



CONFÉDÉRATION SUISSE  
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(11) **CH** **705 758 A1**

**Demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein**

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

(51) Int. Cl.: **B82B** 1/00 (2006.01)  
**B82B** 3/00 (2006.01)  
**G01N** 33/53 (2006.01)  
**B82Y** 15/00 (2011.01)

(12) **DEMANDE DE BREVET**

(21) Numéro de la demande: 01825/11	(71) Requéérant: Metalor Technologies International SA, Avenue du Vignoble 2 2000 Neuchâtel (CH)
(22) Date de dépôt: 15.11.2011	(72) Inventeur(s): Cyrille Gautier, 2300 La Chaux-de-Fonds (CH) Lynda Si-Ahmed, 1786 Sugiez (CH)
(43) Demande publiée: 15.05.2013	(74) Mandataire: GLN S.A., Avenue Edouard-Dubois 20 2000 Neuchâtel (CH)

(54) **Nanoparticules cœur-coquille métal-silice, procédé de fabrication et dispositif de test par immunochromatographie comprenant de telles nanoparticules.**

(57) La présente invention concerne une nanoparticule cœur-coquille comprenant au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels. Selon l'invention, la silice comprend à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation de ladite nanoparticule. La présente invention concerne également une nanoparticule cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins ledit premier matériau et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, la coquille métallique étant stabilisée par un agent surfactant sans halogénure. La présente invention concerne également un dispositif de test par immunochromatographie pour la détection d'au moins un analyte, comprenant des agents de liaison spécifiques de l'analyte, lesdits agents de liaison étant marqués par des nanoparticules, dans lequel les nanoparticules comprennent au moins un cœur composé d'au moins ledit premier matériau et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels.

## Description

### Domaine technique

**[0001]** La présente invention se rapporte à des nanoparticule cœur-coquille comprenant au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels. La présente invention concerne également un dispositif de test par immunochromatographie utilisant de telles nanoparticules. La présente invention concerne également, notamment en tant que produit intermédiaire, des nanoparticules cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau. L'invention concerne également des procédés de fabrication de telles nanoparticules.

### Etat de la technique

**[0002]** Les études sur les nanoparticules métalliques ont révélé de surprenantes propriétés physiques, chimiques et biologiques dépendant de la taille, de la forme et de l'environnement de ces particules.

**[0003]** Plus précisément, les nanoparticules métalliques présentent des propriétés optiques particulièrement intéressantes pour le domaine du diagnostique immunochromatographique. Par exemple, les colloïdes d'or sont couramment utilisés en tant que marqueur ou label dans les tests rapides immunochromatographiques tels que les tests de grossesse, les diagnostics des cancers, d'infections virales, de troubles endocriniens ou encore de consommation de produits stupéfiants.

**[0004]** Les tests immunochromatographiques sont basés sur la migration capillaire de nano ou microparticules le long d'une membrane en présence de l'échantillon testé (urine, sang, plasma, salive, sérum, efflux industriel...). Dans les tests de type «sandwich», les particules sont préalablement conjuguées à un anticorps spécifique à l'antigène recherché. En présence de cet antigène dans l'échantillon testé, le conjugué (particule-anticorps) forme un complexe (particule-anticorps-antigène) avec celui-ci. Le complexe migre sur la membrane jusqu'à la ligne test. Le complexe est alors capturé par la ligne test où un second anticorps spécifique à l'antigène et au complexe est immobilisé. Un résultat positif se traduit par la visualisation d'une ligne colorée formée par l'immobilisation du complexe. Un contrôle interne permet de valider le test. Il est aussi possible d'utiliser d'autres types de reconnaissances spécifiques telles que les complexes haptène/antigène, lectine/carbohydate, apoprotéine/cofacteur ou streptavidine/biotine par exemple. Il existe aussi d'autres types de test immunochromatographique comme par exemples les tests de type compétitif utilisés pour l'analyse des molécules ne possédant qu'un seul épitope. Les tests immunochromatographiques en question sont fabriqués en utilisant des méthodes bien établies (voir par exemple les demandes de brevet WO 01/57522 ou W02008/030546). Plusieurs conjugués spécifiques à différents antigènes peuvent être utilisés dans un même test pour analyser simultanément ces antigènes.

**[0005]** Les labels couramment utilisés sont des nanoparticules de latex ou de silice colorées (ou fluorescentes), des nanoparticules de matériaux semiconducteurs (quantum dots) ou des nanoparticules sphériques de métaux précieux (or et argent). Ces labels doivent répondre à différents critères:» avoir un pouvoir colorant important de façon à pouvoir détecter une faible concentration de virus;

- différentes couleurs pour l'analyse simultanée de plusieurs molécules sur une même bandelette;
- être stable avant, pendant et après l'étape de formation et de purification du conjugué (nanoparticule-anticorps);
- être facilement et fortement couplés à un anticorps ou une autre espèce capable de reconnaître et de se fixer de manière spécifique au virus recherché;
- présenter une bonne stabilité colloïdale et migrer aisément sur les membranes de façon à réduire le rapport signal sur bruit du test.

**[0006]** Les nanoparticules de latex ou de verre colorées (ou fluorescentes) doivent leur coloration ou fluorescence à des pigments ou fluorophores organiques insérés à l'intérieur et/ou à la surface de ces particules. Ces labels souffrent de deux inconvénients majeurs. Les molécules pigments ou fluorophores ne sont pas toujours attachées de façon covalente à la particule et sont peu à peu relarguées par la particule. Cela entraîne une diminution du pouvoir colorant des particules et peut diminuer le rapport signal sur bruit du test. De plus, la majorité des pigments et fluorophores organiques sont fortement apolaires. Par conséquent, ils diminuent la solubilité des particules et compliquent les réactions de conjugaison particule-anticorps.

**[0007]** Les propriétés optiques des nanoparticules métalliques sont principalement dépendantes de la résonance de leurs plasmons de surface. Ce phénomène est dépendant de la taille, de la forme ainsi que de l'environnement des nanoparticules. Le phénomène de résonance plasmonique est décrit par la théorie de Mie (Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. J. Phys. Chem. B 2006, 110, 7238-7248). Les nanoparticules d'or sphériques ayant un diamètre de 40 nm sont couramment utilisées dans les tests immunochromatographiques. Ces particules exhibent une forte coloration rouge causée par la résonance des plasmons de surface avec l'onde électromagnétique à une longueur d'onde d'environ

520 nm. La section efficace d'absorption des nanoparticules d'or sphériques ayant un diamètre de 40 nm est 5 ordres de magnitude supérieure à celles des pigments organiques. Ces particules ont par conséquent un fort pouvoir colorant.

**[0008]** Les nanoparticules anisotropes d'or telles que les nanobâtonnets ont une coloration qui est dépendante du ratio d'aspect (RA, longueur/largeur). Des bâtonnets d'or de différentes couleurs (brun, bleu et vert) peuvent être synthétisés en utilisant les méthodes décrites par Nikoobakht (Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. *Chem. Mater.* 2003, 15, 1957-1962) et Park (Park, K.; Vaia, R. A. *Advanced Materials* 2008, 20, 3882-3886). Pour des particules de même volume, les bâtonnets d'or ont des coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière supérieurs à ceux des nanoparticules d'or sphériques (Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem.* 2006, 110, 7238-7248). Les bâtonnets présentent deux avantages par rapport aux sphères. Un contrôle fin du RA permet de produire des nanobâtonnets de différentes couleurs qui permettent de réaliser des tests en multiplexage. De plus, le pouvoir colorant des bâtonnets est plus important que celui des sphères de même volume ce qui peut rendre les tests immunochromatographiques plus sensibles si les autres conditions sont réunies. Ces autres conditions sont par exemple une haute pureté, une bonne stabilité, la réactivité avec les anticorps et une bonne migration lors de l'éluion. Un conjugué bâtonnet d'or-anti-HER2 a été évalué pour l'analyse immunochromatographique de la protéine HER2 (Venkataramasubramani, M.; Tang, L.; McGoron, A. J.; Li, C.-Z.; Lin, W.-C.; Magjarevic, R. *IFMBE Proceeding* 2009, 24, 199-202). Cependant, ce test a montré que les nanobâtonnets d'or s'agglomèrent en présence de l'anticorps et en présence de NaCl. Ce type d'agglomération risque de fortement compliquer la mise en œuvre de ce type de label pour l'immunochromatographie car la couleur et la stabilité colloïdale des bâtonnets sont sensibles à l'agglomération (Gluodenis, M.; Foss, C. A. *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 9484-9489). Lors de l'agglomération des bâtonnets, les plasmons de surface sont couplés. La fréquence de résonance des bandes plasmoniques est modifiée et leurs intensités fortement diminuées.

**[0009]** Les nanoparticules d'argent présentent des coefficients d'extinction encore plus élevés que ceux des nanoparticules d'or (Thompson, D. G.; Enright, A.; Faulds, K.; Smith, W. E.; Graham, D. *Analytical Chemistry* 2008, 80, 2805-2810). De ce fait les nanoparticules d'argent sont de bons candidats en tant que label pour le diagnostic immunochromatographique car l'analyse visuelle ou spectrométrique peut être faite à des concentrations plus faibles et d'autant plus si ces particules sont anisotropes. Cependant, l'argent est beaucoup moins employé car les nanoparticules d'argent sont instables et les synthèses de nanoparticules d'argent anisotropes ne permettent pas d'obtenir des particules suffisamment monodisperses.

