



HAL
open science

Nano-étoiles d'or décorées de polyoxométallates pour la thérapie combinatoire du cancer

Juan Ramirez Henao

► **To cite this version:**

Juan Ramirez Henao. Nano-étoiles d'or décorées de polyoxométallates pour la thérapie combinatoire du cancer. Matériaux. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASF024 . tel-04653884

HAL Id: tel-04653884

<https://theses.hal.science/tel-04653884>

Submitted on 19 Jul 2024

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.

Nano-étoiles d'or décorées de polyoxométallates pour la thérapie combinatoire du cancer

*Polyoxometalate-decorated gold Nanostars for combinatorial cancer
therapy*

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

Thèse préparée dans l'**Institut Lavoisier de Versailles**

(Université Paris-Saclay, UVSQ, CNRS),

sous la direction de **Anne DOLBECQ-BASTIN,**

Directrice de Recherche, Université Paris-Saclay,

la co-direction de **Pierre MIALANE,** Professeur, Université Paris-Saclay,

le co-encadrement de **Souhir BOUJDAY,** Professeure, Sorbonne Université

et de **Anne VALLEE,** Maîtresse de Conférences Sorbonne Université

Thèse soutenue à Versailles, le 19 Juin 2024, par

Juan Fernando RAMIREZ HENAO

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Pedro De Oliveira

Professeur, Université Paris-Saclay

Président

Fayna Mammeri

Maîtresse de conférences HDR,
Université Paris Cité

Rapportrice & examinatrice

Mona Treguer-Delapierre

Professeur, Université de Bordeaux,

Rapportrice & examinatrice

Fabienne Testard

Directrice de recherche, CEA Paris-
Saclay

Examinatrice

Titre : Nano-étoiles d'or décorées de polyoxométallates pour la thérapie combinatoire du cancer

Mots clés : Nanoétoiles d'or, polyoxométallates, cancer, thérapie photothermique.

Résumé : Les polyoxométallates (POM) sont des oxydes moléculaires anioniques constitués de métaux à hauts degrés d'oxydation qui possèdent de nombreuses propriétés dont des activités biomédicales, notamment une activité antitumorale qui peut être grandement améliorée en les fonctionnalisant avec des bisphosphonates (BP). Cette thèse explore l'utilisation de POM à base de Mo(V) comme agent réducteur et stabilisant pour la synthèse en deux étapes de nanoétoiles d'or (AuNS) sans surfactant. Ces nanoétoiles présentent un double intérêt dans le traitement du cancer : elles peuvent délivrer le bisphosphonate jusqu'aux cellules cancéreuses (chimiothérapie) et générer de la chaleur induisant l'apoptose des cellules lorsqu'elles sont irradiées dans le proche infrarouge, longueur d'onde où les tissus organiques absorbent peu (thérapie photothermique).

La première partie de la thèse porte sur la synthèse et la caractérisation de différents précurseurs nécessaires, notamment un POM incorporant l'alendronate comme BP (Mo_4Al_2) et un autre incorporant le zolédronate (Mo_8Zol_4), ainsi que les nanoparticules d'or sphériques nécessaires à la croissance ultérieure des AuNS.

La suite de la thèse s'intéresse aux deux types de AuNS qui ont été obtenus et amplement caractérisés en utilisant chacun des deux POM précédemment synthétisés. La présence du POM et du ligand bisphosphonate sur la surface des nanoparticules a été observée par plusieurs méthodes, telles que le PM-IRRAS, le STEM-EDX, l'ICP-OES et l'XPS. La longueur d'onde de la bande plasmon a été modulée en fonction du rapport germes/or dans les deux fenêtres biologiques du proche infrarouge. Pour les AuNS obtenues avec le Mo_4Al_2 ainsi que les différents précurseurs, des tests de cytotoxicité à 24 et 120 heures ont été réalisés sur deux lignées cellulaires cancéreuses. L'activité anticancéreuse du bisphosphonate a été conservée dans le POM et dans les AuNS, plus important encore, un effet synergique entre la chimiothérapie et la thérapie photothermique a été observé, ce qui permet de diminuer dramatiquement l' IC_{50} . Pour les deux types de AuNS, des tests de cytotoxicité ont été réalisés à 24 et 120 heures sur des cellules non cancéreuses, démontrant une toxicité accrue des AuNS fonctionnalisées au Mo_8Zol_4 .

Title : Polyoxometalate-decorated gold Nanostars for combinatorial cancer therapy

Keywords : Gold nanoparticles, Gold nanostars, polyoxometalates, cancer, photothermal therapy.

Abstract: Polyoxometalates (POM) are anionic molecular oxides composed of metals with high oxidation states that possess numerous properties including biomedical properties, notably antitumor activity that can be greatly enhanced by functionalizing them with bisphosphonates (BP). This thesis explores the use of Mo(V)-based POM as a reducing and stabilizing agent for the two-step synthesis of gold nanostars (AuNS) without surfactants. These nanostars have a dual interest in cancer treatment: they can deliver bisphosphonate to cancer cells (chemotherapy) and generate heat-inducing cell apoptosis when irradiated in the near-infrared, a wavelength where organic tissues barely absorb (Photothermal therapy).

The first part of the thesis involves the synthesis and characterization of various necessary precursors, including a POM incorporating alendronate as BP (Mo_4Al_2) and another incorporating zoledronate (Mo_8Zol_4), as well as the spherical gold nanoparticles

necessary for the subsequent growth of AuNS. Two types of AuNS will then be obtained and extensively characterized using each of the two previously synthesized POM. The presence of POM and bisphosphonate ligand on the surface of nanoparticles has been observed by several methods, such as PM-IRRAS, STEM-EDX, ICP-OES, and XPS. The plasmonic band wavelength has been modulated depending on the seed-to-gold ratio in the two biological windows of the near-infrared. For AuNS obtained with Mo_4Al_2 as well as different precursors, cytotoxicity tests at 24 and 120 hours were performed on two cancerous cell lines. The anticancer activity of the bisphosphonate has been preserved in both POM and AuNS; more importantly, a synergistic effect between chemotherapy and photothermal therapy has been observed, dramatically reducing the IC_{50} . For both types of AuNS, cytotoxicity tests were conducted on non-cancerous cells at 24 and 120 hours, demonstrating increased toxicity of AuNS functionalized with Mo_8Zol_4 .

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse : le Professeur Pedro de Oliveira, le docteur Fabienne Testard, ainsi que les docteurs Fayna Mammeri et Mona Treguer-Delapierre en leur qualité de rapporteurs. Je tiens aussi à remercier le Professeur Emmanuel Cadot, le Professeur Hélène Pernot et le Docteur Vincent Vivier de m'avoir accueilli au sein de leur équipe respective (MIM de l'Institut Lavoisier de Versailles et le LRS de Sorbonne Université).

Je voudrais sincèrement remercier mon équipe encadrante : Anne Dolbecq, ma directrice de thèse, pour avoir accepté de diriger ma thèse et pour son encadrement, principalement sur la partie « POM ». Pierre Mialane, mon co-directeur, pour l'aide qu'il m'a apportée tant au niveau théorique qu'expérimental. Souhir Boujday, co-encadrante, pour m'avoir fait profiter de son expertise dans le passionnant monde nanométrique. Bien sûr, Anne Vallée qui m'a guidé à chaque moment tout au long de ces 3 ans.

Je remercie également le Ministère des sciences colombien pour le prêt (« pardonable ») qui m'a permis de venir en France pour effectuer ma thèse.

Je tiens également à remercier les différents collaborateurs qui ont contribué à cette thèse : Claire Wilhelm de l'Institut Curie pour les tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses, Flavien Boudreux pour les nombreuses après-midis passées à réaliser des analyses par ICP sur mes échantillons, Ferdaous Ben Romdhane pour m'avoir formé sur l'utilisation du MET et pour les superbes images qu'elle a prises en utilisant différentes techniques comme l'HAADF et le STEM-EDX, Antoine Miche pour les mesures sur XPS, Jean-Michel Guigner pour la cryo-TEM, Michèle Salmain et Benoit Bertrand pour m'aider avec les tests de cytotoxicité sur cellules non cancéreuses, Vincent Vivier pour son aide précieuse dans la partie expérimentale de l'électrochimie, ainsi que Rim, Denisa et Lola, les trois stagiaires qui ont travaillé sur ce projet.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont rendu mon séjour dans les laboratoires très agréable. Plus que des collègues, ce sont des amis. À Versailles, je remercie notamment Jonathan, Ali, Maxence, Jason, Gabrielle et Cédric. À Sorbonne, je remercie particulièrement Walid, Sara, Valentin, Manon, Albert, Ana et Nawres. Enfin, bien sûr, présent dans les deux laboratoires, je remercie sincèrement Ioanna.

Comme toujours, je souhaite remercier ma famille qui est présente à tout moment pour partager les bons et les moins bons moments. Bien sûr, ma mère Fabiola et mon père Hernan, ainsi que mes deux sœurs, Valentina et Ana. Évidemment, le nouvel arrivé dans la famille, le petit Edson. Ma cousine Tatiana et sa merveilleuse famille, mon cousin Ramiro ainsi que sa femme, son fils et ses parents.

Finalement, mais non moins important, je remercie ma femme, Luisa, qui me donne de la force chaque jour.

Table des matières

Liste des abreviatures	9
Introduction	11
Chapitre 1 : Repères bibliographiques	15
1 Les nanoparticules d'or (AuNP)	16
1.1 Introduction générale.....	16
1.2 Propriétés des nanoparticules d'or.....	17
1.3 Applications biomédicales des nanoparticules d'or	19
2 Nanoétoiles d'or (AuNS)	25
2.1 Applications des AuNS.....	25
2.2 Synthèse des AuNS.....	30
3 Polyoxometallates.....	37
3.1 Introduction.....	37
3.2 Fonctionnalisation.....	38
4 Composites AuNP-POM.....	43
4.1 Obtention des composites AuNP-POM.....	43
4.2 Application des composites AuNP-POM	46
5 Références	50
Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des précurseurs	68
1 Introduction	69
2 Synthèses des germes.....	70
2.1 Germes (GA) selon la référence Yuan <i>et al.</i> (2012)	72
2.2 Germes (GB) selon la référence Zabetakis <i>et al.</i> (2012)	73
2.3 Germes (GC) selon la référence Sivaraman <i>et al.</i> (2011)	77
2.4 Germes (GD) selon la référence Ben Haddada <i>et al.</i> (2016).....	78
2.5 Discussion sur les différentes synthèses de germes	82
3 Synthèse et caractérisation des polyoxométallates	83
3.1 Polyoxomolybdate réduit hybride Mo ₄ Al ₂	83
3.2 Polyoxomolybdate réduit hybride Mo ₈ ZO ₄	87

3.3	Comparaison entre les POMo Mo ₄ Al _e ₂ et Mo ₈ Zol ₄	91
4	Conclusion	93
5	Références	94

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₄Al_e₂ comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses.....97

1	Introduction	98
2	Synthèse et caractérisations des AuNS@Mo ₄ Al _e ₂	100
2.1	Paramètres de synthèse.....	100
2.2	Cinétique de synthèse des AuNS@Mo ₄ Al _e ₂	101
2.3	Reproductibilité de la synthèse.....	102
2.4	Lavage et concentration	102
2.5	Caractérisation de la morphologie des AuNS@Mo ₄ Al _e ₂	104
2.6	Caractérisation de la surface des AuNS@Mo ₄ Al _e ₂	107
2.7	Modulation de la morphologie et de la bande plasmon des AuNS@Mo ₄ Al _e ₂ 111	
3	Tests de cytotoxicité	114
3.1	Stabilité des AuNS@Mo ₄ Al _e ₂ dans le milieu de culture.....	114
3.2	Tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses.....	117
3.3	Tests de cytotoxicité sur cellules non-cancéreuses.....	125
4	Conclusions	128
5	References	130

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant 133

1	Introduction	134
2	Synthèse et caractérisation des AuNS@Mo ₈ Zol ₄	135
2.1	Cinétique de synthèse	135
2.2	Reproductibilité de la synthèse.....	137
2.3	Lavage et concentration	137
2.4	Caractérisation de la morphologie des AuNS@Mo ₈ Zol ₄	139
2.5	Caractérisation de la surface des AuNS@Mo ₈ Zol ₄	142
2.6	Modulation de la morphologie et de la bande plasmon des AuNS@Mo ₈ Zol ₄	146

3	Tests de cytotoxicité	152
4	Conclusions	155
5	References	157

Conclusion générale et perspectives159

Matériels et méthodes163

1	Synthèse des germes.....	163
1.1	Germes (GA) selon la référence Yuan <i>et al.</i> (2012)	163
1.2	Germes (GB) selon la référence Zabetakis <i>et al.</i> (2012)	163
1.3	Germes (GC) selon la référence Sivaraman <i>et al.</i> (2011)	164
1.4	Germes (GD) selon la référence Ben Haddada <i>et al.</i> (2016).....	164
2	Synthèse des polyoxométallates hybrides	166
2.1	Synthèse du polyoxomolybdate hybride Mo_4Al_2	166
2.2	Synthèse du polyoxomolybdate hybride Mo_8Zol_4	167
3	Synthèse des composites AuNS@POM	169
3.1	Synthèse des composites AuNS@ Mo_4Al_2	169
3.2	Synthèse des composites AuNS@ Mo_8Zol_4	169
4	Techniques de caractérisation.....	171
5	Références	175

Liste des abreviatures

$^1\text{O}_2$	oxygène singulet
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ale	Alendronate
ATG	Analyse thermogravimétrique
AuNP	Nanoparticules d'or
AuNS	Nano-étoiles d'or
BP	Bisphosphonates
CTAB	Bromure de cétrimonium
DLS	Dynamic light scattering
DRX	Diffraction des rayons X
EDL	electrical double layer
EPR	Enhanced permeability and retention effect
FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICP-OES	Inductively coupled plasma – Optical emission spectrometry
IR	Infrarouge
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance
MTX	mitoxantrone
NIR	Near-infrared
NP	Nanoparticule
PDT	thérapie photodynamique
PEG	polyéthylène glycol
PM-IRRAS	Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase

POM	Polyoxométallate
POMo	Polyoxomolybdate
PTT	Photothermal therapy
Ris	Risedronate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	espèces réactives de l'oxygène
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
UPD	underpotential deposition
UV	Ultraviolet
X-EDS	X-ray Energy-dispersive spectroscopy
XPS	X-ray photoelectron spectrometry
Zol	Zoledronate

Introduction

Au cours des dernières décennies, il est devenu évident que le cancer représente un des principaux problèmes de santé publique auquel l'humanité est confrontée. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il y a eu en 2022 dans le monde 20 millions nouveaux cas de cancer (dont 483 568 en France, soit 2,2% des cas), et 9,7 millions de morts attribuables à cette maladie (dont 190 612 en France soit 2,0% des cas). [1] Bien que la distribution des types de cancers varie d'un pays à l'autre, les deux cancers les plus répandus dans le monde sont ceux du sein et du poumon. [2]

Les traitements conventionnels contre le cancer incluent l'extirpation chirurgicale, la chimiothérapie et la radiothérapie. Toutefois, ces méthodes présentent des limitations. La chirurgie est limitée par l'accessibilité des tumeurs, alors que la chimiothérapie et la radiothérapie conduisent à de forts effets secondaires indésirables. [3] Cela conduit la communauté scientifique à rechercher des traitements alternatifs qui puissent permettre d'atteindre facilement les tumeurs au niveau des différents organes et qui soient peu invasifs. L'utilisation combinée de nanoparticules d'or (AuNP) et de polyoxométallates (POM) représente une stratégie prometteuse de thérapie combinatoire. [4]

Les nanoparticules d'or font l'objet d'études approfondies, favorisées par la facilité de synthèse de ces objets depuis la publication en 1951 par Turkevitch de l'article "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold".[5] Cela a permis de montrer ces dernières décennies que celles-ci possédaient des propriétés pouvant ouvrir la voie à leur application dans de nombreux domaines. On s'intéressera en particulier aux propriétés qui leur permettent d'être impliquées dans différents processus thérapeutiques, telles que leur rapport surface/volume extrêmement élevé qui caractérise tout type de nanoparticule, permettant de les fonctionnaliser avec un médicament pour améliorer l'intégration du médicament dans des systèmes biologiques et le phénomène de résonance de plasmon de surface localisé (LSPR), indispensable à leur utilisation en photothérapie.[6] La photothérapie consiste à utiliser la lumière à des

Introduction

fins thérapeutiques, on distingue deux classes. La première est la thérapie photothermique (PTT) qui consiste en la transformation de la lumière irradiée en énergie thermique, produisant une hyperthermie, c'est-à-dire, une augmentation locale de la température. La deuxième est la thérapie photodynamique (PDT) qui consiste en la production d'oxygène singulet qui par sa réactivité accrue peut détruite les cellules cancéreuses.

Les AuNP les plus répandues sont sphériques, correspondant à la géométrie pour laquelle la relation surface/volume est la plus basse et donc à une énergie de surface minimale,[7] elles sont caractérisées par une bande LSPR dans le visible, ce qui peut poser des problèmes pour les applications en photothérapie dans des systèmes biologiques car les tissus organiques absorbent la lumière de ce domaine de longueur d'onde. Un décalage du LSPR de celles-ci est donc souhaitable, ce qui peut être obtenu en considérant des AuNP présentant des morphologies non sphériques. Ainsi, les nanoparticules en forme d'étoiles (AuNS, de l'anglais Au nanostars), découvertes beaucoup plus récemment, possèdent une bande plasmon dont la longueur d'onde peut correspondre à la fenêtre biologique du proche infrarouge (NIR).[8]

D'autre part, les polyoxométallates sont des molécules inorganiques constituées de métaux de transition à hauts degrés d'oxydation ($W^{V,VI}$, $Mo^{V,VI}$, $V^{IV,V}, \dots$) connectés via des groupements oxo et hydroxo et qui peuvent être vus comme des réservoirs d'électrons. Ils sont à l'heure actuelle principalement utilisés pour des applications en catalyse. Cependant, leurs propriétés anticancéreuses ont pu être mises en évidence, les POM hybrides organique-inorganiques présentant les activités les plus prometteuses. Ainsi, des POM incorporant des ligands bisphosphonates (BP) ont pu montrer une activité antitumorale élevée *in vitro*. [9] De plus, ces POM pouvant être constitués de centres métalliques réduits (W^V , Mo^V , V^{IV}, \dots), il est possible de les utiliser comme agents réducteurs lors de la synthèse de nanosystèmes. Enfin, leur charge négative leur permet de former des liaisons électrostatiques avec des nanoparticules d'or dont la surface est chargée positivement, agissant alors comme stabilisants pour ces dernières.

L'objectif de ces travaux de thèse est donc d'explorer le potentiel des AuNS recouvertes de POM hybrides dans le traitement combinatoire du cancer grâce aux propriétés

Introduction

optiques des AuNS et aux propriétés chimiothérapeutiques des POM.

Le premier chapitre sera consacré à l'état de l'art des AuNP, présentant tout d'abord les différentes voies de synthèses, les méthodes de caractérisation et leurs principales applications, avec une attention spéciale portée aux AuNS obtenues sans surfactant, celles-ci présentant un intérêt particulier pour des applications biomédicales. Après cela, une introduction générale sur les POM et leur fonctionnalisation avec des ligands BP sera suivie de la présentation de leurs propriétés anticancéreuses, avant de conclure sur les méthodes synthétiques permettant l'obtention de composites AuNP-POM et les propriétés de ces systèmes.

Le deuxième chapitre portera sur la synthèse et la caractérisation des précurseurs nécessaires à la synthèse des nanoétoiles, comprenant les germes (nanoparticules d'or sphériques) ainsi que les polyoxométallates (Mo_4Al_2 et Mo_8Zol_4) qui seront utilisés comme agents réducteurs.

Le troisième chapitre abordera la synthèse et la caractérisation d'AuNS obtenues en utilisant le POMo réduit Mo_4Al_2 et présentera les tests de cytotoxicité réalisés sur différentes lignées cellulaires cancéreuses et non cancéreuses, avec et sans irradiation laser dans le proche infrarouge.

Le quatrième chapitre présentera la synthèse d'AuNS obtenues en utilisant cette fois le POM réduit Mo_8Zol_4 , qui comporte des ligands zolédronate reconnus comme présentant une activité anti-tumorale très supérieure à celle du ligand alendronate constituant le POM Mo_4Al_2 et présenté au chapitre III. Des tests de cytotoxicité préliminaires seront également exposés.

Enfin, le manuscrit finira sur une conclusion générale et des annexes.

Références

- [1] W. H. O. (OMS), "Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2022," Feb. 2024. Accessed: Apr. 03, 2024. [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=population&populations=250&types=0_1&sort_by=value1&key=total
- [2] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA Cancer J Clin*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015, doi: 10.3322/caac.21262.
- [3] A. Hamilton and G. Hortobagyi, "Chemotherapy: What progress in the last 5 years?," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 8, pp. 1760–1775, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.10.034.
- [4] S. TOMANE, "Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates / nanoparticules métalliques pour des applications biomédicales," 2021.
- [5] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no. 0, pp. 55–75, 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.
- [6] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim, and H. Park, "Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy," *Front Chem*, vol. 7, no. APR, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00167.
- [7] J. Faraudo and F. Bresme, "Interplay between thermodynamics and geometry in the adsorption of non-spherical nanoparticles at liquid/liquid interfaces," in *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics*, 2004, pp. 397–404. doi: 10.1515/JNETDY.2004.064.
- [8] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, and L. M. Liz-Marzán, "Nanostars shine bright for you. Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 16, no. 2, pp. 118–127, 2011, doi: 10.1016/j.cocis.2010.12.007.
- [9] H. El Moll *et al.*, "Polyoxometalates Functionalized by Bisphosphonate Ligands: Synthesis, Structural, Magnetic and Spectroscopic Characterizations and Activity on Tumor Cell Lines," *Inorg Chem*, vol. 51, no. 14, pp. 7921–7931, 2012, doi: 10.1021/ic3010079.Polyoxometalates.

Chapitre 1 : Repères bibliographiques

Ce chapitre vise à fournir des références bibliographiques permettant d'aborder les domaines des nanoétoiles d'or et des polyoxométallates. Il est structuré en quatre parties distinctes.

La première partie abordera les généralités concernant les nanoparticules d'or. La deuxième partie se concentrera sur les nanoparticules d'or de forme étoilée. La troisième partie présentera les bases de la chimie des polyoxométallates, en mettant particulièrement l'accent sur ceux fonctionnalisés par des ligands bisphosphonates. Enfin, la quatrième partie décrira l'utilisation combinée des nanoparticules d'or et des polyoxométallates.

1 Les nanoparticules d'or (AuNP)

1.1 Introduction générale

Au fil de l'histoire, l'or a joué un rôle fondamental, non seulement sur le plan économique, mais également sur le plan culturel. Depuis les débuts de l'humanité, il a captivé l'imagination en raison de sa brillance, de sa malléabilité, et surtout de sa rareté. Symbole de richesse, de pouvoir et de beauté, il a orné une multitude d'objets précieux, de monuments, de tombes de pharaons, et de cathédrales médiévales. Dans les civilisations amérindiennes précoloniales, il revêt même une dimension spirituelle, voire sacrée. Souvent au cœur de leurs rituels, il symbolise le soleil et la fertilité (Figure 1 a).[1] Son utilisation en tant que matériau précieux a perduré à travers les âges, touchant pratiquement toutes les civilisations jusqu'à nos jours.

L'élément atomique 79, au-delà de ses utilisations à l'échelle macroscopique, a été exploité sous forme nanométrique pendant des siècles, bien avant l'avènement des nanotechnologies. De nombreux vitraux et porcelaines médiévaux tirent leurs teintes de nanoparticules métalliques, notamment de cuivre, d'argent, mais aussi d'or pour obtenir la couleur pourpre.[2] Cependant, l'objet le plus célèbre demeure la fameuse « coupe du roi Lycurgue », une coupe romaine dichroïque (rouge en transmission et verte en



Figure 1: a) Poporo: pièce rituelle en or massif utilisé par la culture amérindienne Quimbaya. b) et c) Coupe de Lycurgue incorporant de l'or nanométrique; rouge en transmission (b) et verte en réflexion (c)

réflexion), datant du IV^e siècle et conservée au Musée britannique, qui contient des nanoparticules d'or et d'argent (Figure 1 b et c).

Il existe deux voies pour obtenir des nanoparticules d'or (AuNP). La première, appelé "Top-down", consiste à fragmenter l'or en bulk, par exemple par ablation laser[3] ou pulvérisation ionique.[4] La seconde, connue sous le nom de "Bottom-up", consiste à produire les nanoparticules d'or par assemblage atomique en réduisant un précurseur d'or (Figure 2). La méthode la plus couramment utilisée pour réduire le précurseur est la réduction chimique.[5],[6] Il existe cependant d'autres formes comme la sonochimie (réduction du précurseur en utilisant des ultrasons),[7] la photochimie[8] ou bien l'électrochimie.[9]

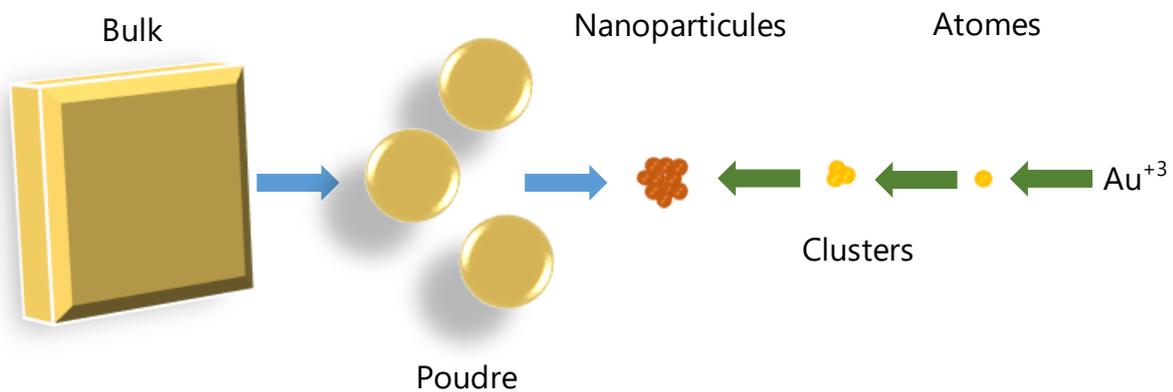


Figure 2: Les deux voies d'obtention des AuNP. Flèches bleues pour la méthode Top-down. Flèches vertes pour la méthode Bottom-up.

Ce n'est qu'en 1857 que Faraday développa des protocoles pour obtenir de l'or colloïdal en utilisant l'approche "Bottom-up". Ces protocoles furent ensuite perfectionnés par Turkevich en 1951. [11] Depuis lors, la plupart des équipes de recherche impliquées dans ce domaine ont développé leurs propres protocoles dérivant de ceux-ci.[10]

1.2 Propriétés des nanoparticules d'or

1.2.1 Description du phénomène physique de résonance du plasmon de surface localisé (LSPR)

Les propriétés optiques très intéressantes des nanoparticules métalliques sont notamment dues à un phénomène connu sous le nom de résonance plasmonique de surface (SPR).[11]. Ce phénomène provient de l'interaction des ondes électromagnétiques avec la surface des nanoparticules, provoquant une oscillation des

électrons présents à la surface. Les différences de propriétés optiques entre les nanoparticules et les particules macroscopiques de même composition chimique sont principalement attribuables au rapport surface/volume très élevée pour les nanosystèmes.[12]

En 1957, R.H. Ritchie prévoit l'existence du plasmon de surface.[13] Ce phénomène découle de l'oscillation collective des électrons d'un métal lorsqu'il est excité par le champ électrique d'une onde électromagnétique. Dans le cas des nanoparticules, où le plasmon est confiné dans une région de taille inférieure à la longueur d'onde, on parle de LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance) (Figure 3). La fréquence d'oscillation est déterminée par la forme et la taille de la distribution de charge, et l'oscillation collective des électrons est appelée résonance plasmonique dipolaire de la particule. [11] Pour les AuNP, la LSPR se situe généralement dans le domaine du visible, conférant une couleur caractéristique à la solution colloïdale en raison de l'absorption très forte de la lumière.

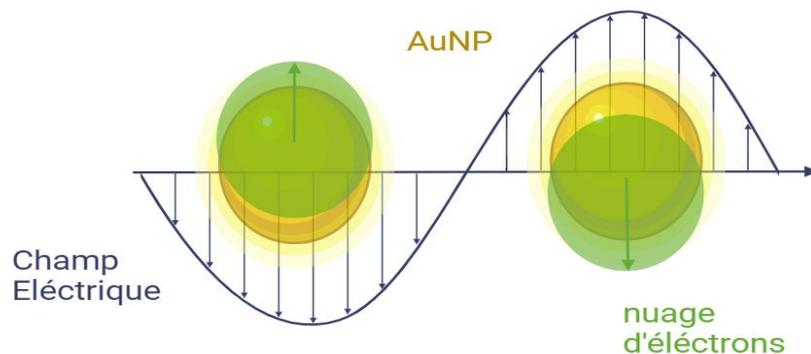


Figure 3: Résonance plasmon de surface. Créé avec BioRender.com

Après absorption, le plasmon de surface peut émettre de manière radiative, provoquant une diffusion de la lumière, ou de manière non-radiative en convertissant la lumière absorbée en chaleur.[12]

Plusieurs facteurs influencent la longueur d'onde à laquelle se produit la LSPR, notamment la forme et la taille des nanoparticules. Par exemple, pour des nanoparticules d'or sphériques de quelques dizaines de nanomètres de diamètre, la LSPR se situe dans le domaine du visible, typiquement entre 520 et 550 nm.[14] En augmentant le diamètre de telles AuNP sphériques, la bande plasmon se déplace vers le rouge. Mais par ailleurs,

la morphologie du nano-objet (pyramide, étoile, bâtonnet, cube, etc.) a une influence notable sur la longueur d'onde de cette bande.

1.3 Applications biomédicales des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sphériques sont reconnues depuis longtemps comme pouvant être des nanomatériaux de choix pour une grande variété d'applications[15] comme la peinture,[16] l'industrie alimentaire,[17] la détection du cancer,[18] l'industrie cosmétique[19], la détection de protéines et de métaux lourds,[20] ou bien comme agent de contraste pour la tomographie à rayons X ou photo acoustique [21] entre autres. De plus, la LSPR peut générer un champ électrique local intense au voisinage des nanoparticules d'or et ainsi induire un signal de diffusion Raman exalté de surface (SERS) pour la détection de molécules uniques.[22] La Figure 4 regroupe les applications potentielles des AuNP en matière de diagnostic et de traitement du cancer.[23] Les travaux présentés dans cette thèse se concentrent sur deux applications spécifiques, la délivrance de médicaments et la photothérapie.

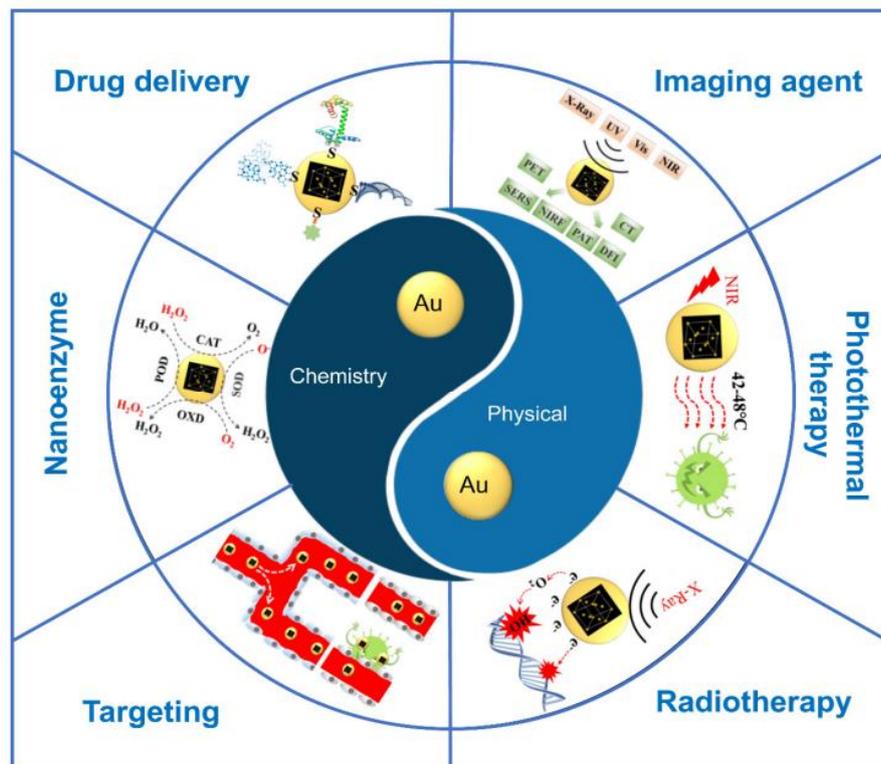


Figure 4: Applications théranostiques des AuNP dans le traitement du cancer. Reproduit de Bai et al. (2020) [23]

1.3.1 Délivrance de médicaments

Chapitre 1 : Repères bibliographiques

La vectorisation de médicaments via des AuNP permet de remédier à un certain nombre de limites présentées par un grand nombre de médicaments telles que la faible pénétration cellulaire, [24],[25] leur instabilité dans des milieux biologiques tels que le sang,[26],[27] ou bien le manque de spécificité cellulaire et tissulaire. [28] Grâce à cela, les doses des médicaments peuvent être beaucoup plus faibles pour un effet analogue tout en diminuant le risque de toxicité et d'effets secondaires.[29] Deux types de vectorisation sont possible. Le premier est la vectorisation passive (effet EPR)[30], [31], [32] qui ne fait appel qu'aux propriétés intrinsèques des AuNP pour leur pénétration et accumulation au sein des cellules. Le second est la vectorisation active, qui consiste à fonctionnaliser des AuNP par des anticorps ou des peptides spécifiques pour augmenter l'affinité envers le tissu ciblé.[33], [34] La délivrance de médicaments implique le dépôt à la surface d'AuNP de molécules thérapeutiques ayant par exemple une activité antibactérienne ou antitumorale. Deux types d'interactions sont possibles entre les AuNP et les agents thérapeutiques, des interactions covalentes ou/et des interactions de type électrostatique ou de van der Waals.[35] Les molécules actives peuvent être utilisées directement au moment de la synthèse des AuNP, agissant comme réducteur et/ou stabilisant,[36] remplacer un ligand préexistant ou bien encore se lier à ce dernier.[35] (Figure 5)

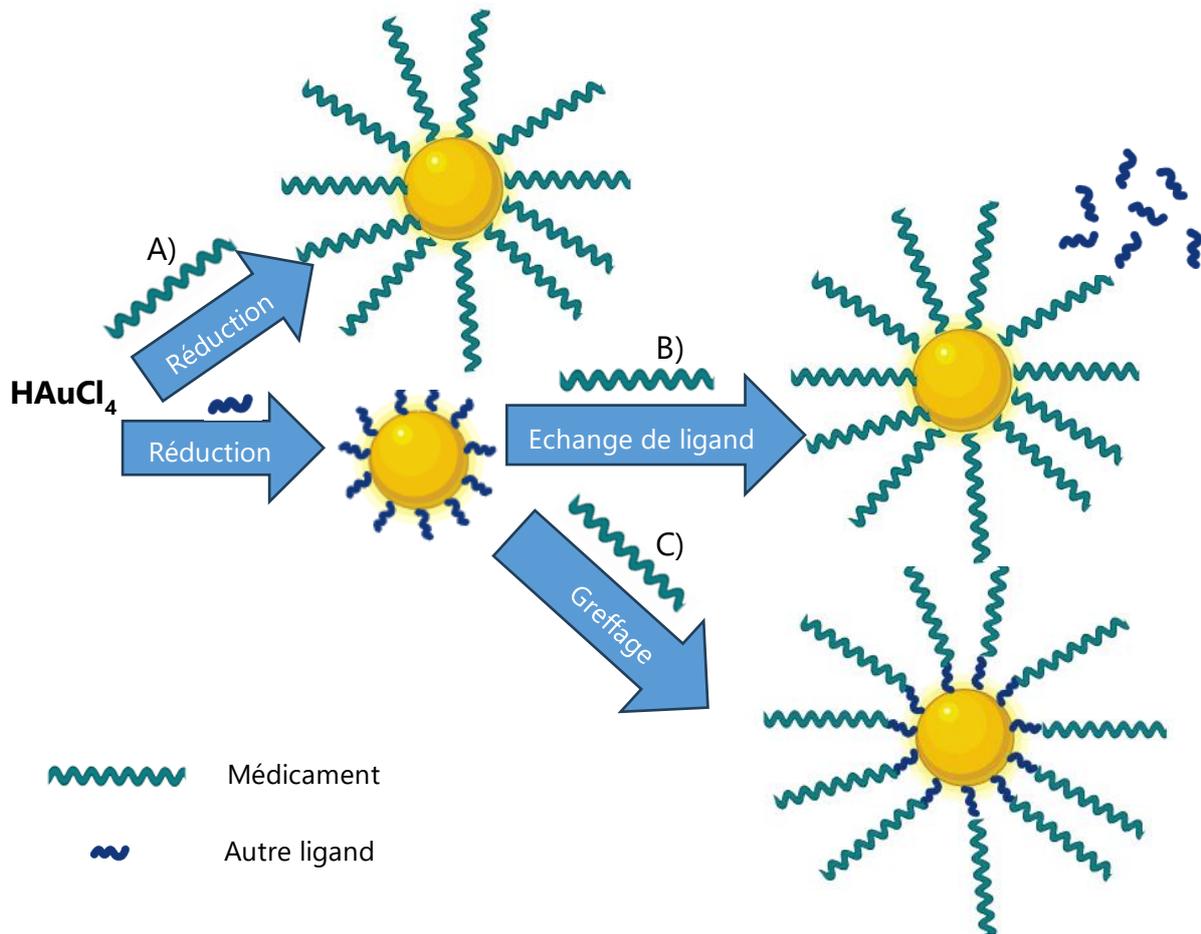


Figure 5: Chargement de médicament sur une AuNP. Créé avec Biorender. A) Le chargement s'effectue durant la synthèse de l'AuNP, le médicament jouant le rôle de stabilisant et/ou de réducteur. B) Synthèse de l'AuNP, puis le médicament remplace le ligand stabilisant. C) Synthèse de l'AuNP, puis le médicament se connecte au ligand stabilisant.

1.3.2 Photothérapies

La photothérapie consiste en l'utilisation de l'énergie sous forme de lumière soit afin d'augmenter localement la température (hyperthermie on parlera alors de thérapie photothermique (PTT)), soit pour produire de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) (on parlera alors de thérapie photodynamique (PDT)).

L'utilisation de la chaleur comme traitement du cancer s'est développée grâce à la découverte chez certains patients atteint de cette maladie et d'une infection entraînant une forte fièvre d'une réduction des symptômes du cancer suite à une importante régression des tumeurs. [37] De plus, il est avéré que l'hyperthermie contribue à rendre les tumeurs plus sensibles à la radiothérapie et à la chimiothérapie.[38], [39] Les AuNP

présentent plusieurs caractéristiques qui les rendent très attractives pour le traitement photothermique du cancer. Premièrement, elles peuvent être administrées directement au niveau de la tumeur et être activées via une irradiation à une longueur d'onde correspondant à leur bande plasmon.[40] Elles permettent donc une thérapie ciblée. Mais de plus elles sont très peu toxiques et facilement fonctionnalisables, permettant d'associer la photothermie à d'autres fonctionnalités, via par exemple l'adhésion de marqueurs moléculaires qui améliorent la sélectivité envers les cellules cancéreuses, réduisant ainsi le risque de brûlure ou d'inflammation des tissus sains.[41]

L'absorption de lumière par les AuNP provoque donc une excitation des électrons libres de la bande plasmonique. L'impulsion d'électrons chauds qui en résulte subit un refroidissement rapide par collisions avec la structure d'or et chauffe instantanément les nanosystèmes à des températures de plusieurs milliers de degrés.[42],[43] Cette chaleur est ensuite transférée aux cellules environnantes et peut induire une hyperthermie locale, entraînant la mort cellulaire aux environs de 42°C.[44], [45] En comparaison avec les vaisseaux sanguins des tissus normaux, les vaisseaux sanguins des tumeurs présentent de nombreuses aspérités au niveau de la paroi, entraînant un blocage de l'approvisionnement en sang à l'intérieur du tissu tumoral. Ainsi, la capacité de refroidissement du tissu tumoral est inférieure à celle du tissu normal. Par conséquent, la chaleur produite lors du processus de conversion d'énergie lumineuse en énergie thermique a plus de chances de s'accumuler dans la tumeur (Figure 6).[23], [46] L'augmentation de température, et donc l'efficacité de la PTT dépend bien évidemment de plusieurs paramètres liés non seulement aux AuNP (concentration, longueur d'onde de la bande plasmon, environnement chimique, forme, etc.) mais bien sûr également au laser utilisé (laser pulsé ou continu, longueur d'onde émise, puissance, durée d'exposition).

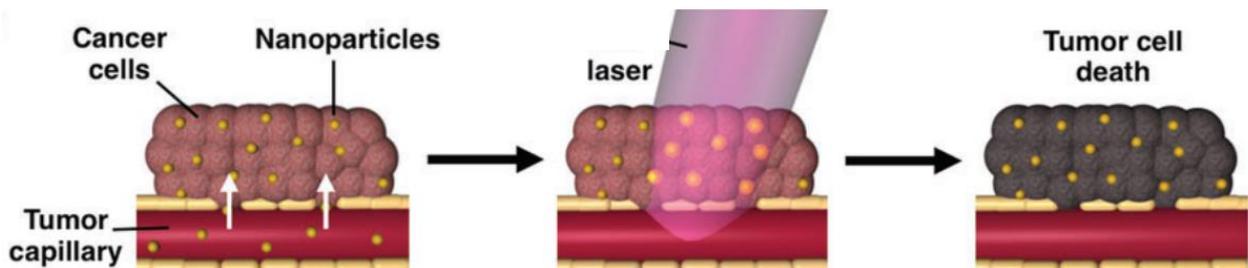


Figure 6: Schématisation du principe de la photothermie. Extrait de Riley et Day (2017). [39]

Pour que la PTT soit le plus efficace possible, la longueur d'onde du laser doit donc être proche de la bande plasmon des nanoparticules utilisées. Cependant, les nanoparticules d'or (AuNP) sphériques, comme mentionné précédemment, présentent une bande plasmonique dans le domaine du visible, ce qui est problématique étant donné l'absorption significative des tissus biologiques à ces longueurs d'onde : pour une photothérapie efficace, il est crucial d'opter pour des longueurs d'onde où l'absorption par les tissus biologiques est minimale. Deux régions particulièrement importantes à cet égard se situent dans le proche infrarouge, étant connues sous les noms de première et deuxième fenêtres biologiques du proche infrarouge et abrégées NIR I (entre 650 et 950 nm) et NIR II (entre 1000 et 1350 nm), respectivement (Figure7).[47]

Afin de décaler la bande plasmon vers l'une de ces fenêtres biologiques, une option envisageable est d'augmenter le diamètre des nanoparticules d'or (AuNP). Cependant, les AuNP ayant un diamètre supérieur à 100 nm présentent des inconvénients majeurs. Non seulement elles ont une mauvaise stabilité colloïdale en solution, mais elles manifestent également une réponse plasmonique de plus en plus faible. De plus, ces particules de plus grande taille sont moins aisément internalisables par les cellules.[42] En outre, elles deviennent moins efficaces pour la délivrance de médicaments en raison de la diminution de la relation surface/volume, où la surface augmente avec le carré du rayon tandis que le volume augmente avec son cube.

La deuxième façon de décaler la bande plasmon dans le proche infrarouge est de modifier la géométrie des AuNP.[48], [49] Plusieurs morphologies ont été considérées. Par exemple des nanotriangles présentant une bande plasmon vers 650 nm, donc proche de l'infrarouge, ont été étudiés,[50],[51] ainsi que des nanosphères creuses (HAuNP) possédant une bande plasmon entre 600 et 800 nm,[52],[53] ou bien encore des nanobâtonnets (AuNR) qui eux possèdent deux bandes plasmoniques, la première vers 530 nm et la seconde, plus intense, entre 700 et 1200 nm en fonction du rapport de forme. [54], [55] Bien que ces géométries présentent un grand potentiel, les travaux de cette thèse se sont concentrés sur une autre forme tout aussi prometteuse : les nanoétoiles d'or (AuNS).

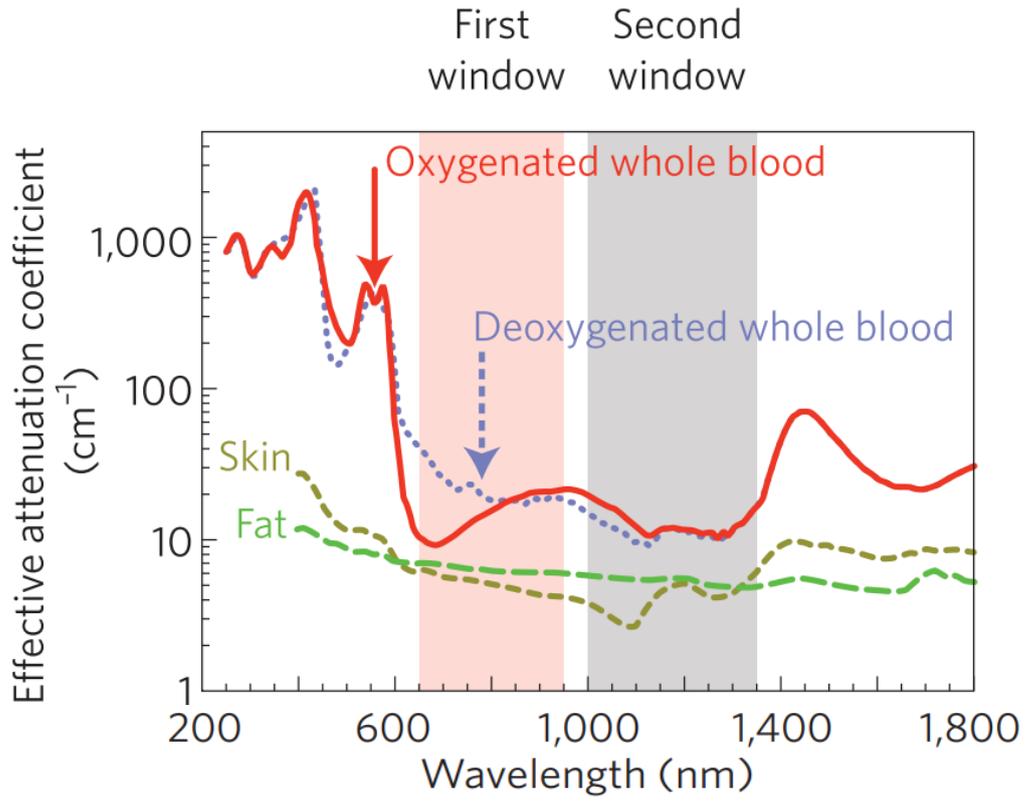


Figure 7: Fenêtres biologiques du proche infrarouge, reproduit de Smith et al. (2009) [47]

2 Nanoétoiles d'or (AuNS)

Les nanoétoiles présentent une géométrie particulièrement intéressante pour des applications thérapeutiques car elles possèdent une résonance de la bande plasmon ajustable dans la première fenêtre biologique du proche infrarouge (NIR I) entre 650 et 950 nm.[47], [56], [57] Cette bande plasmon est le résultat de l'hybridation du plasmon de chaque branche.[58] En plus de la bande plasmon principale, une bande secondaire peut apparaître entre 500 et 600 nm.[59] De plus, le rapport surface/volume est de manière significative plus élevé que pour des NP sphériques, entraînant une augmentation de la quantité de médicament chargeable sur les nanostars.

2.1 Applications des AuNS

Les AuNS peuvent donc être utilisées dans la plupart des applications qui ont déjà été mentionnées ci-dessus. Cependant, le changement de la réponse plasmonique dû au changement de la morphologie ouvre la voie à d'autres applications pour lesquelles il s'avère que les AuNP sphériques sont peu ou pas adaptées. Par exemple, les AuNP 'branchés' telles que les AuNS pourraient être utiles comme substrat pour des applications en SERS grâce à l'exaltation des champs électromagnétiques sur les pointes.[60], [61], [62], [63] De façon similaire, les AuNS peuvent aussi être utilisées dans l'imagerie photoacoustique.[64] Mais de plus, grâce à la facilité de les post-fonctionnaliser, les AuNS peuvent combiner un grand nombre d'applications L'un des exemples les plus notables est celui décrit dans la publication du groupe de Vo-Dinh « Quintuple-modality (SERS-MRI-CT-TPL-PTT) plasmonic nanoprobe for theranostics » qui décrit des AuNS pour une application thérapeutique, la thérapie photothermique, mais également pour quatre applications différentes de diagnostic (SERS, magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), et two-photon luminescence imaging (TPL).[65] Figure 8)

Les nanoétoiles d'or sont donc une alternative à haut potentiel pour le traitement du cancer non seulement du fait que l'or est biocompatible et facilement fonctionnalisable, mais également parce que la forme étoilée possède une relation surface/volume élevée permettant une charge importante de médicament, mais aussi car le décalage de la bande plasmon dans le proche infrarouge permet de renforcer l'effet

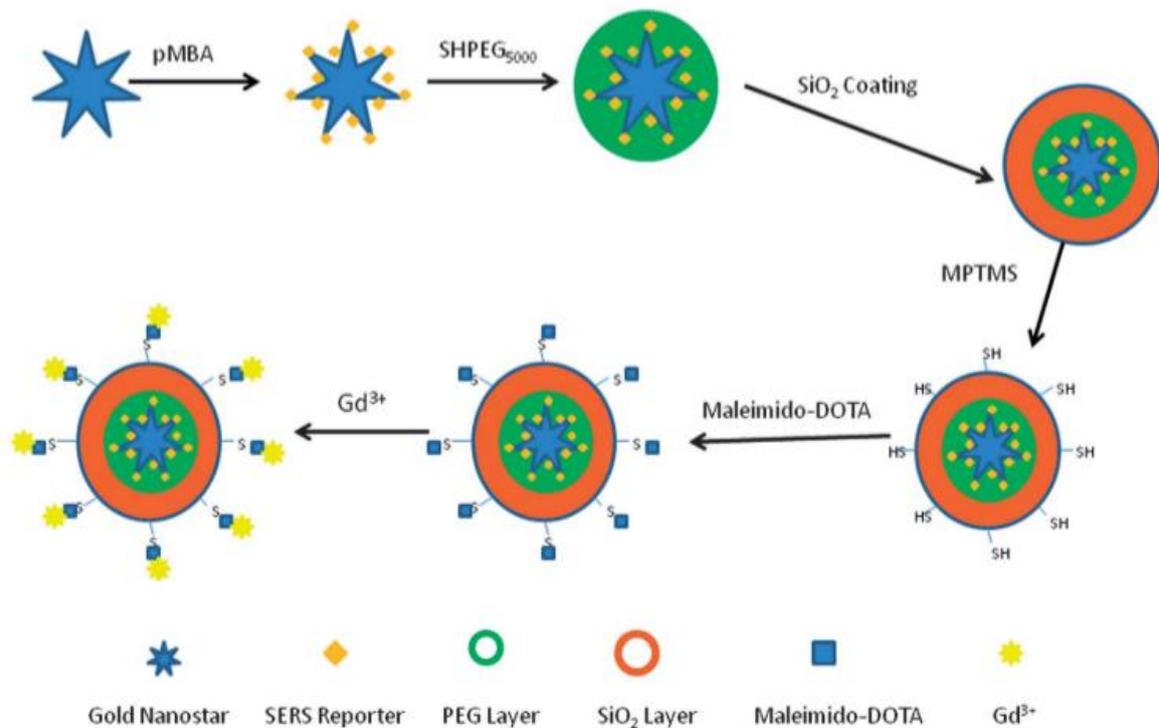


Figure 8: fonctionnalisation d'AuNS conduisant à une quintuple modalité effectuée par le groupe de Vo-Dinh (2013)[65]

photothérapeutique.

2.1.1 Utilisation de AuNS dans la délivrance de médicaments

L'augmentation de la surface spécifique des AuNP ramifiées telles que les AuNS permet donc une charge médicamenteuse plus importante que leurs homologues sphériques. Pour une absorption cellulaire réussie, la morphologie des particules doit cependant tenir compte de deux forces motrices opposées : alors que les particules de plus grande taille offrent des surfaces accrues pour des forces d'adhérence plus importantes entre les particules et les membranes cellulaires, elles augmentent également l'énergie de déformation nécessaire pour que la membrane cellulaire se plie autour de la particule. Les AuNP ramifiées avec une grande surface et un volume relativement faible, devraient

se situer à la limite entre les deux paramètres.[42] Ceci a motivé les travaux de Tian *et al.* qui ont proposé en 2016 une approche théranostique consistant à suivre en temps réel par Raman la délivrance *in vivo* dans des souris du médicament anticancéreux mitoxantrone (MTX) lié à des AuNS recouvertes de polyéthylène glycol (PEG). Après 5 heures il a été observé par ICP-MS que la plupart des AuNS-MTX se sont accumulées principalement dans la tumeur.[66]

Cependant, en raison de la bande plasmon présente dans le proche infrarouge, les nanoparticules d'or sont principalement utilisées pour la thérapie photothermique (ou dans le cadre de thérapies combinatoires). Ces deux cas seront décrits plus précisément dans les paragraphes suivants.

