THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physique

École doctorale I2S

Unités de recherche : L2C (UMR-5221) et IBMM (UMR 5247)

CIBLAGE THERAPEUTIQUE DE LA KINASE CDK4 DANS LE CAS DU CANCER DU PANCREAS PAR DES NANOTUBES DE CARBONE MONO-FEUILLETS

Présentée par Luc CHAVIGNON
Le 10 décembre 2025

Sous la direction d'Eric ANGLARET et May C. MORRIS

Devant le jury composé de

Csilla GERGELY, Professeur, Université de Montpellier	Examinatrice, Présidente du jury
Cécilia MENARD-MOYON, Directrice de recherche, CNRS Strasbourg	Rapporteure/Examinatrice
Etienne GAUFRES, Chargé de recherche, CNRS Bordeaux	Rapporteur/Examinateur
Amandine HURBIN, Chargée de recherche, INSERM Grenoble	Examinatrice
Eric ANGLARET, Professeur, Université de Montpellier	Directeur de thèse
May C. MORRIS, Directrice de recherche, CNRS Montpellier	Co-directrice de thèse
Christophe BLANC, Chargé de recherche, Université de Montpellier	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Résumé

Cette thèse explore les propriétés physico-chimiques, électroniques et optiques et des nanotubes de carbone mono-feuillets (SWNT) afin d'en faire des vecteurs de drogues originaux et performants ciblant la kinase CDK4 dans le cancer du pancréas. Deux drogues sont étudiées : la Doxorubicine (DOX), une anthracycline bien connue dans la littérature et présentant des signaux spectroscopiques caractéristiques en absorption et en fluorescence, et l'Abemaciclib (Ab), un inhibiteur ATP-compétitif des kinases CDK4 et CDK6. La première est utilisée comme modèle pour suivre l'adsorption sur les SWNT par une approche multi-spectroscopique, tandis que la seconde est étudiée de façon croisée en spectroscopie et dans des tests biochimiques et biologiques. Les SWNT sont tout d'abord dispersés en suspension aqueuse en présence de carboxyméthycellulose (CMC), un polyélectrolyte biocompatible utilisé comme agent dispersif et stabilisant des SWNT. Les drogues sont ensuite adsorbées à leur surface pour former des complexes SWNT/CMC/DOX et SWNT/CMC/Ab. L'adsorption, puis la désorption des drogues en température, sont suivies et attestées par l'étude du signal de fluroescence (FL) des SWNT dans le proche IR en spectroscopie couplée Raman/FL. Elles sont complétées par des études de spectroscopies d'absorption UV-vis-proche IR et de fluorescence pour la Doxorubicine, et par des tests d'activité kinase pour l'Abemaciclib. Des tests de prolifération cellulaire sont réalisés avec les complexes SWNT/CMC/Ab sur des cultures de cellules cancéreuses pancréatiques (PANC1) afin de mesurer leur potentiel inhibiteur de prolifération.

Des propositions de structure et d'organisation des complexes SWNT/CMC/drogue sont établies à partir des études spectroscopiques en fonction de la concentration de drogue. Pour les complexes SWNT/CMC/DOX, les résultats montrent l'adsorption de 90% de la Doxorubicine utilisée sur les complexes, peu importe la concentration sur la gamme étudiée (rapports de masses DOX/SWNT de 1 à 30). Trois régimes peuvent être identifiés : sub-monocouche, monocouche et multicouches, du fait de la capacité de la Doxorubicine à s'auto-associer. D'autres molécules s'adsorbent sur la CMC, qu'elle soit présente autour des SWNT ou en solution. Le chauffage à 60°C de ces complexes permet ensuite de relarguer environ 20% de la Doxorubicine adsorbée, processus réversible lors du retour à 20°C.

Pour les complexes SWNT/CMC/Ab, on observe un ratio d'Abemaciclib adsorbée moins important que la Doxorubicine, entre 40 et 80%. Comme l'Abemaciclib ne s'auto-associe pas, on suggère une structure où elle s'adsorbe préférentiellement à la surface des SWNT, pour former une monocouche homogène, ainsi que dans la CMC. Les études spectroscopiques du chauffage des complexes SWNT/CMC/Ab à 60°C tendent à montrer une désorption en température réversible similaire à celle des complexes SWNT/CMC/DOX, mais les tests d'activité kinase n'ont pas permis de valider un quelconque relargage d'Abemaciclib pour l'inhibition de CDK4. Les tests de prolifération avec les complexes SWNT/CMC/Ab montrent quant à eux que les complexes n'ont pas de potentiel inhibiteur supérieur à celui de l'Abemaciclib en solution.

Abstract

This thesis explores the chemical, optical, and electronic properties of single-walled carbon nanotubes (SWNT) as carriers for drug delivery . Two drugs were studied: (1) Doxorubicin (DOX), an anthracycline that is well documented in the literature, characterized by intense absorption and fluorescence spectroscopic signals, used as a model drug to investigate adsorption on SWNTs through a multi-spectroscopic approach and (2) Abemaciclib (Ab), an ATP-competitive inhibitor of CDK4 and CDK6 kinases that is hyperactivated in pancreatic cancer, which was characterized in complementary spectroscopic, biochemical and biological tests. SWNT were first dispersed in carboxymethylcellulose (CMC), a biocompatible polyelectrolyte used as a dispersing and stabilizing agent for SWNT. Drugs were then adsorbed onto their surface to form SWNT/CMC/DOX and SWNT/CMC/Ab complexes. Adsorption and subsequent desorption of drugs at different temperatures were monitored and verified by studying the FL signal of SWNT in the near IR using Raman/FL spectroscopy. These were then complemented by UV-vis-NIR absorption and fluorescence spectroscopy studies for Doxorubicin, and kinase activity tests for Abemaciclib. The potential of SWNT/CMC/Ab complexes to inhibit proliferation of pancreatic cancer cell cultures (PANC1) was determined in comparison with Abemaciclib in solution and SWNT/CMC complexes.

Typical structures of SWNT/CMC/drug complexes can be imagined from our spectroscopic studies performed at different drug concentrations. Several models of Doxorubicin organization on SWNT/CMC can be imagined accounting for the ability of Doxorubicin to self-associate: sub-monolayer, monolayer, and multilayer. A model accounting for adsorption of several layers of Doxorubicin reveals that approximately 90% of Doxorubicin can be loaded onto SWNT complexes, heating these complexes at 60°C promotes release of approximately 20% adsorbed Doxorubicin, a process that is reversible when the temperature returns to 20°C.

For SWNT/CMC/Ab complexes, as Abemaciclib does not self-associate, we imagine a structure in which it preferentially adsorbs onto the surface of SWNTs to form a homogeneous monolayer, implying a lower ratio of adsorbed Abemaciclib than Doxorubicin, between 40 and 80%. Spectroscopic studies following heating of

SWNT/CMC/Ab complexes at 60°C tend to show reversible temperature desorption similar to that of SWNT/CMC/DOX complexes, kinase activity tests did not confirm any release of Abemaciclib for CDK4 inhibition. Proliferation tests with SWNT/CMC/Ab complexes showed that the complexes have no greater inhibitory potential than Abemaciclib in solution.

Remerciements

En comptant mon stage de 6 mois et ma thèse, mon travail sur ce projet a duré quasiment 5 ans, de janvier 2021 à décembre 2025. Cinq années durant lesquelles j'ai évolué sur plusieurs plans, autant dans ma vie personnelle que professionnelle. Cinq années durant lesquelles j'ai aussi pu côtoyer de nombreuses personnes qui m'ont aidé à aller au bout de ce travail, qu'elles aient été rencontrées en chemin, ou bien avant. J'espère n'oublier personne et je m'excuse si c'est le cas.

Tout d'abord, ce projet a été réalisé grâce au financement de l'Université de Montpellier et du LabEx NUMEV que je souhaite remercier pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien mon doctorat, et en particulier Andrea Parmeggiani. Ce projet s'est déroulé conjointement au Laboratoire Charles Coulomb (L2C) et à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), je souhaite donc remercier ces deux laboratoires, leurs administrations, ainsi que toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu positivement interagir.

Je tiens ensuite à grandement remercier mes deux directeurs de thèse, Eric Anglaret et May C. Morris, pour m'avoir sélectionné pour ce projet et fait confiance pour le mener à bien. Merci aussi de m'avoir accompagné tout du long, que ce soit du côté expérimental ou bibliographique, de m'avoir supporté malgré mon sens particulier du timing lors de l'envoi de chapitres, et pour toutes ces relectures.

J'en profite pour exprimer ma gratitude aux rapporteurs de ce manuscrit, Cécilia Ménard-Moyon et Etienne Gaufrès, ainsi qu'aux membres du jury de ma soutenance, Csilla Gergely en tant que présidente et Amandine Hurbin en tant qu'examinatrice.

Je remercie aussi énormément Christophe Blanc pour m'avoir accompagné tout du long, que ce soit au labo ou au bureau, parfois pendant de longues heures jusqu'au bout de la nuit. Ça m'a grandement aidé à avancer et à comprendre, ça a été un honneur de travailler en ta compagnie. Pour les manips complémentaires que je n'ai pas pu réaliser moi-même après la fin de mon contrat, je remercie Marine Ponge et Tiago De Mattos Serodre, qui m'a en plus accompagné au labo et dans les réunions.

Globalement, je remercie l'équipe NMAT du L2C pour leur soutien, notamment Lucyna, Vincent, Jean-Louis, Saïd, Renaud, Matthieu et Edouard, mais aussi Clarisse et Eira. Du côté

ICGM, je remercie Sylvain Dutremez pour toutes les sympathiques discussions que nous avons eues autour du Raman. Je remercie aussi Mélanie Onofre, Chloé Royet et plus anciennement Arthur Laure pour m'avoir appris à les manips de bio et pour la bonne ambiance qu'il y avait grâce à vous au labo. J'en profite aussi pour remercier Sarah Belgaid du LIRMM pour son soutien, ainsi que Serge Bernard.

D'un côté plus personnel, je tiens évidemment à remercier mes parents pour m'avoir élevé, et notamment ma mère Isabelle pour avoir toujours été et être encore là pour moi, de me soutenir sans discontinuer et de faire tout son possible pour moi, je t'aime fort. Je remercie aussi ma famille en général, mes grands-parents Renée et Jean-Paul qui ont fait le déplacement jusqu'à Montpellier pour assister à ma soutenance, mais aussi ma grand-mère Suzanne et mes cousins Marie, Alexandre et Robin.

Je remercie ensuite infiniment tous mes amis, mes frères, pour votre présence sans faille et tous les bons moments qu'on passe chaque jour depuis plus de 10 (dix !) ans. Vous êtes tous des êtres humains exceptionnels et vous m'avez apporté le soutien, la motivation et la détente dont j'avais bien besoin. Matthieu et Dylan, les originaux, vieux comme le monde mais toujours là (ptite TFT ? ptit LoL ?). Léa, toujours au charbon, mais tu vas y arriver, tu y es presque, bientôt libérée ! Mathieu et Cédric, les autres docteurs de 2025 (meilleure année objectivement), je reviens bientôt poser des cubes, t'inquiète pas. Loïc, ce héros, designer officiel de memes devenus cultes, j'ai hésité à mentionner notre surnom nippon commun, mais je me suis retenu. Guillaume, objectivement meilleur psy du monde, merci pour les GAMES, on peut se lancer dans l'esport maintenant ! Mathieu-Louis, on a des vies très similaires comme tu le sais, merci pour toutes ces visites durant ma thèse, à toutes ces parties de cartes, ces rounds sur smash, tu es une personne incroyable que j'aime énormément. Et enfin, comment ne pas citer le roi de ce monde, mon alter-ego, Jules. Tout d'abord merci pour ces jours et ces nuits d'accompagnement pendant la rédaction qui m'ont permis de ne pas craquer, et merci pour ces relectures qui m'ont bien aidé. Merci aussi d'être toujours là pour moi, je le serai aussi tu le sais, tu es au-delà de l'amitié.

J'en profite aussi pour remercier une demoiselle qui se reconnaîtra, et qui a toujours été là pour me soutenir et m'encourager pendant la deuxième moitié de ma thèse.

Je vous aime tous !

Partie bibliographique

Résumé……2

Remerciements……6

Introduction……13

I. Nanotubes de carbone ……16
I.1. Présentation générale……16
I.1.1. Matériaux carbonés……16
I.1.1.1. Hybridation du carbone et liaisons moléculaires……16
I.1.1.2. Les formes allotropiques du carbone……17
I.1.1.3. Le graphite et sa structure……19
I.1.2. Nanotubes de carbone……20
I.2. Différents types de SWNT……22
I.2.1. Structures……22
I.2.2. Coordonnées (n,m)……22
I.3. Dispersion des SWNT……25
I.4. Dispersion des SWNT pour applications biologiques……27
I.5. Multi-fonctionnalisation……28
I.6. Fonctionnalisation interne……31
I.7. Vectorisation……32
I.8. Toxicité des CNT……33

II. Spectroscopie optique des SWNT……37
II.1. Propriétés électroniques des SWNT……37
II.2. Propriétés optiques des SWNT……39
II.3. Propriétés excitoniques des SWNT……42
II.4. Spectroscopie d'absorption des SWNT……48
II.4.1. Principe de la spectroscopie d'absorption des SWNT……48
II.4.2. Spectres et contributions……50
II.5. Spectroscopie Raman des SWNT……52
II.5.1. Généralités sur la diffusion Raman……52
II.5.2. La spectroscopie Raman des SWNT……53
II.6. Fluorescence des SWNT……56
II.6.1. Principe de la fluorescence des SWNT……56
II.6.2. Spectroscopie Raman couplée fluorescence……60
II.7. Effets de l'adsorption et de la fonctionnalisation sur les propriétés optiques des SWNT……62

III. Cancer du pancréas……66
III.1. Contexte général……66
III.1.1. Répartition géographique……67
III.1.2. Mortalité……68

III.1.3. Epidémiologie.....69
III.2. Apparition.....69
III.2.1. Facteurs d'apparition.....69
III.2.2. Altérations génétiques et mutations.....71
III.2.2.1. KRAS.....72
III.2.2.2. CDKN2A.....73
III.2.2.3. TP53.....74
III.2.2.4. SMAD4.....75
III.3. Chirurgie et traitements.....75
III.3.1. Chirurgie.....75
III.3.2. Chimiothérapies.. 76
III.3.2.1. Drogues utilisées en clinique.....76
III.3.2.1.1. Gemcitabine.....78
III.3.2.1.2. Nab-paclitaxel.....79
III.3.2.1.3. FOLFIRINOX.....80
III.3.2.1.4. Olaparib.....81
III.3.2.1.5. Autres agents d'intérêt.....82

IV. Cycle cellulaire, kinases et CDK4.....84

IV.1. Cycle cellulaire et kinases.....84
IV.1.1. Le cycle de division cellulaire.....84
IV.1.2. Les protéines kinases.....87
IV.2. CDK4/cycline D.....89
IV.2.1. CDK4.....89
IV.2.2. Cycline D.....90
IV.2.3. Le rôle de CDK4/cycline D dans le cycle cellulaire.....90
IV.2.4. Le rôle de CD4K/cycline D hors du cycle cellulaire.....91
IV.2.5. CDK4/cycline D dans les cancers.....92
IV.3. Inhibiteurs de CDK4/cycline D.....93
IV.3.1. Inhibiteurs ATP-compétitifs.....94
IV.3.2. Stratégies combinatoires.....98

V. Dispersions, vectorisation et applications médicales des nanotubes de carbone.....100

V.1. Vectorisation par CNT.....100
V.2. Relargage contrôlé.....101

Références partie bibliographique.....106

Partie Matériaux et Méthodes

VI. Matériaux et Méthodes.....132

VI.1. Matériaux……132
VI.1.1. SWNT……132
VI.1.2. Tensio-actifs et agents dispersants……132
VI.1.2.1. Sels biliaires……133
VI.1.2.2. Dodécylsulfate de sodium……133
VI.1.2.3. Carboxyméthylcellulose……134
VI.1.2.4. Préparation des dispersions aqueuses de SWNT……135
VI.1.3. Petites molécules à visée thérapeutique anticancéreuse……137
VI.1.3.1. Doxorubicine……137
VI.1.3.2. Abemaciclib……139
VI.1.3.3. Adsorption de drogues sur les complexes SWNT/CMC……140
VI.1.3.3.1. Protocole d'adsorption de la Doxorubicine……140
VI.1.3.3.2. Protocole d'adsorption de l'Abemaciclib……140
VI.1.4. Lignée cellulaire……141
VI.1.4.1. Lignée cellulaire PANC-1……141
VI.1.4.2. Traitements des cellules……142
VI.1.4.3. Tests de prolifération cellulaire au cristal violet et détermination de l'IC50……142
VI.2. Méthodes……143
VI.2.1. Spectroscopie……143
VI.2.1.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible-proche IR……143
VI.2.1.2. Spectroscopie de fluorescence……145
VI.2.1.3. Spectroscopie Raman/FL……146
VI.2.1.4. Carte d'excitation FL……147
VI.2.1.5. Ajustement non-linéaire des spectres (« déconvolution ») ……148
VI.2.2. Filtration et quantification des drogues adsorbées……149
VI.2.2.1. Filtration……149
VI.2.2.2. Quantification de la drogue adsorbée……151
VI.2.2.2.1. Doxorubicine……151
VI.2.2.2.2. Abemaciclib……153
VI.2.3. Désorption de drogues……153
VI.2.3.1. Doxorubicine……153
VI.2.3.2. Abemaciclib……153
VI.2.4. Tests d'activité kinase……154
VI.2.5. Production et purification de GST-CDK4……155
VI.2.6. Tests de liaison SWNT/Ab/CDK4……157
VI.2.7. Spectroscopie de masse couplée HPLC……157
VI.2.8. Microscopie électronique en transmission……157