**[0010]** Une façon pour obtenir des nanoparticules cumulant les avantages des nanoparticules d'argent avec celle des nanoparticules anisotropes et monodisperses est de recouvrir les bâtonnets d'or avec une couche d'argent. Cette couche d'argent augmente le coefficient d'extinction des nanobâtonnets et permet d'obtenir des couleurs de label différentes en fonction de l'épaisseur de cette couche. Différentes publications décrivent la formation d'une couche d'argent sur des bâtonnets d'or. Les bâtonnets d'or servent de germes en condition alcaline (pH>8) et en présence de bromure de cétrimonium (CTAB) ou d'un mélange CTAB - Chlorure d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium (BDAC) (Park, K.; Vaia, R. A. *Advanced Materials* 2008, 20, 3882-3886), de nitrate d'argent et d'acide ascorbique. Yang ajoute un tampon glycine pour stabiliser les ions Ag<sup>+</sup> et éviter la précipitation d'AgBr (Huang, C.-C.; Yang, Z.; Chang, H.-T. *Langmuir* 2004, 20, 6089-6092; Yang, Z.; Lin, Y.-W.; Tseng, W.-L.; Chang, H.-T. *Journal of Materials Chemistry* 2005, 15, 2450-2454). Le poly(vinylpyrrolidone) (PVP) et le citrate de sodium ont aussi été employés respectivement comme surfactant en complément du CTAB et comme réducteur (Liu; Guyot-Sionnest, P. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004, 108, 5882-5888). Cependant les couches d'argent ainsi obtenues en présence de surfactants halogènes sont instables. La couche d'argent s'oxyde progressivement en formant un léger précipité blanchâtre d'AgBr. Après quelques jours à quelques semaines, la couche d'argent est entièrement oxydée.

**[0011]** Par ailleurs, Gorelikov et Matsuura ont publié une méthode permettant de recouvrir sélectivement les bâtonnets d'or avec une couche de silice homogène en présence de CTAB et de tétraéthoxysilane (TEOS) en condition alcaline (Gorelikov, I.; Matsuura, N. *Nano Lett.* 2008, 8, 369-373). Cependant, cette méthode n'est pas directement applicable aux nanobâtonnets cœur-coquilles or-argent car la couche d'argent s'oxyde en présence de CTAB. Les ions Ag<sup>+</sup> libérés forment alors des particules d'oxyde d'argent ou d'argent pendant l'hydrolyse du TEOS. Cette méthode aboutit donc à un mélange de bâtonnets d'or partiellement enrobés de silice et de nanoparticules d'oxyde d'argent.

**[0012]** On connaît également des particules cœur-coquille-coquilles or-silice mésoporeuse-argent décrites par Wang (Wang, G.; Chen, Z.; Chen, L. *Nanoscale*, 3, 1756-1759). Cependant, la couche d'argent de ces particules n'est pas protégée par la couche de silice, ce qui complique fortement l'accroche d'organosilanes.

**[0013]** On connaît également des nanobâtonnets d'or recouverts d'une couche de silice mésoporeuse utilisés comme nanocapteurs de molécule biologique basés sur la résonance des plasmons de surface localisés (LSPR) (Wu, C.; Xu, Q.-H. *Langmuir*, 2009, 25, 9441-9446). Toutefois, ces nanocapteurs ne permettent pas une reconnaissance spécifique. En effet, une molécule, le glutathionne entre à l'intérieur des pores de la coquille de silice. L'indice de réfraction à proximité de la particule est modifié et la couleur (ou spectre UV-vis) de la particule est modifiée également. Les molécules pouvant pénétrer les pores auront un effet similaire. Les particules et le phénomène décrits par Wu ne peuvent donc pas être utilisés pour le diagnostic immunochromatographique.

**[0014]** Un but de la présente invention est donc de pallier ces inconvénients, en proposant des nanoparticules cœur-coquille métal-silice, et plus particulièrement des nanoparticules or-silice permettant de fabriquer des dispositifs de test par immunochromatographie présentant une sensibilité améliorée par rapport aux dispositifs existants.

**[0015]** Un autre but de la présente invention est de proposer des nanoparticules cœur-coquille-coquille métal-métal-silice, et plus particulièrement des nanoparticules or-argent-silice permettant de fabriquer des dispositifs de test par immunochromatographie présentant une sensibilité améliorée par rapport aux dispositifs existants.

### **Divulgation de l'invention**

**[0016]** A cet effet, il est proposé une nanoparticule cœur-coquille comprenant au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels.

**[0017]** Selon l'invention, la silice comprend à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation de ladite nanoparticule.

**[0018]** La présente invention concerne également un procédé de fabrication de telles nanoparticules cœur-coquille, ledit procédé comprenant:

- la préparation de nanoparticules dans un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge,
- la formation d'une coquille de silice sur lesdites nanoparticules,
- le greffage de groupes fonctionnels sur la silice, et
- le greffage à la surface de la silice d'agents de stabilisation desdites nanoparticules.

**[0019]** La présente invention concerne également l'utilisation de telles nanoparticules cœur-coquille comme marqueur d'une molécule biologique dans un dispositif de test par immunochromatographie.

**[0020]** La présente invention concerne également une nanoparticule cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, la coquille métallique étant stabilisée par un agent surfactant sans halogénure.

**[0021]** La présente invention concerne également un procédé de fabrication d'une suspension stable de telles nanoparticules cœur-coquille, ledit procédé comprenant:

- la préparation de nanoparticules cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, par formation d'une couche du second matériau autour des nanoparticules du premier matériau en présence d'agents surfactants ayant un contre-ion halogénure,
- l'addition d'agents surfactants sans halogénure pour remplacer les agents surfactants ayant un contre-ion halogénure, et
- l'élimination desdits agents surfactants ayant un contre-ion halogénure.

**[0022]** La présente invention concerne également un dispositif de test par immunochromatographie pour la détection d'au moins un analyte, comprenant des agents de liaison spécifiques de l'analyte, lesdits agents de liaison étant marqués par des nanoparticules, dans lequel les nanoparticules comprennent au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels.

### **Brève description des dessins**

**[0023]** L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemples et faite en référence aux dessins dans lesquels:

- la fig. 1 représente des spectres UV-visible de nanoparticules cœur-coquille or-argent stabilisées selon l'invention par un agent surfactant sans halogénure en comparaison à des nanoparticules stabilisées par un agent surfactant ayant un contre-ion halogénure;

## CH 705 758 A1

- les fig. 2a et 2b représentent des images TEM de nanoparticules cœur-coquille-coquille or-argent-silice préparées selon l'exemple 3 correspondant à l'invention et la fig. 2c représente une image TEM de nanoparticules cœur-coquille-coquille or-argent-silice préparées selon l'exemple comparatif 4; et
- la fig. 3 représente le potentiel zêta de particules selon les exemples 6 et 7 en fonction du pH.

### Mode(s) de réalisation de l'invention

**[0024]** La présente invention concerne tout d'abord des nanoparticules cœur-coquille comprenant au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice.

**[0025]** Ledit premier matériau métallique est de préférence choisi parmi le groupe comprenant l'or, l'argent, le cuivre, le palladium, le platine, le rhodium, et leurs mélanges.

**[0026]** La nanoparticule formant le cœur des nanoparticules cœur-coquille selon l'invention peut présenter une forme choisie parmi la forme sphérique ou cylindrique. Dans le cas d'une forme cylindrique, le diamètre de la nanoparticule formant le cœur est de préférence compris entre 1 et 100 nm. Dans le cas d'une forme cylindrique ou de bâtonnet, les dimensions et les distributions sont variées. La largeur du bâtonnet peut être comprise entre 1 nm et 200 nm, et de préférence entre 1 nm et 30 nm et la longueur du bâtonnet peut être comprise entre 2 nm et 400 nm, et de préférence entre 10 nm à 100 nm avec des ratios d'aspect (RA, longueur/largeur) compris entre 1 et 7. De tels sphères et bâtonnets sont préparés selon des méthodes bien connues de l'homme du métier.

**[0027]** De préférence, le cœur des nanoparticules cœur-coquille selon l'invention est une nanoparticule d'or, et plus particulièrement une nanoparticule d'or sous la forme de bâtonnet.

**[0028]** Selon une variante de réalisation de l'invention, la nanoparticule cœur-coquille décrite ci-dessus peut comprendre en outre une coquille intermédiaire métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau utilisé pour le cœur.

**[0029]** Selon un mode de réalisation préféré, la coquille intermédiaire est en argent. Selon un mode de réalisation préféré, le cœur des nanoparticules est en or et la coquille intermédiaire est en argent.

**[0030]** La coquille intermédiaire métallique peut avoir une épaisseur, homogène ou non, comprise entre 1 nm et 200 nm, et de préférence inférieure à 100 nm.

