $R_H(\text{AuNPs}) = 29.5$  nm (Figure S1a). As expected, such nanoparticles dispersed at pH = 4.0 were negatively charged with an averaged electrophoretic mobility  $\mu = -2.927 \times 10^{-8}$  m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Figure S1b), that can be related to a  $\zeta$ -potential of  $-37.3$  mV according to the Debye–Hückel model. The as-obtained red dispersion displays a surface plasmon resonance (SPR) absorption band at 525 nm (Figure S1e). Accordingly, TEM observations (Figures S1c and S1d) revealed isotropic nanoparticles  $R = 28$  nm. Gold nanoparticles concentration was calculated with the following calculations:

We made the assumption that all the gold salt was reduced

- $[Au]_{Atoms} (atoms/L) = \left( \frac{0.025/0.002}{0.152} \right) * N_A$  with  $N_A$  Avogadro Number
- Gold unit cell volume is equal to  $V_{unit\ cell} 5.56 * 10^{-29} m^3$  and was composed of four atoms
- So the number of gold atoms in one nanoparticle is equal to :  $N_{atoms/NP} = \left( \frac{V_{NP}}{V_{unit\ cell}} \right) * 4$  with  $V_{NP}$  the volume of a nanoparticle measured by TEM
- Gold nanoparticles concentration is equal to :  $[NP](NPs/L) = \frac{[Au]_{Atoms}}{N_{atoms/NP}}$

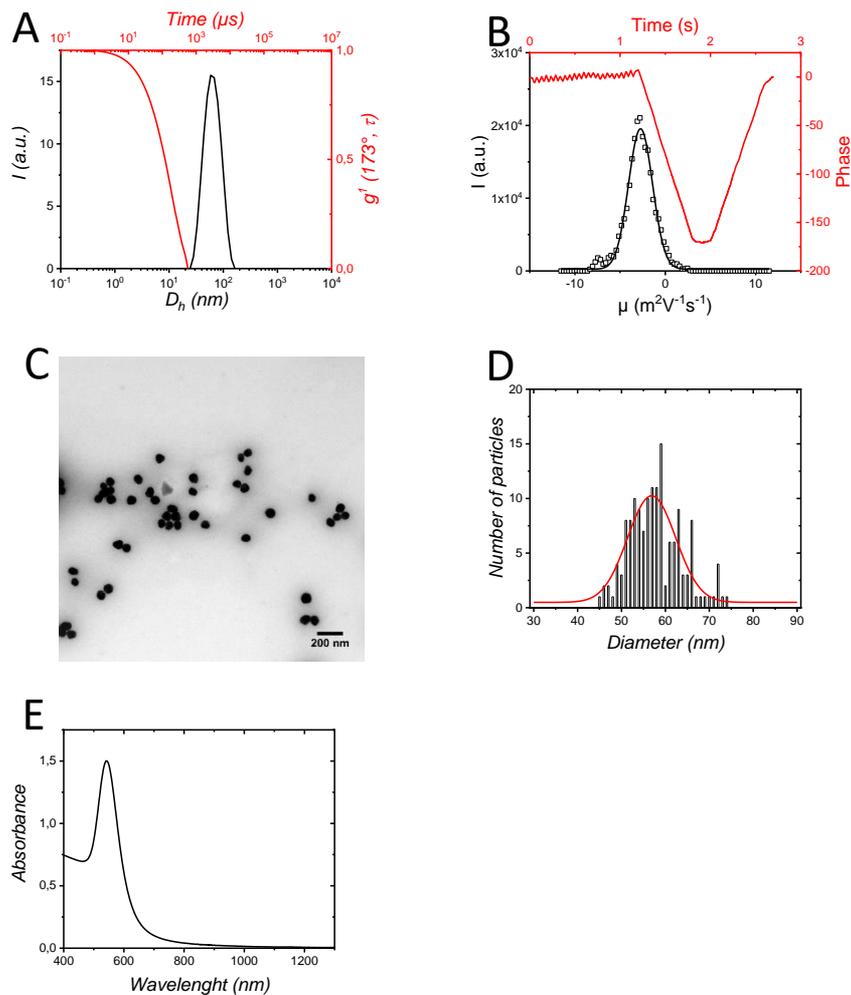


Figure S1. Optical and structural characterizations of citrate coated AuNPs. (a) Scattered electric field autocorrelation function  $g^{(1)}(173^\circ, t)$  and corresponding normalized distributions of the scattered intensity as a function of size by applying the Contin method to our data. (b) Time evolution of the phase for electric field oscillating at 20 Hz and 0.2 Hz. Corresponding electrophoretic mobility (mV). (c) TEM images (scale bar 100 nm). (d) corresponding histogram of size distribution. (e) UV-Vis. spectra.

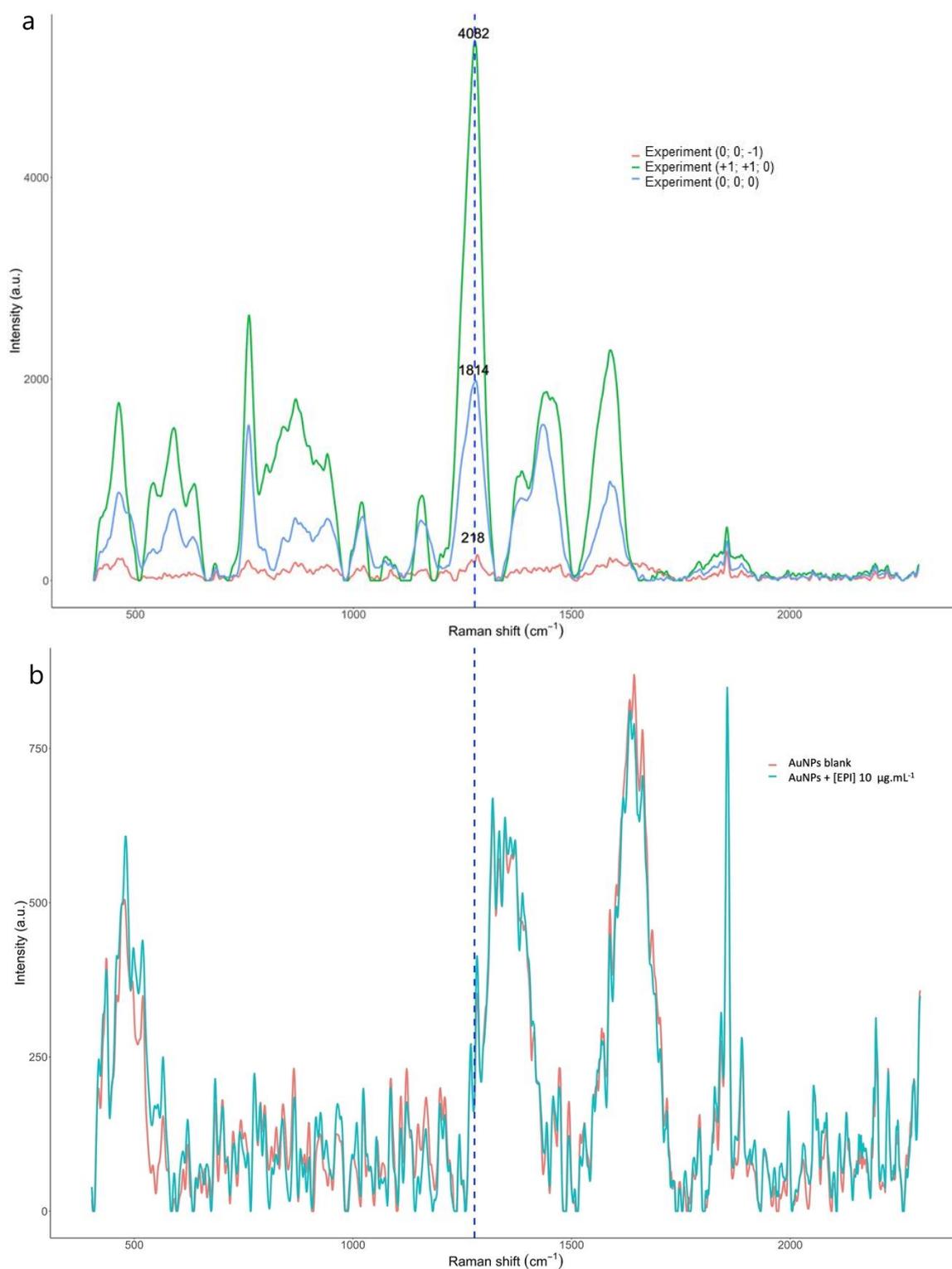


Figure S2. Representation of pretreated SERS spectra of (a) Box Behnken design immediately after quenching ( $t = 0$  s) for the minimal intensity (experiment 0; 0; -1), the maximal intensity (experiment +1; +1; 0) measured at  $1280\text{ cm}^{-1}$  (vertical dash line) and the mean spectra for the center of the DoE (experiment 0; 0; 0); (b) citrate coated gold nanoparticles (AuNPs) and AuNPs with epinephrine at  $10\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  without adding quaternized chitosan.

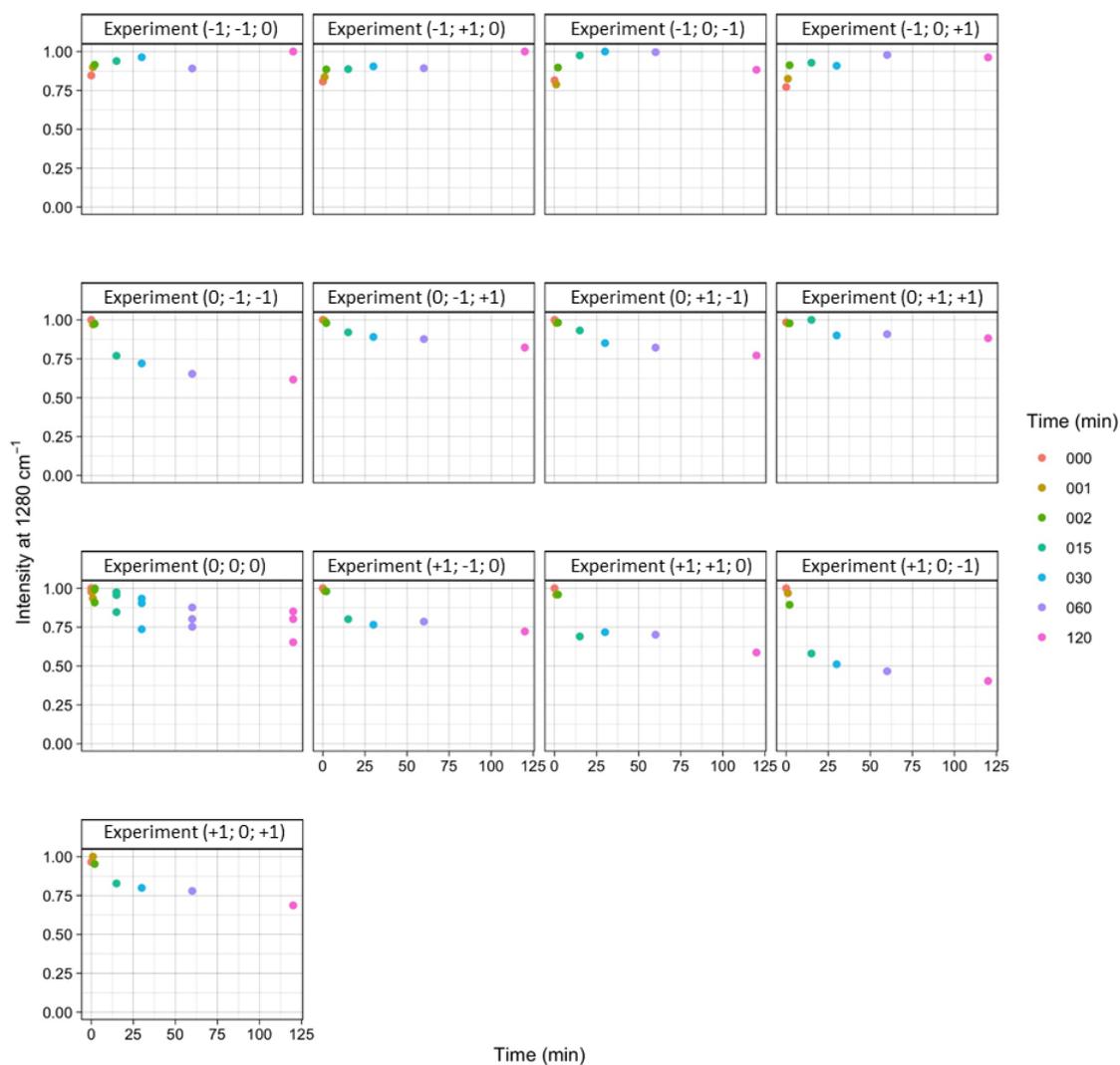


Figure S3. Evolution of signal intensity at  $1283\text{ cm}^{-1}$ , for optimum all experiments of Box Behnken design (legend: size of AuNPs in nm, epinephrine concentration in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , volume of epinephrine in  $\mu\text{L}$ ).

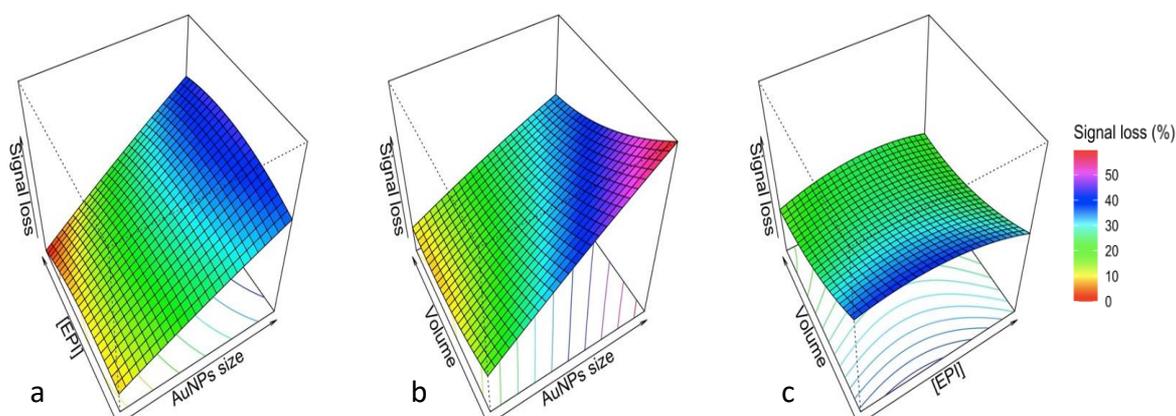


Figure S4. Surface response of Box-Behnken design with signal loss at 120 min as response (AuNPs size: size of nanoparticles, [EPI]: concentrations of epinephrine, Volume: volume of epinephrine added).