Références Matériaux et Méthodes……159

Partie Résultats et discussion

VII. Etudes spectroscopiques indépendantes des suspensions aqueuses de SWNT et de la doxorubicine……164

VII.1. Etude spectroscopique des suspensions aqueuses de SWNT……164
VII.1.1. Suspensions aqueuses SWNT/BS de référence……164
VI.1.1.1. Absorption dans l'UV-visible proche IR……164
VI.1.1.2. Fluorescence dans le proche IR……165
VII.1.2. Comparaisons des spectres pour différents dispersants……168
VII.1.3. Effet de la concentration en CMC……172
VII.1.4. Effet de la concentration en SWNT……177
VII.2. Etude spectroscopique de la Doxorubicine……178
VII.2.1. Absorption dans le visible……179
VI.2.1.1. Evolution en fonction de la concentration……179
VI.2.1.2. Point isobestique ……180
VI.2.1.3. Fraction de monomères……181
VI.2.1.4. Détermination de la concentration……183
VII.2.2. Fluorescence dans le visible……184

VIII. Adsorption et quantification de Doxorubicine sur SWNT……187

VIII.1. Etude de l'adsorption par spectroscopie d'absorption de la Doxorubicine….187
VIII.1.1. Cinétique……187
VIII.1.2. A l'équilibre cinétique……188
VIII.1.2.1. Adsorption……188
VIII.1.2.2. Quantification……190
VIII.1.2.3. Quenching……193
VIII.1.2.4. Recouvrement……194
VIII.1.3. En fonction de la concentration……195
VIII.1.3.1. Adsorption……195
VIII.1.3.2. Quantification……199
VIII.1.3.3. Quenching……202
VIII.1.3.4. Recouvrement……203
VIII.2. Etude de l'adsorption par l'étude spectroscopique de la Doxorubicine en fluorescence……206
VIII.2.1. Cinétique……206
VIII.2.2. A l'équilibre cinétique……207
VIII.2.2.1. Adsorption……207
VIII.2.2.2. Quantification……208
VIII.2.2.3. Quenching……209
VIII.2.3. En fonction de la concentration……209
VIII.2.3.1. Adsorption……209
VIII.2.3.2. Quantification……209
VIII.2.3.3. Quenching……210
VIII.3. Etude de l'adsorption par l'étude spectroscopique des SWNT (NIR FL)……212
VIII.3.1. Cinétique……212
VIII.3.2. A l'équilibre d'adsorption……214
VIII.3.3. En fonction de la concentration de DOX……216

IX. Etude en température de la Doxorubicine en solution et adsorbée sur SWNT……221

IX.1. Evolution des signatures spectrales de la Doxorubicine avec la température...221
IX.2. Etude de complexes SWNT/CMC/DOX en température……..224
IX.3. Etude du relargage en température par l'étude spectroscopique des SWNT….229

X. Adsorption et quantification d'Abemaciclib sur SWNT……234

X.1. Détermination des conditions expérimentales……234
X.1.1. Détermination de l'IC50 de l'Abemaciclib sur la lignée PANC-1……234
X.1.2. Toxicité des complexes SWNT/CMC……235
X.2. Suivi de l'adsorption de l'Abemaciclib par études spectroscopiques des SWNT. ……237
X.2.1. Etude cinétique……237
X.2.2. Etude à l'équilibre……238
X.2.3. En fonction de la concentration……240
X.3. Quantification du recouvrement……242
X.3.1. Quantification par tests d'activité kinase……242
X.3.2. Quantification par spectroscopie de masse couplée HPLC……244
X.4. Potentiel inhibiteur des complexes SWNT/CMC/Ab sur la prolifération des cellules PANC-1……245
X.5. Tests d'interaction entre GST-CDK4 recombinante et les complexes SWNT/CMC/Ab……246
X.6. Etudes en températures de l'Abemaciclib……249
X.6.1. Etude de la désorption en température par la spectroscopie des SWNT…249
X.6.2. Etude de la désorption en température par tests d'activité kinase……251

XI. Discussion générale……253

XI.1. Relations entre décalages et environnement diélectrique……253
XI.2. Structures des complexes……256
XI.3. Ciblage de CDK4……258

Références partie expérimentale……262

Conclusion et perspectives……267

Annexes……272

Introduction

L'essor de la nanomédecine a mis en lumière les nanotubes de carbone, et en particulier les nanotubes de carbone mono-feuillets (*Single-Walled carbon NanoTubes*, SWNT), comme une plateforme pour l'imagerie, le *biosensing* et la vectorisation de composés thérapeutiques. Leur structure unidimensionnelle sp^2 conjuguée leur confère une surface spécifique élevée et une capacité d'adsorption par interactions π-π, permettant la fonctionnalisation, ainsi que des propriétés optiques originales et modulables permettant le suivi de l'adsorption (absorption optique et fluorescence dans le proche infrarouge). Ces atouts ont été exploités pour concevoir des biocapteurs et des agents d'imagerie NIR pour des applications *in vivo*, et pour développer des plates-formes théranostiques pour une détection couplée à l'administration d'un agent thérapeutique [1],[2],[3],[4],[5].

Sur le plan de la vectorisation, les SWNT se prêtent à des greffages covalents (oxydes, amidations) et à des fonctionnalisations non covalentes (polymères, surfactants, enveloppes lipidiques) permettant de moduler leur solubilité ou dispersion métastable et leur ciblage. Par exemple, la PEGylation atténue l'agrégation et réduit la toxicité [6],[7],[8]. Historiquement, les SWNT ont été utilisés comme vecteurs de petites molécules via des interactions π-π et des *linkers* chimiques clivables, démontrant un chargement élevé, une internalisation cellulaire efficace et, dans certains modèles, une amélioration de l'index thérapeutique. Ces preuves de concept ont ouvert la voie à des systèmes plus sophistiqués intégrant ciblage actif, déclenchement par stimuli et suivi optique [9],[10],[11].

Ce potentiel est particulièrement prometteur face aux cancers comme l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) ou cancer du pancréas. Le PDAC demeure l'un des cancers à plus mauvaise issue : malgré une légère amélioration récente, la survie relative à 5 ans plafonne autour de 12–13 %, avec une médiane de quelques mois aux stades avancés. L'incidence progresse et le PDAC s'affirme parmi les principales causes de mortalité par cancer. La structure fibreuse du stroma des tumeurs pancréatiques et la biologie du microenvironnement tumoral constitue un obstacle majeur à la diffusion des cytotoxiques et à l'efficacité des immunothérapies. La prise en charge reste à l'heure actuelle dominée par la chirurgie, la radiothérapie et chimiothérapie [12],[13],[14],[15].

Cette thèse se focalise sur l'étude de complexes à base de SWNT pour deux drogues : la Doxorubicine (DOX) et l'Abemaciclib (Ab), la première comme modèle pour suivre l'adsorption sur les SWNT par une approche multi-spectroscopique, et la seconde dans des tests biochimiques et biologiques. Les propriétés chimiques, électroniques et optiques des SWNT sont étudiées, afin de préparer des complexes SWNT/CMC/Ab dans l'objectif de cibler la kinase CDK4 dans le cancer du pancréas.

Ce manuscrit comporte quatre parties : une partie bibliographique composée de cinq chapitres, une partie « Matériels et Méthodes » puis les résultats subdivisés en cinq chapitres.

La partie bibliographique fait un état de l'art des connaissances actuelles sur les nanotubes de carbone, leurs propriétés, en particulier électroniques et optiques, ainsi que leurs applications en biologie comme vecteurs.

Le chapitre I reprend les généralités sur les nanotubes de carbone, et plus particulièrement les SWNT. Leur structure est présentée et leurs propriétés physico-chimiques générales sont décrites, ainsi que les différentes méthodes de dispersions, covalentes et non-covalentes.

Le chapitre II aborde la spectroscopie optique des SWNT, en décrivant en détail leurs différentes propriétés électroniques, optiques et excitoniques. Un historique de la caractérisation spectroscopique des SWNT est présenté, jusqu'à décrire les excitons, qui jouent un rôle central dans l'étude des SWNT dans ce projet [16],[17],[18],[19]. Les effets de la fonctionnalisation et de l'adsorption à la surface des SWNT sur leurs propriétés optiques des SWNT sont discutés. Les différentes techniques de spectroscopies d'absorption, de fluorescence et Raman/FL sont ensuite présentées en détail.

Le chapitre III reprend les généralités sur le cancer du pancréas, de son contexte actuel aux causes pouvant entrainer son développement. Les différentes altérations génétiques et mutations pouvant le causer sont décrites. Les différentes chirurgies et approches thérapeutiques sont présentées, qu'elles soient approuvées ou en développement clinique.

Le chapitre IV présente en détail la cible thérapeutique dans ce projet : la kinase CDK4. Le cycle cellulaire et les fonctions physio-pathologiques des complexes CDK/cycline et de

CDK4/cycline D en particulier sont expliqués. Les inhibiteurs ciblant CDK4 sont décrits, en particulier les inhibiteurs ATP-compétitifs.

Après avoir précédemment présenté indépendamment les SWNT et le contexte biologique, le chapitre V aborde les différentes applications biologiques des SWNT, et en particulier pour cibler les cancers. Les différentes techniques afin de les rendre biocompatibles par dispersion sont présentées, ainsi que les différents moyens pour adsorber ou fonctionnaliser des molécules d'intérêt à leur surface, jusqu'à la multi-fonctionnalisation.

La partie Matériels et Méthodes présente les différentes molécules et les différents procédés et protocoles utilisés au cours de cette thèse

Le chapitre VII décrit une série d'études spectroscopiques préliminaires ayant permis de comparer les complexes à base de SWNT et de différents dispersants, à plusieurs concentrations, et d'étudier la Doxorubicine en solution en fonction de sa concentration.

Le chapitre VIII étudie l'adsorption de Doxorubicine sur SWNT, ainsi que sa quantification sur les complexes SWNT/CMC, par une approche multi-spectroscopique, en couplant des études d'absorption et de fluorescence de la Doxorubicine dans l'UV-visible, et des SWNT dans le NIR.

Le chapitre IX explore la potentielle désorption de la Doxorubicine des complexes SWNT/CMC/DOX en température. Le comportement de la Doxorubicine seule est d'abord étudié, puis celui des complexes.

Le chapitre X étudie l'adsorption d'Abemaciclib sur SWNT et l'inhibition de la prolifération des complexes SWNT/CMC/Ab sur des cellules PANC1. La toxicité des SWNT et l'IC50 de l'Abemaciclib sont déterminés sur cette lignée cellulaire. L'Abemaciclib adsorbée est quantifiée et son relargage à différentes températures est étudié.

Le chapitre XI discute l'ensemble des résultats des quatre chapitres précédents dans le contexte général de cette thèse. Les structures des complexes sont décrites en détails, ainsi que leurs comportements excitoniques et leur capacité à cibler CDK4.

Un chapitre de conclusion et de perspectives à court et long terme clôt ce manuscrit.

I. Nanotubes de carbone

I.1. Présentation générale

I.1.1. Matériaux carbonés

I.1.1.1. Hybridation du carbone et liaisons moléculaires

Le carbone représente 1,49 % de la masse terrestre (quantités de l'atmosphère et du manteau normalisées par rapport à la masse de la Terre [1]). Cependant, il peut former plus de composés que tous les autres éléments de par sa nature tétravalente et sa capacité à maintenir des liaisons π stables. Il s'agit d'un élément à la base des molécules du vivant que l'on retrouve dans le CO_2, dans la structure des protéines, des glucides, des graisses et de toutes les molécules organiques, le mettant au centre de toute la chimie organique [2]. A l'état naturel, il est présent sous trois formes : amorphe (dans les suies), graphite et diamant (formes pures), mais en laboratoire, il est possible d'en créer de nouvelles, allant de structures tridimensionnelles à zéro-dimensionnelles [3]. Ces structures ne semblent néanmoins pas être réservées à la synthèse en laboratoire : récemment, des fullerènes et leurs éléments constitutifs (« buckybowls ») ont été découverts dans des matériaux fossiles naturels, en plus de « fullertubes », de feuilles de graphène et de nanotubes de carbone [4]

La particularité du carbone réside dans sa capacité à former différentes hybridations électroniques stables (sp, sp^2, sp^3), chacune correspondant à une géométrie et à des propriétés structurales et électroniques distinctes. Cette polyvalence est au cœur de la diversité des formes allotropiques du carbone. Sur la Figure I-1, les 5 hybridations de l'atome de carbone sont représentées [5]. D'abord l'hybridation sp, conduit à deux liaisons σ situées sur le même axe (angle de 180°, Figure I-1.a) et apparaît dans certaines molécules linéaires comme l'acétylène. Deux liaisons π se forment perpendiculairement l'une à l'autres. Ces liaisons peuvent être simples et triples, ou deux fois doubles. L'hybridation sp^2 (Figure I-1.b) est à l'origine de trois liaisons σ coplanaires formant un angle de 120° entre elles. Une liaison π délocalisée est formée perpendiculairement à leur plan par l'orbitale p restante. Le graphite, le graphène et les nanotubes de carbone présentent majoritairement une hybridation sp^2. Enfin, l'hybridation sp^3 (Figure I-1.c) conduit à quatre liaisons σ de manière à former un tétraèdre régulier, avec des angles inter-liaisons de 109,5° et est caractéristique du diamant. Ces 3 hybridations sont les

principales, mais d'autres types existent avec l'hybridation conjointes d'orbitales d et d'orbitales s ou p (Figure I-1.d et e).

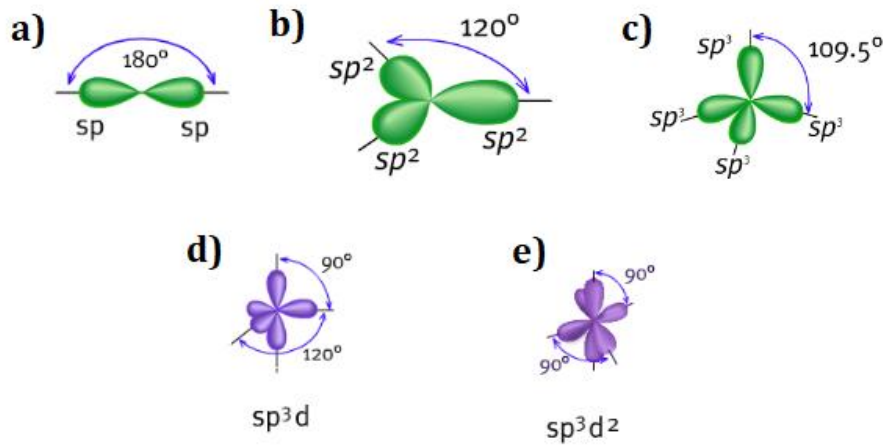


Figure I-1 : Différentes hybridations possibles du carbone : A : sp, B : sp^2, C : sp^3, D : sp^3d, E : sp^3d^2 [5]

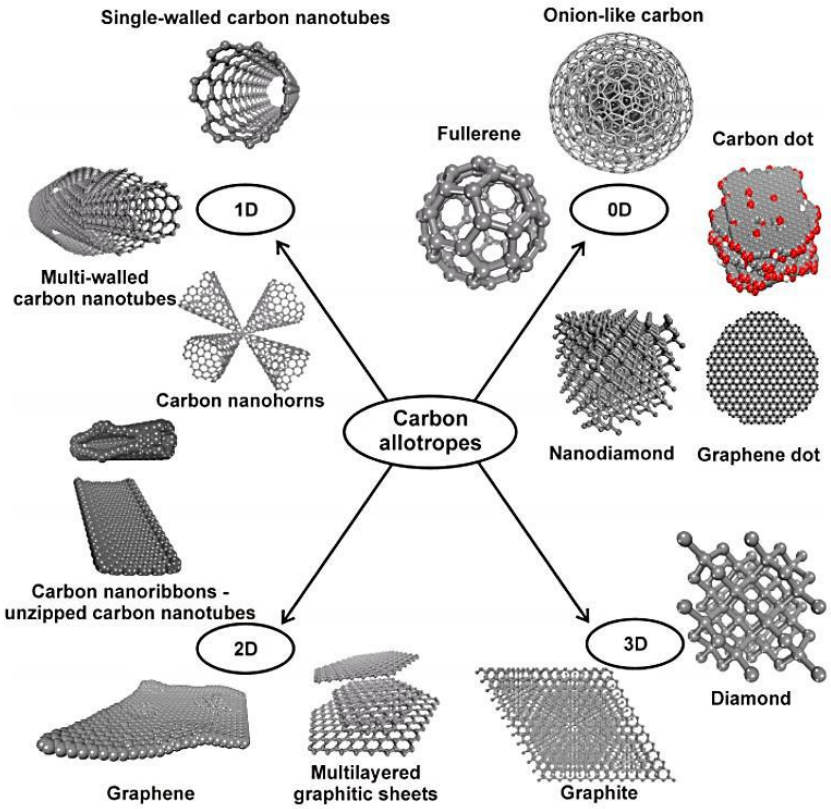
La modularité du carbone est ainsi liée à sa capacité à former des liaisons covalentes, avec lui-même ou d'autres éléments, dû aux différentes géométries de ses orbitales atomiques. De par sa structure électronique ($1s^2 2s^2 2p^2$), le carbone peut donc former de nombreux composés stables de structures différentes et présentant différents types de liaisons covalentes.

I.1.1.2. Les formes allotropiques du carbone

Les liaisons covalentes formées entre plusieurs atomes de carbone permettent d'obtenir des matériaux de faibles tailles, de l'ordre du nanomètre, dotés de propriétés physiques et chimiques spécifiques et de diverses dimensionnalités appelés allotropes du carbone. Ces structures peuvent être tri-, bi-, mono ou zéro-dimensionnelles (Figure I-2).