2.1.2 Utilisation de AuNS pour la thérapie Photothermique (PTT)

Une des premières études sur l'utilisation des AuNS pour la PTT a été réalisée par Van de Broek *et al.* en 2011. Cette étude décrit les AuNS comme un nouveau type de AuNP ramifiées, qui absorbe fortement le rayonnement proche infrarouge (NIR). En raison de leur forme irrégulière et de leur rapport surface/volume très élevé, la production de chaleur est considérablement améliorée par rapport aux AuNP sphériques. Ceci peut être justifié considérant que dans le cas des AuNS, le champ électrique entrant pénètre plus facilement à l'intérieur des fines nanostructures, conduisant à une élévation de température plus importante. Van de Broek *et al.* en 2011 ont ainsi synthétisé des AuNS d'environ 60 nm, présentant une bande plasmon autour de 630 nm. Ces AuNS ont ensuite été fonctionnalisées par des anticorps anti-HER2 et anti-PSA. Finalement, des cellules tumorales SKOV3 ont été incubées à différentes concentrations d'AuNS/anticorps et soumises à une irradiation laser émettant à 690 nm (38 W/cm^2 , 5 min), produisant une mort cellulaire confinée dans le champ d'action du laser.[67] En 2012, le groupe de Vo-Dinh a lui grâce à des AuNS fonctionnalisées avec un peptide de pénétration cellulaire (TAT-peptide) obtenu une photothermolysse efficace avec un laser pulsé à basse puissance (850 nm , 0.2 W/cm^2), marquant ainsi une première pour une puissance se situant en dessous du seuil d'exposition admissible.[68]

Bien que les nanoétoiles possèdent habituellement leur bande plasmon localisée dans la première fenêtre biologique du proche infrarouge, certaines études comme celle de

Chapitre 1 : Repères bibliographiques

Pallavicini *et al.* en 2013 ont montré que des AuNS peuvent présenter des bandes plasmon situées dans les deux fenêtres biologiques NIR I et NIR II. Selon cette même étude, l'effet PTT serait plus efficace par irradiation dans la deuxième fenêtre biologique, le rayonnement pénétrant plus profondément les tissus.[43]

En 2014, Jo *et al.* ont réussi à conjuguer deux aptamères sur une même AuNS, l'aptamère anti-PSMA RNA A10 et l'aptamère de type peptide DUP-1 afin de cibler respectivement les cellules positives (PSMA+) et négatives (PSMA-) du cancer de la prostate. Il a pu être montré que cela conduisait à une augmentation significative de la sélectivité des AuNS pour les souches ciblées, les tests PTT ayant été réalisés avec un laser à 808 nm à des puissances variant entre 0,3 et 4 W/cm² (Figure 9).[69]

Finalement, Srinivasan *et al.* (2023), dans l'une des premières études de photothérapie réalisée *in vivo*, ont implanté des cellules tumorales B16F0 et CT2A dans le crâne de souris. Après quelques jours, ils ont administré par voie intraveineuse une solution d'AuNS stabilisée avec du polyéthylène glycol. Vingt-quatre heures plus tard, les souris ont été traitées avec un laser interstitiel (LITT) pulsé (au centre de la tumeur) à 1064 nm et 0,4 W pendant 10 minutes. L'analyse par ICP-MS a révélé que les AuNS se sont accumulées entre 22 et 52 fois plus dans les cellules tumorales que dans les cellules cérébrales normales, permettant ainsi de limiter l'hyperthermie à la tumeur. Les souris ayant reçu l'injection d'AuNS ont enregistré des températures de 58 °C, tandis que le groupe témoin affichait 39 °C. [70]

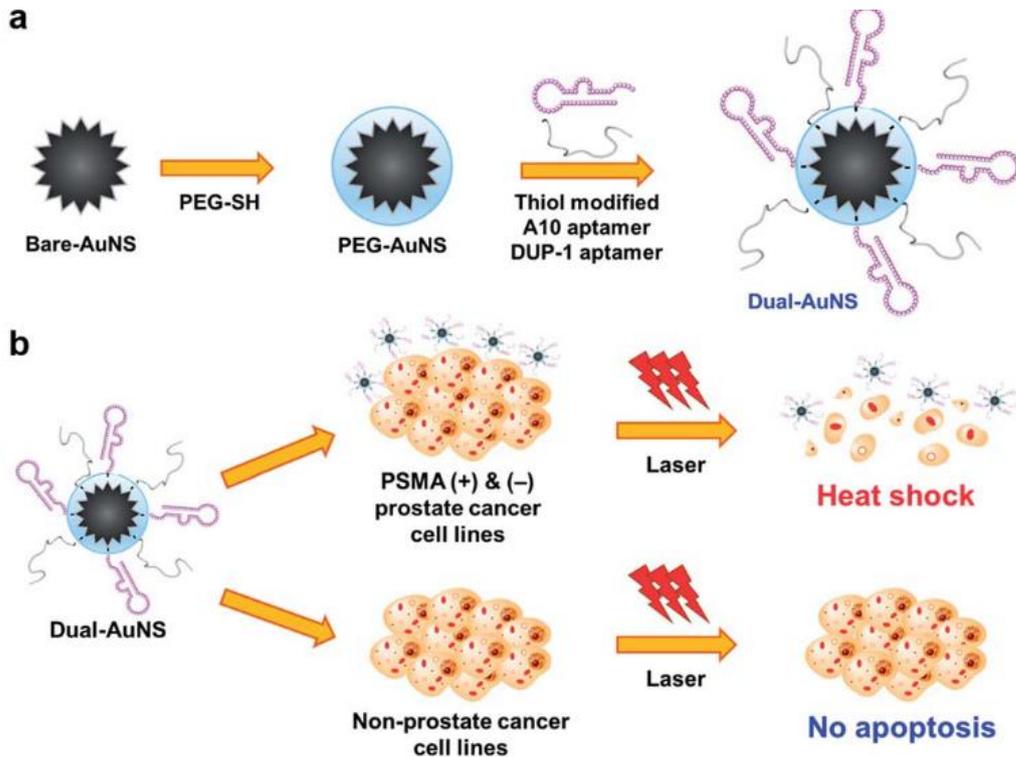


Figure 9: Utilisation de AuNS fonctionnalisées avec des aptamères pour la photothérapie. Prise de Jo *et al.* 2014[69]

2.1.3 Thérapie combinatoire

Plusieurs études, incluant des études *in vivo*, ont mis en évidence qu'il était possible d'utiliser les AuNS à la fois comme agent PTT et pour délivrer des médicaments. Ainsi, en 2019, Montoto *et al.* ont synthétisé des AuNS fonctionnalisées par une molécule photolabile thiolée et postérieurement recouvertes de silice mésoporeuse chargée d'un médicament chimiothérapique, la doxorubicine. Ces nanoparticules étaient ensuite revêtues de régulateurs supramoléculaires de type benzimidazole- β -cyclodextrine, qui sont sensibles aux protons. Après irradiation par une lumière proche infrarouge, le composé photolabile se photodissocie, conduisant à la formation d'acide succinique, induisant ainsi l'ouverture du régulateur et la libération du médicament (Figure 10). Les nanoparticules hybrides ainsi préparées se sont révélées non cytotoxiques pour les cellules cancéreuse HeLa, jusqu'à ce qu'elles soient soumises à une irradiation laser à 808 nm et 3 W/cm² pendant 10 minutes. Cette exposition a entraîné la libération intracellulaire de doxorubicine et une hyperthermie, provoquant une réduction de la viabilité des cellules HeLa de 100% à moins de 20%. Des tests similaires effectués avec les AuNS ne contenant pas de doxorubicine ont montré une viabilité cellulaire finale de

40%, suggérant que la différence de 20% pourrait être attribuée à la libération du médicament.[71]

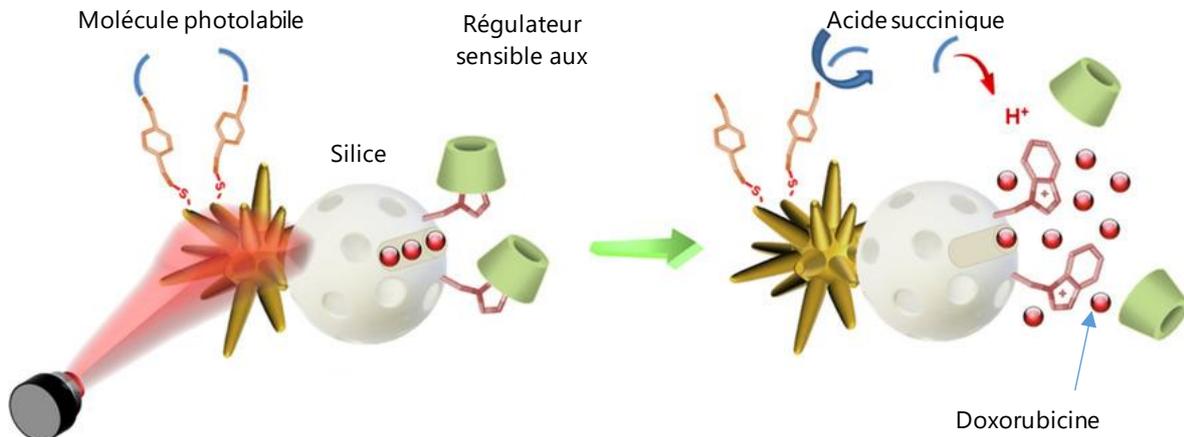


Figure 10: Composite AuNS/silice mésoporeuse pour une thérapie duale. L'irradiation NIR induit la dissociation de la molécule photolabile ce qui conduit à la formation de l'acide succinique, induisant l'ouverture du régulateur supramoléculaire. Extrait de Montoto et al. (2019)[71]

Finalement, en 2020, l'équipe de Miao a fonctionnalisé des AuNS avec des brins d'ADN sur lesquels ils ont chargé de la doxorubicine ainsi qu'un aptamer (AS1411) qui se lie sélectivement aux nucléolines (une phosphoprotéine qui est surexprimée dans un grand nombre de cancers et associée à une faible chance de survie [72]). L'objectif était d'augmenter l'affinité des AuNS envers les cellules cancéreuses. Les nanocomposites obtenus ont été testés *in vitro* sur la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 pour analyser le relargage du médicament à l'intérieur des cellules, avec et sans irradiation laser dans le proche infrarouge. L'irradiation laser a non seulement permis un relargage plus important de la doxorubicine mais de plus il a pu être mis en évidence que l'effet hyperthermique contribuait également à l'apoptose des cellules cancéreuses.

2.2 Synthèse des AuNS

Il existe deux grandes voies de synthèse des nanoétoiles d'or. La première est une méthode directe, couramment appelée « one-pot » ou « seedless method », c'est-à-dire sans germes. Bien qu'elle se déroule en une seule étape, elle est généralement peu reproductible. La deuxième méthode, communément appelée « seed-mediated », est une synthèse en deux étapes qui consiste à partir de germes d'or préalablement

synthétisés puis d'une phase de croissance pour la formation des nanoétoiles.

2.2.1 Synthèses en une seule étape (« seedless method »)

La synthèse directe de nanoétoiles en une seule étape présente certains avantages, tels que l'utilisation de moins de réactifs différents, ce qui entraîne une purification plus simple. De plus, cela évite les problèmes liés à l'utilisation de différents lots de germes. Cependant, deux problèmes majeurs ont été identifiés avec cette méthode : le contrôle des dimensions de la NS (taille du cœur et des branches, nombre de branches) et la reproductibilité de la synthèse.[60], [73], [74] Par ailleurs, bien que certains groupes aient réussi à contourner ces deux obstacles, la plupart de ces synthèses utilisent des surfactants toxiques comme le CTAB (bromure de cetylmethylammonium) ou encore le PVP (polyvinylpyrrolidone), [75], ce qui complique leur application postérieure à des fins biomédicales. Pour cette raison, la plupart des protocoles d'obtention de nanoétoiles d'or se font aujourd'hui en deux étapes.

2.2.2 Synthèses en deux étapes

En raison des limitations évoquées ci-dessus, la méthode de synthèse de nanoétoiles la plus courante est celle en deux étapes (Figure 11). Tout d'abord, il s'agit d'obtenir des germes, c'est-à-dire des nanoparticules d'or généralement sphériques de petite taille ou dans certain cas présentant une autre géométrie comme les penta-twins,[76] qui possèdent une structure polycristalline avec des formes de type polyédrique. De plus, ces nanosystèmes doivent être les plus monodisperses et reproductibles possible. Ensuite, en présence d'agent réducteur et d'un précurseur d'or, une croissance anisotrope se produit sur certaines facettes du germe permettant d'obtenir la forme étoilée finale. Cette croissance sélective peut être assistée par de l'argent et/ou un surfactant tel que le CTAB, [77], le DMF ou le PVP [78] Cependant, en fonction de l'application ultérieure, il est souvent préférable de ne pas utiliser de surfactant. Dans ce cas, seul l'argent est ajouté à la solution colloïdale, celui-ci étant généralement introduit sous la forme de nitrate d'argent. Par ailleurs, bien que plusieurs réducteurs soient envisageables tels que l'hydroxylamine NH_2OH , [79] l'acide ascorbique demeure le plus couramment utilisé.[58]

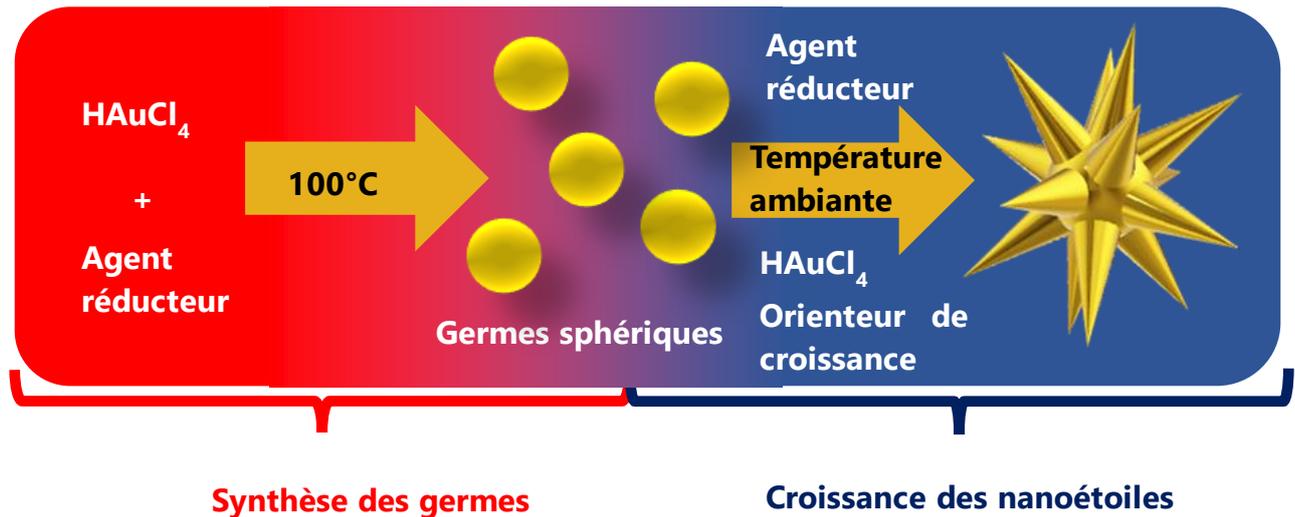


Figure 11 : Synthèse des AuNS en deux étapes

2.2.2.1 Synthèse des germes

Bien que certaines études montrent donc la possibilité d'obtenir des nanoétoiles en utilisant des germes non-sphériques,[80] la plupart des synthèses en deux étapes utilisent des germes sphériques. [42] Cela pourrait être dû au fait que la synthèse de nanoparticules d'or sphériques a été très largement étudiée depuis des décennies, il existe dans la littérature scientifique une quantité impressionnante de protocoles différents pour l'obtention de germes. Dans son célèbre article de 1951, Turkevitch décrit dix synthèses avec une grande variété de réducteurs possibles, tels que le phosphore blanc (utilisé par Faraday) et l'acide citrique, ou le citrate de sodium (Na₃Cit). Ces synthèses explorent également plusieurs conditions de température et de rapport Or/réducteur.[81]

Compte tenu du fait que les germes seront ultérieurement utilisés pour la croissance des nanoétoiles, plusieurs paramètres doivent être particulièrement considérés. Par exemple, le diamètre des germes influencera la taille finale des étoiles mais aussi le ligand présent à la surface qui pourrait avoir une influence sur la déposition des atomes d'or dans l'étape de croissance. L'homogénéité des germes est essentielle pour obtenir des nanoétoiles également homogènes. Enfin, et bien entendu, la reproductibilité des germes est cruciale pour obtenir les mêmes nanoétoiles de manière cohérente.

Parmi toutes les réactions explorées par Turkevitch, Frens a accordé une attention particulière à la réduction de l'acide tétrachloroaurique par le citrate de sodium, car les nanoparticules d'or obtenues par cette voie sont non seulement très homogènes, mais aussi très reproductibles. De plus, la modulation du rapport Citrate/HAuCl₄ a permis d'obtenir des nanoparticules sphériques de différentes tailles.[82],[83] Bien que d'autres méthodes soient possibles, celle-ci reste la plus utilisée pour la synthèse ultérieure des nanoétoiles.[84]

Le groupe de Polte a décrit en 2015 la synthèse Turkevitch-Frens en la divisant en quatre étapes (Figure 12). Tout d'abord, une réduction partielle du précurseur d'or a lieu, formant de petits clusters à partir des monomères d'or. Lors de la deuxième étape, ces clusters forment des particules de germe d'un rayon supérieur à 1,5 nm. Les ions d'or sont attirés et liés dans la double couche électrique (en anglais « electrical double layer », EDL) des germes en tant que co-ions. Les troisième et quatrième étapes comprennent la réduction des ions d'or (d'abord lentement puis rapidement) dans l'EDL, ce qui fait que les monomères d' Au⁰ se déposent exclusivement sur la surface des particules existantes jusqu'à la consommation totale du précurseur. Il n'y a donc pas de formation de nouvelles particules au cours des deux dernières étapes.[85], [86], [87], [88]

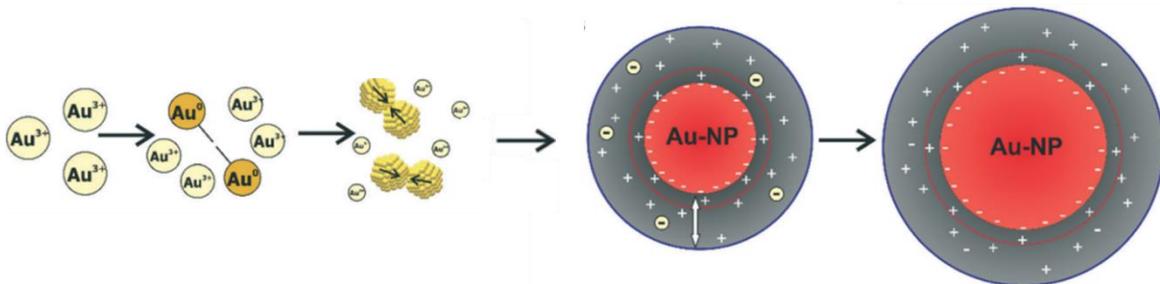


Figure 12: Mécanisme de formation des AuNP (adapté de Wuthschick et al. 2015)[85]

Le rapport HAuCl₄/Na₃Cit qui a été exploré par Frens *et al.* en 1973, joue un rôle crucial sur la taille et la polydispersité des AuNP. En effet, en augmentant la quantité de citrate, la taille finale des AuNP diminue.[83] Cela pourrait être dû à la grande disponibilité de réducteur dans les premières étapes, favorisant ainsi la nucléation initiale.

Le pH de la réaction est fondamental car le précurseur HAuCl₄ existe en solution sous différents complexes de la forme [AuCl_{4-x}(OH_x)]⁻ en fonction du pH de la solution. Une

augmentation du pH favorise le remplacement de Cl^- par des ions OH^- , et selon Dong *et al.*, la réactivité de ce complexe diminue avec l'échange de chlorures.[89]

L'ordre d'ajout des réactifs est lui aussi très important. La méthode classique consiste à verser une solution concentrée de citrate de sodium à température ambiante dans une solution d' HAuCl_4 à ébullition. Il est cependant possible de réaliser la synthèse en inversant l'ordre d'ajout, c'est à dire de verser une solution concentrée de HAuCl_4 dans une solution de citrate à 100°C . Une partie du citrate s'oxyde alors en acide dicarboxylique d'acétone (DCA). Lors des premières étapes, la nucléation est favorisée et permet d'obtenir des nanoparticules de petites tailles.[90], [91] Le DCA, n'est pas, par lui-même, plus réactif que le citrate, cependant, l'effet tampon du citrate disparaît avec sa consommation comme réducteur, ce qui minimise la formation de complexes $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$, augmentant ainsi la disponibilité initiale du AuCl_4^- plus réactif, entraînant la formation accrue de clusters, ce qui finalement conduit à des nanoparticules de taille plus petite.[85]

La réaction est également affectée par **la température**. Selon Dong, pour un rapport Cit/Au de 2,5, une diminution de la température entraîne une augmentation de la taille des particules. Cela s'explique par le fait que la réduction initiale du HAuCl_4 est plus lente, générant ainsi moins de points de nucléation dans les premiers instants et conduisant à une accumulation d'or sur moins de particules. Cependant, lorsque le citrate est en large excès (Cit/Au=7,6), l'influence de la température disparaît.[89]

2.2.2.2 Croissance des nanoétoiles

Après la synthèse des germes, l'étape suivante est celle de la croissance anisotrope. Pour cela, plusieurs conditions bien particulières doivent être réunies. En plus du sel d'or et de l'agent réducteur (qui ne doit être pas être trop fort pour éviter la formation de nouvelles AuNP, mais suffisamment pour faire de la réduction de l'or une réaction irréversible), [42] la présence des germes synthétisés en amont qui servent de point de départ (et finalement de cœur de chaque nanoétoiles) et d'un agent qui oriente la croissance sélective sont indispensables. Pour éviter l'utilisation de surfactants qui peuvent non seulement être toxiques mais également entraver la fonctionnalisation postérieure par des ligands d'intérêts ou l'internalisation cellulaire nécessaire pour les applications visées

dans cette thèse, l'agent orienteur utilisé dans le cadre de notre étude sera l'argent.

Le rôle exact de l'argent présent dans le milieu de réaction de croissance des nanoparticules d'or est toujours sujet à discussion.[42] Alors que certains auteurs affirment que les cations Ag^+ précipitent avec des anions Cl^- bloquant certaines facettes,[79] la plupart affirment plutôt qu'il s'agit d'une déposition en sous-potentiel (« underpotential deposition » (UPD)) de l'argent métallique (Ag^0) sur les facettes les plus énergétiques des germes. La UPD est une électrodeposition de monocouche(s) métallique(s) sur un substrat de métal étranger à des potentiels qui peuvent être significativement moins négatifs que ceux du dépôt sur la même surface métallique que l'adsorbat.[92] Il est très difficile de trancher sur cette question. La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) ne permet pas de discriminer l'une des deux hypothèses car les énergies de liaison de l' Ag^0 et de AgCl sont extrêmement proches (~ 368.1 eV $\text{Ag } 3d_{5/2}$).[58],[93],[94] La Figure 13 illustre l'étape de croissance des nanoétoiles.

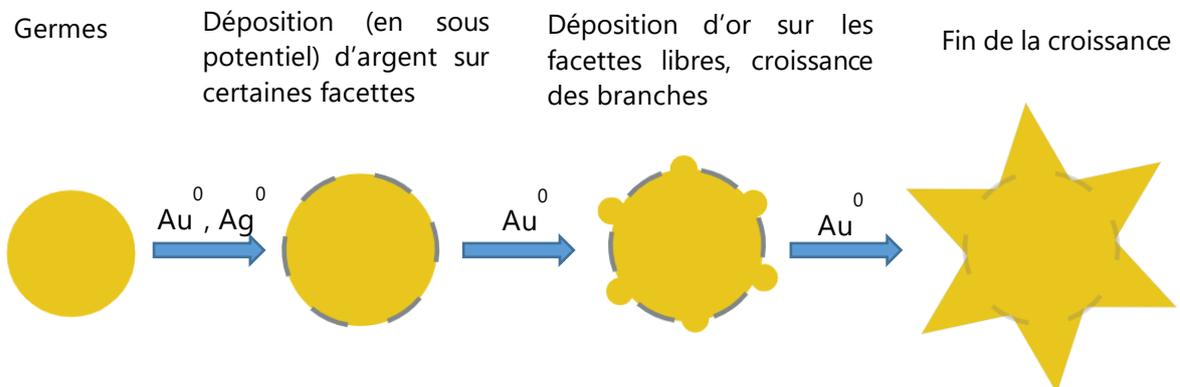


Figure 13: Croissance des nanoétoiles d'or. Créé avec Biorender

Parmi les facteurs qui modifient la forme et la taille finale des nanoétoiles, on retrouve évidemment ceux qui influencent la synthèse des germes, tels que le rapport **$\text{HAuCl}_4/\text{Réducteur}$** , le **pH**, l'**ordre d'ajout des réactifs** et la **température** de synthèse.[42] Cependant, à ce jour il n'existe que peu ou pas d'études dédiées à une seule variation de ce dernier paramètre. De plus, comme cette étape de la synthèse implique des germes déjà formées (avec toute une gamme de paramètres qui peut modifier la morphologie finale, telle que la concentration, la forme, la taille, la polydispersité, la composition chimique de la couche de stabilisant, les facettes cristallines, etc.) et un agent qui oriente la croissance (dans notre cas AgNO_3), l'analyse de l'influence des paramètres est très complexe. [95], [96], [97], [98], [99]

La **concentration en germes** est une des variables les plus analysées. Il est aujourd'hui accepté qu'une diminution de la concentration en germes entraîne la formation d'AuNS de plus grande taille. Cela s'explique par le fait que le nombre de AuNS est déterminé dès le début de l'étape de croissance par le nombre de germes présent dans la réaction. Si la quantité d'Au⁰ disponible doit se diviser en moins de germes, il y aura plus d'or qui se dépose sur chacune. [100]

La **taille des germes** est un paramètre plus difficilement contrôlable car cela implique l'obtention de germes par des protocoles différents (ce qui peut aboutir à d'autres différences comme la polydispersité, les types de facettes cristallines exposées, la quantité de citrate qui reste en solution, etc.). Il a cependant été proposé que des germes de plus grande taille favorisent l'obtention de nanoétoiles plus grandes et présentant davantage de branches.[100]

La **concentration d'AgNO₃** est un facteur fondamental à contrôler car il impacte beaucoup la morphologie finale. Cependant, les résultats obtenus diffèrent notablement en fonction des spécificités de chaque étude. Il n'y a donc pas une proportionnalité directe ou inverse entre la concentration d'argent et la taille ou la morphologie, mais plutôt une relation plus complexe qui dépend de plusieurs facteurs. [79], [100], [101]

Concentration d'ions halogénures tel que les ions Cl⁻, Cl⁻ est naturellement présent dans la réaction car le précurseur d'or le plus utilisé (HAuCl₄) en possède 4. D'autres ions halogénures tels que Br⁻ ou I⁻, présents dans certains surfactants, peuvent modifier la morphologie des nanoétoiles. Cependant, comme les travaux de cette thèse se concentrent uniquement sur les nanoétoiles synthétisées sans surfactant, nous n'entrerons pas davantage dans les détails à ce sujet.[100], [102]

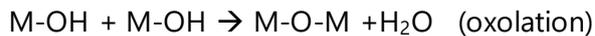
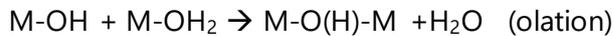
Le **moment exact de l'ajout de chaque réactif**. En effet, si les ions Ag⁺ sont ajoutés trop tôt, il y a possibilité de précipitation sous forme de chlorure d'argent. A l'opposé, s'ils sont ajoutés trop tard, le réducteur entraîne la formation de nanoparticules sphériques.[58]

3 Polyoxometallates

3.1 Introduction

Les POM sont des composés inorganiques incorporant des ions métalliques à haut degré d'oxydation (+4, +5 ou +6) tel que le molybdène (conduisant à des polyoxomolybdates ou POMo), le vanadium (conduisant à des polyoxovanadates ou POV), et le tungstène conduisant à des polyoxotungstates, ou POT) ainsi que des ligands oxo ou hydroxo.[103] Ces systèmes sont modulaires et facilement manufacturables.[104]

Les POM sont des espèces intermédiaires entre l'ion métallate basique mononucléaire $[MO_4]^{n-}$ et l'oxyde métallique MO_x . La plupart des polyanions sont formés par condensation en diminuant le pH d'une solution aqueuse de MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} ou VO_4^{3-} . Deux types de condensation sont possible, l'olation et l'oxolation. [15]



La Figure 14 résume le processus de formation des polyoxométallates à partir de la brique élémentaire $[MO_r]^{n-}$ par polycondensation à pH contrôlé.

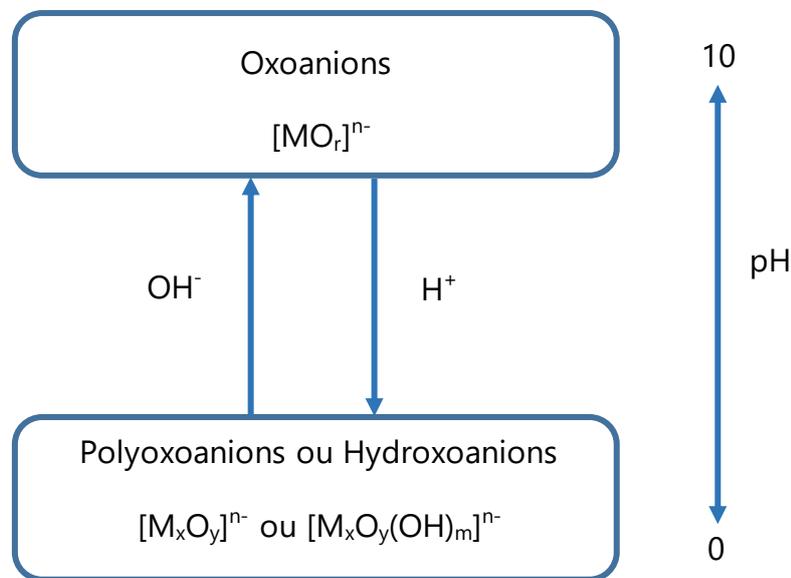


Figure 14: Formation des POM

Une grande diversité structurale peut être obtenue en modifiant les paramètres de la réaction comme le pH, la nature et concentration des précurseurs et la température. Cependant, ces oxydes anioniques peuvent être classés en deux grandes familles : les isopolyoxométallates, ou isopolyanions de formule générale $[M_xO_y]^{n-}$, et les hétéropolyoxométallates, ou hétéropolyanions de formule générale $[X_zM_xO_y]^{n-}$ où X représente un hétéroatome du bloc p tel que le B^{III}, le P^V, l'As^V, ou bien le Si^{IV}.

Le premier POM décrit dans la littérature est le phosphomolybdate d'ammonium $(NH_4)_3[PMo_{12}O_{40}]$, découvert en 1826 par J.J. Berzelius.[105] Grâce aux travaux de J.F. Keggin, sa structure a pu être déterminée par diffraction des rayons X sur monocristal.[106] Ces dernières décennies, une multitude de structures ont été mises en évidence. Cette diversité structurale ainsi que les propriétés physico-chimiques qui en dérivent ont permis l'utilisation des POM dans différents domaines comme la catalyse,[107],[108] l'électrochimie,[109] le magnétisme[110] ou le biomédical [111],[112] notamment grâce à des propriétés antibactériennes[113] et antitumorales[114].

La plupart des POM dérivent de structures types, les plus courantes étant les structures de type Keggin $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ ($\{XM_{12}\}$) (Figure 15a), Dawson $[X_2M_{18}O_{62}]^{n-}$ ($\{X_2M_{18}\}$) (Figure 15b), Lindqvist $[M_6O_{19}]^{n-}$ ($\{M_6\}$) (Figure 15c) et Anderson $[XM_6O_{24}]^{n-}$ ($\{XM_6\}$) (Figure 15d). Il existe aussi des anions géants possédant jusqu'à 368 centres métalliques (Figure 15e et 15f).[115]

3.2 Fonctionnalisation

Bien que les POM soient des composés purement inorganiques, il peut être intéressant de leur associer des fragments organiques dans le but de potentialiser une ou plusieurs de leurs propriétés ou même de leur en conférer de nouvelles. Ces POM, dit POM hybrides, peuvent être divisés en deux classes selon la nature de l'interaction entre la partie organique et la partie inorganique. La première classe (Classe I) inclue tous les systèmes présentant des liaisons non covalentes comme les liaisons d'hydrogène ou de type forces de Van Der Waals ; la deuxième classe (classe II) regroupe alors ceux qui

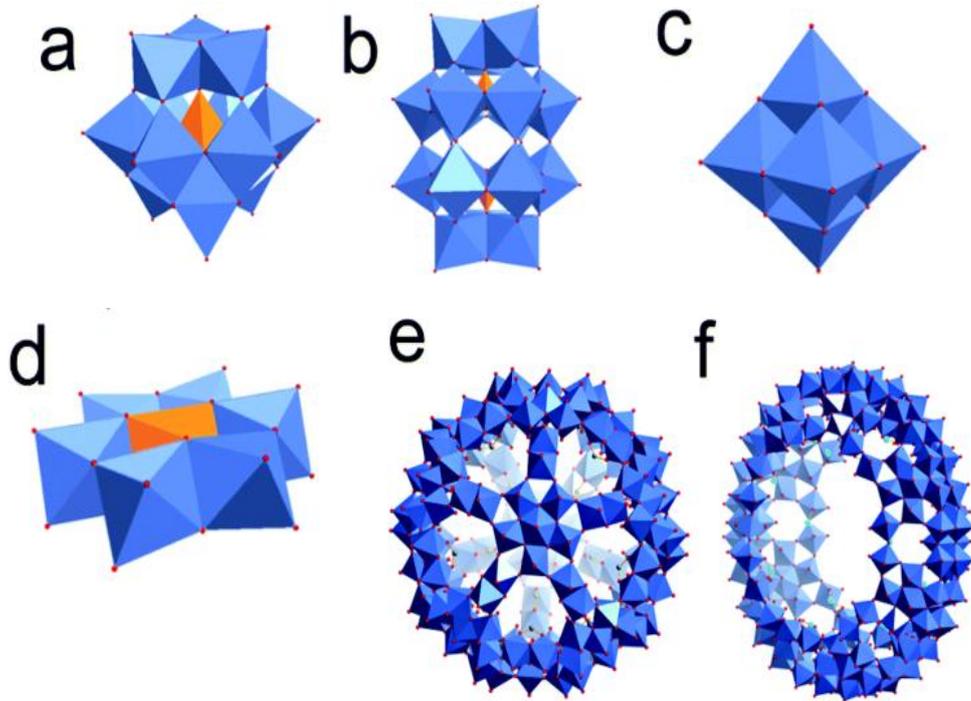


Figure 15: Représentation polyédrique de polyoxomolybdates types. Extrait de Herrmann (2015).[15], [115] Mo : bleu ; O : rouge ; B, Si ou P : orange. (a) Anion de type Keggin ; (b) anion de type Dawson ; (c) anion de type Lindqvist ; (d) anion de type Anderson ; (e) Anion géant Mo_{132} ; (f) anion géant Mo_{154} .

présentent au moins une liaison forte de type covalente ou iono-covalente entre la partie organique et la partie inorganique.[104] Le greffage d'un ligand organique à un POM par liaison covalente nécessite un point d'encrage qui dépend de la nature chimique et électronique de la partie inorganique. Une des formes de fonctionnalisation la plus courante consiste à lier un atome d'oxygène périphérique du POM via une liaison M-O-X, où X représente un élément du bloc p. Dans le cadre des travaux présentés dans cette thèse, nous avons fonctionnalisé des POM avec des ligands bisphosphonates (BP) via de telles liaisons M-O-X. Les bisphosphonates représentent une famille de composés organiques qui ont été synthétisés pour la première fois par N. Menshutkin en 1865. Ce sont des analogues stables des pyrophosphates avec une liaison P-C-P qui remplace la liaison P-O-P entraînant une résistance accrue à l'hydrolyse.[15] Le carbone entre les deux groupes phosphonates peut être lié à une grande diversité de groupes fonctionnels qui permettront de classer les BP en deux catégories, les BP azotés et les non azotés (voir Figure 16).

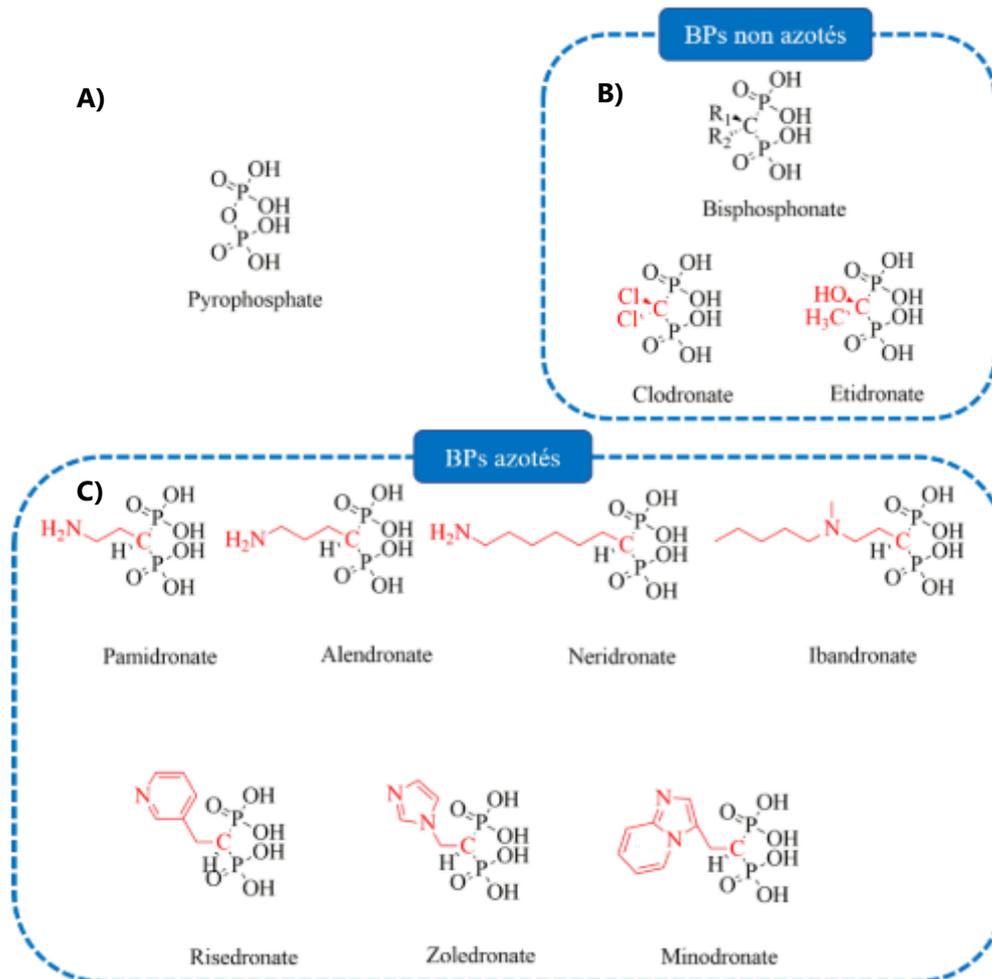


Figure 16: Représentation du pyrophosphate et de bisphosphonates. Extrait de Tomane (2021)[15] A) Pyrophosphate, B) BPs non azotés, C) BPs azotés.

Actuellement, de nombreux bisphosphonates sont commercialisés comme médicaments contre l'ostéoporose ou la maladie de Paget : l'alendronate (acide alendronique) est vendu sous le nom de Fosamax®, le zoledronate (acide zolédronique) est vendu sous le nom d'Aclasta® et le risédronate (acide risédronique) sous les noms d'Actonel®, Atelvia® et Benet®. Le fait que plusieurs études ont mis en évidence leur efficacité comme agent antibactérien et anticancéreux [116], [117], [118], [119], [120], [121] et qu'ils possèdent deux groupes phosphonates qui peuvent se lier facilement aux POM par liaison covalente font d'eux une famille de molécules très intéressantes pour augmenter l'effet anticancéreux des POM. Dans les travaux de cette thèse nous nous sommes intéressés particulièrement à deux d'entre eux, l'alendronate (Ale) et le zoledronate (Zol).

Les premiers POM fonctionnalisés par des ligands monophosphonates ont été

synthétisés en 1975 par Kwak.[122] Ils ont pour formule générale $[(RP)_2Mo_5O_{21}]^{4-}$ avec R= H, Me, Et, Ph, $C_2H_4NH_3^+$ ou $p-CH_2C_6H_4NH_3^+$. Dans cette structure, deux tétraèdres RPO_4 s'étendent de chaque côté d'un anneau de cinq octaèdres MoO_6 . [122]

Le premier POM contenant du Mo^{VI} et un ligand bisphosphonates a été synthétisé et structurellement déterminé par Kortz en 1995, il s'agit du hexamolybdométhylènediphosphonate $[(O_3PCH_2PO_3)Mo_6O_{18}(H_2O)_4]^{4-}$. [123] En 2001, Sergienko a obtenu différents POM fonctionnalisés avec un autre BP l'acide hydroxyéthylidenediphosphonique. [124]

Dans les années 2010, au sein de l'équipe MIM de l'Institut Lavoisier de Versailles, une étude approfondie portant sur la synthèse, la caractérisation et l'analyse de l'effet anticancéreux de polyoxométallates fonctionnalisés par des ligand BP a été menée. [125], [126], [127] En particulier toute une famille de polyoxomolybdates de formule générale $\{Mo_4(BP)_2M\}$ où M est un métal de transition (Mn^{II} , Mn^{III} ou Fe^{III}) et où BP est un ligand comme l'alendronate et le zolédronate ont été synthétisés. Ces POMo sont constitués d'un cation 3d localisé sur un centre d'inversion et connecté à deux unités dimériques $\{Mo^{VI}_2O_6\}$. Chaque BP est lié à un dimère de Mo^{VI} grâce à des liaisons covalentes P-O-Mo et C-O-Mo ainsi qu'au métal central (Figure 17). L'activité antitumorale de ces POM hybrides a été testée. Une conclusion très intéressante est que les POMo fonctionnalisés avec un BP au minimum conservent l'effet anticancéreux du BP sur la lignée tumorale MCF-7. Mais de plus, dans la plupart des cas, cet effet augmente. L'IC₅₀ (concentration du BP à laquelle l'activité métabolique se réduit de moitié) de l'alendronate libre étant de $220 \pm 6 \mu M$, il passe à $110 \pm 9 \mu M$ une fois greffé sur le POMo Mo_4Al_2Fe et à $11 \pm 3 \mu M$ une fois coordonné au cœur Mo_4Al_2Mn . Le zolédronate libre qui quant à lui possède un IC₅₀ de $15 \pm 3 \mu M$ passe à $13 \pm 0.1 \mu M$ pour le composé Mo_4Zol_2Fe et $2.6 \pm 0.5 \mu M$ pour le composé Mo_4Zol_2Mn . [128]

C'est ce type de POM hybride que nous allons considérer pour notre étude portant sur l'activité biologique d'assemblages POM/AuNS.

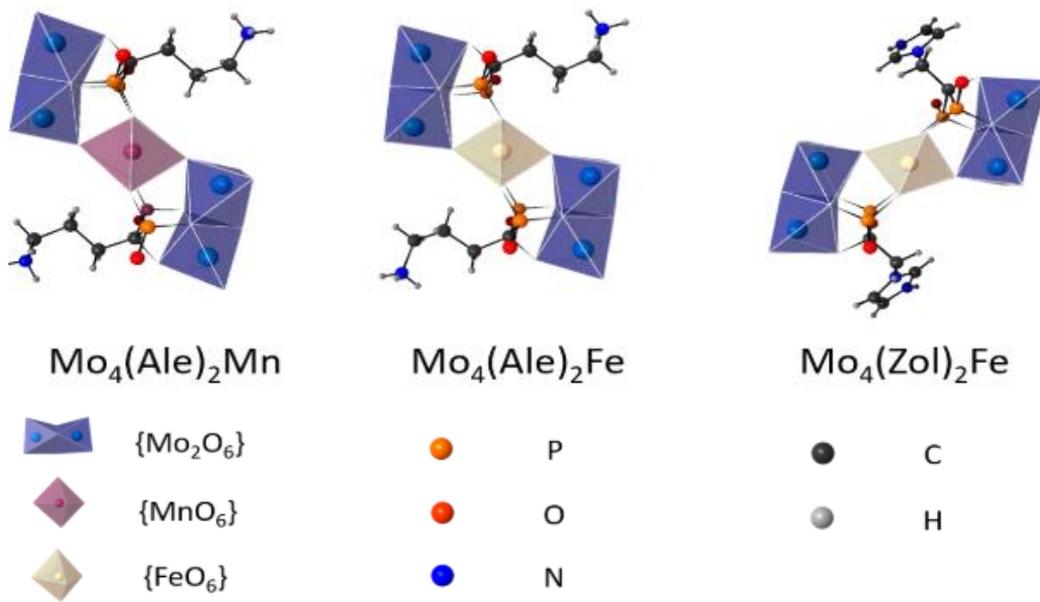


Figure 17 : Représentation en polyèdres et en boules-bâtons de composés de type $\{\text{Mo}_4(\text{BP})_2\text{M}\}$. Extrait de Tomane (2021)[15]

4 Composites AuNP-POM

L'élaboration de nanoparticules d'or nécessite toujours l'assistance d'autres molécules, soit afin de réduire l'or, soit afin de les stabiliser et d'éviter leur aggrégation. Malheureusement ces molécules (citrate, acide ascorbique, etc.) disposent rarement en elles-mêmes d'un intérêt applicatif. Afin d'accéder à des propriétés multithérapeutiques, on doit donc souvent fonctionnaliser *a posteriori* les nanoparticules d'or par échange de ligand ou greffage (Figure 5).

4.1 Obtention des composites AuNP-POM

Étant donné que d'une part des POM ont déjà été étudiés pour diverses applications biomédicales pour lesquelles l'utilisation d'AuNS présente également de grandes applications potentielles, et que d'autre part les charges anioniques d'un POM limitent grandement l'agglomération d'AuNP grâce à des phénomènes de répulsion électrostatique.[129] l'élaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des POM peut présenter un grand intérêt applicatif. Il existe trois méthodes différentes pour obtenir un nanocomposite AuNP-POM (Figure 18). La première consiste à réduire l'or en

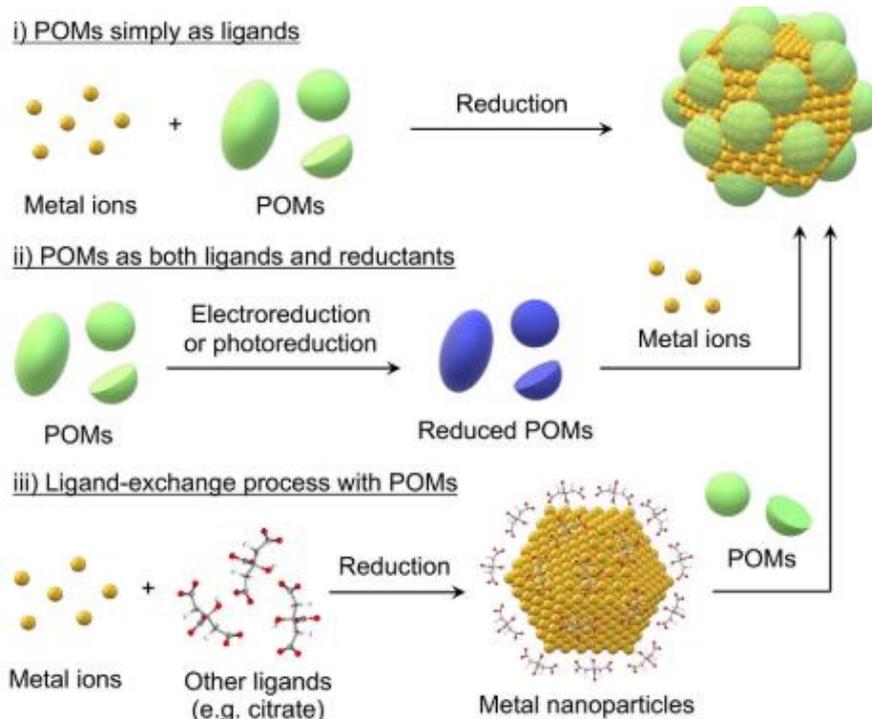


Figure 18: Trois voies différentes permettant d'obtenir des nanocomposites AuNP-POM. Extrait de Xia et al. 2023[130]

présence d'un POM totalement oxydé, lequel va adhérer à la surface des nanoparticules.

Bien que le POM soit déjà présent au moment de la réduction, il ne joue pas le rôle d'agent réducteur. La deuxième consiste à utiliser un POM préalablement partiellement réduit, c'est-à-dire incorporant des ions W^V , V^{IV} ou Mo^V , ce qui lui permet de jouer le rôle d'agent réducteur de l'or au moment de la synthèse. On peut noter qu'il est également possible de partir d'un POM totalement oxydé et de le réduire soit par voie électrochimique ou photochimique. La troisième consiste en l'échange avec le POM de ligands stabilisants présents à la surface de la NP.[130]

Le premier nanocomposite métallique – polyoxoanion a été synthétisé par Lin et Finke en 1994. Un nanocluster d'iridium a été obtenu par réduction du POM $(Bu_4N)_5Na_3[(1,5-COD)IrP_2W_{15}Nb_3O_{62}]$. Il est important de remarquer qu'il est stabilisé par adsorption en surface du même POM.[131] Cependant, ce n'est qu'en 2002 que des nanoparticules d'or ont été synthétisées avec un POM. Troupis *et al.* ont ainsi montré qu'un POM de type Keggin $[SiW_{12}O_{40}]^{4-}$ préalablement réduit par photolyse en $[SiW_{12}O_{40}]^{5-}$ peut être utilisé pour réduire le précurseur métallique et en même temps stabiliser les nanoparticules qui se forment.[132] La première synthèse de nanoparticules d'or en utilisant un POM réduit à base de molybdène date de 2009, où Zhang *et al.*, en collaboration avec l'équipe MIM de l'ILV, ont préparé des nanostructures d'or de différentes géométries et stables pendant plusieurs mois en utilisant le POM de type Keggin partiellement réduit $H_3[H_4P(Mo^V)_4(Mo^VI)_8O_{40}]^{3-}$ comme agent réducteur et stabilisant. En modulant la concentration initiale en POM et surtout le rapport molaire $HAuCl_4/POM$, ils ont réussi à obtenir différentes morphologies, telles que des AuNP sphériques de différentes tailles, des nanofils ou bien encore des nanopolygones. (Figure 19).[133]

Dans la même voie, mais cette fois avec un POM complètement réduit à base de Mo^V , Lang *et al.* ont également réussi en 2016 à synthétiser des AuNP (Figure 20). La réaction suivie est décrite comme simple, rapide, avec un haut rendement et une stabilité des nanocomposites obtenus d'au moins deux ans. L'étude XPS indique que le Mo^V s'oxyde complètement en Mo^VI , confirmant ainsi que le molybdène joue le rôle d'agent réducteur.[134]

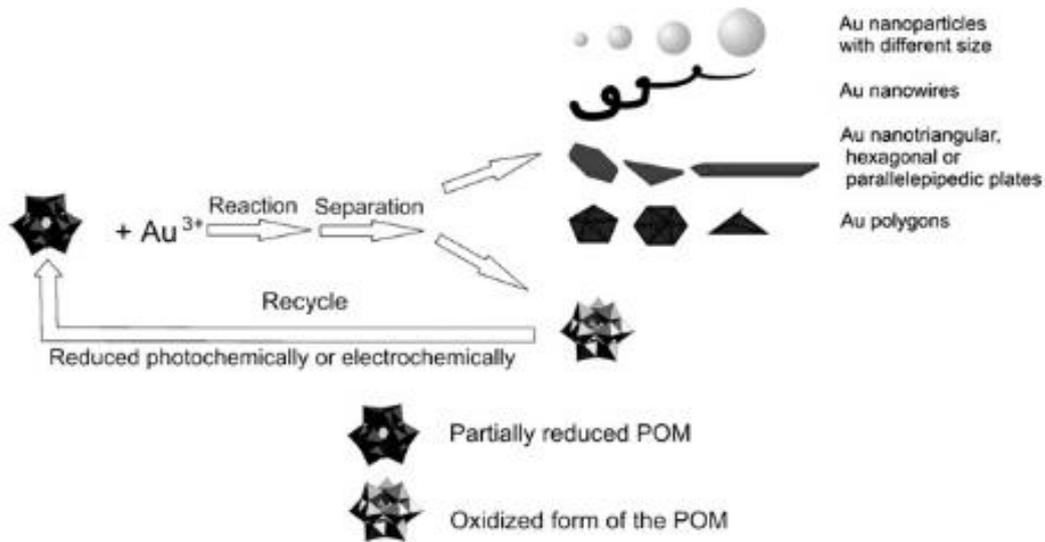


Figure 19: synthèse de AuNP de différentes morphologies obtenues en présence d'un POM partiellement réduit. Reproduit de Zhang et al. (2009)[133]

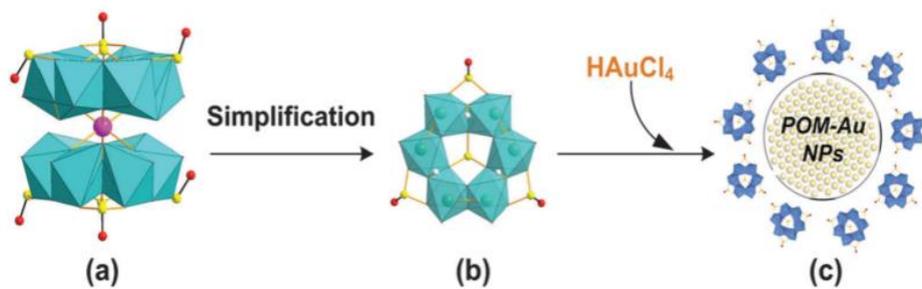
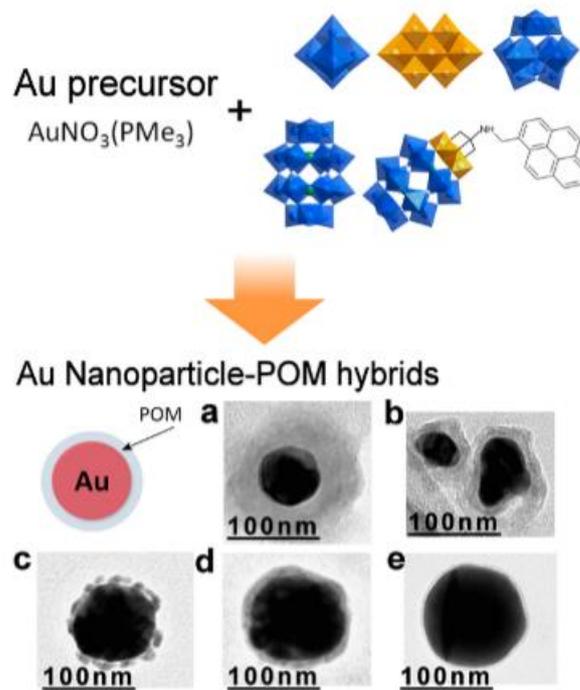


Fig. 1 Relevant species acting in the $HAuCl_4$ reduction: (a) dimeric form $[Na\{(Mo_2O_4)_3(\mu_2-O)_3(\mu_2-SO_3)_3(\mu_6-SO_3)_2\}]^{15-}$, (b) simplified protonated monomeric form $[(Mo_2O_4)_3(\mu_2-OH)_3(\mu_2-SO_3)_3(\mu_6-SO_3)]^{5-}$ used for modelling and (c) a schematic view of the final AuNP with the resulting POM stabilising the AuNP core (AuNPs@POM). Colour code: green octahedra – reduced MoO_6 , yellow – S, magenta – Na, red – O, blue octahedra – oxidised MoO_6 .

Figure 20: Synthèse de AuNP-POMo (Extrait de Lang et al. 2016)[134]

En 2019 le groupe de Cronin a conçu une approche complètement différente pour produire des composites AuNP-POM en utilisant comme précurseur d'or le composé $Au^I NO_3(PMe_3)$, qui possède la capacité de se décomposer en Au^0 après un processus de réduction induit thermiquement, et des POM à base de tungstène ou de vanadium. Les précurseurs sont chauffés par microondes pour aboutir à la formation de nanocomposites (Figure 21).[135]



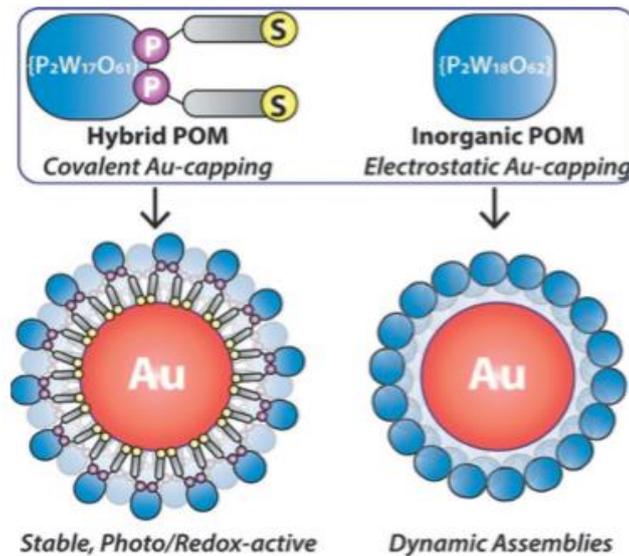
Schematic image of a gold nanoparticle–POM hybrid using (a) W_6 , (b) V_{10} , (c) W_{12} , (d) W_{18} , and (e) $W_{15}V_3$ -pyrene. The average diameter of the NP in the bottom three images is 100 nm.

Figure 21: synthèse de AuNP-POM obtenus par voie micro-onde. Extrait de Martin et al. 2019 [135]

En 2020, le groupe de Newton a lui mis au point une synthèse de tels nanocomposites par échange de ligand. À partir d’AuNP stabilisées par du citrate, et en exploitant la forte affinité de l’or et du soufre, ils ont lié de manière covalente un POM hybride fonctionnalisé avec des thiols à la surface d’AuNP dans le but d’obtenir un nanocomposite AuNP-POM stable et associant les propriétés optiques propre aux AuNP et les propriétés électro et photochimique propres aux POM (Figure 22)[136]

4.2 Application des composites AuNP-POM

Les nanocomposites AuNP-POM sont depuis une dizaine d’années un sujet d’étude récurrent en raison du grand potentiel qui pourrait émerger de la combinaison des propriétés de ses deux composantes. Il existe ainsi des études en lien avec des domaines tels que la photochimie, l’électrochimie, la catalyse et le SERS[130] Cette thèse se concentrera elle uniquement sur les applications d’intérêt biomédical (voir Tableau 1) et en particulier sur les systèmes présentant une activité antitumorale.