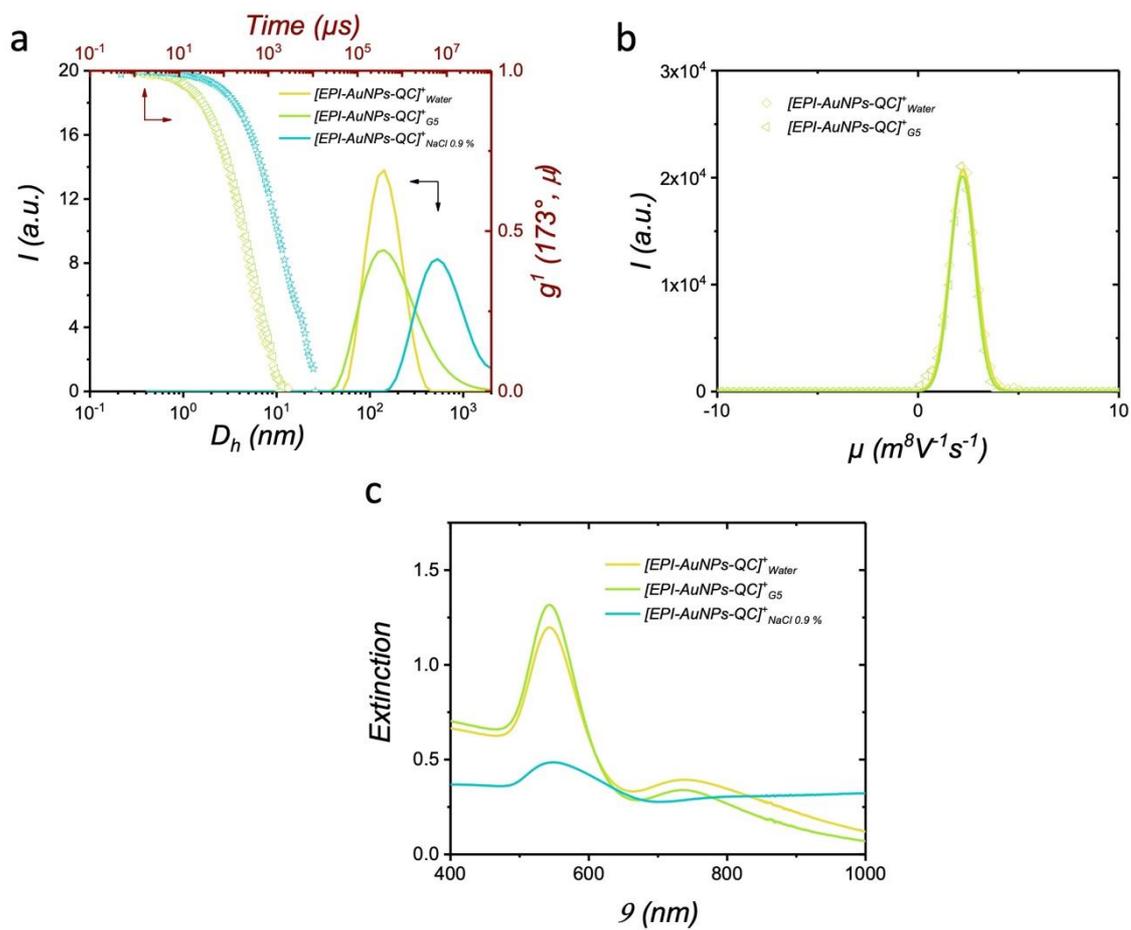


Figure S5. Characterizations of [EPI-AuNPs-QC]<sup>+</sup> in milliQ water (water), sodium chloride at 0.9 % (NaCl 0.9 %) and glucose 5 % (G5) with [AuNPs]<sub>54nm</sub> =  $5.9 \times 10^{10}$  NP.mL<sup>-1</sup>, [EPI] = 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, and [QC] = 0.5 g.L<sup>-1</sup>. (a) Normalized autocorrelation function  $g^{(1)}$  (173°, t) and corresponding distributions of the hydrodynamic diameters. (b) Distribution of zeta potentials by laser Doppler velocimetry. (c) UV-Vis-NIR spectra.

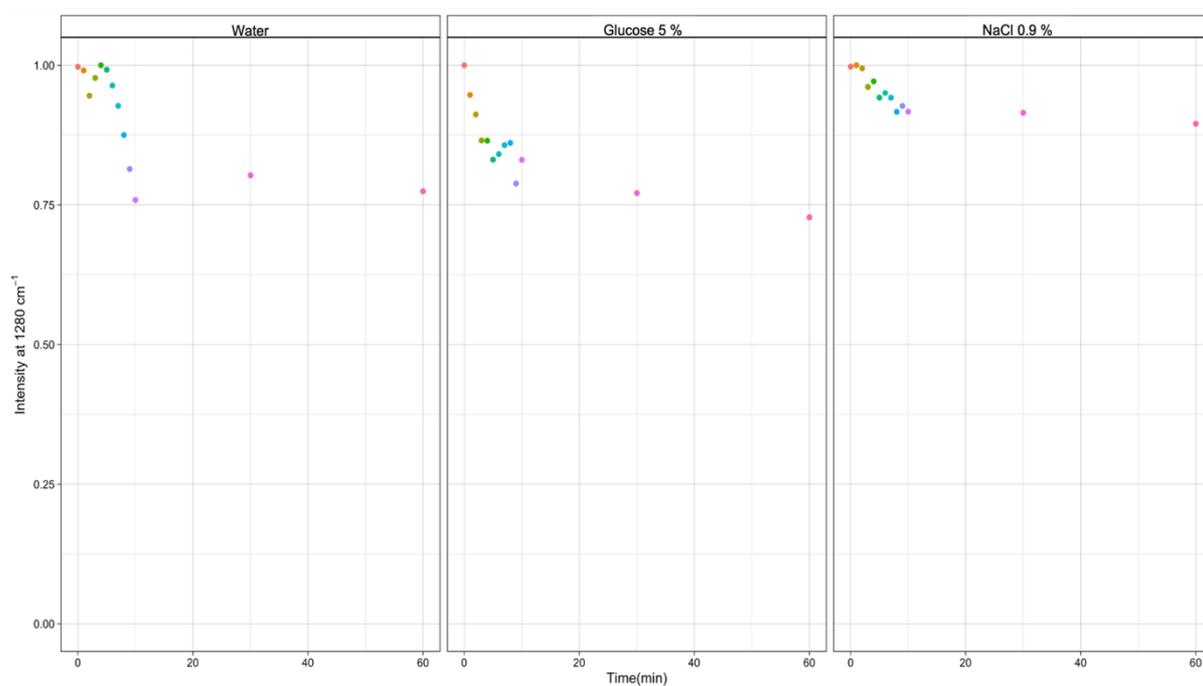


Figure S6. Evolution of signal intensity at 1283 cm<sup>-1</sup>, for optimum conditions in different matrices: water, glucose 5 %, sodium chloride 0.9 % (NaCl 0.9 %).

Dans un premier temps, des AuNPs de tailles croissantes de 26, 40 et 54 nm ont pu être synthétisées par la méthode de Bastus [99]. Ces synthèses ont ensuite été utilisées pour réaliser nos expériences afin d'objectiver l'impact de la taille des AuNPs sur l'exaltation de l'intensité du signal Raman. L'originalité de ce travail résidait dans l'agrégation d'AuNPs médiée par un biopolymère de chitosan en deux étapes, une étape d'agrégation et une étape de stabilisation. La caractérisation du système à chacune des étapes : AuNPs en suspension sans polymère, AuNPs en présence du biopolymère de chitosan en quantité neutralisante et AuNPs en présence du chitosan en excès, avec ou sans adrénaline a permis de mettre en évidence dans l'eau : la neutralisation complète des charges en surface des AuNPs avec un potentiel zéta égal à 0 puis une stabilisation du système en présence de chitosan ajouté en excès. La présence de l'adrénaline n'influe pas sur la charge mesurée. Le diamètre mesuré en DLS a montré une augmentation de la taille des agrégats jusqu'à une taille de l'ordre de 100 nm correspondant à la formation d'un dimère (soit environ deux NPs de 54 nm). De la même façon un déplacement de l'absorbance a été caractérisé à l'UV-vis avec l'apparition d'une nouvelle bande plasmon vers 750 nm, correspondante à la taille des nouveaux agrégats formés. Ces résultats sont en accord avec ceux attendus et permettent de confirmer le mécanisme d'agrégation d'AuNPs médiée par le chitosan en présence d'adrénaline.

Les conditions optimales pour obtenir l'intensité Raman la plus grande ont été déterminées dans l'eau, à partir du résultat du plan de Box-Behnken pour les AuNPs les plus grandes à 54 nm, la concentration d'adrénaline la plus élevée à  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  et le volume d'adrénaline le plus important à 1500  $\mu\text{L}$ . Le suivi de l'intensité du signal SERS au cours du temps a également été réalisé pendant 120 min pour chaque niveau d'expériences. Pour l'ensemble des expériences, l'évolution du signal avait essentiellement lieu dans les premières minutes de l'analyse (jusqu'à 30 min) avant une relative stabilité du signal pour les temps plus longs. Deux profils d'évolution ont été décrits : une augmentation du signal durant les premières minutes avant stabilisation du signal pour les AuNPs de plus petites tailles (26 nm) et une diminution du signal dans les premières minutes avant stabilisation avec une diminution du signal comprise entre 20 et 60 % à 120 min et semblait dépendante de la taille des AuNPs (40 ou 54 nm). Le même plan d'expériences a alors été analysé en changeant le paramètre de réponse de l'intensité du signal à  $1280 \text{ cm}^{-1}$  au pourcentage de diminution de l'intensité du signal à  $1280 \text{ cm}^{-1}$  pour objectiver l'effet des facteurs étudiés sur la diminution du signal. En concordance avec l'analyse des profils cinétiques, le seul facteur ayant un effet significatif était la taille des AuNPs avec un effet positif sur la perte de signal, suggérant un début de sédimentation. Néanmoins, au regard des profils rencontrés dans nos précédentes expériences dans lesquelles les NPs ont été agrégées par modification du pH, le signal était considéré comme stable et exploitable à tous les temps de l'analyse avec des données complémentaires à 24 h montrant un signal toujours exploitable (figure 32).

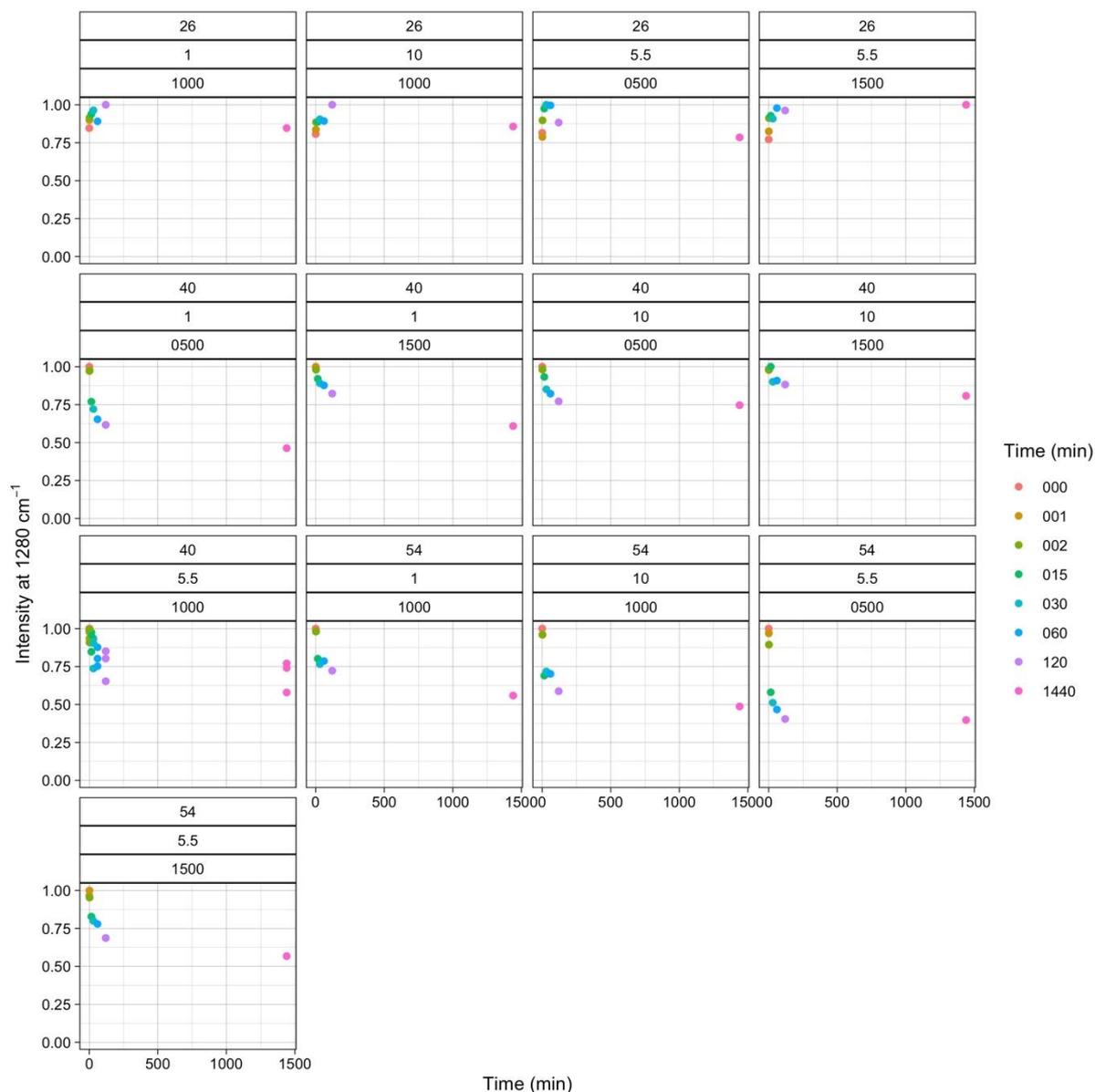


Figure 32 : Evolution de l'intensité du signal à  $1280\text{ cm}^{-1}$  jusqu'à 1440 min (24 h) pour chacun des niveaux du plan d'expériences: 1<sup>er</sup> encadré taille des NPs en nm, 2<sup>ème</sup> encadré concentration en adrénaline en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 3<sup>ème</sup> encadré volume d'adrénaline en  $\mu\text{L}$ .

La caractérisation des agrégats générés pour chaque niveau du plan d'expériences serait aussi intéressante, ce qui permettrait par exemple de déterminer si la structure des agrégats est dépendante de la taille des AuNPs dans nos conditions expérimentales. De plus, une caractérisation dynamique, au cours du temps des agrégats permettrait d'essayer de comprendre les mécanismes de diminution du signal au cours du temps notamment caractériser pour les AuNPs de 54 nm et qui pourrait s'expliquer par une sédimentation lente des agrégats.

