

## 4. Développement de nano-véhicules plasmoniques pour le relargage contrôlé de médicaments en milieu biologique

### 4.1 Nanobâtonnets d'or

#### 4.1.1 Protocoles de synthèse

Au cours du projet, deux protocoles de synthèse ont été utilisés pour obtenir des nanobâtonnets de taille contrôlée avec un ratio d'aspect variant de 2,0 à 5,8. Le premier protocole, tiré de la littérature,<sup>76</sup> est schématisé à la figure 4.1 et décrit de manière détaillée à l'annexe 1. Il s'agit d'une synthèse par croissance contrôlée de germes assistée par l'argent en trois étapes. Tout d'abord, des germes sont formés par réduction rapide d'un sel d'or par du borohydrure de sodium dans une solution concentrée de CTAB (100 mM). Une particularité de cette méthode est l'ajout de bromure de potassium pour obtenir un ratio molaire KBr:CTAB de 1:10. Le bromure de potassium a pour rôle de doper le milieu réactionnel en ions Br<sup>-</sup> afin de diminuer l'impact des ions chlorure et des ions iodure en solution. À titre d'exemple, le CTAB disponible commercialement contient habituellement une faible concentration en I<sup>-</sup> qui varie d'un fournisseur et d'un lot à l'autre, et cette espèce empoisonne la croissance anisotrope des nanoparticules en plus de diminuer la reproductibilité de la synthèse.<sup>99</sup>

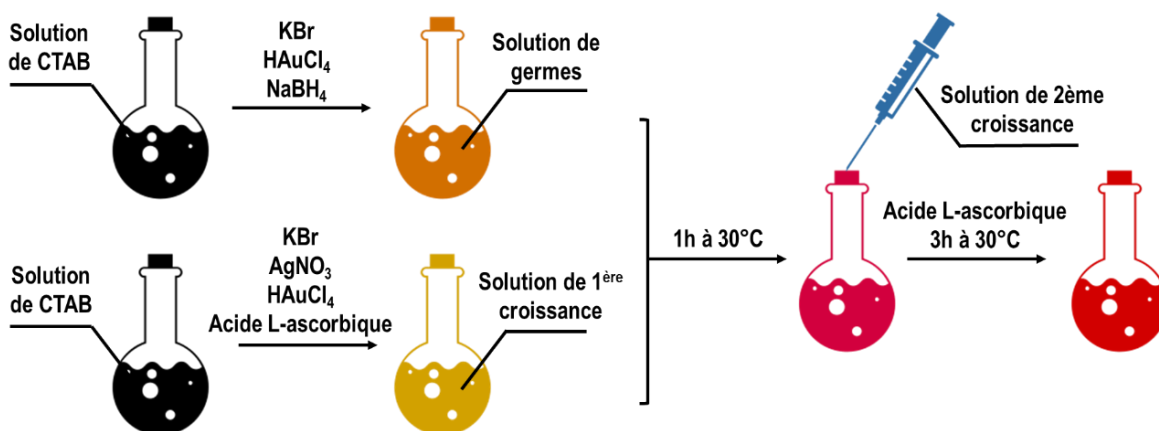


Figure 4.1 – Schéma de concept du premier protocole de synthèse de nanobâtonnets d'or utilisé.

En parallèle, une solution de croissance primaire est préparée en ajoutant du bromure de potassium, du nitrate d'argent, de l'acide chloraurique et de l'acide L-ascorbique à une solution de CTAB 100 mM. Cette solution est donc une source d'or au degré d'oxydation 1 et une source d'ions Ag<sup>+</sup> essentiels à la passivation de surfaces. Un faible volume de germes est ensuite ajouté à la solution de croissance

primaire et la réaction procède pendant une heure à 30°C, une température suffisante pour dissoudre complètement le CTAB. Une seconde étape de croissance a pour but de poursuivre la maturation des nanobâtonnets en plus de réduire la polydispersité des particules. Pour ce faire, une solution d'acide L-ascorbique 9,4 mM est ajoutée goutte à goutte à un débit de 30 µL/min afin de réduire l'Au(III) résiduel en Au(I), qui peut être réduit de façon autocatalytique à la surface des nanobâtonnets. Dans le but de se débarrasser des réactifs excédentaires, la solution finale de nanobâtonnets est centrifugée à deux reprises. Le dernier culot de nanobâtonnets est redispersé dans une solution de CTAB 0,16 mM pour éviter l'agrégation des particules.

Ce protocole permet en théorie de synthétiser des nanobâtonnets avec un ratio d'aspect de 2,0 à 4,2, ce qui correspond à un maximum d'extinction de la bande plasmonique longitudinale situé environ entre 650 et 900 nm. Pour atteindre des ratios d'aspect supérieurs et se déplacer davantage vers l'infrarouge, il est toutefois nécessaire de se tourner vers un autre protocole. Cette seconde méthode, illustrée à la figure 4.2 et décrite en détail à l'annexe 2, est également adaptée de la littérature.<sup>100</sup>

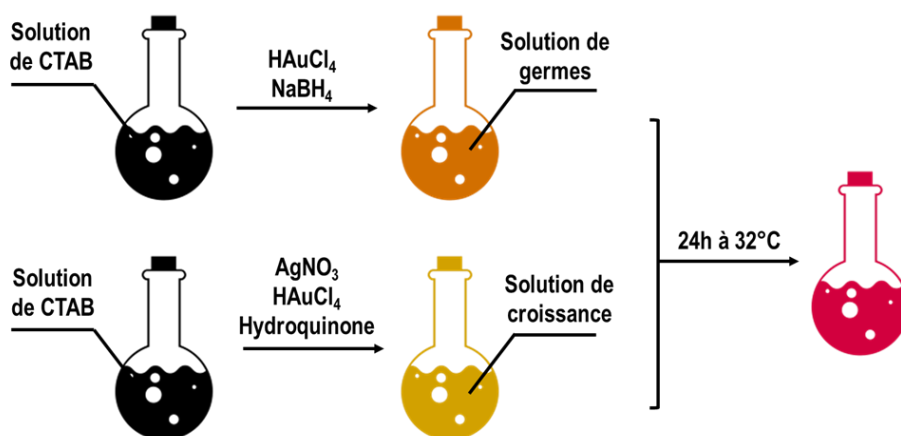


Figure 4.2 – Schéma de concept du second protocole de synthèse de nanobâtonnets d'or utilisé.

Il s'agit d'une synthèse par croissance de germes contrôlée en deux étapes. Contrairement au premier protocole, le réducteur faible dans la solution de croissance n'est pas l'acide L-ascorbique, mais l'hydroquinone, puisque celle-ci favorise la croissance de nanobâtonnets avec un ratio d'aspect élevé en s'intercalant dans les micelles cylindriques de CTAB. Le protocole original ne demande pas d'ajout de bromure de potassium, mais il serait possible de doper le milieu réactionnel avec le même ratio KBr:CTAB qu'à la première synthèse dans le but de réduire la polydispersité des nanobâtonnets causées par des impuretés dans les réactifs commerciaux.

### 4.1.2 Caractérisation

Pour chacun des deux protocoles de synthèse, les nanobâtonnets obtenus ont été caractérisés par microscopie électronique à transmission et par spectroscopie UV-visible. Dans le cas de la première méthode, l'évolution de la synthèse a été suivie en prélevant des aliquots après la première étape de croissance, puis à différents moments durant la deuxième croissance.

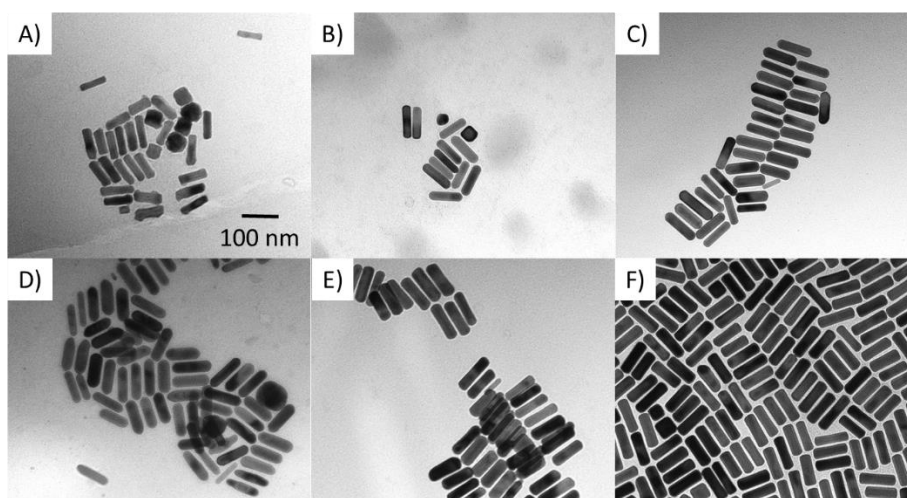


Figure 4.3 – Images TEM pour les nanobâtonnets obtenus avec le premier protocole pour des aliquots prélevés (A) après la première étape de croissance, puis après (B) 30 min, (C) 60 min, (D) 90 min, (E) 120 minutes et (F) la totalité de la seconde croissance.