Le graphite et le diamant sont les allotropes du carbone les plus communs, tridimensionnels et non-nanométriques (Figure I-2, 3D). Le graphite fut d'ailleurs synthétisé artificiellement pour la première fois en 1896 [6]. Les fullerènes (Figure I-2, 0D) ont été découverts par *Kroto et al.* en 1985 [7], par l'étude des mécanismes de formation des molécules de carbone à longue chaîne dans l'espace interstellaire et les

enveloppes circumstellaires et possédant exactement 60 atomes de carbones [3]. Les conditions en laboratoire ont ainsi pu être recrées ce qui a permis de former des molécules de C_{60} en vaporisant du graphite par irradiation laser [7]. Ces molécules sont constituées de cycles pentagonaux et hexagonaux de carbone, d'une structure similaire à celle du graphite, sous la forme d'une sphère creuse [8].



<u>Figure I-2 :</u> Allotropes principaux du carbone regroupés par dimensionnalité [9].

Plus tard, d'autres structures de fullerènes, sous la forme de C_{60}, C_{70}, C_{76}, C_{82} et C_{84}, ont également été découvertes dans la suie ou des roches fossilisées et ont été synthétisées [10]. Les premières tentatives de synthèses de nanotubes de carbone (Figure I-2, 1D) ont été réalisées en 1970 par *Endo et al*. [11]. Les filaments de carbone qu'ils produisirent furent dans un premier temps considérés comme les premiers nanotubes de carbone. Cependant, les conditions de mesure de leur diamètre n'ont pas été satisfaites, et leurs structures furent considérées comme des barrelenes [12]. Dans les années 1950, *Bacon et al.* ont pour la première observé fois des nanotubes de carbone au TEM [13], mais c'est en 1991 qu'*Iijima et al.* ont synthétisé les premiers nanotubes de carbone multi-feuillets [14], puis 2 ans plus tard, en 1993, les premiers nanotubes de carbone mono-feuillets [15]. En

2004, *Geim et al.* ont isolé et étudié le graphène [16], et les 20 années suivantes ont été sources de multiples découvertes de nanostructures : « carbon-dots » [17],[18] (Figure I-2, 0D), « nano-onions » [19],[20] (Figure I-2, 0D), «« nano-horns » [21] (Figure I-2, 1D), nano-ribbons » [22],[23] (Figure I-2, 2D) pour les plus notables.

I.1.1.3. Le graphite et sa structure

Le graphite est l'allotrope cristallin le plus stable du carbone dans les conditions ambiantes de température et de pression, ce qui en fait un matériau d'intérêt majeur pour de nombreuses applications en physique, en chimie et dans l'industrie [24],[25]. Il se présente sous forme de cristaux lamellaires constitués de feuillets plans superposés parallèlement. Au sein de chaque feuillet, les atomes de carbone sont arrangés selon une hybridation sp^2, formant un réseau hexagonal bidimensionnel fortement covalent . Les forces entre ces feuillets, quant à elles, sont de type van der Waals et contribuent à la facilité de clivage de la structure du graphite [26]. Sur le plan structural, le graphite est constitué de feuillets de graphène, empilés selon un motif répété de type ABAB [27]. Dans ce type d'empilement, l'atome de carbone de la couche A se trouve directement au-dessus du centre hexagonal de la couche B, et ainsi de suite. Cette organisation cristallographique hexagonale a été mise en évidence par diffraction des rayons X et elle conduit à un espacement interplanaire moyen d'environ 0,335 nm [28].

Chaque feuillet, composé d'atomes de carbone hybridés sp^2, présente des liaisons covalentes fortes (liaisons σ) entre les atomes voisins dans le plan. Le réseau bidimensionnel hexagonal qui en résulte confère au graphite une très grande rigidité dans la direction des feuillets. En revanche, les interactions entre les couches sont bien plus faibles, de l'ordre de quelques $kJ.mol^{-1}$, ce qui favorise le glissement des plans les uns par rapport aux autres [29]. Cette anisotropie intrinsèque explique les propriétés mécaniques du graphite, telles que sa facilité de clivage selon le plans basal et son aspect feuilleté [30],[31].

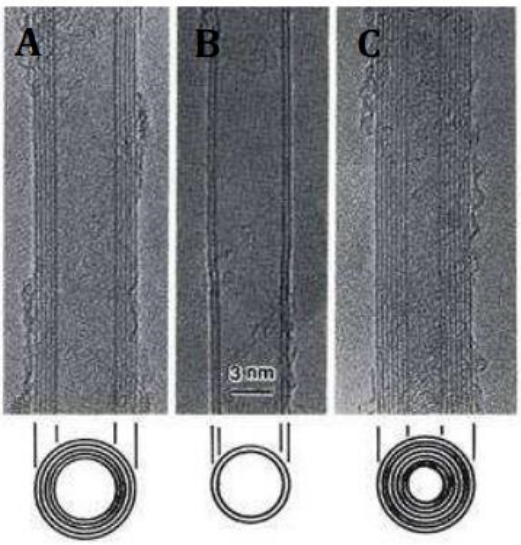
D'un point de vue électronique, la forte liaison covalente dans le plan génère un système délocalisé d'électrons π, conférant au graphite un caractère semi-métallique [32]. Le recouvrement important des orbitales p dans le plan (à l'origine de la délocalisation électronique π) est à l'origine de la bonne conductivité électrique du graphite parallèlement aux feuillets, ainsi que de ses propriétés optiques particulières [32]. La

stabilité du graphite par rapport aux autres formes allotropiques du carbone (par exemple le diamant ou les carbones amorphes) s'explique par la thermodynamique. A pression et température ambiantes, l'organisation lamellaire sp^2 présente le minimum d'énergie libre [33]. Néanmoins, à très haute pression, le diamant devient plus stable, et des transitions de phase graphite-diamant peuvent être induites expérimentalement [34].

I.1.2. Nanotubes de carbone

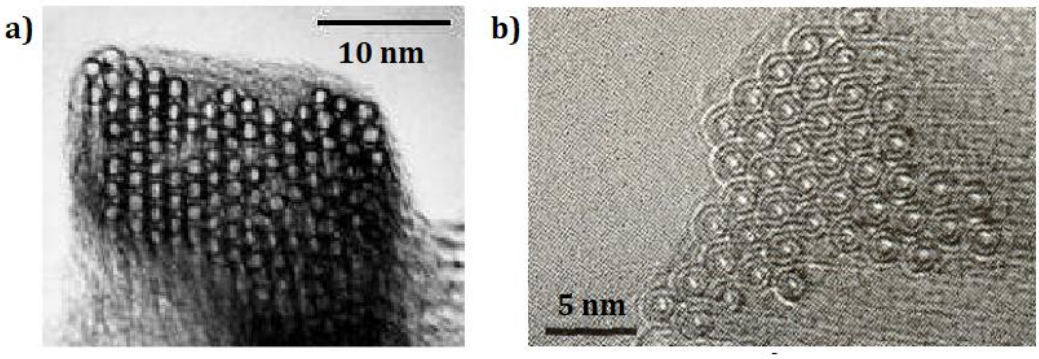
En 1991, lorsqu'*Iijima et al.* observent pour la première fois des nanotubes de carbone au microscope électronique à transmission, ils constatent la présence de plusieurs cylindres concentriques (Figure I-3). Ils sont alors nommés nanotubes de carbone multi-feuillets (MWNT : Multi-Wall carbon NanoTubes) [14]. On peut décrire cette structure comme un empilement de cylindres coaxiaux à l'échelle nanométrique, dont l'espacement interfeuillet se rapproche de celui du graphite (environ 0,34 nm) [14],[35]. Le diamètre externe des MWNT s'étend en général de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres, alors que leur longueur se situe dans la gamme du micron, et peut même parfois dépasser plusieurs dizaines de microns [36]. Le nombre de parois peut varier de quelques couches (typiquement 2 à 5) à plusieurs dizaines. Cette organisation concentrique confère aux MWNT une robustesse mécanique notable et une bonne stabilité thermique. En revanche, les propriétés électroniques des MWNT sont plus complexes à décrire, car chaque couche peut posséder sa propre chiralité, et donc son propre caractère (métallique ou semi-conducteur). Les interactions entre couches compliquent encore davantage l'étude fine de leurs caractéristiques électroniques [37].

Les nanotubes de carbone ne possédant qu'une seule paroi, découverts expérimentalement en 1993, sont donc nommés nanotubes de carbone mono-feuillets (SWNT : Single-Wall carbon NanoTubes) [15]. Les SWNT peuvent être décrits comme des feuillets de graphène (une seule couche d'atomes de carbone organisés en réseau hexagonal) enroulés sur eux-mêmes pour former un cylindre [38]. Le diamètre typique des SWNT varie généralement de 0,8 à 2 nm, tandis que leur longueur peut s'étendre de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres [39].



<u>Figure I-3 :</u> Images TEM de microtubules de carbone graphitique (nanotubes de carbone), A : 5 feuillets et 6,7 nm de diamètre, B : 2 feuillets, 5,5 nm de diamètre, C : 7 feuillets, 6,5 nm de diamètre [14].

Un phénomène caractéristique des nanotubes de carbone à paroi simple (SWNT) est leur tendance à s'agréger sous forme de « fagots » (ou faisceaux), principalement à cause des fortes interactions de Van der Waals qui existent entre leurs parois quasi-cylindriques [39]. En pratique, ces fagots rassemblent un nombre variable de tubes, une dizaine à une centaine, étroitement empaquetés et alignés. Cette configuration influence sensiblement les propriétés physiques et chimiques des SWNT, en modifiant notamment leurs signatures optiques et électroniques, ainsi que leur réactivité de surface [40]. Par exemple, la présence d'interactions intertubulaires dans un fagot peut atténuer les transitions électroniques individuelles observables dans les spectres optiques, et réduire l'efficacité de certaines applications (transistors à effet de champ, biocapteurs), lorsque le dispositif exige la dispersion de nanotubes isolés [41]. Des « fagots » de MWNT peuvent aussi être observés, en particulier ceux possédant deux parois (DWNT : Double-Wall carbon NanoTubes) (Figure I-4) [42].



<u>Figure I-4 :</u> « Fagots » de nanotubes de carbone : a) SWNT [43] *b) DWNT* [42].

Cette agrégation en « fagots », couplée au caractère hydrophobe des SWNT, induit une faible solubilité des SWNT dans l'eau. Cela implique de les disperser avant toute utilisation dans toute application nécessitant des tubes isolés [44]. D'autres structures peuvent parfois être appelées nanotubes de carbone mais sont en réalité des nanofibres de carbone. Lorsque des MWNT possèdent de nombreux défauts récurrents (défauts de surface, graphitisation, fermetures internes…), le terme de nanotube de carbone n'est plus approprié. Les plus répandues sont les structures « bamboo », présentant des fermetures internes et plusieurs parois [45]. D'autres types de nanofibres existent, à l'image des « stacked cup » [46] ou des « herring-bone » [47] (Figure I-5) [48]. Certaines nanofibres de carbone présentent un canal rempli, on parlera alors de nanofils, et lorsque les défauts sont sur représentés, on peut parler de carbone amorphe.

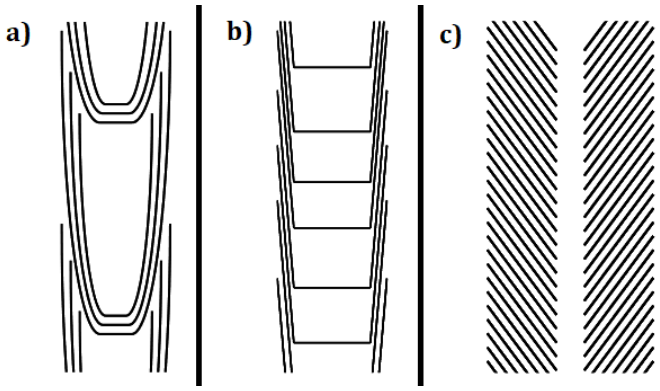


Figure I-5 : Structures types nanofibres de carbone : a) « bamboo », b) « stacked-cup », c) « herring-bone » [47].

I.2. Différents types de SWNT

I.2.1. Structures

Chaque méthode de synthèse permet d'obtenir des SWNT avec différentes nanostructures. La structure d'un SWNT peut être visualisée en considérant un ruban de graphène fini. Si on l'enroule sur lui-même en joignant les bords opposés à chaque tour, on obtient un tube unidimensionnel constitué de carbones sp^2 [49].

I.2.2. Coordonnées (n,m)

De nombreuses structures de nanotubes sont possibles, et sont décrites par les indices chiraux (n,m) [50]. Pour chacune, on définit un vecteur de chiralité noté $\mathbf{C_h}$, un angle chiral

θ et un diamètre correspondant (Figure I-6) [51]. $\mathbf{C_h}$ est une combinaison des vecteurs de base du réseau de la feuille de graphène ($\mathbf{a_1}$ et $\mathbf{a_2}$, séparés par un angle de 120°), où $\mathbf{C_h}$ = n.$\mathbf{a_1}$ + m.$\mathbf{a_2}$, n et m étant les indices de chiralités et étant forcément des entiers non négatifs. θ est l'angle formé entre les vecteurs $\mathbf{C_h}$ et $\mathbf{a_1}$, et est compris entre 0° et 30°. Si θ = 0° (et donc si m = 0), on parle de structure « armchair », et si θ =30° (et donc si m = n), on parle de structure « zigzag ». Ces noms étant inspirés de la ligne décrivant le bord du ruban de graphène (Figure I-7). Dans tous les autres cas, où 0° < θ < 30°, et où n ≠ m, les SWNT sont chiraux.

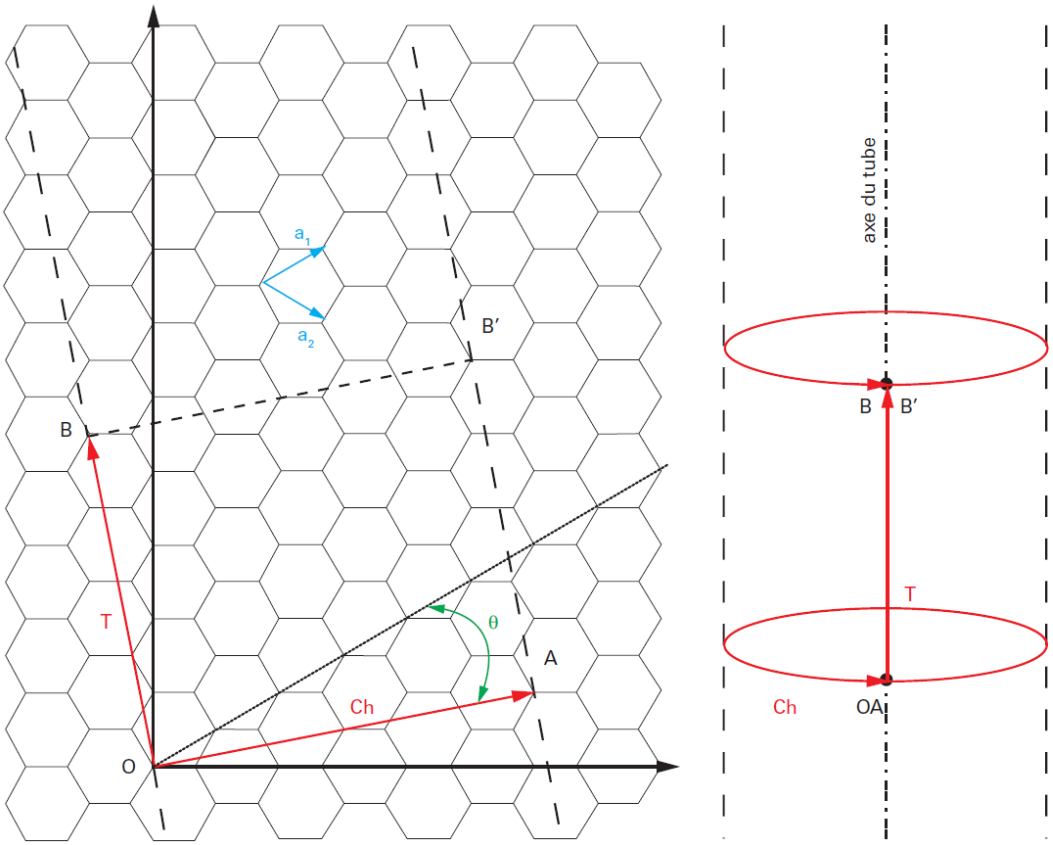
La structure d'un SWNT a une influence sur ses propriétés électroniques. On emploie la formule :

$$\frac{n-m}{3} = x \qquad \text{[I-1]}$$

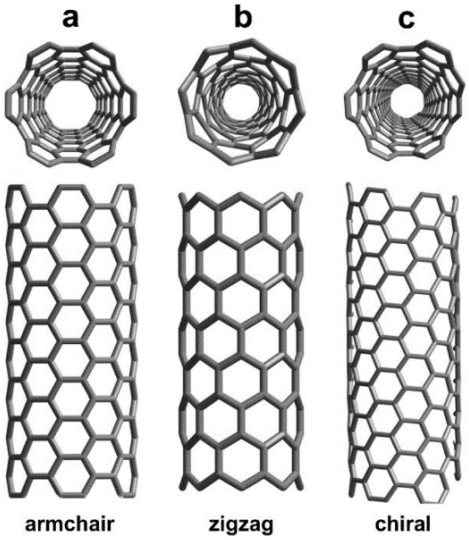
Où, si x = 0, le nanotube est métallique, et dans tous les autres cas, il est semi-conducteur [52]. En effet, le graphène possède une structure de bande bien connue : les bandes de conduction et de valence se touchent en des points K aux coins de la zone de Brillouin hexagonale. Dans un diagramme de dispersion, ces points sont le siège d'une dispersion linéaire, d'où le caractère semi-métallique du graphène (pas de bande interdite à l'échelle macroscopique) [53]. Or, lorsque l'on « roule » le graphène pour en faire un nanotube, on impose une condition de quantification du vecteur d'onde le long du périmètre (la circonférence) : les ondes électroniques doivent vérifier la formule :

$$\mathbf{k} \times \mathbf{C_h} = 2\pi \times a \qquad \text{[I-2]}$$

Où $\mathbf{k}$ est le vecteur onde et où a est un entier. Ainsi, seules certaines directions (et valeurs) de $\mathbf{k}$ deviennent autorisées le long de la circonférence, formant dans l'espace réciproque des lignes de quantification [32]. Si l'une de ces lignes de quantification passe exactement par le point K dans l'espace réciproque, alors le nanotube résultant possède un état électronique sans écart d'énergie (bande interdite nulle ou quasi nulle), on parle de nanotube métallique. Ainsi, tous les SWNT « armchair » sont métalliques, et les SWNT « zigzag » peuvent être métalliques ou semi-conducteurs. Les variations dans la chiralité conduisent également à des différences dans l'énergie de la bande interdite (pour les semi-conducteurs) et dans la position des pics d'absorption optique [54].