A partir des conditions optimales déterminées pour  $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ , nous avons progressivement diminué la concentration jusqu'à  $0,1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ , concentration pour laquelle le signal de l'adrénaline était toujours détectable. Les mesures des

concentrations d'adrénaline comprises de 0,1 à 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nous ont permis d'estimer la faisabilité de la quantification de l'adrénaline dans cette gamme de concentrations. En utilisant une méthodologie proche de celle développée dans notre article sur l'élaboration de modèle quantitatif pour l'adrénaline en SERS, nous avons linéarisé le signal par une transformation logarithmique pour proposer un modèle univarié linéaire classique en exploitant l'intensité du déplacement Raman à  $1280\text{ cm}^{-1}$ , avec des résultats encourageants et un coefficient  $R^2 = 0,998$ . Des études complémentaires devront bien sûr être réalisés pour confirmer ce résultat notamment afin de confirmer l'intérêt de l'agrégation médiée par le chitosan sur la qualité des modèles de prédiction de la concentration.

Enfin, l'analyse SERS de l'adrénaline dans les milieux plus complexes, NaCl 0,9 % et G5, a été réalisée à partir des conditions expérimentales optimales précédemment déterminées. L'analyse des agrégats dans les différents solvants a permis de mettre en évidence l'agrégation des AuNPs dans l'eau et le G5 sous forme de dimères d'une taille d'une centaine de nanomètres. Dans le NaCl 0,9 %, des agrégats de plus grande taille ont en revanche été caractérisés. Les résultats pour l'eau et le NaCl 0,9 % concordaient avec les résultats obtenus sur la mesure spectrale. Les intensités mesurées dans le NaCl 0,9 % étaient environ trois fois supérieures à l'intensité mesurée dans l'eau. Cela peut s'expliquer par la génération d'un nombre plus important de points chauds dans les agrégats de plus grande taille générés par le NaCl 0,9 %. En revanche pour l'étude du signal dans le G5, l'intensité du signal SERS de l'adrénaline était très diminuée sans que cela puisse s'expliquer par la caractérisation des agrégats qui étaient semblables à ceux observés dans l'eau tant en cryoMET que sur le plan de leur charge. Une perte de signal est donc bien mesurée, sans qu'il soit possible de la relier à un élément mesuré. Néanmoins, il y a très certainement une modification de l'interaction de l'analyte avec la nanoparticule. Des caractérisations de la distance intra particulaire entre deux AuNPs constitutifs d'un dimère pourrait permettre de caractériser de façon plus précise les agrégats dans l'eau, le NaCl 0,9 % et le G5 et pourrait apporter des éléments de réponse.

L'intérêt d'utiliser un polymère dans l'agrégation d'AuNPs a donc été démontré avec pour effet l'amélioration de la stabilité des agrégats dans le temps et ouvrant la possibilité d'analyse dans les milieux complexes. Des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer l'impact de l'agrégation médiée par le chitosan d'abord sur la variabilité du signal SERS et ensuite sur l'erreur de prédiction de la concentration en analyte, notamment en terme de dispersion des résultats.

Dans cet article, l'adrénaline a été détectée à une concentration de  $0,1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$  grâce à des AuNPs de taille 54 nm et une agrégation médiée par du chitosan. Le signal de l'adrénaline était toujours présent dans des solutions aqueuses de NaCl 0,9 % et de G5 dans les conditions optimales dans l'eau déterminées par un plan d'expériences de Box-Behnken. Le signal était toujours mesurable pour toutes les conditions du plan d'expériences 120 min après l'induction de l'agrégation, y compris dans les solvants

complexes. Enfin la caractérisation des agrégats à l'optimum et dans les différents milieux a permis une meilleure compréhension de l'agrégation et une corrélation entre la structure des agrégats et le signal observé en SERS.

## 5 Discussion et perspectives

---

Au travers de l'analyse en SERS de molécules d'intérêt thérapeutique, nos travaux ont souligné les difficultés d'analyse en SERS liées à la variabilité de l'exaltation du signal Raman. Le 5-fluorouracile, l'adrénaline et la noradrénaline ont ainsi été caractérisés en SERS avec deux objectifs : affirmer la SERS comme technique spécifique capable de discriminer des molécules de structure chimique très proche et de développer des modèles quantitatifs pour analyser des solutions d'analyte faiblement concentrées à partir de NPs issues de différents lots de synthèse. Si la variabilité de l'exaltation du signal en SERS a peu impacté les modèles discriminants, avec une discrimination de l'adrénaline et de la noradrénaline performante à tous les niveaux de concentrations étudiés, cette variabilité a fortement pénalisée les modèles quantitatifs développés pour ces trois molécules. Le véritable défi de ce travail résidait donc dans l'élaboration de modèles quantitatifs. Dans notre premier travail, l'hétérogénéité de taille et de forme des AgNPs produites entre nos différents lots s'est traduite par une variabilité importante de l'exaltation du signal Raman impactant les modèles de prédiction, avec des erreurs de prédiction de la concentration importantes malgré l'utilisation de techniques chimiométriques multivariées. Une approche mathématique permettant d'inclure la variabilité inter-lot a notamment permis de réduire les erreurs de prédiction mettant en avant la faisabilité de la quantification du 5FU sur une gamme de concentrations de l'ordre du  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dans un second temps, nous avons cherché à synthétiser des NPs de taille et de forme plus homogènes afin de réduire cette source de variabilité et d'obtenir une exaltation du signal Raman plus reproductible. La synthèse d'AuNPs, de taille et forme contrôlées, couplée à l'optimisation expérimentale de facteurs impliqués dans l'agrégation des AuNPs a permis de réduire les erreurs de prédiction en utilisant des techniques de chimiométrie comme la régression PLS, incluant une étape de linéarisation par transformation logarithmique des données avec des modèles quantitatifs développés pour des concentrations d'adrénaline et de noradrénaline de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Enfin, dans l'objectif de contrôler la structure des agrégats et de les stabiliser dans le temps et dans différents milieux, un nouveau mode d'agrégation médié par un polymère de chitosan a été développé. Il a permis la détection de l'adrénaline jusqu'à une concentration de  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans l'eau et à la concentration de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans le NaCl 0,9 % et le G5 avec un signal stabilisé par comparaison aux agrégations médiées par un sel ou par la modification du pH de la suspension. Nous proposons, dans cette partie discuter des différentes stratégies et des différents résultats obtenus au cours de ces travaux, principalement sur les paramètres majeurs impactant le signal SERS : les caractéristiques des NPs sphériques synthétisées et l'interaction NPs / analyte induite par l'agrégation des suspensions. Nous évoquerons également les différentes perspectives à court terme pour tenter d'améliorer la performance des modèles quantitatifs à partir de NPs sphériques et les perspectives à plus long terme sur l'analyse des matrices complexes jusqu'aux matrices

biologiques.

## 5.1 OPTIMISATION PARAMETRES EXPERIMENTAUX

### 5.1.1 Les nanoparticules sphériques en suspension

La synthèse des NPs colloïdales repose sur la réduction d'un sel métallique. Si ces procédés possèdent peu d'étapes et paraissent simples, le nombre important de travaux dérivants des procédés de synthèse issus des travaux originaux de Turkevich [95] pour les AuNPs et Lee & Meisel [96] pour les AgNPs mettent en avant les multiples possibilités et la difficulté dans le choix des paramètres de départ comme le ratio quantité de sel métallique / quantité d'agent d'agrégation, la température et le temps de chauffage, l'ordre d'ajout des réactifs ainsi que la vitesse d'ajout de chacun.

Notre expérience à partir de nos différents travaux confirme que la synthèse à partir de sel d'or produit des NPs de plus faible dispersion en taille et forme en respectant un ratio molaire citrate / sel d'or supérieur à 3,5 [141], associé à l'ajout rapide du réducteur, un nettoyage rigoureux de la verrerie à l'eau régale et des paramètres expérimentaux standardisés et finement contrôlés (nous avons par exemple utilisé la même verrerie et les mêmes équipements pour les synthèses). Nous préconisons de travailler dans un laboratoire où l'environnement de l'air est contrôlé, ou sous hotte à flux laminaire pour limiter le nombre de particules en suspension.

Les techniques de caractérisation des AuNPs doivent toujours *a minima* mettre en œuvre les techniques de MET, spectroscopie UV-vis et DLS tant elles apportent des informations complémentaires :

- La MET permet une visualisation directe des NPs, mais uniquement sur une petite fraction de l'échantillon (quelques centaines de NPs) à partir de laquelle est mesurée la taille et la dispersion de la taille à partir de logiciels d'analyse d'images. Elle peut cependant présenter un biais d'échantillonnage.
- La spectroscopie UV-vis est une mesure indirecte de la taille des NPs à partir du  $\lambda_{\max}$  et de la résolution des équations de Mie [100]. La largeur à mi-hauteur au maximum d'absorbance (FWHM) est un reflet de la dispersion autour de la taille, plus elle est élevée, plus la population de NPs est hétérogène. L'approximation de la concentration en AuNPs est également possible à partir du spectre UV-Vis en utilisant les équations proposées par Haiss [101].
- La DLS est une mesure indirecte de la taille par la détermination du rayon hydrodynamique des NPs, pour des particules supposées sphériques. La dispersion autour de la taille est calculée par l'indice de polydispersité.
- Le potentiel zéta de la suspension, permet de caractériser l'état de charge des NPs et de définir ainsi la stabilité de celle-ci.

La spectroscopie UV-vis peut être considérée comme la technique la moins précise pour caractériser la taille des NPs et doit être interprétée avec la largeur à mi-hauteur.

Elle reste cependant particulièrement intéressante du fait de sa simplicité et rapidité de mise en œuvre, et elle permet par ailleurs, de caractériser la résonance du plasmon de surface localisé (LSPR) des NPs. Au vu des caractéristiques de chacune de ces techniques, des CV sur la taille calculée en DLS et en MET inférieurs à 10 %, avec pour la DLS un indice de polydispersité inférieur à 0,3, semblent être des critères raisonnables pour qualifier des NPs homogènes en taille et en forme. Au vu de nos résultats, une largeur à mi-hauteur (FWHM) inférieure à 150 nm en spectroscopie UV-visible semble concordant. La variabilité sur la taille entre différents lots de synthèse doit faible et devrait être caractérisée à partir de ces trois méthodes sur trois lots au minimum pour valider la qualité du procédé de synthèse entrepris. La mesure du potentiel zéta est également indispensable pour caractériser les charges globales des NPs et connaître ainsi la stabilité de la suspension ainsi que la capacité des NPs à interagir avec leur environnement. Tout au long de nos travaux, nous avons utilisé l'ensemble de ces techniques. Elles étaient concordantes dans tous les cas et nous ont permis de caractériser les NPs synthétisées.

Durant ce travail, nous avons également tenté d'augmenter la concentration en AuNPs dans la suspension par centrifugation et en augmentant les quantités d'or et de citrate à ratio molaire constant. La concentration par centrifugation nécessite la mise en œuvre de nombreuses étapes et transferts avec des risques d'introduire des impuretés dans la suspension. De plus, elle requiert de trouver une vitesse ou plutôt une accélération en cohérence avec la taille des NPs à isoler. Les risques d'introduire de nouvelles impuretés lors des différents transvasements, les difficultés à remettre en suspension les AuNPs à partir du culot et le risque d'augmenter la présence de gros agrégats sont autant d'éléments qui expliquent les difficultés de mise en place d'une telle méthode pour la concentration des NPs en suspension. Finalement cette technique a été abandonnée tant elle devient critique et consomme une quantité importante de la suspension de départ. Des techniques plus spécialisées comme le fractionnement par couplage flux-force, qui permettent une séparation de NPs par l'application d'une force séparative perpendiculairement au flux [165] (*Field Flow Fractionation*, FFF) pourraient être utilisées. Les techniques par FFF sont des techniques séparatives de même que les techniques chromatographiques. Elles sont cependant fondées sur des principes physiques et non sur une interaction chimique avec la phase stationnaire. La force appliquée peut être de différentes natures : thermique, électrique, sédimentaire, permettant ainsi leur séparation en fonction de leur taille. Cette technique pourrait en effet permettre de trier les NPs synthétisées en fonction de leur taille (figure 33) et de leur forme. Durant nos expériences, nous n'avons pas pu conclure dans notre tentative d'inclure la concentration en NPs comme facteur d'analyse. A n'en pas douter, ce facteur a un rôle important aussi bien sur l'agrégation de la suspension que sur la probabilité d'interaction entre l'analyte et les NPs, il serait donc particulièrement intéressant de mettre en avant ce paramètre dans de prochaines expérimentations.

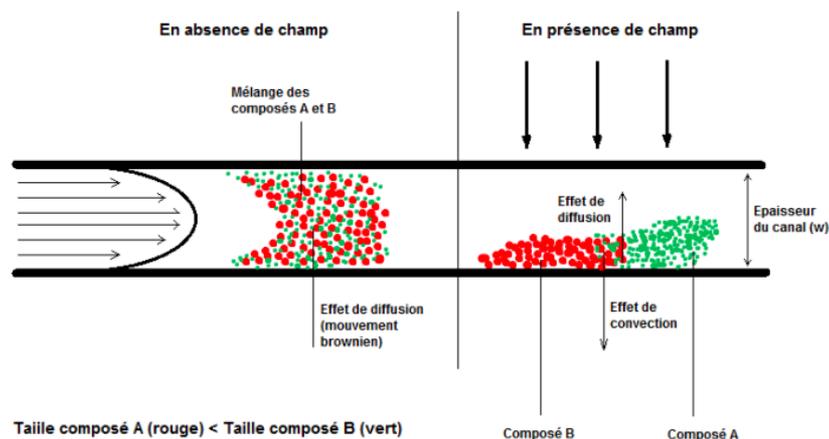


Figure 33 : Principe de séparation des nanoparticules en fonction de leur taille en fractionnement par couplage flux-force [166].

La concentration par augmentation des quantités de réactifs a bien produit des suspensions d'AuNPs de concentration plus importante mais corrélée à une diminution de la taille des NPs produites. Une des hypothèses serait le débit plus important en quantité de réducteur (utilisation d'une solution de citrate de concentration croissante afin de maintenir le volume final de la suspension constant) favorable à la production d'AuNPs de plus petite taille par la multiplication des germes lors de l'étape de nucléation. Dans cette même étude, l'importance du facteur taille des NPs a largement été mis en avant comparativement à la concentration des NPs dans la suspension, les efforts devraient donc davantage être orienté vers la production de NPs de tailles plus importantes. L'impact de la taille des AuNPs sur l'exaltation du signal est en effet majeur [150]. Njoki [167] a démontré la corrélation entre : mesure du  $\lambda_{\max}$ , valeur de la résonance plasmon et taille des AuNPs ainsi que leurs concordances avec les valeurs retrouvées par la théorie de Mie [100] pour des suspensions d'AuNPs synthétisées par de l' $\text{HAuCl}_4$  et de l'acrylate de sodium. Les AuNPs ainsi synthétisées étaient comprises entre 10 et 100 nm pour une évolution du  $\lambda_{\max}$  de 519 à 569 nm. L'impact de la taille des AuNPs sur le signal SERS a ensuite été évalué par l'ajout d'acide 4-mercaptopbenzoïque (MBA), molécule ayant une bonne affinité pour les AuNPs et une grande section efficace en Raman. Un signal est observé pour une concentration de MBA de 0,03 mM à partir des AuNPs de différentes tailles. L'intensité du signal SERS augmente avec la taille des AuNPs, lorsque le  $\lambda_{\max}$  se déplace vers 633 nm qui correspond à la longueur d'onde du laser utilisé.