Tel qu'attendu, la taille des nanobâtonnets augmente au cours de la seconde croissance, en raison de l'ajout d'acide L-ascorbique qui favorise la déposition de l'Au(I) sur les différentes facettes des particules. Puisque la longueur et la largeur des bâtonnets évoluent sensiblement au même rythme, leur ratio d'aspect demeure similaire tout au long de la synthèse.

Tableau 4.1 – Évolution des dimensions et du ratio d'aspect des nanobâtonnets au cours de la première synthèse.

Solution	Longueur	Largeur	Ratio d'aspect	Nombre de particules analysées
	nm			
1 <sup>re</sup> croissance	45 ± 12	15 ± 4	3 ± 1	200
2 <sup>e</sup> croissance 30 min	57 ± 11	21 ± 7	3,0 ± 0,8	164
2 <sup>e</sup> croissance 60 min	62 ± 8	21 ± 4	3,1 ± 0,7	206
2 <sup>e</sup> croissance 90 min	66 ± 7	21 ± 6	3,3 ± 0,8	162
2 <sup>e</sup> croissance 120 min	68 ± 12	25 ± 8	2,9 ± 0,7	172
2 <sup>e</sup> croissance finale	68 ± 9	23 ± 5	3,1 ± 0,8	186

Le spectre d'extinction des nanobâtonnets a également été suivi au cours de la synthèse. Comme le montre la figure 4.4, les spectres présentent deux bandes plasmoniques tel qu'anticipé. La première bande, à environ 800 nm, est attribuable au plasmon longitudinal, tandis que la seconde, vers 530 nm, correspond à l'oscillation transversale des électrons de conduction. Pour une même concentration de nanobâtonnets, l'intensité des bandes plasmoniques augmente en fonction du temps accordé à la seconde croissance, étant donné l'augmentation de la taille des particules. Bien que la bande transversale demeure à la même position durant la croissance, la bande longitudinale se déplace de façon significative entre 775 nm et 815 nm. Ce déplacement est dû, en partie, au fait que la bande longitudinale est très sensible aux faibles variations de ratio d'aspect d'un aliquot à l'autre. De plus, les images TEM permettent d'observer que la pointe des bâtonnets change au cours de la synthèse, débutant par une forme arrondie et terminant avec une forme plus angulaire. Tel que rapporté dans la littérature, ce changement de morphologie peut également affecter la position de la bande longitudinale.<sup>72</sup>

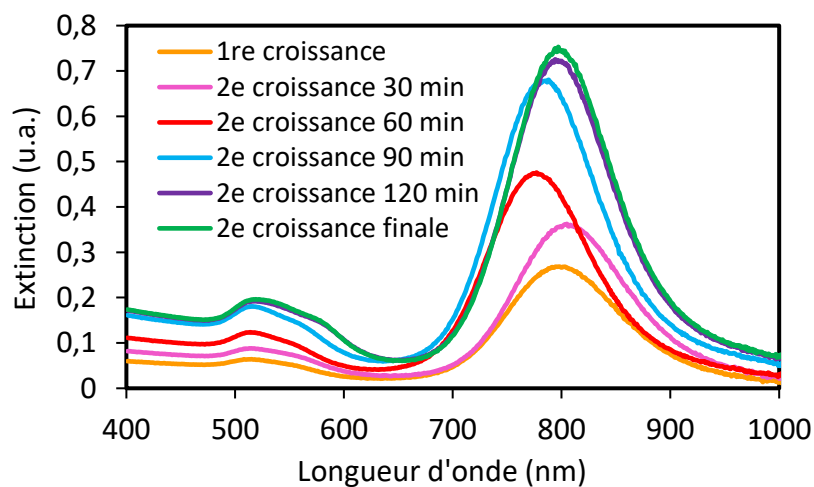
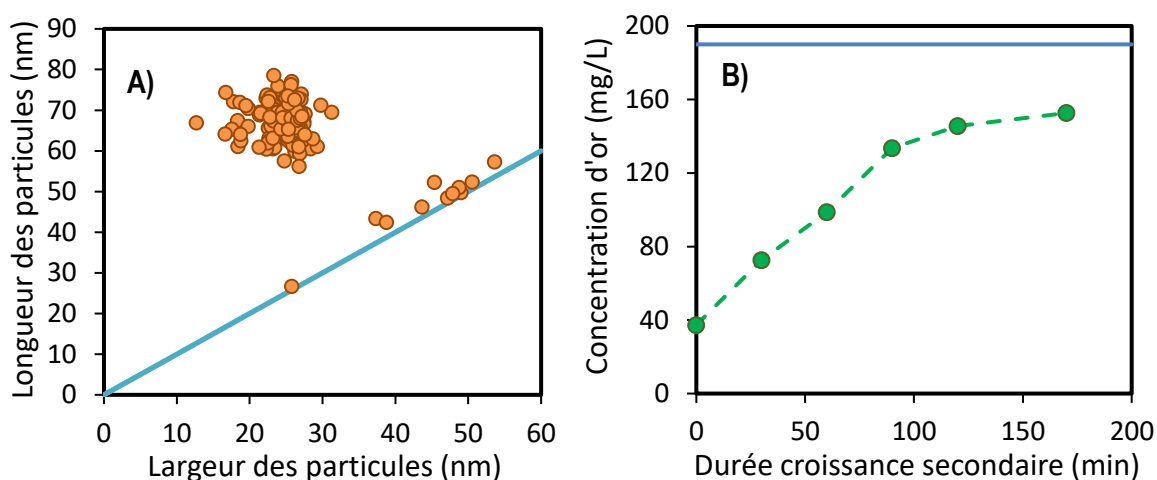


Figure 4.4 – Évolution du spectre d'extinction des nanobâtonnets au cours de la première synthèse pour une même concentration de nanoparticules en solution.

De plus, il est important de noter que l'aire sous la courbe de la bande longitudinale est beaucoup plus grande que l'aire sous la bande à 530 nm. Puisque le plasmon des nanosphères d'or se superpose à la bande transversale des nanobâtonnets, cet important ratio entre les bandes indique que la proportion de sphères en solution est faible comparativement à la population de bâtonnets, ce qui est corrélé par les observations au TEM. Toutefois, la bande qui apparaît entre 550 et 600 nm indique que la synthèse comporte d'autres impuretés, puisque cette bande est caractéristique au plasmon de particules d'or de forme cubique<sup>101</sup> ou octaédrique.<sup>102</sup>

Afin de mieux visualiser la diversité de formes et de tailles des particules à la fin de la synthèse, un diagramme de distribution de tailles a été tracé grâce aux données extraites des images TEM (voir figure 4.5 A). Ce graphique permet d'isoler les particules ayant une forme plus sphérique, donc ayant une longueur et une largeur similaire, des bâtonnets ayant une forme allongée. Dans le cas de cet échantillon, le rendement de bâtonnets a été estimé à 94% (175 bâtonnets/187 particules analysées), ce qui démontre un bon contrôle de la forme grâce à cette technique de croissance de germes contrôlée. Toutefois, il faut demeurer prudent avec l'interprétation des images TEM, puisqu'il est reconnu que les nanobâtonnets et les nanosphères ont tendance à s'agglomérer séparément, créant ainsi deux populations distinctes sur les grilles de carbone.<sup>103</sup> Il est donc essentiel de compiler les données sur plusieurs images TEM représentatives de l'échantillon pour éviter de biaiser les résultats.



**Figure 4.5 – (A) Distribution de tailles des nanobâtonnets à la fin de la seconde croissance tel que déterminé au TEM (n = 187) avec, en bleu, la droite désignant les dimensions de nanosphères. (B) Évolution de la concentration d'or déterminée par ICP-AES pour des aliquots de nanobâtonnets dissous dans de l'eau régale avec, en bleu, la droite désignant la concentration d'or dans le milieu réactionnel ( $\lambda = 267,595$  nm).**

Afin de mieux comprendre l'impact de la seconde étape de croissance sur l'évolution des particules, différents aliquots de nanobâtonnets ont été dissous dans l'eau régale puis analysés par ICP-AES (voir le protocole détaillé de l'analyse à l'annexe 3). En spectrométrie d'émission atomique, l'or possède trois raies caractéristiques principales, soit à 208,209 nm, 242,795 nm et 267,595 nm. Afin d'obtenir un meilleur signal de même qu'une meilleure sensibilité, la raie à 267,595 nm a été sélectionnée pour l'analyse. Tel qu'illustré à la figure 4.5 B, une concentration d'or en solution de  $(37,5 \pm 0,4)$  mg/L a été déterminée à la fin de la première croissance, pour un ajout total de 189,5 mg/ au mélange réactionnel, ce qui indique que seulement 20 % de l'or a été réduit à la surface des germes. Au cours de la seconde croissance, cependant, la concentration d'or dans les aliquots augmente de façon linéaire pendant les

100 premières minutes avant d'atteindre un plateau à la fin de la synthèse. Ceci s'explique par le fait que, lors de l'ajout de la solution d'acide L-ascorbique, l'Au(III) résiduel dans le milieu est réduit en Au(I) et cette espèce peut alors se réduire en Au(0) à la surface des particules de façon autocatalytique. La seconde étape de croissance permet donc d'atteindre une concentration de  $(152,8 \pm 0,4)$  mg/L d'or dans la solution finale, ce qui représente un pourcentage de réduction de l'or de 81 %.