<u>Figure I-6 :</u> Représentation schématique de la formation d'un SWNT à partir de l'enroulement d'un ruban de graphène



<u>Figure I-7 :</u> Les différentes familles de SWNT : a) armchair, b) zigzag, c) chiral [55].

I.3. Dispersion des SWNT

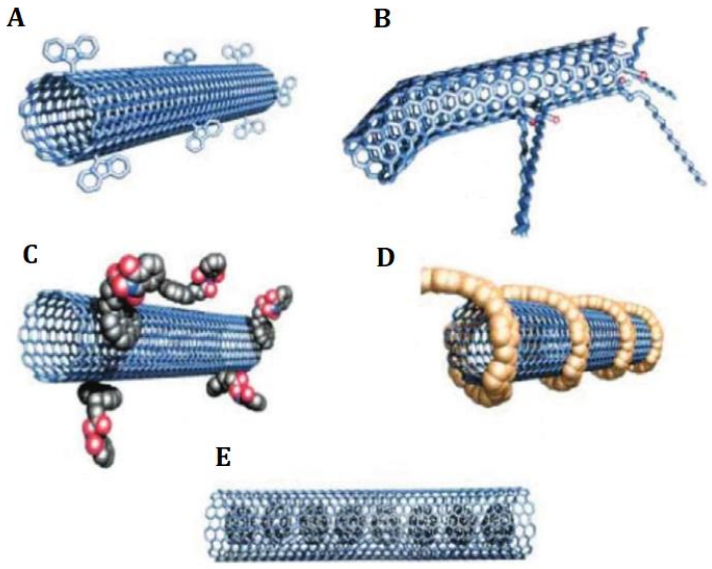
La compréhension des propriétés des nanotubes de carbone (CNT) et le développement de leurs applications pratiques ont longtemps été entravés par leur très faible solubilité dans tous les solvants conventionnels. En effet, l'hydrophobicité des parois latérales du graphène et les interactions π-π ou Van der Waals entre les tubes individuels conduisent à une faible solubilité des CNT dans les solvants aqueux. Ces propriétés provoquent l'agrégation des CNT, ce qui rend les suspensions de CNT non uniformes et conduit à une toxicité cellulaire importante. [56],[57],[58]. L'effort de fonctionnalisation des CNT a été motivé à la fois par la nécessité de contourner leur insolubilité et leur manipulation difficile, et par la possibilité de modifier leur surface de manière contrôlée avec des biomolécules présentant un intérêt fonctionnel. Au cours des dernières décennies, une activité de recherche intense a été consacrée à la mise au point d'approches pour la fonctionnalisation des CNT [59],[60],[61],[62],[63],[64],[65].

En tant que vecteurs de médicaments, la solubilité des CNT dans un milieu aqueux ou biologique est un paramètre important pour leurs applications médicamenteuses [66]. La modification externe des nanotubes de carbone est donc nécessaire pour leur utilisation dans des applications biologiques, en particulier pour la vectorisation de médicaments.

La modification des CNT peut être réalisée en greffant des molécules de manière covalente sur les parois latérales, ou par interaction non covalente de molécules organiques ou inorganiques. Le remplissage des CNT avec des atomes ou de petites molécules est un cas particulier de fonctionnalisation non covalente. On appelle cette fonctionnalisation endoédrique, par opposition à la fonctionnalisation exoédrique. La Figure I-8 présente ces 5 types de fonctionnalisation.

La fonctionnalisation covalente consiste à relier les CNT et les groupes fonctionnels par une liaison chimique. Dans le cas de la fonctionnalisation covalente, les groupes fonctionnels sont greffés sur le squelette des CNT par des réactions chimiques et cette approche permet généralement d'obtenir des conjugués chimiquement stables. Les fonctions générées à la surface des CNT permettent la conjugaison de biomolécules avec des fonctions d'intérêt biologique, physique et/ou chimique. L'adsorption non covalente de biomolécules sur les CNT est plutôt basée sur des interactions faibles, telles que les forces de van der Waals.

Contrairement aux modifications covalentes, les méthodes non covalentes ne perturbent pas l'hybridation sp^2 des nanotubes de carbone et préservent donc leurs propriétés optiques ou électroniques, importantes pour les applications biomédicales des nanotubes de carbone dans l'imagerie et la détection. L'interaction non covalente repose sur la nature hydrophobe des CNT pour l'adsorption de molécules amphiphiles, telles que les surfactants [67], les conjugués lipides-polymères [68] et certains copolymères [69]. Cette approche est non destructive, c'est-à-dire qu'elle n'affecte pas la structure du nanotube en elle-même et peut elle aussi permettre la libération des molécules adsorbées (ou encapsulées). La combinaison des fonctionnalisations covalente et non covalente permet de conférer des multimodalités aux nanotubes de carbone, élargissant ainsi leurs propriétés et le champ de leurs applications potentielles [70]. De plus, la fonctionnalisation des CNT permet de réduire la cytotoxicité et d'améliorer la biocompatibilité, tout en offrant la possibilité de conjuguer des molécules médicamenteuses, des protéines ou des acides nucléiques [71],[72]. En immobilisant différents types de molécules bioactives sur les CNT, de manière covalente ou non covalente, il est possible de leur conférer des capacités de ciblage, de diagnostic et de thérapie, ce qui les rend très attrayants en tant que nano-vecteurs.



<u>Figure I-8 :</u> Représentations schématiques des différents types de fonctionnalisation sur SWNT. A : Fonctionnalisation covalentes sur défauts à la surface, B : Fonctionnalisation covalente de surface, C : Adsorption/complexation/dispersion avec un surfactant, D : Adsorption avec un polymère, E : Fonctionnalisation endoédrique (ici avec C_{60}) [73].

I.4. Dispersion des SWNT pour applications biologiques

Il est intéressant de noter que de nombreuses molécules biologiques ont montré leur capacité à s'adsorber sur les nanotubes, ce qui a élargi le champ d'application des nanotubes de carbone dans le domaine biologique. L'immobilisation de biomolécules sur des nanotubes de carbone a été rapportée pour les peptides, les protéines, les mono- et polysaccharides, les phospholipides et les acides nucléiques [74],[75]. Par exemple, les protéines se dispersent très bien dans les nanotubes : l'interaction supramoléculaire entre les deux est renforcée par l'empilement entre la surface graphitique et les résidus d'acides aminés aromatiques de la séquence protéique. L'adsorption de biomolécules sur les nanotubes de carbone permet de combiner les propriétés conductrices de ces derniers avec la capacité de reconnaissance de la biomolécule, ce qui permet d'obtenir de nouveaux systèmes bioélectroniques exploitables comme biocapteurs avancés [64].

Les SWNT peuvent être fonctionnalisés de manière non covalente par l'intermédiaire de dérivés du pyrène établissant des interactions π-π avec les oxydes de surface [76]. Par exemple, un dérivé de l'acide pyrène carboxylique agit comme réticulant chimique pour ancrer des nanoparticules d'oxyde de fer porteuses d'un groupe alkyle sur des nanotubes de carbone, conduisant à une solubilité accrue du produit final dans des milieux organiques [77]. Des phtalocyanines et des dérivés de porphyrine peuvent également être greffés sur les SWNT [78], générant des matériaux hybrides à large surface spécifique employés comme couches sensibles pour la détection du toluène. D'autres modifications non covalentes consistent à exposer les nanotubes de carbone à des vapeurs contenant les espèces à fonctionnaliser, ce qui préserve l'interaction non covalente tout en introduisant des groupes chimiques susceptibles de réagir ultérieurement avec d'autres composés.

Une méthode de fonctionnalisation sans enveloppement a en outre été introduite [79] : elle peut s'opérer dans des solvants organiques ou inorganiques, et les nanotubes de carbone sont alors fonctionnalisés par un polymère conjugué et porteur de groupes fonctionnels, sans encapsulation complète de leurs surfaces. Une dispersion des nanotubes dans une matrice polymère ou copolymère dotée d'orbitales électroniques délocalisées a été brevetée [80] : ce procédé repose sur une interaction de dispersion entre les nanotubes et le polymère ou copolymère hôte. Par ailleurs, diverses macromolécules peuvent être adsorbées de manière non covalente sur les nanotubes de carbone : des mélanges de diméthylsulfoxyde et d'eau ont ainsi servi à solubiliser des

nanotubes avec de l'amylose [81], des protéines métallothionéines se sont avérées capables de se fixer à la surface des SWNT [82], et des brins d'ADN forment avec eux des hybrides stables assurant une dispersion efficace en solution aqueuse [83],[84].

I.5. Multi-fonctionnalisation

La fonctionnalisation multiple des nanotubes de carbone est utilisée pour leur attacher plusieurs fonctions différentes et ainsi doter le complexe final de propriétés multimodales. Les stratégies de multi-fonctionnalisation reposent sur la combinaison de différentes approches covalentes, de multiples interactions non covalentes ou d'une combinaison d'approches covalentes et non covalentes. De plus, jusqu'à trois ou quatre stratégies de fonctionnalisation différentes peuvent être appliquées sur le même conjugué, ce qui élargit considérablement le champ des possibilités et permet une grande polyvalence. Cette stratégie de synthèse a été particulièrement exploitée pour préparer des constructions de nanotubes de carbone dédiées aux applications biologiques, car elle permet de les conjuguer simultanément avec une molécule de ciblage, une sonde fluorescente et un agent thérapeutique (Figure I-9) [70],[74].

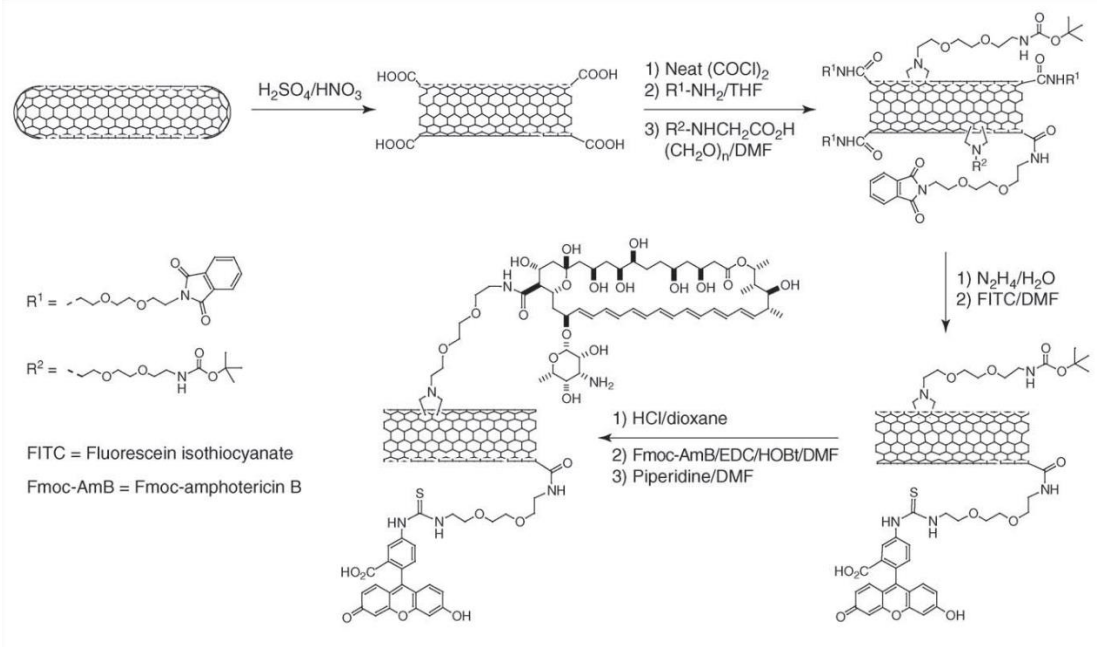


Figure I-9 : Représentation schématique de la synthèse de multi-fonctionnalisation d'un CNT. Le nanotube a été décoré avec une sonde fluorescente (la fluorescéine) et un antibiotique (l'amphotéricine B). Ainsi, la sonde fluorescente permet de suivre l'absorption dans la cellule, et l'antibiotique permet d'exercer un pouvoir thérapeutique.

L'un des premiers exemples de double fonctionnalisation présente des nanotubes de carbone ayant été dérivatisés de manière covalente par cycloaddition 1,3-dipolaire avec deux chaînes fonctionnelles différentes. Après clivage sélectif des deux groupes protecteurs orthogonaux, les amines libres ont été conjuguées dans un cas avec une sonde fluorescente et dans l'autre avec une molécule anticancéreuse [85]. Dans un autre exemple, la Doxorubicine (DOX) a été adsorbée sur des SWNT préalablement fonctionnalisés avec un PEG phospholipidique (PL-PEG) soit par amidation des groupes carboxyliques, soit par adsorption non covalente [86]. Malgré le PL-PEG enroulé autour des tubes, ceux-ci peuvent encore être chargés avec une quantité importante de Doxorubicine. De nombreux autres groupes ont développé des nanotransporteurs à base de CNT pour l'administration de différents médicaments, tels que la Doxorubicine et le paclitaxel, en chargeant la molécule sur des CNT préalablement fonctionnalisés avec une chaîne polymère (des polysaccharides, du PEG, des phospholipides) et/ou un agent de ciblage (un anticorps, un peptide RGD [arginine-glycine-acide aspartique], de l'acide folique FA, etc.) [74]. Un nano-vecteur hybride à double ciblage magnétique a été rapporté, combinant les avantages des MNWT et ceux des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (MIONP), et a été utilisé pour l'administration de médicaments et la chimiothérapie [87]. Les MWNT ont d'abord été fonctionnalisés avec du poly(acide acrylique) (PAA) par polymérisation radicalaire, puis décorés avec des MIONP de manière non covalente. Le ligand ciblé, l'acide folique, a ensuite été greffé par amidation médiée par la carbodiimide entre le COOH du PAA sur les MWNT et le NH2 de l'AF. Une sonde fluorescente, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), a également été conjuguée au nano-vecteur par formation de liaisons covalentes spontanées avec les groupes amines résiduels de surface, tandis que la Doxorubicine a finalement été chargée par empilement π-π et liaison hydrogène. Cette approche synthétique multiple permet une administration ciblée double du médicament aux cellules cancéreuses sous l'effet d'un champ magnétique et par le biais d'interactions ligand-récepteur. Des études *in vitro* ont permis de vérifier que ce conjugué était efficacement absorbé par les cellules de glioblastome U87 et que la libération intracellulaire ultérieure de Doxorubicine entraînait une cytotoxicité accrue par rapport au médicament libre.

Un autre exemple de multifonctionnalisation a été réalisé par *Timaciu et al.*. Dans cette étude, les auteurs décrivent la conception d'un nanobiosenseur multifonctionnalisé

reposant sur des MWNT conjugués à un peptide biosenseur fluorescent spécifique de CDK1 pour l'imagerie ratiométrique de l'activité kinase. Le peptide, dérivé du site d'autophosphorylation de la cycline B1, est couplé via une chimie d'amidation à des nanotubes pré-fonctionnalisés avec des groupes carboxyles, permettant une forte densité de greffage et un contrôle précis de la surface (Figure I-10). La sonde fluorescente utilisée, une rhodamine ou des dérivés Cy5 selon l'application, est positionnée de manière à signaler des changements conformationnels dépendant de la phosphorylation du substrat par CDK1, entraînant une modulation de l'émission de fluorescence. Grâce à l'utilisation de la fluorescence ratiométrique – notamment en co-injectant un contrôle fluorescent indépendant ou en intégrant deux fluorophores distincts sur le même nanotube –, il est possible de normaliser le signal du biosenseur par rapport à sa concentration locale, garantissant ainsi une quantification fiable et indépendante des variations de distribution. Cette approche a permis de détecter et de quantifier l'activité endogène de CDK1 in vitro, dans des cellules vivantes (HeLa) et in vivo dans des xénogreffes tumorales murines, démontrant la capacité du nanobiosenseur à pénétrer les membranes cellulaires efficacement, à conserver sa fonctionnalité enzymatique et à offrir une lecture non-invasive de l'activité kinase directement dans le tissu tumoral vivant [88].

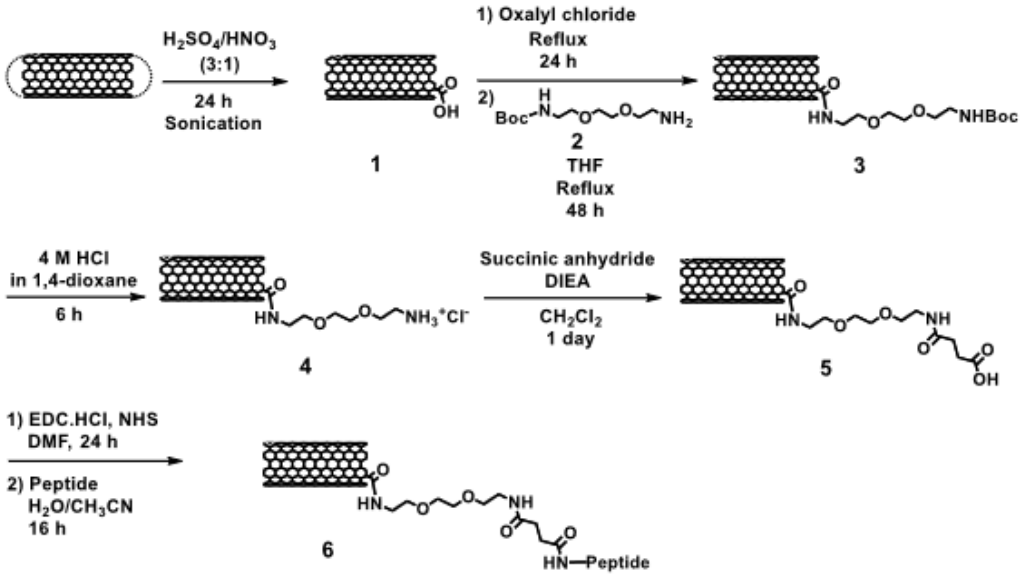


Figure I-10 : Représentation schématique de la synthèse de multi-fonctionnalisation d'un CNT avec peptide biosenseur et sonde fluorescente [88].