A route to stable redox- and photo-active NP@POM composites.

Figure 22: Stratégie de greffage covalent et électrostatique de POM à la surface de AuNP. Extrait de Martin et al. 2020 [136]

Tableau 1: applications biomédicales des composites AuNP-POM

POM	Méthode de fonctionnalisation	Rôle du POM	Ref.
$H_3PW_{12}O_{40}$	Echange de ligand	Encapsulation des AuNP pour des applications anticancéreuses	[137]
$[Na\{(Mo_2^VO_4)_3(\mu_2-O)_3(\mu_2-SO_3)_3(\mu_6-SO_3)_2\}]^{15-}$	Agent réducteur	Agent chimiothérapeutique	[138]
Mo_4Zn_2Mn	Echange de ligand	Agent chimiothérapeutique	[36]
$H_3PW_{12}O_{40}$ et $H_3PMo_{12}O_{40}$	Echange de ligand	Agent bactéricide	[139]
V_3Al_3	Echange de ligand ou agent réducteur	Agent bactéricide	[140]
$H_3PMo_{12}O_{40}$	Agent réducteur	Détection de l'acétaminophène	[141]
$K_8P_2W_{16}V_2O_{62}$	Echange de ligand	Détection d'acide urique	[142]
$K_8SiW_{11}O_{39}$	Echange de ligand	Traitement de l'Alzheimer	[143]

On peut citer trois travaux dédiés à ce domaine. En 2016 Maicas Gabas *et al.* ont publié une étude où un POM au molybdène réduit a été utilisé comme agent réducteur pour la synthèse de nanoparticules d'or sphériques. Ce composite a ensuite été testé sur la lignée tumorale B16 (mélanome) ainsi que sur une lignée de cellules non tumorales (Vero). Les nanoparticules ont été détectées par imagerie MET dans les endosomes des deux lignées

mais elles ont principalement affecté la lignée cancéreuse, bien qu'il y ait eu une plus grande internalisation dans les cellules Vero (58% contre 42%, mesuré par ICP). Le POM seul a été également testé comme témoin aux mêmes concentrations, s'avérant inactif sur les deux lignées et démontrant ainsi l'effet synergique des deux composantes.[138]

D'autre part, en 2018, un POM de type Keggin a été utilisé par Artiga *et al.* dans le but de piéger des nanobâtonnets d'or (AuNR) dans un hydrogel pour faciliter leur internalisations dans des cellules Vero en vue de réaliser un traitement par photothérapie. Ni les AuNR seuls ni les AuNR piégés dans l'hydrogel n'ont montré de cytotoxicité significative. Cependant, lors de l'irradiation, seules les AuNR piégés dans l'hydrogel ont présenté des effets cytotoxiques.[137]

Enfin, en 2021, Tomane *et al.* ont obtenu par échange de ligand des AuNP fonctionnalisées par un POM hybride à base de molybdène et incorporant des ligands zolédronate. Ce nanocomposite a ensuite été testé sur des cellules tumorales PC3 sous irradiation dans la première fenêtre biologique du proche infrarouge, mettant en évidence le grand potentiel des nanocomposites AuNP-POM pour la thérapie combinatoire (photothérapie et chimiothérapie) dans le cadre du traitement du cancer (Figure 23).[36]

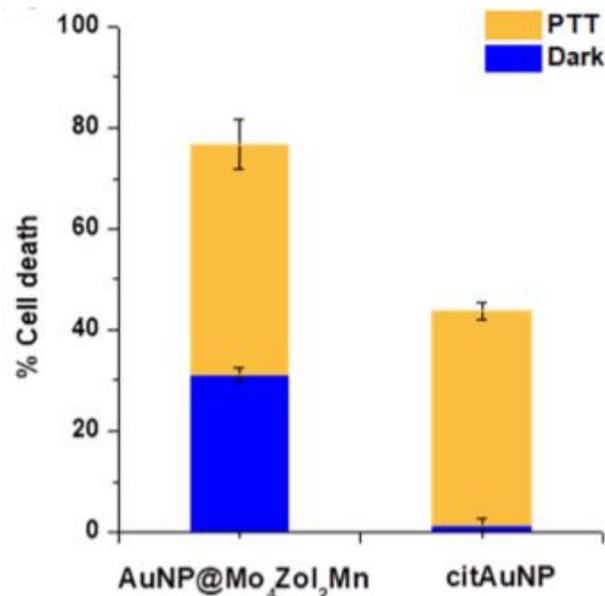


Figure 23: pourcentage de mort cellulaire après traitement en présence d'AuNP-POM et d'AuNP-citrate, avec irradiation à 680 nm (PTT) et sans (Dark). Extrait de Tomane *et al.* 2021 [36]

Cette thèse vise à l'élaboration de composites AuNS@POM-BP inédits pour le traitement

Chapitre 1 : Repères bibliographiques

combiné photothérapeutique/chimiothérapeutique du cancer. L'objectif est d'exploiter les propriétés optiques des nanoétoiles d'or dans la première fenêtre biologique du proche infrarouge –propriétés que n'offrent pas les AuNP sphériques–, les capacités réductrices des polyoxomolybdates réduits ainsi que les propriétés biologiques des bisphosphonates.

5 Références

- [1] L. Filed, « El sistema del oro: exploraciones sobre el destino (emergente) de los objetos de oro precolombinos en Colombia », *Antípoda. Revista de Antropología y Arqueología*, no 14, p. 67-94, janv. 2012, doi: 10.7440/antipoda14.2012.04.
- [2] P. Colombar, « Nanoparticules et couleur, une tradition millénaire », *Photoniques*, p. 37-41, janv. 2015, doi: 10.1051/photon/20150137.
- [3] B. Tangeysh, K. Moore Tibbetts, J. H. Odhner, B. B. Wayland, et R. J. Levis, « Gold nanoparticle synthesis using spatially and temporally shaped femtosecond laser pulses: Post-irradiation auto-reduction of aqueous [AuCl₄]⁻ », *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 117, no 36, p. 18719-18727, sept. 2013, doi: 10.1021/jp4056494.
- [4] R. C. Birtcher, S. E. Donnelly, et S. Schlutig, « Nanoparticle ejection from gold during ion irradiation », *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, vol. 215, no 1-2, p. 69-75, janv. 2004, doi: 10.1016/S0168-583X(03)01789-0.
- [5] M. Tréguer-Delapierre, J. Majimel, S. Mornet, E. Duguet, et S. Ravaine, « SYNTHESIS OF NONSPHERICAL GOLD NANOPARTICLES », *Gold Bull*, vol. 41, p. 195-207, 2008, doi: <https://doi.org/10.1007/BF03216597>.
- [6] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, et P. Mulvaney, « Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications », in *Coordination Chemistry Reviews*, sept. 2005, p. 1870-1901. doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.030.
- [7] K. Okitsu, M. Ashokkumar, et F. Grieser, « Sonochemical synthesis of gold nanoparticles: Effects of ultrasound frequency », *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no 44, p. 20673-20675, nov. 2005, doi: 10.1021/jp0549374.
- [8] S. A. Dong et S. P. Zhou, « Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles », *Materials Science and Engineering: B*, vol. 140, no 3, p. 153-159, juin 2007, doi: 10.1016/j.mseb.2007.03.020.

- [9] S. Huang et al., « Electrochemical synthesis of gold nanocrystals and their 1D and 2D organization », *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no 42, p. 19823-19830, oct. 2005, doi: 10.1021/jp052863q.
- [10] M. T. Rahman et E. V. Rebrov, « Microreactors for gold nanoparticles synthesis: From faraday to flow », *Processes*, vol. 2, no 2, p. 466-493, 2014, doi: 10.3390/pr2020466.
- [11] K. Lance Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, et G. C. Schatz, « The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment K. », *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, p. 668-677, 2003, doi: 10.1016/j.ocecoaman.2014.06.011.
- [12] V. Mody, R. Siwale, A. Singh, et H. Mody, « Introduction to metallic nanoparticles », *J Pharm Bioallied Sci*, vol. 2, no 4, p. 282-289, 2010, doi: 10.4103/0975-7406.72127.
- [13] J. Callaway et R. H. Ritchie, « Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films* », *Physical review*, vol. 106, no 5, 1957.
- [14] S. Link et M. A. El-Sayed, « Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals », *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 19, no 3, p. 409-453, 2000. doi: 10.1080/01442350050034180.
- [15] S. TOMANE, « Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates / nanoparticules métalliques pour des applications biomédicales », 2021.
- [16] A. Iwakoshi, T. Nanke, et T. Kobayashi, « Coating materials containing gold nanoparticles », *Gold Bull*, vol. 38, no 3, p. 107-112, 2005, doi: 10.1007/BF03215244.
- [17] X. He et H. M. Hwang, « Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment », *J Food Drug Anal*, vol. 24, no 4, p. 671-681, 2016, doi: 10.1016/j.jfda.2016.06.001.
- [18] H. Daraee, M. Pourhassanmoghadam, A. Akbarzadeh, N. Zarghami, et M. Rahmati-Yamchi, « Gold nanoparticle–oligonucleotide conjugate to detect the sequence of lung cancer biomarker », *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 44, no 6, p. 1417-1423, 2016, doi: 10.3109/21691401.2015.1031905.

- [19] S. Raj, S. Jose, U. S. Sumod, et M. Sabitha, « Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges », *J Pharm Bioallied Sci*, vol. 4, no 3, p. 186 193, 2012, doi: 10.4103/0975-7406.99016.
- [20] S. Alex et A. Tiwari, « Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and applications-A review », *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 15, no 3, p. 1869 1894, 2015, doi: 10.1166/jnn.2015.9718.
- [21] B. K. Bindhani, U. K. Parida, S. K. Biswal, A. K. Panigrahi, et P. L. Nayak, « Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications », *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 2, no 4, p. 247 260, 2013, doi: 2013:2157-9369:247.
- [22] X. Li, L. Jiang, Q. Zhan, J. Qian, et S. He, « Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing », *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 332, no 2 3, p. 172 179, 2009, doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.09.009.
- [23] X. Bai et al., « The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no 7. MDPI AG, 1 avril 2020. doi: 10.3390/ijms21072480.
- [24] R. H. Grantab et I. F. Tannock, « Penetration of anticancer drugs through tumour tissue as a function of cellular packing density and interstitial fluid pressure and its modification by bortezomib », *BMC Cancer*, vol. 12, juin 2012, doi: 10.1186/1471-2407-12-214.
- [25] S. Bongers, P. Hellebrekers, L. P. H. Leenen, L. Koenderman, et F. Hietbrink, « Intracellular penetration and effects of antibiotics on staphylococcus aureus inside human neutrophils: A comprehensive review », *Antibiotics*, vol. 8, no 2. MDPI AG, 1 juin 2019. doi: 10.3390/antibiotics8020054.
- [26] G. A. Reed, « Stability of drugs, drug candidates, and metabolites in blood and plasma », *Curr Protoc Pharmacol*, vol. 2016, p. 7.6.1-7.6.12, déc. 2016, doi: 10.1002/cpph.16.

- [27] D. H. M. Dam et al., « Direct observation of nanoparticle-cancer cell nucleus interactions », *ACS Nano*, vol. 6, no 4, p. 3318 3326, avr. 2012, doi: 10.1021/nn300296p.
- [28] H. Jahangirian, K. Kalantari, Z. Izadiyan, R. Rafiee-Moghaddam, K. Shamel, et T. J. Webster, « A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles », *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14. Dove Medical Press Ltd., p. 1633 1657, 2019. doi: 10.2147/IJN.S184723.
- [29] I. H. Plenderleith, « Treating the Treatment: Toxicity of Cancer Chemotherapy », *CAN. FAM. PHYSICIAN*, vol. 36, p. 1827 1830, 1990.
- [30] J. Fang, H. Nakamura, et H. Maeda, « The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no 3. p. 136 151, 18 mars 2011. doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009.
- [31] A. Nel, E. Ruoslahti, et H. Meng, « New Insights into “permeability” as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics », *ACS Nano*, vol. 11, no 10. American Chemical Society, p. 9567 9569, 24 octobre 2017. doi: 10.1021/acsnano.7b07214.
- [32] Q. Gao, J. Zhang, J. Gao, Z. Zhang, H. Zhu, et D. Wang, « Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., 13 avril 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.647905.
- [33] J. Wang, M. Sui, et W. Fan, « Nanoparticles for Tumor Targeted Therapies and Their Pharmacokinetics », *Curr Drug Metab*, vol. 11, p. 129 141, 2010.
- [34] W. Mao, Y. J. Son, et H. S. Yoo, « Gold nanospheres and nanorods for anti-cancer therapy: Comparative studies of fabrication, surface-decoration, and anti-cancer treatments », *Nanoscale*, vol. 12, no 28. Royal Society of Chemistry, p. 14996 15020, 28 juillet 2020. doi: 10.1039/d0nr01690j.
- [35] F. Y. Kong, J. W. Zhang, R. F. Li, Z. X. Wang, W. J. Wang, et W. Wang, « Unique roles

of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications », *Molecules*, vol. 22, no 9. MDPI AG, 1 septembre 2017. doi: 10.3390/molecules22091445.

[36] S. Tomane et al., « Gold/Polyoxometalate Core/Shell Nanoparticles for Combined Chemotherapy-Photothermal Cancer Therapy », *ACS Appl Nano Mater*, vol. 4, no 3, p. 2339-2344, 2021, doi: 10.1021/acsnm.0c03187.

[37] H. R. Moyer et K. A. Delman, « The role of hyperthermia in optimizing tumor response to regional therapy », *International Journal of Hyperthermia*, vol. 24, no 3, p. 251-261, mai 2008, doi: 10.1080/02656730701772480.

[38] C. W. Song, H. J. Park, C. K. Lee, et R. Griffin, « Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment », in *International Journal of Hyperthermia*, déc. 2005, p. 761-767. doi: 10.1080/02656730500204487.

[39] R. S. Riley et E. S. Day, « Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment », *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 9, no 4. Wiley-Blackwell, 1 juillet 2017. doi: 10.1002/wnan.1449.

[40] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim, et H. Park, « Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy », *Front Chem*, vol. 7, no APR, p. 1-16, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00167.

[41] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, et M. A. El-Sayed, « Determination of the Minimum Temperature Required for Selective Photothermal Destruction of Cancer Cells with the Use of Immunotargeted Gold Nanoparticles », *Photochem Photobiol*, vol. 82, no 2, p. 412, 2006, doi: 10.1562/2005-12-14-ra-754.

[42] A. L. Siegel et G. A. Baker, « Bespoke nanostars: Synthetic strategies, tactics, and uses of tailored branched gold nanoparticles », *Nanoscale Adv*, vol. 3, no 14, p. 3980-4004, 2021, doi: 10.1039/d0na01057j.

- [43] P. Pallavicini et al., « Triton X-100 for three-plasmon gold nanostars with two photothermally active NIR (near IR) and SWIR (short-wavelength IR) channels », *Chemical Communications*, vol. 49, no 56, p. 6265-6267, juin 2013, doi: 10.1039/c3cc42999g.
- [44] C. Song et al., « Gold nanostars for cancer cell-targeted SERS-imaging and NIR light-triggered plasmonic photothermal therapy (PPTT) in the first and second biological windows », *J Mater Chem B*, vol. 7, no 12, p. 2001-2008, 2019, doi: 10.1039/c9tb00061e.
- [45] X. He, W. F. Wolkers, J. H. Crowe, D. J. Swanlund, et J. C. Bischof, « In situ thermal denaturation of proteins in dunning AT-1 prostate cancer cells: Implication for hyperthermic cell injury », *Ann Biomed Eng*, vol. 32, no 10, p. 1384-1398, 2004, doi: 10.1114/B:ABME.0000042226.97347.de.
- [46] R. Vankayala, A. Sagadevan, P. Vijayaraghavan, C. L. Kuo, et K. C. Hwang, « Metal nanoparticles sensitize the formation of singlet oxygen », *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 50, no 45, p. 10640-10644, 2011, doi: 10.1002/anie.201105236.
- [47] A. M. Smith, M. C. Mancini, et S. Nie, « Bioimaging: Second window for in vivo imaging », *Nature Nanotechnology*, vol. 4, no 11. Nature Publishing Group, p. 710-711, 2009. doi: 10.1038/nnano.2009.326.
- [48] P. Knittel, O. Bibikova, et C. Kranz, « Challenges in nanoelectrochemical and nanomechanical studies of individual anisotropic gold nanoparticles », *Faraday Discuss*, vol. 193, p. 353-369, 2016, doi: 10.1039/c6fd00128a.
- [49] A. Sambou, P. D. Tall, K. Talla, O. B. Sakho D Ngom, et A. C. Beye, « Control of the Surface Plasmon Resonance of Two Configurations of Nanoparticles: Simple Gold Nanorod and Gold/Silica Core/Shell », *Nanoscience and Nanotechnology Research*, vol. 4, no 1, p. 1-6, 2017, doi: 10.12691/nnr-4-1-1.
- [50] L. Scarabelli, « Recent advances in the rational synthesis and self-assembly of anisotropic plasmonic nanoparticles », in *Pure and Applied Chemistry*, De Gruyter, sept. 2018, p. 1393-1407. doi: 10.1515/pac-2018-0510.

- [51] J. E. Ortiz-Castillo, R. C. Gallo-Villanueva, M. J. Madou, et V. H. Perez-Gonzalez, « Anisotropic gold nanoparticles: A survey of recent synthetic methodologies », *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 425. Elsevier B.V., 15 décembre 2020. doi: 10.1016/j.ccr.2020.213489.
- [52] J. M. Park, H. E. Choi, D. Kudaibergen, J. H. Kim, et K. S. Kim, « Recent Advances in Hollow Gold Nanostructures for Biomedical Applications », *Frontiers in Chemistry*, vol. 9. Frontiers Media S.A., 8 juin 2021. doi: 10.3389/fchem.2021.699284.
- [53] L. Zhang et al., « Spatially Controlled Reduction and Growth of Silver in Hollow Gold Nanoshell Particles », *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 123, no 16, p. 10614-10621, avr. 2019, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b11864.
- [54] V. Pellas et al., « Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications », *Biosensors*, vol. 10, no 10. MDPI, 1 octobre 2020. doi: 10.3390/BIOS10100146.
- [55] V. Pellas et al., « Gold Nanorod Coating with Silica Shells Having Controlled Thickness and Oriented Porosity: Tailoring the Shells for Biosensing Nanorod Coating with Silica Shells Having Controlled Thickness and Oriented Porosity: Tailoring the Shells for Biosensing », *ACS Appl Nano Mater*, vol. 255, no 9, 2021, doi: 10.1021/ac.
- [56] S. Sasidharan, D. Bahadur, et R. Srivastava, « Protein-Poly(amino acid) Nanocore-Shell Mediated Synthesis of Branched Gold Nanostructures for Computed Tomographic Imaging and Photothermal Therapy of Cancer », *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 8, no 25, p. 15889-15903, 2016, doi: 10.1021/acsami.6b03428.
- [57] Q. Wu et al., « Gold nanostar-enhanced surface plasmon resonance biosensor based on carboxyl-functionalized graphene oxide », *Anal Chim Acta*, vol. 913, p. 137-144, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.01.063.
- [58] H. Yuan, C. G. Khoury, H. Hwang, C. M. Wilson, G. A. Grant, et T. Vo-Dinh, « Gold nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging », *Nanotechnology*, vol. 23, no 7, 2012, doi: 10.1088/0957-4484/23/7/075102.

- [59] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, et L. M. Liz-Marzán, « Nanostars shine bright for you. Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles », *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 16, no 2, p. 118 127, 2011, doi: 10.1016/j.cocis.2010.12.007.
- [60] K. Chandra, K. S. B. Culver, S. E. Werner, R. C. Lee, et T. W. Odom, « Manipulating the Anisotropic Structure of Gold Nanostars using Good's Buffers », *Chemistry of Materials*, vol. 28, no 18, p. 6763 6769, 2016, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b03242.
- [61] J. Xie, Q. Zhang, J. Y. Lee, et D. I. C. Wang, « The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for in vivo applications », *ACS Nano*, vol. 2, no 12, p. 2473 2480, déc. 2008, doi: 10.1021/nn800442q.
- [62] E. Hao, R. C. Bailey, G. C. Schatz, J. T. Hupp, et S. Li, « Synthesis and Optical Properties of "Branched" Gold Nanocrystals », *Nano Lett*, vol. 4, no 2, p. 327 330, févr. 2004, doi: 10.1021/nl0351542.
- [63] C. G. Khoury et T. Vo-Dinh, « Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization », *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, no 48, p. 18849 18859, déc. 2008, doi: 10.1021/jp8054747.
- [64] W. Li et X. Chen, « Gold nanoparticles for photoacoustic imaging », *Nanomedicine*, vol. 10, no 2. Future Medicine Ltd., p. 299 320, 1 janvier 2015. doi: 10.2217/nnm.14.169.
- [65] Y. Liu, Z. Chang, H. Yuan, A. M. Fales, et T. Vo-Dinh, « Quintuple-modality (SERS-MRI-CT-TPL-PTT) plasmonic nanoprobe for theranostics », *Nanoscale*, vol. 5, no 24, p. 12126 12131, 2013, doi: 10.1039/c3nr03762b.
- [66] F. Tian, J. Conde, C. Bao, Y. Chen, J. Curtin, et D. Cui, « Gold nanostars for efficient in vitro and in vivo real-time SERS detection and drug delivery via plasmonic-tunable Raman/FTIR imaging », *Biomaterials*, vol. 106, p. 87 97, nov. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.014.

- [67] B. Van De Broek et al., « Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy », *ACS Nano*, vol. 5, no 6, p. 4319 4328, juin 2011, doi: 10.1021/nn1023363.
- [68] H. Yuan, A. M. Fales, et T. Vo-Dinh, « TAT peptide-functionalized gold nanostars: Enhanced intracellular delivery and efficient NIR photothermal therapy using ultralow irradiance », *J Am Chem Soc*, vol. 134, no 28, p. 11358 11361, juill. 2012, doi: 10.1021/ja304180y.
- [69] H. Jo, H. Youn, S. Lee, et C. Ban, « Ultra-effective photothermal therapy for prostate cancer cells using dual aptamer-modified gold nanostars », *J Mater Chem B*, vol. 2, no 30, p. 4862 4867, 2014, doi: 10.1039/c4tb00643g.
- [70] E. S. Srinivasan et al., « Gold Nanostars Obviate Limitations to Laser Interstitial Thermal Therapy (LITT) for the Treatment of Intracranial Tumors », *Clinical Cancer Research*, vol. 29, no 16, p. 3214 3224, août 2023, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1871.
- [71] A. Hernández Montoto et al., « Janus Gold Nanostars–Mesoporous Silica Nanoparticles for NIR-Light-Triggered Drug Delivery », *Chemistry - A European Journal*, vol. 25, no 36, p. 8471 8478, juin 2019, doi: 10.1002/chem.201900750.
- [72] S. Yangngam et al., « Cellular localization of nucleolin determines the prognosis in cancers: a meta-analysis », *Journal of Molecular Medicine*, vol. 100, no 8. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, p. 1145 1157, 1 août 2022. doi: 10.1007/s00109-022-02228-w.
- [73] L. Minati, F. Benetti, A. Chiappini, et G. Speranza, « One-step synthesis of star-shaped gold nanoparticles », *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 441, p. 623 628, janv. 2014, doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.10.025.
- [74] J. W. Lee, H. Jung, H. H. Cho, J. H. Lee, et Y. Nam, « Gold nanostar-mediated neural activity control using plasmonic photothermal effects », *Biomaterials*, vol. 153, p. 59 69, 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.041.

- [75] D. W. Mulder, M. M. Phiri, A. Jordaan, et B. C. Vorster, « Modified HEPES one-pot synthetic strategy for gold nanostars », *R Soc Open Sci*, vol. 6, no 6, 2019, doi: 10.1098/rsos.190160.
- [76] D. Chateau, A. Desert, F. Lerouge, G. Landaburu, S. Santucci, et S. Parola, « Beyond the concentration limitation in the synthesis of nanobipyramids and other pentatwinned gold nanostructures. », 2019.
- [77] C. L. Nehl, H. Liao, et J. H. Hafner, « Optical properties of star-shaped gold nanoparticles », *Nano Lett*, vol. 6, no 4, p. 683 688, avr. 2006, doi: 10.1021/nl052409y.
- [78] P. Senthil Kumar, I. Pastoriza-Santos, B. Rodríguez-González, F. Javier García De Abajo, et L. M. Liz-Marzán, « High-yield synthesis and optical response of gold nanostars », *Nanotechnology*, vol. 19, no 1, p. 1 7, 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/01/015606.
- [79] H. Yuan et al., « Shape and SPR evolution of thorny gold nanoparticles promoted by silver ions », *Chemistry of Materials*, vol. 19, no 7, p. 1592 1600, 2007, doi: 10.1021/cm062046i.
- [80] I. B. Becerril-Castro et al., « Gold Nanostars: Synthesis, Optical and SERS Analytical Properties », *Analysis & Sensing*, vol. 2, no 3, mai 2022, doi: 10.1002/anse.202200005.
- [81] J. Turkevich, P. C. Stevenson, et J. Hillier, « A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold », *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no 0, p. 55 75, 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.
- [82] G. Frens, « Particle size and sol stability in metal colloids », *Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*, vol. 250, no 7, p. 736 741, 1972, doi: 10.1007/BF01498565.
- [83] G. FRENS, « Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions », *Nature Physical Science*, vol. 241, no 105, p. 20 22, 1973, doi: 10.1038/physci241020a0.
- [84] K. Zabetakis, W. E. Ghann, S. Kumar, et M. C. Daniel, « Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an

extended Turkevich-Frens method », *Gold Bull*, vol. 45, no 4, p. 203-211, 2012, doi: 10.1007/s13404-012-0069-2.

[85] M. Wuihschick et al., « Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis », *ACS Nano*, vol. 9, no 7, p. 7052-7071, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b01579.

[86] J. Polte, « Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective », *CrystEngComm*, vol. 17, no 36, p. 6809-6830, juin 2015, doi: 10.1039/c5ce01014d.

[87] J. Polte, R. Erler, A. F. Thünemann, F. Emmerling, et R. Kraehnert, « SAXS in combination with a free liquid jet for improved time-resolved in situ studies of the nucleation and growth of nanoparticles », *Chemical Communications*, vol. 46, no 48, p. 9209-9211, déc. 2010, doi: 10.1039/c0cc03238g.

[88] J. Polte et al., « Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation », *J Am Chem Soc*, vol. 132, no 4, p. 1296-1301, févr. 2010, doi: 10.1021/ja906506j.

[89] J. Dong, P. L. Carpinone, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, et B. M. Moudgil, « Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method », *KONA Powder and Particle Journal*, vol. 37, p. 224-232, 2020, doi: 10.14356/kona.2020011.

[90] S. K. Sivaraman, S. Kumar, et V. Santhanam, « Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The role of chloroauric acid », *J Colloid Interface Sci*, vol. 361, no 2, p. 543-547, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.015.

[91] I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús, et V. Puentes, « Influence of the sequence of the reagents addition in the citrate-mediated synthesis of gold nanoparticles », *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, no 32, p. 15752-15757, 2011, doi: 10.1021/jp2017242.

[92] E. Herrero, L. J. Buller, et H. D. Abruña, « Underpotential deposition at single crystal

surfaces of Au, Pt, Ag and other materials », *Chemical Reviews*, vol. 101, no 7. p. 1897-1930, juillet 2001. doi: 10.1021/cr9600363.

[93] M. L. Personick, M. R. Langille, J. Zhang, et C. A. Mirkin, « Shape control of gold nanoparticles by silver underpotential deposition », *Nano Lett*, vol. 11, no 8, p. 3394-3398, 2011, doi: 10.1021/nl201796s.

[94] F. Liebig et al., « A simple one-step procedure to synthesise gold nanostars in concentrated aqueous surfactant solutions », *RSC Adv*, vol. 9, no 41, p. 23633-23641, 2019, doi: 10.1039/c9ra02384d.

[95] J. D. Ramsey, L. Zhou, C. Kyle Almlie, J. D. Lange, et S. M. Burrows, « Achieving plasmon reproducibility from surfactant free gold nanostar synthesis », *New Journal of Chemistry*, vol. 39, no 12, p. 9098-9108, 2015, doi: 10.1039/c5nj01590a.

[96] W. Xi, H. T. Phan, et A. J. Haes, « How to accurately predict solution-phase gold nanostar stability », *Anal Bioanal Chem*, vol. 410, no 24, p. 6113-6123, 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1115-6.

[97] T. Vo-Dinh et al., « Shining Gold Nanostars: From Cancer Diagnostics to Photothermal Treatment and Immunotherapy », *J Immunol Sci*, vol. 2, no 1, p. 1-8, 2018.

[98] H. De Puig, J. O. Tam, C. W. Yen, L. Gehrke, et K. Hamad-Schifferli, « Extinction Coefficient of Gold Nanostars », *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 119, no 30, p. 17408-17415, 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b03624.

[99] S. Atta, T. V. Tsoulos, et L. Fabris, « Shaping Gold Nanostar Electric Fields for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Enhancement via Silica Coating and Selective Etching », *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 120, no 37, p. 20749-20758, 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b01949.

[100] A. S. De Silva Indrasekara, S. F. Johnson, R. A. Odion, et T. Vo-Dinh, « Manipulation of the Geometry and Modulation of the Optical Response of Surfactant-Free Gold Nanostars: A Systematic Bottom-Up Synthesis », *ACS Omega*, vol. 3, no 2, p. 2202-2210,

2018, doi: 10.1021/acsomega.7b01700.

[101] S. Atta, M. Beetz, et L. Fabris, « Understanding the role of AgNO₃ concentration and seed morphology in the achievement of tunable shape control in gold nanostars », *Nanoscale*, vol. 11, no 6, p. 2946 2958, 2019, doi: 10.1039/c8nr07615d.

[102] A. Kedia et P. Senthil Kumar, « Halide ion induced tuning and self-organization of gold nanostars », *RSC Adv*, vol. 4, no 9, p. 4782 4790, 2014, doi: 10.1039/c3ra43976c.

[103] B. Hasenknopf, « Polyoxometalates: Introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications », *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, no 1, p. 275 287, 2005, doi: 10.2741/1527.

[104] A. Dolbecq, E. Dumas, C. R. Mayer, et P. Mialane, « Hybrid organic-inorganic polyoxometalate compounds: From structural diversity to applications », *Chem Rev*, vol. 110, no 10, p. 6009 6048, 2010, doi: 10.1021/cr1000578.

[105] J. Berzelius, « Beitrag zur näheren Kenntnifs de Molybdäns », *Ann Phys*, vol. 6, p. 369 392, 1826.

[106] J. F. Keggin, « Structure of the molecule of 12-Phosphotungstic Acid », *Nature*, vol. 131, 1933, doi: <https://doi.org/10.1038/131908b0>.

[107] S. S. Wang et G. Y. Yang, « Recent Advances in Polyoxometalate-Catalyzed Reactions », *Chemical Reviews*, vol. 115, no 11. American Chemical Society, p. 4893 4962, 10 juin 2015. doi: 10.1021/cr500390v.

[108] M. Zhang, J. Hao, A. Neyman, Y. Wang, et I. A. Weinstock, « Influence of Polyoxometalate Protecting Ligands on Catalytic Aerobic Oxidation at the Surfaces of Gold Nanoparticles in Water », *Inorg Chem*, vol. 56, no 5, p. 2400 2408, 2017, doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b02167.

[109] T. Ueda, « Electrochemistry of Polyoxometalates: From Fundamental Aspects to Applications », *ChemElectroChem*, vol. 5, no 6. Wiley-VCH Verlag, p. 823 838, 1 mars 2018. doi: 10.1002/celec.201701170.

- [110] J. M. Clemente-Juan et E. Coronado, « Magnetic clusters from polyoxometalate complexes », *Coord Chem Rev*, p. 361 394, 1999, [En ligne]. Disponible sur: www.elsevier.com/locate/ccr
- [111] B. Hasenknopf, « POLYOXOMETALATES: INTRODUCTION TO A CLASS OF INORGANIC COMPOUNDS AND THEIR BIOMEDICAL APPLICATIONS », *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, p. 275, 2005.
- [112] T. Yamase, « Anti-tumor, -viral, and -bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug », *J Mater Chem*, vol. 15, no 45, p. 4773 4782, déc. 2005, doi: 10.1039/b504585a.
- [113] A. Bijelic, M. Aureliano, et A. Rompel, « The antibacterial activity of polyoxometalates: Structures, antibiotic effects and future perspectives », *Chemical Communications*, vol. 54, no 10, p. 1153 1169, 2018, doi: 10.1039/c7cc07549a.
- [114] A. Bijelic, M. Aureliano, et A. Rompel, « Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallo-drugs in the Combat Against Cancer », *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 58, no 10, p. 2980 2999, 2019, doi: 10.1002/anie.201803868.
- [115] S. Herrmann, C. Ritchie, et C. Streb, « Polyoxometalate - Conductive polymer composites for energy conversion, energy storage and nanostructured sensors », *Dalton Transactions*, vol. 44, no 16, p. 7092 7104, 2015, doi: 10.1039/c4dt03763d.
- [116] E. Chmielewska et P. Kafarski, « Physiologic Activity of Bisphosphonates – Recent Advances », *Open Pharmaceutical Sciences Journal*, vol. 3, no 1, p. 56 78, 2016, doi: 10.2174/1874844901603010056.
- [117] E. CIMINI et al., « Zoledronic acid enhances vd2 t-lymphocyte antitumor response to human glioma cell lines », *international journal of immunopathology and pharmacology*, vol. 24, no 1, p. 139 148, 2011.
- [118] A. Leon et al., « Isoprenoid biosynthesis as a drug target: Bisphosphonate inhibition of *Escherichia coli* K12 growth and synergistic effects of fosmidomycin », *J Med*

Chem, vol. 49, no 25, p. 7331 7341, déc. 2006, doi: 10.1021/jm060492b.

[119] Y. Feng, N. Huang, Q. Wu, L. Bao, et B. Y. Wang, « α -helical domain is essential for antimicrobial activity of high mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMG2) », *Acta Pharmacol Sin*, vol. 26, no 9, p. 1087 1092, sept. 2005, doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00132.x.

[120] J. R. Green, « Bisphosphonates: Preclinical Review », *Oncologist*, vol. 9, no S4, p. 3 13, sept. 2004, doi: 10.1634/theoncologist.9-90004-3.

[121] J. Zekria, M. Mansour, et S. M. Karim, « The anti-tumour effects of zoledronic acid », *Journal of Bone Oncology*, vol. 3, no 1. Elsevier GmbH, p. 25 35, 2014. doi: 10.1016/j.jbo.2013.12.001.

[122] W. Kwak, M. T. Pope, et T. F. Scully, « Stable organic Derivatives of Heteropoly Anions, Pentamolybdobisphosphonates », *J Am Chem Soc*, vol. 94, no 3, p. 5735 5738, 1975, doi: <https://doi.org/10.1021/ja00853a017>.

[123] U. Kortz et M. T. Pope, « Polyoxometalate-Diphosphate Complexes. 3. Possible Intermediates in the Molybdate-Catalyzed Hydrolysis of Pyrophosphate. The Structure of Hexamolybdomethylenediphosphonate, $[(O_3PCH_2PO_3)Mo_6O_{18}(H_2O)_4]^{4-}$ », 1995. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

[124] V. S. Sergienko, « Structural Chemistry of 1-Hydroxyethylidenediphosphonic Acid Complexes », *Russian Journal of Coordination Chemistry*, vol. 27, no 10, p. 723 753, 2001, doi: 10.1023/A:1012334908835.

[125] H. El Moll et al., « Polyoxometalates functionalized by bisphosphonate ligands: Synthesis, structural, magnetic, and spectroscopic characterizations and activity on tumor cell lines », *Inorg Chem*, vol. 51, no 14, p. 7921 7931, juill. 2012, doi: 10.1021/ic3010079.

[126] J. D. Compain et al., « Tetra- to dodecanuclear oxomolybdate complexes with functionalized bisphosphonate ligands: Activity in killing tumor cells », *Chemistry - A European Journal*, vol. 16, no 46, p. 13741 13748, 2010, doi: 10.1002/chem.201001626.

[127] H. El Moll et al., « Tuning the photochromic properties of molybdenum bisphosphonate polyoxometalates », *Inorg Chem*, vol. 51, no 4, p. 2291-2302, 2012, doi: 10.1021/ic202299d.

[128] A. Saad et al., « Polyoxomolybdate Bisphosphonate Heterometallic Complexes: Synthesis, Structure, and Activity on a Breast Cancer Cell Line », *Chemistry - A European Journal*, vol. 21, no 29, p. 10537-10547, juill. 2015, doi: 10.1002/chem.201406565.

[129] U. Jameel, M. Zhu, X. Chen, et Z. Tong, « Recent progress of synthesis and applications in polyoxometalate and nanogold hybrid materials », *Journal of Materials Science*, vol. 51, no 5. Springer New York LLC, p. 2181-2198, 1 mars 2016. doi: 10.1007/s10853-015-9503-1.

[130] K. Xia, K. Yamaguchi, et K. Suzuki, « Recent Advances in Hybrid Materials of Metal Nanoparticles and Polyoxometalates », *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 62, no 1. John Wiley and Sons Inc, 2 janvier 2023. doi: 10.1002/anie.202214506.

[131] N. Y. Lint et R. G. Finke, « Novel Polyoxoanion- and Bu_4N^+ -Stabilized, Isolable, and Redissolvable, 20-30-Å $\text{Ir} \sim 300\text{-}900$ Nanoclusters: The Kinetically Controlled Synthesis, Characterization, and Mechanism of Formation of Organic Solvent-Soluble, Reproducible Size, and Reproducible Catalytic Activity Metal », 1994. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

[132] A. Troupis, A. Hiskia, et E. Papaconstantinou, « ChemInform Abstract: Synthesis of Metal Nanoparticles by Using Polyoxometalates as Photocatalysts and Stabilizers. », *ChemInform*, vol. 33, no 31, p. no-no, 2010, doi: 10.1002/chin.200231245.

[133] G. Zhang et al., « Synthesis of various crystalline gold nanostructures in water: The polyoxometalate $\beta\text{-}[\text{H}_4\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ as the reducing and stabilizing agent », *J Mater Chem*, vol. 19, no 45, p. 8639-8644, nov. 2009, doi: 10.1039/b903599k.

[134] Z. Lang et al., « On the formation of gold nanoparticles from $[\text{Au}(\text{I})\text{Cl}_4]^-$ and a non-classical reduced polyoxomolybdate as an electron source: A quantum mechanical modelling and experimental study », *New Journal of Chemistry*, vol. 40, no 2, p. 1029

1038, févr. 2016, doi: 10.1039/c5nj02773j.

[135] S. Martín, Y. Takashima, C. G. Lin, Y. F. Song, H. N. Miras, et L. Cronin, « Integrated Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Polyoxometalate Clusters », *Inorg Chem*, vol. 58, no 7, p. 4110 4116, avr. 2019, doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b03013.

[136] C. Martin et al., « Redox-Active Hybrid Polyoxometalate-Stabilised Gold Nanoparticles », *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 59, no 34, p. 14331 14335, août 2020, doi: 10.1002/anie.202005629.

[137] Á. Artiga, S. García-Embid, L. De Matteis, S. G. Mitchell, et J. M. de la Fuente, « Effective in Vitro Photokilling by cell-adhesive gold nanorods », *Front Chem*, vol. 6, no JUN, 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00234.

[138] I. M. Gabas, G. Stepien, M. Moros, S. G. Mitchell, et J. M. De La Fuente, « In vitro cell cytotoxicity profile and morphological response to polyoxometalate-stabilised gold nanoparticles », *New Journal of Chemistry*, vol. 40, no 2, p. 1039 1047, févr. 2016, doi: 10.1039/c5nj02775f.

[139] H. K. Daima, P. R. Selvakannan, R. Shukla, S. K. Bhargava, et V. Bansal, « Fine-Tuning the Antimicrobial Profile of Biocompatible Gold Nanoparticles by Sequential Surface Functionalization Using Polyoxometalates and Lysine », *PLoS One*, vol. 8, no 10, oct. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0079676.

[140] S. Tomane et al., « One-pot synthesis of a new generation of hybrid bisphosphonate polyoxometalate gold nanoparticles as antibiofilm agents », *Nanoscale Adv*, vol. 1, no 9, p. 3400 3405, 2019, doi: 10.1039/c9na00401g.

[141] T. R. Bastami, A. Ghaedi, S. G. Mitchell, A. Javadian-Saraf, et M. Karimi, « Sonochemical synthesis of polyoxometalate-stabilized gold nanoparticles for point-of-care determination of acetaminophen levels: preclinical study in an animal model », *RSC Adv*, vol. 10, no 28, p. 16805 16816, avr. 2020, doi: 10.1039/d0ra00931h.

[142] Z. Bai, C. Zhou, H. Xu, G. Wang, H. Pang, et H. Ma, « Polyoxometalates-doped Au

nanoparticles and reduced graphene oxide: A new material for the detection of uric acid in urine », *Sens Actuators B Chem*, vol. 243, déc. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2016.11.159.

[143] M. Perxés Perich et al., « Polyoxometalate-Decorated Gold Nanoparticles Inhibit β -Amyloid Aggregation and Cross the Blood–Brain Barrier in a μ physiological Model », *Nanomaterials*, vol. 13, no 19, oct. 2023, doi: 10.3390/nano13192697

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des précurseurs

Ce chapitre est consacré à la synthèse et à la caractérisation des différents précurseurs utilisés pour la synthèse des nanoétoiles. Nous commencerons par présenter les germes sphériques, puis les POMo réduits utilisés dans cette étude. Ensuite, nous mettrons en évidence dans la dernière partie du chapitre les similitudes et les différences entre les deux types de POMo, ainsi qu'entre ces derniers et l'acide ascorbique, largement utilisé comme réducteur dans la synthèse de nanoétoiles d'or sans surfactant dans la littérature.

1 Introduction

Pour l'obtention des nanoétoiles recouvertes de POMo hybride, nous avons opté pour une synthèse en deux étapes sans surfactant, dont le principe général a été largement décrit dans le premier chapitre. La première étape concerne la synthèse de nanoparticules d'or sphériques, un processus étudié depuis 1951 par Turkevich.[1] La première partie de ce chapitre sera dédiée à la comparaison de diverses méthodes de synthèse publiées, visant à obtenir des germes aussi homogènes et reproductibles que possible. En effet, même de légères variations entre différents lots de germes pourraient entraîner des différences notables et imprévisibles sur les nanoétoiles. Les germes seront caractérisés par spectroscopie UV-Visible, diffusion dynamique de la lumière (DLS), potentiel zêta et microscopie électronique en transmission (MET).

La deuxième partie du chapitre sera consacrée à l'obtention et à la caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore et analyse thermogravimétrique (ATG) des deux polyoxométallates réduits qui ont été utilisés pour la synthèse des nanoétoiles. Finalement, les propriétés électrochimiques des deux POM seront analysées et comparées entre elles, ainsi qu'avec celles du réducteur le plus couramment utilisé dans la synthèse des nanoétoiles d'or sans surfactant dans la littérature, à savoir l'acide ascorbique.

Les autres réactifs utilisés pour la synthèse sont disponibles commercialement et largement utilisés dans les laboratoires de chimie, ne nécessitant donc pas d'attention particulière (nitrate d'argent, acide chlorhydrique et eau ultrapure).

2 Synthèses des germes

Pour la synthèse des nanoétoiles d'or (AuNS) en deux étapes, il est fondamental de pouvoir obtenir des nanoparticules d'or sphériques aussi homogènes, monodisperses, et reproductibles que possible. Afin de garantir cela, après une inspection visuelle, les germes obtenus sont caractérisés par spectroscopie UV-vis, diffusion dynamique de la lumière (DLS), potentiel zêta et microscopie électronique en transmission (MET).

L'inspection visuelle est considérée satisfaisante si le résultat de la synthèse est un liquide limpide présentant une coloration rose ou rouge caractéristique des nanoparticules d'or sphériques. Si la solution est incolore ou légèrement jaune, cela indique que le précurseur d'or n'a pas été réduit, tandis que si la solution est violette, noire ou trouble, cela est souvent synonyme d'agrégation des nanoparticules d'or.

Le spectre UV-Vis doit présenter une seule bande plasmon, entre 510 et 530 nm, la plus fine possible, ce qui est synonyme de monodispersité. La longueur d'onde de la bande plasmon est reliée au diamètre des nanoparticules d'or. Ainsi une longueur d'onde entre 510 et 530 nm est en lien avec des nanoparticules sphériques de quelques dizaines de nanomètres de diamètre. Une longueur d'onde légèrement supérieure à 530 nm peut indiquer que les nanoparticules sphériques sont déjà trop grandes pour une croissance ultérieure. Une longueur d'onde significativement plus élevée peut également être le signe de la présence de formes non sphériques.

La diffusion dynamique de la lumière permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or, qui est légèrement supérieur au diamètre réel car il prend en compte la couche d'hydratation autour des nanoparticules.[2] L'avantage principal de cette technique est sa rapidité et sa simplicité, car en cinq minutes, les résultats peuvent être obtenus, fournissant non seulement le diamètre moyen, mais aussi une distribution de taille, que ce soit par nombre de particules, par volume de particules ou par intensité du signal (voir Figure 1A).

Le potentiel zêta permet de déterminer les charges électriques en surface des

nanoparticules d'or, lesquelles sont fondamentales pour leur stabilité. Des potentiels proches de zéro (dans la plage de -30 à 30 mV) indiquent une solution instable ou peu stable, tandis que des valeurs éloignées de zéro indiquent une solution stable. Cette stabilité augmente avec l'augmentation de la valeur absolue du potentiel zêta.[3], [4] La Figure 1B montre la variation du potentiel en fonction de la distance à partir de la surface de la nanoparticule. Le potentiel le plus élevé se trouve à la surface (« surface potential »), puis le potentiel décroît exponentiellement quand on s'éloigne de la surface. Immédiatement autour de la particule se trouve une couche d'ions de charge opposée à la particule appelée couche de Stern. Ensuite se trouve une couche d'ions associés de manière plus faible, la frontière de cette couche est appelée « slipping plane ». Cette frontière délimite l'endroit où la nanoparticule et les ions associés se déplacent en tant qu'entité unique. Le potentiel zêta représente le potentiel de ce « slipping plane ».

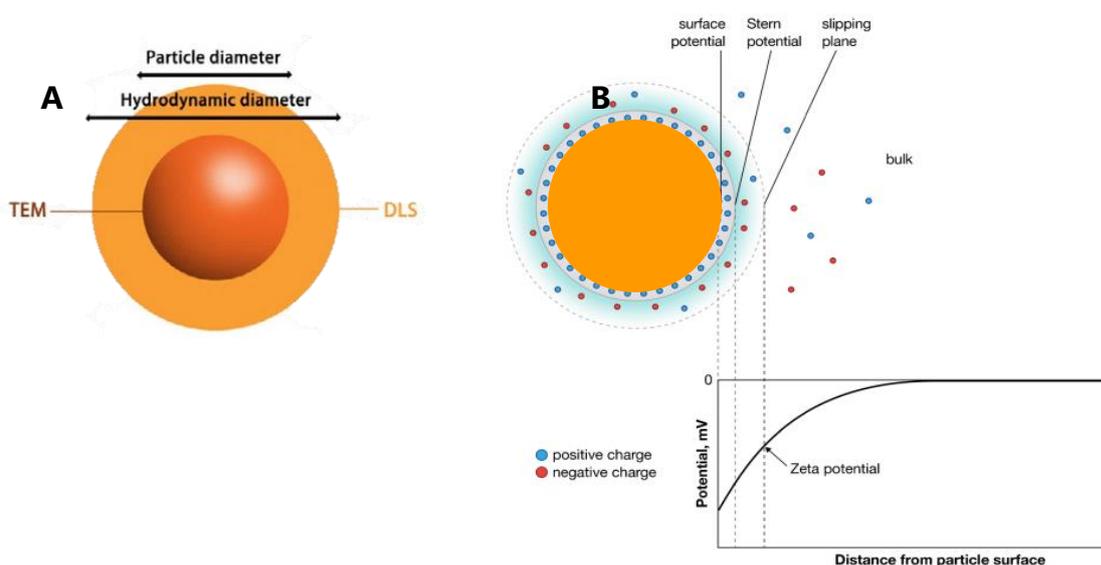


Figure 1: **A** Diamètre hydrodynamique. Figure extraite de Rahdar et al. (2019) [2]
B. Potentiel zêta. Figure extraite de Smith et al. (2017)[4]

La microscopie électronique en transmission (MET) permet non seulement d'observer la taille réelle des nanoparticules d'or une à une, mais aussi leur morphologie. Bien que cette technique soit très utile, elle est également très chronophage. La préparation des grilles, l'ajustement du microscope et finalement l'analyse des données, y compris le traitement des images pour obtenir les diamètres d'un grand nombre de nanoparticules, font que seuls les échantillons potentiellement utilisés pour les synthèses des nanoétoiles d'or sont soumis à l'observation par MET.

Par la suite seront présentés les différentes synthèses de germes en utilisant des protocoles utilisés dans la littérature. Dans toutes les synthèses présentées, le précurseur d'or est HAuCl_4 et l'agent réducteur est le citrate de sodium. Ce dernier joue aussi le rôle de stabilisant dans toutes les synthèses à l'exception de celle réalisé selon le protocole décrit par Ben Haddada *et. al*[5] où c'est l'acide tannique qui joue ce rôle (**GD**).

2.1 Germes (**GA**) selon la référence Yuan *et al.* (2012)

Le premier protocole que nous avons testé est celui décrit par Yuan *et al.* (2012)[6]. Il permet d'obtenir des AuNP sphériques avec une concentration en or de 0,87 mM en utilisant du citrate de sodium comme agent réducteur et stabilisant avec un rapport $\frac{\text{Citrate}}{\text{Au}}=5,1$. Selon les auteurs, le diamètre des nanoparticules obtenues est de $12\pm 0,7$ nm (bien qu'ils ne mentionnent pas si cette valeur correspond au diamètre obtenu par microscopie électronique ou par DLS), ils ne présentent aucune image par MET ni de spectre UV-Vis.

L'inspection visuelle révèle une solution limpide rouge bordeaux. Le spectre UV-Vis présente une seule bande plasmon bien définie à 525 nm (Figure 2).

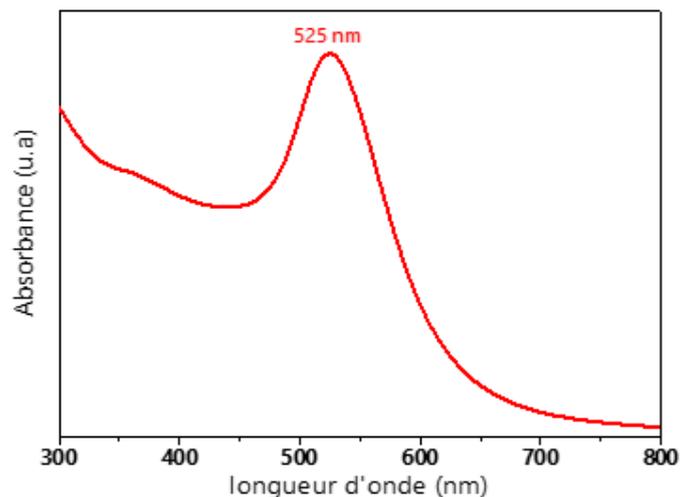


Figure 2: Spectre d'absorbance des AuNP (**GA**) synthétisées selon Yuan *et al.* (2012)

Le diamètre hydrodynamique des germes, mesuré par DLS, est de $22,6 \pm 4,1$ nm, tandis que le potentiel zêta est de -51 ± 4 mV. La valeur négative est due à la charge négative des ions citrate qui stabilisent les nanoparticules.

La forme ainsi que la distribution des tailles des nanoparticules ont ensuite été déterminées par microscopie électronique en transmission (Figure 3). Les diamètres des

nanoparticules ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ. Le diamètre moyen est de $18,6 \pm 4,9$ nm, la distribution de taille est présentée sur la Figure 4. L'hétérogénéité est notable dans les images, les nanoparticules les plus petites ont un diamètre de 6 nm, pendant que les plus grandes atteignent 30 nm. Bien que ces germes pourraient théoriquement être utilisés pour l'étape de croissance, il est fort probable que cette synthèse conduisent à des nanoétoiles très polydispersées et soit peu reproductible.

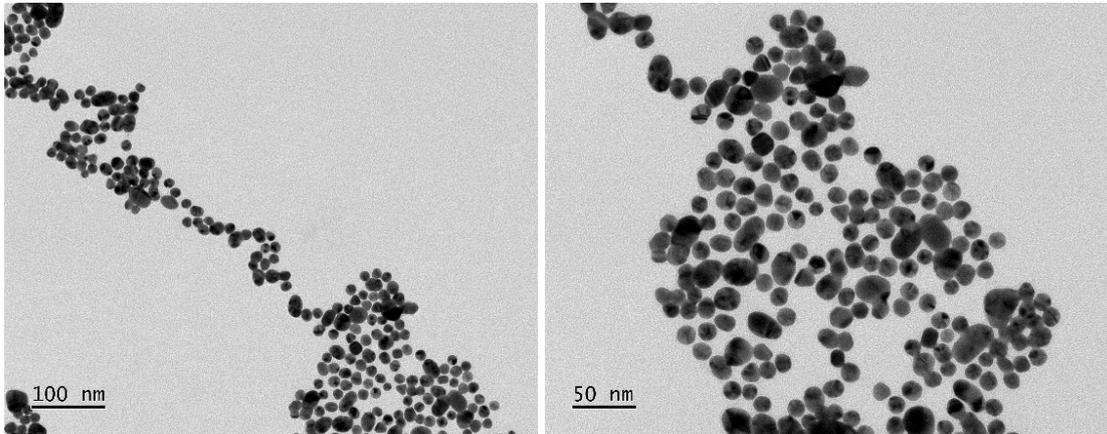


Figure 3: Images MET des AuNP (GA) synthétisées selon Yuan et al. (2012)

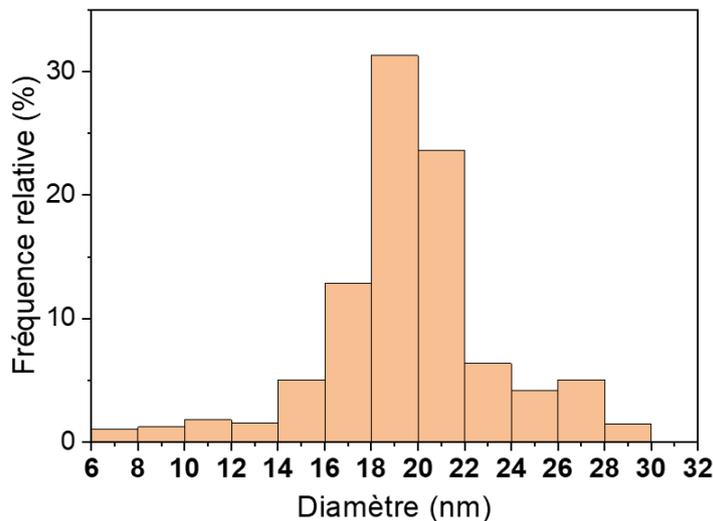


Figure 4: Distribution de tailles de AuNP (GA) synthétisées selon Yuan et al. (2012)

2.2 Germes (GB) selon la référence Zabetakis et al. (2012)

Le protocole suivant pour la synthèse des germes **GB1** est basé sur la publication de Zabetakis et al. (2012).[7] Il permet de produire des germes sphériques avec une concentration en or de 0,3 mM en utilisant du citrate de sodium comme agent réducteur

et stabilisant avec un rapport $\frac{\text{Citrate}}{\text{Au}}=4,0$. Selon les auteurs, les nanoparticules obtenues ont un diamètre de $12,6 \pm 0,9$ nm ($17,3$ nm par DLS). Le spectre d'absorption (Figure 5) présente une bande plasmon unique à 521 nm. La DLS indique un diamètre hydrodynamique de $21,4 \pm 2,3$ nm. Le potentiel zêta est de -44 ± 5 mV, ce qui est en accord avec les charges négatives de l'anion citrate qui stabilise les nanoparticules.