À partir de ces données, il serait théoriquement possible de calculer la concentration de nanoparticules en solution en se basant sur la densité de l'or et sur le volume des nanobâtonnets. Toutefois, l'incertitude sur la donnée obtenue serait très élevée, puisqu'il serait nécessaire d'estimer que toutes les nanoparticules en solution sont de forme et de taille semblables en plus d'estimer le volume des nanobâtonnets en fonction des dimensions mesurées au TEM. Pour obtenir une valeur plus fiable, les nanobâtonnets ont donc été analysés par suivi individuel des particules (NTA). Grâce à cette technique, la concentration de particules dans la solution finale a été calculée à  $(2,9 \pm 0,1) \times 10^{11}$  NPs/mL par le logiciel de traitement d'images pour cinq répliques du même échantillon.

Dans le cas de la seconde méthode de synthèse, les particules ont uniquement été caractérisées à la fin de la période de croissance. La figure 4.6 présente les images TEM obtenues pour les trois conditions testées. La différence majeure entre les synthèses A, B et C est la quantité de germes ajoutée à la solution de croissance ainsi que la concentration d'ions  $\text{Ag}^+$  dans le milieu réactionnel. En effet, le volume de solution de germes ajouté augmente de la synthèse A à C (respectivement 80  $\mu\text{L}$ , 160  $\mu\text{L}$  et 320  $\mu\text{L}$ ) tandis que la concentration d' $\text{AgNO}_3$  diminue légèrement.

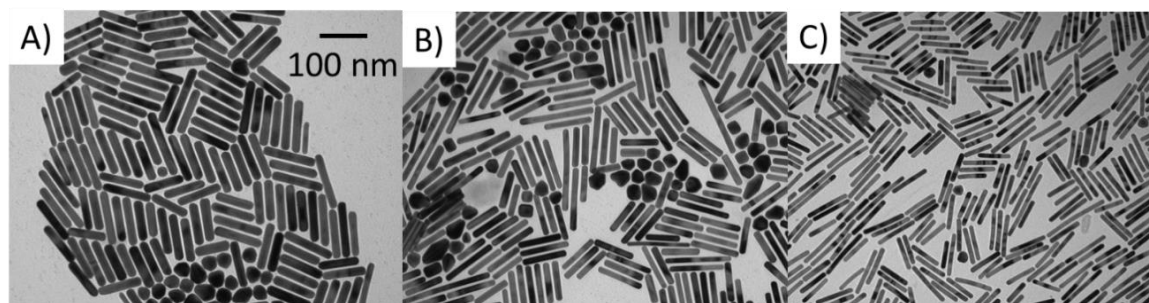


Figure 4.6 - Images TEM pour les nanobâtonnets obtenus avec le second protocole pour les synthèses A, B et C.

Tel qu'attendu, les nanobâtonnets synthétisés par cette méthode possèdent un ratio d'aspect beaucoup plus élevé qu'avec le protocole précédent, en raison de l'utilisation de l'hydroquinone comme réducteur faible. Par ailleurs, la taille des nanobâtonnets d'or diminue de la synthèse A à la synthèse

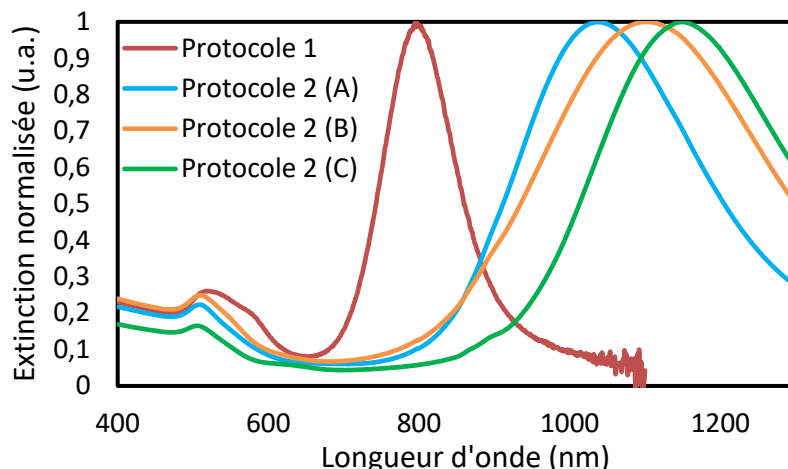
C, selon les dimensions mesurées à l'aide des images TEM (voir tableau 4.2). Ceci s'explique par le fait que toutes les synthèses possèdent la même concentration d'or dans la solution de croissance, alors que le volume de germes ajouté varie. Par conséquent, plus il y a de germes en solution, moins il y a de réactifs disponibles par unité de surface, ce qui mène à l'obtention de nanobâtonnets plus petits, comme dans le cas de la synthèse C.

**Tableau 4.2 - Dimensions et concentration des nanobâtonnets obtenus avec le second protocole de synthèse.**

Solution	Longueur	Largeur	Ratio d'aspect	Concentration
	nm			x 10 <sup>11</sup> NPs/mL
A	105 ± 18	22 ± 3	4,8	2,35 ± 0,02
B	91 ± 14	28 ± 7	5,2	3,62 ± 0,07
C	81 ± 13	14 ± 2	5,8	4,9 ± 0,3

Un autre élément important à remarquer est que le ratio aspect augmente de la synthèse A à C, passant de 4,8 à 5,8. Ceci peut paraître contradictoire, puisqu'il est connu dans la littérature que le ratio d'aspect des bâtonnets augmente en fonction de la concentration d'AgNO<sub>3</sub> dans la solution de croissance.<sup>104</sup> Toutefois, la concentration d'ions Ag<sup>+</sup> varie très peu d'une synthèse à l'autre et le changement dans le ratio d'aspect des bâtonnets serait plutôt attribuable à l'augmentation significative de la concentration de germes en passant de la synthèse A à la synthèse C. En effet, il est rapporté dans la littérature qu'une augmentation de la quantité de germes en solution entraîne une hausse du ratio d'aspect des nanobâtonnets,<sup>105,106</sup> bien que ce phénomène soit encore mal compris.

Encore une fois, les spectres d'extinction mesurés présentent deux bandes plasmoniques caractéristiques aux nanobâtonnets. La position de la bande longitudinale pour les synthèses A, B et C est respectivement de 1036 nm, 1103 nm et 1148 nm, puisque le plasmon se déplace typiquement vers le rouge lorsque le ratio d'aspect augmente. Ce second protocole permet par conséquent d'atteindre des longueurs d'onde plus loin dans le proche infrarouge qu'avec le premier protocole. Toutefois, la bande longitudinale est beaucoup plus évasée avec cette seconde méthode. La largeur à mi-hauteur varie entre 293 nm et 365 nm, tandis qu'elle atteignait à peine 117 nm avec la première méthode, ce qui est un indicateur que les nanobâtonnets sont plus polydisperses. Encore une fois, les images TEM permettent d'observer la présence d'impuretés de forme sphérique, cubique ou octaédrique, mais le rendement de nanobâtonnets demeure très élevé.



**Figure 4.7 - Spectres d'extinction des nanobâtonnets obtenus avec la seconde méthode de synthèse comparativement à la première méthode.**

Ces deux protocoles sont intéressants, puisqu'ils permettent d'obtenir des nanobâtonnets d'or avec un plasmon couvrant une large gamme de longueurs d'onde dans le proche infrarouge. Les nanobâtonnets synthétisés à l'aide du premier protocole ont toutefois été sélectionnés pour la suite du projet, étant donné leur plus faible polydispersité. Il faut cependant noter que la surface des bâtonnets est recouverte d'une bicouche de CTAB pour les deux méthodes proposées, ce qui signifie qu'elle peut être fonctionnalisée avec de la silice ou du polymère à l'aide des mêmes protocoles. La seule différence provient de la surface disponible, mais ceci peut être ajusté en diluant ou en concentrant les nanobâtonnets au besoin.

## 4.2 Couche de silice

### 4.2.1 Protocole de synthèse

Pour effectuer l'ajout d'une couche de silice à la surface des nanobâtonnets, une synthèse en deux étapes a été utilisée (voir l'annexe 4 pour le protocole complet). La première étape consiste à activer la surface des nanobâtonnets d'or en déplaçant une partie de la bicouche de CTAB à l'aide d'une molécule bifonctionnelle, le (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane (MPTMS). En effet, le MPTMS possède une fonction thiol à son extrémité, ce qui lui permet d'adhérer fortement à la surface d'or en plus d'exposer son groupement silane vers le milieu réactionnel.<sup>107</sup> La seconde étape vise à effectuer la croissance d'une couche de silice par un procédé de type Stöber.<sup>108</sup> Pour ce faire, les bâtonnets recouverts de MPTMS (AuNBs@MPTMS) sont transférés dans une solution d'éthanol contenant un



précurseur de type alcoxysilane, ici l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS). La réaction d'hydrolyse et de condensation du silane est alors catalysée par l'ajout d'une base, la diméthylamine (DMA).