Le rôle de la taille des NPs dans nos différents articles a également été mis en évidence et en particulier dans le dernier travail. En effet, nous avons synthétisé des AuNPs de taille croissante selon le procédé de Bastus [99], jusqu'à 54 nm afin d'objectiver l'impact de la taille sur l'exaltation du signal en SERS. La taille des AuNPs était le facteur le plus important sur l'exaltation du signal Raman de l'adrénaline avec une exaltation maximale obtenue pour les AuNPs de 54 nm. Les études suivantes

devront donc s'intéresser à la production de NPs homogènes en taille et en forme et de taille supérieure à 54 nm.

La plupart du temps, l'utilisation de NPs sphériques en suspension nécessite, pour induire une exaltation du signal, une étape d'agrégation. Cette étape cruciale dans l'expérimentation SERS avec ce type de NPs fut l'objet de notre second axe d'optimisation.

### 5.1.2 Agrégation des nanoparticules sphériques

Les travaux de Wark [155] ont permis de visualiser directement la génération de l'exaltation SERS du 3,5-dimethoxy-4-(6'-azobenzotriazolyl)phénol (ABT-DMOP) par l'agrégation d'AgNPs médiée par du  $MgSO_4$  grâce à une technique dynamique de mesure d'images SERS représentée dans la figure 34 mettant ainsi visuellement en évidence l'importance de l'agrégation pour la génération d'un signal SERS à partir d'une suspension d'NPs.

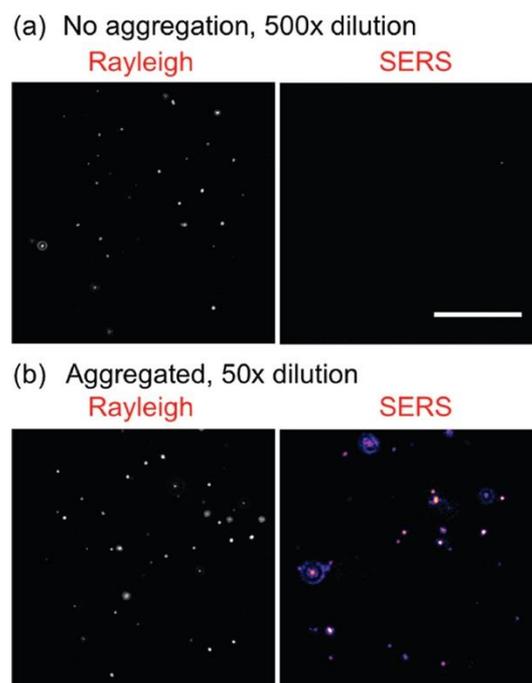


Figure 34 : Imagerie SERS et visualisation des points chauds [156]. (a) image Rayleigh et SERS d'ABT-DMOP à  $5 \times 10^{-7}$  M sans agrégation, la diffusion Rayleigh est bien observée, la SERS est non visible. (b) après ajout de  $MgSO_4$  comme agent d'agrégation, apparition de l'activité SERS.

Au cours de ce travail, différentes stratégies d'agrégation des NPs ont été entreprises :

- Une agrégation d'AgNPs par l'ajout d'une solution tampon de citrate de sodium à pH = 6,0 avec deux objectifs : protoner le 5FU pour qu'il puisse interagir avec les AgNPs et protoner le citrate en surface de NPs pour diminuer

la force de répulsion électrostatique générant ainsi l'agrégation.

- Une agrégation d'AuNPs par l'ajout d'une solution d'HCl (optimisation de la concentration ajoutée pour garder le volume constant). Sur le même principe que précédemment, l'agrégation est générée par diminution de la force de répulsion électrostatique entre les AuNPs.

- Une agrégation d'AuNPs médiée par un polymère. La quantité de polymère ajoutée pour générer l'agrégation est déterminée de telle façon à neutraliser en partie les charges en surface des AuNPs rendant ainsi leur charge globale nulle.

Dans la plupart de nos études, les paramètres expérimentaux ont été optimisés par la réalisation de plans d'expériences en suivant comme réponse l'intensité du signal Raman. Les facteurs étudiés avaient tous un effet sur l'agrégation, notamment la concentration en analyte. Cela a été objectivé dans notre étude sur la noradrénaline pour laquelle le changement de concentration étudiée a directement impacté les effets des facteurs étudiés avec des optima différents à chacun des niveaux de concentration. Si ces études permettent d'affirmer l'effet des facteurs sur l'intensité du signal Raman dans les conditions de l'expérience, elles n'en expliquent pas le mécanisme. Ainsi l'équipe de Bell [150] a cherché à caractériser l'effet de la taille des NPs et des agrégats sur l'amplification du signal. Ils ont ainsi étudié la relation entre la mesure de l'absorbance du plasmon d'AuNPs commerciales d'une taille de 20 à 150 nm (synthétisées par une variante du procédé de Frens [97]) agrégées par du  $\text{MgSO}_4$ . Les AuNPs seules et agrégées avec le  $\text{MgSO}_4$  ont été caractérisées par UV-vis. L'impact de la taille des AuNPs sur le signal Raman a été réalisé par la mesure du thiophénol à une concentration de  $1,66 \times 10^{-7}$  M qui permettait le recouvrement de la surface des AuNPs. Les auteurs ont cherché à relier la taille des AuNPs, la valeur du  $\lambda_{\text{max}}$  et la valeur de l'absorbance des agrégats à la longueur d'onde du laser (785 nm) à l'intensité de l'exaltation (figure 35). La comparaison a été effectuée en corrigeant la densité d'analyte présente à la surface des NPs, pour exprimer une intensité en fonction du nombre d'AuNPs en surface par mL de suspension, ce qui permettait de comparer des suspensions qui n'avaient pas la même concentration d'AuNPs au départ. Dans cette étude, a été mis en évidence l'importance de la taille des AuNPs de départ, toute chose mise à part, sur l'exaltation observée avec une exaltation maximale pour les AuNPs d'une taille de 74 nm, conformément à ce que nous avons également observé et qui a été décrit dans la partie précédente. En revanche, ils n'ont pas retrouvé de corrélation entre l'absorbance des agrégats à la longueur d'onde du laser et intensité Raman. Cette étude reste très informative car il s'agit de l'une des rares études qui tente de caractériser les agrégats et de les relier à l'intensité Raman exaltée. Toutefois, ces résultats doivent être pondérés car la caractérisation des agrégats s'est faite sur des suspensions en absence d'analyte or le thiophénol a une affinité importante pour les AuNPs par son groupement thiol. Il est possible que la présence du thiophénol modifie la structure des agrégats. De plus, l'intensité Raman a été pondérée pour obtenir une intensité en surface disponible d'AuNPs par mL de solution alors que pour la mesure de l'absorbance UV-vis aucune pondération n'a été réalisée bien que les concentrations

en AuNPs soient différentes. Cette pondération est d'ailleurs discutable car au-delà des possibilités de présence de l'analyte à la surface des AuNPs, le critère le plus important devrait être le nombre de molécules d'analyte au niveau des points chauds qui reste un paramètre particulièrement difficile à déterminer. Il reste donc raisonnable de conclure sur l'effet de la taille des AuNPs de départ dans l'exaltation de suspensions agrégées. Ce travail illustre l'importance de maîtriser et de caractériser l'agrégation.

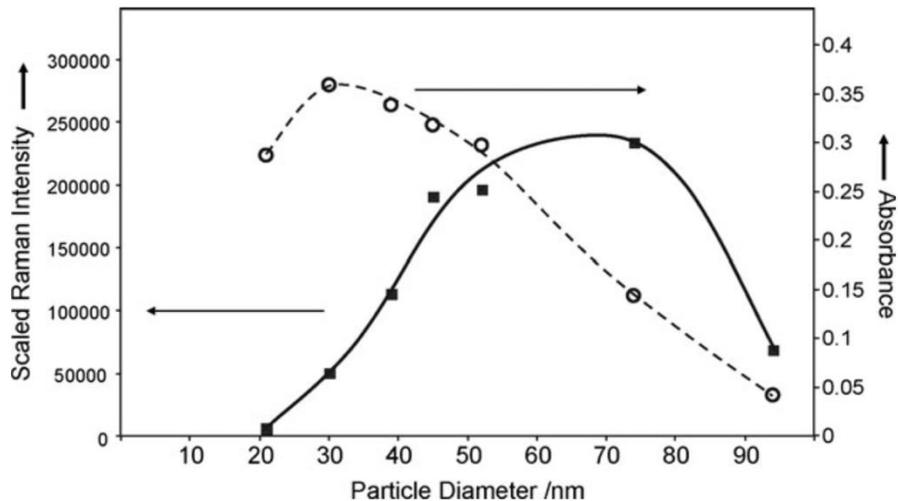


Figure 35 : Evolution de l'absorbance UV-vis à 785 nm des AuNPs agrégées (ligne en pointillés) et de l'intensité du signal SERS du tiophénol à  $1073 \text{ cm}^{-1}$  (ligne pleine) en fonction de la taille des AuNPs [150].

Certains auteurs ont étudié plus en détails les points chauds générés par des AuNPs sphériques. Cependant ces études ont toujours été réalisées dans des conditions très spécifiques souvent sur la base d'AuNPs agrégées sous forme de dimère ou trimère puis adsorbées sur un support [168] ou recouverte par une coquille protectrice [169,170], ce qui ne correspond pas aux situations concrètes de l'expérimentation SERS. Ces études apportent néanmoins une compréhension sur la capacité d'exaltation des points chauds, et elles convergent à démontrer que l'élément le plus important est la distance interparticulaire, plus que la taille de l'agrégat et sa correspondance avec l'absorbance du plasmon de surface des NPs. Wustholz [170] a ainsi démontré que le facteur d'exaltation pour l'analyte (2-(4-pyridyl)-2-cyano-1-(4-ethynylphenyl)ethylene, PCEPE) était peu impacté par la taille de l'agrégat (dimère à octamère) mais bien plus sensible à la distance entre deux AuNPs (figure 36).

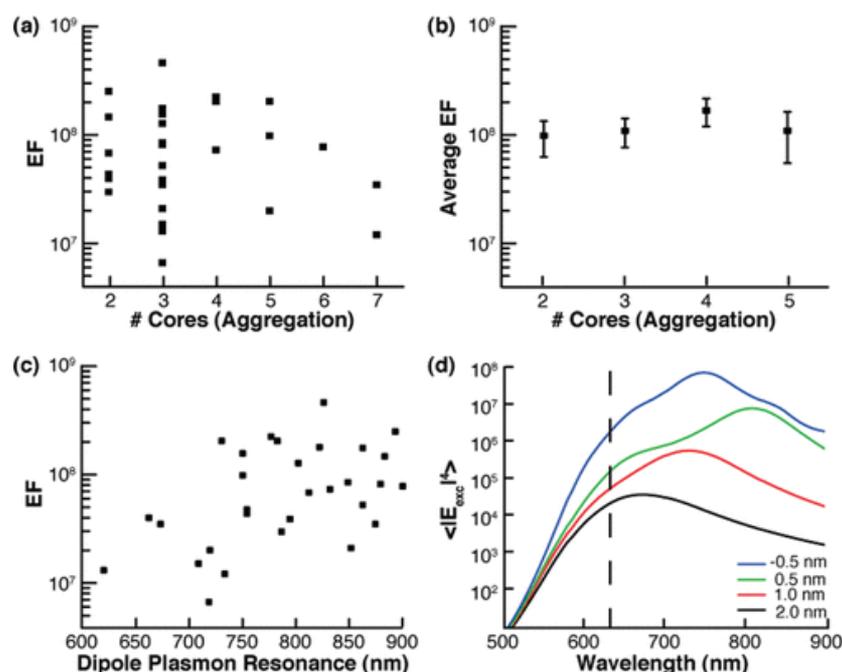


Figure 36 : Impact de l'agrégation et de la distance interparticulaire sur le facteur d'exaltation EF et l'intensité du champ moyen  $\langle |E_{exc}|^4 \rangle$  (n agrégats = 30). (a) EF en fonction du type d'agrégat. (b) EF moyen en fonction du type d'agrégat. (c) EF en fonction de la valeur de la résonance plasmon de l'agrégat. (d) Evolution du champ électrique ( $\langle |E_{exc}|^4 \rangle$ ) en fonction de la distance entre les particules pour un dimère (valeur calculée) [170].

Nos travaux n'étaient pas centrés sur la caractérisation des points chauds, mais de manière plus pragmatique sur la transposition de la SERS pour l'analyse quantitative. Nous nous sommes donc surtout intéressés à la mesure du signal SERS en présence d'analytes et à son suivi dans le temps qui reflète l'état d'agrégation du système (nombre de points chauds, taille des agrégats, nombre de molécules d'analyte au niveau des points chauds) à un instant donné. Tous les facteurs étudiés semblaient jouer un rôle sur l'agrégation : taille des NPs, nature de l'analyte, rapport des quantités NPs/analyte et bien sûr, nature et quantité de l'agent d'agrégation. Les profils cinétiques ainsi étudiés ont montré des variations plus ou moins importantes du signal au cours du temps, notamment dans le cas des agrégations médiées par l'acide chlorhydrique. Les agrégats n'ayant pas été caractérisés dans cette étude, il est difficile de conclure sur l'évolution de l'état d'agrégation au cours du temps. Dans notre travail sur l'agrégation médiée par le chitosan, les agrégats ont été caractérisés dans les conditions optimales de l'analyse, en présence d'analyte et dans différents milieux, par UV-vis, DLS et cryoTEM. Les agrégats ainsi générés étaient des dimères lorsque l'agrégation avait lieu dans l'eau ou le G5 et avait des caractéristiques similaires à l'UV-vis et en DLS ainsi que du point de vue de leur charge. Pourtant les spectres Raman étaient très différents en termes d'intensité d'exaltation, avec des intensités bien inférieures dans les expériences menées dans le G5 par rapport à l'eau. Une des hypothèses seraient donc une distance interparticulaire différente entre les deux conditions comme proposé par Wustholz [170]. Pour des dimères et un laser à 785 nm,

une faible variation de la distance interparticulaire semble avoir des conséquences importantes sur l'exaltation du champ électrique (figure 36). Les agrégats caractérisés dans le NaCl 0,9 % ont quant à eux montré des agrégats formés de taille supérieure générant davantage de points chauds et expliquant les intensités Raman mesurées plus importantes dans ces conditions.