I.6. Fonctionnalisation interne

L'encapsulation de molécules à l'intérieur des nanotubes de carbone suscite un intérêt croissant dans le domaine biomédical, car la cavité interne des nanotubes peut être remplie d'une charge thérapeutique ou d'imagerie, tandis que la surface externe peut être modifiée pour conférer dispersibilité, biocompatibilité et sélectivité de site [89]. Bien que moins explorée que la fonctionnalisation externe, l'approche de chargement interne offre la possibilité de confiner l'agent diagnostique ou thérapeutique, le protégeant ainsi de la dégradation ou de l'inactivation et lui conférant une stabilité supplémentaire.

Après le premier rapport de Pederson et Broughton sur le remplissage des nanotubes de carbone, [90] une grande variété de matériaux organiques et inorganiques ont été encapsulés à l'intérieur de SWNT et MWNT [89]. Une grande variété de molécules peuvent être localisées dans la cavité intérieure des nanotubes, allant de petits atomes de gaz comme He à des molécules plus grosses, telles que Gd2@C92 (gadolinium métallofullerène) [91],[92]. En raison du profond puits de potentiel à l'intérieur des tubes, les molécules peuvent en principe pénétrer très facilement à l'intérieur des nanotubes, à condition qu'elles aient suffisamment d'énergie pour se déplacer vers les extrémités ouvertes du tube et surmonter la faible barrière énergétique d'entrée [93]. Le processus de remplissage peut être effectué soit pendant la synthèse des CNT, soit après la synthèse, si les CNT sont ouverts. Ce dernier procédé est le plus utilisé, en particulier pour l'inclusion de molécules sensibles à la température ou aux catalyseurs. Les méthodologies de remplissage post-synthèse des nanotubes de carbone sont généralement classées en deux catégories : la voie gazeuse et la voie liquide [94]. Dans la première stratégie, les nanotubes de carbone sont placés dans une ampoule scellée sous vide et le matériau à enfermer pénètre dans les nanotubes de carbone en phase gazeuse, qui est soit sa phase naturelle, soit obtenue par sublimation. Dans la méthode liquide, le matériau de remplissage est liquide ou chauffé au-dessus de sa température de fusion, et les nanotubes sont remplis par mouillage capillaire. De plus, l'entrée dans la cavité intérieure présente une faible barrière et est assez spontanée si la tension superficielle du liquide n'est pas trop élevée [93].

I.7. Vectorisation

Les systèmes de vectorisation de médicaments visent à améliorer le ciblage sélectif et à augmenter la biodisponibilité des molécules thérapeutiques dans les cellules cancéreuses. Ceci contribue à réduire les effets secondaires, en particulier pour les molécules à forte hydrophobicité, au moyen de nano-plateformes assurant, dans l'idéal, un dosage précis, modulable et localisé selon un rythme prédéfini [95],[96],[97]. La vectorisation n'est cependant pas forcément liée à des nano-plateformes. L'électroperméabilisation permet par exemple le traitement ciblé de tumeurs [98], et des systèmes d'hydrogels peuvent d'auto-assembler et de désagréger grâce à des ultrasons [99].

L'efficacité d'un composé médicamenteux peut être considérablement améliorée par son incorporation dans un système de vectorisation de médicaments [100]. Une grande variété de stratégies de vectorisation de médicaments covalentes et non covalentes a été développée [101],[102],[103],[104]. Elles augmentent la biodisponibilité, réduisent la toxicité, contrôlent la libération des molécules médicamenteuses et permettent un ciblage précis des médicaments [105]. Par exemple, les peptides de pénétration cellulaire, de courts peptides pouvant traverser la membrane cellulaire, permettent d'y vectoriser des molécules actives [106],[107].

Le système de vectorisation de médicaments peut être appliqué non seulement pour l'administration orale courante, mais aussi pour d'autres voies d'administration telles que l'administration intraveineuse, transdermique ou pulmonaire. L'interaction entre les fines particules et la peau au niveau cellulaire peut être utilisée pour améliorer la réactivité immunitaire pour les applications de vaccins topiques [108].

La biodégradabilité, la biocompatibilité et la capacité de fonctionnalisation font des matériaux biopolymères de bons candidats à utiliser largement dans l'industrie pharmaceutique [109]. Les agents thérapeutiques peuvent être piégés ou encapsulés dans une matrice polymère, qui peut être personnalisée pour protéger les principes actifs avant qu'ils n'atteignent le site cible, et permet la libération à travers la matrice jusqu'au site d'action. En effet, le principe actif est d'abord piégé (par encapsulation physique ou par conjugaison covalente) dans un réseau qui l'isole des enzymes et des fluctuations de pH sanguin pendant le transport. Une fois la particule arrivée dans le micro-environnement pathologique, la libération se fait selon divers mécanismes : diffusion à travers les

nanocanaux du polymère gonflé, dégradation contrôlée qui rompt progressivement le réseau ou transitions stimuli-réactives où un signal intrinsèque ou externe déclenche l'ouverture de la matrice [110],[111]. Le ciblage se superpose à cette cinétique : la taille nanométrique et un manteau hydrophile prolongent la circulation et exploitent l'effet EPR pour un enrichissement passif dans les tumeurs, tandis que des ligands (anticorps anti-EGFR, peptides RGD, acide folique, etc.) greffés en surface assurent un ciblage actif des récepteurs surexprimés, comme le démontrent les nanoparticules polymériques développées contre le cancer du sein triple-négatif ou les systèmes à base de chitosane [112],[113].

Le système de vectorisation de médicaments offre également la possibilité de protéger les agents thérapeutiques pour permettre leur administration par différentes voies. En effet, les formulations peuvent solubiliser, disperser, homogénéiser, protéger et cibler les composés [114],[115],[116],[117].

Dans cette optique, les nanotubes de carbone représentent un vecteur de choix pour la vectorisation, grâce à leur importante surface spécifique, leur stabilité chimique, leur capacité à encapsuler, leur aptitude au chargement de médicaments et leur faculté à traverser les membranes cellulaires (sans entraîner la mort cellulaire). S'y ajoute leur aptitude à interagir, de façon covalente ou non, avec les principes actifs et les biomolécules par le biais de forces de van der Waals, d'interactions hydrophobes ou électrostatiques [96],[118]. Les travaux de recherche s'orientent ainsi vers la conception de stratégies non toxiques à base de CNT, qui pourraient être éliminés de la circulation humaine via la voie rénale sans engendrer d'effets indésirables [119],[120],[121].

I.8. Toxicité des CNT

Du point de vue des applications biomédicales et pharmacologiques, les nanotubes de carbone (CNT) constituent un sujet de controverse. La littérature oscille en effet entre la mise en avant de leur toxicité potentielle et l'exaltation de leur importance pour les applications biologiques et médicales. Leur structure a suscité depuis longtemps d'importantes inquiétudes sur le plan toxicologique [122],[123], et de nombreuses études ont cherché à répondre à la question : « Les CNT sont-ils toxiques ? »

[66],[124],[125],[126],[127]. Malheureusement, il n'existe pas de réponse simple ou évidente à ce sujet, car la toxicité d'un composé dépend d'une multitude de facteurs. De plus, comme pour tout agent à visée thérapeutique ou diagnostique, le risque d'effets nocifs doit toujours être évalué en regard des bénéfices potentiels.

Le profil toxicologique des nanotubes de carbone dépend étroitement de leurs propriétés et caractéristiques (structure, longueur, rapport d'aspect, degré de défauts, agrégation, degré et type de fonctionnalisation, méthode de synthèse). Par conséquent, les résultats d'études sur leur toxicité, leurs mécanismes d'internalisation et leur biodistribution demeurent parfois contradictoires, incitant à la plus grande prudence avant toute conclusion définitive. Il est cependant aujourd'hui communément admis que certaines caractéristiques des CNT influencent fortement leur toxicité [128], et il convient de les examiner brièvement.

La pureté est le premier de ces paramètres. En effet, la présence et la quantité de particules métalliques résiduelles (issues du procédé de production) dans un échantillon de CNT peuvent provoquer des effets indésirables dans le microenvironnement cellulaire, notamment via la production d'espèces réactives à l'oxygène responsables d'une réponse inflammatoire [129]. Ainsi, des CNT purifiés de haute qualité sont préférables pour les applications biologiques.

De multiples travaux ont aussi montré jusqu'ici que les CNT longs et rigides sont à éviter, car ils ne sont pas seulement peu adaptés à l'administration de médicaments, mais peuvent aussi produire des effets délétères analogues à ceux des fibres d'amiante [130],[131],[132],[133]. Il est établi que des CNT de plus de 20 μm ne sont pas entièrement internalisés par les macrophages, entraînant une phagocytose partielle et une clairance limitée [131]. Pour les applications *in vivo*, il est fondamental de s'assurer de la stabilité des dispersions de CNT et de les maintenir sous forme individualisée.

De gros agrégats peuvent en effet échapper à la phagocytose par les macrophages ou obstruer de petits capillaires, engendrant ainsi des effets toxiques. Une sonication intensive et une fonctionnalisation appropriée et biocompatible constituent donc des étapes cruciales lors de la préparation et peut significativement réduire le risque de réponse inflammatoire aiguë [66]. La quantité et le type de groupements fonctionnels

présents à la surface des nanotubes influencent également leur cytotoxicité, leur biodistribution et leur devenir dans l'organisme [134],[135].

Par exemple, il a été observé que des CNT fonctionnalisés avec du PEG présentent une immunogénicité plus faible et des temps de circulation sanguine plus longs [136]. À noter que des nanotubes de carbone oxydés par voie acide ont montré des effets toxiques et une réponse inflammatoire, attribués à la présence de groupes oxygénés et de nombreux sites de défaut réactifs [137],[138].

L'influence de ces paramètres sur la toxicité des CNT s'exprime à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'évaluation *in vitro* repose sur l'étude de la prolifération cellulaire, de l'apoptose ou de la nécrose, du stress oxydatif, des dommages à l'ADN et de l'expression d'enzymes spécifiques, qui peuvent tous être affectés par l'exposition aux CNT. Il a été démontré à plusieurs reprises que les CNT non fonctionnalisés induisent une toxicité cellulaire accrue, conduisant à l'apoptose et à la nécrose [66]. À l'inverse, leur fonctionnalisation externe renforce leur biocompatibilité et abaisse leur toxicité. Certaines études rapportent que les macrophages peuvent ingérer d'importantes quantités de CNT fonctionnalisés sans manifester d'effets toxiques, et que des CNT fonctionnalisés ne se révèlent pas cytotoxiques à l'égard des cellules régulant la réponse immunitaire (par exemple, les lymphocytes) [139],[140]. La toxicité *in vivo* englobe quant à elle à la fois la pharmacocinétique du composé administré (par exemple, la circulation sanguine, le taux de libération du médicament, la rétention, le métabolisme, l'excrétion) et son impact toxicologique (réponse physiologique et immunologique, biodistribution). Une préoccupation majeure concerne la toxicité pulmonaire induite par inhalation dans un cadre professionnel. En effet, une administration abdominale de nanotubes induit la formation de granulomes et peut causer un mésothéliome (cancer de la plèvre) chez la souris, phénomène similaire à celui observé avec certaines fibres d'amiante [131],[141]. Ces recherches suggèrent que l'inhalation de CNT longs, rigides et non fonctionnalisés peut accroître le risque de carcinogenèse. Lorsque l'on introduit des CNT de longueurs variées dans la cavité pleurale de souris [142],[143], on constate que seuls les CNT longs ne franchissent pas les barrières pulmonaires et restent retenus dans ces tissus, déclenchant une inflammation chronique et des lésions des cellules mésothéliales susceptibles d'engendrer des granulomes. En parallèle, de nombreuses autres études se

sont intéressées aux effets toxiques potentiels de CNT fonctionnalisés et administrés par voie intraveineuse, conditions essentielles à leurs applications thérapeutiques [135]. En effet, le type de fonctionnalisation et la voie d'administration influencent grandement la biodistribution et la métabolisation, ainsi que la réponse physiologique globale. Différentes stratégies ont été employées pour suivre la biodistribution des CNT, notamment le marquage radioactif, qui permet une quantification par scintigraphie gamma et une visualisation *in vivo* au moyen de la TEMP ou de la TEP. La spectroscopie Raman peut également révéler la présence de CNT dans les tissus.

Comme mentionné précédemment, la PEGylation est l'une des méthodes les plus utilisées pour disperser et permettre le transport sanguin des CNT, tandis que leur fonctionnalisation par une molécule de ciblage permet de les diriger vers un site d'intérêt précis, modifiant par conséquent leur profil de distribution. [135].

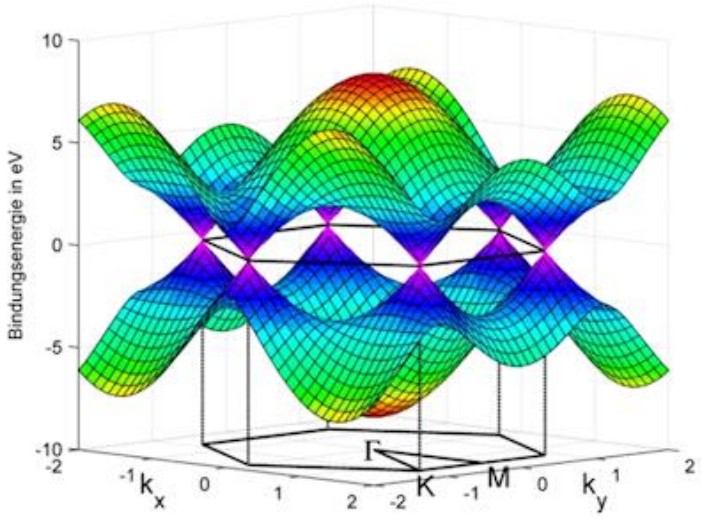
Bien que la taille nanométrique des CNT représente un atout majeur pour l'administration de médicaments, elle constitue aussi l'une de leurs principales limites du point de vue toxicologique. En pratique, la tendance des CNT à former des agrégats peut considérablement augmenter leur taille globale, la portant au-delà de celle de certains vaisseaux sanguins ou du seuil d'excrétion rénale (environ 5 nm). Cette situation peut entraîner des obstructions avec réaction inflammatoire, ainsi qu'une métabolisation et une élimination incomplètes dans les organes cibles, suscitant un risque de toxicité chronique. L'excrétion rénale de CNT administrés par voie intraveineuse est en effet fortement compromise par leur longueur et leur agglomération, qui rendent leur passage à travers l'endothélium difficile. L'autre voie d'élimination pour des particules plus imposantes implique la capture hépatique suivie d'une excrétion biliaire, menant à l'évacuation dans les selles. Toutefois, ce processus demeure lent et relativement inefficace, favorisant la rétention des CNT dans le foie et la rate et alimentant ainsi le risque d'effets indésirables. Les voies d'excrétion défavorables, la longue rétention dans l'organisme et les inquiétudes quant aux conséquences à long terme pour la santé représentent à ce jour les principaux obstacles à la mise en pratique clinique des nanotubes de carbone.

II. Spectroscopie optique des SWNT

II.1. Propriétés électroniques des SWNT

La structure électronique des nanotubes de carbone peut être décrite, dans une première approximation, en utilisant la même approche que pour le graphène, à savoir la méthode des « liaisons fortes » (*tight-binding*) [144],[145]. Cette méthode, largement éprouvée pour décrire la structure électronique de matériaux covalents et de nombreux semi-conducteurs inorganiques tridimensionnels, ainsi que de diverses molécules organiques, fournit un cadre adéquat pour prédire leur conduction (la mobilité des électrons dans la bande de conduction) et leur valence (la capacité des états de valence à fournir ces électrons) [145],[146],[147],[148]. Dans le cas particulier des nanotubes, il est toutefois nécessaire de prendre en compte leur périodicité bien définie à la fois le long de l'axe et selon la circonférence du tube [32], contrairement au graphène qui s'étend de manière bidimensionnelle [149]. En paramétrant les interactions de voisinage et le recouvrement des orbitales, on peut alors calculer la relation de dispersion des nanotubes de manière analogue à celle du graphène [32],[150].

La Figure II-1 illustre la structure de bande (dans sa partie supérieure) et la première zone de Brillouin (dans sa partie inférieure) du graphène. La bande de valence et la bande de conduction se touchent en six points correspondant aux sommets de l'hexagone (points K) au niveau de Fermi [151],[152],[153]. Dans le cas des SWNT, la quantification du vecteur d'onde dans la direction radiale (ou circonférentielle) conduit à des états électroniques discrets propres à chaque tube. Le principe de « zone pliée » (*zone-folding*) [154],[155] permet alors de déterminer si un nanotube sera métallique ou semi-conducteur : 1/3 des SWNT sont métalliques tandis que 2/3 sont semi-conducteurs [156],[157],[158]. Plus précisément, les propriétés électroniques dépendent de la position de ces lignes de coupure par rapport aux points K : si ces lignes coïncident avec l'un de ces points où la densité d'états est non nulle, le nanotube se comporte comme un métal. Dans le cas contraire, il présente une bande interdite (*gap*) caractéristique d'un semi-conducteur [40],[144],[145],[152],[159] [160].



<u>Figure II-1 :</u> Structure des bandes π et π du graphène sur l'ensemble de la première zone de Brillouin* [161].