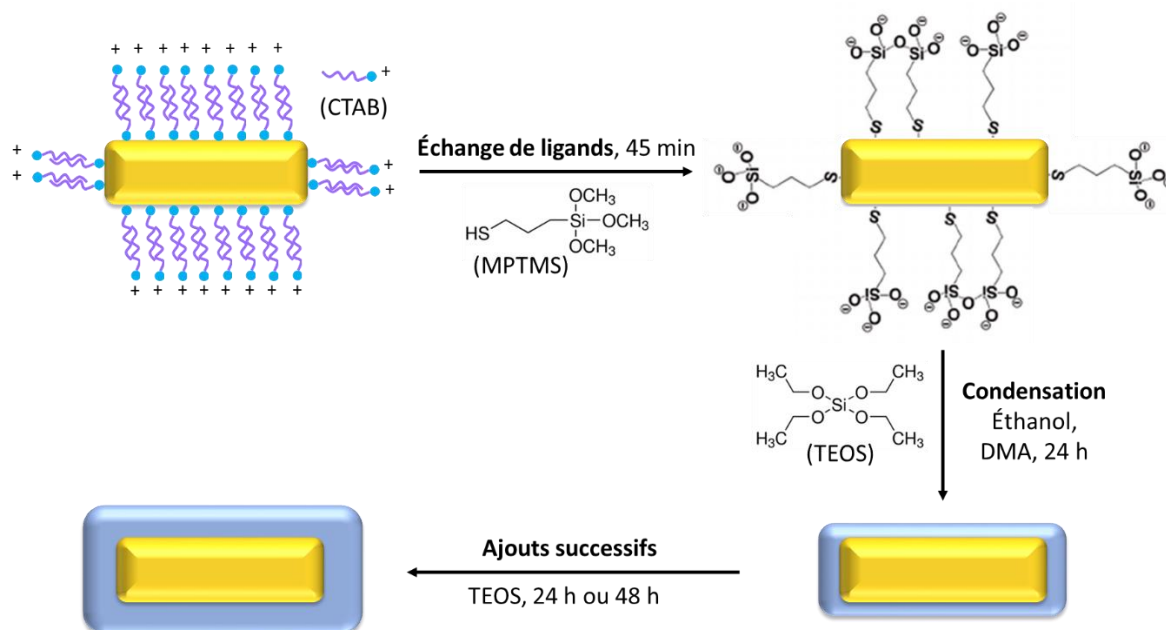
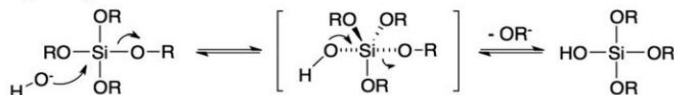


Figure 4.8 – Schéma de la méthode d'ajout d'une couche de silice à la surface des nanobâtonnets d'or par échange de ligands, puis condensation de TEOS.

Afin d'obtenir des coquilles de silice uniformes et d'éviter la seconde nucléation, il est essentiel de contrôler la cinétique d'hydrolyse et de condensation du précurseur. Pour y arriver, il est possible de ralentir la réaction d'hydrolyse en utilisant une quantité minimale de base et d'eau. De plus, l'épaisseur de la coquille de silice peut être modulée avec précision en jouant sur le volume et sur le nombre d'ajouts de TEOS dans le milieu réactionnel.

#### Hydrolyse



#### Condensation

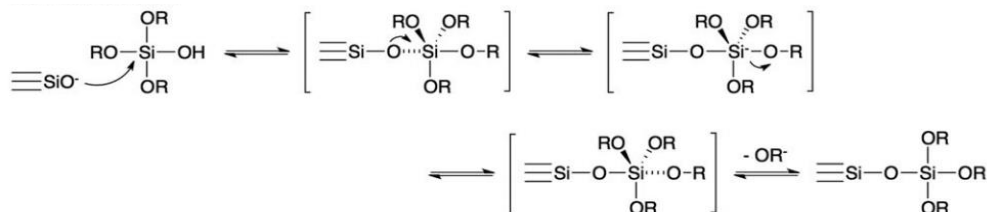


Figure 4.9 – Mécanisme d'hydrolyse et de condensation d'un précurseur alcoxysilane par un procédé de type Stöber catalysé par une base.<sup>109</sup>

#### 4.2.2 Caractérisation

Les nanobâtonnets d'or recouverts de silice (AuNBs@SiO<sub>2</sub>) ont d'abord été caractérisés par TEM. La figure 4.10 présente quelques exemples de coquilles obtenues pour un ajout croissant de TEOS au milieu réactionnel. La technique de déplacement de ligands suivie de la polycondensation du TEOS permet d'obtenir des couches de silice uniformes sur toutes les facettes des nanobâtonnets en plus de limiter la formation de nanoparticules de silice. En effet, en absence de MPTMS, le TEOS se condense exclusivement sous forme de nanoparticules de silice et la surface des nanobâtonnets reste couverte uniquement de la bicouche de CTAB.

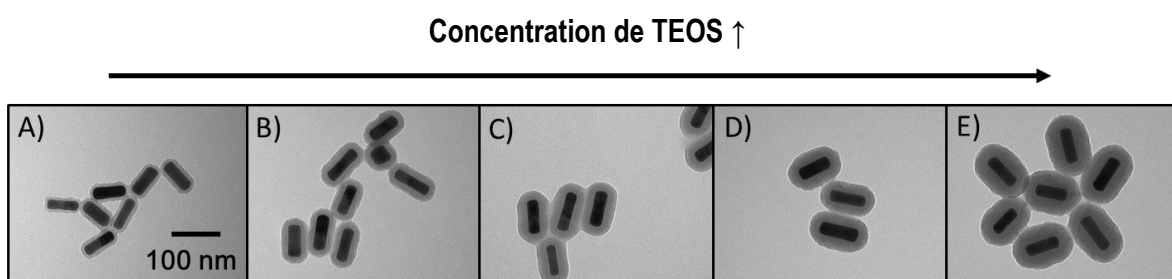
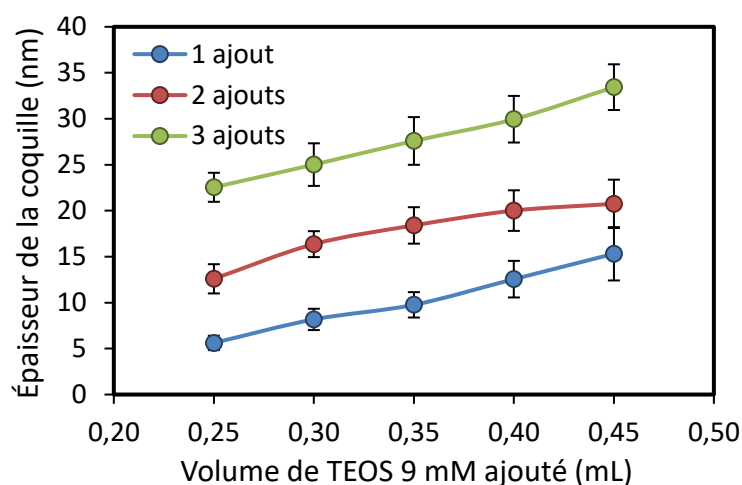


Figure 4.10 – Images de microscopie électronique à transmission de nanobâtonnets d'or recouverts d'une couche de silice de (A) (8±1) nm, (B) (16±1) nm, (C) (23±2) nm, (D) (25±2) nm et (E) (30±3) nm.

Tableau 4.3 – Épaisseur de la coquille obtenue pour l'ajout de différents volumes d'une solution de TEOS 9 mM, tel que déterminé à l'aide des images TEM.

Nombre d'ajouts	Volume de TEOS 9mM	Épaisseur de la coquille	Écart-type relatif
	mL	nm	%
1	0,25	5,6 ± 0,8	14
	0,30	8 ± 1	14
	0,35	10 ± 1	14
	0,40	13 ± 2	16
	0,45	15 ± 3	19
2	0,25	13 ± 2	13
	0,30	16 ± 1	9
	0,35	18 ± 2	11
	0,40	20 ± 2	11
	0,45	21 ± 3	13
3	0,25	23 ± 2	8
	0,30	25 ± 2	8
	0,35	28 ± 2	7
	0,40	30 ± 3	9
	0,45	33 ± 4	11

Afin de moduler l'épaisseur de la couche de silice avec précision, différents volumes d'ajout de TEOS 9 mM dans l'éthanol ont été testés. Comme le montre le tableau 3.1, la coquille de silice devient de plus en plus épaisse à mesure que la quantité de TEOS dans le milieu augmente, puisqu'il y a davantage de réactifs disponibles pour l'étape de polycondensation. En effectuant un seul ajout de TEOS, il est donc possible de moduler la couche de silice de 5,6 nm à 15 nm avec une bonne précision. Cependant, il est difficile de produire une couche plus mince, étant donné que les nanobâtonnets ont alors tendance à agréger. De plus, lors que le volume de TEOS ajouté est plus grand que 0,45 mL, la concentration de précurseur en solution devient suffisante pour entraîner la formation de nanoparticules de silice individuelles.



**Figure 4.11 – Évolution de la couche de silice sur les nanobâtonnets d'or pour l'ajout de différents volumes de TEOS 9 mM.**

Pour atteindre des tailles supérieures à 15 nm, il est donc nécessaire de faire plusieurs petits ajouts de TEOS. Avec deux ajouts, l'épaisseur de la coquille varie entre 13 et 21 nm, tandis qu'avec trois ajouts il est possible d'atteindre des tailles de 23 à 33 nm. La figure 4.11 permet de mieux visualiser l'évolution de la coquille de silice et son uniformité. De manière générale, l'écart-type relatif sur l'épaisseur de la couche diminue en fonction du nombre d'ajouts effectué, puisque des ajouts successifs permettent de corriger les imperfections de surface initiales.