**[0031]** De même, la coquille de silice peut avoir une épaisseur, homogène ou non, comprise entre 1 nm et 300 nm et de préférence entre 10 nm et 200 nm.

**[0032]** De préférence, l'épaisseur de la coquille de silice est supérieure à 10 nm de manière à éviter un changement de coloration du label dû à un changement de l'indice de réfraction de l'environnement proche de la particule métallique ou dû au couplage interparticule des plasmons de surface.

**[0033]** De préférence, l'épaisseur de la coquille de silice est inférieure à 200 nm de façon à éviter une décantation trop rapide des particules et une mauvaise migration sur la membrane du test.

**[0034]** La silice peut être poreuse ou dense.

**[0035]** La silice constituant la coquille comprend des groupes fonctionnels.

**[0036]** De préférence, le groupe fonctionnel modifiant la silice est capable de générer une interaction avec une molécule biologique. Plus particulièrement, lesdits groupes fonctionnels modifiant la silice sont capables d'être conjugués à une molécule biologique qui est un agent de liaison ou de reconnaissance spécifique à un analyte. De préférence, les groupes fonctionnels permettent la conjugaison d'anticorps spécifiques d'un antigène à détecter.

**[0037]** De tels groupements fonctionnels sont par exemple des fonctions aminé, imine, urée, hydrazine, maléimide, isocyanate, thiol, disulfure, acide carboxylique, anhydride d'acide, nitrile, ester de N-hydroxysuccinimide, ester de N-hydroxy-succinimide, époxyde, imidoester, acide phosphonique, hydroxyle, aldéhyde, cétone, hydrogène activé, azide ou alcyne.

**[0038]** En outre, selon l'invention, la silice comprend à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation de ladite nanoparticule.

**[0039]** D'une manière avantageuse, les agents de stabilisation sont choisis pour être inertes chimiquement lors d'une réaction de couplage ou de conjugaison de la nanoparticule avec une molécule biologique.

**[0040]** De préférence, lesdits agents de stabilisation sont des chaînes chargées et/ou polaires permettant d'éviter l'agglomération des nanoparticules ou des conjugués soit en conservant un potentiel zêta fortement négatif soit par encombrement stérique. Les chaînes polaires inertes chimiquement peuvent être des chaînes organiques comprenant un groupement ionisable à pKa bas ou élevés conservant respectivement une charge négative et positive sur une large gamme de pH. Les groupements à pKa faibles sont préférés car les groupements silanols portés par la silice sont char-

gés négativement sur une large gamme de pH. Le greffage de groupement positif neutralise les charges négatives de la surface de silice et entraîne une agglomération des particules. Des exemples de groupement à pKa faible sont les méthylphosphonates et les sulfonates. Les aminés quaternaires sont des exemples de groupement à pKa élevés. Des chaînes polaires non-ionisables peuvent également être utilisées. Par exemple, les chaînes polyéther tels que les polyéthylènes glycol sont efficaces contre l'agglomération des nanoparticules selon l'invention.

**[0041]** De préférence, lesdits groupes fonctionnels et lesdits agents de stabilisation sont issus respectivement d'organosilanes capables de se greffer sur la silice. Plus particulièrement, selon la présente invention, on utilise un mélange d'organosilanes comportant, outre lesdits groupes fonctionnels ou lesdits agents de stabilisation, une ou plusieurs fonctions hydrolysables permettant la condensation de l'organosilane sur la coquille de silice.

**[0042]** Les fonctions hydrolysables sont par exemple des mono, di ou tri-alcoxy-silanes, des mono, di ou tri-acétoxy-silanes des mono, di ou tri-chlorosilanes ou encore des organosilanes déjà hydrolysés tels que les mono, di ou tri-silanol.

**[0043]** Les organosilanes possèdent en plus de leurs fonctions hydrolysables, un ou plusieurs groupes fonctionnels ou un ou plusieurs agents de stabilisation.

**[0044]** La présente invention concerne également un procédé de fabrication des nanoparticules cœur-coquille décrites ci-dessus, ledit procédé comprenant:

- la préparation de nanoparticules dans un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge,
- la formation d'une coquille de silice sur lesdites nanoparticules,
- le greffage de groupes fonctionnels sur la silice, et
- le greffage à la surface de la silice d'agents de stabilisation desdites nanoparticules.

**[0045]** D'une manière avantageuse, le greffage des groupes fonctionnels et des agents de stabilisation sur la silice est réalisé par réaction de condensation d'organosilanes portant lesdits groupes fonctionnels et d'organosilanes portant lesdits agents de stabilisation.

**[0046]** De tels organosilanes ont été décrits ci-dessus.

**[0047]** L'hydrolyse et condensation des organosilanes sont faites en solution dans un solvant polaire ou apolaire et catalysées par une base ou un acide. La température de réaction peut aussi influencer la réaction. Le choix du solvant ou du mélange de solvant ainsi que du pH de la solution est optimisé de façon à condenser sélectivement les organosilanes sur la surface de silice en évitant la formation de gel de silice difficilement séparable des particules fonctionnalisées. Les choix des ratios bâtonnets/organosilanes et organosilanes chimiquement actif/organosilane inertes sont optimisés de façon à respectivement fonctionnaliser la coque de silice au maximum et à obtenir un bon compromis entre la stabilité colloïdale et la réactivité lors des réactions de conjugaison. Enfin la température de la solution peut être augmentée jusqu'à l'ébullition pour accélérer et optimiser le greffage des organosilanes. Finalement, des organosilanes ne possédant qu'une seule fonction hydrolysable telle que le triméthylméthoxy-silane ou le triméthylchlorosilane peuvent être utilisés pour passer la surface.

**[0048]** Les excès organosilanes non-greffés peuvent être éliminés par exemple par centrifugation, ultrafiltration, dialyse, distillation, extraction ou chromatographie (échange ou exclusion).

**[0049]** Lorsque les nanoparticules selon l'invention comprennent une coquille métallique intermédiaire telle que décrite ci-dessus, le procédé de fabrication de nanoparticules selon l'invention comprend, préalablement à la formation de la coquille de silice, une étape de formation d'une coquille intermédiaire métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, en présence d'agents surfactants ayant un contre-ion halogénure. Un tel agent surfactant est par exemple le bromure de cétrimonium (CTAB).

**[0050]** La couche d'argent est déposée selon des méthodes décrites dans la littérature. Le nitrate d'argent est réduit sélectivement sur la surface des nanoparticules constituant le cœur. D'autres sels d'argent peuvent être utilisés comme par exemple le sulfate d'argent ou le citrate d'argent. L'acide ascorbique est utilisé comme réducteur. La vitesse de réduction est contrôlée par le pH de la solution. Le pH est augmenté en ajoutant une solution basique comme par exemple une solution de soude ou d'ammoniaque. D'autres molécules à pouvoir réducteur faible comme par exemple l'hydroquinone, le glucose et l'acide citrique peuvent aussi être utilisées comme réducteur. Lors de la réduction de l'argent, les nanoparticules sont stabilisées par le CTAB ou un mélange CTAB/BDAC (Chlorure d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium).

**[0051]** Les nanoparticules d'or (argent) sphériques exhibent une bande plasmonique comprise entre 500 (400) et 560 (560) nm environ. La longueur d'onde de la bande plasmonique dépend de la taille de la particule. Cette longueur d'onde augmente avec le diamètre de la particule. Les nanobâtonnets d'or exhibent deux bandes plasmoniques, la bande plasmonique longitudinale et la bande plasmonique latérale, qui correspondent respectivement à l'oscillation collective des électrons le long et perpendiculairement à l'axe principal des bâtonnets. La longueur d'onde de la bande longitudinale est comprise entre environ 500 (RA=1) et 1500 (RA=7) nm en fonction du RA (Ratio d'Aspect) alors que la longueur d'onde de la bande latérale est similaire à la bande plasmonique des particules sphériques d'or à environ 510 nm.

**[0052]** Lors de la formation de la couche d'argent sur les nanobâtonnets d'or, une troisième bande plasmonique dite hybride apparaît à environ 380 nm. De plus, les longueurs d'ondes des bandes plasmoniques longitudinales et latérales diminuent de plus en plus au fur et à mesure que l'épaisseur de la couche d'argent augmente. De même, l'intensité des trois bandes plasmoniques augmente avec l'épaisseur de la couche d'argent. Il est possible de créer une multitude de particules cœur-coquilles or-argent en jouant sur les dimensions du cœur ainsi que sur l'épaisseur de la couche d'argent. Il est ainsi possible d'obtenir une large gamme de label pour le diagnostic immunochromatographique avec différentes nuances de brun, rouge, orange, bleu et vert par exemple. De plus il est possible d'obtenir des labels ayant un pouvoir colorant extrêmement fort avec des coefficients d'extinction molaire allant jusqu'à  $2.44 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour la bande plasmonique longitudinale et se cumulant avec le pouvoir colorant des deux autres bandes. Pour augmenter la sensibilité des tests immunochromatographiques, on choisira de préférence un cœur anisotrope ayant un volume d'environ 30 à 40 nm ou plus et une coquille d'argent de 10 nm. Finalement, la formation de la coquille de silice entraîne une augmentation des longueurs d'ondes des bandes plasmoniques causée par le changement d'indice de réfraction à la surface des particules. Cependant, les intensités des bandes plasmoniques restent inchangées.