Van Hove a montré, dans une étude sur les cristaux unidimensionnels, que leur densité d'états électroniques présente des singularités prononcées aux points de haute symétrie [162]. Dans le cas spécifique des nanotubes de carbone, qui peuvent être considérés comme des cristaux unidimensionnels dérivés du graphène, la relation de dispersion au voisinage du point K conduit à une densité d'états se comportant en $1/\sqrt{E}$, où E représente l'énergie de l'état électronique. [40],[145],[148]. La Figure II-2 montre ces singularités de Van Hove dans la densité d'états (DOS) pour des SWNT métalliques et semi-conducteurs. Dans le cas des nanotubes semi-conducteurs, un gap sépare les deux premières singularités de Van Hove, tandis que pour les nanotubes métalliques, la DOS reste continue autour du niveau de Fermi [163]. Ces singularités apparaissent à E/E_0 = 3, 6, 9, etc… pour les SWNT métalliques et à tous les autres rapports pour les SWNT semi-conducteurs, reflétant la position des états électroniques quantifiés dans la structure de bande.

Les électrons peuvent subir une diffusion, qui peut être soit élastique (par un défaut), soit inélastique (par un phonon acoustique ou optique) [160],[164]. Un régime de transport est considéré comme balistique lorsque les électrons traversent le tube sans être diffusés par des impuretés, des défauts ou des phonons. À l'échelle nanométrique, les électrons peuvent se déplacer le long d'un nanotube pratiquement sans subir de diffusion inélastique, aboutissant à un transport balistique sur des longueurs pouvant atteindre plusieurs centaines de nanomètres, voire quelques microns [165].

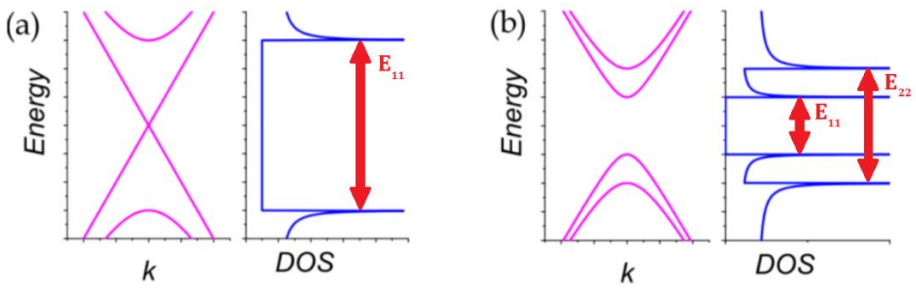


Figure II-2 : Représentation schématique des structures de bandes (rose) et des densités d'états (bleu) pour des SWNT métalliques (a) et semi-conducteurs (b) [166].

II.2. Propriétés optiques des SWNT

Comme expliqué ci-dessus, la densité d'états d'un SWNT est reliée à ses indices chiraux (n,m), qui définissent ses propriétés électroniques, desquelles dépendent ses propriétés optiques. Pour prédire et interpréter les propriétés optiques des SWNT, il est pratique d'utiliser un diagramme de Kataura. [158],[167] Ce diagramme trace les énergies des transitions optiques des SWNT en fonction de leurs coordonnées (n,m), et ce pour les nanotubes métalliques et semi-conducteurs. On peut ainsi attribuer des signatures optiques à certains types de (n,m) en comparant les résultats expérimentaux avec les modèles calculés [164].

Cette représentation s'appuie à l'origine sur une description des électrons selon l'approximation de la liaison forte (*tight-binding*), permettant de déterminer les règles de sélection à partir du calcul de l'élément de matrice associé aux différentes transitions [144],[145],[168]. Cet élément de matrice désigne l'intégrale de recouvrement entre l'état initial de valence et l'état final de conduction. Sa valeur fixe l'amplitude (et donc l'intensité) de la transition optique considérée. Ainsi, seul un élément de matrice non nul satisfait les règles de sélection et conduit à une raie observable dans le diagramme de Kataura. L'absorption dépend alors de la polarisation du champ électrique incident par rapport à l'axe du nanotube. Les transitions autorisées peuvent se produire lorsque cette polarisation est parallèle à l'axe du tube [32],[169],[170]. Cependant, l'absorbance n'est pas uniquement régie par les règles de sélection : elle est également modulée par la force de l'oscillateur, et seules les transitions ayant une polarisation parallèle à l'axe du nanotube contribuent de manière significative au spectre optique [144]. Dans ces conditions, les transitions autorisées sont associées aux paires symétriques des

singularités de Van Hove. Ces transitions optiques dépendent de la nature du nanotube : E_{ii}, aussi notées M_{ii} et S_{ii}, respectivement pour les nanotubes métalliques et semi-conducteurs, où *i* fait référence à la $i^{ème}$ singularité de Van Hove [171]. Les énergies calculées par cette méthode par le calcul dépendent de l'énergie de recouvrement orbitalaire. En la faisant varier on peut prendre en compte les effets à « plusieurs corps » [38],[172],[173],[174]. Cependant, cela ne permet pas de décrire les résultats expérimentaux.

Sur cette base, *Kataura et al.* ont réalisé des mesures d'absorption optique allant du proche infrarouge au visible sur un ensemble de SWNT couvrant une grande plage de diamètres [158]. Ils ont alors représenté l'écart énergétique (*gap*) et les énergies de toutes les bandes d'absorption mesurées en fonction du diamètre du tube pour différents types de SWNT (métalliques et semi-conducteurs). Cet outil est largement utilisé pour interpréter les propriétés optiques des SWNT et pour estimer la distribution de leurs diamètres à partir des énergies d'absorption [39]. Le tracé fondateur de Kataura a le mérite d'offrir une règle d'échelle simple issue d'un modèle de liaisons fortes à premier voisin et de mesures d'absorption sur des ensembles de tubes, mais il suppose un paramètre de transfert constant, ce qui conduit à des écarts systématiques lorsque le diamètre du nanotube est inférieur à 1,2 nm. En effet, la courbure modifie les intégrales de recouvrement, le *trigonal warping* sépare les sous-bandes et crée les familles *2n+m= const* avec pentes opposées pour semiconducteurs de type 1 et 2, et les interactions électroniques et excitoniques (qui seront l'objet de la partie suivante) décalent fortement les transitions optiques par rapport aux transitions à une particule [158],[172],[173],[174],[175],[176].

Pour prendre en compte ces effets, *Jorio et al.* ont établi un « Kataura corrigé » basé sur des spectroscopies Raman résonantes avec des excitations entre 1,26 et 2,7 eV. Elles ont été réalisées sur échantillons dispersés dans l'eau et ont proposé une forme analytique qui incorpore explicitement les effets de chiralité et de courbure :

$$E_{ii}(d,\theta) = \frac{\alpha_p}{d} + \frac{\beta_p \cos(3\theta)}{d^2} \qquad \text{[II-1]}$$

Avec d le diamètre du tube, θ l'angle chiral, α_p le terme principal $= \frac{2}{3}\gamma_0 \alpha_{c-c} p$ et β_p l'amplitude du terme correctif de chiralité/courbure. Cette loi de base, valable entre 0.7 et 2.3nm, regroupe chaque famille E_{ii} le long d'une courbe en fonction de d et θ [167].

Restent les écarts « expérience – liaison forte ». Pour les premières sous-bandes (E_{S11}, E_{S22} et E_{M11}) *Jorio et al.* montrent que les corrections *many-body* suivent la loi de mise à l'échelle dérivée par *Kane & Mele* :

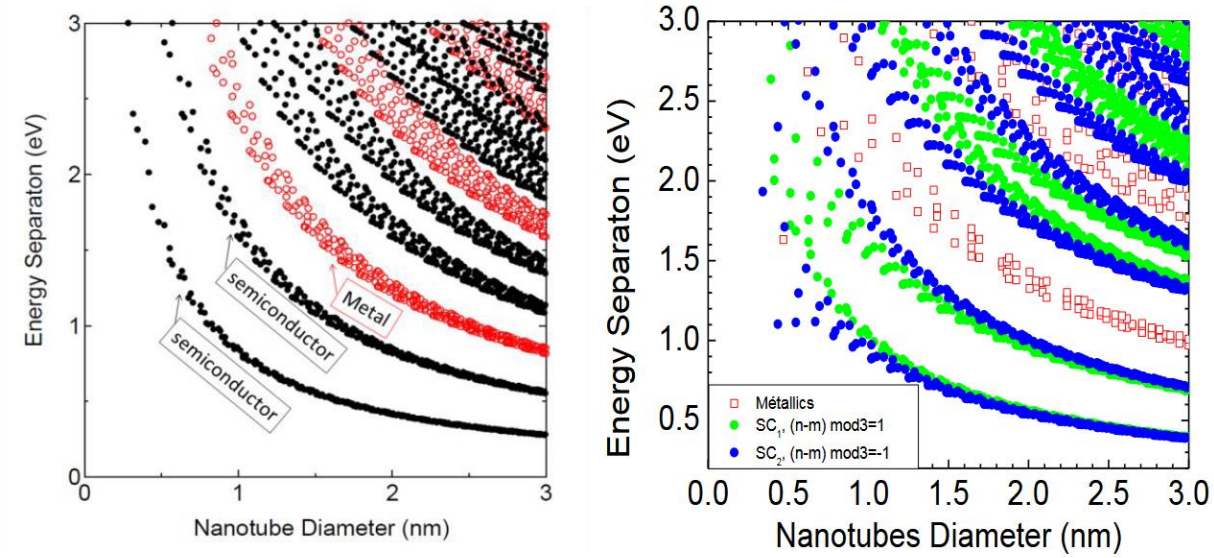
$$\Delta E_{mb} = \gamma_0 \alpha_{c-c} \frac{g}{4} \left(\frac{2\rho}{3d}\right) ln \left[2\Lambda \left(\frac{2\rho}{3d}\right)\right] \qquad \text{[II-2]}$$

Où γ_0 est l'intégrale de recouvrement TB, α_{c-c} est la distance C-C, g quantifie l'intensité effective du Coulomb 1D, ρ est l'indice de bande, d est le diamètre du nanotube et Λ est un *cut-off* UV [167].

Pour les transitions d'ordre supérieur, *Jorio et al.* constatent une autre mise à l'échelle : il faut ajouter un terme en $+\frac{\gamma}{d}$ (décalage vers le bleu) aux corrections ci-dessus, ce qu'ils interprètent comme la diminution du caractère excitonique pour ces niveaux élevés (transition plus proche « bande-à-bande »). En pratique, le « Kataura corrigé » se calcule donc :

$$E_{ii} = \frac{a_\rho}{d} + \frac{\beta_P \, cos(3\theta)}{d^2} + \Delta E_{mb} + X \qquad \text{[II-3]}$$

Avec X = 0 pour E_{11} et E_{22}, et X = $\frac{\gamma}{d}$ pour E_{33} et E_{44} [167],[177],[178].La Figure II-3 montre les deux diagrammes de Kataura.



<u>Figure II-3 :</u> Graphique de Kataura théorique initial (à gauche) [158] *et graphique de Kataura corrigé par Jorio et al., ajusté sur une série de mesures expérimentales sur un tapis de SWNT alignés verticalement (à droite)* [167].

II.3. Propriétés excitoniques des SWNT

Les premières approches théoriques basées sur un modèle mettant en jeu un électron libre offrent une description approximative des énergies de transition dans les SWNT [172]. En effet, ce modèle repose sur des électrons indépendants et ne prend pas en considération l'ensemble des interactions électroniques, à savoir les effets de courbure et l'anisotropie de bande (*trigonal warping*), les interactions *many-body*, le couplage électron-phonon, et l'environnement diélectrique. Or, les SWNT présentent un confinement unidimensionnel très prononcé et un important effet d'écrantage des interactions coulombiennes. Dans ce régime, les interactions électron-électron et électron-trou deviennent significatives, si bien qu'un modèle à électrons indépendants ne suffit plus et qu'il faut introduire explicitement les corrélations entre porteurs. Concrètement, les transitions optiques vérifient :

$$E_{opt} = E_{qp} - E_b \qquad \text{[II-4]}$$

Où E_{qp} est le gap quasi-particulaire renormalisé par les interactions et E_b l'énergie de liaison excitonique, élevée en 1D et sensible à l'environnement diélectrique. Dans ce contexte, l'inclusion du concept d'exciton, une paire électron-trou, s'est avérée cruciale pour décrire correctement les transitions optiques [168],[172],[179],[180].

L'un des éléments expérimentaux soutenant l'existence d'états excités fortement liés est le rendement quantique très faible des SWNT, généralement de l'ordre de 1 % [39],[181],[182]. En effet, dans un SWNT, l'excitation créée est un exciton fortement lié qui se dépeuple par des voies non radiatives. Il ne reste donc qu'une faible population de l'exciton *bright* et la probabilité d'émission radiative est minime. Le rendement quantique exprime le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

Les premières mises en évidence expérimentales de l'existence d'excitons dans des SWNT semi-conducteurs ont été rapportées grâce à une excitation de la fluorescence à deux photons [183],[173],[184]. L'absorption à deux photons répond à des règles de sélection spécifiques, différentes de celles qui régissent l'absorption linéaire.

Dans les SWNT, on retrouve ainsi une série de niveaux de type Rydberg pour les excitons, analogue à celle de l'atome d'hydrogène, où les états de symétrie paire sont notés 1s, 2s, 3s, etc. et ceux de symétrie impaire, 2p, 3p, etc. (Figure II-4) [185]. Par ailleurs, tous les

états excitoniques dans les SWNT sont de type singulet, car le couplage spin-orbite y est faible [186]. Il en découle que l'absorption à un photon ne peut avoir lieu qu'entre des états de même symétrie, donnant ainsi accès au niveau fondamental 1s de l'exciton, tandis que l'absorption à deux photons n'autorise que la transition vers les états impairs tels que l'état 2p [173],[185],[187].

La Figure II-5 illustre schématiquement ces niveaux d'énergie. On observe d'abord une excitation vers l'état 2p ou le continuum (ces deux états pouvant être peuplés par l'absorption à deux photons), suivie d'une relaxation vers l'état 1s, d'une recombinaison et d'une dissipation d'énergie par émission photonique.

L'existence de mécanismes de désexcitation non radiative, ou la présence d'états optiquement interdits sous l'état excité, explique cette dominante non radiative de la recombinaison excitonique [39],[173]. Dès qu'on inclut l'interaction électron–trou, les transitions optiques des SWNT ne correspondent plus aux simples pics de densité d'états (singularités de van Hove) prédits par un modèle à électrons indépendants mais à des états excitoniques associés. Toute transition S_{ii} se décompose alors en une série d'états excitoniques situés sous la bande de conduction, associée à la singularité de Van Hove correspondante [172],[184],[188]. Dans ce cadre, l'énergie de liaison désigne l'énergie de l'exciton, tandis que E_{11} constitue l'énergie de transition optique excitonique associée à une paire de singularités de Van Hove [172].

Enfin, en introduisant explicitement les interactions coulombiennes, il apparaît que la combinaison des deux états non équivalents de la bande de conduction (pour les électrons) et de la bande de valence (pour les trous) donne naissance à quatre états excitoniques (Figure II-5) [169],[184],[189]. Deux d'entre eux correspondent à k = 0, résultant du couplage entre des électrons et des trous de spin opposé, tandis que les deux états restants, E(-k') et E(+k'), se caractérisent quant à eux par un moment K non nul. Ces états sont l'une des raisons majeures de la faible émission optique, puisqu'ils favorisent la recombinaison non radiative des excitons [164].

Les spectres d'absorption et d'émission des SWNT sont en grande partie régis par les excitons, et plus particulièrement par leurs états excitoniques dits « autorisés » ou « *bright* ». Cependant, un aspect majeur des propriétés optiques des SWNT réside

également dans l'existence d'états excitoniques « non autorisés » ou « *dark* » situés en dessous de l'état fondamental excitonique lumineux [190].

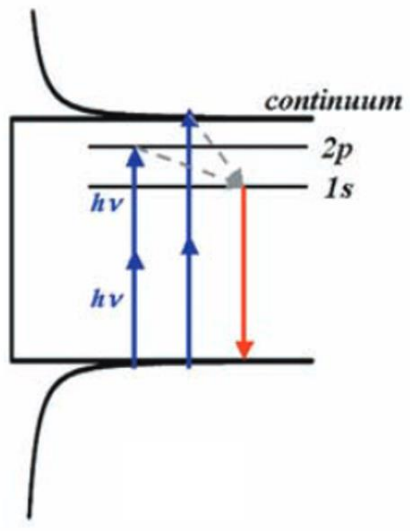


Figure II-4 : Représentation schématique de la densité d'états pour un SWNT, montrant l'excitation à deux photons (flèches bleues) et l'émission de fluorescence qui s'ensuit (flèches rouges) pour un exciton. L'état d'exciton 1s est interdit par l'excitation à deux photons. L'exciton 2p et l'état continuum sont excités. Ils relaxent vers l'état d'exciton 1s et deviennent fluorescents par un processus à un photon.