Les nanobâtonnets recouvertes de silice ont également été caractérisés par spectroscopie UV-visible. Comme le montre la figure 4.12, l'étape d'échange de ligands avec le MPTMS n'a pas d'influence sur la position de la bande plasmonique longitudinale. Cependant, l'ajout de la couche de silice entraîne un déplacement significatif de cette bande vers le rouge, tel qu'attendu, étant donné que l'indice de

réfraction de la silice est plus élevée que celle de l'eau.<sup>42</sup> Le déplacement augmente également en fonction de l'épaisseur de la couche, passant de 31 à 38 nm lorsque la couche varie de 8 à 30 nm, puisque le plasmon des nanobâtonnets possède une certaine portée dans le milieu environnant. Il est intéressant de noter que la bande longitudinale devient plus étroite lorsque l'épaisseur de la coquille de silice augmente, ce qui suggère encore une fois une meilleure uniformité de la surface avec plusieurs ajouts de TEOS.

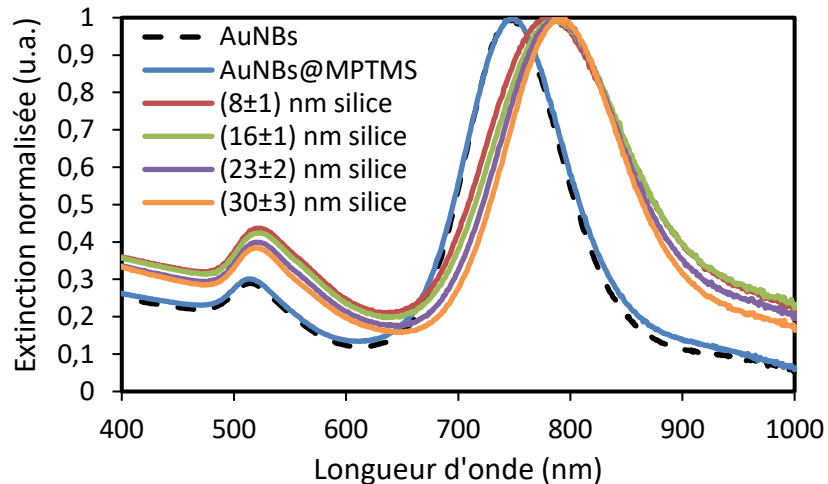


Figure 4.12 – Spectres d'extinction des nanobâtonnets d'or après l'échange de ligands avec le MPTMS, puis après l'étape d'ajout d'une couche de silice d'épaisseur modulable.

### 4.3 Couche de polymère thermosensible

#### 4.3.1 Choix du polymère

Un des polymères thermosensibles les plus utilisés dans la littérature est le PNIPAM ou poly(N-isopropylacrylamide). Cet hydrogel biocompatible est particulièrement utilisé dans le domaine du transport actif de médicaments, puisqu'il possède une LCST de 32°C, c'est-à-dire qu'il passe d'une phase hydratée et gorgée de molécules bioactives à une phase déshydratée et plus dense lorsque cette température est atteinte.<sup>110</sup> Ceci est idéal pour induire un relargage progressif d'un médicament dès l'entrée du polymère dans le corps humain, qui maintient sa température à  $(36,8 \pm 0,4)^\circ\text{C}$  en conditions normales.<sup>111</sup> Toutefois, dans le cadre du projet, le but est de relarguer un principe actif dans l'organisme uniquement lorsque le nano-véhicule aura atteint le site biologique ciblé, et ce, en induisant un chauffage local à l'aide d'une source laser. Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser un polymère thermosensible possédant une LCST supérieure à 37°C, sans toutefois être trop élevée pour éviter d'induire la mort cellulaire.

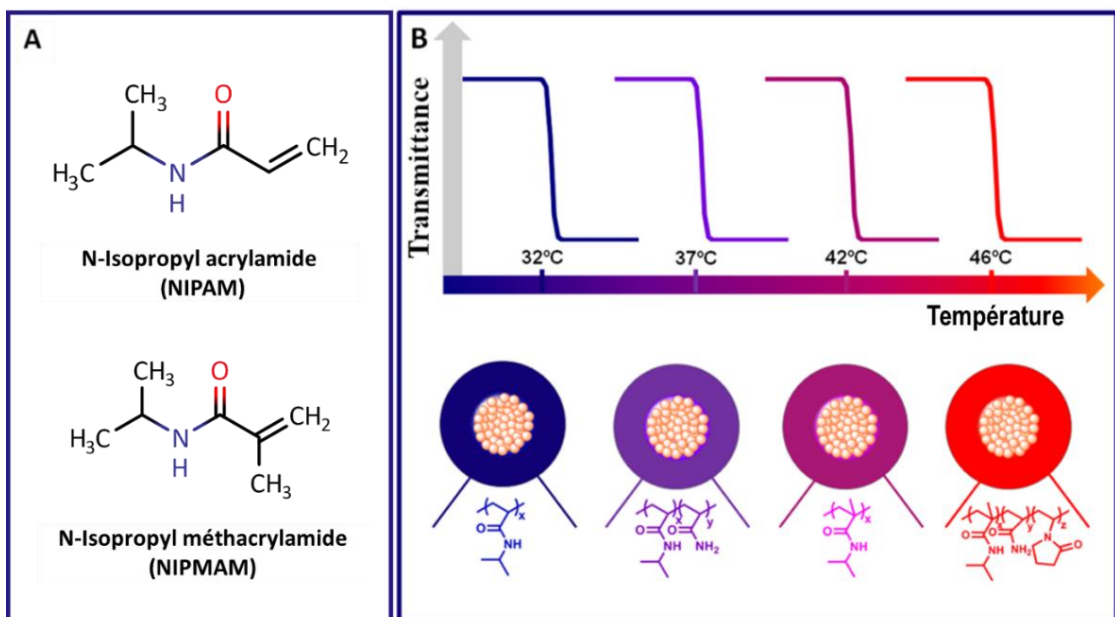
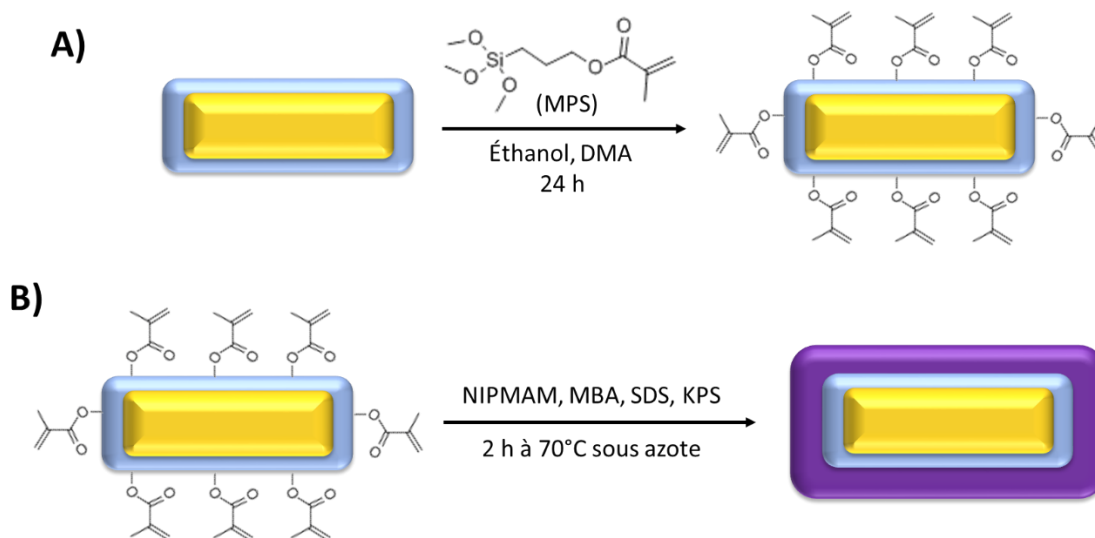


Figure 4.13 – (A) Structure de deux monomères : le NIPAM et le NIPMAM. (B) LCST de différents polymères thermosensibles, dont le PNIPAM (en bleu) et le PNIPMAM (en magenta).<sup>112</sup>

Tel que démontré dans la littérature, il est possible de modifier la structure du N-isopropylacrylamide (NIPAM) ou bien de lui ajouter un second monomère pour moduler la LCST du polymère final (voir figure 4.13). Par exemple, le N-isopropylméthacrylamide (NIPMAM) est obtenu en ajoutant un groupement méthyle au monomère de départ; le polymère résultant, le poly(N-isopropylméthacrylamide) (PNIPMAM), possède alors une LCST de 42°C.<sup>112</sup> Ce polymère a donc été sélectionné pour le projet, puisqu'il peut être synthétisé de façon simple et similaire au PNIPAM en plus de respecter les exigences de température.