Nous proposons donc pour les investigations futures, la caractérisation de la suspension agrégée de chaque expérience au moment de l'optimisation des conditions expérimentales, afin de pouvoir relier état d'agrégation du système et signal SERS mesuré. Développer des techniques capables de caractériser les distances interparticulaires dans les conditions pratiques de l'expérience SERS serait également particulièrement intéressant. De plus, les perspectives offertes par l'agrégation médiée par des polymères pourraient permettre le contrôle de motifs précis permettant une exaltation optimale et reproductible du signal. Si la synthèse de NPs sphériques de plus grande taille, couplée à l'optimisation de l'agrégation paraissent les deux axes majeurs pour le développement d'une exaltation optimale et reproductible, d'autres stratégies restent possibles. Ainsi l'utilisation de NPs de forme plus complexe pourrait avoir un pouvoir d'exaltation ne nécessitant pas de générer une agrégation. Un compromis est donc à trouver entre le pouvoir d'exaltation et la complexité de la forme. De plus, la question de l'interaction entre les NPs et l'analyte reste importante, et les conditions expérimentales devront être optimisées en vue de rendre possible cette interaction.

Dans cette partie, nous avons rappelé et explicité d'une part le rôle primordial de la taille des NPs sphériques dans l'exaltation du signal en SERS ainsi que différentes techniques de caractérisation pour définir des suspensions nanoparticulaires homogènes et d'autre part, l'importance de l'agrégation pour générer des points chauds. Cette agrégation doit faire l'objet d'une caractérisation dans les conditions de l'expérience. La transposition vers des matrices complexes comme les milieux biologiques nécessitera des agrégations peu dépendantes du milieu d'analyse ou des méthodes de reconnaissance spécifique entre les NPs et l'analyte. Dans le cas où une analyse ciblée, spécifique n'est pas envisageable, des techniques doivent être développées pour s'affranchir des perturbations liées aux différents constituants de la matrice, comme par exemple pour s'affranchir de l'effet « corona » des protéines dans le sang [108].

Au-delà de l'optimisation des facteurs expérimentaux principalement axée sur la structure des NPs en suspension, l'interaction NPs / analyte et la génération de points chauds par l'agrégation de la suspension, nous avons pu voir au cours de ces différents travaux l'importance de l'optimisation chimométrique ou mathématique des données spectrales.

## 5.2 OPTIMISATION MATHÉMATIQUES

L'un des objectifs de ce travail était de construire des modèles chimiométriques ou mathématiques capables de différencier deux molécules de structures très proches et de développer des modèles quantitatifs permettant la prédiction de la concentration à partir de spectres Raman exaltés. Les outils chimiométriques ou mathématiques restent indispensables dans le traitement des données spectrales, tant pour enlever le bruit de fond de mesure et sélectionner l'information spectrale pertinente que pour construire les modèles prédictifs. Pour l'ensemble de nos travaux deux prétraitements ont été appliqués pour conserver la structure des spectres initialement mesurés : un lissage par Savitzky-Golay [171] et une correction de la ligne de base par ALS [172]. La construction d'un modèle d'analyse discriminante basée sur la régression PLS (PLS-DA), qui est une approche chimiométrique classiquement utilisée en analyse spectrale a suffi pour discriminer l'adrénaline et la noradrénaline avec d'excellentes performances et un pourcentage de « bien classés » de 100 %. Pour développer des modèles quantitatifs performants, plusieurs stratégies adaptées aux données ont dû être développées. Ainsi des modèles uni ou multivariés, linéaires ou non linéaires ont été construits et comparés en fonction de la structure des données issues des spectres acquis en SERS. L'acquisition des jeux de données a nécessité un grand nombre de mesures à partir de différents lots de NPs, afin de construire des modèles incluant la variabilité liée à la synthèse des NPs. Cette approche multi-lots pour construire les modèles quantitatifs est à ce jour très peu décrite dans la littérature [113]. En revanche, certains auteurs proposent de tester l'impact de plusieurs lots sur la variabilité du signal à partir d'un seul niveau de concentration d'analyte. De même la majorité des quantifications proposées sont en réalité davantage des études semi-quantitatives dans lesquelles les limites de quantification sont extrapolées à partir du rapport signal sur bruit. Nous revenons ici sur les différentes stratégies mathématiques développées dans nos différents travaux et sur leurs conclusions.

Notre première étude s'intéressait à l'analyse quantitative du 5FU en SERS. Ainsi dans ce travail, la différence des AgNPs entre les différents lots a introduit une variabilité dans l'intensité des spectres Raman exaltés. Des essais préliminaires ont été réalisés par analyse univariée, en reliant l'intensité caractéristique de la molécule à analyser aux différents niveaux de concentrations connues d'analyte dans le but d'objectiver la linéarité du signal. Dans le cas du 5FU, analysé de 1 à 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  l'évolution de l'intensité du déplacement à 786  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique du cycle pyrimidique du 5FU, n'était pas linéaire et évoluait vers un maximum. Si l'analyse univariée peut informer sur la linéarité de la réponse à un nombre d'onde donné, elle ne garantit pas la linéarité de l'évolution du signal spectral en analyse multivariée qui prend en compte tout ou partie du spectre. En conséquence, les approches chimiométriques classiques, comme la régression PLS, qui est une méthode d'analyse multivariée linéaire, ont également été utilisées. Elles ne présentent cependant que des performances limitées, avec une moyenne d'erreurs relatives calculées en valeur absolue (MARE) égale à 16,8 %. Un modèle non linéaire de type sigmoïdale a alors été

développé. Ce modèle seul ne permettait pas une amélioration suffisante des performances de prédiction. Finalement un modèle de régression a été construit indépendamment pour les données issues de chaque lot d'AgNPs. La question posée était alors : pour un échantillon inconnu comment choisir le lot d'AgNPs qui servira à la prédiction de sa concentration ? Cette étape est réalisée dans l'algorithme par l'approche des plus proches voisins, c'est-à-dire sur les bases d'une comparaison spectrale, intensité par intensité du nouveau spectre mesuré et des spectres prédits à partir des modèles par lot de NPs. Le modèle sélectionne de cette manière un modèle de régression, construit sur les bases d'un lot unique, pour prédire la concentration d'un nouvel échantillon. La concentration est ensuite estimée à partir du modèle sélectionné. Avec une telle approche, les performances ont été fortement améliorées avec une MARE égale à 6,30 %. L'amélioration de la prédiction de la concentration avec un modèle par lot a confirmée l'impact de la variabilité du signal exalté issue des différents lots, eux-mêmes caractérisés par des tailles et des formes d'AgNPs hétérogènes, sur les performances prédictives des modèles quantitatifs.

Ce modèle construit en collaboration étroite avec l'équipe Xpop était fondé uniquement sur l'amélioration des performances prédictives du modèle et non sur des considérations chimiques ou issues de l'observation expérimentale de l'évolution du signal en fonction de la concentration. En cela, cette étude a démontré que les outils mathématiques pouvaient parvenir à améliorer un biais expérimental, en l'occurrence de prendre en considération une partie de la variabilité du signal induite par les différents lots de NPs dans la construction du modèle prédictif de la concentration. L'approche par la méthode des plus proches voisins permettrait, d'une façon plus large, de prédire les concentrations d'échantillons à l'aide de NPs différentes. La construction de ce type de modèle nécessite cependant au préalable de larges jeux de données issues des différentes synthèses. Contrairement aux approches classiquement utilisées, plus le modèle intègre de variabilités, plus il sera représentatif des conditions d'utilisation en routine et plus il sera robuste pour la prédiction de nouveaux échantillons.

L'objectif en quantification de nos travaux suivants était de prédire la concentration de l'adrénaline et de la noradrénaline avec des erreurs de prédiction les plus faibles possibles. Les résultats pour cette étude ont été présentés sous la forme d'un profil d'exactitude, qui permet la représentation d'un résultat analytique quantitatif en représentant l'erreur relative ainsi que l'erreur aléatoire, et qui est recommandé par plusieurs instances, dont la société française des sciences techniques et pratiques pharmaceutiques [49] ou les ICH [113] (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*). Dans cette nouvelle étude, trois lots d'AuNPs ont été synthétisés avec une homogénéité de taille et de forme jugée acceptable. L'approche précédente par les plus proches voisins n'a pas été nécessaire. De plus, trois lots de NPs n'auraient pas été suffisants pour construire un tel modèle. Différentes approches mathématiques ont été développées pour comparer leurs performances prédictives. D'abord un modèle de régression

linéaire univarié, qui représente les modèles les plus communément retrouvés dans les études en SERS [36,38,43,44], à partir de l'intensité à  $1280\text{ cm}^{-1}$  attribuable à l'adrénaline et à la noradrénaline. Les conclusions étaient similaires à celles expliquées dans l'étude du 5FU. L'évolution du signal à ce nombre d'onde, en fonction de la concentration en analyte n'était pas linéaire. Une transformation logarithmique a permis sa linéarisation. Sur la base de ces résultats, deux modèles multivariés ont été développés : un modèle de régression PLS à partir des données brutes préalablement prétraitées et un modèle de régression PLS après transformation logarithmique de la concentration et de l'intensité. L'amélioration des performances prédictives était importante pour les analyses multivariées par rapport aux analyses univariées et après transformation logarithmique. Ces études, sur ces molécules distinctes, sont concordantes quant à l'évolution non linéaire de l'intensité du signal Raman en SERS en fonction de la concentration et incitent donc au développement de modèles non linéaires (sigmoïdale dans l'analyse du 5FU), ou à la linéarisation des données avant l'utilisation de technique régression univariée ou multivarié. Ainsi, l'adrénaline et la noradrénaline ont pu être quantifiées en suivant une validation analytique basée sur le profil d'exactitude. A notre connaissance, il s'agit de l'une des seules études, avec celle de De Bleye sur la quantification de l'aminophénol, proposant une validation du modèle quantitatif par des profils d'exactitude, soulignant les difficultés à produire de telles études. Les prochaines étapes de la validation analytique devront s'intéresser à la validation de la fidélité intermédiaire ou encore de la reproductibilité inter-laboratoire. En ce sens de promotion de la SERS pour l'analyse quantitative, l'Université de Trieste a conduit une étude multicentrique [173] regroupant 15 laboratoires issus d'un collectif européen (Raman4Clinics) pour doser une molécule, l'adénine, dans le but d'évaluer la justesse et la reproductibilité notamment la fidélité inter-laboratoire. Pour se faire, ils ont distribué aux différents laboratoires des kits avec plusieurs types de NPs : AgNPs et AuNPs en suspension colloïdales ainsi que des AgNPs et AuNPs fixées sur un support par dépôt sur des bâtons de silicone. Deux longueurs d'onde de laser ont été utilisées pour un total de six combinaisons possibles. Finalement, les meilleurs résultats basés sur le calcul du biais, de la somme des erreurs de prédiction inter-laboratoires et de la RMSEP ont été obtenu pour les AgNPs déposés sur un support et pour les AuNPs colloïdales (RMSEP de 13 %). Au-delà des résultats particulièrement intéressants de ce travail collaboratif, on voit bien la dynamique actuelle de promouvoir la SERS pour l'analyse quantitative avec une validation analytique robuste pour une utilisation en pratique courante. Au vu des bons résultats obtenus à partir des AuNPs avec un laser de longueur d'onde 785 nm, cette étude nous a conforté dans nos choix précédents de synthétiser des AuNPs sphériques en suspension couplé à la détection du signal par un spectromètre Raman disposant d'un laser à 785 nm.

Au travers de ces études, nous avons développé une stratégie d'analyse rationnelle autour de trois grands axes : optimisation de la synthèse, optimisation expérimentale des facteurs impactant l'exaltation de l'intensité du signal et optimisation mathématiques, ce qui a permis la construction de modèles quantitatifs pour des

concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre pour les molécules étudiées. L'augmentation de la taille des NPs par des méthodes de croissance successive couplée à une agrégation médiée par un polymère ont permis d'envisager des détections de l'ordre de la centaine de nanogrammes par millilitre. La stabilisation des agrégats a permis d'envisager la mesure de l'échantillon à distance de l'agrégation et des mesures dans des matrices plus complexes. Les perspectives sont désormais nombreuses. Les perspectives à court terme seront de construire des modèles quantitatifs à partir d'une agrégation médiée par des polymères en appliquant des stratégies similaires à celle développée dans cet ouvrage. Si l'exaltation dépend à la fois de la taille des NPs de départ et de la structure des agrégats, comme semble le confirmer l'exaltation majorée du signal de l'adrénaline dans le NaCl 0,9 %. La recherche de procédés d'agrégation permettant de maîtriser la structure et la géométrie des agrégats serait particulièrement intéressante pour produire des assemblages des polymères / NPs de motif contrôlé, à haut pouvoir exaltant, dans lequel serait piégé l'analyte. Il apparaît dès lors que de tels systèmes pourraient repousser les limites de quantification actuelles obtenues à partir de suspensions colloïdales de NPs. La reproductibilité de ces méthodes sur l'exaltation du signal SERS devra également être déterminée. Si la stabilité et le pouvoir d'exaltation se confirment dans des solvants comme le G5 ou le NaCl 0,9 %, nous pourrions envisager une transposition dans le milieu biologique qui constitue des matrices beaucoup plus complexes contenant un grand nombre de constituants tels que des cellules, protéines, peptides et ions, qui peuvent interagir avec les NPs. Certaines techniques ont déjà été proposées par exemple pour s'affranchir de l'effet corona des protéines [108] qui annihile le signal SERS. Des techniques de reconnaissance spécifique avec l'analyte pourront également être envisagées, avec la fonctionnalisation des NPs sphériques par des groupements spécifiques de l'analyte. Pour garantir cette spécificité, des outils mathématiques d'analyse multivariée pourront également être proposés comme l'analyse en composantes indépendantes en vue d'extraire un signal d'intérêt d'un signal plus complexe composé de la contribution de plusieurs analytes.

## Conclusion

---

La diffusion Raman exaltée de surface est une technique d'analyse de la matière spécifique et sensible qui permet l'analyse d'une grande variété de molécules. Ce travail de thèse avait pour objectif d'utiliser la SERS comme outil d'analyse pour la discrimination et la quantification de molécules d'intérêt thérapeutiques. Les défis face à cet objectif étaient particulièrement importants. En effet, si les capacités de la SERS pour amplifier le signal Raman d'un analyte ne sont plus à démontrer, le manque de reproductibilité dans l'amplification du signal reste un frein majeur à son développement. Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché au travers de l'étude de trois molécules d'intérêt thérapeutique : un anticancéreux, le 5-fluorouracile et deux neurotransmetteurs activateurs du système nerveux parasympathique utilisés comme médicaments d'urgence : l'adrénaline et la noradrénaline, à comprendre les paramètres critiques qui influent sur l'amplification du signal Raman.

A partir de molécules modèles, nous avons réussi à démontrer la faisabilité du dosage du 5FU à partir de différents lots de synthèse dont les AgNPs ont été caractérisées comme hétérogènes du point de vue de leur taille et de leur forme. Une réponse mathématique a pu être apportée pour réduire en partie la variabilité du signal exalté au cours de ces expériences et améliorer de ce fait la qualité de la prédiction de la concentration. La discrimination de l'adrénaline et de la noradrénaline a été possible par une méthode discriminante basée sur la régression PLS-DA qui a permis une reconnaissance optimale de la bonne molécule pour l'ensemble des échantillons analysés. Les modèles mathématiques de la prédiction de la concentration de ces deux molécules ont inclus une transformation logarithmique des données afin de linéariser les données, puis une régression linéaire multivariée de type PLS a été entreprise et a permis de valider le dosage de ces deux molécules par la représentation de profil d'exactitude pour des concentrations de 32 à 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour la noradrénaline et de 20 à 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour l'adrénaline.