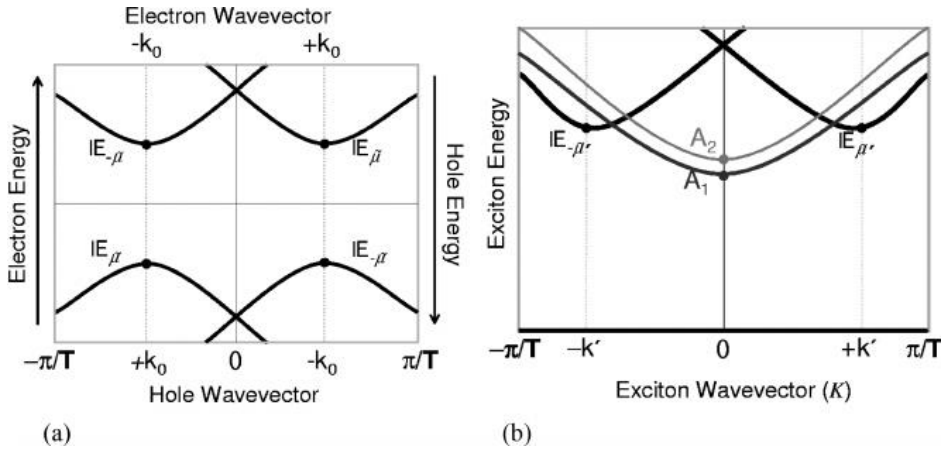
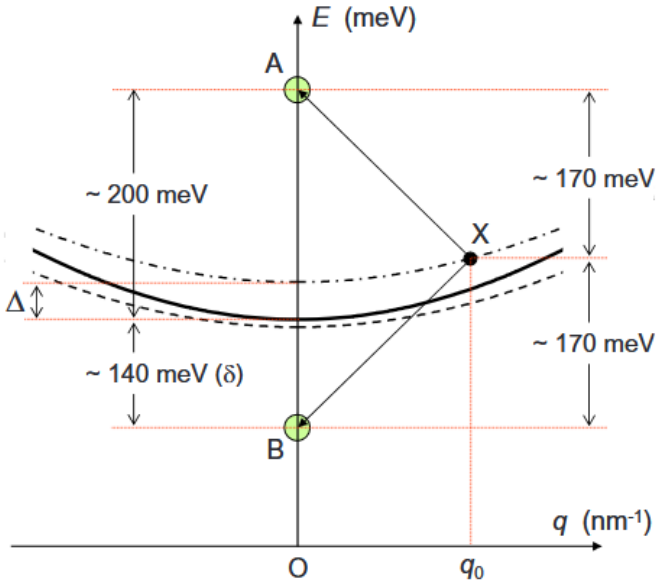


Figure II-5 : Diagrammes schématiques pour les SWNT chiraux des symétries des bandes électroniques (a) et des bandes excitoniques associées (b). Les états de l'électron, du trou et de l'exciton aux bords de la bande sont indiqués par un cercle plein et par leur représentation irréductible [191].

La Figure II-6 présente les états d'énergie les plus bas d'un exciton singulet dans un SWNT, en fonction du moment k. La courbe en trait continu correspond aux états excitoniques *bright*, responsables de l'émission FL directe, tandis que la courbe en pointillés représentent les états *dark*, plus bas en énergie. La courbe en tirets-points représente des excitons *dark* avec moment angulaire non nul, situés environ 20 à 30 meV au-dessus de E_{11}. Les points X et B illustrent les états impliqués dans des processus de diffusion avec phonons. Seuls les excitons *bright* à q = 0 nteragissent avec la lumière et émettent en photoluminescence, les excitons *dark* à moment fini n'étant pas directement radiatifs. Mais, par couplage avec les phonons, un exciton *dark* peut se diffuser vers un exciton *bright* à q = 0 en perdant l'énergie du phonon (environ 170 meV). Cela explique la présence d'une bande environ 140 meV (170 – 30) sous E_{11}.



<u>Figure II-6 :</u> Représentation schématique des états d'excitons singulets de plus faible énergie dans un SWNT. La ligne pleine représente les états autorisés (« bright »), les lignes pointillées les états non-autorisés (« dark ») [192].

Dans un SWNT semi-conducteur, les résonances optiques S_{ii} mettent donc en jeu des excitons 1D. Des mesures à 1 et 2 photons sur tubes individuels ont directement extrait des énergies de liaison de l'ordre de 0,3 à 0,4 eV pour des diamètres d ≈ 0.7 à 0.9 nm. Des calculs *ab initio* obtiennent des valeurs comparables, parfois plus élevées selon le rapport chiralité/diamètre (jusqu'à 0,8 eV) [184],[193].

Le temps de vie radiatif intrinsèque d'un exciton *bright* à Q ≈ 0 peut être très court, de l'ordre de 10 ps au strict seuil d'émission, mais l'occupation thermique de modes *dark* rallonge l'effectif radiatif jusqu'à l'échelle de la ns à température ambiante. En pratique, les temps de décroissance FL mesurés sur tubes individuels sont souvent dominés par des canaux non radiatifs (défauts, dopage, EEA), donnant des constantes de décroissance typiquement < 20 à 200 ps selon l'échantillon et l'environnement [181],[185],[194].

La propagation des excitons le long du tube suit une diffusion 1D soumise aux pertes non radiatives et à l'annihilation exciton–exciton. Dans des dispersions aqueuses avec ADN, on a rapporté des longueurs de diffusion autour de 100 nm [195]. Pour des nanotubes suspendus dans l'air, la diffusion s'allonge nettement, avec des valeurs supérieures à 600 nm et, selon les méthodes et conditions, des estimations entre 200 et 600 nm, confirmant l'impact majeur des défauts et de l'environnement de surface [196],[197],[198].

L'environnement (solvant, surfactant, substrat, cavité, remplissage interne) écrante les interactions coulombiennes. En augmentant ε_{env} , E_b diminue (moins de liaison), et E_{ii}^{qp} (gap quasi-particulaire) diminue aussi par renormalisation. La variation nette observée pour E_{11},E_{22} est le plus souvent un décalage vers le rouge de quelques dizaines de meV [183],[199].

Cambré et al. [200] abordent quantitativement l'effet de l'environnement diélectrique en s'appuyant sur des équations et sur le modèle de constante diélectrique « effective » de *Nugraha-Jorio-Saito* [201] (Figure II-7).

Dans l'approche « continuum », on associe à chaque transition mesurée E_{ii} une constante diélectrique effective κ qui exprime l'écrantage combiné du tube et de son environnement (extérieur et intérieur, quand le tube est rempli). *Cambré et al.* déduisent κ à partir des E_{ii} expérimentaux et la met en relation avec un facteur d'échelle géométrico-excitonique proposé par Nugraha :

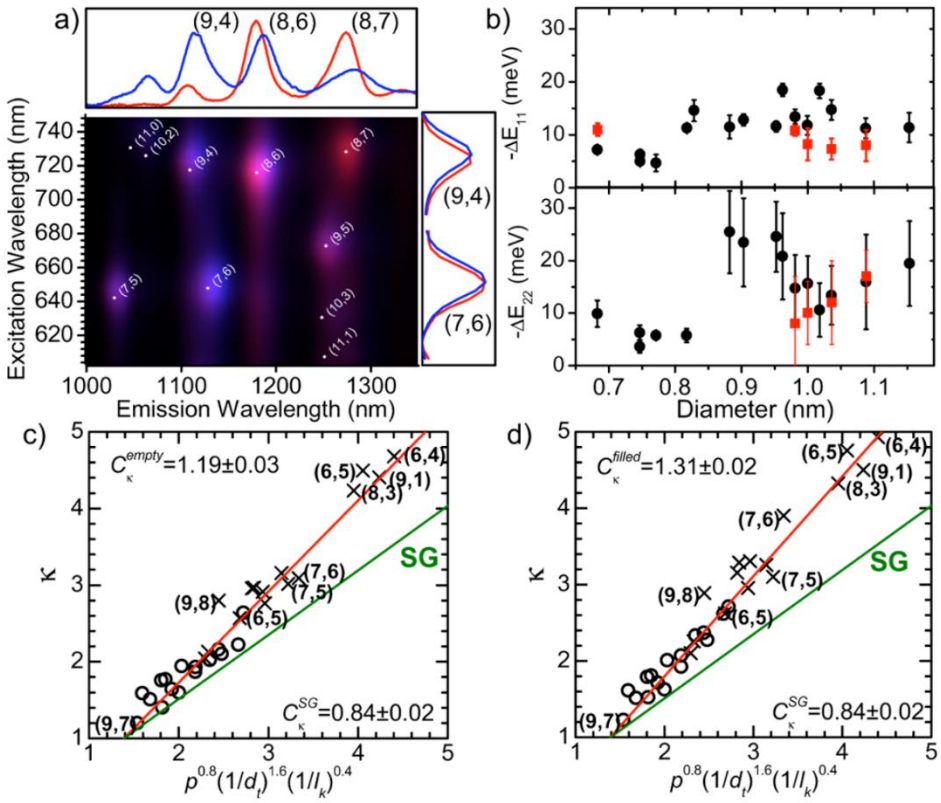
$$\kappa = C_\kappa p^{0.8} \left(\frac{1}{d}\right)^{1.6} \left(\frac{1}{l_k}\right)^{0.4} \qquad \text{[II-5]}$$

Où p est l'indice de bande, d le diamètre, l_k la taille excitonique et C_k la pente, servant de « jauge d'écrantage » : plus C_k est grand, plus l'écrantage est fort. Le remplissage d'eau augmente significativement C_k par rapport aux tubes vides, ce qui se traduit par des décalages vers le rouge d'entre 5 et 30 meV.

De manière complémentaire, la dépendance des énergies optiques à la permivitivité externe ε_{env} est bien décrite par une loi puissance empirique :

$$E_{ii}(\varepsilon_{env}) = E_{ii}^{\infty} + A\varepsilon_{env}^{-\alpha} \qquad \text{[II-6]}$$

Avec E_{ii}^{∞} la valeur « fortement écrantée » (grand ε_{env}), A l'amplitude, et α un exposant entre 0,7 et 1 selon i et l'échantillon. Cette loi rend compte d'un redshift de plusieurs dizaines de meV quand ε_{env} augmente, et d'une saturation de l'effet pour ε_{env} supérieur à 5, sans dépendance marquée en (n,m).



<u>Figure II-7 :</u> a) Graphique superposé bicolore des cartes PLE 2D d'un échantillon trié par DGU composé de tubes vides (rouge) et d'un tube contenant principalement des SWNT remplis d'eau (bleu) et spectres FL (longueurs d'onde d'excitation de 700 à 745 nm) et FLE (longueurs d'onde d'émission de 1100 à 1150 nm) pour les SWNT vides (rouge) et remplis d'eau (bleu). b) Décalages électroniques vers le rouge des premières (ΔE_{11}) et deuxièmes (ΔE_{22}) transitions optiques en fonction du diamètre des nanotubes obtenus à partir d'expériences sur un ensemble et sur une seule molécule. C) et d) Constante diélectrique effective κ reproduisant les valeurs E_{ii} expérimentales pour les SWNT vides (c) et remplis d'eau (d) [200].

Une règle d'échelle utile est définie :

$$E_{b,i} \propto \frac{1}{\varepsilon_{eff} d} \qquad \text{[II-7]}$$

De sorte que l'augmentation de ε_{eff} réduit E_b. La variation nette suit alors les deux équations ci-dessus et s'estime quantitativement via κ ou via $E_{ii}(\varepsilon_{env})$. *Cambré et al.* illustre ces tendances sur 16 chiralités : les tubes vides présentent des raies plus étroites (moins d'inhomogénéité) et des E_{ii} moins criblés que les tubes remplis d'eau, validant l'usage conjoint de κ et de la loi puissance pour quantifier l'effet de l'environnement (Figure II-7) [200],[201],[202].

II.4. Spectroscopie d'absorption des SWNT

II.4.1. Principe de la spectroscopie d'absorption des SWNT

La spectroscopie d'absorption est un outil de premier choix pour explorer les transitions excitoniques des SWNT. En raison de la forte anisotropie et du confinement quantique, les nanotubes de carbone présentent des transitions excitoniques visibles dans le domaine du proche infrarouge (NIR), du visible (Vis) et de l'ultraviolet (UV) [67],[203]. On y observe les bandes d'absorption correspondant aux transitions excitoniques associées aux paires symétriques de singularités de van Hove [204]. Les largeurs de raies d'absorption pour un nanotube unique sont déterminées par les interactions excitoniques, c'est-à-dire par la création et le temps de vie d'excitons fortement liés (électron-trou) dans la structure unidimensionnelle des SWNT [39],[173]. Dans le cas d'un mélange, il faut également considérer l'élargissement hétérogène, dû à l'hétérogénéité des environnements. Les excitons gouvernent le phénomène d'absorption, en réduisant l'énergie de transition par rapport à ce qui serait attendu d'un simple modèle de bandes libres. Grâce aux singularités de van Hove propres à la densité d'états unidimensionnelle, le couplage électron-trou est fortement renforcé : des excitons à énergie de liaison élevée (environ 0,3 eV pour S_{11}) se forment et confèrent aux transitions E_{ii} des nanotubes des raies d'absorption clairement résolues dans les spectres UV-Vis-NIR [171],[173].

Pour les SWNTs semi-conducteurs, on observe généralement les premiers pics d'absorption dans le proche infrarouge (transition E_{11}) et le visible (transition E_{22}),

chaque transition étant spécifique à une chiralité (n,m). [205],[206] La chiralité détermine donc aussi bien la largeur de bande interdite (pour les SWNT semi-conducteurs) que l'énergie des pics d'absorption [53],[205]. On peut donc relier le diagramme de Kataura aux bandes d'absorption optiques, et par extension, on peut relier ces mêmes bandes aux différentes coordonnées de chiralité (n,m) des SWNT (Figure II-8).

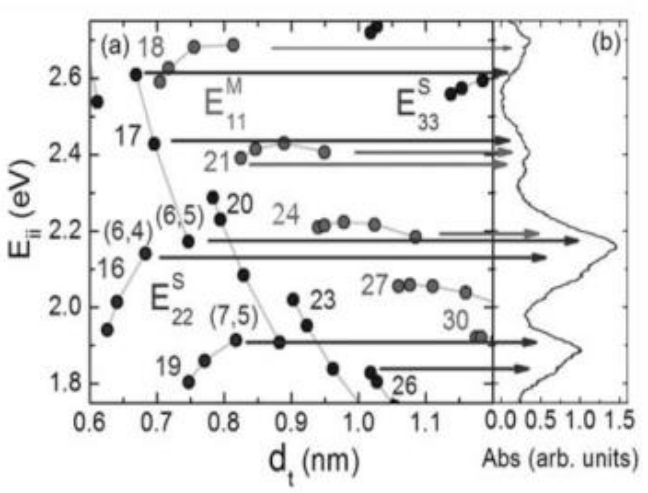


Figure II-8 : Diagramme de Kataura de certains (n,m) (a) relié aux bandes d'absorptions correspondantes (b) [41].

On observe cependant que les bandes d'absorption sont reliées aux (n,m) de nanotubes avec des E_{ii} similaires, une bande peut donc inclure des contributions de plusieurs (n,m) présentant des énergies proches. La résolution de plusieurs pics distincts au sein de chaque bande dans la gamme Vis-NIR reflète la superposition des transitions excitoniques de différentes chiralités de SWNT au sein d'un échantillon [205],[206]. Dans ce manuscrit, lorsqu'une raie n'implique qu'une seule contribution, on parlera de « pic », et lorsqu'elle est constituée de plusieurs, on parlera de « bande ».

Des protocoles de *fit* de ces bandes permettent d'avoir une idée plus précise des proportions des contributions associées à une bande (Figure II-9) [207],[208].

Il est possible d'utiliser la spectroscopie d'absorption pour étudier l'individualisation des SWNT ainsi que leur concentration [209]. En effet, en appliquant la loi de Beer-Lambert, $A = lC\alpha$, on peut estimer la concentration en SWNT de l'échantillon mesuré pour un état de dispersion donné. A est le maximum d'absorbance du pic, et est fonction de la

concentration C, du chemin optique l et du coefficient d'atténuation α. De plus, l'intensité chute dès que les tubes s'agrègent [39],[67].

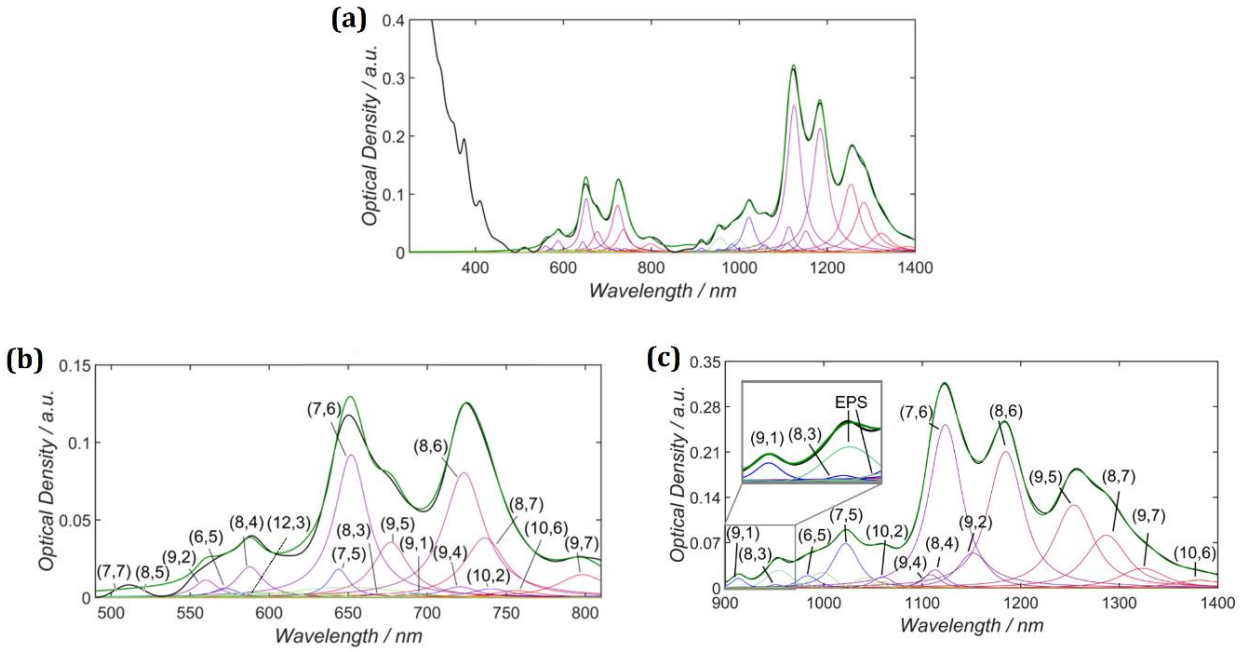


Figure II-9 : Fits de spectres d'absorption de SWNT par des fonctions Voigt sur un spectre au background soustrait selon le procédé de Naumov et al. [210] *(a), entre 500 et 800 nm (b) et entre 900 et 1400 nm (c), et attributions de (n,m) correspondants* [207].