**[0053]** D'une manière particulièrement avantageuse, le procédé de fabrication de nanoparticules selon l'invention comprend en outre une étape d'addition d'agents surfactants sans halogénure pour remplacer les agents surfactants ayant un contre-ion halogénure, et l'élimination des agents surfactants ayant un contre-ion halogénure.

**[0054]** L'agent surfactant sans halogénure peut être un agent surfactant cationique, anionique ou non ionique.

**[0055]** Un agent surfactant cationique sans halogénure est par exemple choisi parmi le groupe comprenant le nitrate de cétrimonium, l'hydroxyde de cétrimonium, le nitrate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le sulfate de cétrimonium, le sulfate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le phosphate de cétrimonium, le phosphate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium.

**[0056]** Un agent surfactant non ionique sans halogénure est par exemple choisi parmi le groupe comprenant le Triton® X-100, le nonaéthylène glycol monododécyl éther, N-nonanoyl-N-méthylglucamine, le Nonidet® P40, le nonyl B-D-glucopyranoside, l'octaéthylène glycol monododécyl éther. **[0057]** Un agent surfactant anionique sans halogénure est par le sodium dodécylsulfate.

**[0057]** Il est bien évident que d'autres agents surfactants sans halogénure appropriés peuvent être utilisés.

**[0058]** De préférence, on utilise un agent surfactant cationique.

**[0059]** La concentration en agent surfactant sans halogénure est de préférence comprise entre 1 mM et 0.1 M.

**[0060]** Ce procédé permet notamment de recouvrir sélectivement les nanoparticules présentant une coquille intermédiaire d'argent avec une couche de silice homogène, sans l'ajout de précurseurs généralement utilisés (silane, citrate, PVP, poly-électrolyte, enzyme ou gélatine). En effet, ces surfactants non-halogénés, de préférence cationiques, confèrent une bonne stabilité colloïdale, une bonne stabilité contre l'oxydation de la couche d'argent et sont suffisamment vitrophiles pour permettre la formation d'une couche homogène et sélective de silice.

**[0061]** Dans la présente invention, l'agent surfactant ayant un contre-ion halogénure utilisé lors de la formation de la coquille métallique intermédiaire est substitué par l'agent surfactant sans halogénure par centrifugation, ultrafiltration, extraction, dialyse ou précipitation à froid. Le remplacement de l'agent surfactant ayant un contre-ion halogénure par un agent surfactant sans halogénure permet d'éviter l'oxydation de la couche intermédiaire, et plus spécifiquement de la couche d'argent. De plus, cette étape permet d'éliminer les excès de réactif tels que l'acide ascorbique, sel d'argent introduit lors de la formation de la couche d'argent. Les nanobâtonnets cœur-coquille ainsi purifiés peuvent être conservés plusieurs mois sans évolution des propriétés optiques. Les nanobâtonnets cœur-coquille stabilisés par un agent surfactant sans halogénure peuvent être enrobés sélectivement d'une couche de silice homogène en une seule étape.

**[0062]** Ainsi, un procédé préféré de fabrication des nanoparticules selon l'invention comprend les étapes de:

- préparation de nanoparticules cœur-coquille intermédiaires, de préférence or-argent, en présence d'agents surfactants ayant un contre-ion halogénure;
- purification et stabilisation des nanoparticules obtenues par l'agent surfactant sans halogénure selon les méthodes listées ci-dessus;
- ajustement du pH de la solution entre 9 et 12 en utilisant par exemple une solution de soude ou d'ammoniac. D'autre base peuvent être utilisée.
- mélange de la solution avec une solution alcoolique de tétraéthylorthosilicate ou directement avec le tétraéthylorthosilicate pour obtenir la particule enrobée de silice.

**[0063]** D'autres alcoxysilanes peuvent être utilisés.

**[0064]** La couche de silice apporte trois avantages, (i) Elle stabilise l'éventuelle couche intermédiaire d'argent en la protégeant par exemple des halogénures contenus dans les différentes solutions tampons utilisés lors de la préparation des conjugués et la préparation des tests immunochromatographiques. (ii) La couche de silice permet de stabiliser la coloration des nanoparticules obtenues en gardant constante la constante diélectrique à la surface desdites nanoparticules et en prévenant le couplage des plasmons de surface desdites nanoparticules lorsque celles-ci sont trop proches. Le couplage des bandes plasmoniques est nul lorsque la distance entre deux nanoparticules est supérieure à environ 20 nm.

Ainsi une couche de silice de 10 nm est largement suffisante, (iii) Finalement, les groupements silanols de la couche de silice permettent, comme on l'a vu ci-dessus, le greffage de nombreux organosilanes offrant une large gamme de chimie de surface particulièrement appropriée pour la conjugaison des molécules biologiques, et plus particulièrement des anticorps. Ces organosilanes sont fortement liés à la couche de silice alors que les surfactants adsorbés à la surface des colloïdes d'or utilisés dans l'état de la technique peuvent très facilement s'échanger entre différentes particules. Pour cette raison, les nanoparticules cœur-coquilles et cœur-coquille-coquilles fonctionnalisées et stabilisées selon l'invention avec un mélange d'organosilanes sont particulièrement appropriées pour les tests immunochromatographiques multiplexes. En effet, les risques d'échange d'anticorps entre les différents conjugués nanoparticules-anticorps sont moindres avec les nanoparticules cœur-coquilles et cœur-coquille-coquilles fonctionnalisées et stabilisées avec un mélange d'organosilanes selon l'invention.

**[0065]** La couche externe de silice des nanoparticules cœur-coquille ou cœur-coquille-coquille offre la possibilité de greffer une large variété d'organosilanes tels que par exemple le 3-aminopropyl triéthoxysilane (APTES) ou le carboxyéthylsilanetriol (CEST). Ces groupements fonctionnels permettent la conjugaison de ces nanomatériaux avec des anticorps et donc leur utilisation en tant que label pour le diagnostique immunochromatographique. Cependant, ces fonctionnalisations posent des problèmes de stabilité. Par exemple une trop grande densité de groupements acide carboxylique entraîne une agglomération des particules à pH acide. Ce phénomène est dû à la perte des charges négatives à la surface lors de la protonation des acides carboxyliques et aux liaisons hydrogènes formées entre les acides portés par les particules. De plus, une trop forte densité d'acide carboxylique est aussi problématique lors des réactions de conjugaison d'anticorps. Par exemple, lors de la formation de liaisons de type peptidique (amide) en utilisant le 1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS), la formation des acides activés intermédiaires neutralisent drastiquement les charges de surface et provoque l'agglomération des particules. Un problème d'agglomération est aussi observé pendant la fonctionnalisation avec l'APTMS. La surface de la silice et les groupements aminés de l'APTMS portent respectivement des charges négatives et positives. Lors du greffage de l'APTMS, les charges se neutralisent et le potentiel zêta devient trop faible pour stabiliser les particules qui par conséquent s'agglomèrent.

**[0066]** La solution apportée par la présente invention, consistant à utiliser un mélange d'organosilanes fonctionnel et d'organosilanes chimiquement inertes tels que décrits ci-dessus permet d'éviter les problèmes d'agglomération lors du greffage, du stockage ou de la conjugaison des nanoparticules avec un anticorps.

**[0067]** Les organosilanes fonctionnels tels que par exemple l'APTMS ou le CEST permettent l'accroche des anticorps alors que les organosilanes chimiquement inertes évitent l'agglomération des nanoparticules ou des conjugués soit en conservant un potentiel zêta fortement négatif soit par encombrement stérique.

**[0068]** Les nanoparticules cœur-coquille selon l'invention décrites ci-dessus peuvent être utilisées comme marqueur d'une molécule biologique dans un dispositif de test par immunochromatographie.

**[0069]** La présente invention concerne également, comme produit intermédiaire notamment, une nanoparticule cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, ladite coquille métallique étant stabilisée par un agent surfactant sans halogénure.

**[0070]** Une telle nanoparticule est utilisée pour fabriquer une nanoparticule décrite ci-dessus comprenant une coquille intermédiaire. L'agent surfactant est cationique, anionique ou non ionique et correspond à l'agent surfactant sans halogénure décrit ci-dessus. De préférence, cet agent surfactant sans halogénure est choisi parmi le groupe comprenant le nitrate de cétrimonium, l'hydroxyde de cétrimonium, le nitrate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le sulfate de cétrimonium, le sulfate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le phosphate de cétrimonium, le phosphate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le Triton® X-100, le nonaéthylène glycol monododécyl éther, N-nonanoyl-N-méthylglucamine, le Nonidet® P40, le nonyl B-D-glucopyranoside, l'octaéthylène glycol monododécyl éther et le sodium dodécylsulfate.

**[0071]** Ladite nanoparticule formant le cœur peut présenter une forme choisie parmi la forme sphérique ou cylindrique, selon les mêmes caractéristiques que décrites ci-dessus.

**[0072]** D'une manière avantageuse, le cœur est une nanoparticule d'or, de préférence anisotrope. De préférence, la coquille métallique est en argent. De préférence, la nanoparticule, en tant que produit intermédiaire, est une nanoparticule cœur-coquille or-argent.