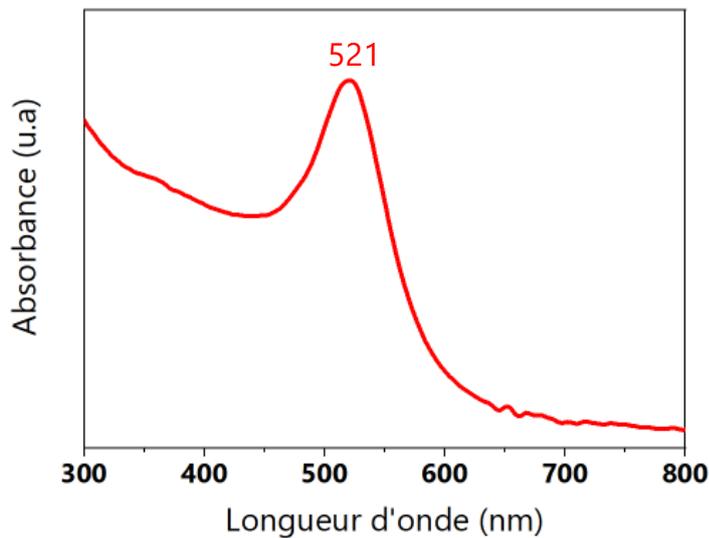


Figure 5: Spectre d'absorption des AuNP (**GB1**) synthétisées selon Zabetakis et al. (2012)

Les images MET (Figure 6) permettent d'observer des nanoparticules sphériques très homogènes en forme et en taille, avec un diamètre moyen de $15,0 \pm 2,1$ nm (Figure 7).

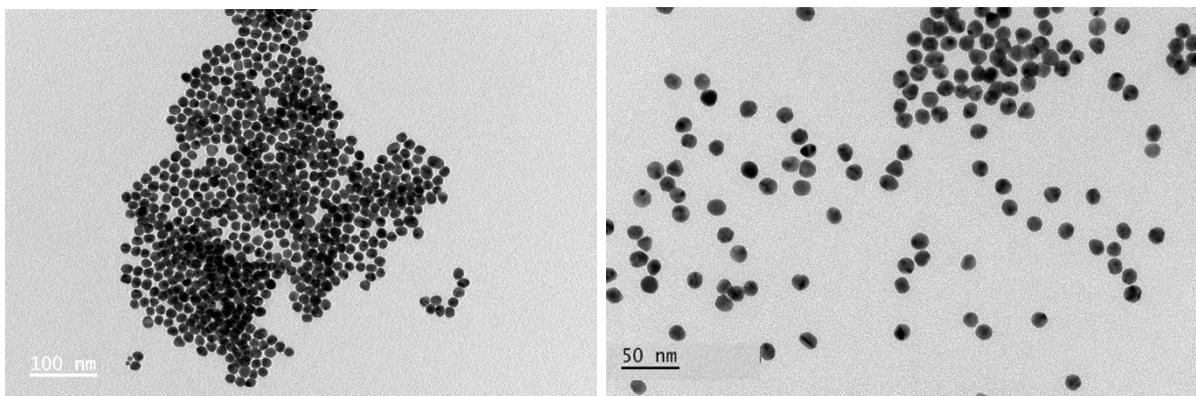


Figure 6: Images MET des AuNP (**GB1**) synthétisées selon Zabetakis et al. (2012)

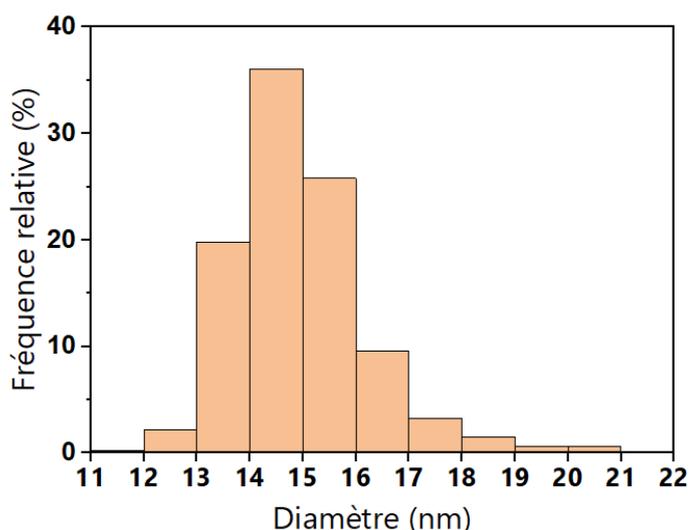


Figure 7 : Distribution de tailles de AuNP (**GB1**) synthétisées selon de Zabetakis et al. (2012)

Afin d'augmenter la concentration en germes de la solution, une variation du protocole a été réalisée en multipliant par 2 la concentration des précurseurs. Cette décision découle de la nécessité d'obtenir une solution de germes plus concentrée pour permettre, lors de l'étape ultérieure de croissance des nanoétoiles d'or, l'obtention d'une solution finale plus concentrée en particules. Cette adaptation est motivée par le fait que les tests biologiques présentés dans le dernier chapitre nécessitent plusieurs dilutions successives dans le milieu de culture.

Cette variante sera dénommée **GB2** et permet d'obtenir des germes sphériques avec une concentration en or de 0,6 mM et avec un rapport $\frac{\text{Citrate}}{\text{Au}}=4,0$. Selon les auteurs, le diamètre des nanoparticules diminue légèrement à $10,7 \pm 0,9$ nm (15,6 nm par DLS). Selon eux, cette diminution pourrait être due à la diminution du pH causé par l'augmentation de la concentration de HAuCl_4 . L'inspection visuelle révèle une solution limpide de couleur rose. Le spectre d'absorption (Figure 8) présente une bande plasmon unique à 519 nm. La DLS indique un diamètre hydrodynamique de $18,3 \pm 2,0$ nm. Le potentiel zêta est de -48 ± 9 mV. Les images MET (Figure 9) montrent des nanoparticules sphériques avec diamètre moyen de $14,1 \pm 4,5$ nm (Figure 10) certaines coalescences sont identifiables, ce qui augmente l'écart type.

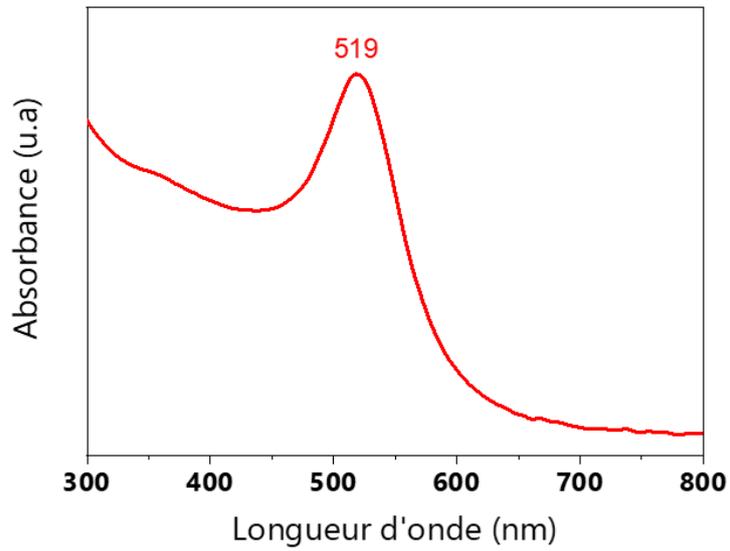


Figure 8: Spectre d'absorption des AuNP (GB2) synthétisées selon la variante de Zabetakis et al. (2012)

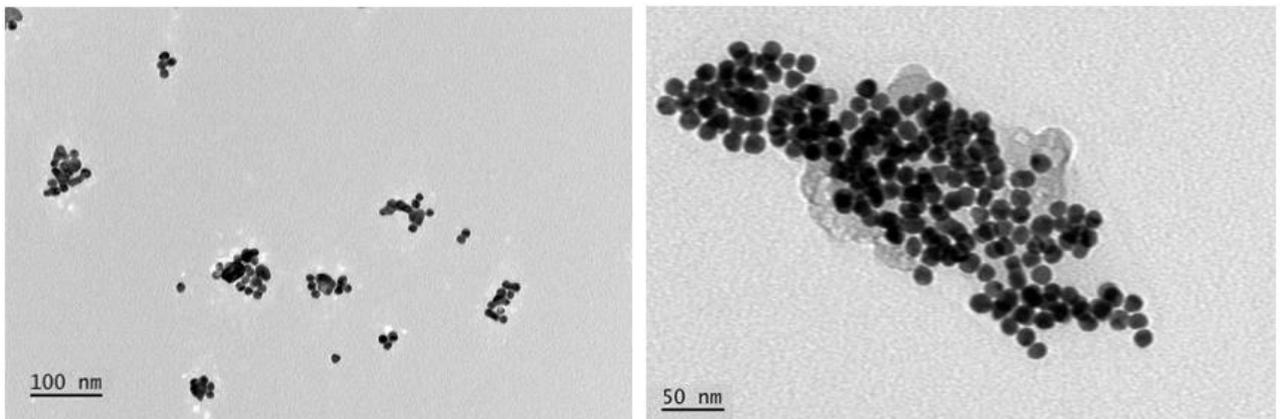


Figure 9: Images MET des AuNP (GB2) synthétisées selon la variante de Zabetakis et al. (2012)

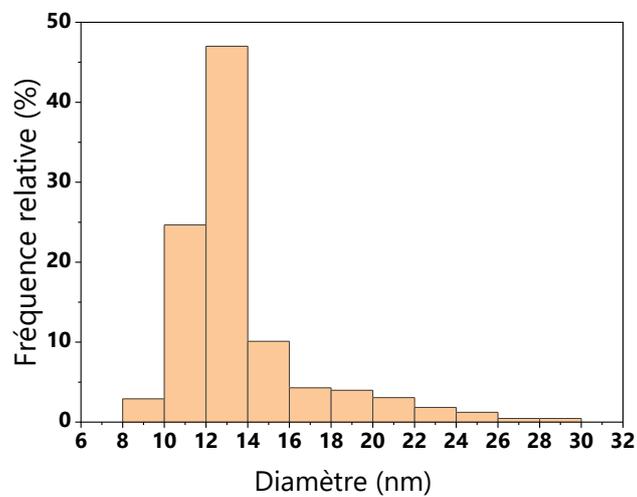


Figure 10: Distribution de tailles de AuNP (GB2) synthétisées selon Zabetakis et al.

2.3 Germes (GC) selon la référence Sivaraman *et al.* (2011)

Le protocole suivant pour la synthèse des germes (GC) est basé sur la publication de Sivaraman *et al.* (2011).[8] La principale différence est l'ordre d'ajout des réactifs, dans ce cas, c'est le précurseur d'or concentré qui est ajouté à une solution aqueuse contenant le citrate de sodium qui est l'agent réducteur. Selon les auteurs cela permet d'obtenir des AuNP homogènes avec un diamètre inférieur à 10 nm, une concentration en or de 0,3 mM et un rapport $\frac{\text{Citrate}}{\text{Au}}=5,0$. Le spectre d'absorption (Figure 11) présente une bande plasmon unique à 520 nm.

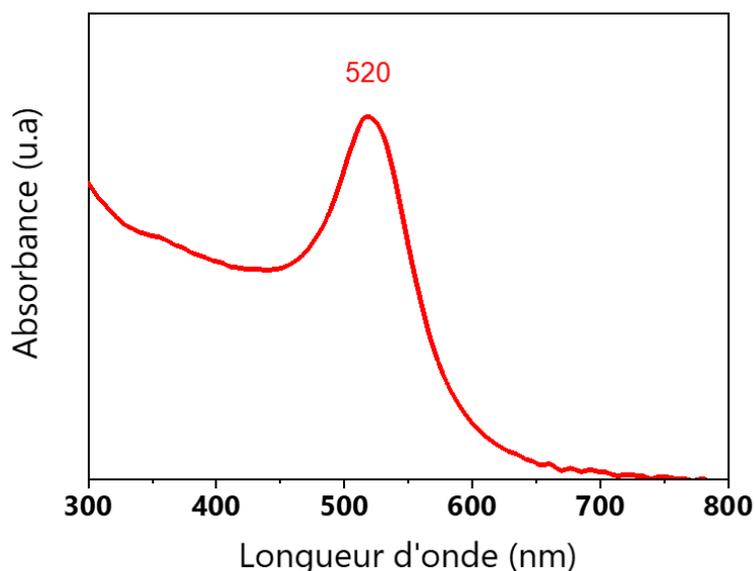


Figure 11: Spectre d'absorption des AuNP (GC) synthétisées selon Sivaraman *et al.* (2011)

La DLS indique un diamètre hydrodynamique de $21,8 \pm 2,9$ nm. Le potentiel zêta est de -42 ± 7 mV, ce qui est cohérent avec les charges négatives de l'anion citrate qui stabilise les nanoparticules.

Les images MET (Figure 12) permettent d'observer des nanoparticules sphériques très homogènes en forme et en taille, mais avec un diamètre de $15,7 \pm 3,2$ nm, supérieur à celui reporté (Figure 13).

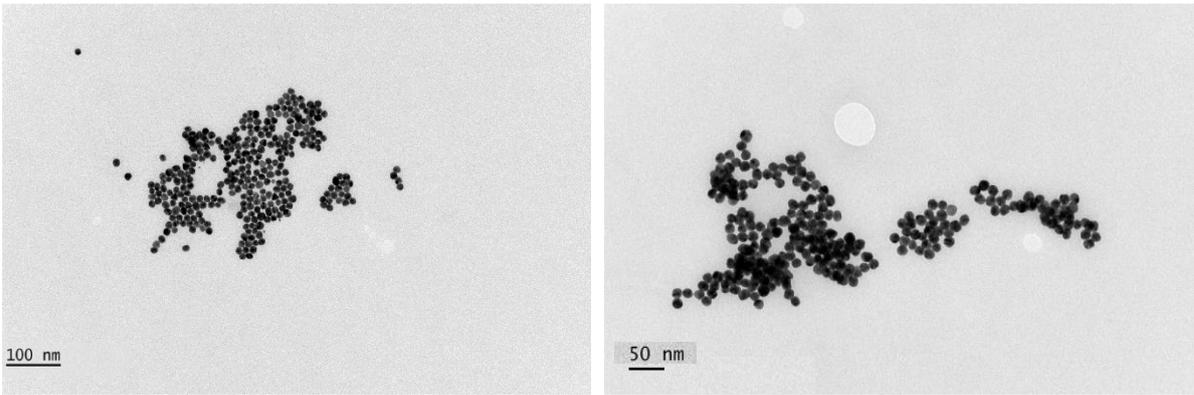


Figure 12: Images MET des AuNP (GC) synthétisées selon Sivaraman et al. (2011)

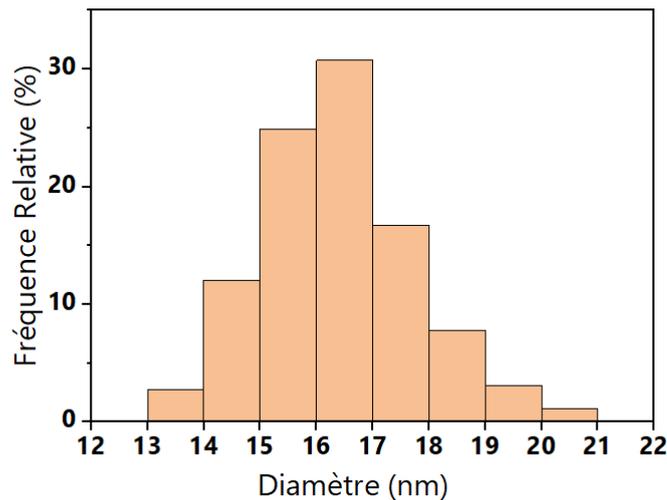


Figure 13: Distribution de tailles de AuNP (GC) synthétisées selon Sivaraman et al. (2011)

2.4 Germes (GD) selon la référence Ben Haddada et al. (2016)

Un quatrième protocole (GD1) pour la synthèse des germes a été testé, celui décrit par Ben Haddada et al. (2016).[5] Il permet de produire des germes sphériques avec une concentration en or de 0,29 mM en utilisant du citrate de sodium comme agent réducteur avec un rapport $\frac{\text{Citrate}}{\text{Au}}=5,0$ et possède la particularité d'utiliser de l'acide tannique comme agent stabilisateur. Selon les auteurs, le diamètre moyen est de $13,5 \pm 1$ nm pendant que la bande plasmon se trouve à 520 nm. L'inspection visuelle révèle une solution limpide de couleur rose. Le spectre UV-Vis présente une seule bande plasmon bien définie à 520 nm. (Figure 14)

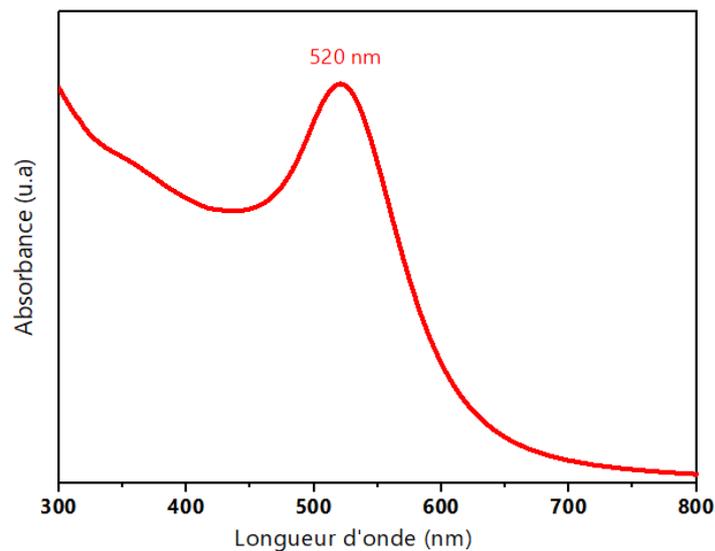


Figure 14: Spectre d'absorption des AuNP (**GD1**) synthétisées selon Ben Haddada et. al (2016)

L'analyse par DLS montre un diamètre hydrodynamique de $16,3 \pm 2,2$ nm. Le potentiel zêta est quant à lui de -48 ± 14 mV, ce qui est en accord avec les charges négatives de l'acide tannique et du citrate en surface des AuNP.

Les images MET (Figure 15) permettent d'observer des nanoparticules homogènes en forme. On peut aussi observer que le diamètre moyen est $10,1 \pm 2,9$ nm (Figure 16).

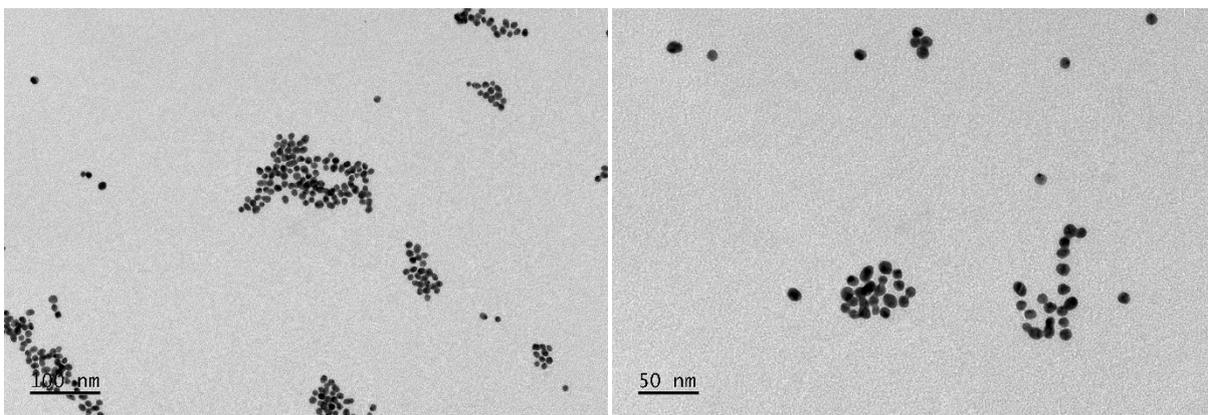


Figure 15: Images MET des AuNP (**GD1**) synthétisées selon Ben Haddada et. al (2016)

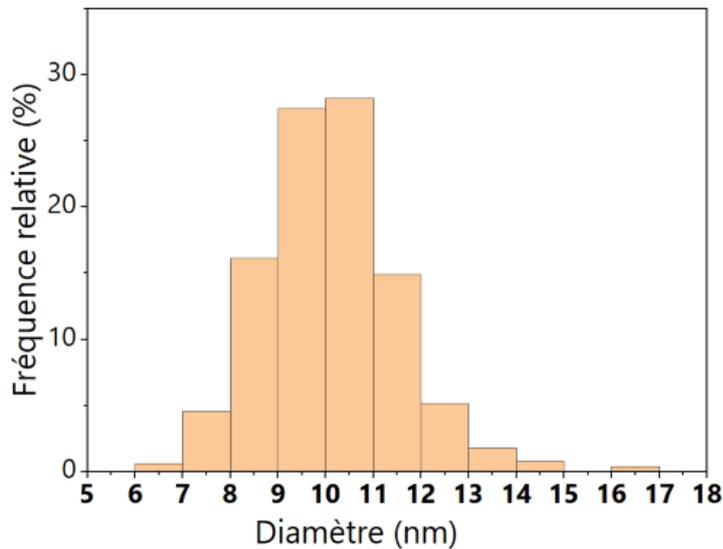


Figure 16: Distribution de tailles de AuNP (**GD1**) synthétisées selon Ben Haddada et. al (2016)

Une nouvelle fois, une variante a été introduite dans le but d'augmenter la concentration en or des germes. Cependant, dans ce test, la concentration des précurseurs sera multipliée par 3 et non pas par 2. Cette variante, qui n'est pas rapportée dans la littérature permet d'obtenir des germes sphériques avec une concentration en or de 0,87 mM, sera appelée **GD2**.

Le spectre d'absorption (Figure 17) présente une bande plasmon unique à 515 nm. La DLS indique un diamètre hydrodynamique de $11,6 \pm 2,8$ nm. Le potentiel zêta est quant à lui de -53 ± 16 mV.

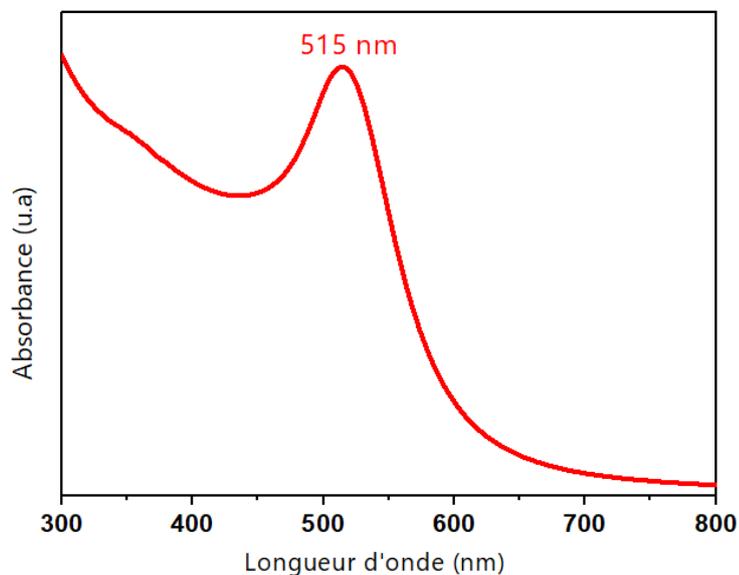


Figure 17: Spectre d'absorption des AuNP (**GD2**) synthétisées selon la variante de Ben Haddada et. al (2016)

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des précurseurs

Les images MET (Figure 18) permettent d'observer des nanoparticules sphériques, avec un diamètre moyen de $7,3 \pm 2,9$ nm (Figure 19). Cette diminution de la taille par rapport aux germes **GD1** pourrait être due à l'augmentation de la concentration du précurseur d'or, HAuCl_4 (tout en conservant la relation $\frac{\text{HAuCl}_4}{\text{Réducteur}}$), ce qui diminue le pH.

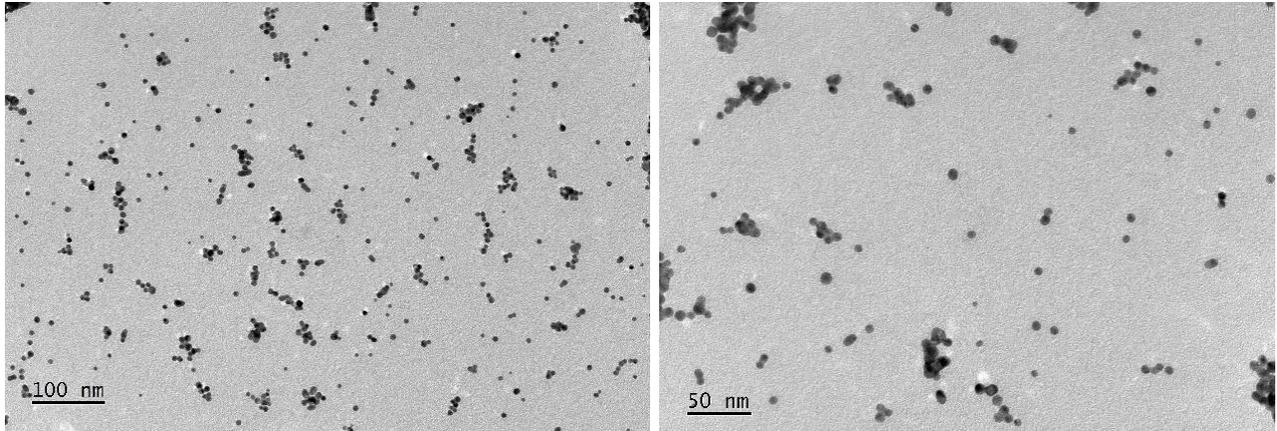


Figure 18: Images MET des AuNP (**GD2**) synthétisées selon la variante de Ben Haddada et al. (2016)

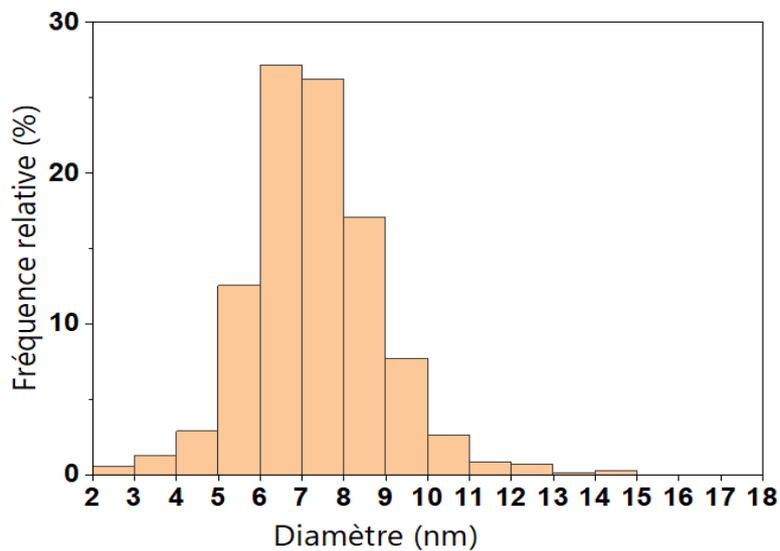


Figure 19 : Distribution de tailles de AuNP (**GD2**) synthétisées selon la variante de Ben Haddada et al. (2016)

2.5 Discussion sur les différentes synthèses de germes

Les résultats des synthèses sont regroupés dans le tableau 1. Bien que tous les protocoles effectués visent à synthétiser des nanoparticules d'or sphériques, plusieurs différences sont identifiables. Les synthèses **GD1** et **GD2** incorporent un agent stabilisant (acide tannique) additionnel au citrate. Des points communs sont également identifiables : les potentiels zêta de toutes les AuNP sont négatifs car les ligands en surface sont tous des anions, tel que le tannate pour les **GD1** et **GD2** et le citrate pour tous les autres. Un autre point commun, la relation $\frac{Citrate}{Au}$ dans toutes les synthèses est relativement proche entre 4,0 et 5,1, ce qui représente un large excès en réducteur.

Du point de vue de l'homogénéité, les germes les plus intéressants sont les **GB1** avec une taille de $15,0 \pm 2,1$ nm, soit l'écart type le plus bas des 6 protocoles testés. Pour cette raison, la croissance des nanoétoiles se fera avec les germes **GB1**.

Tableau 1: caractérisation des germes obtenus

Code	[Au] (mM)	Relation $\frac{Citrate}{Au}$	LSPR (nm)	Diamètre Référence (nm)	Diamètre obtenu (nm)	Potentiel zêta (mV)	Ligand en surface	Réf
GA	0,87	5,1	525	$12 \pm 0,7^*$	$18,6 \pm 4,9$	-51 ± 4	citrate	[6]
GB1	0,30	4,0	521	$12,6 \pm 0,9$	$15,0 \pm 2,1$	-44 ± 5	citrate	[7]
GB2	0,60	4,0	519	$10,7 \pm 0,9$	$14,1 \pm 4,5$	-48 ± 9	citrate	[7]
GC	0,30	4,0	520	< 10	$15,7 \pm 3,2$	-42 ± 7	citrate	[8]
GD1	0,29	4,0	520	$13,5 \pm 1$	$10,1 \pm 2,9$	-48 ± 14	Citrate+ Tannate	[5]
GD2	0,87	4,0	515	**	$7,3 \pm 2,9$	-53 ± 16	Citrate + Tannate	[5]

* Les auteurs ne précisent pas s'il s'agit du diamètre obtenu par TEM ou par DLS

** La synthèse n'existe pas dans la littérature avec cette concentration

3 Synthèse et caractérisation des polyoxométallates

Cette partie décrit la synthèse et la caractérisation des POMo fonctionnalisés avec les ligands alendronate et zolédronate. Il est important de noter que ces ligands sont disponibles commercialement et largement utilisés en médecine, notamment pour le traitement de l'ostéoporose. L'acide alendronique est connu sous le nom de Fosamax®, tandis que l'acide zolédronique est vendu sous le nom d'Aclasta®. De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité des bisphosphonates comme agents anticancéreux et antibactériens.[9], [10], [11], [12], [13], [14]

3.1 Polyoxomolybdate réduit hybride Mo₄Al_{e2}

Le polyoxomolybdate hybride $[(C_2H_5)_2NH_2]_6[Mo^V_4O_8(O_3PC(C_3H_6NH_3)OPO_3)_2].6H_2O$ (Mo₄Al_{e2}) est un POM à base d'ions Mo^V et de ligands alendronate. Il a été synthétisé pour la première fois en 2010 dans l'équipe MIM à l'ILV par Compain *et al.*[14] en utilisant le ligand alendronate synthétisé selon un protocole décrit par Kubíček *et al.*[15]

3.1.1 Structure du POMo Mo₄Al_{e2}

Ce POMo centrosymétrique est constitué de deux unités {Mo₂O₁₀} connectées entre elles par des arêtes (Figure 20). Deux ligands bisphosphonates $[O_3PC(C_3H_6NH_3)OPO_3]^{4-}$ tétradentés se lient de manière dissymétrique aux ions Mo^V. En effet, un groupe {PO₃} est monocoordiné à un centre Mo^V, tandis que l'autre groupe phosphonate est coordiné via deux atomes d'oxygène à un centre métallique adjacent. De plus, le groupe hydroxyle déprotoné agit en tant que ligand pontant (μ₂-O). Les 6 contre-ions sont des cations diméthylammonium, qui établissent des liaisons hydrogène avec les POM.[14]

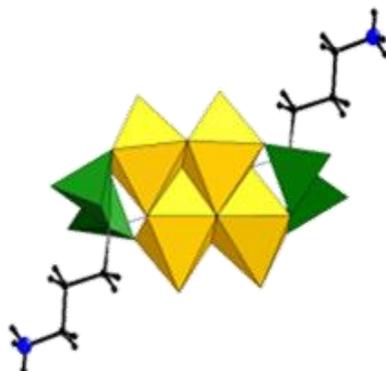


Figure 20 : Structure du POMo Mo₄Al_e₂. Octaèdres jaunes = Mo^VO₆, tétraèdres verts = PO₄, sphères noires = C, sphères bleues = N, sphères noires = H

3.1.2 Caractérisation du POMo Mo₄Al_e₂

La première caractérisation réalisée est la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les vibrations des liaisons P-O et P=O de l'alendronate sont détectables entre 1036 et 1136 cm⁻¹, tandis que les vibrations des liaisons Mo-O et Mo=O sont visibles entre 893 et 970 cm⁻¹ dans le spectre infrarouge du composé (Figure 21).

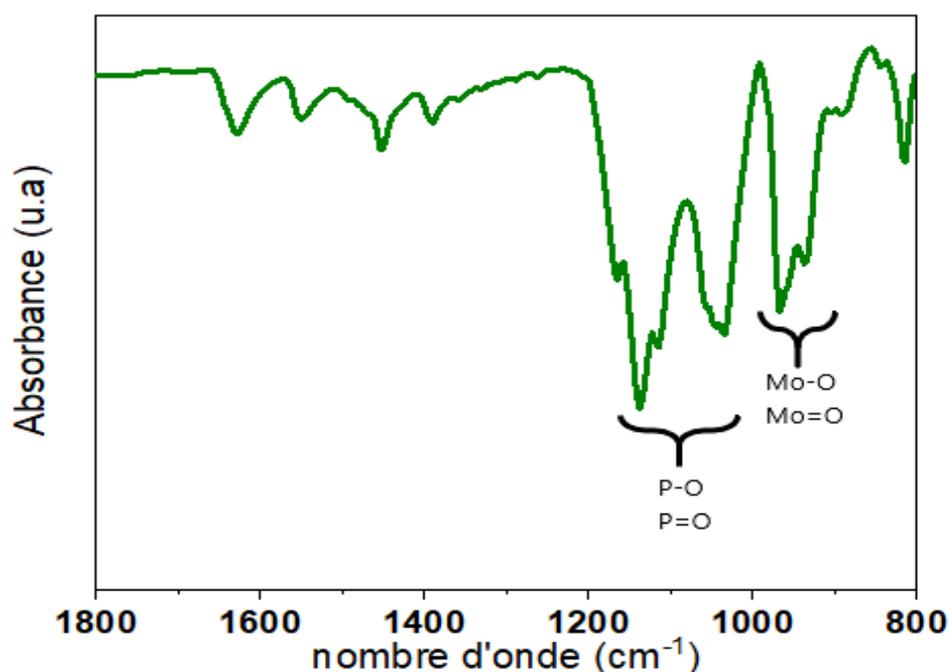


Figure 21: Spectre infrarouge du POMo hybride Mo₄Al_e₂

Le spectre RMN ³¹P{¹H} du POMo Mo₄Al_e₂ dans D₂O (Figure 22) présente un doublet de doublets, à 30,9 et 31,2 ppm pour le premier et 20,2 et 19,9 ppm pour le deuxième, en accord avec la présence de deux atomes de phosphore non équivalents et couplés au sein de chaque ligand bisphosphonate.

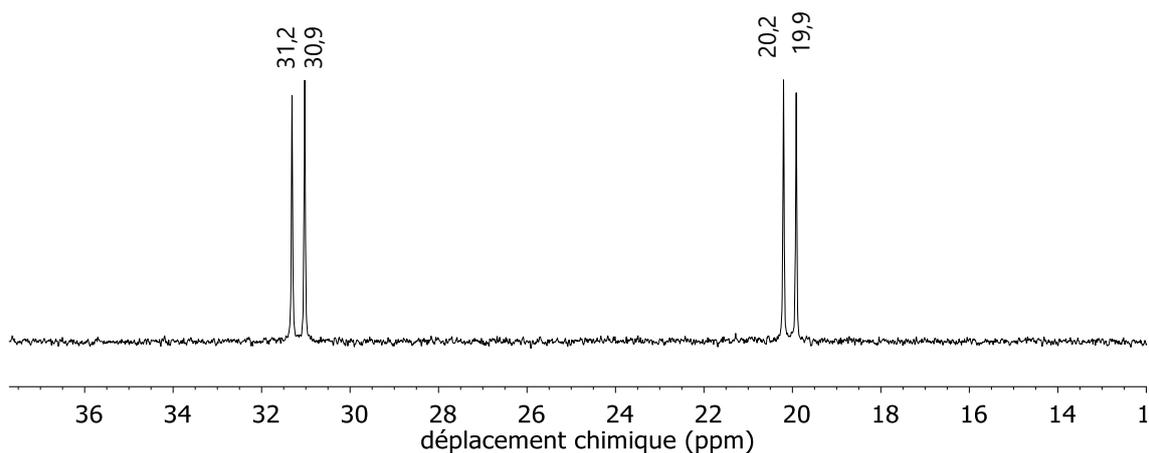


Figure 22: spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ du POMo Mo₄Al₂

L'analyse thermogravimétrique (ATG) (Figure 23) du composé permet de confirmer le degré d'hydratation (6 molécules d'eau pour chaque molécule de POM) et d'obtenir ainsi la formule détaillée $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}_2]_6[\text{Mo}^{\text{V}}_4\text{O}_8(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)\text{OPO}_3)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ avec une masse molaire de 1406 g/mol.

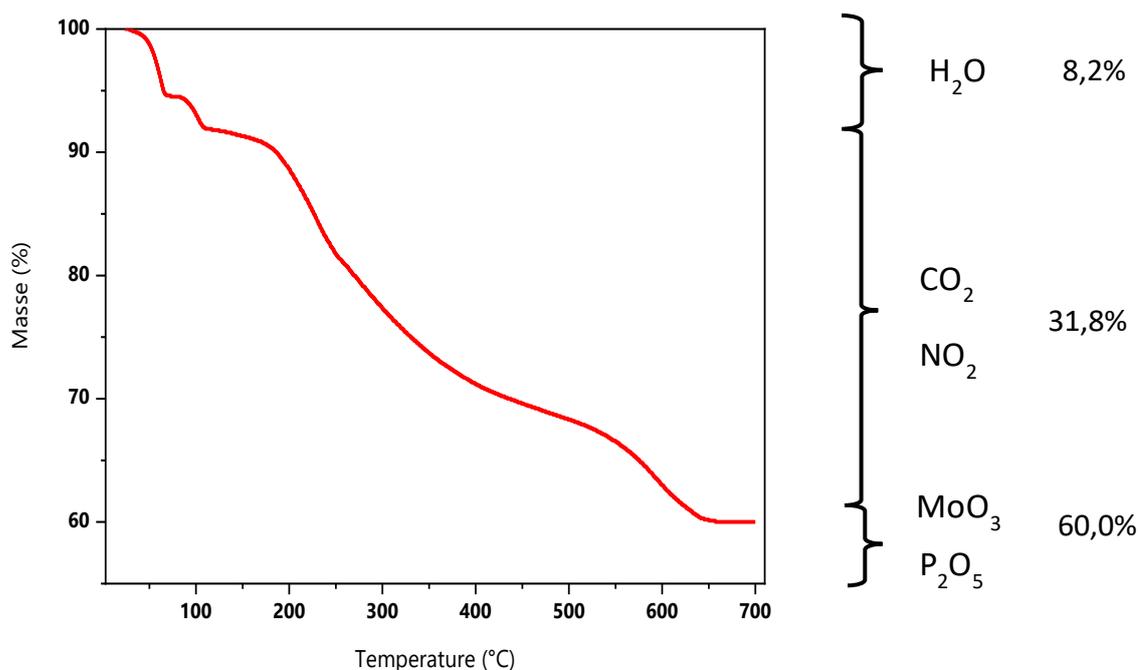


Figure 23: Analyse thermogravimétrique du POMo Mo₄Al₂

3.1.3 Propriétés électrochimiques du POMo Mo₄Al₂

Le POMo Mo₄Al₂ étant utilisé pour réduire l'or présent sous forme d'Au^{III} dans le

précurseur HAuCl_4 , il est nécessaire d'étudier les propriétés électrochimiques de ce POM. Cette caractérisation n'avait jamais été faite auparavant. Le cyclovoltammogramme du POM a été enregistré afin de déterminer si la réduction est réversible ou irréversible ainsi que de connaître le potentiel standard afin d'obtenir le diagramme de prédominance.

La voltammétrie cyclique (Figure 24) a été réalisée sur une solution de $\text{Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ 4 mM en utilisant une électrode en platine comme électrode de travail et avec comme référence une électrode au calomel saturé (ECS). On peut observer une réaction d'oxydation irréversible avec un potentiel anodique (E_a) de 0,68 V (par rapport à la référence ECS). Pour les réactions irréversibles, contrairement aux réactions réversibles, il est impossible d'estimer le potentiel standard comme la moyenne entre le potentiel anodique (E_a) et le potentiel cathodique (E_c). Il est cependant possible d'utiliser les deux premières dérivées du voltammogramme pour déterminer (E)ⁱ qui est le point d'inflexion (deuxième dérivée égale à zéro) et offre une excellente estimation du potentiel standard E° . [16]

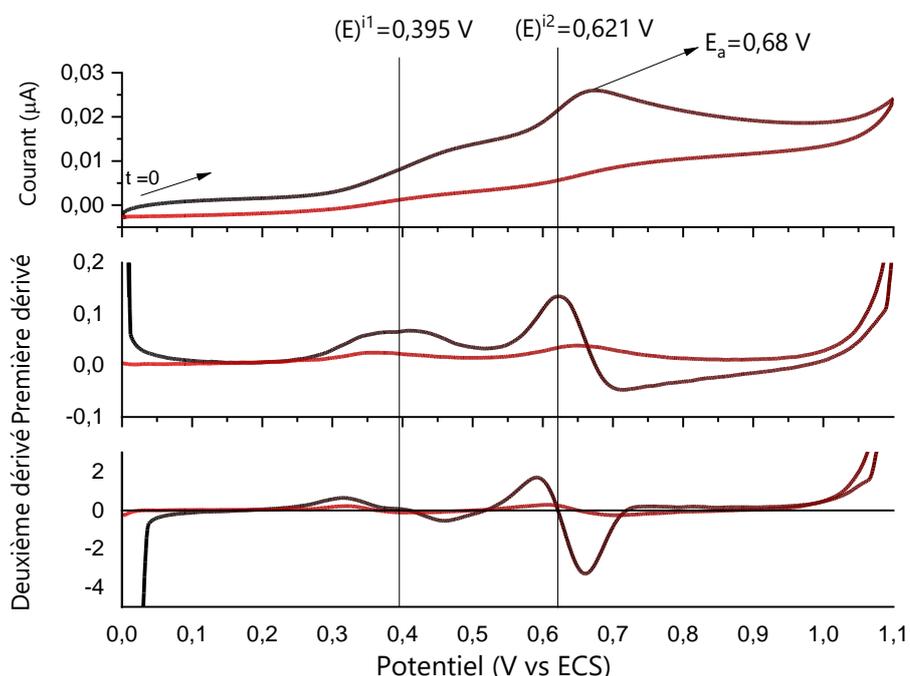


Figure 24: Voltammogramme du POMo $\text{Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ à un pH de 5,5 (figure supérieur) ainsi que sa première dérivée (figure du milieu) et la deuxième dérivée (figure inférieur)

Un point d'inflexion très net apparaît à 0,621 V vs ECS (ce qui correspond à un E° de 0,862 V vs ENH). Un deuxième, beaucoup moins net à 0,395 V vs ECS (ce qui correspond à un E° de 0,636 vs ENH) est aussi visible. La présence de deux potentiels d'oxydation

différents des ions molybdène présents dans le POM pourrait être reliées à des environnements chimiques différents de ces ions.

D'un autre côté la demi-équation de réduction de l'or est la suivante :



Grâce à la valeur des différents potentiels, on peut représenter le diagramme de prédominance (Figure 25), on constate que le précurseur $[\text{AuCl}_4]^-$ ne peut pas coexister avec le POMo Mo_4Al_2 , entraînant la réaction entre les deux.

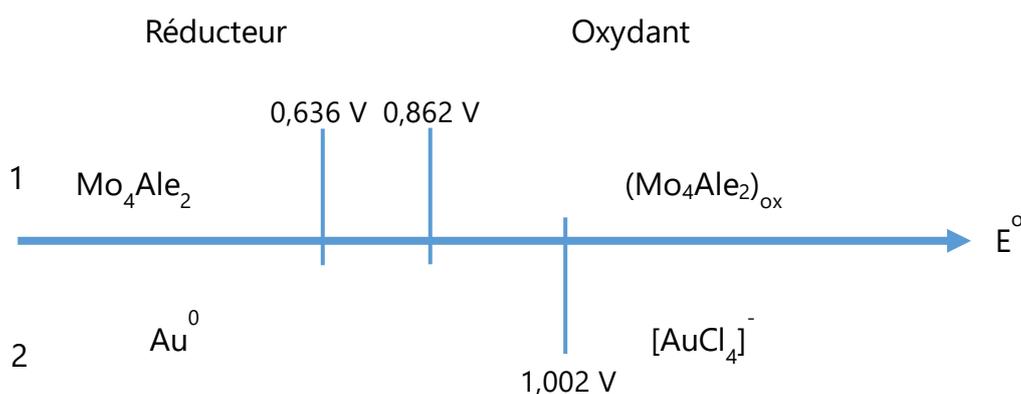


Figure 25: diagramme de prédominance avec le POMo Mo_4Al_2

3.2 Polyoxomolybdate réduit hybride Mo_8Zol_4

Le polyoxomolybdate (POMo) hybride $\text{Na}_8[(\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O}))_4(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{N}_2\text{H}_5)\text{OPO}_3)_4].20\text{H}_2\text{O}$ (Mo_8Zol_4) est un POMo à base de Mo réduit (Mo^{V}) avec quatre ligands zolédronate. Il a été synthétisé pour la première fois au sein de notre groupe.[18]

3.2.1 Structure du POMo Mo_8Zol_4

Grâce à des études par spectroscopie par résonance nucléaire (RMN), il a été possible de mettre en évidence un équilibre entre deux espèces différentes (Figure 26) : Mo_8Zol_4 et Mo_4Zol_2 . [18] Mo_4Zol_2 présente une structure analogue à celle du POMo Mo_4Al_2 décrit précédemment. Mo_8Zol_2 quant à lui possède une structure cyclique résultant de l'assemblage de quatre dimères $\{\text{Mo}_2\text{O}_{10}\}$ via 4 ligands bisphosphonates. Sa structure est analogue à celle du POMo Mo_8Al_4 . [14] Mo_8Zol_4 est stable à basse température (5°C), tandis que Mo_4Zol_2 est l'espèce majoritaire à haute température (80°C). Pour des températures intermédiaires, un mélange des deux POMo est présent. La Figure 27 montre le spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ à température ambiante, on peut voir les contributions

de chaque espèce. . La présence d'une troisième espèce, non identifiée, est également visible.

Figure 27 : spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ du POMo à température ambiante, le Mo_8Zol_4 coexiste avec le Mo_4Zol_2

3.2.2 Caractérisation du POMo Mo_8Zol_4

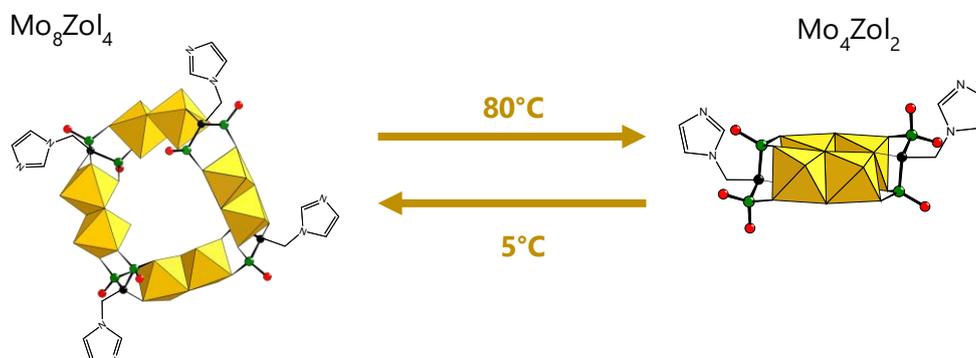
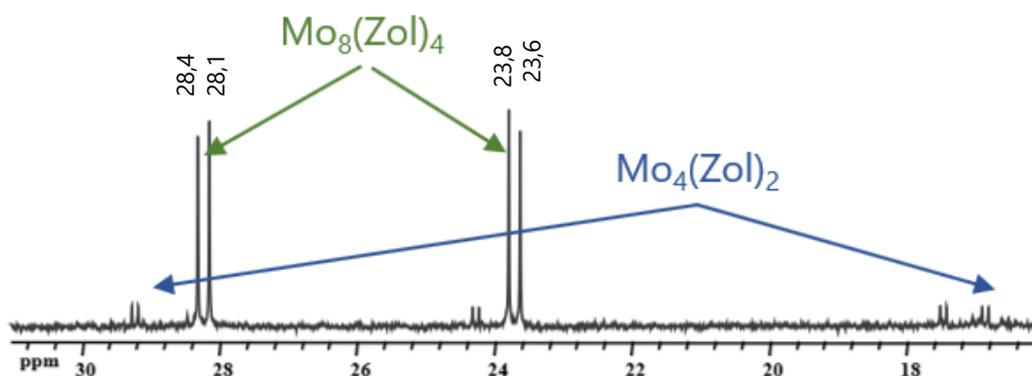


Figure 26: Equilibre entre les POMo Mo_8Zol_4 et Mo_4Zol_2 . Octaèdres jaunes = $\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_6$, sphères vertes = P, sphères noires = C



Les bandes de vibration des liaisons P-O et P=O du zolédronate sont observées entre 1055 et 1154 cm^{-1} sur le spectre infrarouge du POMo et celles des liaisons Mo=O et M-O sont centrées à 940 cm^{-1} (Figure 28).

L'analyse thermogravimétrique (ATG) (Figure 29) du composé permet de confirmer le degré d'hydratation (20 molécules d'eau pour chaque molécule de POMo) et d'obtenir ainsi la formule $\text{Na}_8[(\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O}))_4(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_4\text{N}_2\text{H}_5)\text{OPO}_3)_4].20\text{H}_2\text{O}$ avec une masse molaire de 2708 g/mol .

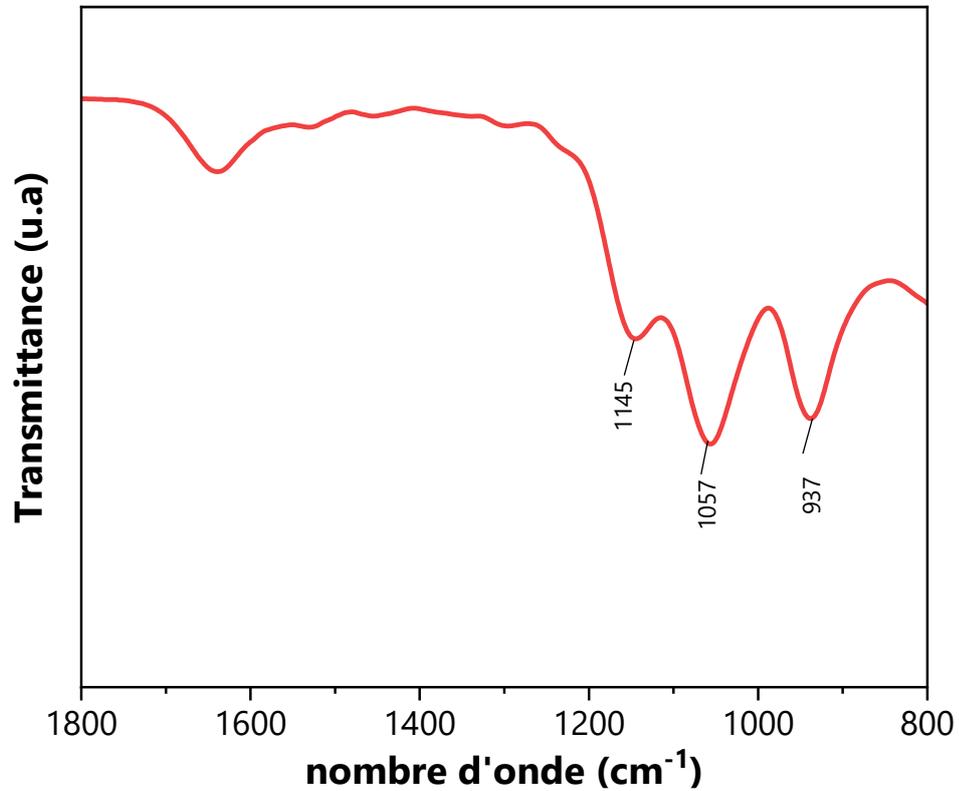


Figure 28: spectre infrarouge du Mo₈Zol₄

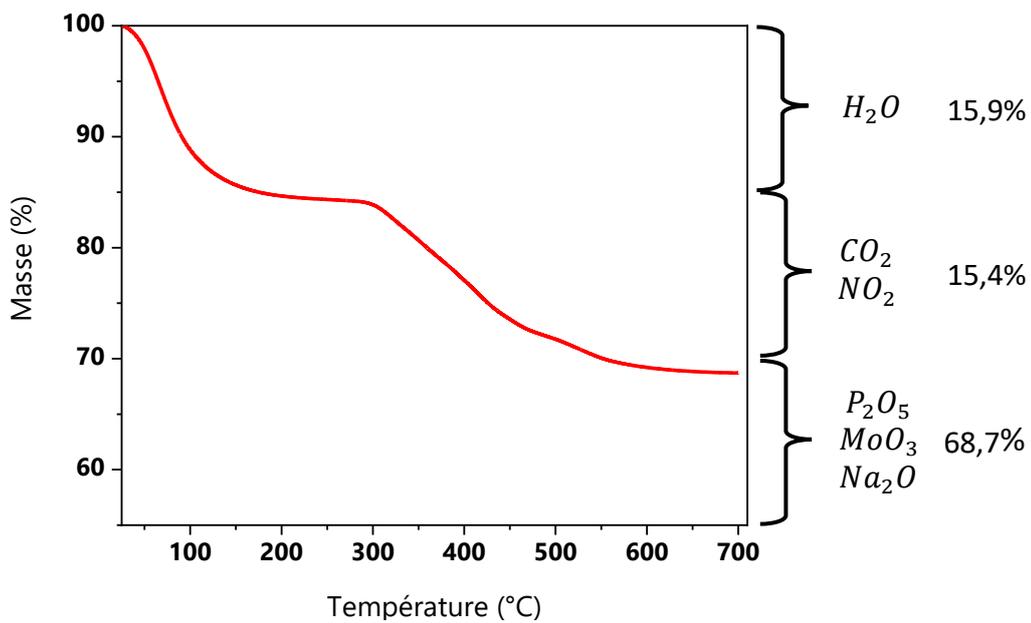


Figure 29: Analyse thermogravimétrique du Mo₈Zol₄

3.2.3 Electrochimie du POMo Mo₈Zol₄

Comme pour le POMo Mo₄Al₂, une caractérisation par voltammétrie cyclique a été effectuée pour le POMo Mo₈Zol₄. Celle-ci (Figure 30) a été réalisée sur une solution de

Mo_8Zol_4 à une concentration de 2 mM en utilisant une électrode en platine comme électrode de travail et avec comme référence une électrode au calomel saturé (ECS). On peut observer une réaction d'oxydation irréversible avec un potentiel anodique (E_a) de 0,486 V (par rapport à la référence ECS). A nouveau le potentiel standard est estimé grâce aux dérivées du voltammogramme. Un seul point d'inflexion (E^i) apparaît à 0,430 V vs ECS, ce qui correspond à un potentiel standard $E^\circ = 0,671$ VS ENH. L'apparition d'un seul pic s'explique par le fait que bien que les molybdène ont deux environnements différents, ceux-ci sont très semblables, l'unique différence étant que l'un est dicoordiné au Zol pendant que l'autre est tricoordiné.