Ainsi au cours de ces différents travaux, nous avons mis en lumière le rôle prépondérant de la taille des NPs de départ dans l'exaltation du signal Raman en SERS. De plus, l'importance de l'agrégation dans l'exaltation du signal et dans sa reproductibilité a été mise en avant. Enfin notre dernier travail a ouvert la voie à une médiation de l'agrégation des NPs par des polymères, cette agrégation est particulièrement intéressante car elle nous a permis de stabiliser le signal au cours du temps, d'augmenter l'exaltation du signal Raman de l'adrénaline avec une détection possible à 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cette stratégie d'agrégation, permettrait également par le meilleur contrôle des motifs formés d'exalter plus intensément le signal Raman. La transposition dans des matrices complexes a également été entreprise dans des solutions aqueuses de NaCl et de G5 et constitue une première étape vers la transposition vers des milieux plus complexes tels que les milieux biologiques (sang, plasma, urine...).

Les avancés sur l'utilisation par notre équipe de la SERS ont donc été importantes. Elles ouvrent des perspectives encourageantes pour l'utilisation de la SERS quantitative en routine à partir de NPs simples et accessibles. Parmi les applications retenues, nous envisageons un développement de la SERS pour le contrôle qualité de médicaments mais également pour la détection à plus faibles concentrations notamment dans le cadre de la recherche de contamination de surface, ou encore pour le dosage de médicaments ou de leurs métabolites dans les milieux biologiques. Le frein lié aux interférences provoquées par les matrices complexes devra cependant être levé. Aujourd'hui, nous sommes convaincus qu'une collaboration étroite entre différentes spécialités telles que la chimie, la physique et les mathématiques ainsi que l'accès à des laboratoires d'application constitue un élément indispensable pour promouvoir la SERS de façon efficiente en vue de répondre aux nouveaux défis de santé.

## Références bibliographiques

---

- [1] A. Michelet, M. Boiret, F. Lemhachheche, L. Malec, A. Tfayli, E. Ziemons, Utilisation de la spectrométrie Raman dans le domaine pharmaceutique, *STP Pharma Prat.* 23 (2013) 97–117.
- [2] A. Amin, P. Bourget, F. Vidal, F. Ader, Routine application of Raman spectroscopy in the quality control of hospital compounded ganciclovir, *Int. J. Pharm.* 474 (2014) 193–201.
- [3] C. Bazin, B. Cassard, E. Caudron, P. Prognon, L. Havard, Comparative analysis of methods for real-time analytical control of chemotherapies preparations, *Int. J. Pharm.* 494 (2015) 329–336.
- [4] P. Bourget, A. Amin, A. Moriceau, B. Cassard, F. Vidal, R. Clement, The Raman Spectroscopy (RS): A new tool for the analytical quality control of injectable in health settings. Comparison of RS technique versus HPLC and UV/Vis-FTIR, applied to anthracyclines as anticancer drugs, *Pathol. Biol. (Paris)*. 60 (2012) 369–379.
- [5] F. Nardella, M. Beck, P. Collart-Dutilleul, G. Becker, C. Boulanger, L. Perello, A. Gairard-Dory, B. Gourieux, G. Ubeaud-Séquier, A UV-Raman spectrometry method for quality control of anticancer preparations: Results after 18 months of implementation in hospital pharmacy, *Int. J. Pharm.* 499 (2016) 343–350.
- [6] L.M.M. Lê, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Discrimination and quantification of two isomeric antineoplastic drugs by rapid and non-invasive analytical control using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. 161 (2016) 320–324.
- [7] L.M.M. Lê, M. Berge, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Rapid discrimination and quantification analysis of five antineoplastic drugs in aqueous solutions using Raman spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 111 (2018) 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.046>.
- [8] L.M.M. Le, B. Kégl, A. Gramfort, C. Marini, D. Nguyen, M. Cherti, S. Tfaili, A. Tfayli, A. Baillet-Guffroy, P. Prognon, P. Chaminade, E. Caudron, Optimization of classification and regression analysis of four monoclonal antibodies from Raman spectra using collaborative machine learning approach, *Talanta*. 184 (2018) 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.109>.
- [9] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, A. Baillet Guffroy, P. Prognon, A. Dowek, E. Caudron, Quantification of gemcitabine intravenous drugs by direct measurement in chemotherapy plastic bags using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. 196 (2019) 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.062>.

- [10] D. Yang, Y. Ying, Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 46 (2011) 539–560.
- [11] A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska, Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 1061–1076.
- [12] R. Ramakrishnaiah, G.U. Rehman, S. Basavarajappa, A.A. Al Khuraif, B.H. Durgesh, A.S. Khan, I. ur Rehman, Applications of Raman spectroscopy in dentistry: analysis of tooth structure, *Appl. Spectrosc. Rev.* 50 (2015) 332–350.
- [13] S. Potgieter-Vermaak, N. Maledi, N. Wagner, J.H.P. Van Heerden, R. Van Grieken, J.H. Potgieter, Raman spectroscopy for the analysis of coal: a review, *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011) 123–129.
- [14] G.S. Bumbrah, R.M. Sharma, Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse, *Egypt. J. Forensic Sci.* 6 (2016) 209–215.
- [15] C.A.F. de Oliveira Penido, M.T.T. Pacheco, I.K. Lednev, L. Silveira Jr, Raman spectroscopy in forensic analysis: identification of cocaine and other illegal drugs of abuse, *J. Raman Spectrosc.* 47 (2016) 28–38.
- [16] C. Shende, W. Smith, C. Brouillette, S. Farquharson, Drug Stability Analysis by Raman Spectroscopy, *Pharmaceutics*. 6 (2014) 651–662. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6040651>.
- [17] E.C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P.G. Etchegoin, Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study, *J. Phys. Chem. C*. 111 (2007) 13794–13803.
- [18] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* 26 (1974) 163–166.
- [19] M. Moskovits, Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals, *J. Chem. Phys.* 69 (1978) 4159–4161. <https://doi.org/10.1063/1.437095>.
- [20] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 84 (1977) 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
- [21] J. Bicker, A. Fortuna, G. Alves, A. Falcão, Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples—A review, *Anal. Chim. Acta.* 768 (2013) 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.030>.

- [22] J.C. Cook, C.M.P. Cuypers, B.J. Kip, R.J. Meier, E. Koglin, Use of colloidal SERS for the trace detection of organic species: a survey based on pyridine as the probe molecule, *J. Raman Spectrosc.* 24 (1993) 609–619. <https://doi.org/10.1002/jrs.1250240910>.
- [23] C. Deriu, I. Conticello, A.M. Mebel, B. McCord, Micro Solid Phase Extraction Surface-Enhanced Raman Spectroscopy ( $\mu$ -SPE/SERS) Screening Test for the Detection of the Synthetic Cannabinoid JWH-018 in Oral Fluid, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4780–4789. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00335>.
- [24] X. Jiang, Y. Chen, J. Du, M. Yang, Y. Shen, X. Li, X. Han, L. Yang, B. Zhao, SERS investigation and high sensitive detection of carbenicillin disodium drug on the Ag substrate, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 204 (2018) 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.059>.
- [25] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1667–1670. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>.
- [26] L. Litti, V. Amendola, G. Toffoli, M. Meneghetti, Detection of low-quantity anticancer drugs by surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2123–2131.
- [27] S.S. Panikar, G. Ramírez-García, S. Sidhik, T. Lopez-Luke, C. Rodriguez-Gonzalez, I.H. Ciapara, P.S. Castillo, T. Camacho-Villegas, E. De la Rosa, Ultrasensitive SERS Substrate for Label-Free Therapeutic-Drug Monitoring of Paclitaxel and Cyclophosphamide in Blood Serum, *Anal. Chem.* 91 (2019) 2100–2111. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04523>.
- [28] V. Turzhitsky, L. Zhang, G.L. Horowitz, E. Vitkin, U. Khan, Y. Zakharov, L. Qiu, I. Itzkan, L.T. Perelman, Picoanalysis of Drugs in Biofluids with Quantitative Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Small.* 14 (2018) 1802392. <https://doi.org/10.1002/smll.201802392>.
- [29] A. Jaworska, S. Fornasaro, V. Sergo, A. Bonifacio, Potential of surface enhanced raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review, *Biosensors.* 6 (2016) 47.
- [30] S. Fornasaro, S.D. Marta, M. Rabusin, A. Bonifacio, V. Sergo, Toward SERS-based point-of-care approaches for therapeutic drug monitoring: the case of methotrexate, *Faraday Discuss.* 187 (2016) 485–499. <https://doi.org/10.1039/C5FD00173K>.
- [31] M. Fan, G.F. Andrade, A.G. Brolo, A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta.* 693 (2011) 7–25.

- [32] C. Hamon, L.M. Liz-Marzán, Colloidal design of plasmonic sensors based on surface enhanced Raman scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 512 (2018) 834–843.
- [33] M. Jahn, S. Patze, I.J. Hidi, R. Knipper, A.I. Radu, A. Mühlig, S. Yüksel, V. Peksa, K. Weber, T. Mayerhöfer, Plasmonic nanostructures for surface enhanced spectroscopic methods, *Analyst.* 141 (2016) 756–793.
- [34] L. Petti, R. Capasso, M. Ripa, M. Pannico, P. La Manna, G. Peluso, A. Calarco, E. Bobeico, P. Musto, A plasmonic nanostructure fabricated by electron beam lithography as a sensitive and highly homogeneous SERS substrate for bio-sensing applications, *Vib. Spectrosc.* 82 (2016) 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2015.11.007>.
- [35] M.M. Al-Shalalfeh, A.T. Onawole, T.A. Saleh, A.A. Al-Saadi, Spherical silver nanoparticles as substrates in surface-enhanced Raman spectroscopy for enhanced characterization of ketoconazole, *Mater. Sci. Eng. C.* 76 (2017) 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.081>.
- [36] C. De Bleye, E. Dumont, E. Rozet, P.-Y. Sacré, P.-F. Chavez, L. Netchacovitch, G. Piel, Ph. Hubert, E. Ziemons, Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering: From development to method validation, *Talanta.* 116 (2013) 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.084>.
- [37] S. Mabbott, E. Correa, D.P. Cowcher, J.W. Allwood, R. Goodacre, Optimization of parameters for the quantitative surface-enhanced raman scattering detection of mephedrone using a fractional factorial design and a portable Raman spectrometer, *Anal. Chem.* 85 (2012) 923–931.
- [38] B.R.A. Junior, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, L.G.C. Durango, M.R. Forim, R.L. Carneiro, Determination of B-complex vitamins in pharmaceutical formulations by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 188 (2018) 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.07.049>.
- [39] H. Wang, Z. Xue, Y. Wu, J. Gilmore, L. Wang, L. Fabris, Rapid SERS Quantification of Trace Fentanyl Laced in Recreational Drugs with a Portable Raman Module, *Anal. Chem.* 93 (2021) 9373–9382. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00792>.
- [40] P. Kalimuthu, S.A. John, Studies on ligand exchange reaction of functionalized mercaptothiadiazole compounds onto citrate capped gold nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 122 (2010) 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.03.009>.
- [41] M.Y. Chan, W. Leng, P.J. Vikesland, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Characterization of Salt-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles, *ChemPhysChem.* 19 (2018) 24–28. <https://doi.org/10.1002/cphc.201700798>.
- [42] K. Faulds, R.E. Littleford, D. Graham, G. Dent, W.E. Smith, Comparison of Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Unaggregated and Aggregated

Nanoparticles, *Anal. Chem.* 76 (2004) 592–598. <https://doi.org/10.1021/ac035053o>.

[43] O. Alharbi, Y. Xu, R. Goodacre, Detection and quantification of the opioid tramadol in urine using surface enhanced Raman scattering, *Analyst*. 140 (2015) 5965–5970. <https://doi.org/10.1039/C5AN01177A>.

[44] S.L. Kleinman, M.C. Peterman, M. Benhabib, M.T. Cheng, J.D. Hudson, R.E. Mohler, Rapid Quantification of 4,4'-Methylenedianiline by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 89 (2017) 13190–13194. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02936>.

[45] W. Shen, X. Lin, C. Jiang, C. Li, H. Lin, J. Huang, S. Wang, G. Liu, X. Yan, Q. Zhong, B. Ren, Reliable Quantitative SERS Analysis Facilitated by Core-Shell Nanoparticles with Embedded Internal Standards, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 7308–7312. <https://doi.org/10.1002/anie.201502171>.

[46] C. Shende, A. Farquharson, C. Brouillette, W. Smith, S. Farquharson, Quantitative Measurements of Codeine and Fentanyl on a Surface-Enhanced Raman-Active Pad, *Molecules*. 24 (2019) 2578. <https://doi.org/10.3390/molecules24142578>.

[47] E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*, Elsevier, 2008.

[48] G.C. Schatz, M.A. Young, R.P. Van Duyne, Electromagnetic Mechanism of SERS, in: K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp (Eds.), *Surf.-Enhanc. Raman Scatt. Phys. Appl.*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2006: pp. 19–45. [https://doi.org/10.1007/3-540-33567-6\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-33567-6_2).

[49] Ph. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>.

[50] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris, A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering, *Biosensors*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/bios9020057>.

[51] V.L. Nader, Approche expérimentale et théorique de la diffusion Raman exaltée : résonance des plasmons de surface et effet de pointe, phdthesis, Université de Nantes, 2010. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00559365> (accessed September 15, 2021).

[52] C.V. Raman, K.S. Krishnan, A New Type of Secondary Radiation, *Nature*. 121 (1928) 501–502. <https://doi.org/10.1038/121501c0>.

[53] C.V. Raman, The molecular scattering of light, Nobel Lecture, 11 Dec. 1930,

Nobel Lect. Phys. 41 (1922) 267–275.

[54] H. Kornfeld, Bemerkung zu der Mitteilung von G. Landsberg und L. Mandelstam über eine neue Erscheinung in der Lichtzerstreuung in Krystallen, *Naturwissenschaften*. 16 (1928) 653–653. <https://doi.org/10.1007/BF01494259>.

[55] S. Boujday, M.L. de la Chapelle, J. Srajer, W. Knoll, Enhanced Vibrational Spectroscopies as Tools for Small Molecule Biosensing, *Sensors*. 15 (2015) 21239–21264. <https://doi.org/10.3390/s150921239>.

[56] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, A. Baillet Guffroy, P. Prognon, A. Dowek, E. Caudron, Quantification of gemcitabine intravenous drugs by direct measurement in chemotherapy plastic bags using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. 196 (2019) 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.062>.

[57] L.M.M. Lê, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Discrimination and quantification of two isomeric antineoplastic drugs by rapid and non-invasive analytical control using a handheld Raman spectrometer, *Talanta*. 161 (2016) 320–324.