#### 4.3.2 Premier protocole de synthèse

Une première approche a été testée pour ajouter une couche de polymère thermosensible sur les nanobâtonnets d'or recouverts de silice (voir l'annexe 5 pour le protocole de synthèse détaillé).<sup>113</sup> La première étape consiste à apprêter la surface de silice en y incorporant des groupements méthacrylate, qui serviront de points d'ancrage pour la polymérisation du NIPMAM. Pour ce faire, du 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MPS) est hydrolysé, puis condensé à la surface du réseau de silice par catalyse basique avec du DMA dans l'éthanol. Par la suite, les nanobâtonnets sont transférés dans l'eau et la couche d'hydrogel thermosensible est ajoutée par un processus de polymérisation par précipitation du NIPMAM initié par le persulfate de potassium (KPS), un initiateur radicalaire soluble en milieu aqueux, en présence d'un surfactant, le dodécylsulfate de sodium (SDS).



**Figure 4.14 – Schéma de synthèse pour l'ajout d'une coquille de polymère thermosensible à la surface des nanobâtonnets d'or recouverts de silice par (A) fonctionnalisation de surface à l'aide de groupements méthacrylate, puis (B) polymérisation par précipitation du NIPMAM.**

Le N,N'-métylènebisacrylamide (MBA) est ajouté au mélange réactionnel dans un ratio MBA:NIPMAM de 1:9 dans le but de former une matrice de polymère réticulée. De cette manière, les molécules bioactives seront encapsulées de façon plus efficace dans la couche de polymère.

#### 4.3.3 Caractérisation et problèmes rencontrés

Les nanobâtonnets ont été caractérisés par microscopie électronique à transmission après chacune des deux étapes de synthèse. Tel qu'illustré à la figure 4.15, les nanobâtonnets d'or recouverts de silice et de MPS ( $\text{AuNBs@SiO}_2\text{@MPS}$ ) présentent une morphologie coeur@coquille bien définie dans l'éthanol. Cependant, après l'étape de polymérisation par précipitation du NIPMAM dans l'eau à 70°C pendant 2 h, la couche de silice est presque complètement érodée. Pour investiguer la cause de cette érosion, les  $\text{AuNBs@SiO}_2$  de même que les  $\text{AuNBs@SiO}_2\text{@MPS}$  ont été chauffés à 70°C pendant une période de 2 h sans ajouter les réactifs de polymérisation, et la dégradation de la silice a également été observée au TEM. L'érosion se produit aussi lorsque ces échantillons sont laissés dans l'eau à température pièce pendant 24 h. Il semble donc que ce soit le traitement thermique en milieu aqueux qui soit au cœur du problème.

L'hypothèse la plus logique est que la présence d'eau cause l'hydrolyse des liens Si-O-Si, détruisant ainsi le réseau de silice, et que la cinétique de cette réaction est accélérée à haute température. De

plus, il s'avère en fait que, lors de l'ajout de la couche de silice, il y a présence de CTAB dans le milieu réactionnel dans le but de stabiliser les nanobâtonnets d'or. Tel que rapporté dans la littérature, le CTAB peut agir en tant que « moule » ou « gabarit » en s'assemblant sous forme de micelles au moment de la polycondensation du TEOS, afin de créer un réseau de silice poreux.<sup>114a</sup> La porosité de cette coquille de silice la rendrait donc particulièrement sensible à l'hydrolyse des liens Si-O-Si, puisque la surface de contact avec le milieu aqueux est accrue. Le rayon de courbure prononcé aux extrémités des nanobâtonnets pourrait également avoir une influence sur la sensibilité de la silice à l'hydrolyse, mais ce facteur n'a pas été étudié au cours de ce projet.<sup>114b</sup>

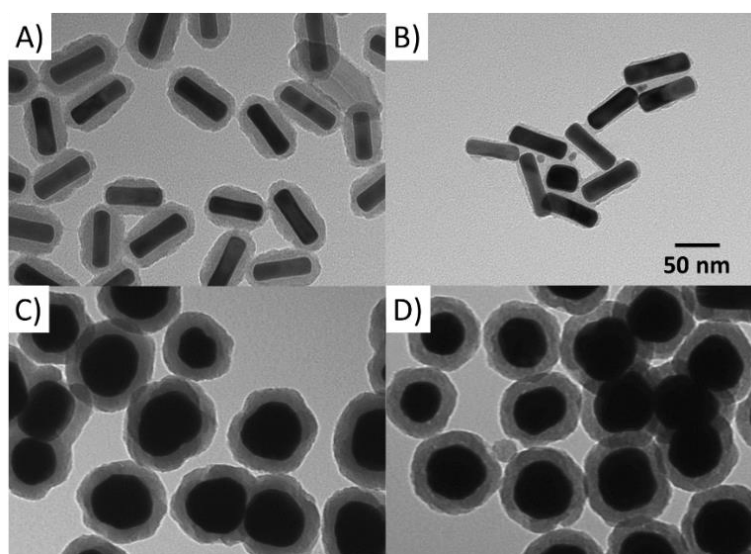
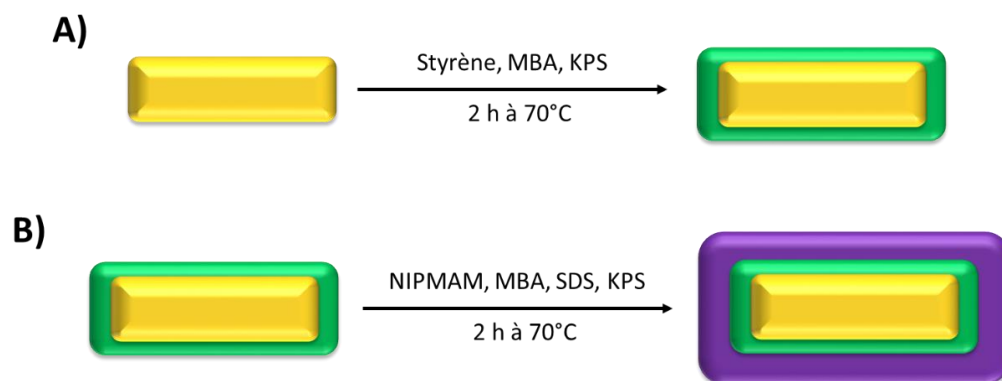


Figure 4.15 – Images TEM de AuNBs@SiO<sub>2</sub>@MPS (A) dans l'éthanol et (B) dans l'eau après 2 h à 70°C. À titre de comparaison, images TEM de AuNPs@SiO<sub>2</sub> (C) dans l'éthanol et (D) dans l'eau après 2 h à 70°C.

Afin d'étudier cette hypothèse, les AuNBs@SiO<sub>2</sub> ont été comparés à des nanoparticules d'or sphériques recouvertes de silice (AuNPs@SiO<sub>2</sub>). Ces nanoparticules d'or, d'un diamètre d'environ 50 nm, ont été synthétisées par croissance contrôlée de germes en présence de citrate de sodium tribasique (voir protocole à l'annexe 7), donc dans un milieu ne contenant pas de CTAB. Une couche de silice d'environ 20 nm a ensuite été ajoutée à l'aide d'une méthode similaire à celle utilisée pour les nanobâtonnets d'or. À des fins de comparaison, ces nanostructures ont également été chauffées à 70°C pendant 2 h dans l'eau et, comme le montre la figure 4.15, la couche de silice dans ce cas ne présente aucun signe d'érosion. Pour éviter de dégrader la silice, il serait donc nécessaire d'effectuer la polymérisation du NIPMAM dans un autre solvant comme l'éthanol, ou encore de retirer le CTAB du milieu réactionnel avant d'ajouter la couche de silice. Ces alternatives n'ont toutefois pas encore été testées.

#### 4.3.4 Second protocole de synthèse

En parallèle, un second protocole a été étudié pour ajouter une coquille de PNIPMAM aux nanobâtonnets d'or (voir l'annexe 6).<sup>115</sup> Dans cette méthode, les nanobâtonnets d'or sont d'abord recouverts d'une mince couche de polystyrène (PS) grâce à la polymérisation par précipitation du styrène par le KPS en milieu aqueux. Le MBA est également utilisé comme agent de réticulation dans un ratio molaire MBA:styrène d'environ 1:3, afin d'obtenir une coquille de polymère réseautee.<sup>116</sup>



**Figure 4.16 - Schéma de synthèse alternatif pour l'ajout d'une coquille de polymère thermosensible à la surface des nanobâtonnets d'or par (A) polymérisation par précipitation du styrène, puis (B) polymérisation par précipitation du NIPMAM.**

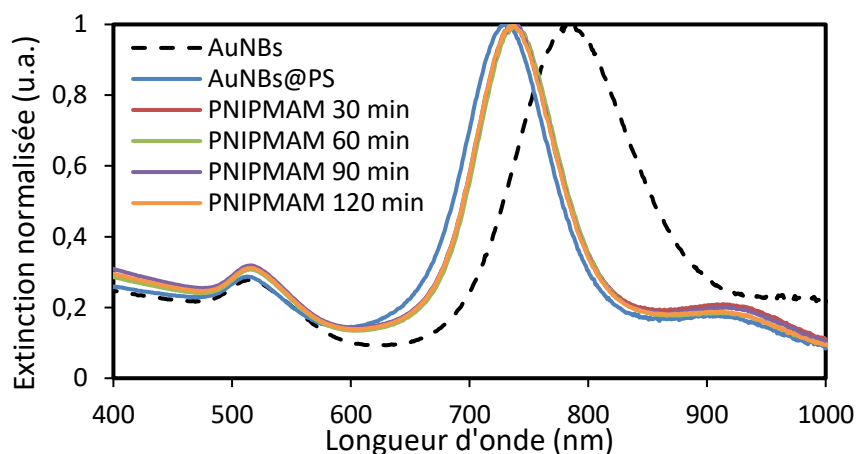
Étant donné que le styrène et le MBA ont une plus grande affinité pour la bicouche de CTAB que pour le milieu aqueux, ceux-ci polymérisent préférentiellement à la surface des nanobâtonnets d'or. Tel que rapporté dans la littérature, le polystyrène agit alors comme point d'ancrage pour la polymérisation par précipitation du NIPMAM en formant un environnement hydrophobe et riche en terminaisons méthacrylate.