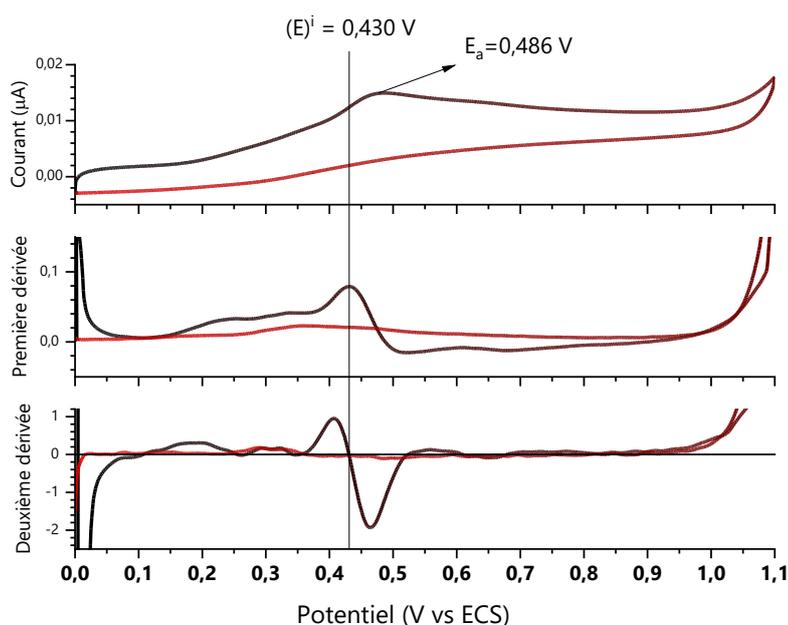


Figure 30 : Voltammogramme du Mo_8Zol_4 à pH = 5,5 (figure supérieure) ainsi que sa première dérivée (figure du milieu) et la deuxième dérivée (figure inférieure)

Grace aux deux potentiels, on peut représenter le diagramme de prédominance (Figure

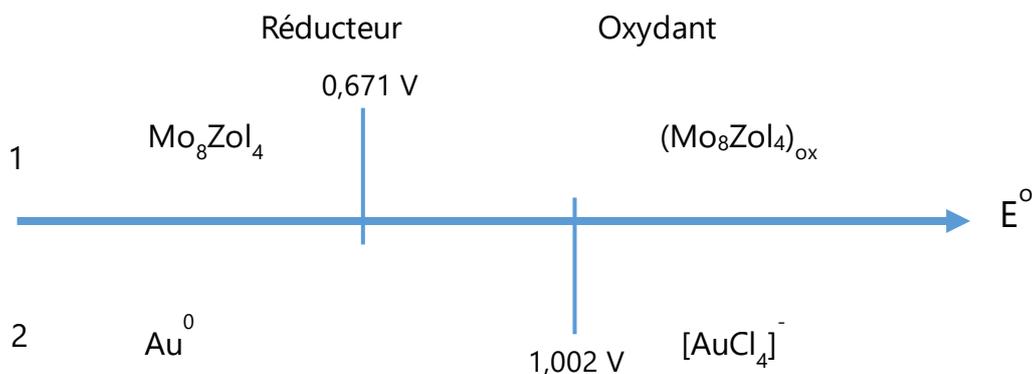


Figure 31: Diagramme de prédominance avec le POMo Mo_8Zol_4

31). On peut constater que le précurseur d'or, $[\text{AuCl}_4]^-$ ne peut pas coexister avec Mo_8Zol_4

entraînant la réaction entre les deux.

3.3 Comparaison entre les POMo Mo₄Al_e₂ et Mo₈Zol₄

Les deux POMo présentent des similitudes sur certains aspects mais diffèrent sur bien d'autres. Les similitudes les plus remarquables sont que les deux possèdent des ions Mo^V, ce qui leur confère la capacité de réduire l'or. Cette capacité réductrice est néanmoins plus faible que celle de l'acide ascorbique (H₂A), qui est largement utilisé dans la synthèse de nanoétoiles dans la littérature,[19] car bien que ce dernier soit considéré comme un réducteur faible,[20] son potentiel standard (E°) de 0,06 V par rapport à ENH, indique qu'il est un réducteur plus fort que les deux POMo étudiés (Figure 32).[17] Cependant, étant donné que la synthèse avec l'acide ascorbique est très rapide (30 secondes),[6] l'utilisation d'un réducteur plus faible pourrait avoir l'avantage de permettre un meilleur contrôle de la réaction. Un autre point commun entre les deux est le rapport atomique Mo/P égal à 1.

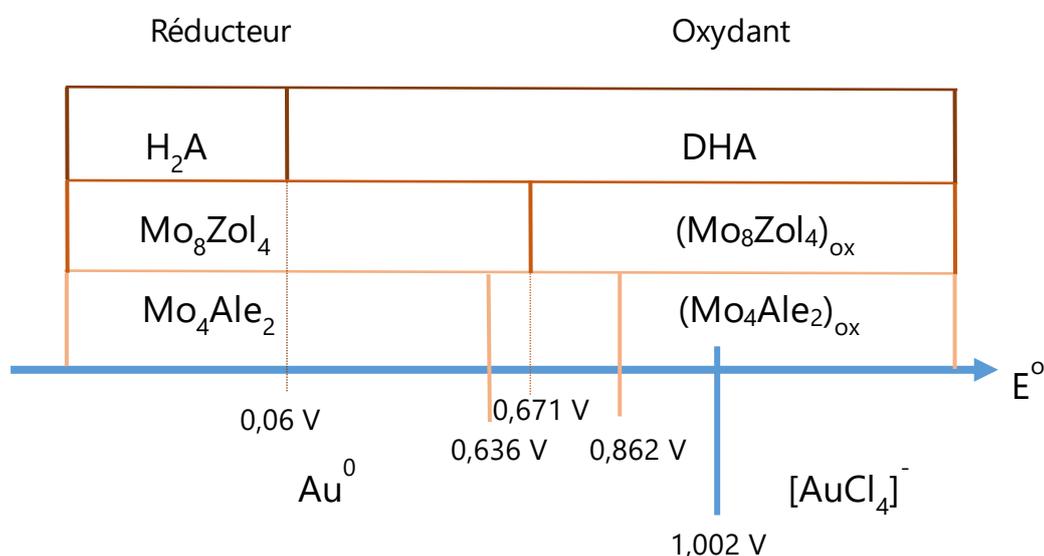


Figure 32: Diagrammes de prédominance comparatif

Les différences les plus notables sont les suivantes. Premièrement, le ligand bisphosphonate n'est pas le même, ce qui pourrait revêtir une importance significative lors de l'évaluation de la cytotoxicité, car le zolédronate est plus actif sur les cellules cancéreuses que l'alendronate. Deuxièmement, le POMo Mo₈Zol₄ possède le double d'atomes de Mo^V et par conséquent, il peut donner le double d'électrons (tableau 2). Cela devra être pris en compte dans les synthèses des AuNS@POMo pour conserver la

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des précurseurs

relation $\frac{Au^{3+}}{Réducteur}$. Finalement, Mo_8Zol_4 possède aussi le double de groupes bisphosphonates par molécule.

Tableau2 : Nombre d'électrons disponibles par molécule de réducteur

Réducteur	Nombre d'électrons disponibles
Acide Ascorbique	2
Mo_4Al_2	4
Mo_8Zol_4	8

4 Conclusion

L'ensemble des expériences décrites dans ce chapitre représente une démarche méthodique et approfondie pour la synthèse et la caractérisation des précurseurs nécessaires à la fabrication des nanoétoiles d'or (AuNS) recouvertes de polyoxomolybdates (POMo) hybrides.

La première partie du chapitre met en évidence l'importance de la synthèse de nanoparticules d'or sphériques homogènes et reproductibles, essentielles pour garantir la qualité des nanoétoiles finales. Les différentes méthodes de synthèse explorées sont discutées en détail, avec une analyse approfondie des résultats obtenus par différentes techniques de caractérisation telles que la spectroscopie UV-Vis, la diffusion dynamique de la lumière (DLS), le potentiel zêta et la microscopie électronique en transmission (MET). Ces caractérisations permettent d'évaluer la taille, la forme, la distribution et la stabilité des nanoparticules d'or obtenues. Les germes synthétisés selon la méthode appelée **GB1** (Zabetakis *et al.* (2012)) sont les plus intéressants en termes d'homogénéité et seront ceux que nous utiliserons par la suite pour la synthèse des nanoétoiles.

La seconde partie du chapitre aborde la synthèse et la caractérisation des POMo fonctionnalisés avec les ligands alendronate et zolédronate. Ces ligands, disponibles commercialement et utilisés en médecine, ajoutent une dimension intéressante à ces composés en termes d'applicabilité potentielle, notamment dans le domaine médical. Les caractérisations effectuées, telles que la spectroscopie infrarouge et la thermogravimétrie, fournissent des informations importantes sur la composition et la structure des POMo.

Enfin, l'étude des propriétés électrochimiques des POMo, réalisée par voltammétrie, confirme leur capacité à réduire l'or et contribue à la compréhension des mécanismes impliqués dans les réactions de synthèse des nanoétoiles.

5 Références

- [1] J. Turkevich, P. C. Stevenson, et J. Hillier, « A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold », *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no 0, p. 55 75, 1951, doi: 10.1039/DF95111100055.
- [2] A. Rahdar, N. Amini, F. Askari, M. A. Bin, et H. Susan, « Dynamic light scattering: A useful technique to characterize nanoparticles », *J. Nanoanalysis*, vol. 6, no 2, p. 80 89, 2019, doi: 10.22034/JNA.2019.667079.
- [3] Z. Fatfat, M. Karam, B. Maatouk, D. Fahs, et H. Gali-Muhtasib, « Chapter 7 - Nanoliposomes as safe and efficient drug delivery nanovesicles », in *Advanced and Modern Approaches for Drug Delivery*, A. K. Nayak, M. S. Hasnain, B. Laha, et S. Maiti, Éd., Academic Press, 2023, p. 159 197. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91668-4.00002-2>.
- [4] M. C. Smith, R. M. Crist, J. D. Clogston, et S. E. McNeil, « Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes », *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, no 24, p. 5779 5787, sept. 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0527-z.
- [5] M. Ben Haddada et al., Gold nanoparticles assembly on silicon and gold surfaces: Mechanism, stability, and efficiency in diclofenac biosensing, vol. 120, no 51. 2016. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10322.
- [6] H. Yuan, C. G. Khoury, H. Hwang, C. M. Wilson, G. A. Grant, et T. Vo-Dinh, « Gold nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging », *Nanotechnology*, vol. 23, no 7, 2012, doi: 10.1088/0957-4484/23/7/075102.
- [7] K. Zabetakis, W. E. Ghann, S. Kumar, et M. C. Daniel, « Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich-Frens method », *Gold Bull*, vol. 45, no 4, p. 203 211, 2012, doi: 10.1007/s13404-012-0069-2.
- [8] S. K. Sivaraman, S. Kumar, et V. Santhanam, « Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The role of

chloroauric acid », *J Colloid Interface Sci*, vol. 361, no 2, p. 543-547, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.015.

[9] E. Chmielewska et P. Kafarski, « Physiologic Activity of Bisphosphonates – Recent Advances », *Open Pharmaceutical Sciences Journal*, vol. 3, no 1, p. 56-78, 2016, doi: 10.2174/1874844901603010056.

[10] E. Cimini et al., « Zoledronic acid enhances vd2 t-lymphocyte antitumor response to human glioma cell lines », *international journal of immunopathology and pharmacology*, vol. 24, no 1, p. 139-148, 2011.

[11] A. Leon et al., « Isoprenoid biosynthesis as a drug target: Bisphosphonate inhibition of *Escherichia coli* K12 growth and synergistic effects of fosmidomycin », *J Med Chem*, vol. 49, no 25, p. 7331-7341, déc. 2006, doi: 10.1021/jm060492b.

[12] J. R. Green, « Bisphosphonates: Preclinical Review », *Oncologist*, vol. 9, no S4, p. 3-13, sept. 2004, doi: 10.1634/theoncologist.9-90004-3.

[13] J. Zekria, M. Mansour, et S. M. Karim, « The anti-tumour effects of zoledronic acid », *Journal of Bone Oncology*, vol. 3, no 1. Elsevier GmbH, p. 25-35, 2014. doi: 10.1016/j.jbo.2013.12.001.

[14] J. D. Compain et al., « Tetra- to dodecanuclear oxomolybdate complexes with functionalized bisphosphonate ligands: Activity in killing tumor cells », *Chemistry - A European Journal*, vol. 16, no 46, p. 13741-13748, 2010, doi: 10.1002/chem.201001626.

[15] V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, et I. Lukeš, « Aminoalkylbis(phosphonates): Their complexation properties in solution and in the solid state », *Eur J Inorg Chem*, no 2, p. 333-344, 2007, doi: 10.1002/ejic.200600615.

[16] E. M. Espinoza, J. A. Clark, J. Soliman, J. B. Derr, M. Morales, et V. I. Vullev, « Practical Aspects of Cyclic Voltammetry: How to Estimate Reduction Potentials When Irreversibility Prevails », *J Electrochem Soc*, vol. 166, no 5, p.3175-3187, 2019, doi: 10.1149/2.0241905jes.

[17] B. Zümreoglu-Karan, « A rationale on the role of intermediate Au(III)-vitamin C

complexation in the production of gold nanoparticles », *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11, no 5, p. 1099-1105, juill. 2009, doi: 10.1007/s11051-008-9498-5.

[18] K. Joyen, O. Oms, et P. Mialane, « Synthèse et Caractérisation de Polyoxométallates hybrides Molybdène/Bisphosphonate pour des Applications Biologiques », Université Paris-Saclay, Versailles, 2022.

[19] A. L. Siegel et G. A. Baker, « Bespoke nanostars: Synthetic strategies, tactics, and uses of tailored branched gold nanoparticles », *Nanoscale Adv*, vol. 3, no 14, p. 3980-4004, 2021, doi: 10.1039/d0na01057j.

[20] W. Ahmed, E. Stefan Kooij, A. Van Silfhout, et B. Poelsema, « Controlling the morphology of multi-branched gold nanoparticles », *Nanotechnology*, vol. 21, no 12, 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/12/125605.

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

Ce chapitre est dans un premier temps dédié à la synthèse et la caractérisation de nanoétoiles d'or obtenues en utilisant le polyoxométallate Mo_4Al_2 incorporant le ligand alendronate et des centres molybdène (V). La deuxième partie du chapitre décrit une méthode permettant de moduler la bande plasmon caractérisant ces nanoétoiles. Finalement, la dernière partie abordera les tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses (U-87 et MCF-7) et non-cancéreuses (MCF-10)

1 Introduction

Dans les dernières années, il y a eu une importante floraison de descriptions de synthèses en deux étapes de nanoétoiles d'or sans surfactant, la plupart d'entre elles étant basées sur l'utilisation de germes sphériques comme ceux décrits dans le chapitre précédent. La croissance est généralement assistée par du nitrate d'argent pour orienter la croissance des branches de manière sélective, pendant qu'un agent réducteur faible permet de réduire les ions du précurseur d'or. Le plus utilisé est sans doute l'acide ascorbique (C₆H₈O₆), celui-ci est capable de céder deux électrons par molécule. Dans le précurseur HAuCl₄, l'or possède un état d'oxydation de +3, et doit donc accepter 3 électrons pour se réduire en Au⁰. La relation stœchiométrique est donc de 3 molécules d'acide ascorbique pour 2 molécules de HAuCl₄ (Eq. 1).[1]



Cependant, pour favoriser la formation des nanoparticules, au lieu d'utiliser la relation stœchiométrique $\frac{\text{Acide Ascorbique}}{\text{HAuCl}_4} = 1,5$, il est commun que le réducteur soit en excès, avec, par exemple, des rapports $\frac{\text{Acide Ascorbique}}{\text{HAuCl}_4}$ entre 2 et 6. [2] Cela pourrait aussi se représenter comme $\frac{\text{électrons disponibles}}{\text{Au}^{3+}}$ entre 4 et 12.

Etant donné que le POMo Mo₄Al_e₂ contient 4 atomes de Mo^V qui peuvent céder chacun un électron, la relation stœchiométrique serait $\frac{\text{Mo}_4\text{Al}_e_2}{\text{HAuCl}_4} = 0,75$. Cependant les synthèses ont été réalisées avec le réducteur en excès avec un rapport $\frac{\text{Mo}_4\text{Al}_e_2}{\text{HAuCl}_4} = 2$ soit $\frac{\text{électrons disponibles}}{\text{Au}^{3+}} = 8$.

Ce chapitre se divisera en deux parties, la première se concentrera sur la synthèse et la caractérisation des AuNS@Mo₄Al_e₂, on abordera dans un premier temps les paramètres et la cinétique de la synthèse, suivie de l'analyse de la reproductibilité, de la description du lavage et de la concentration par centrifugation, avant d'aborder la caractérisation détaillée des AuNS@Mo₄Al_e₂ par différentes techniques telles que la spectroscopie UV-visible-proche infrarouge (UV-vis-NIR), la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique en transmission, la spectroscopie infrarouge de réflexion-

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

absorption à modulation de phase (PM-IRRAS), la spectrométrie photoélectronique X (XPS). Après ces caractérisations, on abordera la modulation de la bande plasmon et de la taille des AuNS en modifiant la relation $\frac{\text{Germes}}{\text{Au}^{3+}}$.

2 Synthèse et caractérisations des AuNS@Mo₄Al₂

2.1 Paramètres de synthèse

L'étape de croissance des nanoétoiles est fortement influencée par une vaste gamme de paramètres tels que : la température, le pH, les rapports $\frac{\text{Germe}}{\text{Au}^{3+}}$, $\frac{\text{Réducteur}}{\text{Au}^{3+}}$ et $\frac{\text{AgNO}_3}{\text{Au}^{3+}}$, la vitesse d'agitation, l'ordre d'ajout des réactifs et même le temps entre l'ajout de chacun d'entre eux.[2] Les rapports entre les différents réactifs ont été initialement sélectionnés selon la référence [2], pendant que l'ordre et le temps d'ajout de ceux-ci ont été optimisés dans un rapport de stage de Basile Bouvet au sein de notre groupe.[3] Enfin, la température qui pour la croissance de AuNS est généralement la température ambiante,[4] a été fixée à 0°C en plaçant le réacteur dans un mélange eau-glace pour un meilleur contrôle. De plus, les basses températures décalent la bande plasmon vers le proche infrarouge.[5]

Le premier test exploratoire avec ces conditions a permis d'obtenir une solution colloïdale bleue, ce qui constitue le premier indicateur de la formation de nanoétoiles. Après 30 minutes de synthèse, la longueur d'onde de la bande plasmonique se situe aux alentours de 800 nm, avec une bande secondaire également visible aux alentours de 530 nm (Figure1). Cette configuration de deux bandes est caractéristique des nanoétoiles, où la bande principale intense correspond aux pointes, pendant que la bande secondaire est due au cœur de la nanoétoile.[6]

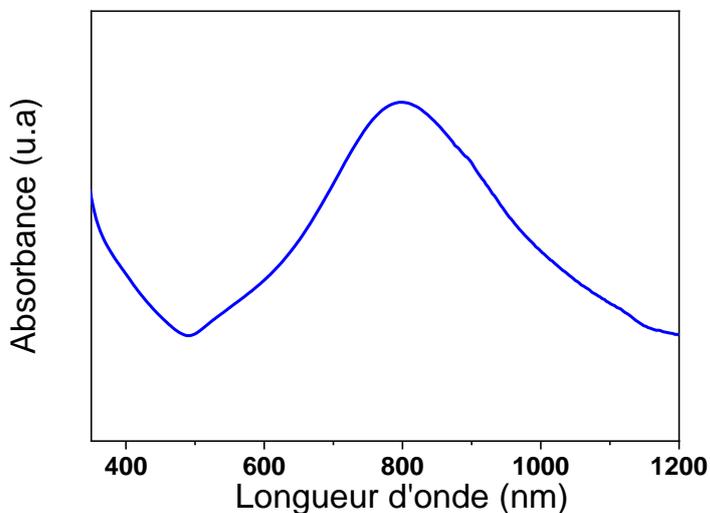


Figure 1: Spectre d'absorption des AuNS@Mo₄Al₂ après 30 minutes de synthèse

2.2 Cinétique de synthèse des AuNS@ Mo_4Al_2

Bien que le changement de couleur caractéristique de la formation des AuNS apparaisse très rapidement, dès la première minute de synthèse, nous avons constaté une évolution de la bande plasmon des AuNS dans le temps quand la synthèse est stoppée après 30 min comme dans le test préparatoire. Nous avons donc cherché à déterminer si la bande plasmon et donc a priori la géométrie des AuNS se stabilisait au cours du temps. La réaction a été suivie par spectroscopie UV-visible (et proche infrarouge) pour déterminer le temps nécessaire à la stabilisation de la bande plasmonique (Figure 2). La formation des nanoétoiles est observée dès la première mesure du spectre d'extinction. En effet, alors que la bande plasmonique des germes se situe à 521 nm, la bande plasmonique après 3 minutes de réaction est déjà à 782 nm, suggérant l'apparition de nanoétoiles. Cette valeur continue à augmenter pendant les 15 premières minutes jusqu'à atteindre 801 ± 7 nm puis redescend lentement pour se stabiliser à $\lambda = 750 \pm 5$ nm après 2 heures de synthèse.

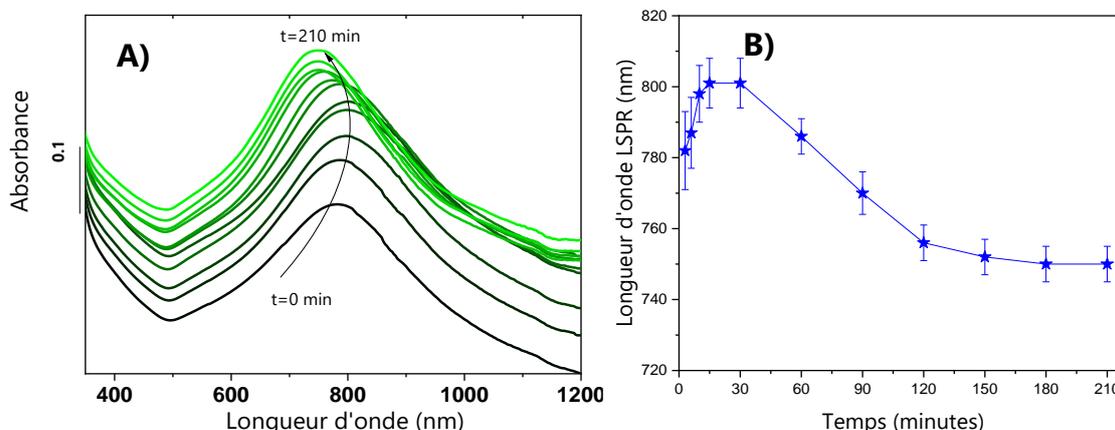


Figure 2: **A)** Caractérisation optique des AuNS@ Mo_4Al_2 dans le milieu de synthèse entre $t = 0$ et $t = 210$ minutes de réaction. **B)** Evolution de la position de la bande plasmon au cours du temps.

Ce dernier décalage de la bande plasmon pourrait être dû à une réorganisation des atomes d'or sur certaines facettes afin de réduire l'énergie libre du système. Ce phénomène a été expliqué par le fait que la croissance des nanoétoiles est gouvernée par les vitesses de déposition et de diffusion de l'or. Au début de la réaction, lorsque beaucoup d'or est disponible, la vitesse de déposition est plus importante que celle de la diffusion. Cependant, quand il ne reste plus d'or libre en solution, c'est la diffusion qui prédomine.[7]

2.3 Reproductibilité de la synthèse

Une fois déterminé le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, la synthèse a été répétée dix fois dans les mêmes conditions afin d'examiner sa reproductibilité (Figure 3). On voit que la longueur d'onde de la bande plasmonique varie entre 730 et 769 nm, ce qui donne une longueur d'onde moyenne $\lambda = 750 \pm 14$ nm. Une bande secondaire est visible aux alentours de 530 nm, elle peut être attribuée aux cœurs des nanoétoiles.[8] Cependant sa proximité par rapport à la bande principale plus large et intense rend quelquefois difficile son identification.

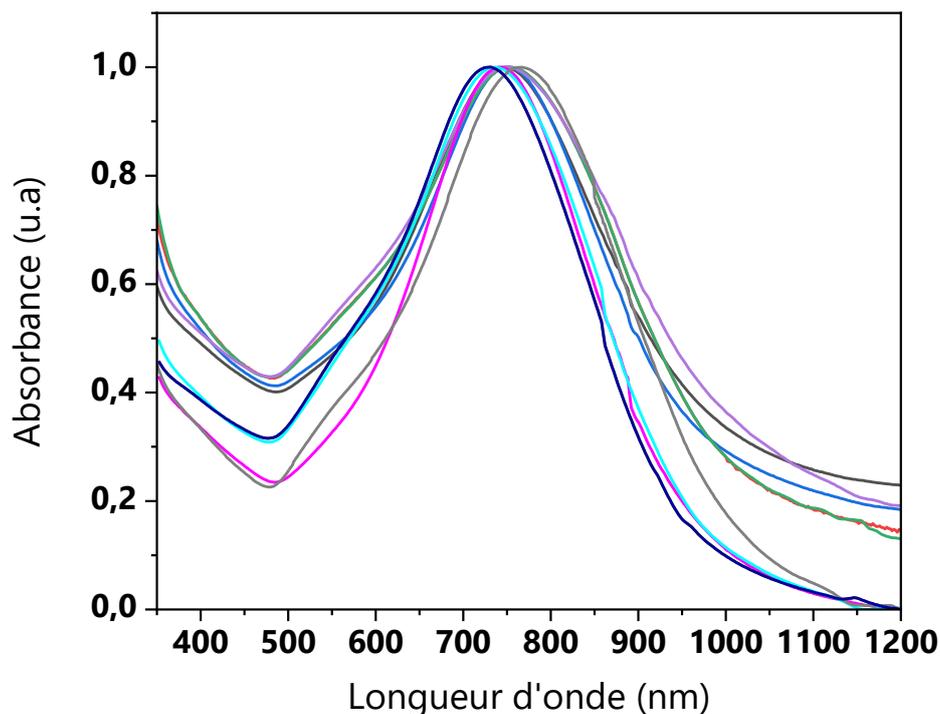


Figure 3: Spectres UV-Vis correspondant à 10 synthèses indépendantes de composites AuNS@Mo₄Al₂.

2.4 Lavage et concentration

Du fait que le réducteur Mo_4Al_2 est présent en large excès dans le milieu réactionnel, le lavage est nécessaire pour en retirer l'excès. Cette étape permet également d'éliminer d'autres impuretés telles que des germes qui n'auraient pas formé de nanoétoiles. Ce lavage est réalisé par deux cycles de centrifugation à une vitesse de 2200 RPM pendant 13 minutes puis en retirant le surnageant et en ajoutant une quantité d'eau inférieure au volume de surnageant retiré, ce qui permet de pouvoir en même temps augmenter la

concentration des AuNS. Cela est nécessaire car dans les des tests de cytotoxicité postérieurs, la solution colloïdale devra être diluée dans le milieu de culture des cellules, augmenter la concentration dans cette étape permettra donc de tester des concentrations en nanoétoiles plus élevées dans le milieu de culture. Afin de ne pas agréger les AuNS formées, des vitesses de centrifugation basses ainsi que des tubes en verre ont été utilisés, en effet, nous avons remarqué que lors de centrifugation dans des tubes en polystyrène, un dépôt gris/noire qui est dû à l'agrégation des AuNS se forme sur les parois, celui-ci ne peut pas être redispersé même en utilisant un bain à ultrason. Après cette étape, les AuNS@Mo₄Ale₂ lavées ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 4) et par ICP-OES. La spectroscopie met en évidence qu'après l'étape de centrifugation, le rapport $\frac{POM}{Au}$ diminue. En effet, l'absorbance à 290 nm (A_{290}), caractéristique du Mo₄Ale₂ a été mesurée et divisée par l'absorbance A_{750} , observée à 750 nm, correspondant à l'absorbance de la bande plasmon des AuNS. Une diminution de la relation $\frac{A_{290}}{A_{750}}$ de 2,4 à 1,5 est observée. Le rapport expérimental $\frac{BP}{Au}$ obtenu par ICP-OES après lavage est de $1,3 \pm 0,4$, alors que le rapport relatif aux réactifs introduit dans le milieu réactionnel est de 4,0 (soit un rapport $\frac{Mo}{Au} = 8$). Le rapport $\frac{Mo}{P}$ avant et après lavage reste quant à lui inchangé ($1,0 \pm 0,1$), ce qui semblerait indiquer que les groupes bisphosphonates restent coordonnés au POM pendant la synthèse et l'étape de lavage et concentration.

Le potentiel zêta a été mesuré afin de déterminer la charge de surface des nanoétoiles, la valeur obtenue est de $-33,0 \pm 2,8$ mV. Cette valeur négative est cohérente avec la charge négative des POMo présents en surface et avec la bonne stabilité colloïdale des AuNS pendant au moins deux semaines.

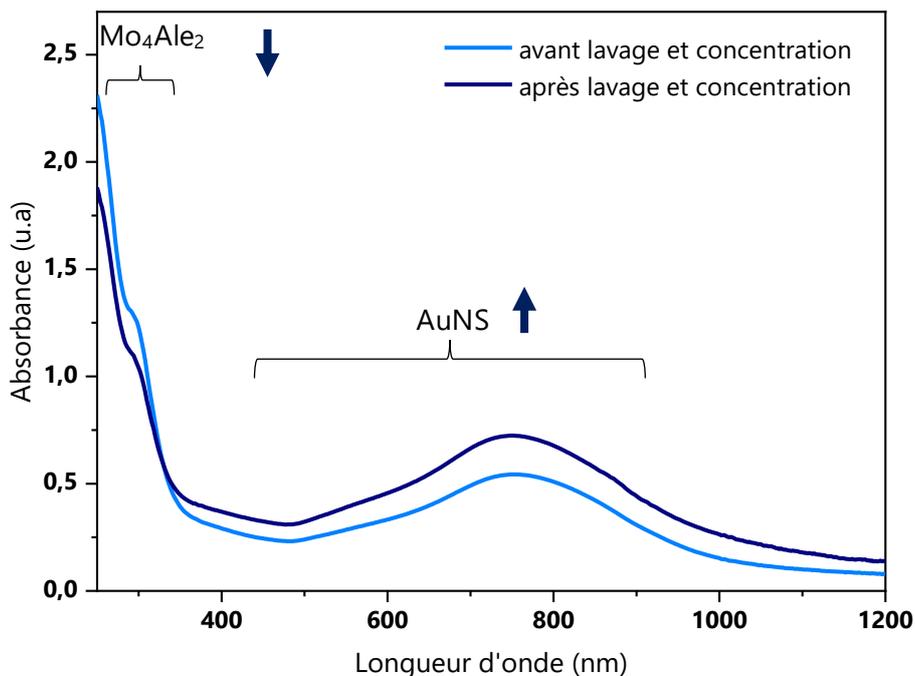


Figure 4: Spectre d'absorption électronique des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ avant et après lavage.

2.5 Caractérisation de la morphologie des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$

La géométrie des nanoparticules a été analysée par microscopie électronique en transmission puis par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Une étude par microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) a aussi été effectuée.

L'imagerie par MET présentée (Figure 5) révèle bien la présence de nanoparticules en forme d'étoiles. Les AuNS ont des cœurs de 40 ± 8 nm de diamètre, et des branches réparties sur toute la surface du cœur en direction perpendiculaire à celui-ci. Elles ne semblent pas avoir un motif régulier ou une symétrie identifiable, mais au contraire semblent avoir une disposition aléatoire sur la surface. Les branches ont une longueur d'approximativement 35 ± 11 nm pendant que le diamètre maximal de Féret est de 95 ± 15 nm.

Bien que la quantité et la taille exacte des branches soient difficiles à déterminer avec précision sur des images en deux dimensions en raison de la morphologie anisotrope des AuNS, une schématisation en 3 dimensions est proposée à titre indicatif avec 16 branches (bien qu'elles ne soient pas toutes visibles) (Figure 6).

La diffusion dynamique de la lumière (Figure 7) révèle un diamètre hydrodynamique égal

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

à 89 ± 9 nm. Dans le cas des nanoparticules non-sphériques, cette valeur correspond au diamètre d'une particule sphérique possédant la même vitesse de diffusion translationnelle.[9] Le diagramme présente également un deuxième signal beaucoup plus faible aux alentours de 10 nm, il n'est pas dû aux germes ni aux cœurs des AuNS mais à la diffusion rotationnelle des nanoparticules anisotropes, et ne doit donc pas être

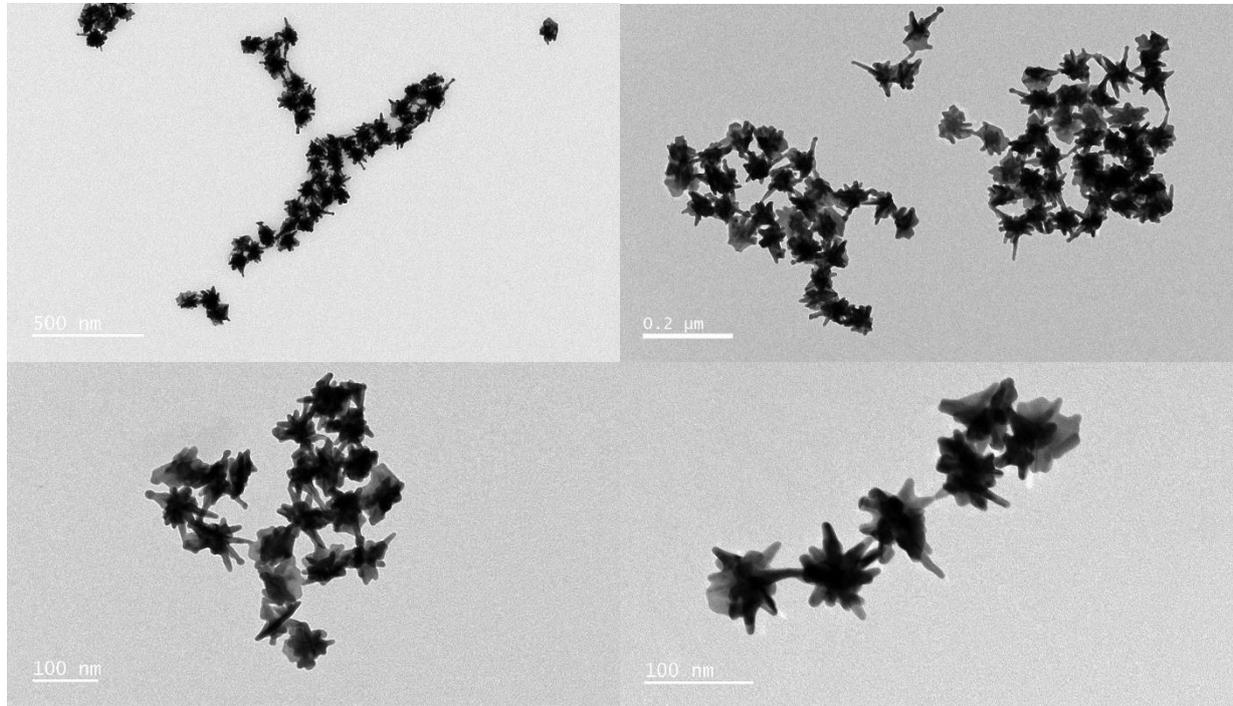


Figure 5 : Images par MET des AuNS@ Mo_4Al_2

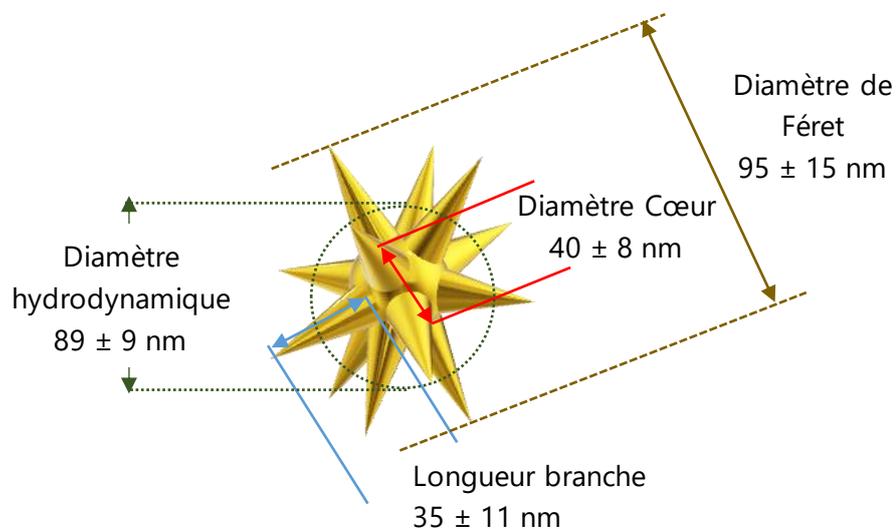


Figure 6: Schématisation 3D d'une AuNS@ Mo_4Al_2

pris en compte pour la détermination de la taille des nanoparticules.[10]

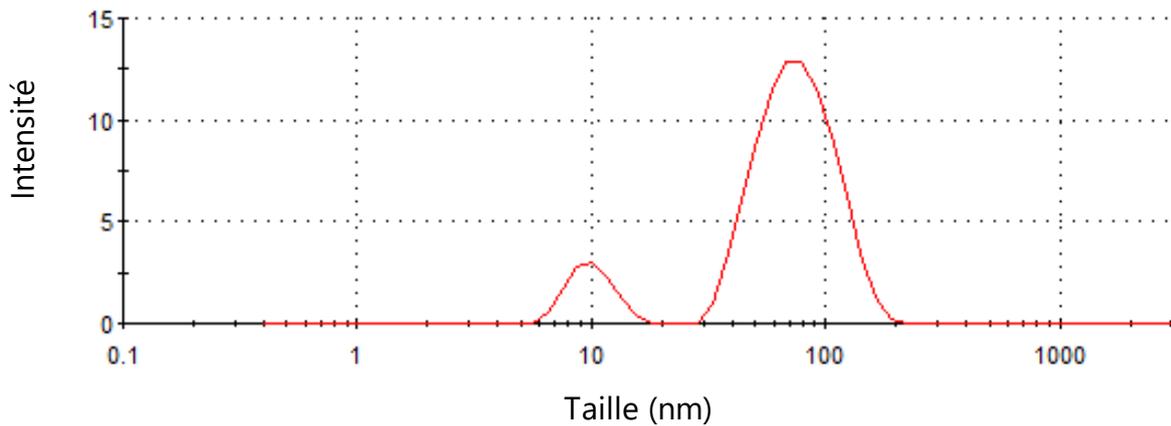


Figure 7: Diamètre hydrodynamique déterminé par DLS des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$

Des images de microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) ont également été enregistrées afin d'examiner plus en détail la morphologie des AuNS. La Figure 8A permet de focaliser sur une nanoétoile et montre un cœur d'environ 40 nm avec plusieurs branches. Quatre d'entre elles semblent situées dans le plan de l'image et leur taille varie entre 30 et 40 nm, d'autres branches semblent plus petites mais cela pourrait être dû au fait qu'elles pointent dans des directions différentes du plan de l'image. La Figure 8B montre les plans atomiques à l'intérieur d'une branche. Deux plans différents sont visibles, le plan (1 1 1) et le plan (2 0 0).

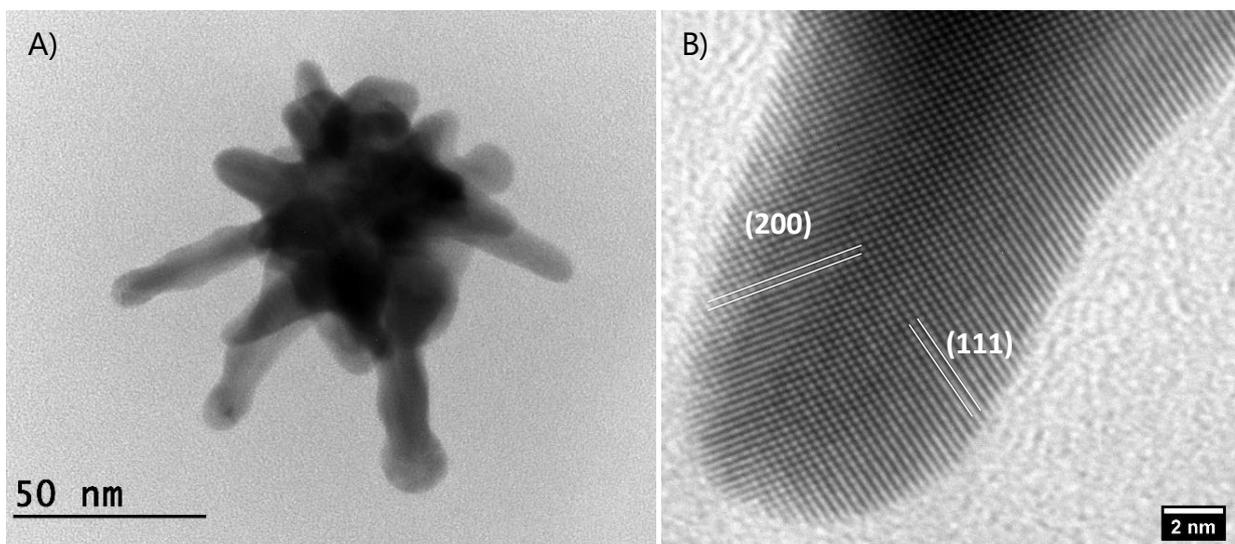


Figure 8: Image MET-HR A) d'une nanoétoile, B) d'une branche d'une nanoétoile.

2.6 Caractérisation de la surface des AuNS@ Mo_4Al_2

Nous avons voulu analyser plus en détail la surface des AuNS, pour cela nous avons réalisé de l'imagerie HAADF (Annular Dark-Field Imaging), de la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie en microscopie électronique en transmission à balayage (STEM-EDS) ainsi que de la spectroscopie infrarouge de réflexion absorption (PM-IRRAS) et de la spectroscopie de photoélectrons des rayons X (XPS).

Pour l'imagerie HAADF, l'intensité de l'image dépend du numéro atomique des éléments constituant le matériau, montrant une image plus brillante lorsque l'élément a un numéro atomique élevé. Parmi tous les éléments présents dans la solution, l'or est de loin celui avec le numéro atomique le plus élevé ($Z_{\text{Au}}=79$), suivi par l'argent ($Z_{\text{Ag}}=47$), le molybdène ($Z_{\text{Mo}}=42$) et enfin le phosphore ($Z_{\text{P}}=15$). La Figure 9 montre qu'autour des nanoétoiles se forme une couche composée d'atomes beaucoup plus légers que l'or, qui pourrait donc être attribuée au POMo.

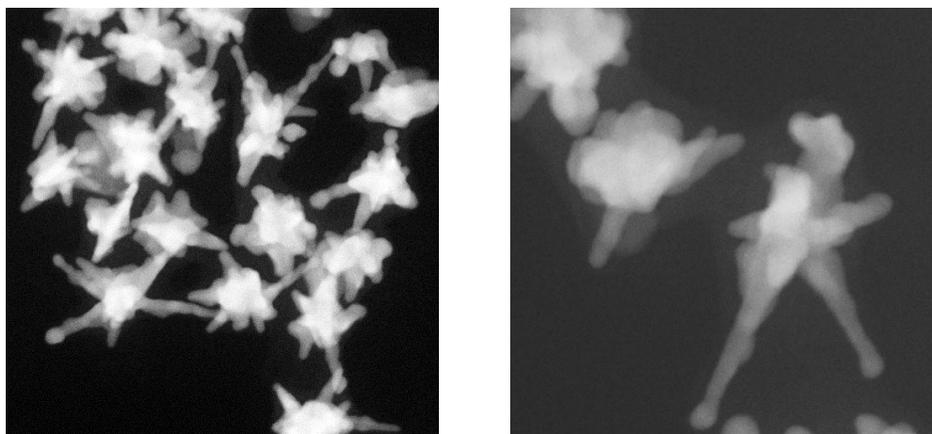


Figure 9: imagerie HAADF d'une AuNS@ Mo_4Al_2 .

Après cela, une cartographie élémentaire (Figure 10) a été réalisée par STEM-EDS sur une nanoétoile afin de connaître sa composition. On observe que l'or constitue le corps de la nanoétoile, tandis que les autres éléments suivent la forme de celle-ci mais sont également présents dans la fine couche visible autour. D'un point de vue quantitatif, l'or est l'élément le plus présent avec 60,52%, le phosphore et le molybdène conservent leur relation 1:1 presque parfaite avec 18,27% et 17,12% respectivement, l'argent est présent avec une proportion de 4,09%.

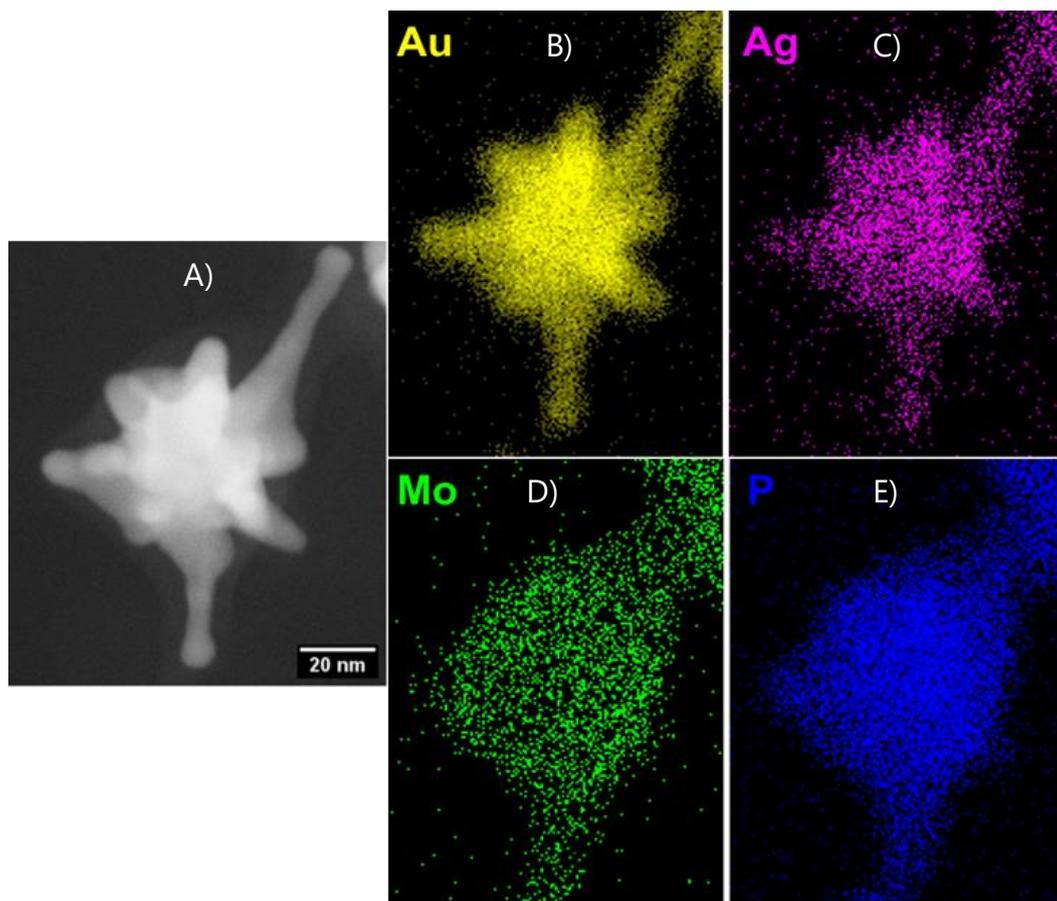


Figure 10: Cartographie élémentaire par STEM-EDS. A) image HAADF. Spectre correspondant aux éléments : B) Au, C) Ag, D) Mo et E) P.

La présence d'un POMo hybride contenant des ligands alendronate à la surface des AuNS a aussi été confirmée par spectroscopie infrarouge et par spectroscopie de photoélectrons des rayons X.

Le spectre infrarouge du POMo initial et des AuNS@ Mo_4Al_2 (Figure 11) présente les bandes caractéristiques des groupements phosphonates P-O et P=O, entre 1033 et 1137 cm^{-1} pour le POMo réduit et entre 1064 et 1160 cm^{-1} pour AuNS@ Mo_4Al_2 , ainsi que celles caractéristiques des groupements Mo-O et Mo=O 813 et 968 cm^{-1} pour le POMo et entre 813 et 941 pour les AuNS (voir tableau 1).

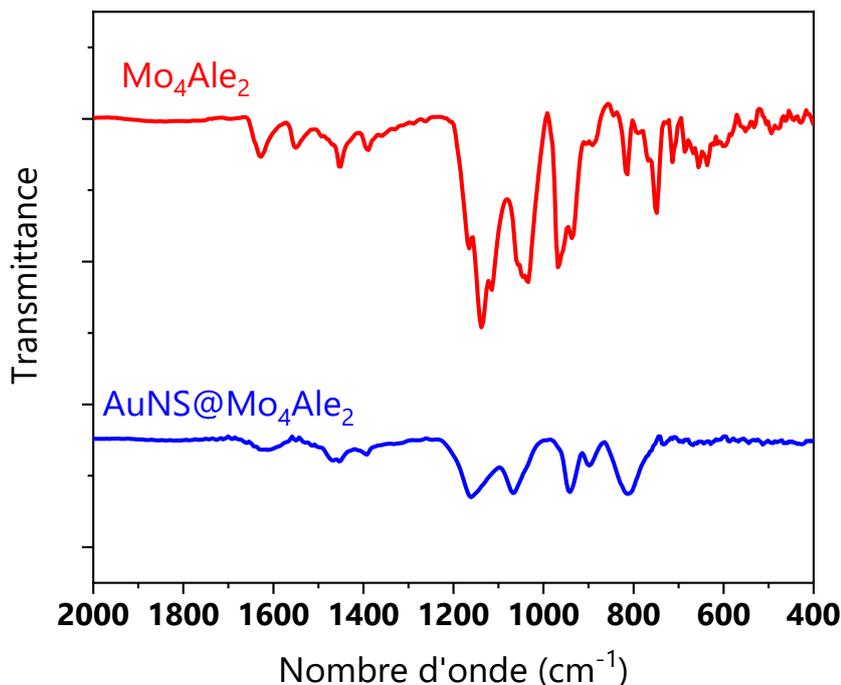


Figure 11: Spectres infrarouge (PM-IRRAS) du POMo réduit Mo_4Al_2 et des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$

Tableau 1: Fréquences infrarouge (en cm^{-1}) et assignations des pics pour les composés Mo_4Al_2 et $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$

Assignment	Mo_4Al_2	$\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$
v (P-O) et v (P=O)	1137	1160
	1114	1064
	1033	
v (Mo=O) et v (Mo-O)	968	
	937	941
		898
	813	813

La spectroscopie de photoélectrons des rayons X (Figure 12) du Mo_4Al_2 présente un doublet avec une composante Mo 3d 5/2 à 231,2 eV et une composante Mo 3d 3/2 à 234,4 eV, caractéristique d'un composé Mo(V). Le spectre XPS de $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ n'a pu être ajusté qu'en considérant la présence à la fois d'ions Mo(V) et d'ions Mo(VI), avec des pics Mo(VI) 3d 5/2 et Mo(VI) 3d 3/2 situés à 232,8 et 236,0 eV, respectivement. Cependant, l'intégration a montré que le molybdène avait été presque entièrement

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

oxydé pendant la synthèse, avec un rapport Mo(VI):Mo(V) de 95:5, confirmant le rôle des centres Mo(V) en tant qu'agents réducteurs. Il est important de rappeler que le POMo est en large excès dans la synthèse, l'absence quasi totale de Mo(V) pourrait donc indiquer que seul le POMo oxydé joue le rôle d'agent stabilisant des AuNS après le lavage. Enfin, la couche de POMo domine complètement le signal XPS, atténuant le signal de l'or, en accord avec la couche observée par HAADF.

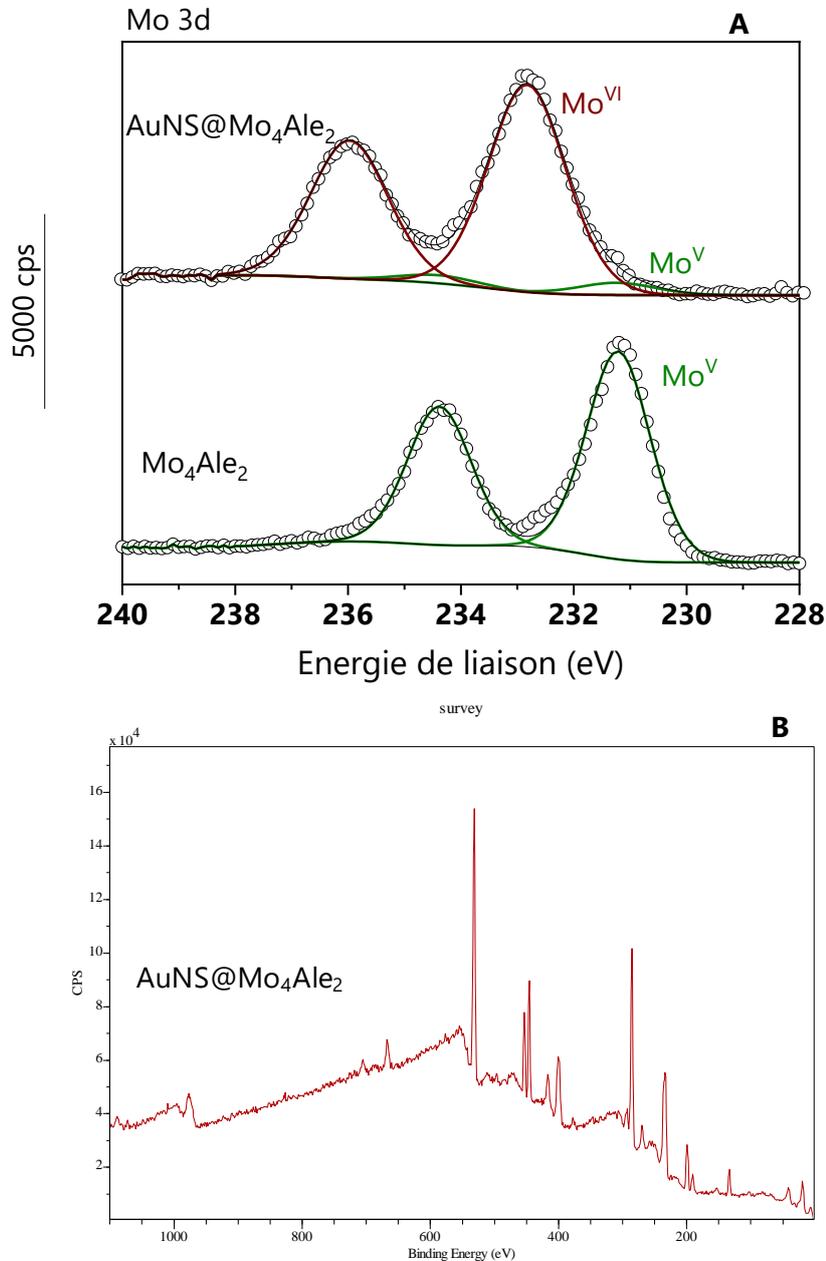


Figure 12: spectroscopie de photoélectrons des rayons X (XPS) de Mo_4Al_2 et $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ **A**) Région du Mo **B**) spectre complet.

2.7 Modulation de la morphologie et de la bande plasmon des AuNS@Mo₄Al₂

Une fois la synthèse des AuNS maîtrisée, nous avons cherché à moduler la longueur d'onde de la bande plasmon (et par conséquent la morphologie) de celles-ci. Un grand nombre de publications ([2], [11], [12]) indiquant que le rapport $\frac{\text{Germe}}{\text{Au}^{3+}}$ est un facteur critique permettant de moduler la croissance des nanoétoiles, celui-ci a été étudié en premier. Pour minimiser l'influence d'autres facteurs tels que le rapport $\frac{\text{Au}^{3+}}{\text{réducteur}}$ ou le pH de la solution, qui dépend en grande partie du précurseur acide de Au³⁺, le rapport $\frac{\text{Germe}}{\text{Au}^{3+}}$ a été modulé uniquement en variant la concentration en germes dans le milieu réactionnel tout en gardant une concentration en Au³⁺ fixe. La concentration en germes jusqu'ici considérée était C = 1,04x10¹⁴ germes/litre. Nous exprimerons par la suite le rapport $\frac{\text{Germe}}{\text{Au}^{3+}}$ en fonction de ce paramètre C.