[58] L. Lê, M. Berge, A. Tfayli, P. Prognon, E. Caudron, Discriminative and Quantitative Analysis of Antineoplastic Taxane Drugs Using a Handheld Raman Spectrometer, *BioMed Res. Int.* 2018 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/8746729>.

[59] L.M.M. Lê, M. Berge, A. Tfayli, J. Zhou, P. Prognon, A. Baillet-Guffroy, E. Caudron, Rapid discrimination and quantification analysis of five antineoplastic drugs in aqueous solutions using Raman spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 111 (2018) 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.046>.

[60] M.A. Mansouri, P.-Y. Sacré, L. Coïc, C. De Bleye, E. Dumont, A. Bouklouze, P. Hubert, R.D. Marini, E. Ziemons, Quantitation of active pharmaceutical ingredient through the packaging using Raman handheld spectrophotometers: A comparison study, *Talanta*. 207 (2020) 120306. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120306>.

[61] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* 26 (1974) 163–166.

[62] J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* 75 (1979) 790–798.

[63] M. Moskovits, Surface-enhanced spectroscopy, *Rev. Mod. Phys.* 57 (1985) 783.

[64] A. Otto, The ‘chemical’ (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 497–509. <https://doi.org/10.1002/jrs.1355>.

- [65] A. Otto, Charge transfer in first layer enhanced Raman scattering and surface resistance, *Q. Phys Rev.* 3 (2017).
- [66] E.C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P.G. Etchegoin, Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 13794–13803.
- [67] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- [68] D. Pines, Collective Energy Losses in Solids, *Rev. Mod. Phys.* 28 (1956) 184–198. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.28.184>.
- [69] C.J. Powell, J.B. Swan, Origin of the Characteristic Electron Energy Losses in Magnesium, *Phys. Rev.* 116 (1959) 81–83. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.116.81>.
- [70] R.H. Ritchie, Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films, *Phys. Rev.* 106 (1957) 874–881. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.874>.
- [71] N. Guillot, M.L. de la Chapelle, The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 113 (2012) 2321–2333.
- [72] X. Zhang, Y.L. Chen, R.-S. Liu, D.P. Tsai, Plasmonic photocatalysis, *Rep. Prog. Phys.* 76 (2013) 046401. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/76/4/046401>.
- [73] E. Hao, G.C. Schatz, Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 357–366.
- [74] L. Jensen, C.M. Aikens, G.C. Schatz, Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1061–1073. <https://doi.org/10.1039/B706023H>.
- [75] D.A. LONG, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules.* Chicester, (2001).
- [76] J.R. Lombardi, R.L. Birke, A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering, *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 734–742. <https://doi.org/10.1021/ar800249y>.
- [77] B. Sharma, R.R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne, SERS: Materials, applications, and the future, *Mater. Today.* 15 (2012) 16–25.
- [78] D.J. Masiello, G.C. Schatz, Many-body theory of surface-enhanced Raman scattering, *Phys. Rev. A.* 78 (2008) 042505. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.78.042505>.

- [79] D.J. Masiello, G.C. Schatz, On the linear response and scattering of an interacting molecule-metal system, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 064102. <https://doi.org/10.1063/1.3308624>.
- [80] P.G. Etchegoin, E.C.L. Ru, A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 6079–6089. <https://doi.org/10.1039/B809196J>.
- [81] M.V. Cañamares, C. Chenal, R.L. Birke, J.R. Lombardi, DFT, SERS, and Single-Molecule SERS of Crystal Violet, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 20295–20300. <https://doi.org/10.1021/jp807807j>.
- [82] S.L. Kleinman, E. Ringe, N. Valley, K.L. Wustholz, E. Phillips, K.A. Scheidt, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Crystal Violet Isotopologues: Theory and Experiment, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 4115–4122. <https://doi.org/10.1021/ja110964d>.
- [83] K.L. Wustholz, C.L. Brosseau, F. Casadio, R.P.V. Duyne, Surface-enhanced Raman spectroscopy of dyes: from single molecules to the artists' canvas, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 7350–7359. <https://doi.org/10.1039/B904733F>.
- [84] J.A. Dieringer, A.D. McFarland, N.C. Shah, D.A. Stuart, A.V. Whitney, C.R. Yonzon, M.A. Young, X. Zhang, R.P. Van Duyne, Introductory Lecture: Surface enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications, *Faraday Discuss.* 132 (2006) 9–26. <https://doi.org/10.1039/B513431P>.
- [85] P.R. West, S. Ishii, G.V. Naik, N.K. Emani, V.M. Shalaev, A. Boltasseva, Searching for better plasmonic materials, *Laser Photonics Rev.* 4 (2010) 795–808. <https://doi.org/10.1002/lpor.200900055>.
- [86] S.A. Maier, *Plasmonics: fundamentals and applications*, Springer Science & Business Media, 2007.
- [87] E.D. Palik, *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, 1998.
- [88] P.B. Johnson, R.W. Christy, Optical Constants of the Noble Metals, *Phys. Rev. B* 6 (1972) 4370–4379. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.6.4370>.
- [89] S. Abalde-Cela, S. Carregal-Romero, J.P. Coelho, A. Guerrero-Martínez, Recent progress on colloidal metal nanoparticles as signal enhancers in nanosensing, *Adv. Colloid Interface Sci.* 233 (2016) 255–270.
- [90] S.S. Masango, R.A. Hackler, N. Large, A.-I. Henry, M.O. McAnally, G.C. Schatz, P.C. Stair, R.P. Van Duyne, High-Resolution Distance Dependence Study of Surface-Enhanced Raman Scattering Enabled by Atomic Layer Deposition, *Nano Lett.* 16 (2016) 4251–4259. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b01276>.

- [91] E.S. Shibu, M. Hamada, N. Murase, V. Biju, Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 15 (2013) 53–72. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.004>.
- [92] M. Fan, G.F. Andrade, A.G. Brolo, A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta.* 693 (2011) 7–25.
- [93] W. Zhu, M.G. Banaee, D. Wang, Y. Chu, K.B. Crozier, Lithographically fabricated optical antennas with gaps well below 10 nm., *Small.* 7 (2011) 1761–1766. <https://doi.org/10.1002/sml.201100371>.
- [94] S.J. Barcelo, W. Wu, X. Li, Z. Li, R.S. Williams, Nanoimprint lithography of plasmonic platforms for SERS applications, *Appl. Phys. A.* 121 (2015) 443–449. <https://doi.org/10.1007/s00339-015-9073-8>.
- [95] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- [96] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391–3395.
- [97] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.* 241 (1973) 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>.
- [98] N. Leopold, B. Lendl, A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 5723–5727.
- [99] N.G. Bastús, J. Comenge, V. Puntès, Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening, *Langmuir.* 27 (2011) 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>.
- [100] G. Mie, Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen, *Ann Phys.* 25 (1908) 1–377.
- [101] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- [102] T. Chung, S.-Y. Lee, E.Y. Song, H. Chun, B. Lee, Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing, *Sensors.* 11 (2011) 10907–10929.

<https://doi.org/10.3390/s111110907>.

[103] R.A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P.J. Goulet, J.J. Garrido, R.F. Aroca, Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced Raman scattering, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 3787–3792.

[104] P. Kalimuthu, S.A. John, Studies on ligand exchange reaction of functionalized mercaptothiadiazole compounds onto citrate capped gold nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 122 (2010) 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.03.009>.

[105] K. Siriwardana, M. Gadogbe, S.M. Ansar, E.S. Vasquez, W.E. Collier, S. Zou, K.B. Walters, D. Zhang, Ligand adsorption and exchange on pegylated gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. C.* 118 (2014) 11111–11119.

[106] E. Dumont, C. De Bleye, M. Haouchine, L. Coïc, P.-Y. Sacré, P. Hubert, E. Ziemons, Effect of the functionalisation agent on the surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectrum: Case study of pyridine derivatives, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 233 (2020) 118180. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118180>.

[107] S.S. Panikar, G. Ramírez García, S. Sidhik, T. López-Luke, C. Rodriguez-Gonzalez, I. Higuera Ciapara, P. Salas-Castillo, T.A. Camacho-Villegas, E. De La Rosa, Ultra-sensitive SERS substrate for label-free therapeutic drug monitoring of Paclitaxel and Cyclophosphamide in blood serum, *Anal. Chem.* (2018).

[108] E. Dumont, C. De Bleye, J. Cailletaud, P.-Y. Sacré, P.-B. Van Lerberghe, B. Rogister, G.A. Rance, J.W. Aylott, Ph. Hubert, E. Ziemons, Development of a SERS strategy to overcome the nanoparticle stabilisation effect in serum-containing samples: Application to the quantification of dopamine in the culture medium of PC-12 cells, *Talanta.* 186 (2018) 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.038>.

[109] C. Zhang, X. Liang, T. You, N. Yang, Y. Gao, P. Yin, An ultrasensitive “turn-off” SERS sensor for quantitatively detecting heparin based on 4-mercaptobenzoic acid functionalized gold nanoparticles, *Anal. Methods.* 9 (2017) 2517–2522. <https://doi.org/10.1039/C7AY00494J>.

[110] Q. Shi, J. Huang, Y. Sun, R. Deng, M. Teng, Q. Li, Y. Yang, X. Hu, Z. Zhang, G. Zhang, A SERS-based multiple immuno-nanoprobe for ultrasensitive detection of neomycin and quinolone antibiotics via a lateral flow assay, *Mikrochim. Acta.* 185 (2018) 84. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2556-x>.

[111] J. GOUPY, Plans d'expériences, Ref TIP620WEB - Qual. Sécurité Au Lab. (1997). <http://www.techniques.ingenieur.fr/base-documentaire/42497210-qualite-au-laboratoire/download/p230/plans-d-experiences.html> (accessed January 6, 2019).

[112] S. Mabbott, E. Correa, D.P. Cowcher, J.W. Allwood, R. Goodacre, Optimization of parameters for the quantitative surface-enhanced Raman scattering detection of

mephedrone using a fractional factorial design and a portable Raman spectrometer, *Anal. Chem.* 85 (2012) 923–931.

[113] C. De Bleye, E. Dumont, E. Rozet, P.-Y. Sacré, P.-F. Chavez, L. Netchacovitch, G. Piel, Ph. Hubert, E. Ziemons, Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering: From development to method validation, *Talanta*. 116 (2013) 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.084>.

[114] L.F. Sallum, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, R.L. Carneiro, Optimization of SERS scattering by Ag-NPs-coated filter paper for quantification of nicotinamide in a cosmetic formulation, *Talanta*. 118 (2014) 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.039>.

[115] N. Kumar, A. Bansal, G.S. Sarma, R.K. Rawal, Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview, *Talanta*. 123 (2014) 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.003>.

[116] V. Mazet, Développement de méthodes de traitement de signaux spectroscopiques: estimation de la ligne de base et du spectre de raies, (n.d.) 165.

[117] J. Cailletaud, C. De Bleye, E. Dumont, P.-Y. Sacré, L. Netchacovitch, Y. Gut, M. Boiret, Y.-M. Ginot, Ph. Hubert, E. Ziemons, Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 458–472. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.056>.

[118] A. Jaworska, S. Fornasaro, V. Sergio, A. Bonifacio, Potential of surface enhanced raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review, *Biosensors*. 6 (2016) 47.

[119] S. Farquharson, A. Gift, C. Shende, F. Inscore, B. Ordway, C. Farquharson, J. Murren, Surface-enhanced Raman spectral measurements of 5-fluorouracil in saliva, *Molecules*. 13 (2008) 2608–2627.

[120] C. Yuen, W. Zheng, Z. Huang, Low-level detection of anti-cancer drug in blood plasma using microwave-treated gold-polystyrene beads as surface-enhanced Raman scattering substrates, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 580–584.

[121] C. Eliasson, A. Lorén, K.V.G.K. Murty, M. Josefson, M. Käll, J. Abrahamsson, K. Abrahamsson, Multivariate evaluation of doxorubicin surface-enhanced Raman spectra, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 1907–1915. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00453-X](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00453-X).

[122] L. Litti, V. Amendola, G. Toffoli, M. Meneghetti, Detection of low-quantity anticancer drugs by surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2123–2131.

- [123] A. Vicario, V. Sergo, G. Toffoli, A. Bonifacio, Surface-enhanced Raman spectroscopy of the anti-cancer drug irinotecan in presence of human serum albumin, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 127 (2015) 41–46.
- [124] S. Fornasaro, S. Dalla Marta, M. Rabusin, A. Bonifacio, V. Sergo, Toward SERS-based point-of-care approaches for therapeutic drug monitoring: the case of methotrexate, *Faraday Discuss*. 187 (2016) 485–499.
- [125] C. Andreou, R. Mirsafavi, M. Moskovits, C.D. Meinhart, Detection of low concentrations of ampicillin in milk, *Analyst*. 140 (2015) 5003–5005.
- [126] S. Zaleski, K.A. Clark, M.M. Smith, J.Y. Eilert, M. Doty, R.P. Van Duyne, Identification and Quantification of Intravenous Therapy Drugs Using Normal Raman Spectroscopy and Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem*. 89 (2017) 2497–2504. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04636>.
- [127] A. Zengin, U. Tamer, T. Caykara, Extremely sensitive sandwich assay of kanamycin using surface-enhanced Raman scattering of 2-mercaptobenzothiazole labeled gold@silver nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*. 817 (2014) 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.042>.
- [128] I.J. Hidi, J. Heidler, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, Ciprofloxacin: pH-dependent SERS signal and its detection in spiked river water using LoC-SERS, *Anal. Bioanal. Chem*. 408 (2016) 8393–8401. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9957-2>.
- [129] S. Farquharson, C. Shende, F.E. Inscore, P. Maksymiuk, A. Gift, Analysis of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc*. 36 (2005) 208–212.
- [130] J.E.L. Villa, M.A.S. Afonso, D.P. dos Santos, P.A. Mercadal, E.A. Coronado, R.J. Poppi, Colloidal gold clusters formation and chemometrics for direct SERS determination of bioanalytes in complex media, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc*. 224 (2020) 117380. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117380>.
- [131] B. Deng, X. Luo, M. Zhang, L. Ye, Y. Chen, Quantitative detection of acyclovir by surface enhanced Raman spectroscopy using a portable Raman spectrometer coupled with multivariate data analysis, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 173 (2019) 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.058>.
- [132] M. Liu, Y. Wang, Y. Jiang, H. Liu, J. Chen, S. Liu, Quantitation of Oxcarbazepine Clinically in Plasma Using Surfaced-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Coupled with Chemometrics, *Appl. Spectrosc*. 73 (2019) 801–809. <https://doi.org/10.1177/0003702819845389>.
- [133] C. Westley, Y. Xu, B. Thilaganathan, A.J. Carnell, N.J. Turner, R. Goodacre, Absolute Quantification of Uric Acid in Human Urine Using Surface Enhanced Raman

Scattering with the Standard Addition Method, *Anal. Chem.* 89 (2017) 2472–2477. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04588>.