**[0073]** La présente invention concerne également un procédé de fabrication d'une suspension stable de nanoparticules, telles que les nanoparticules décrites ci-dessus en tant que produit intermédiaire, ce procédé comprenant:

- la préparation de nanoparticules cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier

matériau, par formation d'une couche du second matériau autour des nanoparticules du premier matériau en présence d'agents surfactants ayant un contre-ion halogénure,

- l'addition d'agents surfactants sans halogénure pour remplacer les agents surfactants ayant un contre-ion halogénure, et
- l'élimination desdits agents surfactants ayant un contre-ion halogénure.

**[0074]** L'agent surfactant sans halogénure est de préférence choisi parmi le groupe comprenant le nitrate de cétrimonium, l'hydroxyde de cétrimonium, le nitrate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le sulfate de cétrimonium, le sulfate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le phosphate de cétrimonium, le phosphate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le Triton® X-100, le nonaéthylène glycol monododécyl éther, N-nonanoyl-N-méthylglucamine, le Nonidet® P40, le nonyl (3-D-glucopyranoside, l'octaéthylène glycol monododécyl éther et le sodium dodécylsulfate, ou tout autre surfactant sans halogénure approprié.

**[0075]** Les caractéristiques des différents réactifs sont décrites ci-dessus.

**[0076]** [0076] Comme on l'a vu ci-dessus, les nanoparticules cœur-coquille ainsi obtenues sont purifiées et peuvent être conservées plusieurs mois sans évolution des propriétés optiques.

**[0077]** La présente invention concerne également un dispositif de test par immunochromatographie pour la détection d'au moins un analyte, comprenant des agents de liaison ou de reconnaissance spécifiques de l'analyte, lesdits agents de liaison ou de reconnaissance étant marqués par des nanoparticules conjuguées audit agent de reconnaissance, lesdites nanoparticules comprenant au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels.

**[0078]** De telles nanoparticules sont utilisées en tant que label pour le diagnostic immunochromatographique.

**[0079]** Tels qu'utilisés ici, le terme «label» se rapporte à des matériaux colorés permettant de détecter la(les) molécule(s) recherchée(s) suite à l'immobilisation du (des) complexe(s) sur la (les) ligne(s) test(s) de la bandelette immunochromatographique. La détection peut-être visuelle ou utiliser un appareil de détection spécialisé.

**[0080]** D'une manière particulièrement préférée, la silice comprend en outre, à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation desdites nanoparticules.

**[0081]** Les agents de stabilisation sont choisis pour être inertes chimiquement lors d'une réaction de couplage ou de conjugaison des nanoparticules avec les agents de liaison.

**[0082]** Les groupes fonctionnels modifiant la silice sont capables de générer une interaction avec les agents de liaison spécifique à l'analyte.

**[0083]** D'une manière avantageuse, les groupes fonctionnels et les agents de stabilisation sont issus d'organosilanes capables de se greffer sur la silice.

**[0084]** La nanoparticule formant le cœur des nanoparticules peut présenter une forme choisie parmi la forme sphérique ou cylindrique.

**[0085]** De préférence, le cœur des nanoparticules est une nanoparticule d'or.

**[0086]** Selon un mode de réalisation préféré, les nanoparticules comprennent en outre une coquille intermédiaire métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau de la coquille intermédiaire étant différent du premier matériau constituant le cœur des nanoparticules.

**[0087]** De préférence, la coquille intermédiaire est en argent.

**[0088]** De préférence, on utilise des nanoparticules cœur-coquille-coquille or-argent-silice.

**[0089]** Les caractéristiques détaillées des différents composants et des procédés de fabrication des nanoparticules sont décrites ci-dessus.

**[0090]** D'une manière avantageuse, l'analyte à détecter est un antigène et l'agent de liaison est un anticorps spécifique de l'antigène.

**[0091]** Les nanoparticules cœur-coquille ou cœur-coquille-coquille fonctionnalisées ainsi que les nanoparticules cœur-coquille ou cœur-coquille-coquilles fonctionnalisées et stabilisées selon la présente invention peuvent être conjuguées de façon chimique ou physique avec un agent de reconnaissance spécifique à l'analyte. Le conjugué ainsi préparé peut être utilisé pour la détection qualitative ou quantitative de l'analyte ciblé dans un test immunochromatographique.

**[0092]** Les agents de liaison spécifique sont par exemple des anticorps monoclonaux ou polyclonaux portant un ou des sites de reconnaissance moléculaire (paratope) spécifique à l'antigène complémentaire recherché. D'autres exemples de couples de molécule exhibant une reconnaissance spécifique exploitable pour la préparation de tests immunochromatographiques sont les paires haptène/antigène, ligand/récepteur, substrat/enzyme, inhibiteur enzyme, carbohydrate/lectine, biotine/avidine (biotine/streptavidine), virus/récepteur cellulaire.

**[0093]** La conjugaison correspond à la réaction de couplage entre le label (nanoparticule) et l'agent de liaison spécifique. Les méthodes de conjugaisons sont variées. De nombreux livres et articles décrivent ces réactions de conjugaison qui sont connues de l'homme du métier. La méthode la plus répandue est la formation d'amide à partir des fonctions acides carboxyliques et aminés disponibles à la surface du label et de l'agent de liaison spécifique.

**[0094]** Les conjugués décrits dans la présente invention peuvent être intégrés dans la préparation de tests immunochromatographiques. Les méthodes de préparation de ces tests sont détaillées par exemples dans la demande de brevet WO 2008/030546.

**[0095]** Exemples

**[0096]** Exemple 1 (invention)

**[0097]** Nanoparticules cœur-coquille or-argent en suspension dans le CTAN

**[0098]** Des nanobâtonnets d'or ayant un RA de 4.2 sont préparés selon la méthode publiée par Nikoobakht (citée plus haut). Une solution de croissance est préparée en mélangeant (agitation magnétique) à 27°C, 500 mL d'une solution aqueuse de CTAB (0.2M), 30 mL d'une solution aqueuse de nitrate d'argent (4 mM), 500 mL d'une solution aqueuse d'acide tétrachloroaurique (1mM) et 5.39 mL d'une solution aqueuse d'acide ascorbique (78 mM). Des nanoparticules sphériques d'or (germes) sont préparées en mélangeant à 27°C, 5 mL d'eau, 5 mL d'une solution aqueuse d'acide tétrachloroaurique (1mM), 10 mL d'une solution aqueuse de CTAB (0.2M) et 0.6 mL d'une solution aqueuse glacée de borohydrure de sodium (1 mM). Quelques minutes après l'ajout du borohydrure, 1.6 mL de la solution brune de germes sont ajoutés dans la solution de croissance. La solution est laissée sous agitation magnétique pendant trois heures. La solution devient lentement brune. Les excès de réactifs sont éliminés par centrifugation et les bâtonnets d'or sont redispersés dans un litre d'eau ultra pure.

**[0099]** Les nanobâtonnets cœur-coquilles Au-Ag sont préparés en mélangeant, 1 L de la solution de bâtonnets d'or, 2 mL d'une solution aqueuse de nitrate d'argent (0.1 M), 8 mL d'une solution aqueuse d'acide ascorbique (0.1 M) et 175 mL d'une solution de soude (0.01 M). La solution devient progressivement verte indiquant la formation de la coquille d'argent autour des bâtonnets d'or. On dissout 34.64 g de CTAN dans la solution. Les excès de réactifs sont éliminés par centrifugation et les bâtonnets cœur-coquilles Au-Ag sont redispersés dans 1 L d'eau ultra pure. Les nanobâtonnets cœur-coquilles Au-Ag s'agglomèrent de façon irréversible si le CTAN n'est pas rajouté avant la centrifugation.

**[0100]** Exemple 2 (comparatif)

**[0101]** Nanobâtonnets cœur-coquilles or-argent en suspension dans le CTAB.

**[0102]** Des nanobâtonnets d'or ayant un RA de 4.2 sont préparés exactement selon la méthode décrite dans l'Exemple 1 (paragraphe [0097]). De même, des nanobâtonnets cœur-coquilles Au-Ag sont préparés selon la méthode décrite dans l'Exemple 1 (paragraphe [0098]). Cependant, 36.44 g de CTAB sont dissous dans la solution à la place de 34.64 g de CTAN avant que les excès de réactif soient éliminés par centrifugation et les bâtonnets cœur-coquilles Au-Ag sont redispersés dans 1 L d'eau ultra pure.