La Figure 13A montre la variation du spectre d'absorption électronique en fonction de la concentration en germes. La Figure 13B montre uniquement la longueur d'onde de la bande plasmon à différentes concentrations en germes, ce qui permet une analyse plus aisée. Il est rapidement identifiable qu'une diminution de la concentration en germes décale la bande plasmonique vers l'infrarouge. Cela pourrait être dû à une plus grande disponibilité de Au³⁺ pour la croissance autour de chaque germe, entraînant la formation de AuNS plus grandes et avec plus de branches chacune.

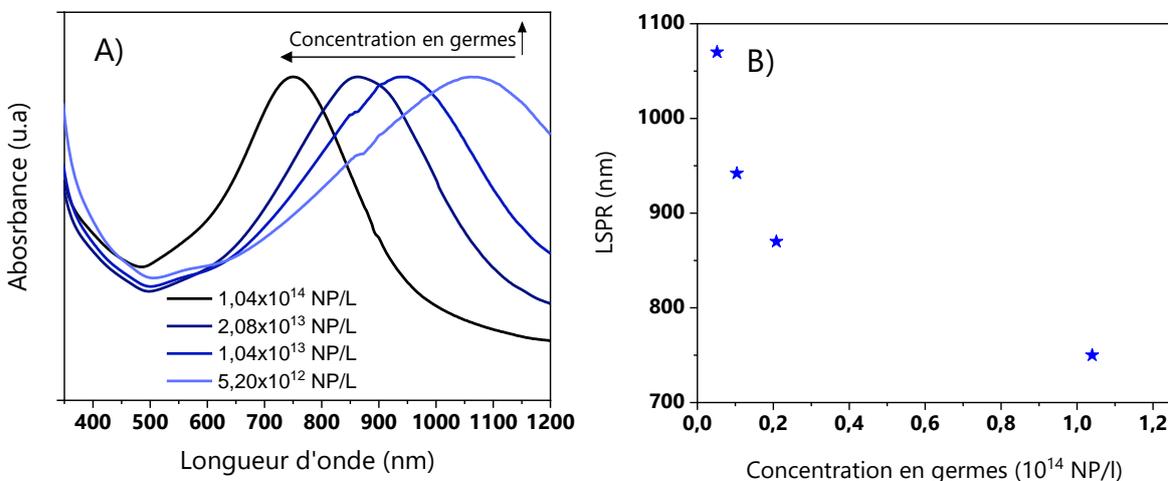


Figure 13: Effet de la concentration en germes sur : A) le spectre d'absorbance et B) la longueur d'onde de la bande plasmon

L'affirmation précédente a été confirmée par MET (Figure 14) ; la synthèse avec la

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₄Al₂ comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

concentration en germes la plus faible ($5,20 \times 10^{12}$ germes/L, soit C/20) a produit des AuNS beaucoup plus grandes, avec les cœurs de près de 200 nm de diamètre et des branches qui se ramifient en plusieurs autres branches (Figure 14A). Leur bande plasmon est localisée à 1070 nm, soit au début de la deuxième fenêtre biologique du proche infrarouge,[13] ce qui en ferait des candidates idéales pour la photothérapie s'il n'y avait deux problèmes majeurs. Le premier est qu'il est très peu probable de pouvoir internaliser des objets si grands (plusieurs centaines de nanomètres par étoile).[14] Le deuxième est la diminution drastique de la stabilité de ces composites par rapport aux AuNS précédemment synthétisées, cette instabilité étant visible principalement pendant le lavage par centrifugation car même à basse vitesse (1500 RPM), les AuNS s'agrègent. La ramification des branches est aussi présente pour la concentration C/10 (soit $1,04 \times 10^{13}$ germes/L). La bande plasmon, à 942 nm, se trouve à la limite supérieure de la première fenêtre biologique, les cœurs dépassant légèrement les 100 nm (Figure 14B), ces NPs restent donc peu prometteuses pour des applications biomédicales pour les mêmes motifs. Les AuNS formées avec la concentration C/5 ($2,08 \times 10^{13}$ germes/L, Figure 14C) ont une bande plasmon dans la première fenêtre biologique du NIR, précisément à 870 nm, et bien qu'elles possèdent une morphologie qui rappelle les AuNS formés avec la concentration standard en germes ($C=1,04 \times 10^{14}$ germes/L, Figure 14D), c'est-à-dire sans branches qui se ramifient elles-mêmes, elles restent cependant plus grandes (cœurs entre 60 et 90 nm contre 40 nm pour les autres) et peu stables rendant difficile le lavage par centrifugation. Le Tableau 2 offre un résumé de l'influence de la concentration en germes sur la longueur d'onde de la bande plasmon ainsi que sur la morphologie des AuNS@Mo₄Al₂.

Tableau 2: Influence de la concentration en germes sur la bande plasmon et la morphologie des AuNS@Mo₄Al₂

Concentration en germes (NP/L)	LSPR (nm)	Diamètre du cœur (nm)	Diamètre maximal de Féret (nm)	Longueur des branches (nm)	Ramification des branches en d'autres branches
$5,20 \times 10^{12}$	1070	140 ± 24	313 ± 55	~60 à 150	OUI
$1,04 \times 10^{13}$	942	121 ± 17	286 ± 43	~50 à 140	OUI
$2,08 \times 10^{13}$	870	79 ± 20	196 ± 26	~30 à 120	TRES PEU
$1,04 \times 10^{14}$	750	40 ± 8	95 ± 15	~20 à 50	NON

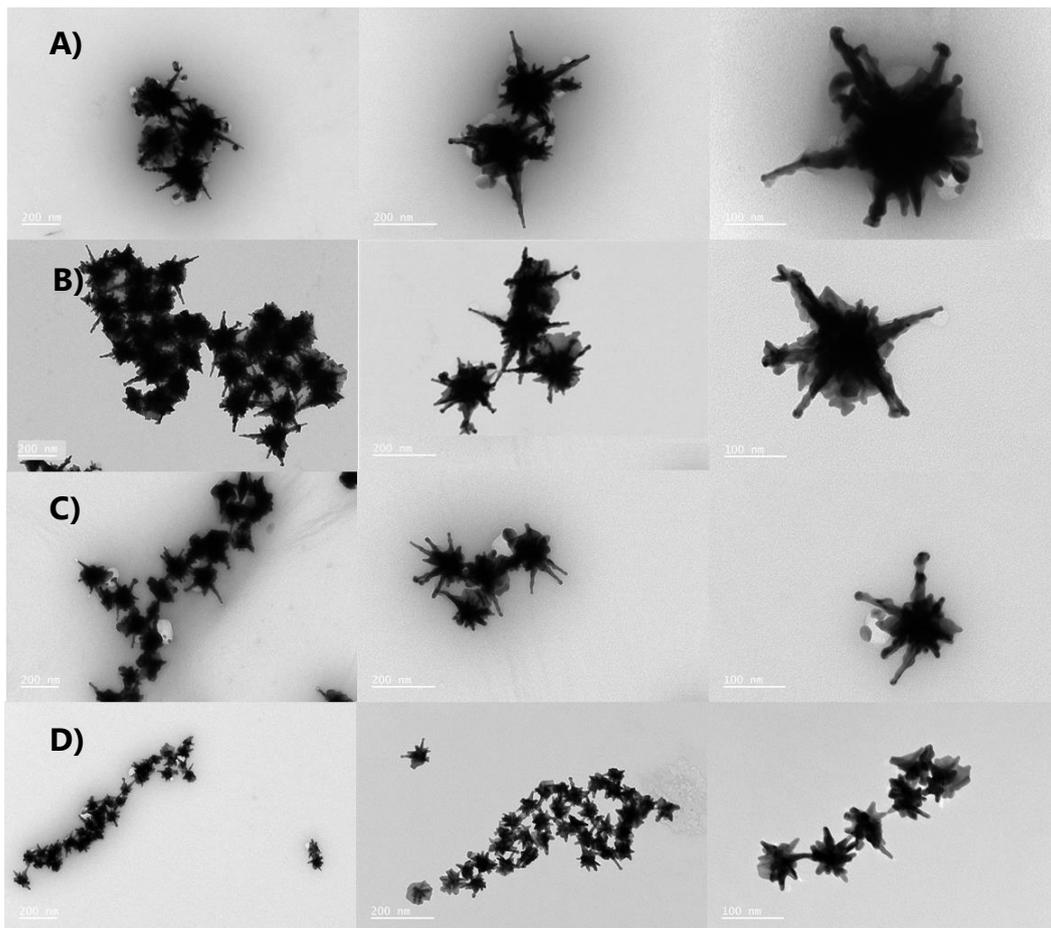


Figure 14: Imagerie MET des AuNS@ $\text{Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ pour différentes concentrations en germes. A) $5,20 \times 10^{12}$ germes/l, B) $1,04 \times 10^{13}$ germes/l, C) $2,08 \times 10^{13}$ germes/l et D) $1,04 \times 10^{14}$ germes/l.

3 Tests de cytotoxicité

La deuxième partie du chapitre portera sur les tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses et non-cancéreuses ainsi que la photothérapie (PTT) appliquée aux lignées cancéreuses. Pour cela, dans un premier temps, nous examinerons la stabilité des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ dans un milieu de culture biologique par DLS, spectroscopie UV-Visible et cryo-MET. Ensuite, l'effet cytotoxique des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ et de différents précurseurs (POM et ligand alendronate) sera examiné sur des cellules cancéreuses après un temps d'incubation de 24 et 120 heures. Les cellules incubées avec les AuNS seront ensuite soumises à une irradiation dans le proche infrarouge pour déterminer l'effet phototheraputic. Enfin, des tests de cytotoxicité sur des cellules non-cancéreuse seront également réalisés.

Après avoir réussi à synthétiser et caractériser des AuNS recouvertes de POM pour la première fois, et connaissant le grand potentiel de celles-ci comme agents anticancéreux en combinant la chimiothérapie et la photothérapie, nous avons voulu examiner en détail le comportement de nos nanocomposites dans des milieux biologiques pour examiner la viabilité d'un futur traitement combinatoire. Premièrement, nous avons suivi par spectroscopie d'absorption, par DLS et par cryomicroscopie électronique (cryo-ME) la stabilité des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ à deux concentrations différentes (qui correspondent à $[\text{Al}] = 25$ et $100 \mu\text{M}$) dans du DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium »), lequel sera ensuite utilisé comme milieu de culture pour les tests de cytotoxicité sur des cellules non cancéreuses MCF-10 et cancéreuses U-87 (glioblastome) et MCF-7 (adénocarcinome). Finalement, l'internalisation des AuNS dans les cellules cancéreuses sera vérifiée par microscopie électronique en transmission et quantifiée par ICP-OES.

3.1 Stabilité des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ dans le milieu de culture

La Figure 15 montre l'évolution du spectre d'absorption des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ dans le DMEM. La Figure 15A correspond à une concentration en alendronate de $25 \mu\text{M}$, on peut voir un décalage vers le rouge de la bande plasmon de 14 nm dès la première mesure après avoir dilué les nanoétoiles dans le milieu de culture. Ce décalage s'explique par la formation d'une couronne de protéines autour des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$. La Figure 15B

correspond à une concentration en alendronate de $100 \mu\text{M}$, ici le décalage vers le rouge est de 54 nm .

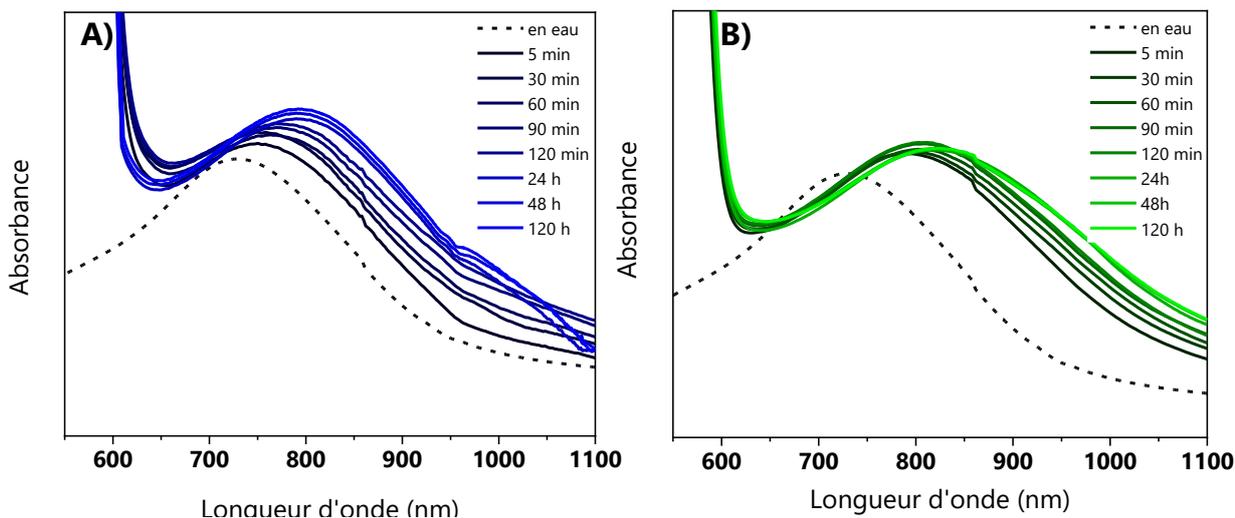


Figure 15: Evolution du spectre d'absorption des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ dans le DMEM en fonction du temps. En pointillé le spectre d'absorption des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ dans l'eau. **A)** concentration en alendronate = $25 \mu\text{M}$. **B)** concentration en alendronate = $100 \mu\text{M}$.

La stabilité des AuNS dans le milieu de culture a aussi été suivi par DLS, (Figure 16) l'augmentation du diamètre hydrodynamique est notable dès la première mesure pour les deux concentrations différentes. Pour la concentration la plus basse, le diamètre passe rapidement de 100 à 160 nm et finit par se stabiliser entre 200 et 250 nm . Pour la concentration la plus haute, le diamètre augmente rapidement à 300 nm et se stabilise vers 400 nm . L'augmentation plus grande dans le deuxième cas est concordant avec le décalage plus important de la bande plasmon.

Finalement, avec la collaboration de Jean-Michel Guigner de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPIC), nous avons examiné par cryo-MET (Figure 17), les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ diluées dans le DMEM après 24 h , l'intérêt de cette technique est de connaître l'état d'agrégation des nanoparticules dans le milieu car le séchage de la grille en MET classique pourrait donner lieu à l'agrégation des AuNS sans que cela soit représentatif du comportement en solution. La couronne de protéines est visible pour les deux concentrations mais beaucoup plus épaisse pour la concentration la plus grande, avec une épaisseur de $44,3 \pm 9,1 \text{ nm}$ contre $22,5 \pm 4,8 \text{ nm}$. Bien que nous n'ayons pas encore réussi à expliquer l'augmentation de l'épaisseur de la couronne de protéines lorsque la concentration en nanoparticules est plus importante, cela est tout à

fait en accord avec le décalage plus important de la longueur d'onde de la bande plasmon ainsi que du diamètre hydrodynamique.

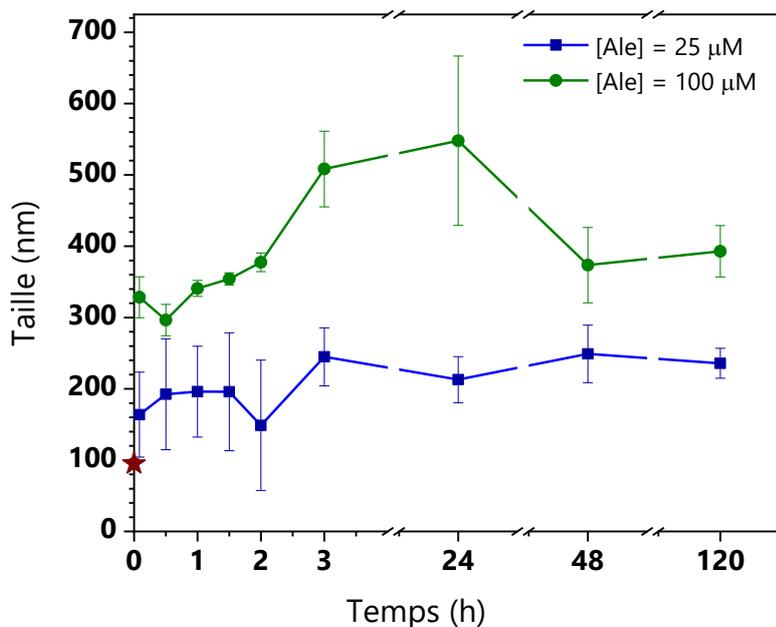


Figure 16: Suivi par DLS de la stabilité des AuNS@Mo₄Ale₂. L'étoile rouge correspond au diamètre hydrodynamique dans l'eau

Finalement, avec la collaboration de Jean-Michel Guigner de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), nous avons examiné par cryo-MET (Figure 17), les AuNS@Mo₄Ale₂ diluées dans le DMEM après 24 h, l'intérêt de cette technique est de connaître l'état d'agrégation des nanoparticules dans le milieu car le séchage de la grille en MET classique pourrait donner lieu à l'agrégation des AuNS sans que cela soit représentatif du comportement en solution. La couronne de protéines est visible pour les deux concentrations mais beaucoup plus épaisse pour la concentration la plus grande, avec une épaisseur de $44,3 \pm 9,1$ nm contre $22,5 \pm 4,8$ nm. Bien que nous n'ayons pas encore réussi à expliquer l'augmentation de l'épaisseur de la couronne de protéines lorsque que la concentration en nanoparticules est plus importante, cela est tout à fait en accord avec le décalage plus important de la longueur d'onde de la bande plasmon ainsi que du diamètre hydrodynamique.

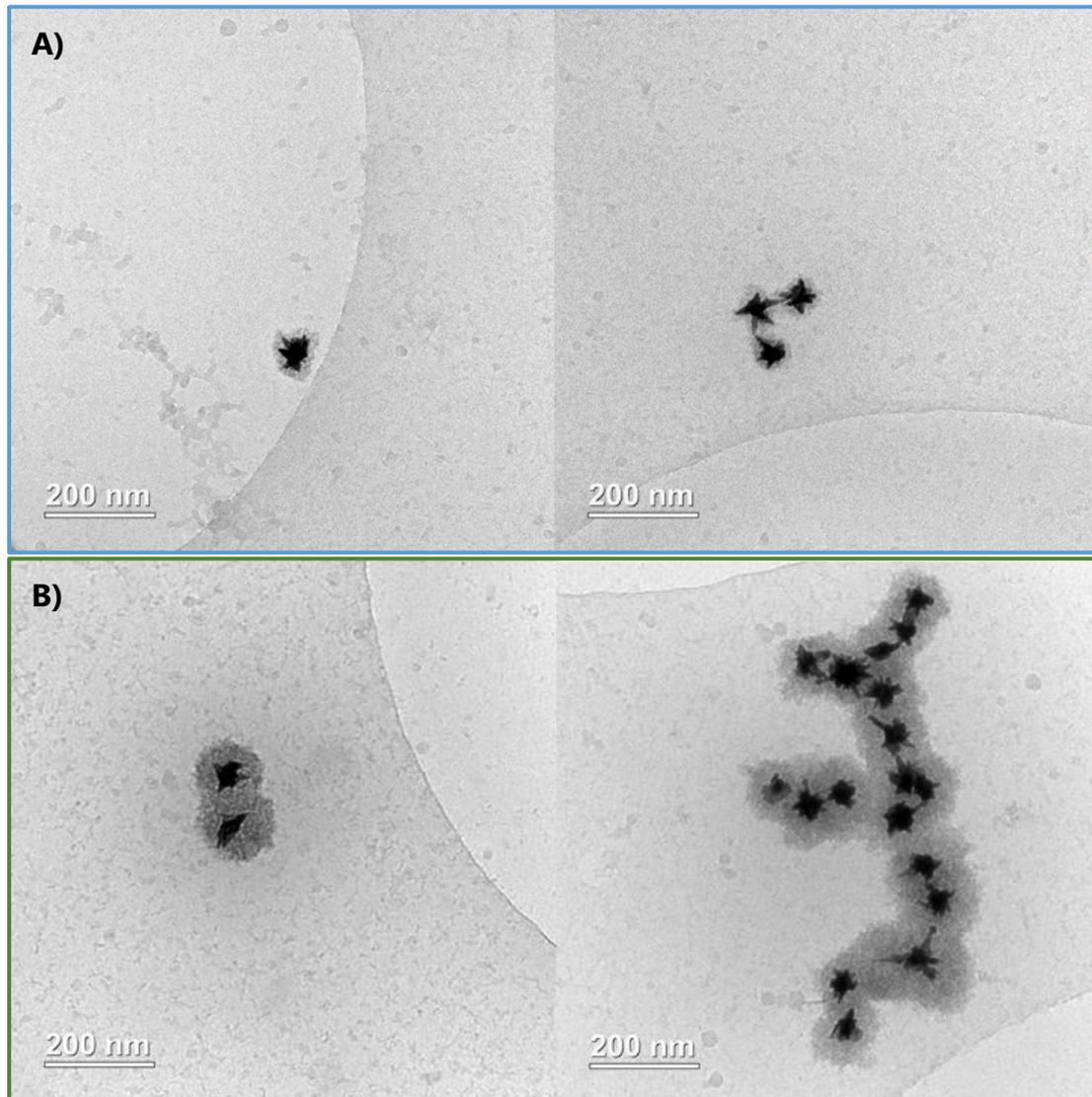


Figure 17: Cryo-ME sur les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ dans le DMEM. **A)** Concentration en alendronate de $25 \mu\text{M}$ et **B)** concentration en alendronate de $100 \mu\text{M}$.

3.2 Tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses

Deux lignés cellulaires cancéreuses différentes (MCF-7 et U-87) ont été choisies pour évaluer les performances thérapeutiques des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ à différentes concentrations en alendronate avec et sans irradiation avec un laser à 808 nm doté d'une puissance de $1,7 \text{ W/cm}^2$ afin d'estimer l'effet phototherapeutique. Nous avons aussi testé la cytotoxicité du ligand alendronate, du Mo_4Al_2 ainsi que celle d'un POM oxydé possédant des ligands alendronate, Mo_6Al_2 (Figure18). [15] Le choix d'utiliser ce POM en particulier repose sur sa similarité avec le POM Mo_4Al_2 mais, contrairement à ce dernier, le Mo_6Al_2 ne contient que du molybdène avec un état d'oxydation +VI au lieu de +V. Comme le degré d'oxydation des POM à la surface des AuNS est +VI et sachant

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

qu'il a été montré antérieurement que l'état d'oxydation du molybdène a un rôle significatif sur l'activité cytotoxique des polyoxomolybdates hydrides, [15], [16] il est un bon candidat pour estimer la cytotoxicité des POM à la surface des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$. Les tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses ont été réalisés en collaboration avec Claire Wilhelm de l'Institut Curie.

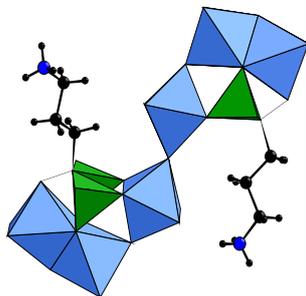


Figure 18: structure du Mo_6Al_2 . Octaèdres bleus = MoO_6 , tétraèdres verts = P, sphères noires = C, sphères bleues = N

Les cellules de Glioblastome U-87 ont été incubées dans du DMEM pendant 24 heures avec le ligand alendronate, chacun des deux POM (oxydé et réduit) ainsi que les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$. (Figure 19). Les courbes dose-réponse pour l'alendronate libre et le Mo_4Al_2 se chevauchent significativement avec des IC_{50} similaires indiquant que le Mo_4Al_2 conserve l'activité antitumorale de l'alendronate. Cependant, les activités chimiothérapeutiques de l'alendronate et du Mo_4Al_2 sont très faibles après 24 heures, avec un IC_{50} de 7090 et 8500 μM , respectivement. En revanche, le Mo_6Al_2 présente une activité chimiothérapeutique plus élevée, avec un IC_{50} de 3800 μM . Cela confirme que les espèces au Mo^{VI} possèdent une meilleure activité antitumorale que celles au Mo^{V} . L'activité chimiothérapeutique après 24 heures des nanocomposites $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ a pu être évaluée uniquement pour des concentrations en alendronate inférieures à 250 μM , c'est-à-dire à une concentration inférieure à celle des POM seuls. En effet, l'évaluation de l'activité d' $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ pour des concentrations plus élevées était inaccessible en raison de l'impossibilité de concentrer davantage les suspensions colloïdales tout en maintenant leur stabilité colloïdale. Néanmoins, cette tendance initiale suggère que les AuNS préservent et possiblement améliorent l'effet thérapeutique des espèces de bisphosphonates de molybdène (V). Plus important encore, sous irradiation à 808 nm, la valeur de IC_{50} mesurée pour $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ chute à approximativement 50 μM , soit 150 fois plus bas que pour l'alendronate libre, démontrant l'impact élevé de l'effet photothermique de ces nanostructures.

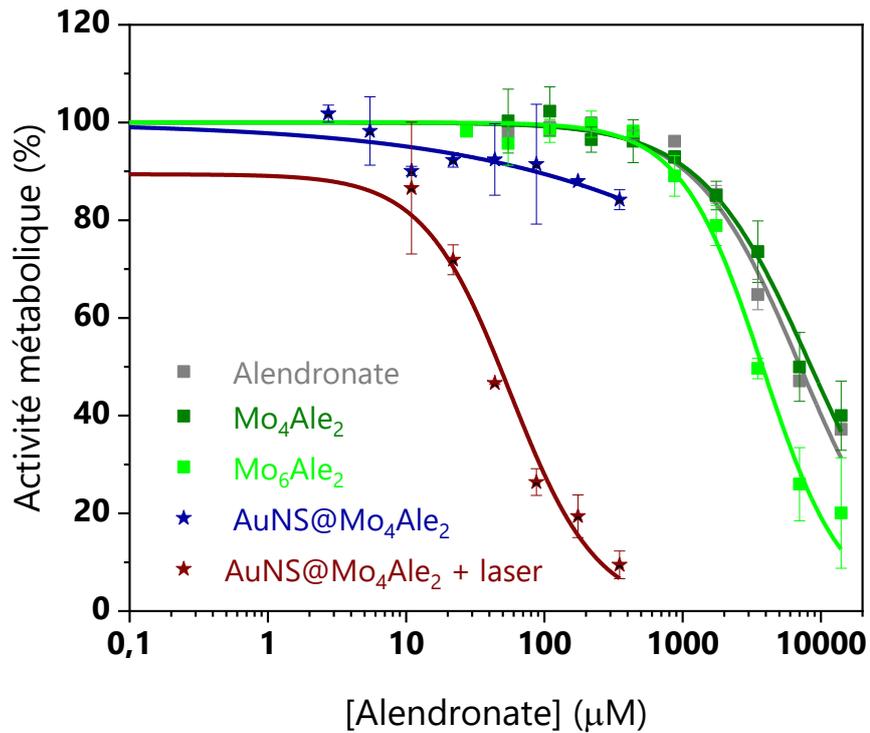


Figure 19: Activité métabolique de la lignée U-87 incubée pendant 24 heures avec les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ avec et sans irradiation à différentes concentrations en alendronate

Nous avons voulu savoir si l'effet chimiothérapeutique était influencé par le temps d'exposition des cellules aux agents chimiothérapeutiques et avons donc décidé d'augmenter celui-ci à 120 heures. Les courbes dose-réponse sont exposées dans la Figure 20.

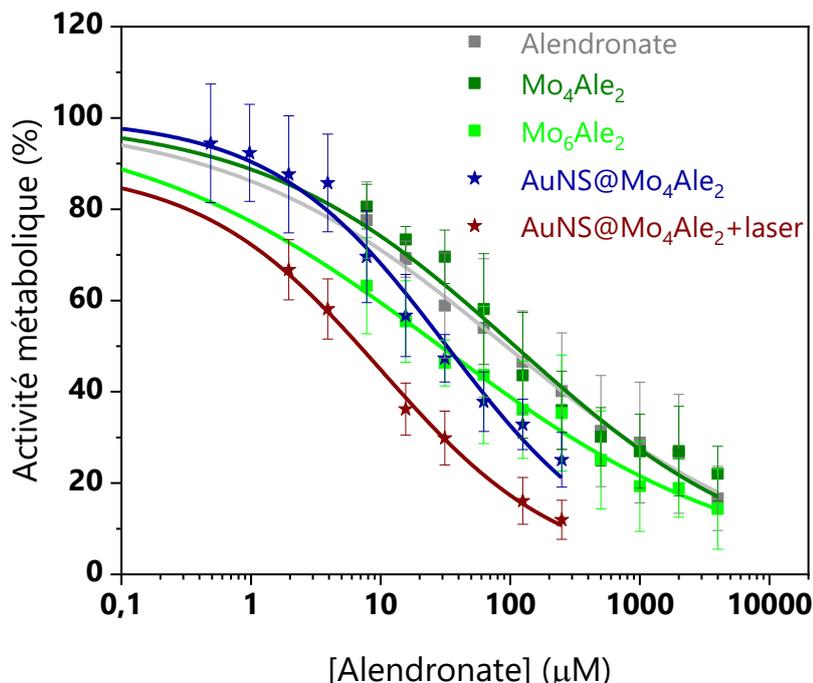


Figure 20: Activité métabolique de la lignée U-87 incubé pendant 120 heures avec les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ avec et sans irradiation à différentes concentrations en alendronate.

Quel que soit l'agent chimiothérapeutique testé, il est clair que la valeur de IC_{50} diminue nettement après cinq jours d'incubation par rapport à 24 heures, montrant que l'effet chimiothérapeutique dépend du temps. L'activité chimiothérapeutique de l'alendronate et du POM $\text{Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ atteint une valeur IC_{50} d'environ 100 μM , soit 8 fois moins que lors d'un contact de 24 heures, tandis que le $\text{Mo}_6\text{Al}_2\text{e}_2$ et l' $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ présentent un IC_{50} remarquable d'environ 30 μM . Là encore, sous irradiation à 808 nm, la valeur de IC_{50} mesurée pour $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ diminue drastiquement à $\sim 7 \mu\text{M}$.

Afin de savoir si l'efficacité remarquable du traitement à 120 heures en utilisant le nanocomposite $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ était exclusive à la lignée U-87 ou pouvait être observée avec des résultats similaires sur des cellules cancéreuses complètement différentes, nous avons reproduit le test avec la lignée MCF-7 qui sont des cellules tumorales mammaires. Les courbes dose-réponse avec cette nouvelle lignée sont montrées sur la Figure 21.

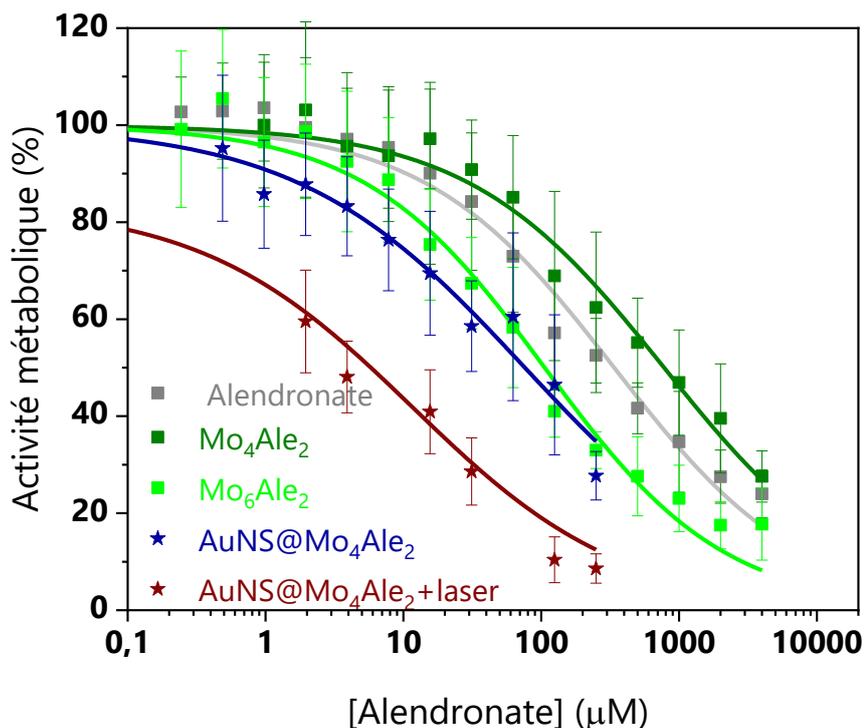


Figure 21: Activité métabolique de la lignée MCF-7 incubée pendant 120 heures avec les AuNS@Mo₄Al₂ avec et sans irradiation à différentes concentrations en alendronate

L'alendronate et les composites sont globalement moins actifs contre cette lignée cellulaire, avec, pour toutes les molécules/composites testés, un IC₅₀ de 2 à 7 fois plus élevé que celui mesuré pour la lignée cellulaire U-87 pour un temps d'incubation égal. Cependant, en comparant les réponses au sein de la lignée cellulaire MCF-7, les mêmes tendances ont été observées que pour les cellules U-87 : l'alendronate et le POM Mo₄Al₂ ont les activités les plus faibles tandis que les valeurs IC₅₀ du POM Mo₆Al₂ et des nanoétoiles AuNS@Mo₄Al₂ sont proches, avec une activité légèrement meilleure pour le nanocomposite. L'impact de l'irradiation est cette fois-ci encore plus frappant, car la valeur de IC₅₀ diminue jusqu'à 6 μM, soit environ 12 fois moins qu'en l'absence d'irradiation. Le tableau 3 résume les valeurs IC₅₀ de tous les agents thérapeutiques dans les 3 tests effectués.

Tableau 3: IC₅₀ des différents agents chimiothérapeutiques sur U-87 à 24 et 120 heures ainsi que sur MCF-7 à 120 heures.

	U-87 IC ₅₀ ^{24h} [alendronate] (μM)	U-87 IC ₅₀ ^{120h} [alendronate] (μM)	MCF-7 IC ₅₀ ^{120h} [alendronate] (μM)
alendronate	7090 ± 360	93 ± 14	340 ± 40
Mo ₄ Al ₂	8500 ± 660	110 ± 15	780 ± 110
Mo ₆ Al ₂	3800 ± 200	29 ± 6	106 ± 10
AuNS@Mo ₄ Al ₂	-	32 ± 4	76 ± 15
AuNS@Mo ₄ Al ₂ + PTT	47 ± 4	7 ± 1	6 ± 2

Pour mieux comprendre l'effet de l'irradiation sur l'activité antitumorale des composites AuNS@Mo₄Al₂, nous avons représenté l'inhibition des cellules tumorales sans et sous irradiation d'un laser infrarouge à 808 nm (1,7 W/cm² pendant 5 minutes) (Figure 22). Pour les cellules U-87, à une concentration en alendronate de 62,5 μM et après 24 heures d'incubation, les AuNS@Mo₄Al₂ ont montré une activité anticancéreuse très faible, avec environ 9 % d'inhibition cellulaire. Cependant, l'activité métabolique chute drastiquement sous irradiation, avec 59 % d'inhibition cellulaire. À la même concentration mais après 120 heures d'incubation dans le noir, une activité anticancéreuse de 60 % a été atteinte, tandis que dans les mêmes conditions mais sous irradiation, une inhibition cellulaire presque complète a été observée. Pour la ligné MCF-7, à la même concentration en alendronate et pour également 120 heures d'incubation dans le noir, l'inhibition cellulaire est légèrement inférieure, avec une valeur de 48%. Cependant, l'effet phototherapeutique a permis une nouvelle fois d'obtenir une inhibition cellulaire presque complète. Cela démontre clairement que le nanocomposite AuNS@Mo₄Al₂ agit comme un agent thérapeutique qui combine la chimiothérapie et la photothérapie. Dans l'ensemble, on peut noter que l'effet de la PTT est plus fort que celui observé pour les AuNP@Mo₄Zol₂Mn_n[17] mettant en évidence l'influence de la morphologie des nanoparticules d'or (étoiles versus sphères).

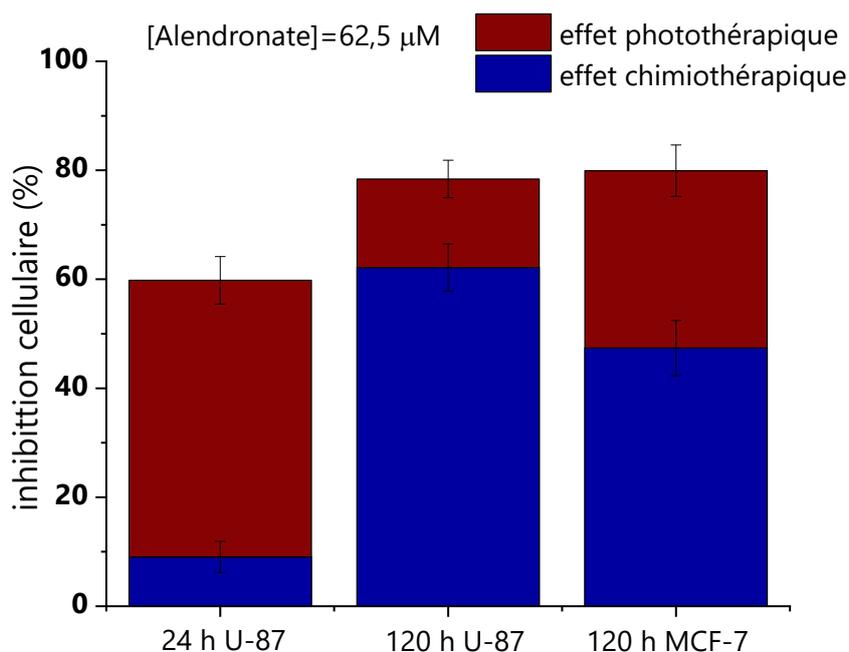


Figure 22: Contribution de la chimiothérapie apportée par les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ (bordeaux) et de la photothérapie due à l'irradiation à 808 nm des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ (bleu) à une concentration en alendronate de 62,5 μM

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués, nous avons étudié l'apport des AuNS sur le processus d'internalisation en réalisant des mesures ICP-OES sur des cellules lavées isolées de lots incubés pendant 5 jours avec Mo_4Al_2 , Mo_6Al_2 et $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$, respectivement, à une concentration en alendronate de 62,5 μM . L'internalisation de l'alendronate n'a pas pu être évaluée dû à l'absence de molybdène ou d'or dans cette molécule. En effet, le dosage par ICP-OES des autres atomes présents dans la molécule (C,N,P,O,H) ne peut pas être effectué car ces éléments sont abondamment présents dans les cellules.

Pour les trois agents chimiothérapeutiques, une internalisation similaire dans les cellules incubées de U-87 a été observée (Figure 23), indiquant que la meilleure activité des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ par rapport au Mo_4Al_2 seul n'est pas le résultat d'une meilleure internalisation dans les cellules mais résulte du processus d'oxydation $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{VI}}$ se produisant pendant la synthèse. Il convient de noter qu'à l'inverse de ce qui a été observé pour la lignée cellulaire U-87, une meilleure internalisation a été démontrée pour les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ par rapport à Mo_4Al_2 ou Mo_6Al_2 pour la lignée cellulaire MCF-7. Cela pourrait expliquer la plus grande différence d'activité entre $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ et Mo_4Al_2

pour cette lignée cellulaire par rapport à U-87.

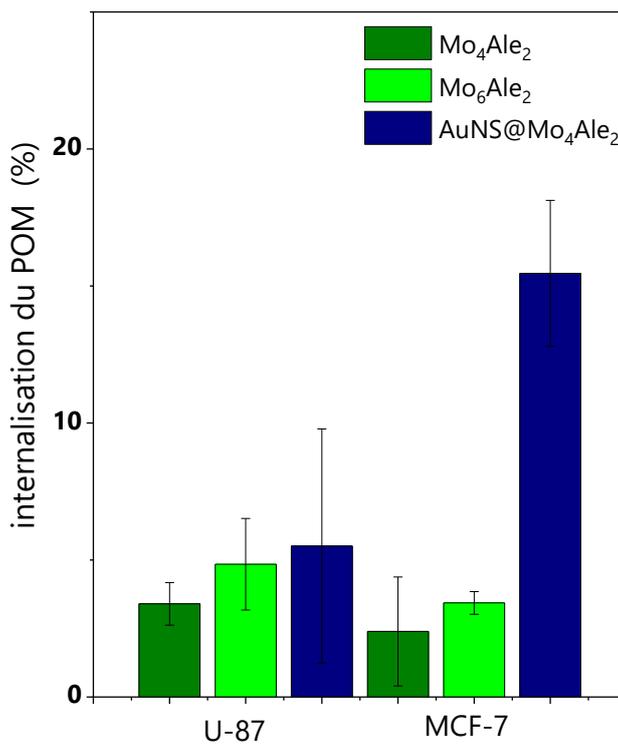


Figure 23: Pourcentage d'internalisation du POM déterminé par ICP-OES sur les lignées cellulaires U-87 et MCF-7 après 120 heures d'incubation pour une concentration en alendronate (externe) de $62,5 \mu\text{M}$

Finalement, des images TEM des cellules U-87 et MCF-7 incubées pendant cinq jours avec les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ à des concentrations de $7,8 \mu\text{M}$ et $62,5 \mu\text{M}$ en alendronate et après irradiation sont présentées dans la Figure 24. Ces images mettent en évidence pour les deux lignées cellulaires que les AuNS étaient confinées dans les compartiments endosomaux des cellules après internalisation par la voie de l'endocytose. Ce résultat démontre également que l'augmentation de la dose entraîne une augmentation du nombre d'endosomes contenant les nanoparticules et une augmentation de la densité des nanoparticules à l'intérieur des endosomes. Le pourcentage d'or internalisé dans les cellules, déterminé via ICP après lavage des cellules, est le même pour les deux lignées cellulaires à des concentrations de $7,8 \mu\text{M}$ et $62,5 \mu\text{M}$ en alendronate (environ 60%). De manière remarquable, l'internalisation des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2\text{e}_2$ démontre clairement la mort cellulaire, avec une désorganisation presque complète des corps cellulaires et une fragmentation des noyaux, en particulier pour la haute dose, et pour les deux lignées cellulaires.

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₄Ale₂ comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

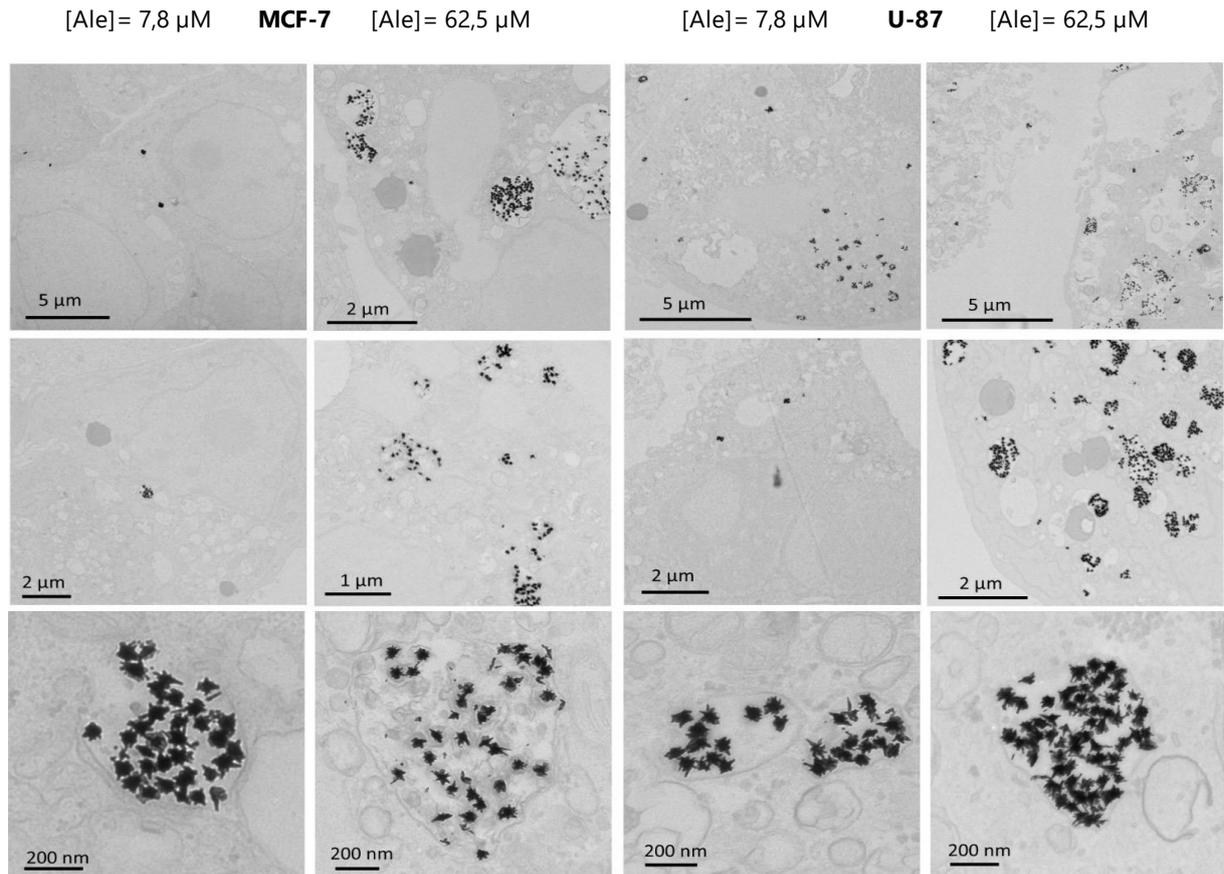


Figure 24: Images MET des cellules MCF-7 (deux colonnes de gauche) et U-87 (deux colonnes de droite) à une concentration en alendronate de 7,81 µM (colonne 1 et 3) et 62,5 µM (colonnes 2 et 4)

3.3 Tests de cytotoxicité sur cellules non-cancéreuses

La Figure 25 montre le pourcentage d'activité métabolique des cellules MCF-10 après 24 heures d'incubation avec le POM Mo₆Ale₂ et les AuNS@Mo₄Ale₂ respectivement. Il est à noter qu'avec des concentrations inférieures à 25 µM aucun effet cytotoxique n'est détectable dans les deux cas. Cependant, à des concentrations plus élevées, une inhibition partielle de l'activité métabolique peut être observée. La concentration la plus élevée, correspondant à 200 µM en alendronate, inhibe quant à elle 40% de l'activité métabolique pour le Mo₆Ale₂ et 34% pour les AuNS@Mo₄Ale₂.

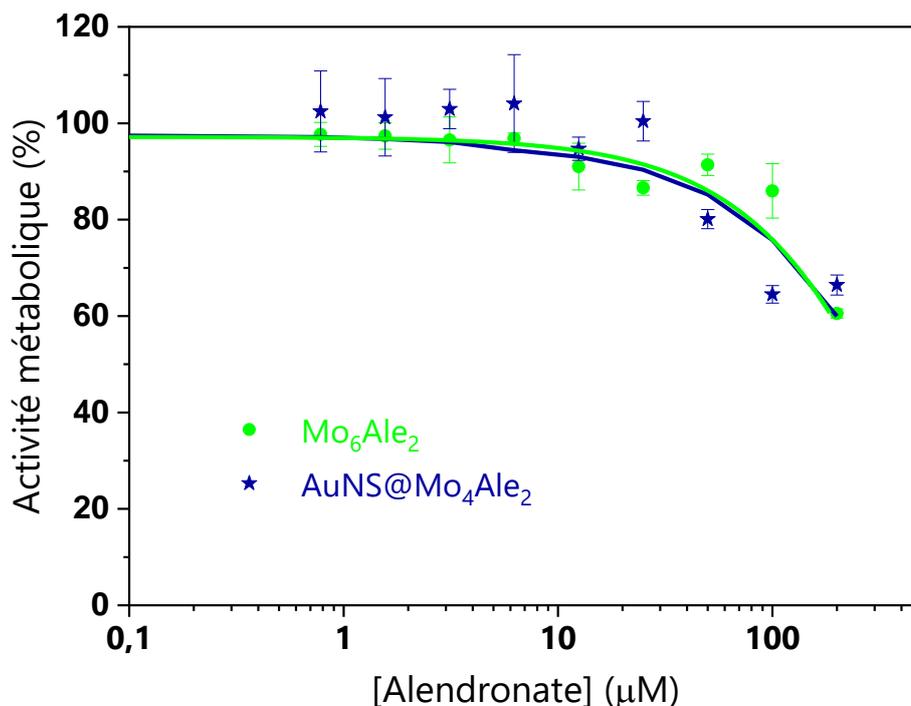


Figure 25: Activité métabolique de la lignée MCF-10 après 24 heures d'incubation avec Mo_6Al_2 (vert) ou les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ (bleu) à différentes concentrations

La Figure 26 montre le pourcentage d'activité métabolique des cellules MCF-10 après 120 heures d'incubation avec le Mo_6Al_2 et les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$. Cette fois, on remarque une inhibition de l'activité métabolique dès 3 µM, cette inhibition augmentant à mesure que la concentration en alendronate augmente, allant jusqu'à 80% pour le Mo_6Al_2 et une inhibition presque totale pour les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ à 200 µM en alendronate. La concentration inhibitrice médiane (IC_{50} ou concentration à laquelle l'activité métabolique est réduite de moitié) des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ est de 51,1 µM pendant que celui du Mo_6Al_2 est de 62,5 µM (en alendronate).

Dans les deux tests (à 24 et 120 heures) il est notable que l'inhibition de l'activité métabolique des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ est très proche de celle du Mo_6Al_2 ce qui pourrait laisser penser que l'effet cytotoxique est presque exclusivement dû au POM hybride et non aux AuNS en elles-mêmes.

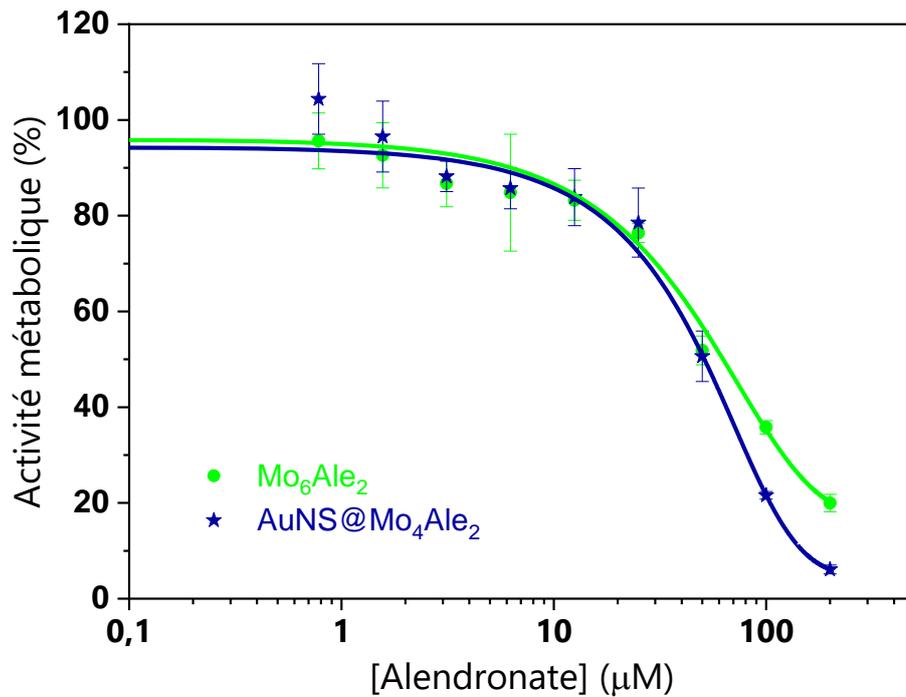


Figure 26: Influence du POM Mo_6Al_2 et des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ sur l'activité métabolique des cellules MCF-10 après 120 heures d'incubation

On peut noter que la cytotoxicité *in vitro* des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ et du Mo_6Al_2 est comparable entre les cellules cancéreuses et non cancéreuses, d'ailleurs l' IC_{50} à 120 heures pour les MCF-7 se situe entre les IC_{50} des U-87 et les MCF-7. Cependant, *in vivo* l'effet EPR pourrait conduire à une accumulation des nanoétoiles à l'intérieur des tumeurs augmentant ainsi la sélectivité.[18], [19], [20]

4 Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre montrent l'obtention de manière reproductible de nanoétoiles d'or avec une bande plasmon dans la fenêtre biologique du proche infrarouge en utilisant le POM réduit Mo₄Ale₂ incorporant le ligand alendronate. La cinétique de la synthèse a été étudiée, montrant que la réaction débute très rapidement mais que deux heures sont nécessaires pour stabiliser la bande plasmon, en particulier à cause d'une réorganisation atomique diminuant légèrement la longueur d'onde de la bande plasmon.

La présence de POMo oxydé et de ligand alendronate à la surface des nanoétoiles après le processus synthétique et le lavage a pu être mis en évidence par ICP-OES, XPS, PM-IRRAS, HAADF et STEM-EDS.

Une modulation de la taille des nanoétoiles ainsi que de la longueur d'onde de la bande plasmon a pu être obtenue en changeant le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$, ce qui permet aux AuNS@Mo₄Ale₂ de présenter des longueurs d'onde de la bande plasmon comprises entre 750 nm (pour le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$ le plus élevé) et 1070 nm (pour le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$ le plus bas), couvrant ainsi l'intégralité de la première fenêtre biologique du proche infrarouge ainsi qu'une partie de la deuxième fenêtre biologique ce qui les rend idéales pour la photothérapie.

L'effet cytotoxique des AuNS@Mo₄Ale₂ a été testé sur trois lignées cellulaires, dont deux cancéreuses et une non-cancéreuse. Les résultats obtenus montrent une cytotoxicité comparable au POM oxydé (Mo₆Ale₂) à 24 et 120 heures, et dans le cas des lignées cancéreuses, supérieure au POM réduit (Mo₄Ale₂) et au ligand libre. Cela confirme le rôle clé de l'état d'oxydation du molybdène dans l'activité antitumorale. L'activité cytotoxique sur les lignées tumorales a été drastiquement augmentée par l'irradiation dans le proche infrarouge en allant jusqu'à induire une mort cellulaire quasi totale, faisant des AuNS@Mo₄Ale₂ un nanocomposite prometteur pour les traitements combinatoires chimio/photothermique.

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

Dans le prochain chapitre seront présentés la synthèse, la caractérisation et les premiers tests de cytotoxicité d'un nouveau composite AuNS@POM avec un POM contenant le ligand zolédronate, lequel montre une cytotoxicité accrue comparé à l'alendronate.[21]

5 References

- [1] B. Zümreoglu-Karan, "A rationale on the role of intermediate Au(III)-vitamin C complexation in the production of gold nanoparticles," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11, no. 5, pp. 1099–1105, Jul. 2009, doi: 10.1007/s11051-008-9498-5.
- [2] H. Yuan, C. G. Khoury, H. Hwang, C. M. Wilson, G. A. Grant, and T. Vo-Dinh, "Gold nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 7, 2012, doi: 10.1088/0957-4484/23/7/075102.
- [3] B. Bouvet and A. Vallée, "Les Nano-étoiles d'or décorées de polyoxométallates," Versailles, 2020.
- [4] I. B. Becerril-Castro et al., "Gold Nanostars: Synthesis, Optical and SERS Analytical Properties," *Analysis & Sensing*, vol. 2, no. 3, May 2022, doi: 10.1002/anse.202200005.
- [5] S. Barbosa et al., "Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars," *Langmuir*, vol. 26, no. 18, pp. 14943–14950, 2010, doi: 10.1021/la102559e.
- [6] P. Senthil Kumar, I. Pastoriza-Santos, B. Rodríguez-González, F. Javier García De Abajo, and L. M. Liz-Marzán, "High-yield synthesis and optical response of gold nanostars," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/01/015606.
- [7] N. T. Le, T. J. M. Boskovic, M. M. Allard, K. E. Nick, S. R. Kwon, and C. C. Perry, "Gold Nanostar Characterization by Nanoparticle Tracking Analysis," *ACS Omega*, vol. 7, no. 49, pp. 44677–44688, Dec. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c03275.
- [8] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, and L. M. Liz-Marzán, "Nanostars shine bright for you. Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 16, no. 2, pp. 118–127, 2011, doi: 10.1016/j.cocis.2010.12.007.
- [9] Malvern instrument, "Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes."
- [10] H. Liu, N. Pierre-Pierre, and Q. Huo, "Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions," *Gold Bull*, vol. 45, no. 4, pp. 187–195, 2012, doi: 10.1007/s13404-012-0067-4.
- [11] A. L. Siegel and G. A. Baker, "Bespoke nanostars: Synthetic strategies, tactics, and

uses of tailored branched gold nanoparticles," *Nanoscale Adv*, vol. 3, no. 14, pp. 3980–4004, 2021, doi: 10.1039/d0na01057j.