[134] S. Fornasaro, A. Bonifacio, E. Marangon, M. Buzzo, G. Toffoli, T. Rindzevicius, M.S. Schmidt, V. Sergo, Label-Free Quantification of Anticancer Drug Imatinib in Human Plasma with Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12670–12677. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02901>.

[135] Des recommandations pour prévenir certaines toxicités sévères des chimiothérapies par fluoropyrimidines - Dossiers et communiqués de presse, (n.d.). <https://www.e-cancer.fr/Presse/Dossiers-et-communiques-de-presse/Des-recommandations-pour-prevenir-certaines-toxicites-severes-des-chimiotherapies-par-fluoropyrimidines> (accessed August 21, 2019).

[136] F. Lemaitre, F. Goirand, M. Launay, E. Chatelut, J.-C. Boyer, A. Evrard, M.-N. Paludetto, R. Guilhaumou, J. Ciccolini, A. Schmitt, Suivi thérapeutique pharmacologique du 5-fluorouracile: mise au point et recommandations du groupe STP-PT de la SFPT et du GPCO-Unicancer, [/data/revues/00074551/unassign/S0007455118301954/](https://www.em-consulte.com/en/article/1237507). (2018). <https://www.em-consulte.com/en/article/1237507> (accessed March 29, 2020).

[137] F.S. Braiteh, S.J. Salamone, Y. Li, J.B. Courtney, M. Duda, S. Diamond, M.C. Miller, Pharmacokinetic (PK)-guided optimization of 5-fluorouracil (5FU) exposure in colorectal cancer (CRC) patients: U.S.-based clinical practices experience, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 3574–3574. [https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.3574](https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.3574).

[138] D. Grasseschi, R.A. Ando, H.E. Toma, V.M. Zamarion, Unraveling the nature of Turkevich gold nanoparticles: the unexpected role of the dicarboxyketone species, *RSC Adv.* 5 (2014) 5716–5724. <https://doi.org/10.1039/C4RA12161A>.

[139] S.M. Mehta, M.P. Sequeira, H. Muthurajana, J.S. D'Souza, Rapid synthesis of gold and silver nanoparticles using tryptone as a reducing and capping agent, *Appl. Nanosci.* (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0684-1>.

[140] J. Polte, Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective, *CrystEngComm.* 17 (2015) 6809–6830. <https://doi.org/10.1039/C5CE01014D>.

[141] L. Shi, E. Buhler, F. Boué, F. Carn, How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question, *J. Colloid Interface Sci.* 492 (2017) 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.065>.

[142] N.G. Bastús, F. Merkoçi, J. Piella, V. Puntes, Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties, *Chem. Mater.* 26 (2014) 2836–2846. <https://doi.org/10.1021/cm500316k>.

[143] Z.S. Pillai, P.V. Kamat, What factors control the size and shape of silver

nanoparticles in the citrate ion reduction method?, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 945–951.

[144] J. Polte, X. Tuaev, M. Wuithschick, A. Fischer, A.F. Thuenemann, K. Rademann, R. Kraehnert, F. Emmerling, Formation Mechanism of Colloidal Silver Nanoparticles: Analogies and Differences to the Growth of Gold Nanoparticles, *ACS Nano.* 6 (2012) 5791–5802. <https://doi.org/10.1021/nn301724z>.

[145] C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance Raman scattering, *Langmuir.* 11 (1995) 3712–3720.

[146] Résumé des caractéristiques du produit - FLUOROURACILE ACCORD 50 mg/ml, solution à diluer pour perfusion - Base de données publique des médicaments, (n.d.). <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=65502207&typedoc=R> (accessed July 13, 2018).

[147] PubChem, 5-Fluorouracil, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3385> (accessed August 22, 2019).

[148] Y. Fang, N.-H. Seong, D.D. Dlott, Measurement of the Distribution of Site Enhancements in Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science.* 321 (2008) 388–392. <https://doi.org/10.1126/science.1159499>.

[149] S. Mabbott, O. Alharbi, K. Groves, R. Goodacre, Application of surface enhanced Raman scattering to the solution based detection of a popular legal high, 5,6-methylenedioxy-2-aminoindane (MDAI), *Analyst.* 140 (2015) 4399–4406. <https://doi.org/10.1039/C5AN00591D>.

[150] S.E. J. Bell, M. R. McCourt, SERS enhancement by aggregated Au colloids: effect of particle size, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 7455–7462. <https://doi.org/10.1039/B906049A>.

[151] S.L. Kleinman, R.R. Frontiera, A.-I. Henry, J.A. Dieringer, R.P. Van Duyne, Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots, *Phys Chem Chem Phys.* 15 (2013) 21–36. <https://doi.org/10.1039/C2CP42598J>.

[152] L. Litti, M. Meneghetti, Predictions on the SERS enhancement factor of gold nanosphere aggregate samples, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21 (2019) 15515–15522. <https://doi.org/10.1039/C9CP02015B>.

[153] M. Meyer, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Self-Limiting Aggregation Leads to Long-Lived Metastable Clusters in Colloidal Solutions, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 6040–6047. <https://doi.org/10.1021/jp055866b>.

- [154] D.L. Van Hying, C.F. Zukoski, Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles, *Langmuir*. 14 (1998) 7034–7046. <https://doi.org/10.1021/la980325h>.
- [155] A.W. Wark, R.J. Stokes, S.B. Darby, W.E. Smith, D. Graham, Dynamic Imaging Analysis of SERS-Active Nanoparticle Clusters in Suspension, *J. Phys. Chem. C*. 114 (2010) 18115–18120. <https://doi.org/10.1021/jp107559x>.
- [156] L. Shi, F. Carn, F. Boué, E. Buhler, Role of the ratio of biopolyelectrolyte persistence length to nanoparticle size in the structural tuning of electrostatic complexes, *Phys. Rev. E*. 94 (2016) 032504. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.94.032504>.
- [157] L. Shi, F. Carn, A. Goukassov, E. Buhler, F. Boué, Self-Induced Crystallization in Charged Gold Nanoparticle-Semiflexible Biopolyelectrolyte Complexes, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*. 36 (2020) 7925–7932. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01064>.
- [158] V. Mulens-Arias, A. Nicolás-Boluda, A. Gehanno, A. Balfourier, F. Carn, F. Gazeau, Polyethyleneimine-assisted one-pot synthesis of quasi-fractal plasmonic gold nanocomposites as a photothermal theranostic agent, *Nanoscale*. 11 (2019) 3344–3359. <https://doi.org/10.1039/c8nr09849b>.
- [159] A.B. da Silva, K.B. Rufato, A.C. de Oliveira, P.R. Souza, E.P. da Silva, E.C. Muniz, B.H. Vilsinski, A.F. Martins, Composite materials based on chitosan/gold nanoparticles: From synthesis to biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 161 (2020) 977–998. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.113>.
- [160] S.H.S. Dananjaya, R.M.C. Udayangani, C. Oh, C. Nikapitiya, J. Lee, M.D. Zoysa, Green synthesis, physio-chemical characterization and anti-candidal function of a biocompatible chitosan gold nanocomposite as a promising antifungal therapeutic agent, *RSC Adv.* 7 (2017) 9182–9193. <https://doi.org/10.1039/C6RA26915J>.
- [161] A. Leiva, S. Bonardd, M. Pino, C. Saldías, G. Kortaberria, D. Radić, Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles, *Eur. Polym. J.* 68 (2015) 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.032>.
- [162] E. Dube, D.O. Oluwole, E. Prinsloo, T. Nyokong, A gold–chitosan composite with low symmetry zinc phthalocyanine for enhanced singlet oxygen generation and improved photodynamic therapy activity, *New J. Chem.* 42 (2018) 10214–10225. <https://doi.org/10.1039/C8NJ00801A>.
- [163] S. Monti, J. Jose, A. Sahajan, N. Kalarikkal, S. Thomas, Structure and dynamics of gold nanoparticles decorated with chitosan–gentamicin conjugates: ReaxFF molecular dynamics simulations to disclose drug delivery, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21 (2019) 13099–13108. <https://doi.org/10.1039/C9CP02357G>.

- [164] E. Loubaki, M. Ourevitch, S. Sicsic, Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride. characterization of modified chitosan by <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, *Eur. Polym. J.* 27 (1991) 311–317. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(91\)90111-Z](https://doi.org/10.1016/0014-3057(91)90111-Z).
- [165] J.C. Giddings, Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials, *Science*. 260 (1993) 1456–1465. <https://doi.org/10.1126/science.8502990>.
- [166] M. Mongy, Le fractionnement par couplage flux-force en flux hydrodynamique: étude de l'application de la technique de fractionnement par couplage flux-force en fibre creuse, PhD Thesis, éditeur inconnu, 2016.
- [167] P.N. Njoki, I.-I.S. Lim, D. Mott, H.-Y. Park, B. Khan, S. Mishra, R. Sujakumar, J. Luo, C.-J. Zhong, Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*. 111 (2007) 14664–14669. <https://doi.org/10.1021/jp074902z>.
- [168] J.D. Driskell, R.J. Lipert, M.D. Porter, Labeled Gold Nanoparticles Immobilized at Smooth Metallic Substrates: Systematic Investigation of Surface Plasmon Resonance and Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Phys. Chem. B*. 110 (2006) 17444–17451. <https://doi.org/10.1021/jp0636930>.
- [169] G. Chen, Y. Wang, M. Yang, J. Xu, S.J. Goh, M. Pan, H. Chen, Measuring Ensemble-Averaged Surface-Enhanced Raman Scattering in the Hotspots of Colloidal Nanoparticle Dimers and Trimers, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 3644–3645. <https://doi.org/10.1021/ja9090885>.
- [170] K.L. Wustholz, A.-I. Henry, J.M. McMahon, R.G. Freeman, N. Valley, M.E. Piotti, M.J. Natan, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Structure–Activity Relationships in Gold Nanoparticle Dimers and Trimers for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 10903–10910. <https://doi.org/10.1021/ja104174m>.
- [171] Abraham. Savitzky, M.J.E. Golay, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures., *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.
- [172] P.H.C. Eilers, H.F.M. Boelens, Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing, (n.d.) 24.
- [173] S. Fornasaro, F. Alsamad, M. Baia, L.A.E. Batista de Carvalho, C. Beleites, H.J. Byrne, A. Chiadò, M. Chis, M. Chisanga, A. Daniel, J. Dybas, G. Eppe, G. Falgayrac, K. Faulds, H. Gebavi, F. Giorgis, R. Goodacre, D. Graham, P. La Manna, S. Laing, L. Litti, F.M. Lyng, K. Malek, C. Malherbe, M.P.M. Marques, M. Meneghetti, E. Mitri, V. Mohaček-Grošev, C. Morasso, H. Muhamadali, P. Musto, C. Novara, M. Pannico, G. Penel, O. Piot, T. Rindzevicius, E.A. Rusu, M.S. Schmidt, V. Sergo, G.D. Sockalingum, V. Untereiner, R.

Vanna, E. Wiercigroch, A. Bonifacio, Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Quantitative Analysis: Results of a Large-Scale European Multi-Instrument Interlaboratory Study, *Anal. Chem.* 92 (2020) 4053–4064. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05658>.

**Titre :** Stratégies d'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique par diffusion Raman exaltée de surface

**Mots clés :** Spectroscopie Raman exaltée de surface, Analyse quantitative, Chimométrie, Médicament

**Résumé :** La spectroscopie Raman est une technique d'analyse rapide, spécifique et non destructive qui permet d'analyser un grand nombre de molécules par la mesure de leurs énergies de vibration. Cependant, la faible proportion de photons diffusés en diffusion Raman (1 sur  $10^8$ ) limite son usage à l'analyse de molécules dont les concentrations sont de l'ordre du  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Afin de s'affranchir de cette limite, ce travail s'intéresse au phénomène de diffusion Raman exaltée de surface (SERS) qui permet une amplification majeure de l'intensité du signal Raman d'une molécule placée à proximité de nanoparticules métalliques (NPs). Cette exaltation a été démontrée depuis de nombreuses années et permet son utilisation pour la détection de molécules à l'état de trace. Le frein actuel au développement de l'utilisation de la SERS est le manque de reproductibilité de l'amplification du signal limitant ainsi les applications quantitatives.

L'objectif de ce travail de thèse est le développement de la SERS en tant que technique analytique spécifique et ultra-sensible pour l'analyse de molécules d'intérêt thérapeutique, dans le but de déterminer la molécule analysée (analyse discriminante) ainsi que sa concentration (analyse quantitative). Pour répondre à cet objectif, une stratégie d'analyse rationnelle a été développée autour de trois axes : la synthèse reproductible de NPs métalliques sphériques en suspension colloïdale, l'optimisation expérimentale des paramètres d'interaction NPs/analyte et l'optimisation mathématique des données spectrales dans la construction de modèles de prédiction discriminants et quantitatifs adaptés aux données.

La première étude avait pour objectif la construction d'un modèle quantitatif pour le dosage du 5-fluorouracile à partir de NPs d'argent issues de synthèses différentes. Ces différentes synthèses ont conduit à des NPs présentant une variabilité de taille et de forme importante malgré l'optimisation préalable des paramètres de synthèse, soulignant les

difficultés à produire des NPs d'argent de façon reproductible. Les mesures spectrales issues de ces expériences ont toutefois pu être exploitées et ont confirmé la variabilité d'amplification du signal d'une synthèse à l'autre impactant la qualité de la prédiction quantitative. Un outil mathématique, basé sur l'approche des plus proches voisins et la construction d'un modèle de quantification par lot de NPs, a été développé et a grandement amélioré la qualité du modèle de prédiction en réduisant l'erreur relative totale de 16,8 % à 6,3 %.

Face au manque de reproductibilité de la synthèse des NPs d'Ag, les travaux portant sur la noradrénaline et l'adrénaline ont été réalisés à l'aide de NPs d'or en suspension qui ont permis des synthèses plus reproductibles par rapport aux NPs d'argent. L'optimisation expérimentale par plans d'expériences combinée au suivi de l'évolution du signal mesuré au cours du temps a mis en avant l'importance des facteurs : taille des NPs, proportion NPs / analyte et concentration en analyte sur l'amplification de l'intensité du signal et sur l'interaction NPs / analyte. Enfin, dans un dernier travail, la recherche d'un mode d'agrégation innovant médiée par un biopolymère naturel de chitosan a permis de stabiliser dans le temps le signal Raman exalté et d'envisager des mesures de l'adrénaline jusqu'à une concentration de  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans diverses matrices aqueuses.

Au travers de ces différents travaux, les capacités discriminantes de la SERS ont été réaffirmées avec un pourcentage de bien classé de 100 % entre l'adrénaline et la noradrénaline, deux molécules de structure très proche. De plus, des modèles quantitatifs ont pu être développés avec des limites basses de quantification de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  déterminées par la construction de profils d'exactitude, démontrant de ce fait le potentiel de la SERS pour l'analyse quantitative de molécules d'intérêt thérapeutique, ouvrant la voie à de nombreuses applications.