**[0103]** Comparaison des exemples 1 (invention) et 2 (comparatif)

**[0104]** Comparaison des stabilités des coquilles d'argent sur des particules en suspension dans un surfactant en présence ou non d'halogénures

**[0105]** Dans le but de comparer la stabilité des nanobâtonnets cœur-coquille or-argent en suspension dans une solution contenant du CTAN et en présence ou non d'halogénure, des spectres UV-visible ont été mesurés pour des nanobâtonnets cœur-coquilles or-argent suspendus pendant 2 semaines dans une solution contenant du CTAN (courbe A), des nanobâtonnets cœur-coquilles or-argent suspendus pendant 12 heures dans une solution contenant du CTAN et 0.1 M de NaBr (courbe B) et des nanobâtonnets d'or utilisés comme germe pour la préparation des nanobâtonnets cœur-coquille or-argent et en suspension dans le CTAB (courbe C). Les spectres UV-visible de la fig. 1 montrent que le spectre UV-vis des nanobâtonnets cœur-coquille dispersés dans une solution contenant des ions bromures (courbe B) est quasiment identique au spectre des germes (nanobâtonnets d'or) (courbe C). De plus, la solution de germes et bâtonnets cœur-coquille ont la même couleur brune. Ces observations démontrent que la couche d'argent est rapidement oxydée en présence d'halogénure. En revanche, les nanobâtonnets cœur-coquille or-argent conservés en absence d'ions bromures conservent leur coloration verte et le spectre caractéristique des nanobâtonnets cœur-coquille préparés dans l'Exemple 1. Ces spectres montrent que le CTAN est bien approprié pour la conservation des particules d'argent ou ayant une coquille d'argent.

**[0106]** Exemple 3

**[0107]** Formation de la coquille de silice sur les nanobâtonnets cœur-coquille or-argent stockés dans une solution de CTAN (sans halogénures).

**[0108]** Le pH de la solution de nanobâtonnets cœur-coquille Au-Ag préparées selon l'exemple 1 est ajusté à 10.5 à l'aide d'une solution de soude (0.1 M). Trois fractions de 40 mL d'une solution à 20 V% en TEOS dans le méthanol sont ajoutées goutte à goutte avec un espacement de 30 minutes entre chaque fraction. La solution change très légèrement de coloration. Les excès de réactifs sont éliminés par centrifugation et les nanobâtonnets cœur-coquille-coquilles Au-Ag-silice sont redispersés dans 1 L d'éthanol.

**[0109]** Exemple 4 (comparatif)

**[0110]** Formation de la coquille de silice sur les nanobâtonnets cœur-coquille or-argent stockés dans une solution de CTAB (présence d'halogénures).

**[0111]** Les nanobâtonnets cœur-coquille-coquille Au-Ag-silice sont préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 3 excepté que les germes utilisés sont les nanobâtonnets cœur-coquille Au-Ag préparés selon l'exemple comparatif 2 (suspension dans CTAB) et non selon l'Exemple 1 (suspension dans CTAN). Il faut noter que dans cet exemple comparatif, le pH diminue très rapidement après l'ajustement à pH 10.5 à cause de la formation de particules d'argent ou d'oxyde d'argent.

**[0112]** Exemple 5

**[0113]** Formation de la coquille de silice sur les nanobâtonnets d'or

**[0114]** Les nanobâtonnets cœur-coquille Au-silice sont préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 3 excepté que les germes utilisés sont les nanobâtonnets d'Or préparés selon l'exemple 1 (paragraphe [0097]). Dans cet exemple, le pH reste stable lors de l'ajustement.

**[0115]** Comparaison des exemples 3, 4 et 5

**[0116]** Stabilité de la coquille d'argent lors de la formation de la coquille de silice dans les surfactants contenant ou non des halogénures

**[0117]** Dans le but de comparer les produits obtenus lors de la formation d'une coquille de silice sur des nanobâtonnets cœur-coquilles Au-Ag en suspension soit dans le CTAN soit dans le CTAB, il a été observé au microscope électronique à transmission les échantillons de l'exemple 3 et de l'exemple 4 comparatif.

**[0118]** Pour la préparation des grilles d'observation, une goutte de solution est déposée et séchée sur une grille. Les micrographes de la fig. 2 montrent clairement que des nanoparticules d'argent ou d'oxyde d'argent sont formées en présence de bromure dans le CTAB à pH basique (fig. 2c) alors qu'aucune particule de ce genre n'est visible lorsque les nanobâtonnets cœur-coquilles or-argent sont suspendus dans le surfactant CTAN qui ne contient pas d'halogénure (fig. 2a et 2b). La stabilité du pH lors de l'ajustement à pH 10.5 dans l'exemple 5 confirme bien l'incompatibilité des surfactants avec des halogénures pour la formation d'une coquille de silice sur une couche d'argent.

**[0119]** Exemple 6 (invention)

**[0120]** Préparation des nanobâtonnets cœur-coquille or-silice fonctionnalisés avec des acides carboxyliques et stabilisés avec des méthylphosphonates

**[0121]** Les nanobâtonnets cœur-coquille or-silice préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 5 sont fonctionnalisés et stabilisés selon le procédé de l'invention avec un mélange de 3-(Trihydroxysilyl)propyl méthylphosphonate (THPMP sel à 42% dans l'eau, Gelest) et de carboxyethylsilanetriol (CEST). 54.2 ml de nanobâtonnets cœur-coquille or-silice sont ajoutés à 248 ml de solution tampon citrate (0.1 M, pH 3) dans un ballon de 500 mL équipé d'un barreau aimanté et d'un condenseur. Sous agitation, 17.72 mL de THPMP et 0.246 mL de CEST sont rajoutés avant de porter la solution à reflux pendant 12 heures. Les excès de réactif sont éliminés par centrifugation.

**[0122]** Exemple 7

**[0123]** Préparation des nanobâtonnets cœur-coquille or-silice fonctionnalisés avec des acides carboxyliques

**[0124]** Les nanobâtonnets cœur-coquilles or-silice préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 5 sont fonctionnalisés avec le carboxyethylsilanetriol (CEST, sel en solution à 25% dans l'eau, Gelest). 54.2 ml de nanobâtonnets cœur-coquilles or-silice sont ajoutés à 141.8 ml d'eau ultra-pure dans un bêcher de 300ml équipé d'un barreau aimanté. Sous agitation, 11.85 mL de CEST sont rajoutés et la solution est laissée sous agitation pendant 12 heures. Les excès de réactif sont éliminés par centrifugation.

**[0125]** [00125]

**[0126]** Comparaison des exemples 6 et 7

**[0127]** Différence de stabilité colloïdale entre les nanoparticules cœur-coquilles or-silice fonctionnalisées avec des acides carboxyliques ou avec un mélange d'acides carboxyliques et méthylphosphonates

**[0128]** Le potentiel zêta des nanobâtonnets cœur-coquilles or-silice fonctionnalisées avec des acides carboxyliques (Exemple 7)

**[0129]** Préparation des nanobâtonnets cœur-coquille or-silice fonctionnalisés avec des acides carboxyliques

**[0130]** ou avec un mélange d'acides carboxyliques et de méthylphosphonate (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) a été mesuré (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) dans le but de comparer la stabilité colloïdale des particules fonctionnalisées avec des acides carboxyliques d'une part et fonctionnalisées et stabilisées avec un mélange d'acides carboxyliques et de méthylphosphonates d'autre part. Les points représentés sous la forme de triangle représentent les potentiels zêtas des nanoparticules fonctionnalisées avec le mélange d'acides carboxyliques et de méthylphosphonates et les points

représentés sous la forme de carrés représentent les potentiels zêtas des nanoparticules fonctionnalisées avec les acides carboxyliques et non stabilisées.

**[0131]** Les potentiels zêtas des nanoparticules fonctionnalisées avec le mélange d'acides carboxyliques et de méthylphosphonates sont significativement plus négatifs sur la plage de pH mesurés. Ces mesures démontrent que l'addition de méthylphosphonate selon l'invention améliore la stabilité colloïdale des nanobâtonnets cœur-coquilles or-silice.

**[0132]** Exemple 8

**[0133]** Préparation du conjugué cœur-coquille Au-silice - Goat anti-rabbit IgG

**[0134]** On mélange 1 ml de nanobâtonnets cœur-coquille or-silice carboxylés (Exemple 7) en solution à 1% dans l'eau ultrapure à 1 ml d'EDC (sigma) à 2.6 mM dans un tampon MES (pH 6.1, 25 mM, sigma). On ajoute 4 mg de Goat anti-rabbit IgG. La solution est laissée sous agitation pendant une heure. La réaction est stoppée en centrifugeant la suspension. Le conjugué est resuspendu dans de l'eau ultrapure.

**[0135]** Exemple 9

**[0136]** Quantité minimale de nanoparticules immobilisées sur la ligne test pour observer un signal positif

**[0137]** Dans le but de démontrer le fort pouvoir colorant des labels utilisés dans la présente invention, des conjugués nanobâtonnets cœur-coquille or-silice - goat anti-rabbit IgG selon l'exemple 8 et colloïdes d'or - goat anti-rabbit IgG (British Biocell International) ont été comparés. Le nombre minimum de conjugués immobilisés sur la ligne test d'un test immunochromatographique et permettant une détection visuelle a été déterminé. Des quantités décroissantes de conjugués ont été déposées puis éluées sur des tigettes ayant une ligne de capture (rabbit IgG).