[12] C. G. Khoury and T. Vo-Dinh, "Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, no. 48, pp. 18849–18859, Dec. 2008, doi: 10.1021/jp8054747.

[13] A. M. Smith, M. C. Mancini, and S. Nie, "Bioimaging: Second window for in vivo imaging," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 710–711, 2009. doi: 10.1038/nnano.2009.326.

[14] S. H. Wang, C. W. Lee, A. Chiou, and P. K. Wei, "Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images," *J Nanobiotechnology*, vol. 8, Dec. 2010, doi: 10.1186/1477-3155-8-33.

[15] H. El Moll et al., "Polyoxometalates functionalized by bisphosphonate ligands: Synthesis, structural, magnetic, and spectroscopic characterizations and activity on tumor cell lines," *Inorg Chem*, vol. 51, no. 14, pp. 7921–7931, Jul. 2012, doi: 10.1021/ic3010079.

[16] J. D. Compain et al., "Tetra- to dodecanuclear oxomolybdate complexes with functionalized bisphosphonate ligands: Activity in killing tumor cells," *Chemistry - A European Journal*, vol. 16, no. 46, pp. 13741–13748, 2010, doi: 10.1002/chem.201001626.

[17] S. Tomane et al., "Gold/Polyoxometalate Core/Shell Nanoparticles for Combined Chemotherapy-Photothermal Cancer Therapy," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 4, no. 3, pp. 2339–2344, 2021, doi: 10.1021/acsanm.0c03187.

[18] A. Nel, E. Ruoslahti, and H. Meng, "New Insights into 'permeability' as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics," *ACS Nano*, vol. 11, no. 10. American Chemical Society, pp. 9567–9569, Oct. 24, 2017. doi: 10.1021/acsnano.7b07214.

[19] J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, "The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 3. pp. 136–151, Mar. 18, 2011. doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009.

[20] Q. Gao, J. Zhang, J. Gao, Z. Zhang, H. Zhu, and D. Wang, "Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Apr. 13, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.647905.

Chapitre 3 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant et évaluation de leurs activités contre des cellules cancéreuses

[21] A. Saad et al., "Polyoxomolybdate Bisphosphonate Heterometallic Complexes: Synthesis, Structure, and Activity on a Breast Cancer Cell Line," *Chemistry - A European Journal*, vol. 21, no. 29, pp. 10537–10547, Jul. 2015, doi: 10.1002/chem.201406565.

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant

Ce chapitre est tout d'abord dédié à la synthèse et la caractérisation de nanoétoiles d'or obtenues en utilisant le polyoxométallate Mo₈Zol₄ incorporant le ligand zolédronate et des centres molybdène(V). La deuxième partie du chapitre décrit une méthode permettant de moduler la bande plasmon caractérisant ces nanoétoiles. Finalement, la dernière partie abordera les tests de cytotoxicité réalisés sur la lignée cellulaire MCF-10.

1 Introduction

Après avoir obtenu des nanoétoiles en utilisant le composé Mo₄Al_e₂ comme agent réducteur et stabilisant, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un nouveau composite AuNS-POM, cette fois-ci obtenu en présence du POM Mo₈Zol₄ décrit dans le chapitre 2. Pour cette nouvelle synthèse, afin de conserver le rapport $\frac{\text{électron disponible}}{\text{Au}^{3+}} = 8$, le rapport molaire $\frac{\text{POMo}}{\text{HAuCl}_4}$ a été divisé par deux en tenant en compte de la structure du POM qui, comparé au Mo₄Al_e₂ est constitué du double d'atomes de Mo^V.

Cette étude a été motivée par le fait que le zolédronate est un bisphosphonate doté de bien meilleures propriétés anticancéreuses que l'alendronate. En effet, tandis que l'alendronate présente un IC₅₀ de 210 µM sur les cellules cancéreuses MCF-7, le zolédronate, dans les mêmes conditions, présente un IC₅₀ 14 fois plus faible, soit de 15 µM.[1] Par ailleurs, comme Mo₄Al_e₂, Mo₈Zol₄ est un POMo réduit. Il comporte huit centres Mo^V ayant la capacité de réduire Au^{III} en Au⁰ et donc de former des AuNS en suivant la méthode précédemment décrite. Enfin, si les propriétés biologiques de ce POM contre des cellules cancéreuses n'ont à ce jour pas été étudiées, il représente cependant un candidat très prometteur pour la synthèse de composites AuNS@POMo en vue d'un traitement combinatoire photothermique/chimiothérapeutique, les complexes associant Mo(VI) et zolédronate présentant des activités très élevées et supérieures à celles du ligand seul.[2], [3]

Ce chapitre abordera dans un premier temps la cinétique de la synthèse, suivi de l'analyse de sa reproductibilité, de la description du lavage et de la concentration du milieu qui s'effectueront de façons simultanées, avant d'aborder la caractérisation détaillée des composites AuNS@Mo₈Zol₄ par différentes techniques telles que la spectroscopie UV-visible-proche infrarouge (UV-vis-NIR), la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique en transmission et de la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS). Après cela, nous explorerons les possibilités de moduler la taille des AuNS et donc la bande plasmon caractérisant ces systèmes en modulant le rapport $\frac{\text{Germes}}{\text{Au}^{3+}}$, et finalement nous analyserons la cytotoxicité des AuNS@Mo₈Zol₄ sur des cellules non-cancéreuses de type MFC-10.

2 Synthèse et caractérisation des $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$

2.1 Cinétique de synthèse

Comme lors de la synthèse des AuNS avec le POM Mo_4Ale_2 cette étude débute par le suivi cinétique par spectroscopie UV-visible de la synthèse des AuNS afin de déterminer le temps nécessaire à ce que la bande plasmonique n'évolue plus en longueur d'onde. La Figure 1 montre l'évolution de la position de la bande plasmonique en fonction du temps de synthèse. Il est possible d'observer dès les premières minutes un fort décalage de cette bande, celle-ci passant de 521 nm pour les germes à 830 nm après 3 minutes de réaction, suggérant l'apparition de nanoétoiles.

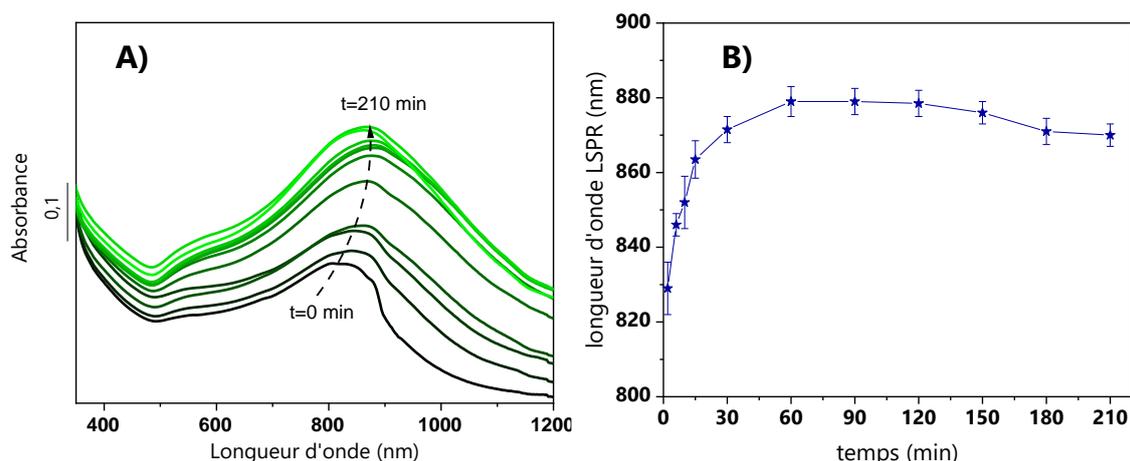


Figure 1: **A)** Caractérisation optique des $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ dans le milieu de synthèse entre $t = 0$ et $t = 210$ minutes de réaction. **B)** Evolution de la position de la bande plasmon.

Ce décalage de la longueur d'onde de la bande plasmonique vers les hautes longueurs d'onde continue à se déplacer pendant 60 minutes mais dans une moindre mesure jusqu'à atteindre une valeur maximale de $\lambda = 880 \pm 4$ nm. Après une stabilisation temporelle d'approximativement une heure, la position de la bande plasmon diminue légèrement d'une dizaine de nanomètres pour, après 3 heures, arriver à une valeur définitive de $\lambda = 870 \pm 4$ nm.

Lorsque cette cinétique est comparée à celle obtenue lors de la synthèse des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Ale}_2$ (Figure 2), trois différences sont identifiables. Tout d'abord, la longueur d'onde finale de la LSPR se décale de plus de 100 nm vers l'infrarouge pour cette synthèse, avec une valeur de 870 nm au lieu de 750 nm. Nous tenterons d'expliquer ce

décalage dans la partie 5 du présent chapitre, en comparant les morphologies des nanoétoiles formées. La deuxième différence est qu'après la valeur maximale, obtenue au bout de 60 minutes, la longueur d'onde de la bande plasmonique se décale très peu vers le visible, seulement d'une dizaine de nanomètres, contre 50 nanomètres avec le Mo_4Al_2 . Ce décalage, déjà identifié dans le chapitre précédant, est causé par la diffusion de l'or sur les nanoétoiles déjà formé,[4] et semble être donc plus limité dans le cas de l'utilisation du Mo_8Zol_4 . Cet effet pourrait être en partie expliqué par une mobilité réduite des atomes d'or lié à la différence d'interaction entre les deux POM et la surface

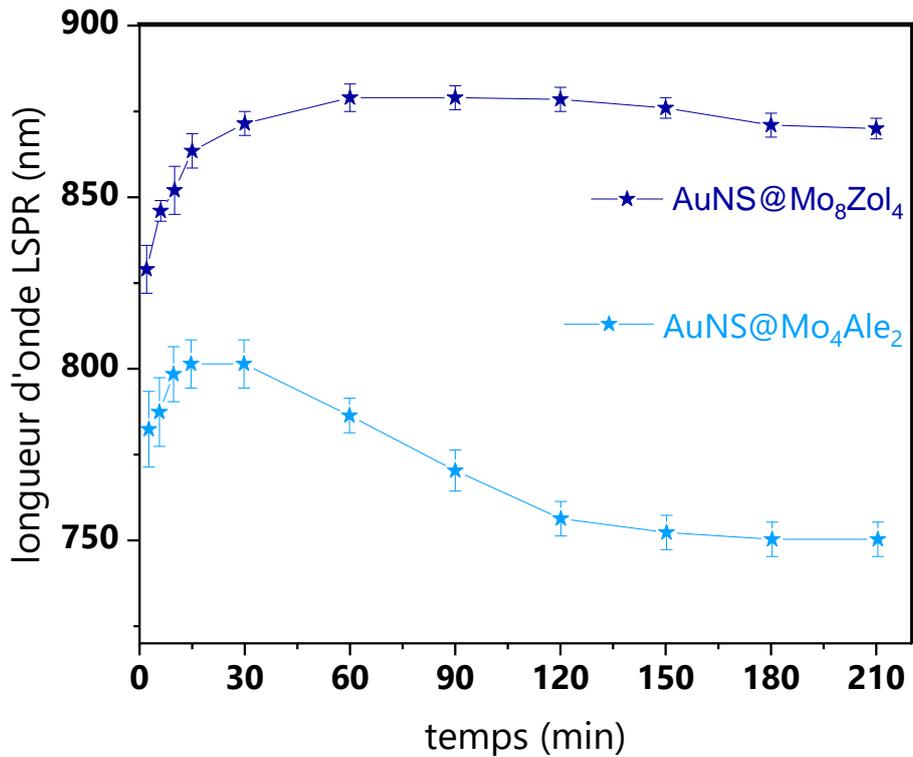


Figure 2 : Comparaison de la cinétique de synthèse des deux types de AuNS@POM

d'or. Enfin, la dernière différence est que le temps pour arriver à la stabilisation est de 3 heures.

2.2 Reproductibilité de la synthèse

Une fois le temps nécessaire pour compléter la réaction déterminé, la synthèse a été répétée dix fois dans les mêmes conditions afin d'examiner la reproductibilité de la synthèse (Figure 3). On voit que la longueur d'onde de la bande plasmonique se situe entre 843 et 907 nm, soit à $\lambda = 875 \pm 22$ nm. En considérant que les synthèses ont été réalisées avec différents lots de germes et de Mo_8Zol_4 , cette homogénéité de la longueur d'onde est un indicateur d'une bonne reproductibilité. Par ailleurs, la bande secondaire visible aux alentours de 530 nm peut être attribuée aux cœurs des nanoétoiles.[5] Bien que cette celle-ci était également présente dans les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$, elle est cette fois-ci beaucoup plus facilement identifiable du fait que la bande plasmonique principale se trouve plus loin et donc interfère moins.

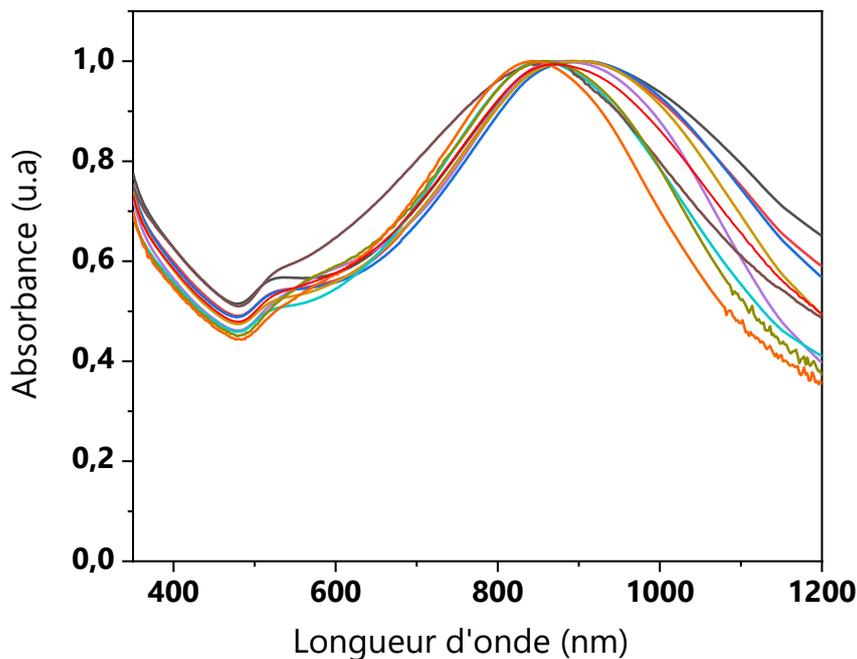


Figure 3: Spectres UV-Vis correspondants à 10 synthèses indépendantes de composites $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$

2.3 Lavage et concentration

A nouveau, il s'est révélé nécessaire de réaliser un lavage de la solution colloïdale finale pour éliminer l'excès de réducteur ainsi que des possibles germes qui n'auraient pas formé de nanoétoiles. Dès la première centrifugation, il a été évident que les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ sont plus stables que les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$, car pour les mêmes vitesses de centrifugation, il n'y a eu aucune agrégation, ce qui a permis d'augmenter la vitesse de centrifugation pour obtenir une séparation des deux phases beaucoup plus évidente.

Cela permet de retirer plus facilement le POM en excès. Ce lavage est réalisé par centrifugation à une vitesse de 2500 RPM pendant 15 minutes (contre 2200 RPM pendant 12 minutes dans le cas antérieur) puis en retirant le surnageant et en ajoutant une quantité d'eau inférieure au volume de surnageant retiré, afin de pouvoir en même temps augmenter la concentration des AuNS. Après cette étape, les AuNS@Mo₈Zol₄ lavées ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 3) et par ICP-OES, les deux méthodes mettant en évidence la diminution du rapport $\frac{POMo}{Au}$. Par spectroscopie, l'absorbance à 280 nm (A_{280}), caractéristique du Mo₈Zol₄, a été mesurée et divisée par l'absorbance A_{870} observée à 870 nm, correspondant à l'absorbance de la bande plasmon des AuNS. Une diminution du rapport $\frac{A_{280}}{A_{870}}$ de 2,53 à 1,49 est observée. Le rapport expérimental $\frac{BP}{Au}$ obtenu par ICP-OES passe de 4,0 avant lavage à $0,8 \pm 0,4$ après lavage. Cette diminution est plus importante que celles des AuNS@Mo₄Al₂ où le rapport $\frac{BP}{Au}$ est passé de 4,0 à 1,3. Le rapport $\frac{Mo}{P}$ après lavage reste quant à lui inchangé ($0,97 \pm 0,2$), ce qui semblerait indiquer, à nouveau que les groupes bisphosphonates restent coordonnés au POMo pendant la synthèse et l'étape de lavage et concentration.

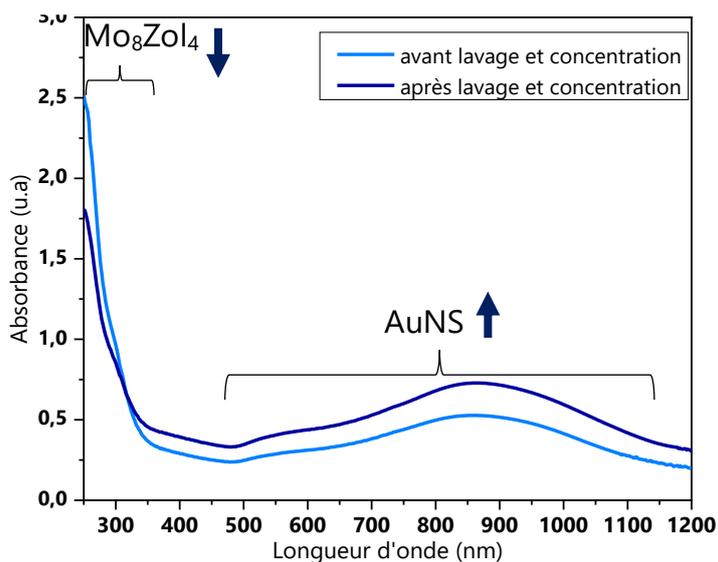


Figure 4: Spectre d'absorption électronique des AuNS@Mo₈Zol₄ avant et après lavage.

Le potentiel zêta des AuNS@Mo₈Zol₄ est de $-36,4 \pm 2,2$ mV. Cette valeur négative est cohérente avec la charge négative des POMo présents en surface et avec la bonne stabilité colloïdale des AuNS. Le fait que cette valeur s'éloigne légèrement plus de zéro que celles des AuNS@Mo₄Al₂ ($-33,0 \pm 2,8$ mV) indique une meilleure stabilité colloïdale.

Cela pourrait expliquer pourquoi le lavage par centrifugation est plus facile pour ces nanoétoiles. Cependant, en tenant en compte l'erreur dans la mesure, cette différence pourrait être non significative.

2.4 Caractérisation de la morphologie des AuNS@Mo₈Zol₄

La forme et la taille des nanoparticules ont été caractérisées par microscopie électronique en transmission (MET) puis par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) a été réalisée afin d'observer de façon plus détaillée les AuNS.

L'imagerie par MET, présentée dans la Figure 5, révèle bien la présence de nanoparticules en forme d'étoiles. Les AuNS@Mo₈Zol₄ ont des cœurs de 40 ± 7 nm de diamètre et des branches réparties sur toute la surface du cœur et pointant vers l'extérieur. Elles ne semblent pas avoir un motif régulier ou une symétrie identifiable, mais au contraire semblent avoir une disposition aléatoire sur la surface. Les branches ont une longueur moyenne d'approximativement 49 ± 22 nm, cependant, il existe deux types de branches qui se différencient par leur taille. Chaque AuNS possède entre 2 à 4 branches très

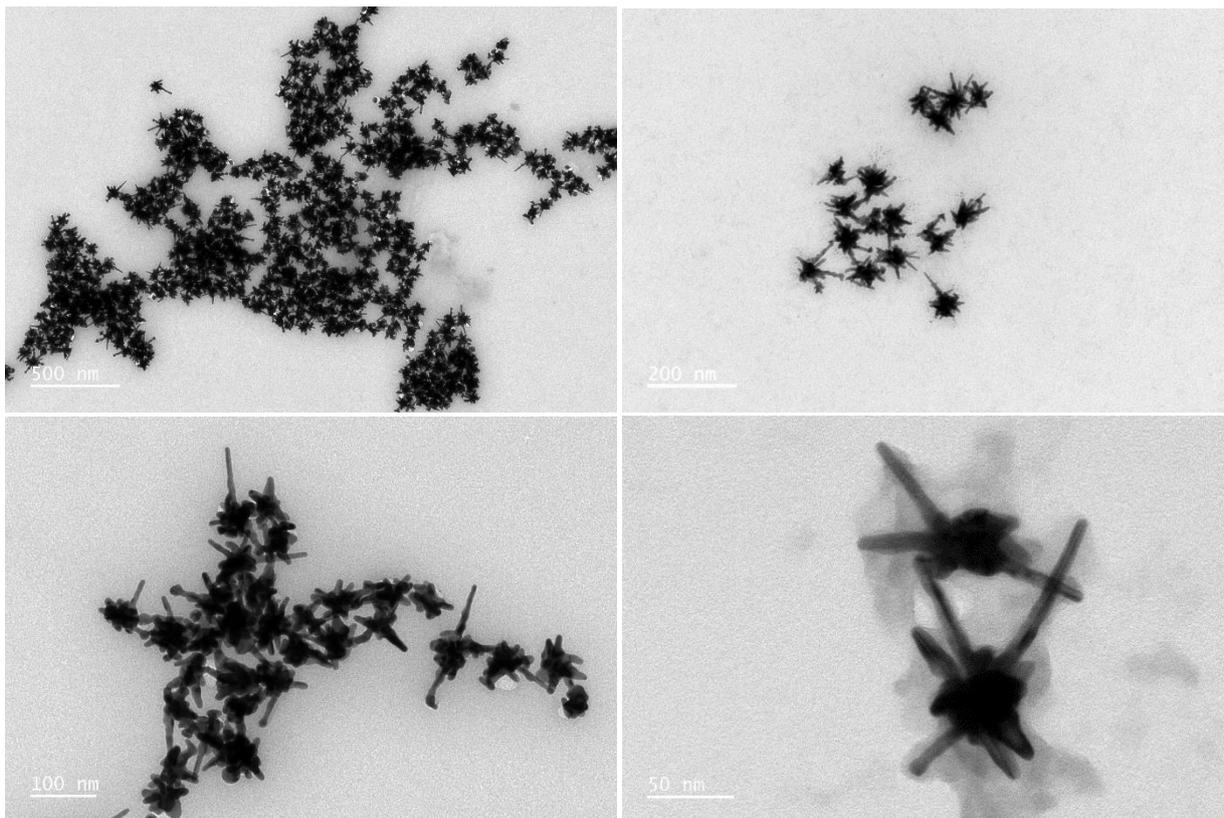


Figure 5: Images par MET des AuNS@Mo₈Zol₄

longues qui peuvent aller jusqu'à 100 nm et une dizaine de branches beaucoup plus courtes entre 10 à 40 nm. Le diamètre maximal de Féret est de 125 ± 25 nm, cette augmentation par rapport au $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ (diamètre maximal de Féret de 95 ± 15 nm) est liée à la présence de ces longues branches. Une schématisation en 3 dimensions est proposée de manière indicative dans la Figure 6 avec 3 branches longues et 12 branches courtes.

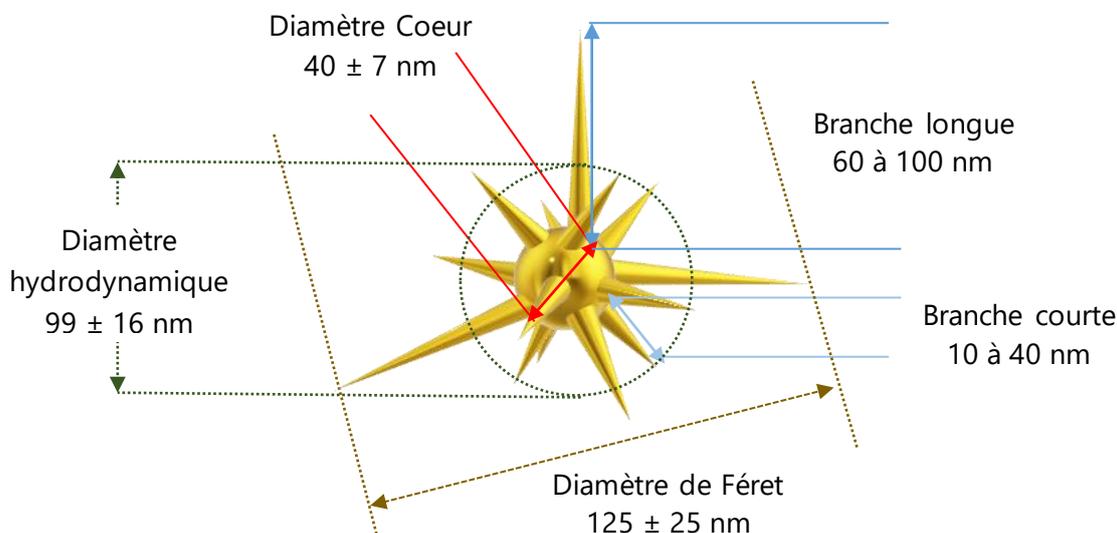


Figure 6 : Schématisation 3D d'une $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$

La diffusion dynamique de la lumière (Figure 7) révèle un diamètre hydrodynamique égal à 99 ± 13 nm. Dans le cas de nanoparticules non-sphériques, cette valeur correspond au diamètre d'une particule sphérique possédant la même vitesse de diffusion translationnelle.[6] Le diagramme présente également un deuxième signal beaucoup plus faible aux alentours de 10 nm. Comme cela a déjà été expliqué au chapitre précédent, il n'est pas dû aux germes ni aux cœurs des AuNS mais à la diffusion rotationnelle des nanoparticules anisotropes, et ne doit donc pas être pris en compte

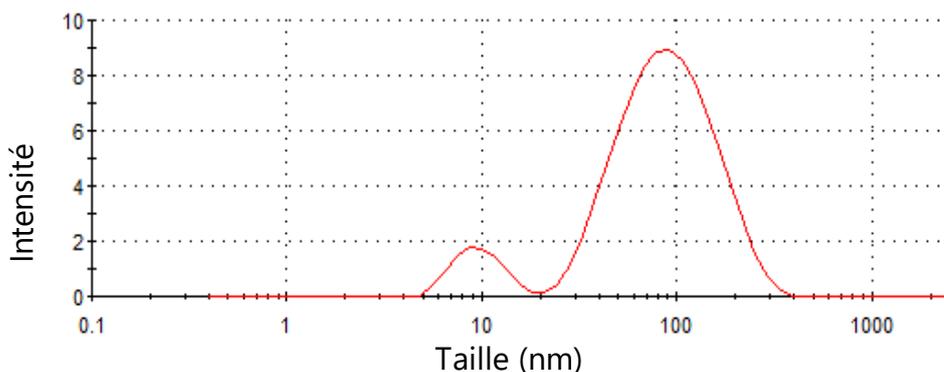


Figure 7 : Diamètre hydrodynamique déterminé par DLS pour les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ pour la détermination de la taille des nanoparticules.[7]

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_8Zol_4 comme agent réducteur et stabilisant

Des images de microscopie électronique en transmission à haute résolution (MET-HR) ont également été enregistrées afin d'examiner plus en détail la morphologie des AuNS. La Figure 8 permet de focaliser sur une AuNS. Plusieurs branches sont visibles, avec des longueurs apparentes très variables. Cela peut être dû non seulement à l'hétérogénéité de la longueur des branches en elle-même, mais également à l'orientation de chaque branche par rapport à l'image. Trois branches qui semblent être alignées sur le même plan que la micrographie sont clairement identifiables par leur remarquable longueur (entre 90 et 105 nm chacune). Sept autres branches mineures (ou alignées sur un plan différent) avec des tailles entre 16 et 45 nm sont également observables. Les contrastes en forme de protubérances visibles sur le cœur de la nanoparticule peuvent être des branches (quasi) perpendiculaires au plan de l'image. Sur la même nanoétoile, trois sections S1, S2 et S3 ont été agrandies.

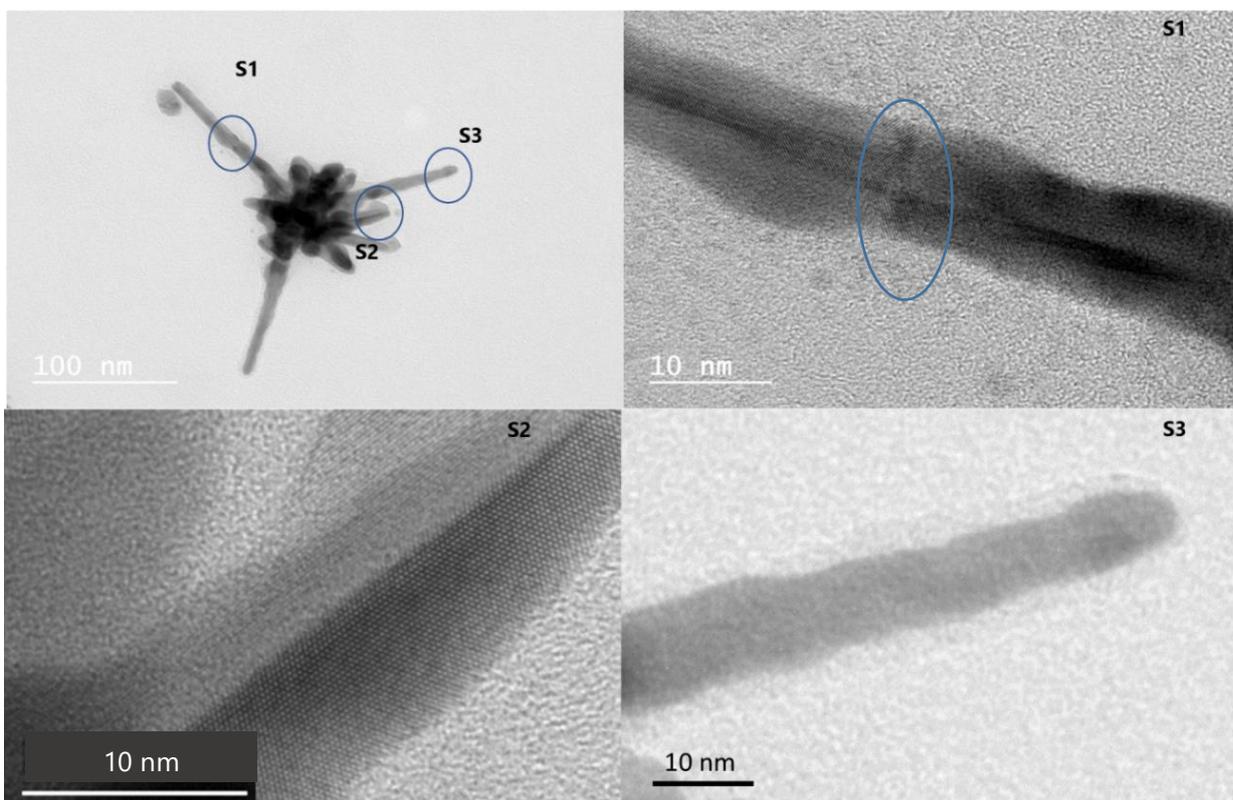


Figure 8: Image MET-HR d'une nanoétoile, avec 3 sections agrandies.

S1 correspond au centre de la plus grande branche. Sur celui-ci, un défaut transversal est visible. Bien qu'il soit difficile d'en connaître l'origine exacte, la déposition d'atomes d'argent pourrait être la cause de l'interruption de croissance en cet endroit.

La section S2 correspond à l'agrandissement d'une branche beaucoup plus courte, mais avec la particularité que les alignements atomiques sont visibles dans le plan de l'image, avec une distance interplanaire d'approximativement 2,52 Å. Ceci correspondrait à des plans (1 1 1), qui présentent une distance interplanaire de 2,355 Å. La section S3 correspond-elle au grossissement d'une autre des longues branches, mais focalisé sur sa pointe. Il est possible d'apercevoir une fine couche d'approximativement 3 nm autour de la branche, qui pourrait correspondre au POMo.

La Figure 9 représente une deuxième nanoétoile. Celle-ci possède deux longues branches, de 65 et 82 nm de longueur respectivement, et 6 autres plus petites, comprises entre 20 et 40 nm de longueur. La couche amorphe qui, dans la figure précédente, ne se voyait que très subtilement, est ici visible très facilement sur près de la moitié de la nanoparticule, avec une épaisseur de couche allant de 4 à 20 nm selon l'endroit. La région S1 correspond au grossissement d'une branche où la couche amorphe est facilement repérable.

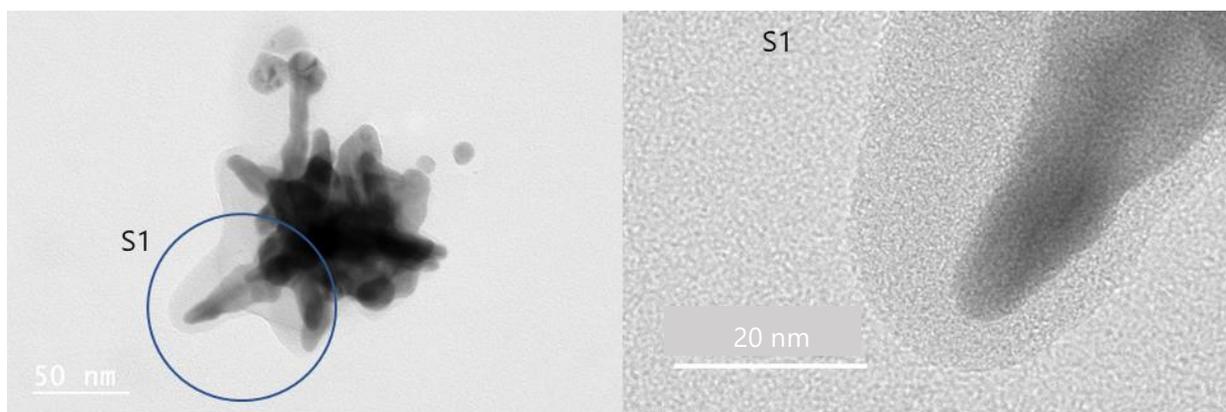


Figure 9: image MET-HR d'une nanoétoile avec une section agrandie S1 mettant en évidence une couche amorphe autour d'une pointe de la NS.

2.5 Caractérisation de la surface des AuNS@ Mo_8Zol_4

Pour déterminer la composition des nanoétoiles ainsi que de la couche amorphe les entourant, nous avons réalisé de l'imagerie « annular dark-field imaging » (HAADF), de la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie en microscopie électronique en transmission à balayage (STEM-EDS) ainsi que de la spectroscopie infrarouge de réflexion absorption (PM-IRRAS).

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo_8Zol_4 comme agent réducteur et stabilisant

Pour confirmer la présence du POMo dans la couche amorphe, de l'imagerie HAADF (Annular Dark-Field Imaging) a été réalisée. Cette technique est fortement sensible au numéro atomique Z des éléments constituant le matériau, montrant une image plus brillante lorsque l'élément a un numéro atomique élevé. Parmi tous les éléments présents dans la solution, l'or est de loin celui avec le Z le plus élevé ($Z_{\text{Au}}=79$), suivi par l'argent ($Z_{\text{Ag}}=47$), le molybdène ($Z_{\text{Mo}}=42$) et enfin le phosphore ($Z_{\text{P}}=15$). La Figure 10 montre l'imagerie HAADF de deux nanoétoiles. Autour d'elles se forme une couche composée d'atomes beaucoup plus légers que l'or, donc possiblement le POMo.

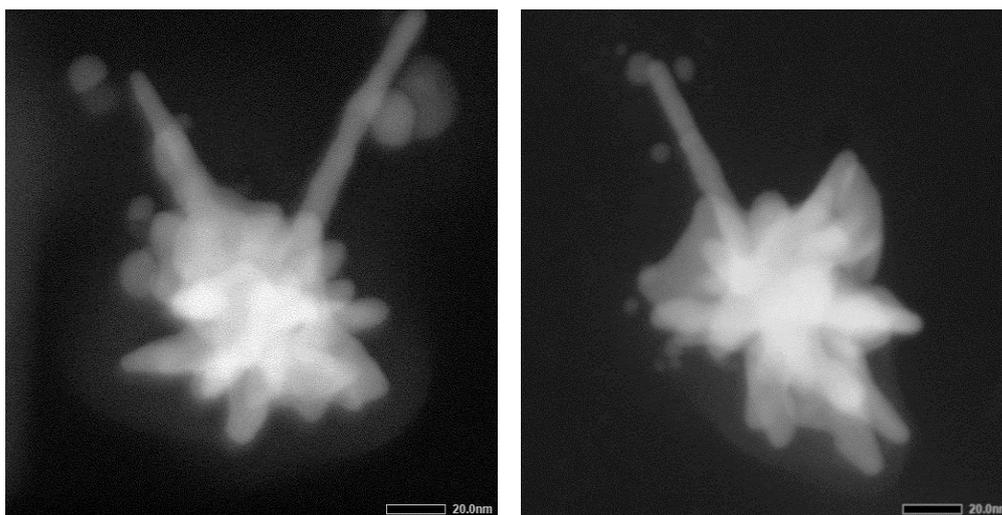


Figure 10: imagerie HAADF de deux $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$.

Une cartographie élémentaire par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie en microscopie électronique en transmission à balayage (STEM-EDS) (Figure 11) a été réalisée sur une nanoétoile afin de connaître sa composition. On observe que l'or est présent uniquement dans le corps de la nanoétoile tandis que le molybdène est aussi visible dans la couche amorphe autour. D'un point de vue quantitatif, l'or est l'élément le plus présent avec 66,0%, suivi par l'argent avec 12,4%. Le phosphore et le molybdène conservent leur relation 1:1 presque parfaite avec 10,9% et 10,7% respectivement.

La présence d'un POMo hybride contenant des ligands zolédronate à la surface des AuNS a aussi été observée par spectroscopie infrarouge (PM-IRRAS). Le spectre infrarouge du POMo initial et des $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ (Figure 12) présente les bandes caractéristiques des groupement phosphonates P-O et P=O, entre 1053 et 1169 cm^{-1} pour les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ et entre 1080 et 1180 cm^{-1} pour le Mo_8Zol_4 , ainsi que celles

caractéristiques aux groupements Mo-O et Mo=O entre 820 et 1008 pour les AuNS et

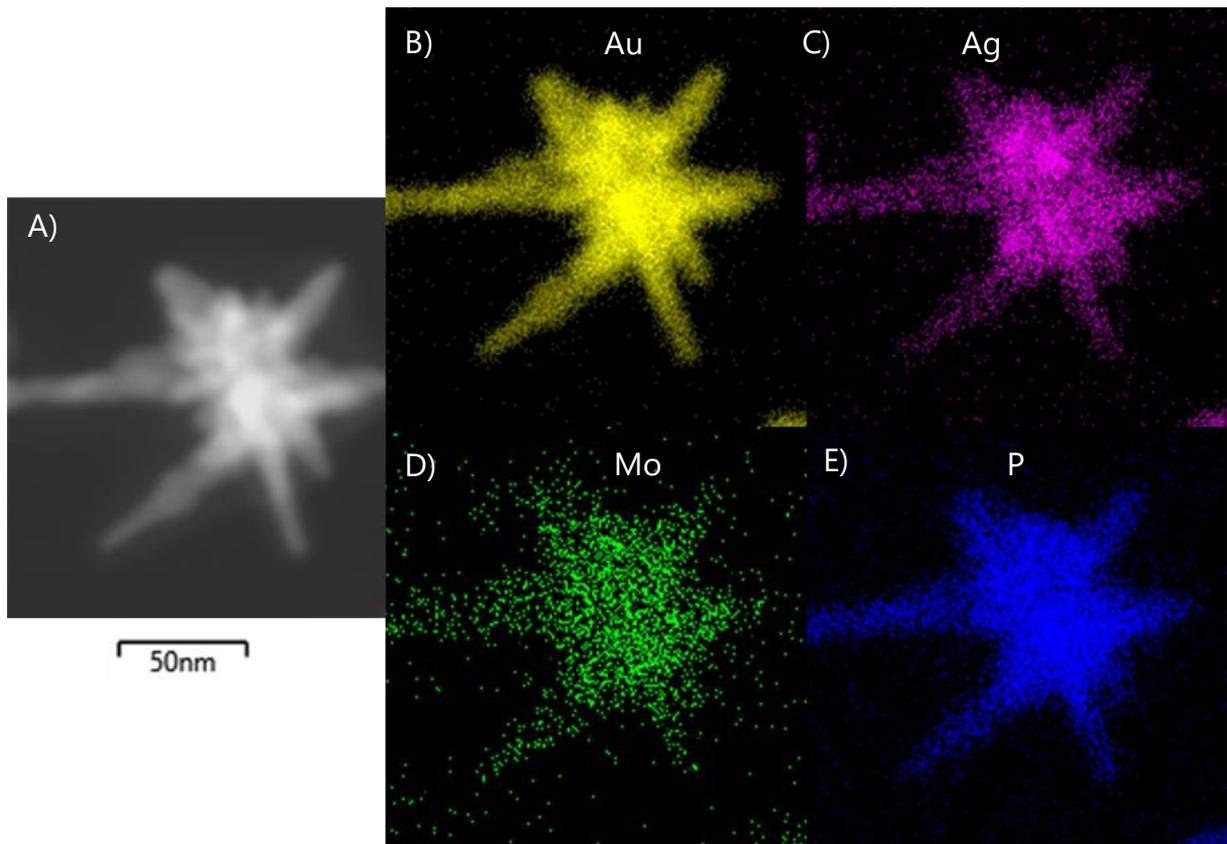


Figure 11: Cartographie élémentaire par STEM-EDS. A) image HAADF ; Spectre correspondant aux éléments B) Au, C) Ag, D) Mo et E) P.

entre 818 et 1010 cm^{-1} pour le POMo (voir tableau 1).

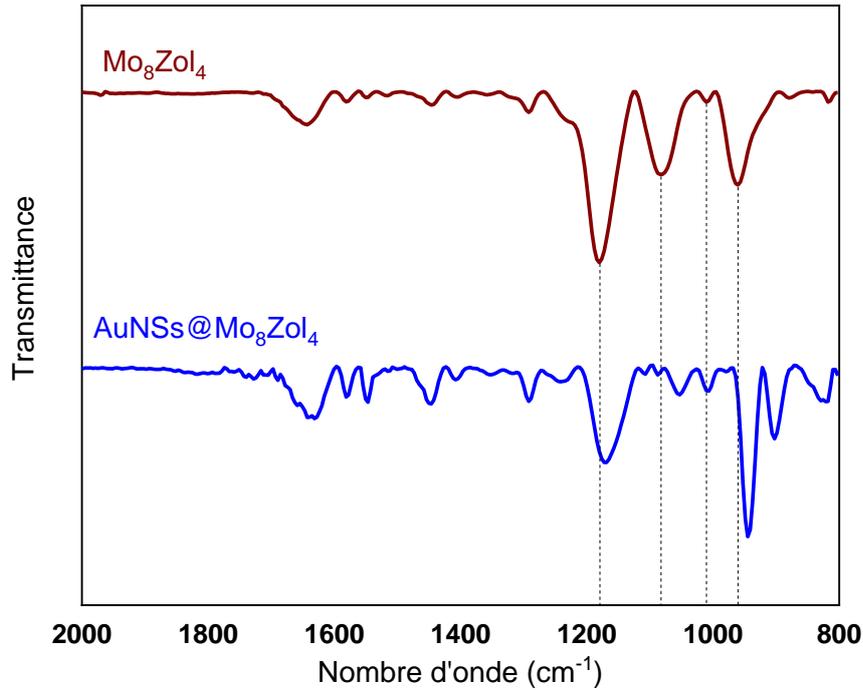


Figure 12: Spectres infrarouge (PM-IRRAS) du POMo réduit Mo_8Zol_4 et des $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$.

Tableau 1: Fréquences infrarouge (en cm^{-1}) et assignations des pics pour les composés Mo_8Zol_4 et $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$

Assignation	Mo_8Zol_4	$\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$
ν (P-O) et ν (P=O)	1180	1169
	1080	1108
		1053
ν (Mo=O) et ν (Mo-O)	1010	1008
	960	945
	880	902
	818	820

La spectroscopie de photoélectrons des rayons X (Figure 19) du Mo_8Zol_4 présente un doublet avec une composante Mo 3d 5/2 à 231,2 eV et une composante Mo 3d 3/2 à 234,4 eV, caractéristique d'un composé Mo(V). Le spectre XPS de $\text{AuNS@Mo}_4\text{Ale}_2$ a pu être ajusté qu'en considérant la présence d'ions Mo(VI), ce qui indique que la totalité du POM non oxydé a pu être séparé des AuNS lors du lavage.

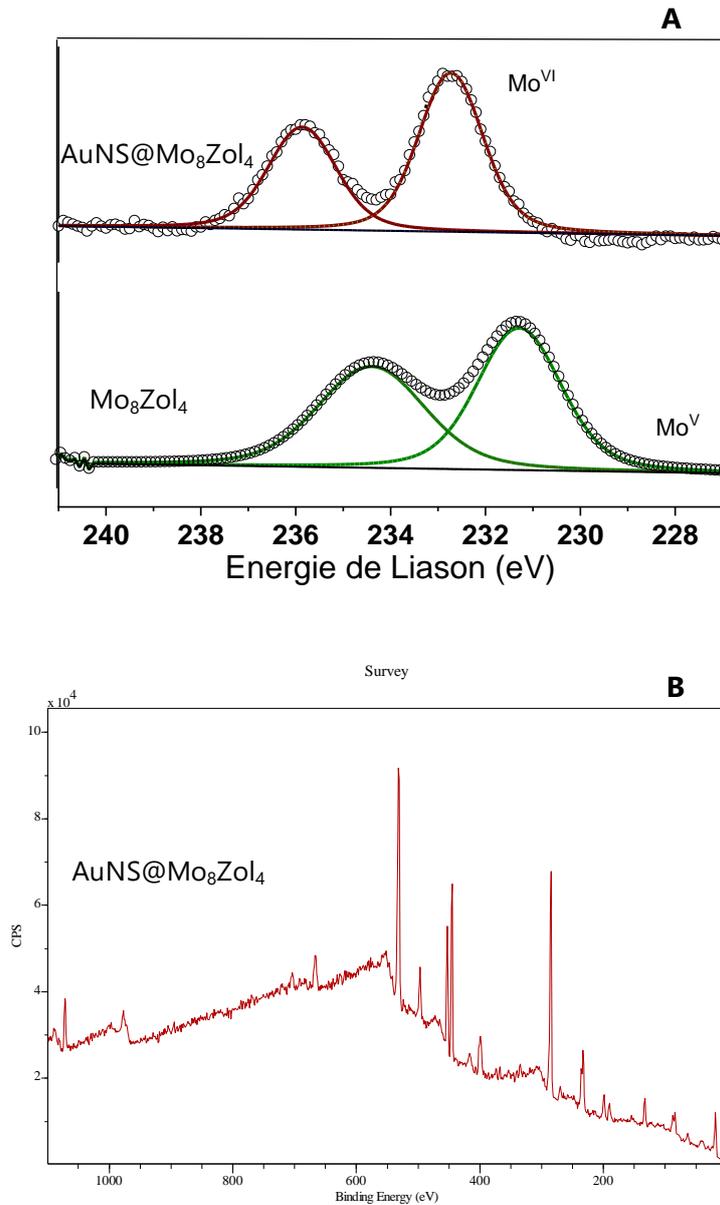


Figure 19 : spectroscopie de photoélectrons des rayons X (XPS) de Mo_8Zol_4 et $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ **A**) région du Mo **B**) spectre complet

2.6 Modulation de la morphologie et de la bande plasmon des $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$

Encore une fois, nous avons modifiée le rapport $\frac{\text{GermeS}}{\text{Au}^{3+}}$, afin de moduler non seulement la morphologie des AuNS, mais aussi la longueur d'onde de la bande plasmon, Ce rapport étant amplement identifié dans la littérature comme étant critique. [8], [9], [10]

Pour que d'autres facteurs, tels que le rapport $\frac{\text{Au}^{3+}}{\text{réducteur}}$ ou le pH de la solution, qui

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant

dépend en grande mesure du précurseur acide de Au³⁺, n'interfèrent pas dans notre étude, la concentration en Au³⁺ a été fixée pendant que la concentration en germes a été modifiée changeant ainsi le rapport $\frac{\text{Germes}}{\text{Au}^{3+}}$. La concentration jusqu'ici considérée était C=1,04x10¹⁴ germes/litre. Dans le chapitre antérieur, la concentration en germes avait été uniquement diminuée dans le but d'obtenir des AuNS avec une longueur d'onde plus grande (car la bande initiale est à 750 nm). Cependant, cette fois-ci, comme la bande plasmon des AuNS initiales est à 870 nm, nous augmenterons et diminuerons la concentration dans le but d'avoir des AuNS avec des bandes plasmons qui couvrent l'intégralité des deux fenêtres biologiques du proche infrarouge.

La Figure 13 **A**) montre la variation du spectre d'absorption électronique en fonction de la concentration en germes. La Figure 13 **B**) montre uniquement la longueur d'onde de la bande plasmon à différentes concentrations en germes. Comme espéré, une diminution de la concentration en germes décale la bande plasmonique vers l'infrarouge. Ce décalage peut être dû à une plus grande disponibilité d'Au³⁺ pour la croissance autour de chaque germe, entraînant la formation d'AuNS plus grandes ou plus de branches chacune. Le cas contraire, c'est-à-dire avec une quantité de germes plus importante, décale la bande plasmon vers le visible, ce qui est indicateur de nanoétoiles plus petites ou avec moins de branches. L'affirmation précédente a été confirmée par MET (Figures 14 et 15) ; la synthèse avec la concentration en germes la plus faible (5,20x10¹² germes/l, soit C/20) a produit des AuNS beaucoup plus grandes, avec des cœurs qui dépassent les 200 nm de diamètre et des branches qui se ramifient en plusieurs autres branches (Figure 14A). Leur bande plasmon est localisée à 1194 nm, soit en plein milieu de la deuxième fenêtre biologique du proche infrarouge[11], ce qui en ferait des candidates idéales pour la photothérapie s'il n'y avait deux problèmes majeurs. Le premier est qu'il est très peu probable de pouvoir internaliser des objets si grands (plusieurs centaines de nanomètres par étoile)[12] Le deuxième est la diminution drastique de la stabilité de ces composites par rapport aux AuNS précédemment synthétisées, cette instabilité s'avérant surtout pendant le lavage par centrifugation, car même à basse vitesse (1500 RPM), les AuNS s'agrègent.

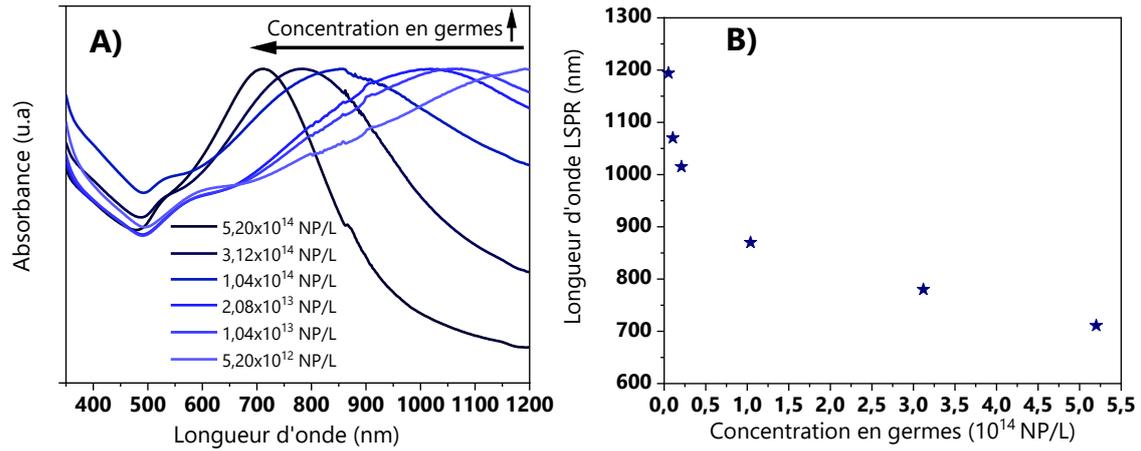


Figure 13: Effet de la concentration en germes sur : **A)** le spectre d'absorbance et **B)** la longueur d'onde de la bande plasmonique

La ramification des branches est aussi présente pour des concentrations de C/10 et C/5 ($1,04 \times 10^{13}$ germes/l et $2,08 \times 10^{13}$ germes/l respectivement). Les AuNS avec la concentration en germes C/10 (Figure 14B) possèdent des cœurs de 109 ± 16 nm et des branches entre 110 et 150 nm pour les plus grandes. Les AuNS avec la concentration en germes C/5 (Figure 14C) ont des cœurs d'approximativement 105 ± 20 nm et des branches qui atteignent des valeurs entre 120 et 140 nm pour les plus grandes.