#### 4.3.5 Caractérisation

Les nanobâtonnets recouverts de polystyrène (AuNBs@PS), puis de PNIPMAM (AuNBs@PS@PNIPMAM) ont d'abord été caractérisés par spectroscopie UV-visible. Tout d'abord, la bande plasmonique longitudinale des nanobâtonnets se déplace significativement vers le bleu lors de l'ajout de la couche de polystyrène, passant de 782 à 729 nm. Le système AuNBs@PS a été très peu caractérisé dans la littérature, mais cette tendance a déjà été rapportée par le groupe de Chen, qui l'attribue à une diminution de la permittivité locale autour du cœur plasmonique.<sup>117</sup> Cette hypothèse n'est supportée par aucun fait de la littérature et semble aller à l'encontre d'un autre point soulevé dans l'article : l'indice de réfraction du polystyrène est supérieur à celui de l'eau. À cet égard, la bande



longitudinale se déplace ensuite de 10 nm vers le rouge suite à l'ajout de la couche de polymère thermosensible, ce qui serait dû à une augmentation de l'indice de réfraction du milieu.



**Figure 4.17 – Spectres d'extinction des nanobâtonnets d'or à différentes étapes de l'ajout d'une couche de PNIPMAM.**

Le plasmon des nanobâtonnets est similaire pour les 4 aliquots prélevés après 30, 60, 90 et 120 min de polymérisation du NIPMAM. Toutefois, les images TEM de ces aliquots présentent des différences marquées. Tel qu'illustré à la figure 4.18, les AuNBs@PS@PNIPMAM obtenus après 30 minutes sont bien séparés et définis, tandis qu'ils forment un réseau de polymère interconnecté après 120 minutes de réaction. Le premier aliquot a donc été utilisé pour le reste des caractérisations, et les nanosphères de polymères visibles sur la grille TEM ont été éliminées en grande partie par centrifugation.

Dans le but de vérifier la réponse du polymère thermosensible à la température, les nano-véhicules ont été étudiés par DLS. Les AuNBs@PS présentent un diamètre hydrodynamique constant dans une gamme de température de 25°C à 50°C (voir figure 4.18 D), tel qu'attendu. Cependant, pour les AuNBs@PS@PNIPMAM, le diamètre hydrodynamique diminue drastiquement de 37°C à 46°C, passant de  $(197 \pm 22)$  nm à  $(140 \pm 16)$  nm, ce qui représente un affaissement de la structure de 29% (voir figure 4.18 E). La LCST du polymère est d'environ 41°C, très près de la donnée rapportée dans la littérature. De plus, comme le montre la figure 4.18 C, la structure du nano-véhicule est conservée, même après ce traitement thermique dans l'eau, ce qui présente un net avantage par rapport à la méthode de synthèse précédente. Il est d'ailleurs à noter que l'affaissement de la couche de polymère peut, en théorie, être modulé en modifiant le ratio entre le monomère et l'agent de réticulation.<sup>115</sup> De cette manière, il serait donc possible de contrôler la cinétique de relargage des molécules bioactives encapsulées.

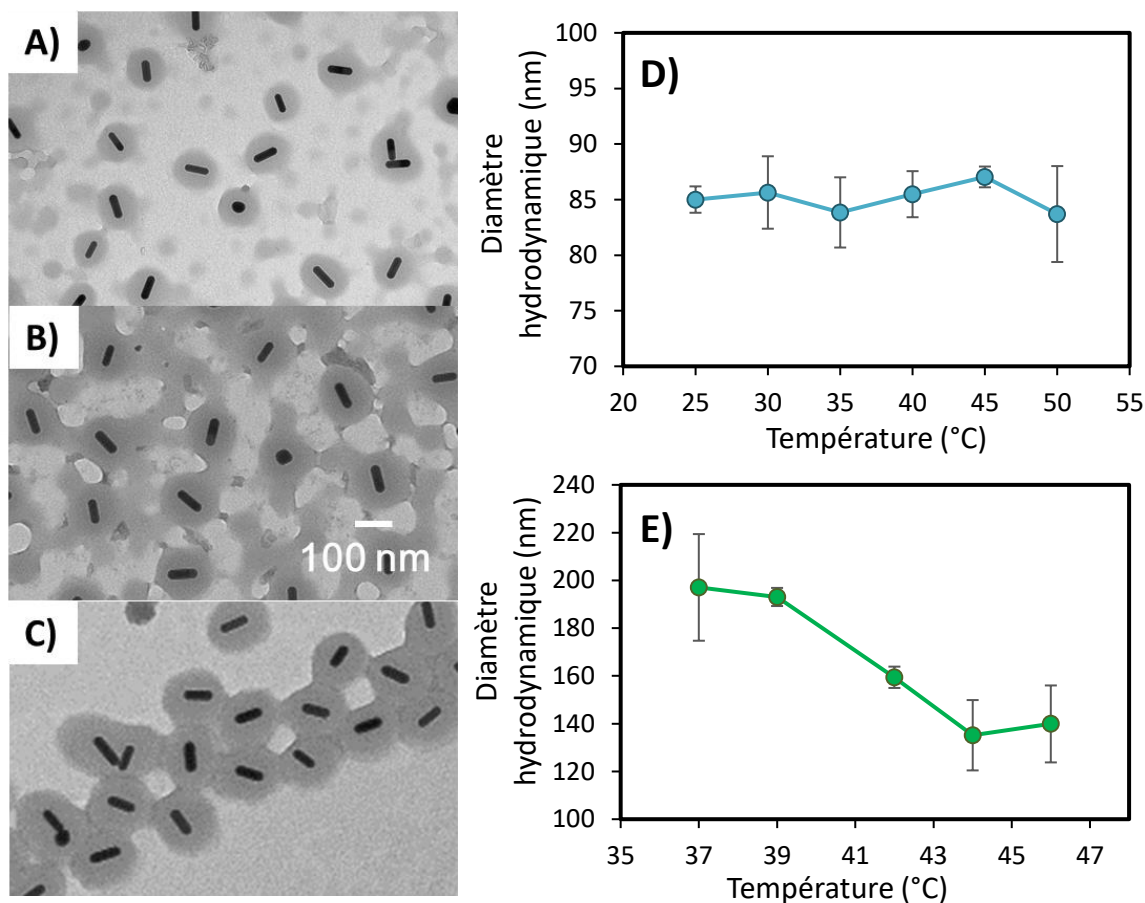


Figure 4.18 – Images TEM de AuNBs@PS@PNIPAM (A) après 30 min et (B) après 120 min de polymérisation du NIPMAM, puis (C) après un traitement thermique à 46°C pour l'échantillon en (A). Analyse DLS de (D) AuNBs@PS et (E) AuNBs@PS@PNIPAM en fonction de la température.

Cette seconde méthode de synthèse permet d'obtenir des nano-véhicules fonctionnels pour l'application visée. Toutefois, d'autres tests ont été effectués afin de vérifier la présence de la couche de polystyrène à la surface des AuNBs, puisque très peu d'articles dans la littérature se sont penchés sur ce type de caractérisation.<sup>117,118</sup> Pour ce faire, des AuNBs tel que synthétisés ont été comparés à trois autres échantillons ayant subi un traitement à 70°C pendant 2 h dans l'eau 1) sans ajout de réactifs, 2) en présence de KPS et 3) en présence de KPS, de styrène et de MBA. Ces solutions ont été analysées par spectroscopie UV-visible, par TEM et par DLS.

Tout d'abord, les spectres d'extinction présentés à la figure 4.19 montrent que la température et la présence de KPS dans le milieu ont une influence sur la position de la bande plasmonique longitudinale. En effet, le plasmon des nanobâtonnets d'or se déplace vers le bleu de 13 nm après le traitement thermique et de 47 nm lorsque le KPS est présent dans le milieu réactionnel sous haute

température. De manière étonnante, l'effet très marqué de ces deux paramètres ne semble pas être rapporté dans la littérature. Grâce à ces nouveaux résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une hausse de température et la présence d'une espèce radicalaire comme le persulfate de potassium peuvent induire une modification de la morphologie des nanobâtonnets, changeant ainsi l'énergie de résonance du plasmon longitudinal.