**[0138]** Une membrane de nitrocellulose ayant des pores de 8 µm et supportée par un plastique rigide est découpée en bandelettes de 10 mm de large sur 80 mm de long. 5 µl d'une solution de rabbit IgG à 1mg/ml dans l'eau ultrapure est déposée à la micropipette à 3 cm du bord supérieur de chaque tigette. Les lignes de capture sont séchées pendant 2 heures et immobilisées par immersion dans une solution à 0.1% en Tween® 20 et 1% en polyvinylpyrrolidone (PVP) puis séchées une seconde fois pendant 2 heures. 5 µl de conjugués nanoparticules-Goat anti-rabbit IgG dilués à des concentrations décroissantes dans une solution à 0.1% en Tween® 20 et 1% en PVP sont déposées à 3 cm du bord inférieur de chaque tigette et séchées pendant 2 heures. Les tigettes sont placées dans un tube contenant approximativement 0.5 cm de solution tampon phosphate. Les conjugués migrent vers la ligne d'immobilisation (rabbit IgG) et sont capturés après environ 1 minute.

**[0139]** Ces tests ont montré qu'il est possible de détecter visuellement l'immobilisation d'environ 20 millions de particules cœur-coquilles or-silice conjuguées à l'anticorps (Exemple 8) alors que des colloïdes de 40 nm ne sont pas visibles si moins de 30 millions de nanoparticules sphériques d'or sont immobilisées. Ce test démontre que le pouvoir colorant des nanoparticules cœur métallique-coquille de silice est environ 1.5 fois supérieur au pouvoir colorant des colloïdes d'or utilisés généralement dans les tests immunochromatographiques.

**[0140]** Par ailleurs, il faut noter que la bande plasmonique longitudinale des nanobâtonnets cœur-coquille or-silice utilisés dans cet exemple est majoritairement localisée dans le proche infrarouge et donc invisible pour l'œil humain. Par conséquent, des bâtonnets cœur-coquille-coquille or-argent-silice (exemple 3) ayant une bande plasmonique latérale entièrement localisée dans le visible et exhibant de plus un coefficient d'extinction molaire supérieur seront par exemple mieux adaptés pour une détection visuelle comparés aux nanobâtonnets cœur-coquille utilisés dans cet exemple.

**[0141]** Ce test montre que l'utilisation des nanoparticules cœur métallique-coquille de silice peut augmenter la sensibilité des tests immunochromatographiques si par ailleurs, les autres paramètres tels que par exemple le taux de conjugaison, la cinétique de complexation conjugué-antigène, les migrations des conjugués et des complexes conjugué-antigènes et l'immobilisation du complexe conjugué-antigène sont eux aussi optimisés.

### Revendications

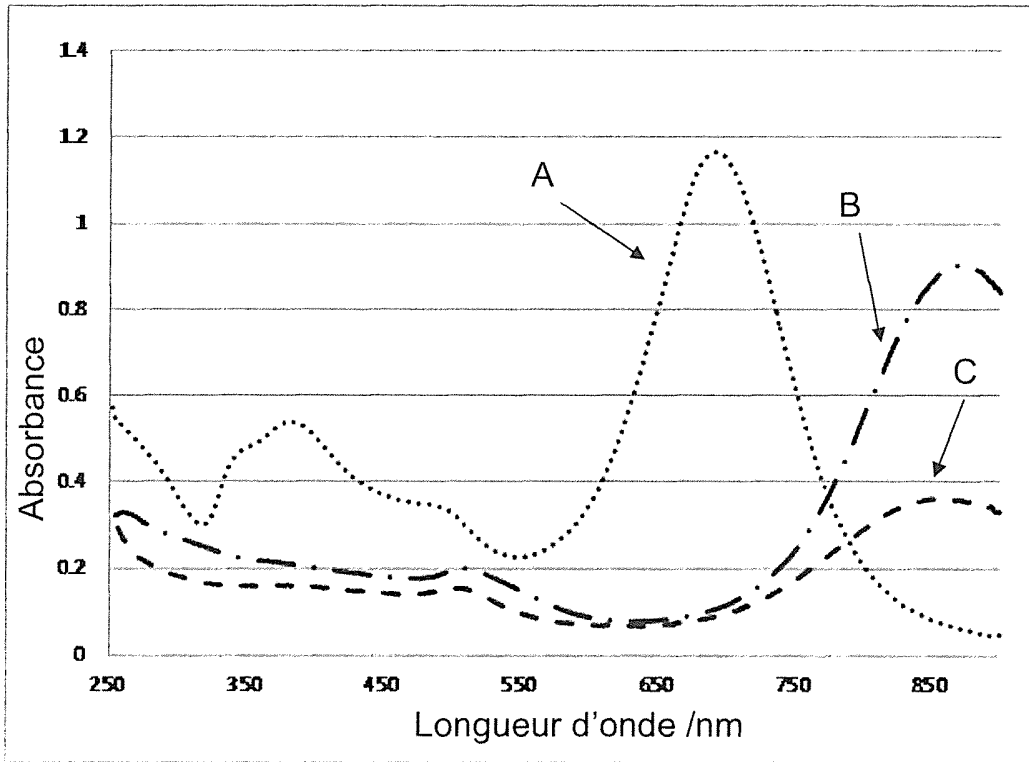
1. Nanoparticule cœur-coquille comprenant au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels, caractérisée en ce que la silice comprend à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation de ladite nanoparticule.
2. Nanoparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que les agents de stabilisation sont choisis pour être inertes chimiquement lors d'une réaction de couplage de la nanoparticule avec une molécule biologique.
3. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les groupes fonctionnels modifiant la silice sont capables de générer une interaction avec une molécule biologique.
4. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les groupes fonctionnels et les agents de stabilisation sont issus d'organosilanes capables de se greffer sur la silice.

## CH 705 758 A1

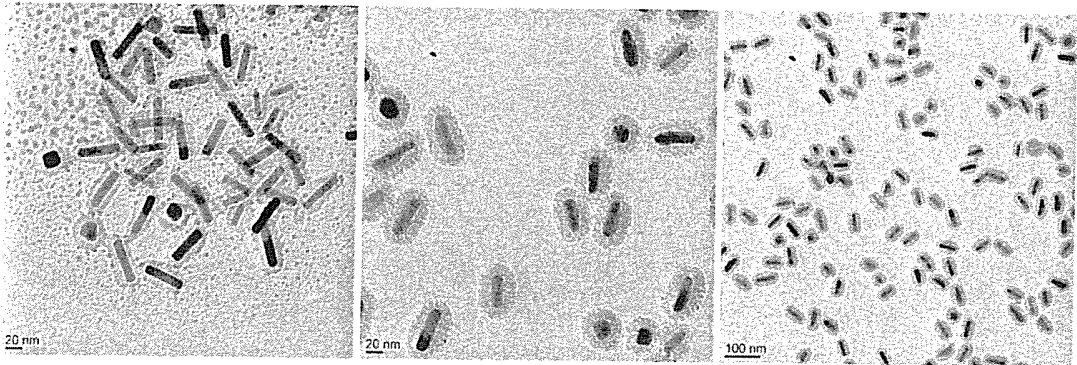
5. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le cœur est une nanoparticule d'or.
6. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la nanoparticule formant le cœur présente une forme choisie parmi la forme sphérique ou cylindrique.
7. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une coquille intermédiaire métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau.
8. Nanoparticule selon la revendication 7, caractérisée en ce que la coquille intermédiaire est en argent.
9. Nanoparticule cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, caractérisée en ce que la coquille métallique est stabilisée par un agent surfactant sans halogénure.
10. Nanoparticule selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent surfactant sans halogénure est choisi parmi le groupe comprenant le nitrate de cétrimonium, l'hydroxyde de cétrimonium, le nitrate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le sulfate de cétrimonium, le sulfate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le phosphate de cétrimonium, le phosphate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le Triton<sup>®</sup> X-100, le nonaéthylène glycol monododécyl éther, N-nonanoyl-N-méthylglucamine, le Nonidet<sup>®</sup> P40, le nonyl 6-D-glucopyranoside, l'octaéthylène glycol monododécyl éther et le sodium dodécylsulfate.
11. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 9 à 10, caractérisée en ce que le cœur est une nanoparticule d'or.
12. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce que la nanoparticule formant le cœur présente une forme choisie parmi la forme sphérique ou cylindrique.
13. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce que la coquille métallique est en argent.
14. Dispositif de test par immunochromatographie pour la détection d'au moins un analyte, comprenant des agents de liaison spécifiques de l'analyte, lesdits agents de liaison étant marqués par des nanoparticules, caractérisé en ce que les nanoparticules comprennent au moins un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels.
15. Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que la silice comprend en outre, à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation desdites nanoparticules.
16. Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce que les agents de stabilisation sont choisis pour être inertes chimiquement lors d'une réaction de couplage des nanoparticules avec les agents de liaison.
17. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que les groupes fonctionnels modifiant la silice sont capables de générer une interaction avec les agents de liaison.
18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que les groupes fonctionnels et les agents de stabilisation sont issus d'organosilanes capables de se greffer sur la silice.
19. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que le cœur des nanoparticules est une nanoparticule d'or.
20. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce que la nanoparticule formant le cœur des nanoparticules présente une forme choisie parmi la forme sphérique ou cylindrique.
21. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que les nanoparticules comprennent une coquille intermédiaire métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau de la coquille intermédiaire étant différent du premier matériau constituant le cœur des nanoparticules.
22. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisée en ce que la coquille intermédiaire est en argent.
23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 14 à 22, caractérisé en ce que l'analyte à détecter est un antigène et l'agent de liaison est un anticorps spécifique de l'antigène.
24. Procédé de fabrication de nanoparticules cœur-coquille selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, comprenant:

## CH 705 758 A1

- la préparation de nanoparticules dans un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge,
  - la formation d'une coquille de silice sur lesdites nanoparticules,
  - le greffage de groupes fonctionnels sur la silice, et
  - le greffage à la surface de la silice d'agents de stabilisation desdites nanoparticules.
25. Procédé de fabrication de nanoparticules selon la revendication 24, caractérisé en ce que le greffage de groupes fonctionnels et d'agents de stabilisation sur la silice est réalisé par réaction de condensation d'organosilanes portant lesdits groupes fonctionnels et d'organosilanes portant lesdits agents de stabilisation.
26. Procédé de fabrication de nanoparticules selon l'une des revendications 24 et 25, caractérisé en ce qu'il comprend, préalablement à la formation de la coquille de silice, une étape de formation d'une coquille intermédiaire métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, en présence d'agents surfactants ayant un contre-ion halogénure.
27. Procédé de fabrication de nanoparticules selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il comprend l'addition d'agents surfactants sans halogénure pour remplacer les agents surfactants ayant un contre-ion halogénure, et l'élimination des agents surfactants ayant un contre-ion halogénure.
28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'agent surfactant sans halogénure est choisi parmi le groupe comprenant le nitrate de cétrimonium, l'hydroxyde de cétrimonium, le nitrate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le sulfate de cétrimonium, le sulfate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le phosphate de cétrimonium, le phosphate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le Triton® X-100, le nonaéthylène glycol monododécyl éther, N-nonyl-N-méthylglucamine, le Nonidet® P40, le nonyl 8-D-glucopyranoside, l'octaéthylène glycol monododécyl éther et le sodium dodécylsulfate.
29. Procédé de fabrication d'une suspension stable de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, comprenant:
- la préparation de nanoparticules cœur-coquille comprenant un cœur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, par formation d'une couche du second matériau autour des nanoparticules du premier matériau en présence d'agents surfactants ayant un contre-ion halogénure,
  - l'addition d'agents surfactants sans halogénure pour remplacer les agents surfactants ayant un contre-ion halogénure, et
  - l'élimination desdits agents surfactants ayant un contre-ion halogénure.
30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'agent surfactant sans halogénure est choisi parmi le groupe comprenant le nitrate de cétrimonium, l'hydroxyde de cétrimonium, le nitrate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le sulfate de cétrimonium, le sulfate d'hexadécyl-diméthyl-benzyl-ammonium, le phosphate de cétrimonium, le phosphate d'hexadécyl-diméthyl-benzylammonium, le Triton® X-100, le nonaéthylène glycol monododécyl éther, N-nonyl-N-méthylglucamine, le Nonidet® P40, le nonyl B-D-glucopyranoside, l'octaéthylène glycol monododécyl éther et le sodium dodécylsulfate.
31. Utilisation de nanoparticules cœur-coquille selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 comme marqueur d'une molécule biologique dans un dispositif de test par immunochromatographie.



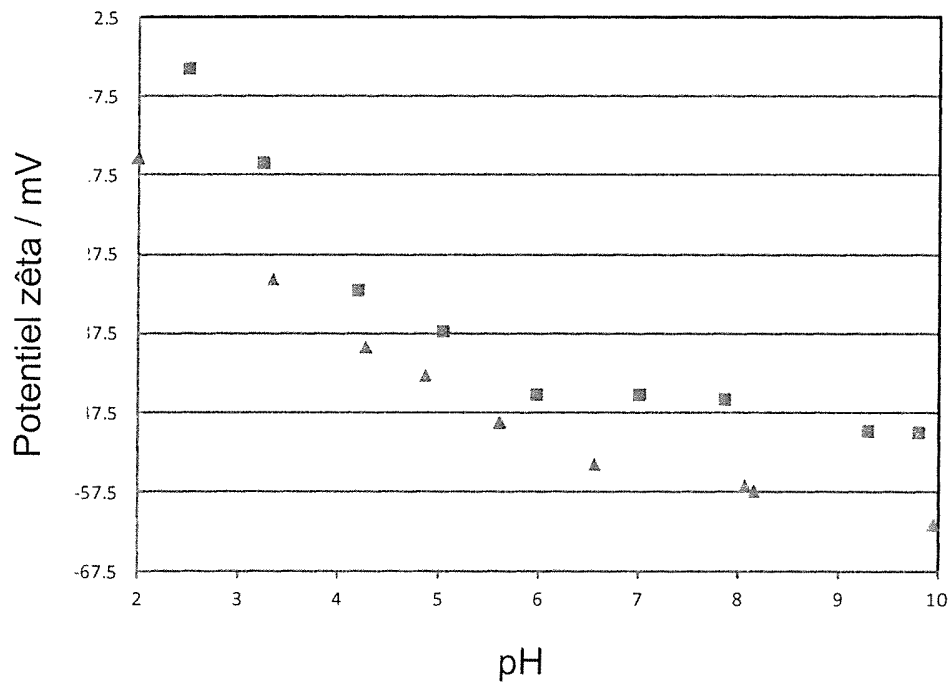
**FIG. 1**



**FIG. 2c**

**FIG. 2b**

**FIG. 2a**



**FIG. 3**

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		COTE DU DOSSIER DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE	
		Cas 1298/ACH/CH/nv	
Demande nationale n°		Date du dépôt	
1825/2011		15-11-2011	
Pays du dépôt		Date de priorité revendiquée	
Déposant (Nom)			
Metalor Technologies International SA			
Date de la requête d'une recherche de type international		Numéro donné par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international	
29-12-2011		SN 57437	
<b>I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
G01N33/558 G01N33/58 B22F1/02 B22F1/00 B22F9/24			
<b>II. DOMAINES RECHERCHES</b>			
Documentation minimale consultée			
Système de classification		Symboles de la classification	
IPC.8		G01N B22F	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. <input type="checkbox"/> IT A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV. <input checked="" type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION (Observations sur la feuille supplémentaire)			

Form PCT/ISA 201 A (11/2006)

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

CH 18252011

A. CLASSEMENT DES OBJETS DE LA DEMANDE					
INV.	G01N33/558	G01N33/58	B22F1/02	B22F1/00	B22F9/24
ADD.					

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et le CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification avec des symboles de classement)

G01N B22F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-internal, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ABSENCE D'UNITE D'INVENTION voir feuille supplémentaire B</p> <p>-----</p> <p>XIA CHEN ET AL: "Core-shell nanostructures for ultrasensitive detection of [alpha]-thrombin", NANOSCALE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY UK, vol. 2, no. 12, novembre 2010 (2010-11), pages 2841-2846, XP002672798, ISSN: 2040-3364 * Methods *</p>	<p>1-8, 24-28,31</p>
X A	<p>US 2010/150828 A1 (CHEN JEN-KUN [TW] ET AL) 17 juin 2010 (2010-06-17) * exemple 7 *</p> <p>-----</p>	<p>1-6,24, 25 7,8, 26-28,31</p>

Voir la suite du cadre D pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:	
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	** document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais être pour constituer le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
*B* document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
*C* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (seda qu'indiquées)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
*D* document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée	Date d'expédition du rapport de recherche de type international
30 mars 2012	

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisée
Office Européen des Brevets, P. B. 2018 Patendlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Morra, Valentina

4

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

SN 57437  
CH 18252011

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1-8, 24-28, 31

Nanoparticule coeur-coquille comprenant au moins un coeur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels, caractérisée en ce que la silice comprend à sa surface, liés de façon covalente, des agents de stabilisation de ladite nanoparticule; procédé de fabrication et utilisation de ladite particule.

---

2. revendications: 9-13, 29, 30

Nanoparticule coeur-coquille comprenant un coeur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille métallique réalisée dans un second matériau à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, ledit second matériau étant différent du premier matériau, caractérisée en ce que la coquille métallique est stabilisée par un agent surfactant sans halogénure; procédé de fabrication de ladite particule.

---

3. revendications: 14-23

Dispositif de test par immunochromatographie pour la détection d'au moins un analyte, comprenant des agents de liaison spécifiques de l'analyte, lesdits agents de liaison étant marqués par des nanoparticules, caractérisé en ce que les nanoparticules comprennent au moins un coeur composé d'au moins un premier matériau métallique à base d'au moins un métal présentant une résonance plasmonique dans le domaine choisi parmi le domaine de l'ultraviolet, le domaine du visible et le domaine du proche infrarouge, et une coquille de silice, ladite silice comprenant des groupes fonctionnels.

---

La recherche a été limitée au premier sujet.

**RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°  
CH 18252011

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2010150828	A1	17-06-2010	
		AU 2009333387 A1	08-07-2010
		CA 2743315 A1	06-07-2010
		EP 2373450 A1	12-10-2011
		TW 201034972 A	01-10-2010
		US 2010150828 A1	17-06-2010
		WO 2010077794 A1	08-07-2010