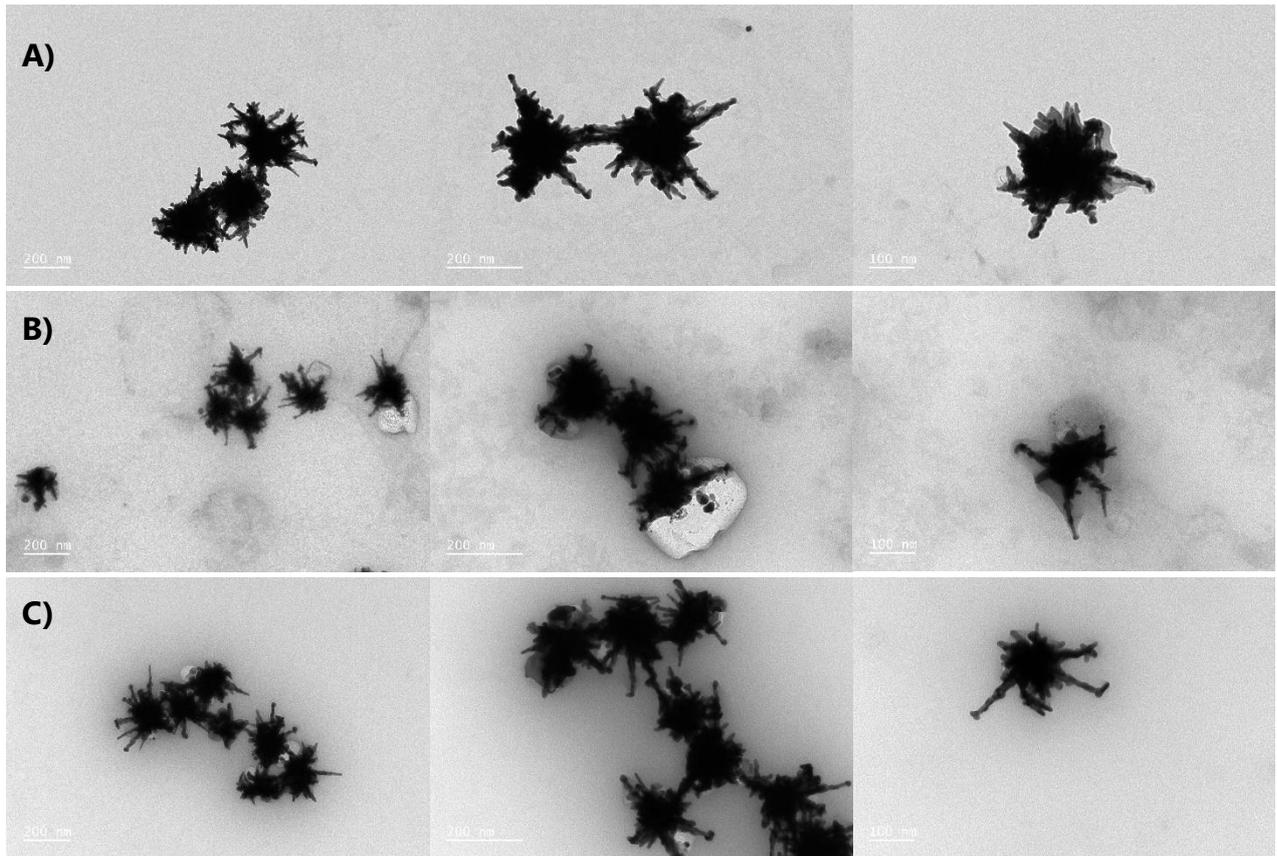


Figure 14: Imagerie MET pour différentes concentrations en germes (inférieures à la concentration standard). A) $5,20 \times 10^{12}$ germes/L, B) $1,04 \times 10^{13}$ germes/L, C) $2,08 \times 10^{13}$ germes/L

La Figure 15A rappelle la morphologie des AuNS synthétisées avec une concentration $C = 1,04 \times 10^{14}$ germes/l et amplement caractérisées ci-dessus. La Figure 15B représente elle des AuNS obtenues avec une concentration en germes égale au triple de la concentration C, soit $3,12 \times 10^{14}$ germes/l. On voit que les nanoétoiles obtenues sont alors beaucoup plus petites, avec des cœurs de 22 ± 4 nm et moins de branches. La plupart d'entre-elles possèdent une voire deux longues branches d'environ 30 à 40 nm, et entre 3 et 5 branches plus courtes de longueurs comprises entre 10 et 20 nm. Il est cependant notable que la bande plasmon reste dans le proche infrarouge, aux alentours de 780 nm, soit dans la même région que les AuNS@ Mo_4Ale_2 décrites au chapitre 3. La Figure 15C, quant à elle, montre des AuNS obtenues avec une concentration en germes 5 fois supérieur à C, c'est-à-dire $5,20 \times 10^{14}$ germes/l. Les nanoétoiles obtenues ont des cœurs de 23 ± 6 nm. La plupart d'entre elles possèdent une seule branche d'environ 25 à 40 nm et entre 3 et 5 branches plus courtes de longueurs comprises entre 10 et 20 nm. Comme attendu, la bande plasmon se décale encore plus vers le visible, mais reste tout de même

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant

peu éloignée de l'IR ($\lambda = 711$ nm). Le Tableau 2 offre un résumé de l'influence de la concentration en germes sur la longueur d'onde de la bande plasmon ainsi que sur la morphologie des AuNS@Mo₈Zol₄. On peut observer que le changement de la concentration initiale en germes, et par conséquent du rapport $\frac{\text{Germes}}{\text{Au}^{3+}}$ permet de moduler la longueur d'onde de la bande plasmon afin de couvrir les deux fenêtres biologiques du proche infrarouge. Les nanoparticules avec la concentration en germes de $1,04 \times 10^{14}$ germes/l et qui ont été amplement caractérisées antérieurement seront utilisées dans des tests de cytotoxicité et comparées aux AuNS@Mo₄Al₂.

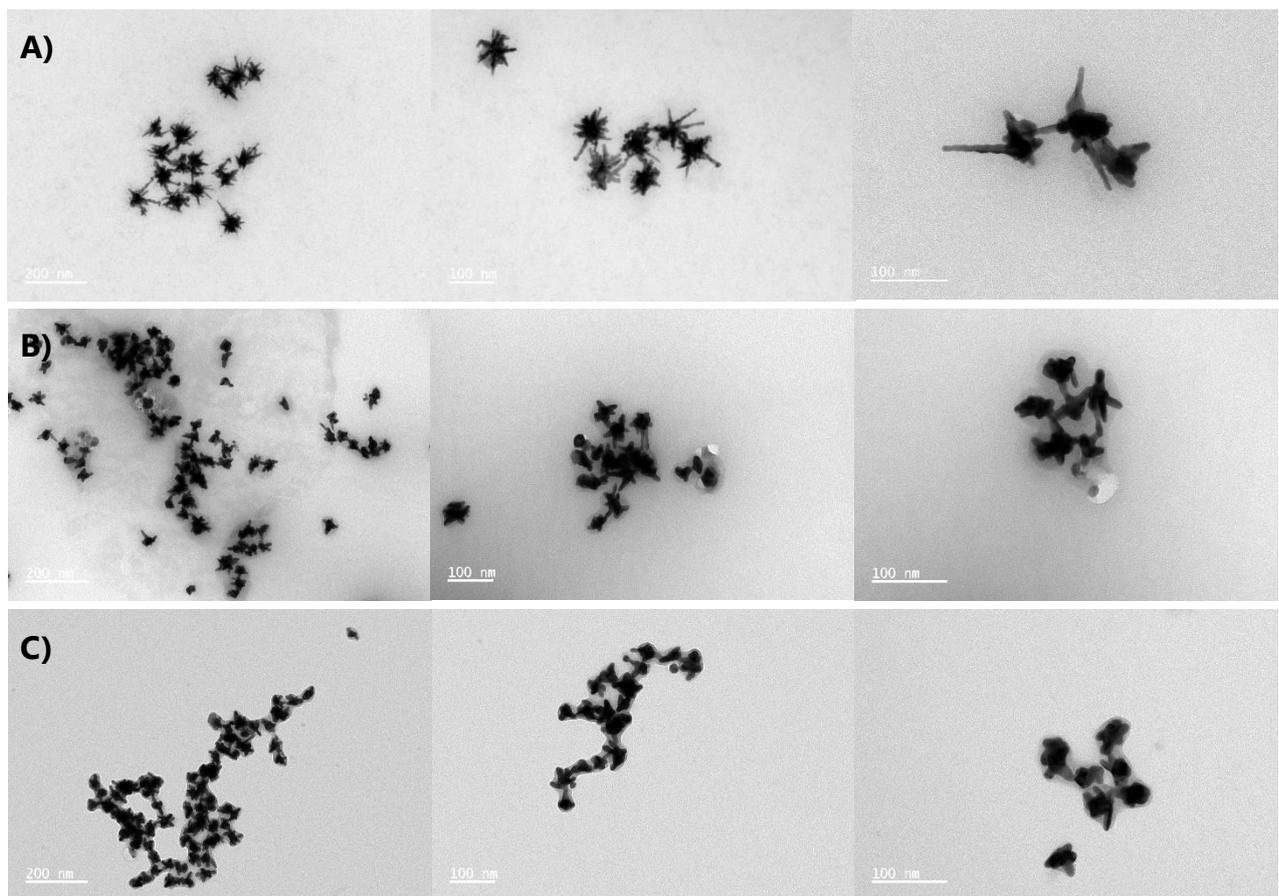


Figure 15: Imagerie MET pour différentes concentrations en germes (égales ou supérieures à la concentration C) : A) $1,04 \times 10^{14}$ germes/L, B) $3,12 \times 10^{14}$ germes/L et C) $5,20 \times 10^{14}$ germes/L.

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant

Tableau 2 : Influence de la concentration en germes sur la bande plasmon et la morphologie des AuNS@Mo₈Zol₄

Concentration en germes (germes/l)	LSPR (nm)	Diamètre du cœur (nm)	Nombre de branche « longues »	Longueur des branches « longues » (nm)	Nombre de branche « courtes »	Longueur des branches « courtes » (nm)	Diamètre de Féret (nm)
5,20x10 ¹²	1194	143 ± 16	~ 5 à 10	~100 à 150	incomptable	~10 à 40	336 ± 70
1,04 x 10 ¹³	1070	109 ± 16	~ 5 à 10	~90 à 140	incomptable	~10 à 40	260 ± 40
2,08x10 ¹³	1015	105 ± 20	~ 5 à 10	~80 à 140	incomptable	~10 à 40	287 ± 52
1,04x10 ¹⁴	870	40 ± 7	~ 2 à 4	~60 à 100	~8 à 13	~10 à 40	125 ± 25
3,12x10 ¹⁴	780	22 ± 4	~1 à 2	~30 à 40	~3 à 5	~10 à 20	59 ± 12
5,20x10 ¹⁴	711	23 ± 6	~1	~25 à 40	~3 à 5	~10 à 20	54 ± 10

3 Tests de cytotoxicité

Les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ ainsi qu'un POM oxydé au zolédronate, le composé Mo_6Zol_2 caractérisé à l'ILV en 2012 [13] ont ensuite été utilisés pour des tests de cytotoxicité à 24 et 120 heures avec une lignée cellulaire non cancéreuse (MCF-10). Le choix d'utiliser le POM Mo_6Zol_2 repose sur le fait qu'il comporte des ligands zolédronate et des centres Mo(VI) (Figure 16) , et présente donc de fortes similarités avec le POM stabilisant les AuNS dans le composite $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$. Cela devrait donc en faire un meilleur élément de comparaison que le composé Mo_8Zol_4 pour évaluer l'effet cytotoxique du POM constituant $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$, car il a été précédemment démontré que l'état d'oxydation du molybdène joue un rôle majeur dans l'activité cytotoxique des polyoxomolybdates hydrides.[2], [13]

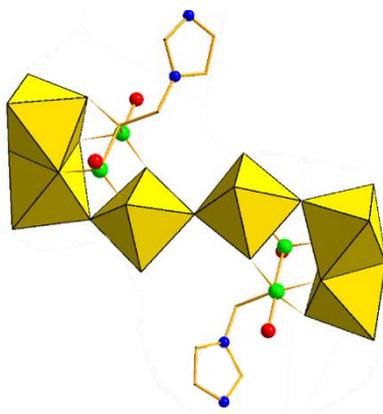


Figure 16: Structure du Mo_6Zol_2 . Octaèdres jaunes = MoO_6 , sphères vertes = P, sphères noires = C, sphères bleues = N

La Figure 17 présente le pourcentage d'activité métabolique des cellules MCF-10 après 24 heures d'incubation avec le POM Mo_6Zol_2 et $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ respectivement. On peut observer une inhibition partielle de l'activité métabolique dès la concentration de $10 \mu\text{M}$ en zolédronate. La concentration la plus élevée, qui correspond à $200 \mu\text{M}$ en zolédronate, inhibe 55% de l'activité métabolique pour le Mo_6Zol_2 et 25% pour les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$. En prenant en compte la haute déviation standard, les tendances de l'inhibition en fonction de la concentration sont similaires, avec une légèrement plus forte inhibition pour le POM seul.

La Figure 18 montre le pourcentage d'activité métabolique des cellules MCF-10 après 120 heures d'incubation avec le Mo_6Zol_2 et les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$. On peut voir une

inhibition de l'activité métabolique même à des concentrations inférieures à $10\ \mu\text{M}$, celle-ci augmentant à mesure que la concentration en zolédronate augmente, allant jusqu'à une inhibition presque totale à $100\ \mu\text{M}$ en zolédronate pour le Mo_6Zol_2 et les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$. Les deux courbes coïncident presque parfaitement, ce qui laisse penser que l'inhibition est uniquement due au POM fonctionnalisé et non aux nanoétoiles en elles-mêmes. Finalement, les IC_{50} à 120 heures sont presque identiques, $22\ \mu\text{M}$ pour le Mo_6Zol_2 et $24\ \mu\text{M}$ pour les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$. Soit entre 2 et 3 fois moins que pour le Mo_6Ale_2 et les $\text{AuNS@Mo}_4\text{Ale}_2$ (Figure 19).

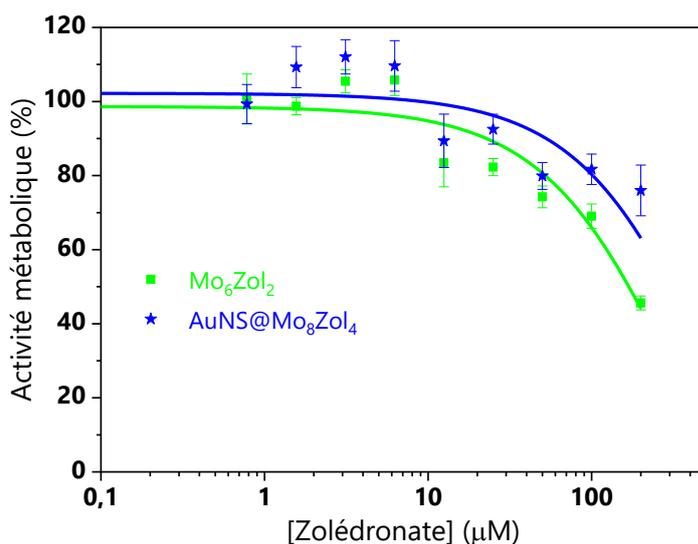


Figure 17: Activité métabolique de la lignée MCF-10 après 24 heures d'incubation avec Mo_6Zol_2 (vert) ou les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ (bleu) à différentes concentrations.

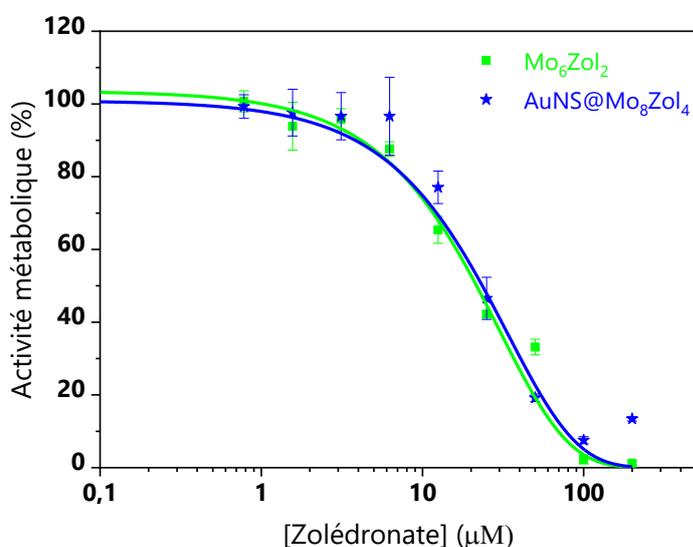


Figure 18 : Activité métabolique de la lignée MCF-10 après 120 heures d'incubation avec Mo_6Zol_2 (vert) ou les $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$ (bleu) à différentes concentrations.

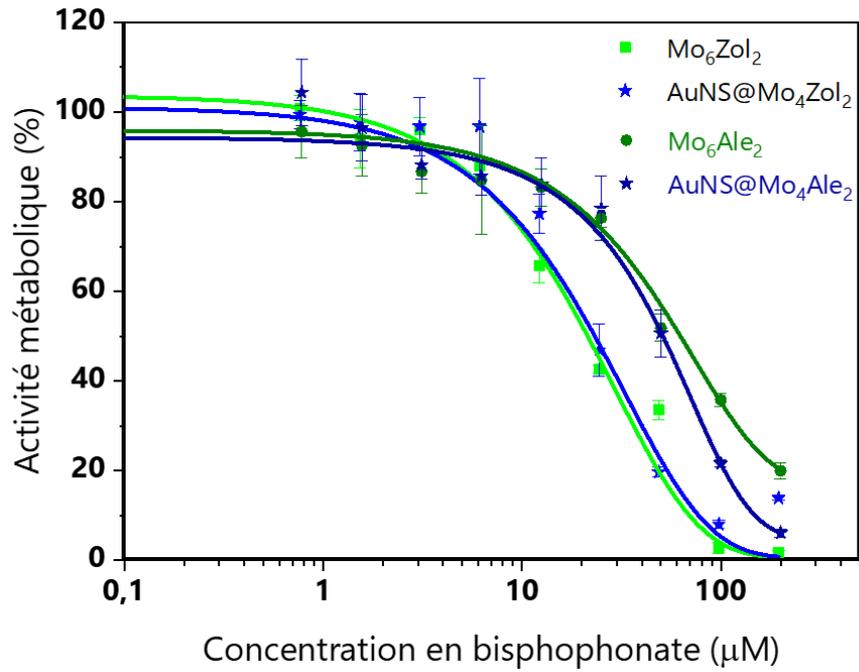


Figure 19: Comparaison de l'effet cytotoxique pour les AuNS@POM et les POM sur des cellules MCF-10 après 120 heures d'incubation en fonction de la concentration en bisphosphonate.

4 Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre montrent l'obtention de AuNS en utilisant un POMo réduit et incorporant le ligand zolédronate, lequel est connu pour son effet anticancéreux bien plus important que l'alendronate utilisé dans le chapitre précédent. La cinétique de la synthèse a été étudiée, montrant une réaction qui débute aussi rapidement que dans le cas de l'utilisation du POM incorporant le ligand alendronate, mais qui met plus de temps à se stabiliser bien que la diminution de la longueur d'onde de la bande plasmon correspondant à la réorganisation des atomes d'or soit beaucoup moins importante (Figure 2).

Dans des conditions analogues, nous avons pu observer pour les deux types de AuNS obtenues la formation de nanoétoiles dont le cœur a le même diamètre, c'est-à-dire approximativement 40 nm. Cependant, dans le cas du composite AuNS@Mo₈Zol₄, les nanoétoiles possèdent généralement 2 à 4 branches plus longues que les autres (entre 60 et 100 nm), ce qui augmente le diamètre maximal de Féret à 125 ± 25 nm (contre 95 ± 15 nm pour les AuNS@Mo₄Al_{e2} qui présentaient des branches de taille plus homogène) et pourrait être responsable du décalage vers l'infrarouge observé pour la bande plasmon (870 nm contre 750 nm pour les AuNS@Mo₄Al_{e2}). Il serait possible que ces longues branches se forment dans les deux cas, mais que la réorganisation des atomes d'or dans l'étape finale de la synthèse des AuNS@Mo₄Al_{e2} contribue à une homogénéisation de la longueur des branches expliquant ainsi le décalage final de la bande plasmon vers le visible.

La présence de POM et de ligand zolédronate à la surface des nanoétoiles après le processus synthétique et le lavage a pu être mis en évidence par différentes techniques de caractérisation comme : ICP-OES, PM-IRRAS, HAADF et STEM-EDS. Cela, ajouté au fait que la bande plasmon soit dans la première fenêtre biologique du proche infrarouge, fait de ces nano-objets des candidats très prometteurs pour la thérapie combinatoire.

La deuxième partie du chapitre démontre, tout comme dans le chapitre précédent, qu'une modulation de la taille des nanoétoiles et donc de la longueur d'onde de la bande

Chapitre 4 : Synthèse de nanoétoiles d'or avec le POMo hybride Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant

plasmon peut être obtenue en modulant le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$, ce qui d'obtenir des AuNS@Mo₈Zol₄ avec des longueurs d'onde pour la bande plasmon comprises entre 710 nm (pour le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$ le plus élevé) et 1194 nm (pour le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$ le plus bas), couvrant totalement la première fenêtre biologique du proche infrarouge ainsi qu'une partie de la deuxième fenêtre biologique. Ces différents types de nanoétoiles ont pu être caractérisés par microscopie électronique. Ceci a permis de révéler que les AuNS synthétisées en considérant le rapport $\frac{Germe}{Au^{3+}}$ le plus bas sont remarquables, présentant des branches ramifiées.

Finalement, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur la lignée cellulaire MCF-10 à 24 heures et 120 heures d'incubation avec les AuNS@Mo₈Zol₄ et comme référence un POM oxydé au zolédronate, le POM Mo₆Zol₂. La similitude des effets inhibiteurs caractérisant ces composés est frappante, suggérant que la cytotoxicité est uniquement due au POM fonctionnalisé et non aux AuNS en elles-mêmes. Par ailleurs, on peut noter que des tests montrent après 120h d'incubation que les composés incorporant du zolédronate, que ce soit des POM ou des nanoparticules, présentent une cytotoxicité plus élevée que leurs analogues incorporant de l'alendronate (Figure 19).

5 References

- [1] A. Saad et al., "Polyoxomolybdate Bisphosphonate Heterometallic Complexes: Synthesis, Structure, and Activity on a Breast Cancer Cell Line," *Chemistry - A European Journal*, vol. 21, no. 29, pp. 10537–10547, Jul. 2015, doi: 10.1002/chem.201406565.
- [2] J. D. Compain et al., "Tetra- to dodecanuclear oxomolybdate complexes with functionalized bisphosphonate ligands: Activity in killing tumor cells," *Chemistry - A European Journal*, vol. 16, no. 46, pp. 13741–13748, 2010, doi: 10.1002/chem.201001626.
- [3] H. El Moll et al., "Tuning the photochromic properties of molybdenum bisphosphonate polyoxometalates," *Inorg Chem*, vol. 51, no. 4, pp. 2291–2302, 2012, doi: 10.1021/ic202299d.
- [4] N. T. Le, T. J. M. Boskovic, M. M. Allard, K. E. Nick, S. R. Kwon, and C. C. Perry, "Gold Nanostar Characterization by Nanoparticle Tracking Analysis," *ACS Omega*, vol. 7, no. 49, pp. 44677–44688, Dec. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c03275.
- [5] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, and L. M. Liz-Marzán, "Nanostars shine bright for you. Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 16, no. 2, pp. 118–127, 2011, doi: 10.1016/j.cocis.2010.12.007.
- [6] Malvern instrument, "Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes."
- [7] H. Liu, N. Pierre-Pierre, and Q. Huo, "Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions," *Gold Bull*, vol. 45, no. 4, pp. 187–195, 2012, doi: 10.1007/s13404-012-0067-4.
- [8] A. L. Siegel and G. A. Baker, "Bespoke nanostars: Synthetic strategies, tactics, and uses of tailored branched gold nanoparticles," *Nanoscale Adv*, vol. 3, no. 14, pp. 3980–4004, 2021, doi: 10.1039/d0na01057j.
- [9] H. Yuan, C. G. Khoury, H. Hwang, C. M. Wilson, G. A. Grant, and T. Vo-Dinh, "Gold

nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 7, 2012, doi: 10.1088/0957-4484/23/7/075102.

[10] C. G. Khoury and T. Vo-Dinh, "Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, no. 48, pp. 18849–18859, Dec. 2008, doi: 10.1021/jp8054747.

[11] A. M. Smith, M. C. Mancini, and S. Nie, "Bioimaging: Second window for in vivo imaging," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 710–711, 2009. doi: 10.1038/nnano.2009.326.

[12] S. H. Wang, C. W. Lee, A. Chiou, and P. K. Wei, "Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images," *J Nanobiotechnology*, vol. 8, Dec. 2010, doi: 10.1186/1477-3155-8-33.

[13] H. El Moll et al., "Polyoxometalates functionalized by bisphosphonate ligands: Synthesis, structural, magnetic, and spectroscopic characterizations and activity on tumor cell lines," *Inorg Chem*, vol. 51, no. 14, pp. 7921–7931, Jul. 2012, doi: 10.1021/ic3010079.

Conclusion générale et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis l'obtention de composites nanoétoiles d'or/polyoxométallates pour la thérapie combinatoire chimiothérapie/photothérapie du cancer. Les nanoétoiles d'or obtenues possèdent une bande plasmon dans le proche infrarouge, facilitant la thérapie photothermique, tandis que les polyoxométallates possèdent des ligands bisphosphonates ayant une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses.

La première partie a consisté à obtenir les précurseurs pour la synthèse en deux étapes de nanoétoiles d'or sans surfactant. Des germes d'or sphériques d'un diamètre de 15 ± 2 nm ont été produits. Les différentes techniques de caractérisation, notamment l'imagerie par MET, ont permis d'identifier le protocole idéal pour obtenir des germes les plus homogènes possible. Des POM hybrides et réduits ont également été synthétisés. Pour cela, il a d'abord été nécessaire de synthétiser les ligands bisphosphonates (alendronate et zolédronate). Ceux-ci ont ensuite été utilisés pour synthétiser les POM réduits, afin de pouvoir les utiliser comme agent réducteur du précurseur d'or grâce au Mo(V), mais aussi comme agent stabilisant des nanoparticules pour exploiter les propriétés anticancéreuses des ligands bisphosphonates. Les POM ont été caractérisés grâce à plusieurs techniques, telles que la spectroscopie infrarouge et la RMN ^{31}P . Les propriétés électrochimiques ont également été explorées, car le potentiel redox des POM obtenus doit être suffisant pour réduire le précurseur d'or en surface des germes, tout en limitant la réduction de celui-ci en solution, ce qui pourrait conduire à la nucléation de nouvelles nanoparticules. Les deux POM ont un potentiel standard supérieur à celui de l'acide ascorbique mais restent cependant dans la région où la réaction est thermodynamiquement favorisée ce qui les rend utilisables pour la synthèse de AuNS.

La deuxième partie a porté sur la synthèse de nanoétoiles d'or en utilisant le POM Mo_4Al_2 comme agent réducteur et stabilisant. La cinétique de synthèse a été étudiée, révélant que la formation de nanoétoiles commence très rapidement avec le décalage

Conclusion générale et perspectives

de la bande plasmon jusqu'à 800 nm après 15 minutes. Cependant, après 30 minutes, la bande plasmon se décale de 50 nm vers le visible, soit jusqu'à 750 nm, ceci est probablement lié à la réorganisation des atomes d'or. Les AuNS@Mo₄Ale₂ ainsi obtenues possèdent un cœur d'approximativement 40 nm de diamètre et de nombreuses branches d'approximativement 35 nm de longueur pour un diamètre maximal de Féret vers 95 nm avec un longueur d'onde de la bande plasmon de 750 nm. Cette bande a pu être modulée entre 750 et 1070 nm, couvrant ainsi la totalité de la première fenêtre du proche infrarouge ainsi qu'une partie de la deuxième. La présence du POM ainsi que du ligand alendronate à la surface des nanoétoiles a été confirmée par ICP-OES (rapport $\frac{Ale}{Au}$ de $1,3 \pm 0,4$), STEM-EDX et PM-IRRAS. Ensuite, la cytotoxicité des AuNS@Mo₄Ale₂ a été testée à 24 et 120 heures sur une lignée cellulaire non cancéreuse (MCF-10) et sur deux lignées cancéreuses (U-87 et MCF-7). Dans les tests à 24 heures, l'effet cytotoxique des AuNS@Mo₄Ale₂ est uniquement visible aux concentrations les plus élevées (> 50 µM). Cependant, pour les tests à 120 heures, l'effet cytotoxique est beaucoup plus intense, étant visible dès 5 µM. Enfin, les cellules cancéreuses incubées avec les AuNS@Mo₄Ale₂ ont été soumises à une irradiation laser dans le proche infrarouge (808 nm). La combinaison de l'effet chimiothérapique avec l'effet photothermique a permis d'obtenir une inhibition encore plus importante et une diminution dramatique de l'IC₅₀. Pour les tests sur U-87 à 24 heures, l'IC₅₀, qui n'a pas pu être déterminé sans irradiation car il est supérieur à la concentration maximale testée, est de 47 µM. Pour les tests à 120 heures, l'IC₅₀ avec irradiation est de 6 µM pour les U-87 (contre 32 µM sans irradiation) et de 7 µM pour les MCF-7 (contre 76 µM sans irradiation).

Enfin, la dernière partie de ces travaux de thèse a porté sur l'obtention et la caractérisation de nanoétoiles d'or en utilisant le POM Mo₈Zol₄ comme agent réducteur et stabilisant. Les AuNS@Mo₈Zol₄ ainsi obtenues possèdent un cœur de même taille que les AuNS@Mo₄Ale₂ (40 nm de diamètre) mais se différencient par une plus importante hétérogénéité de la taille des branches. En effet, bien que la plupart d'entre elles soient de taille comparable avec les branches des AuNS@Mo₄Ale₂, celles-ci possèdent généralement entre deux et quatre branches beaucoup plus longues (entre 60 et 100 nm) ce qui augmente le diamètre maximal de Féret jusqu'à 125 nm (95 nm pour les

Conclusion générale et perspectives

AuNS@Mo₄Al₂) et déplace la longueur d'onde de la bande plasmon à 870 nm (contre 750 nm pour les AuNS@Mo₄Al₂).

La bande plasmon des AuNS@Mo₈Zol₄ a pu être modulée entre 711 et 1194 nm, ce qui permet cette fois de couvrir complètement les deux fenêtres biologiques du proche infrarouge. La présence du POM ainsi que du ligand zolédronate à la surface des nanoétoiles a été confirmée par ICP-OES (rapport $\frac{Zol}{Au}$ de $0,8 \pm 0,4$), STEM-EDX et PM-IRRAS.

La cinétique de synthèse possède deux différences notables, la première est que le décalage de la bande plasmon vers le visible due à la réorganisation des atomes d'or dans l'étape finale de la synthèse est moins important (approximativement de 10 nm au lieu de 50 nm). La deuxième différence est que le temps nécessaire pour obtenir une bande plasmon stable est de 3 heures au lieu de 2. Cette diminution de la réorganisation des atomes d'or sur les AuNS@Mo₈Zol₄ déjà formées observée par spectroscopie est en accord avec leur morphologie finale, montrant certaines branches beaucoup plus longues que d'autres, contrairement aux AuNS@Mo₄Al₂ où la réorganisation atomique permet une meilleure homogénéisation de la taille des branches. L'unique différence entre les deux synthèses est le POM utilisé, il est donc probablement responsable de ces différences de cinétiques et de morphologies. Il serait possible que ce soit lié aux différences de propriétés redox de ces POM, pouvant influencer la réduction du sel d'or. Cependant, il est plus probable que cela soit dû à une différence dans l'adsorption des POM, ce qui changerait la diffusion des atomes d'or sur les nanoétoiles à la fin de la synthèse, conférant, dans le cas des AuNS@Mo₈Zol₄ une résistance accrue à la migration des atomes d'or.

Enfin, des tests de cytotoxicité préliminaires sur MCF-10 ont été réalisés, à nouveau à 24 et 120 heures. La cytotoxicité des AuNS@Mo₈Zol₄ s'est révélée plus importante que celle des AuNS@Mo₄Al₂, ce qui pourrait être dû à l'activité biologique plus importante du ligand zolédronate. Cependant, à ce jour, aucun test n'a été réalisé sur des cellules cancéreuses ni en combinant avec la photothérapie (irradiation laser).

Conclusion générale et perspectives

Les autres travaux de recherche qui s'ouvrent à la fin de cette thèse incluent, entre autres, l'utilisation de différents POM réduits, par exemple le Mo_4Ris_2 , pour l'obtention de différents nanocomposites. À titre exploratoire, une synthèse a déjà été réalisée, permettant d'obtenir des nanoétoiles avec une bande plasmon à 830 nm, soit entre la longueur d'onde de la bande plasmon des $\text{AuNS@Mo}_4\text{Al}_2$ et des $\text{AuNS@Mo}_8\text{Zol}_4$.

Il serait également intéressant de lier de nouvelles molécules au POM réduit, par exemple des aptamères, pour faciliter le ciblage de cellules cancéreuses, ou encore de molécules qui, sous irradiation dans le proche infrarouge, pourraient produire de l'oxygène singulet comme certains pigments.

Après cela, des tests *in vivo* pourront être réalisés avec les différents nanocomposites. En raison de la forte affinité des bisphosphonates avec les os, il serait fondamental de connaître la distribution des AuNS@POM à l'intérieur du corps et de déterminer le temps de permanence de celles-ci ainsi que les voies d'élimination, ou le cas échéant, de déterminer l'innocuité à long terme.

Matériels et méthodes

1 Synthèse des germes

1.1 Germes (GA) selon la référence Yuan *et al.* (2012)

Le premier protocole que nous avons testé est celui décrit par Yuan *et al.* (2012)[1], il permet d'obtenir des AuNP sphériques avec une concentration en Or de 0,87 mM :

- Préparer 15 mL d'une solution de citrate de Sodium 1% et préchauffer approximativement à 60°C.
- Dans un ballon de 250 mL verser 90 mL d'eau ultra pure et 10 mL de H_{AuCl}₄ 10 mM et chauffer à 100°C à reflux.
- Sous agitation continue, ajouter la solution de citrate dans la solution d'or attendre 15 min.
- La solution se colore en noir puis rouge bordeaux.

La solution colloïdale peut être stockée dans un flacon en verre ambré à 4°C

1.2 Germes (GB) selon la référence Zabetakis *et al.* (2012)

1.2.1 GB1

Le suivant protocole pour la synthèse des germes (GB1) se base sur la publication de Zabetakis *et al.* (2012).[2] Il permet de produire des germes sphériques avec une concentration en or de 0,3 mM.

- Dans un ballon de 25 mL verser 14,5 mL d'eau ultra pure et 450 µL de H_{AuCl}₄ 10 mM sous agitation. Puis chauffer à 100°C.
- Ajouter 106 µL d'une solution aqueuse de citrate de sodium 5%. La solution vire d'abord au noir puis au rose.
- Dix minutes après avoir ajouté le citrate de sodium, refroidir la solution dans un bain de glace.

1.2.2 GB2

Le suivant protocole pour la synthèse des germes (GB2) permet de produire des germes sphériques avec une concentration en or de 0,6 mM.

- Dans un ballon de 25 mL verser 13,9 mL d'eau ultra pur et 900 µL de H_{AuCl}₄ 10 mM sous agitation. Puis chauffer à 100°C.
- Ajouter 212 µL d'une solution aqueuse de citrate de sodium 5%. La solution vire d'abord au noir puis au rose.
- Dix minutes après avoir ajouté le citrate de sodium, refroidir la solution dans un bain de glace.

1.3 Germes (GC) selon la référence Sivaraman *et al.* (2011)

Le suivant protocole pour la synthèse des germes GC est basé sur la publication de Sivaraman *et al.* (2011).[3] La principale différence est que, contrairement aux méthodes antérieures, dans ce cas c'est le précurseur d'or concentré qui est ajouté à l'agent réducteur. Il permet d'obtenir des germes sphériques avec une concentration en Or de 0.3 mM.

- Dans un ballon de 25 mL verser 14,4 mL d'eau ultrapure et 106 µL d'une solution aqueuse de citrate de sodium 5%. Chauffer à 100 °C sous agitation.
- Ajouter 450 µL d'une solution aqueuse H₂AuCl₄ 10 mM. La solution vire d'abord au noir puis au rose.
- Après 7 minutes d'avoir ajouté l'H₂AuCl₄, la solution est refroidie dans un bain de glace.

1.4 Germes (GD) selon la référence Ben Haddada *et al.* (2016)

1.4.1 GD1

Un quatrième protocole pour la synthèse des germes a été testé, celui décrit par Ben Haddada *et al.* (2016).[4] (**GD1**) Il permet de produire des germes sphériques avec une concentration en or de 0,29 mM

- Dans un ballon de 250 mL, verser 77 mL d'eau ultra pure et 3 mL d'une solution aqueuse de H₂AuCl₄ 10 mM. Préchauffer à 60°C sous agitation.
- Dans une fiole jaugée de 20 mL, verser 4 mL d'une solution aqueuse de citrate de sodium 1% et 25 µL d'acide tannique 1%. Compléter avec de l'eau ultra pure. Préchauffer à 60°C.
- Verser le contenu de la fiole dans le ballon sous agitation ; quand la solution tourne au rouge, monter la température jusqu'à 95°C à reflux.
- Après 16 minutes à 95°C retirer le ballon et refroidir dans un bain de glace pour arrêter la réaction.

La solution colloïdale peut être stockée dans un flacon en verre ambré à 4°C.

1.4.2 GD2

Un cinquième protocole pour la synthèse des germes a été testé, en multipliant la concentration des réactifs de GD1 par 3.

- Dans un ballon de 250 mL, verser 71 mL d'eau ultra pure et 9 mL d'une solution aqueuse de H₂AuCl₄ 10 mM. Préchauffer à 60°C sous agitation.
- Dans une fiole jaugée de 20 mL, verser 12 mL d'une solution aqueuse de citrate de sodium 1% et 75 µL d'acide tannique 1%. Compléter avec de l'eau ultra pure.

Matériels et méthodes

Préchauffer à 60°C.

- Verser le contenu de la fiole dans le ballon sous agitation ; quand la solution tourne au rouge, monter la température jusqu'à 95°C à reflux.
- Après 16 minutes à 95°C retirer le ballon et refroidir dans un bain de glace pour arrêter la réaction.

La solution colloïdale peut être stockée dans un flacon en verre ambré à 4°C.

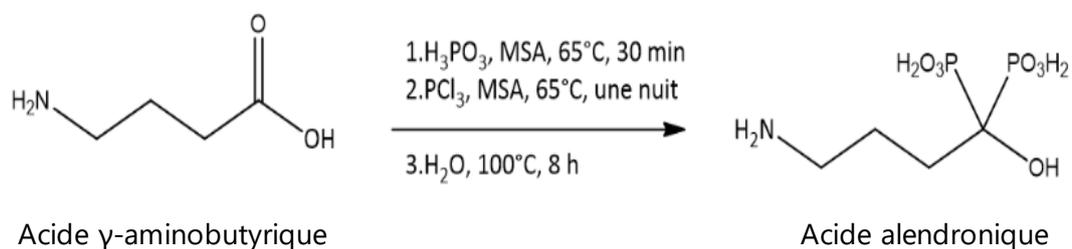
2 Synthèse des polyoxométallates hybrides

2.1 Synthèse du polyoxomolybdate hybride Mo_4Ale_2

2.1.1 Synthèse du ligand alendronate

L'acide alendronique $\text{H}_2\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2)(\text{OH})\text{PO}_3\text{H}_2$ (Ale) a été synthétisé comme décrit précédemment par Kubíček *et al.*[5]

L'acide γ -aminobutyrique (8,80 g, 85,4 mmol) et l' H_3PO_3 (7,0 g, 85,4 mmol) ont été dissous dans de l'acide méthanesulfonique (MSA, 33 ml) et chauffés à 65 °C pendant 30 minutes. Le PCl_3 (15,70 ml, 180 mmol) a été ajouté goutte à goutte avec agitation vigoureuse et le mélange a été chauffé à 65 °C pendant la nuit. La solution résultante a été versée dans de l'eau (150 ml) et le mélange a été refluxé pendant 8 heures. Après refroidissement à température ambiante, 350 ml d'éthanol ont été ajoutés. Après 12



heures, les cristaux ont été collectés par filtration, lavés à l'eau et à l'éthanol. Rendement : 61% (13 g, 52,2 mmol, 249 g.mol⁻¹). RMN du $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (300 MHz, D_2O) : $\delta = 19,2$ (s) ppm.

2.1.2 Synthèse du POM hybride

Préparation d'une solution de $[\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_6]_2^{2+}$: L'hydrate d'hydrazine $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (220 mg, 4,40 mmol) a été ajouté à une suspension de MoO_3 (1,15 g, 8,0 mmol) dans du HCl aqueux (4 M, 40 mL). Le mélange a ensuite été agité à 60 °C pendant 3 heures, et la solution résultante (d'un rouge profond) (0,1 M) a été laissée refroidir à température ambiante avant toute utilisation ultérieure.

Synthèse du $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}_2]_4[\text{Mo}_4\text{O}_8(\text{O}_3\text{PC}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_3)\text{OPO}_3)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Mo_4Ale_2)

L'acide alendronique (0,250 g, 1 mmol) a été dissous dans 10 mL de la solution aqueuse de $[\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (0,1 M, 10 mL, 1 mmol). De la diéthylamine a été ajoutée goutte à

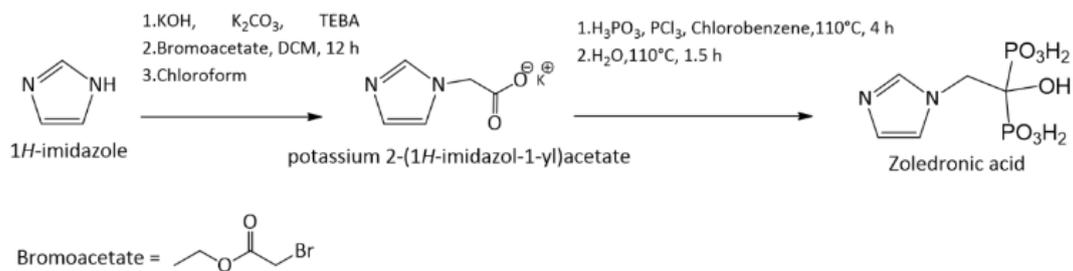
goutte jusqu'à atteindre un pH de 7. La solution résultante d'un rouge profond a été filtrée et laissée évaporer à température ambiante. De petits cristaux rouges ont été collectés par filtration 2 à 3 jours plus tard (0,246 g, 56 % basé sur Mo).

2.2 Synthèse du polyoxomolybdate hybride Mo_8Zol_4

2.2.1 Synthèse du ligand zolédronate

La synthèse a été adaptée à partir de procédures rapportées dans la référence[6]. Dans une solution de dichlorométhane (DCM) de 500 mL, imidazole (13,6 g, 200 mmol), hydroxyde de potassium (13,6 g, 240 mmol), K_2CO_3 anhydre (27,2 g, 200 mmol) et TEBA (chlorure de benzyltriéthylammonium, 0,3 g, 1 mmol) ont été ajoutés. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 30 minutes. Après refroidissement à 10°C , 16,8 mL (150 mmol) de bromoacétate d'éthyle ont été ajoutés goutte à goutte avec agitation. Après repos à température ambiante pendant toute la nuit, le mélange a été filtré et le solvant du filtrat a été évaporé sous vide pour obtenir un liquide jaune. À ce liquide, 200 mL d'eau ont été ajoutés et le mélange a été agité pendant 12 h à température ambiante. Le solvant a été évaporé sous vide et un grand volume de chloroforme a été ajouté au résidu, ce qui a entraîné la précipitation de l'acide 1H-imidazole-1-acétique sous forme de poudre blanche qui a été isolée par filtration avec un rendement de 12% (3,90 g, 24 mmol, Masse molaire : $164,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ce dernier a été dissous avec H_3PO_3 (4,06 g, 50 mmol) dans 13 mL de chlorobenzène en chauffant à 110°C . Le mélange a été refroidi à température ambiante et PCl_3 (2,88 mL, 33 mmol) a été ajouté goutte à goutte avant de chauffer à nouveau à 110°C pendant 4 h. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante et 27 mL d'eau ont été ajoutés lentement avant de chauffer à 110°C pendant 1,5 h. Le mélange a été refroidi à température ambiante et filtré. Le solvant du filtrat a été évaporé sous vide et 85 mL de méthanol ont été ajoutés au résidu, ce qui a entraîné la précipitation. Cette suspension a été chauffée à reflux pendant 16 h, puis filtrée à chaud. La poudre blanche résultante a été lavée avec de l'éthanol et de l'éther diéthylique. Rendement : 34% (1,84 g, 6,7 mmol, Masse molaire : $272,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Matériels et méthodes



2.2.2 Synthèse du POM hybride

136 mg (0,5 mmol) d'acide zolédronique sont introduits dans 5 mL de Mo₂O₄ et la suspension est agitée 5 min. Le pH est augmenté à 6,8 avec du NaOH 4 M et le mélange est agité pendant 5 min à température ambiante le temps de stabiliser le pH. Le solide marron est filtré, lavé à l'éthanol et séché à l'éther. Une masse de 320 mg est obtenue. La RMN ³¹P est discutée dans le texte.

3 Synthèse des composites AuNS@POM

3.1 Synthèse des composites AuNS@Mo₄Ale₂

Dans un ballon de 25 ml verser 4,5 mL d'eau milli-Q puis 250 microlitres de H₂AuCl₄ 10 mM. Placez le ballon dans un bain de glace et ajouter un barreau aimanté, en agitant à 600 RPM. Attendez 10 minutes que la température soit en équilibre. Verser 100 microlitres de HCl 0,1 M, puis attendre 5 minutes pour homogénéiser. Ensuite, verser :

- 300 microlitres de germes (0,3 mM).
- 30 secondes plus tard, 100 microlitres de AgNO₃ 4 mM.
- 20 secondes plus tard, 50 microlitres de Mo₄Ale₂ 100mM.
- Attendre 2 h sous agitation.

Le lavage est réalisé par centrifugation de la façon suivante :

La solution (5 mL) est versée dans un tube en verre et centrifugée pendant 13 minutes à 2200 RPM. Le surnageant bleu clair est transféré dans un deuxième tube en verre pour un nouveau cycle de centrifugation dans les mêmes conditions. Le surnageant du deuxième cycle est presque translucide et contient très peu de nanoétoiles, il est donc rejeté. La partie inférieure dans les deux cycles est d'un bleu très intense dû à la haute concentration en AuNS, les deux fractions sont réunies dans un seul tube et de l'eau ultra pure est rajouté jusqu'à obtenir un volume total de 2,5 mL. Finalement, les AuNS sont stockées au froid et à l'abri de la lumière.

3.2 Synthèse des composites AuNS@Mo₈Zol₄

Dans un ballon de 25 ml verser 4,5 mL d'eau milli-Q puis 250 microlitres de H₂AuCl₄ 10 mM. Placez le ballon dans un bain de glace et ajouter un barreau aimanté, en agitant à 600 RPM. Attendez 10 minutes que la température soit en équilibre. Ajouter 100 microlitres de HCl 0,1 M, puis attendez 5 minutes pour homogénéiser. Ensuite, verser :

- Versez 300 microlitres de germes (0,3 mM).
- 30 secondes plus tard, versez 100 microlitres de AgNO₃ 4 mM.
- 20 secondes plus tard, versez 50 microlitres de Mo₈Zol₄ 50mM (préalablement chauffé à 80°C pour dissoudre puis refroidit à température ambiante.)
- Attendre 3 h sous agitation.

Le lavage est réalisé par centrifugation de la façon suivante :

Matériels et méthodes

La solution (5 mL) est versée dans un tube en verre et centrifugée pendant 15 minutes à 2500 RPM. Le surnageant bleu clair est transféré dans un deuxième tube en verre pour un nouveau cycle de centrifugation dans les mêmes conditions. Le surnageant du deuxième cycle est presque translucide et contient très peu de nanoétoiles, il est donc rejeté. La partie inférieure des deux cycles est bleu-gris très intense dû à la haute concentration en AuNS, les deux fractions sont réunies dans un seul tube et de l'eau ultra pure est rajouté jusqu'à obtenir un volume total de 2,5 mL. Finalement, les AuNS sont stockées au froid et à l'abri de la lumière.

4 Techniques de caractérisation

Spectroscopie UV-Visible

Les spectres d'absorption électronique ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer Lambda-750 en utilisant des cellules en quartz de 2 mm d'épaisseur, la longueur d'onde sélectionnée est de 250 à 1200 nm.

Spectroscopie infrarouge

FT-IR : Les spectres FT-IR des POM et des ligands bisphosphonates (en poudre) ont été enregistrés sur un Nicolet ATR 6700 FT

PM-IRRAS : Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Nicolet de ThermoFisher en déposant 200 μ L de solution colloïdale sur une surface d'or et en laissant sécher pendant 2 heures à 30°C.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et ζ -potential

Les mesures ont été réalisées à 25°C sur un Malvern Zetasizer Nano ZS en triplicat pour chaque mesure.

Microscopie électronique en transmission (MET) et STEM-EDS

L'acquisition des images TEM a été réalisée sur un JEOL JEM 1011 avec une tension d'accélération de 100 kV. Les grilles ont été préparées en déposant 10 μ L de la suspension colloïdale sur une grille en cuivre couverte de carbone et sécher à température ambiante. Les distributions de tailles ont été obtenues en utilisant le logiciel ImageJ.

Les mesures de microscopie électronique en transmission à haute résolution (HR-TEM) ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL 2100Plus UHR fonctionnant à 200 kV. Des images de microscopie électronique en transmission par balayage (STEM) utilisant un détecteur à grand angle d'obscurité (HAADF) ont également été acquises. Le mode STEM couplé à la spectroscopie de dispersion d'énergie des rayons X (XEDS) a été utilisé pour effectuer la cartographie élémentaire. L'analyse XEDS a été réalisée avec un détecteur

Matériels et méthodes

SDD Oxford Instrument de 80 mm². Les spectres de rayons X ont été enregistrés et traités avec le logiciel Aztec. Les distributions de tailles des nanoparticules ont été calculées en mesurant un minimum de 200 particules à l'aide du logiciel ImageJ. Pour l'imagerie MET des échantillons cellulaires, après incubation avec les nanoparticules, les cellules ont été détachées avec de la trypsine et fixées dans du glutaraldéhyde à 5% dilué dans un tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 heure, puis lavées avec un tampon cacodylate. Les échantillons ont ensuite été contrastés avec du tampon à extrait de thé Oolong (OTE), suivis d'une post-fixation avec 1% d'oxyde d'osmium et 1,5% de cyanoferrate de potassium. Une série de bains de déshydratation, de 30% à 100%, a ensuite été réalisée avant d'incorporer les culots cellulaires dans des résines époxy. Les résines ont finalement été sectionnées (70 nm), et les sections ont été placées sur des grilles en cuivre pour observation avec un microscope électronique à transmission Hitachi HT 7700 fonctionnant à une tension d'accélération de 80 kV.

Les grilles de cryo-TEM ont été préparées en déposant 10 µL de solution colloïdale sur une grille en cuivre revêtue de carbone et en les gelant par immersion dans de l'éthane liquide, puis l'excès a été retiré. Les mesures ont été réalisées dans un microscope JEOL JEM-2100 fonctionnant à une tension d'accélération de 100 kV.

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

Les contenues en P, Mo, Ag, et Au ont été mesurés par ICP-OES en utilisant un Agilent Technologies 700 Series. Pour cela 0,5 mL de chaque échantillon a été mélangé avec 0,5 mL d'un mélange HCl 2:1 HNO₃. Après 4 heures de chauffage à 80°C et 20 heures à température ambiante, les échantillons ont été dilués en rajoutant 6 mL d'eau ultra pure.

Pour les cellules, après avoir retiré le surnageant, 200 µL du même mélange HCl:HNO₃ a été ajouté à chaque plaque et chauffés à 80°C pendant 4 heures, puis laissés 20 heures à température ambiante. Le jour suivant, chaque échantillon a été mélangé avec de l'eau ultrapure pour obtenir un volume total de 4 mL.

Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ³¹P ont été enregistré sur un Bruker AC-300 opérant à 121,5 MHz. Les

déplacements chimiques sont référenciés par rapport a un standard externe, 85% H₃PO₄.

Spectroscopie photoélectronique X (XPS)

Les analyses XPS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre photoélectronique à rayons X Omicron Argus, équipé d'une source de rayonnement AlK α monochromatisée ($h\nu = 1486,6$ eV) et d'une puissance de faisceau électronique de 280 W. L'émission de photoélectrons à partir de l'échantillon a été analysée à un angle de décollage de 45° dans des conditions de vide ultra-élevé ($\leq 10^{-9}$ mbar). Les énergies de liaison ont été calibrées par rapport à l'énergie de liaison C1s (C-C) à 284,8 eV et les intensités des pics des éléments ont été corrigées par des facteurs de Scofield. Les aires des pics ont été déterminées après soustraction d'un fond Shirley. Les spectres ont été ajustés à l'aide du logiciel Casa XPS v.2.3.15 (Casa Software Ltd, Royaume-Uni) en appliquant des fonctions gaussiennes-lorentziennes (70%/30%).

Voltammétrie des POM

La voltammétrie cyclique a été réalisée sur une solution de POM avec une concentration en Mo(V) de 16 mM en utilisant une électrode en platine comme électrode de travail et avec comme référence une électrode au calomel saturé (ECS). Le solvant est une solution de NaCl 0,5 M avec pH = 5,5. La vitesse de balayage est de 10 mv/s.

Tests de cytotoxicité

Les nanoparticules ont été internalisées par les cellules U87 et MCF7 dans une plaque à 96 puits pendant 5 jours et avec les cellules U87 pendant 24 heures. Six conditions ont été comparées. Premièrement, les cellules ont été maintenues en culture pendant 24 heures ou 5 jours comme condition témoin. Deuxièmement, le milieu de culture a été enrichi en molécules d'alendronate, avec des concentrations variant de 0,24 μ M à 4 mM. Troisièmement, le milieu de culture a été enrichi en Mo₄Al_e₂ à des concentrations comprises entre 1 μ M et 1,5 mM d'alendronate. Quatrièmement, le milieu de culture a été enrichi en Mo₆Al_e₂ à des concentrations comprises entre 0,24 μ M et 1,5 mM d'alendronate. Cinquièmement, le milieu de culture a été enrichi en AuNS@Mo₄Al_e₂ à des concentrations comprises entre 0,48 μ M et 0,25 mM d'alendronate. Enfin, les cellules

supplémentées avec AuNS@ Mo₄Al₂ ont été exposées à un laser de 808 nm à 1,7 W/cm² pendant 5 minutes. Dans une étude précédente menée par certains d'entre nous, cette puissance laser de 1,7 W/cm² s'est avérée efficace pour induire une inhibition de la croissance tumorale in vivo sans présenter de phototoxicité non spécifique.[7] De plus, cette valeur est inférieure à la puissance utilisée dans de nombreuses études in vivo.[8], [9], [10]

Après 24 heures ou 5 jours, le milieu de culture a été remplacé par 200 µL de RPMI sans rouge de phénol, supplémenté de 10% d'Alamar Blue. Après 2 heures, la plaque a été analysée avec un lecteur de plaque multimode (Enspire Perkin Elmer) à une longueur d'onde d'excitation de 570 nm et une détection de fluorescence à 585 nm. L'activité métabolique a été déterminée par comparaison avec les cellules témoins.

Ajustements de l'activité métabolique :

Tous les ajustements sont effectués à l'aide d'un algorithme de Levenberg-Marquardt pour représenter le modèle DoseResp[11] avec une pente de Hill variable (p) disponible dans le logiciel OriginPro, présenté dans l'équation 1.

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(Log x_0 - x)p}} \quad (1)$$

A1 représente l'asymptote inférieure, représentant l'efficacité maximale du médicament avec une "concentration infinie", tandis que A2 est l'asymptote supérieure qui représente l'activité sans traitement. Log x₀ est le logarithme de la concentration lorsque l'activité métabolique est la moitié de l'activité maximale. x est la variable indépendante de l'ajustement (-9.0, -2.4) correspond au logarithme de la concentration du médicament en mol/L. y est la variable dépendante [0,100] : pourcentage d'activité métabolique. p est la pente de Hill variable. Pour p>0, l'activité métabolique est stimulée par le médicament et pour p<0, elle est inhibée. |p|>1 indique une pente plus abrupte.

5 Références

- [1] H. Yuan, C. G. Khoury, H. Hwang, C. M. Wilson, G. A. Grant, and T. Vo-Dinh, "Gold nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 7, 2012, doi: 10.1088/0957-4484/23/7/075102.
- [2] K. Zabetakis, W. E. Ghann, S. Kumar, and M. C. Daniel, "Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich-Frens method," *Gold Bull*, vol. 45, no. 4, pp. 203–211, 2012, doi: 10.1007/s13404-012-0069-2.
- [3] S. K. Sivaraman, S. Kumar, and V. Santhanam, "Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The role of chloroauric acid," *J Colloid Interface Sci*, vol. 361, no. 2, pp. 543–547, 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.015.
- [4] M. Ben Haddada et al., Gold nanoparticles assembly on silicon and gold surfaces: Mechanism, stability, and efficiency in diclofenac biosensing, vol. 120, no. 51. 2016. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10322.
- [5] V. Kubiček, J. Kotek, P. Hermann, and I. Lukeš, "Aminoalkylbis(phosphonates): Their complexation properties in solution and in the solid state," *Eur J Inorg Chem*, no. 2, pp. 333–344, 2007, doi: 10.1002/ejic.200600615.
- [6] S. TOMANE, "Synthèse et caractérisation de composites polyoxométallates / nanoparticules métalliques pour des applications biomédicales," 2021.
- [7] A. Plan Sangnier et al., "Targeted thermal therapy with genetically engineered magnetite magnetosomes@RGD: Photothermia is far more efficient than magnetic hyperthermia," *Journal of Controlled Release*, vol. 279, pp. 271–281, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.04.036.
- [8] E. B. Dickerson et al., "Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice," *Cancer Lett*, vol. 269, no. 1, pp. 57–66, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.026.
- [9] G. Von Maltzahn et al., "Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas," *Cancer Res*, vol. 69, no. 9, pp. 3892–3900, May 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4242.

[10] Y. Feng et al., "Differential photothermal and photodynamic performance behaviors of gold nanorods, nanoshells and nanocages under identical energy conditions," *Biomater Sci*, vol. 7, no. 4, pp. 1448–1462, Apr. 2019, doi: 10.1039/c8bm01122b.

[11] G. Jones, "Fitting and handling dose response data," *J Comput Aided Mol Des*, vol. 29, no. 1, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1007/s10822-014-9752-0.