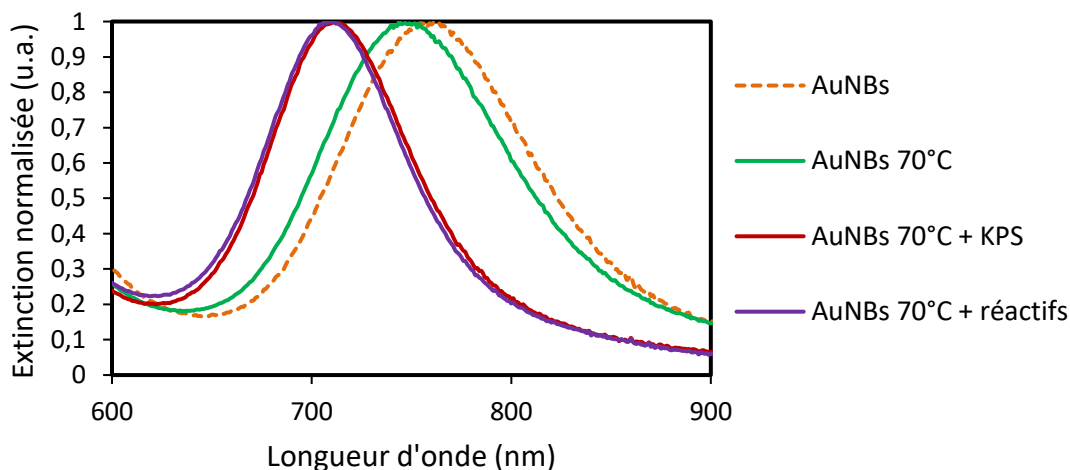


Figure 4.19 – Spectres d'extinction des nanobâtonnets d'or après des traitements dans différents milieux réactionnels.

Pour vérifier cette hypothèse, ces quatre échantillons ont par la suite été caractérisés par TEM. Tel qu'illustré à la figure 4.20, la pointe des nanobâtonnets d'or passe d'une forme angulaire tout juste après leur synthèse à une forme plus arrondie après le traitement thermique. Cette modification de la forme des bâtonnets est encore plus marquée en présence de persulfate de potassium, ce qui permet d'expliquer le déplacement graduel du plasmon vers les plus courtes longueurs d'onde.<sup>72</sup> Il semble donc qu'une température élevée et la présence de radicaux favorise le remaniement des atomes d'or à la surface des nanoparticules, passant d'une conformation en pointe vers une conformation arrondie afin de diminuer l'énergie de surface du système.

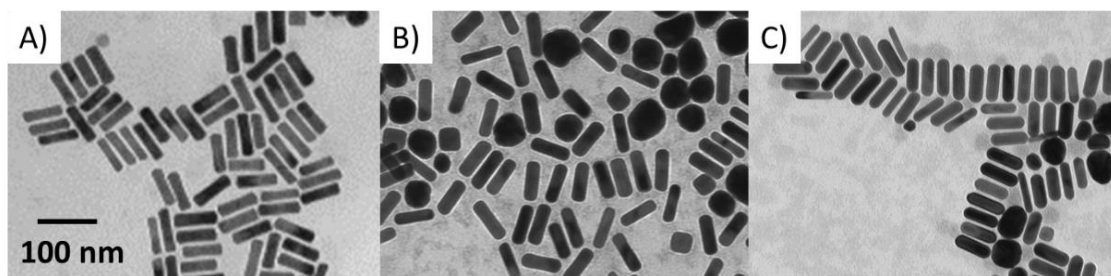


Figure 4.20 – Images TEM de nanobâtonnets d'or (A) directement après leur synthèse, (B) après un traitement de 2h dans l'eau à 70°C et (C) après un traitement de 2h dans l'eau à 70°C en présence de KPS.

Les dimensions des nanobâtonnets ont également été mesurées à l'aide des images TEM et portées en graphique à la figure 4.21. Selon ces résultats, il semble que la distribution de tailles des nanobâtonnets d'or demeure similaire pour les quatre échantillons étudiés, ce qui indique que le déplacement de la bande plasmonique ne serait pas dû à un changement dans le ratio d'aspect des AuNBs, mais uniquement à un changement de morphologie des pointes.

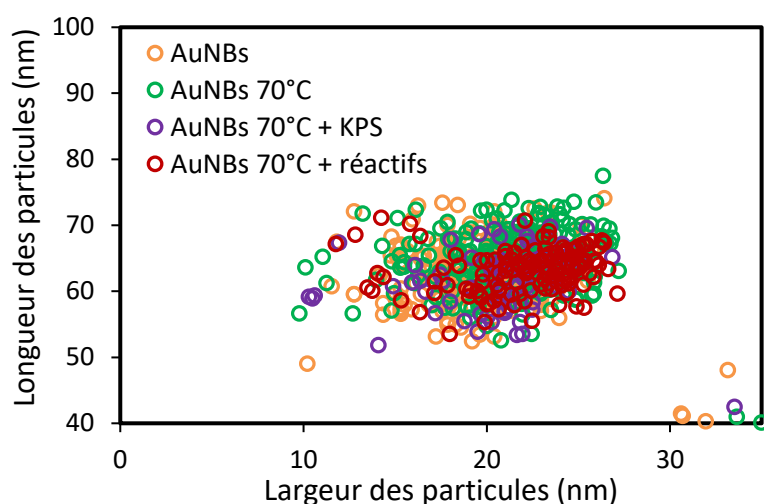


Figure 4.21 - Distribution de tailles des nanobâtonnets après différents traitements tel que déterminé au TEM.

La présence de la couche de polystyrène à la surface des AuNBs n'a toutefois pas pu être confirmée par microscopie électronique à transmission. La principale difficulté provient du fait qu'une mince couche de PS est très difficile à observer au TEM, même en utilisant un agent de coloration comme l'acide phosphotungstique, étant donné qu'elle peut facilement être confondue avec une bicouche de CTAB ou avec de l'eau adsorbée sur la surface d'or. Comme analyse préliminaire, les quatre échantillons ont donc été caractérisés par DLS, afin de vérifier s'il y a modification du diamètre hydrodynamique des nanobâtonnets après chaque traitement. Comme le montre la figure 4.22, le diamètre hydrodynamique des AuNBs fraîchement synthétisés diminue à haute température et en présence de KPS, passant de  $(63,7 \pm 0,4)$  nm à  $(60,7 \pm 0,7)$  nm après le traitement thermique et à  $(59,3 \pm 0,9)$  nm avec l'ajout du persulfate de potassium. Cette variation semble être occasionnée par l'arrondissement des pointes des bâtonnets. Toutefois, lorsque tous les réactifs sont présents en solution à 70°C, le diamètre des nanoparticules solvatées est plus grand, atteignant  $(62,2 \pm 0,3)$  nm. Ce résultat suggère que le polystyrène est bien déposé à la surface des AuNBs par polymérisation par précipitation, augmentant ainsi la taille des particules, mais il s'agit uniquement d'une preuve indirecte.

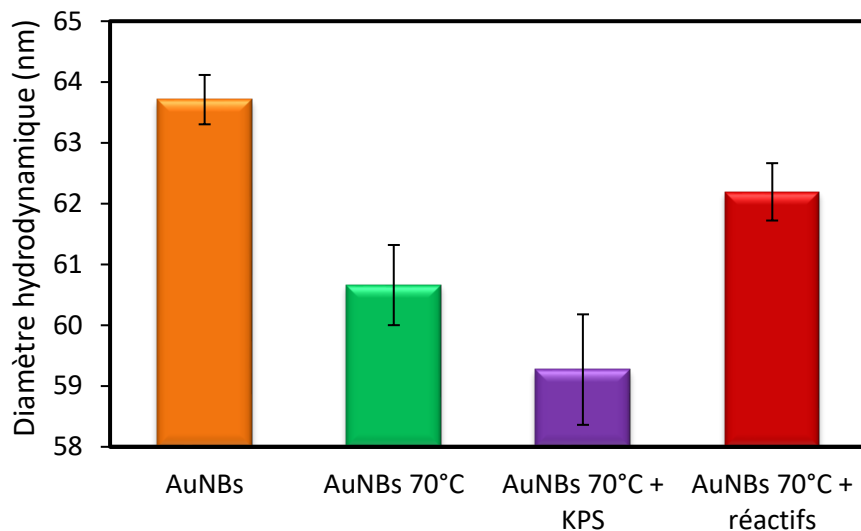


Figure 4.22 – Analyse DLS des nanobâtonnets d’or dans l’eau nano à température pièce.

Pour confirmer ou infirmer la présence de la couche de polystyrène, il serait donc nécessaire de faire des analyses plus poussées en utilisant des techniques comme la spectroscopie infrarouge et la thermogravimétrie. L’inconvénient principal de ces méthodes d’analyse est qu’elles demandent plusieurs milligrammes d’échantillon, ce qui représente une masse importante dans le domaine des nanoparticules, en plus d’être destructrices. De plus, comme la coquille de polystyrène est en théorie très mince, le poids du polymère représente une fraction infime du poids total des AuNBs@PS, ce qui signifie qu’il faut une masse d’échantillon encore plus grande pour espérer repérer le polystyrène. Néanmoins, ces techniques permettraient d’identifier avec précision les espèces chimiques présentes à la surface des nanobâtonnets d’or.