La spectroscopie d'absorption des SWNT requiert un spectrophotomètre couvrant un large domaine spectral, généralement de l'ultraviolet à l'infrarouge (UV-Vis-NIR), afin d'observer les différentes transitions [67],[211]. La ligne de base doit être analysée et le signal de référence doit être corrigé, car l'absorption des surfactants et d'autres constituants du milieu de dispersion peuvent perturber l'analyse du spectre des SWNT [210].

En revanche, les mesures sur substrat sont plus complexes car les SWNT peuvent s'aligner, interagir avec la surface ou former des réseaux denses (films minces), ce qui modifie la forme et l'intensité des pics d'absorption [54].

II.4.2. Spectres et contributions

L'intensité et la position peuvent varier en fonction de l'environnement chimique du SWNT (dopage, interactions avec des molécules adsorbées, etc.) [206],[208],[212],[213].

Située dans le visible (environ 500–800 nm), la transition E_{22} est généralement plus large que E_{11} et fournit des informations supplémentaires sur la distribution en chiralités. Les excitons correspondants sont moins fortement liés (énergie de liaison plus faible) que pour E_{11} [173],[205]. Néanmoins, ils demeurent sensibles aux perturbations de l'environnement, à l'exemple d'un léger déplacement du pic d'absorption lorsqu'il y a dopage chimique ou interaction avec un substrat [212],[214],[215],[216],[217]. En effet, le dopage agit par renormalisation du gap et possibles complexes chargés (trions) à proximité de E_{11}. On observe alors un décalage accompagné d'un élargissement et d'une diminution d'amplitude. Un substrat apporte quant à lui un écran statique, un possible transfert de charge et des défauts. On a ainsi un décalage vers les basses énergies et une largeur accrue.

La Figure II-10 montre des exemples typiques de spectres d'absorption UV-visible-proche IR. On y voit les bandes d'absorption des SWNT métalliques et semi-conducteurs, localisées dans différentes gammes spectrales dans l'UV-Vis-NIR pour différents échantillons de SWNT. En effet, les semi-conducteurs S_{11} (en rouge) sont dans la partie NIR, les semi-conducteurs S_{22} (en bleu) et les métalliques M_{11} (en vert) sont dans le visible. Malgré des profils différents entre les échantillons, les pics d'absorption correspondant à chaque chiralité de nanotube se trouvent toujours aux mêmes longueurs d'onde. Les différences de profils témoignent donc de la prédominance ou non de certains diamètres de SWNT dans les échantillons.

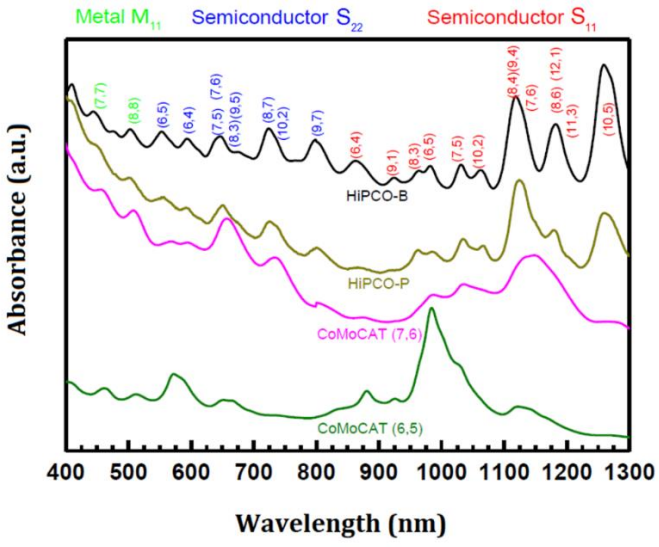


Figure II-10 : Spectres d'absorption UV-vis-NIR de différentes suspensions aqueuses de SWNT et (n,m) contribuant à chaque pic [218].

Des transitions plus énergétiques (E_{33}, E_{44}, etc.) sont parfois détectées dans l'ultraviolet, mais elles sont moins intenses et souvent masquées par l'absorption du solvant ou du surfactant, et surtout des plasmons [67],[219]. L'analyse de ces transitions, plus délicate, nécessite une excellente dispersion des SWNT et un matériel de spectroscopie couvrant une large gamme UV [220]. Les semi-conducteurs S_{33} sont plus loin dans l'UV.

II.5. Spectroscopie Raman des SWNT

II.5.1. Généralités sur la diffusion Raman

La diffusion Raman correspond à un phénomène de diffusion inélastique de la lumière, lié à une modulation temporelle du milieu traversé par le rayonnement incident [221]. Cette modulation peut provenir de toute perturbation de la matière, et en particulier des vibrations atomiques (phonons) dans un réseau cristallin [178],[222],[223],[224]. Dans ce contexte, l'interaction entre les photons incidents et le nuage électronique peut être décrite à l'aide de transitions électroniques entre l'état fondamental et un état excité [225]. Lorsque les photons traversent un matériau, différents mécanismes de dispersion lumineuse se mettent en place, dont l'un est la diffusion Raman [226].

En physique des solides, on distingue classiquement trois principaux types de diffusion de la lumière : la diffusion élastique (Rayleigh) et la diffusion inélastique (Stokes et anti-Stokes). La diffusion Rayleigh se produit lorsque l'énergie des photons diffusés est identique à celle des photons incidents, impliquant l'absence d'échange d'énergie (état final identique à l'état initial). À l'inverse, dans le cadre de la diffusion Raman, les processus Stokes et anti-Stokes correspondent à des échanges d'énergie entre les photons et le réseau cristallin via la création ou l'annihilation de phonons [164],[177],[189],[227].

Plus précisément, dans la diffusion Raman anti-Stokes, les photons diffusés possèdent une énergie plus élevée que celle des photons incidents, ce qui reflète l'annihilation d'un phonon dans le cristal (l'état final des électrons se trouve à un niveau d'énergie plus bas que l'état initial) [222],[228]. Inversement, la diffusion Raman Stokes correspond à la création d'un phonon, entraînant des photons diffusés à plus basse énergie que les photons incidents [38]. La diffusion Raman Stokes peuple donc des états vibrationnels excités et la diffusion Raman anti-Stokes en annihile.

Lors du processus de diffusion Raman, l'état intermédiaire est en général un état virtuel qui provient de la perturbation de la lumière incidente, produisant simultanément la création et l'annihilation de photons. Ce phénomène donne lieu à un processus de diffusion Raman non résonnant, ce qui n'est pas le cas pour les SWNT. En effet, les SWNT possèdent des singularités de van Hove très marquées et des transitions excitoniques discrètes E_{ii}, et lorsque l'énergie du laser s'aligne sur l'une de ces transitions, le couplage électron-phonon est fortement amplifié, si bien que la diffusion Raman devient résonante, donnant des pics intenses caractéristiques. La Figure II-11 illustre ces phénomènes [229],[230],[231].

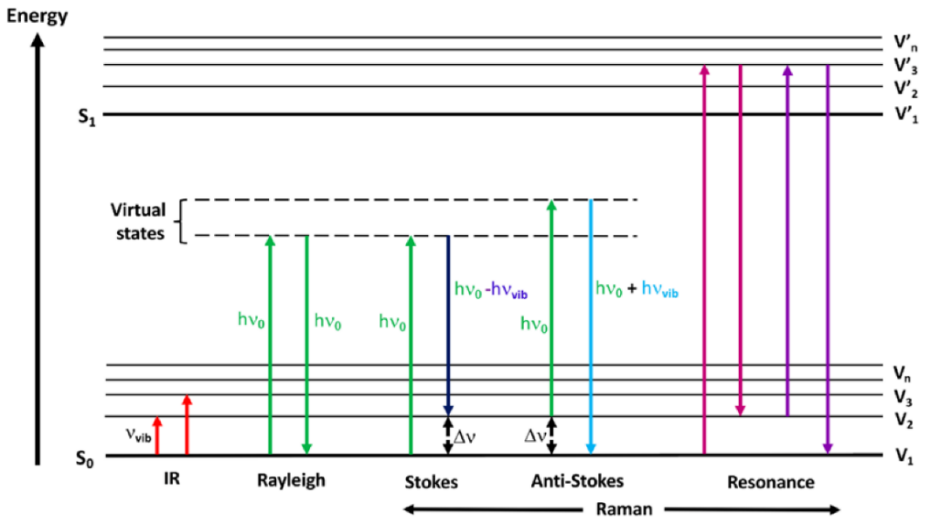


Figure II-11 : Représentation schématique des transitions énergétiques impliquées dans la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman Stokes et anti-Stokes, résonnantes ou non [229]

II.5.2. La spectroscopie Raman des SWNT

Dans le cas des SWNT, l'état excité intermédiaire coïncide avec un véritable état excitonique, ce qui accroît considérablement l'intensité du signal de diffusion. Plus précisément, la résonance entre l'énergie du faisceau laser et l'énergie de transition excitonique induit un renforcement des processus de diffusion, tant inélastique qu'élastique, aboutissant à un régime de Raman résonant [170],[232]. Grâce à ce phénomène, la spectroscopie Raman appliquée aux SWNT s'est imposée comme la méthode de caractérisation de référence pour ce type de nanostructures, notamment en raison de la sensibilité de la diffusion Raman résonante aux paramètres structuraux

(chiralité, diamètre) et aux propriétés électroniques [187],[233],[234]. La Figure II-12 illustre les principaux modes Raman actifs dans les SWNT.

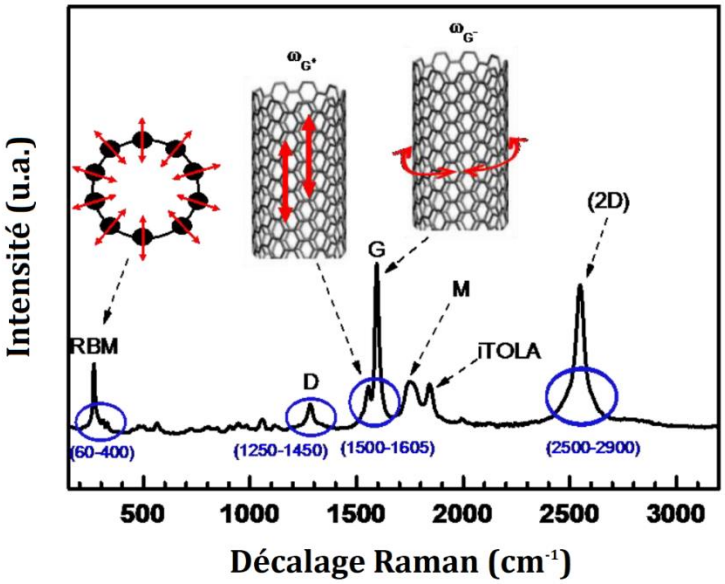
D'après la théorie des groupes, le calcul du nombre de modes actifs Raman dans un SWNT dépend de sa chiralité : on dénombre ainsi huit modes vibrationnels pour les SWNT achiraux et quinze pour les SWNT chiraux [235],[236]. Cependant, ces valeurs proviennent d'une classification purement symétrique. La part réellement observable dépend du couplage électron-phonon et du régime de résonance, si bien que seuls quelques-uns de ces modes dominent les spectres Raman usuels : entre 3 et 5 pour les SWNT achiraux, et entre 6 et 8 pour les SWNT chiraux [235]. Le pic à basse fréquence (<400 cm^{-1}) est appelé mode de respiration radiale (*Radial Breathing Mode,* RBM) [237]. Ce mode, correspondant à l'expansion et la contraction radiale du nanotube, vibre à une fréquence directement liée au diamètre d du nanotube par une relation de type $\omega_{RBM} = A/d + B$, où A et B sont obtenus expérimentalement ou calculés [238],[239]. Les valeurs de A et B varient en effet en fonction du milieu et des conditions de mesure : les forces de Van der Waals intertubes modifient la constante radiale et les couplages ajoutent de l'énergie. De plus, les compressions radiales ou les dopages rigidifient ou assouplissent la paroi, et la température entraîne différentes dilatations thermiques. Pour des nanotubes dispersés en solution aqueuse à température ambiante, $A \approx 218\ cm^{-1}\cdot nm$ et $B \approx 16\ cm^{-1}$ [223],[239].

Aux fréquences intermédiaires (1250–1450 cm^{-1}), on observe le mode D, qui correspond à un mode de second ordre doublement résonant impliquant la diffusion élastique d'un électron sur un défaut ou une discontinuité structurelle dans le nanotube [240]. Puis, vers 1590 cm^{-1}, apparaît le mode G, souvent scindé en deux composantes G^+ et G^- lorsque la symétrie tangente est levée par la courbure du tube, c'est-à-dire, lorsque l'enroulement casse l'équivalence des deux vibrations tangentielles du graphène. La séparation est faible pour les nanotubes semi-conducteurs mais devient nettement plus grande lorsque le tube est métallique [241],[242],[243]. Le mode G est lié au mouvement d'élongation des liaisons C–C dans le plan du nanotube et permet de distinguer rapidement un nanotube métallique d'un nanotube semi-conducteur. En effet, pour les nanotubes semi-conducteurs, deux sous-raies fines et quasi lorentziennes, centrées respectivement vers 1590 cm^{-1} et 1580–1585 cm^{-1}. Pour un métallique en revanche, la sous-raie optique longitudinale (LO, G^-) se déplace vers les basses fréquences (1540 cm^-) et s'élargit

fortement avec un profil asymétrique en raison d'un fort couplage électron-phonon , tandis que la raie optique transversale (TO, G^+) reste étroite [244],[245].

Au-delà de 1700 cm^{-1}, des modes Raman de second ordre comme le mode M (~1750 cm^{-1}) ou le mode iTOLA (~1850 cm^{-1}) peuvent être détectés. Le mode M est généralement interprété comme un harmonique d'un phonon optique transverse hors-plan (oTO) du graphite, tandis que le mode iTOLA résulte de la combinaison d'un phonon optique transversal dans le plan (iTO), d'un phonon optique longitudinal (LO) et d'un phonon acoustique longitudinal (LA) [232],[234].

Enfin, à haute fréquence (2500–2900 cm^{-1}), on retrouve la raie G' (également appelée 2D). La terminologie G' était historiquement utilisée car elle était considérée comme une « seconde » bande G, jusqu'à ce qu'on se rende compte qu'il constitue l'harmonique de 2ème ordre de la bande D, d'où la terminologie 2D. Elle représente un autre paramètre d'identification des propriétés structurales et électroniques des nanotubes. En effet, elle révèle simultanément le diamètre, la chiralité, la nature métallique ou semiconductrice et l'état d'agrégation/dopage des SWNT par la variation concertée de sa position, de sa dispersion laser, de sa largeur et de sa scission. [234],[246],[247].



<u>Figure II-12 :</u> Spectre Raman résonnant à 1064 nm d'un SWNT montrant plusieurs de ses principaux modes vibrationnels : RBM, D, G, M, iTOLA, G', 2G, d'après [248].

II.6. Fluorescence des SWNT

II.6.1. Principe de la fluorescence des SWNT

La fluorescence (FL) désigne l'émission de photons par un matériau après absorption d'un quantum de lumière. Le processus s'ouvre par la promotion d'un porteur (électron, exciton, polariton, etc.) vers un état excité, suivie d'une relaxation radiative vers un état d'énergie plus faible. L'émission est donc gouvernée par la compétition entre voies radiatives (fluorescence, phosphorescence) et non radiatives (conversion interne, couplage vibronique, transfert d'énergie). La FL découle alors de la dissociation radiative de cet exciton. La densité d'états, la dimensionnalité et la force du confinement quantique modulent fortement le spectre émis. Dans le cas des nanotubes de carbone, les excitons sont fortement liés, quantifiés, avec des transitions E_{11}, E_{22} caractérisées par des pics FL fins [184],[198],[249]. La fluorescence ne concerne que les SWNT semi-conducteurs. Elle est particulièrement appropriée pour déterminer la chiralité des nanotubes de carbone semi-conducteurs. La première étude en fluorescence de SWNT dispersés en solution aqueuse a été rapportée en 2002 par *O'Connell et al.* [67].

Le phénomène de FL se déroule en trois étapes. Tout d'abord, un photon est absorbé, d'énergie E_{22}, E_{33}, E_{44}, etc. Ensuite, on observe la relaxation non radiative de l'exciton, qui passe d'un état plus énergétique à un état moins énergétique, situé en deçà de la première paire de singularités de van Hove (et défini comme niveau excitonique). Enfin, dans la troisième étape, l'exciton se dissocie par un processus radiatif en émettant un photon d'énergie égale à E_{11}, donc égale à l'écart d'énergie entre cet état et le vide excitonique, laquelle correspond à la transition excitonique fondamentale propre à la chiralité concernée [164],[205]. La Figure II-13 le représente.

Au-delà de l'aspect fondamental, cette approche FL permet de déterminer précisément la chiralité des SWNT [250],[251]. Une mesure de fluorescence continue permet de cartographier précisément les énergies de transition des différents (n,m), c'est ce qu'on appelle une carte de FL (Figure II-14). Il est alors possible d'identifier les SWNT grâce à leurs énergies d'excitation et d'émission attribuées par le diagramme de Kataura. La première carte de FL a été rapportée par *Bachilo et al.* [39]. Ils ont par ailleurs combiné la cartographie en FL avec la spectroscopie Raman afin d'élaborer une approche permettant d'attribuer les indices chiraux (n,m) aux divers pics détectés sur la carte FL. Ils ont alors

constaté que ces pics s'organisaient selon des « familles » satisfaisant la relation 2n + m = *constante*, un schéma qui avait déjà été prédit par la théorie [234],[237]. D'autres signaux FL détectés sur la carte ont cependant été corrélés à divers phénomènes physiques. En effet, il existe 3 mécanismes à l'origine de la PL : les transitions optiques directes (DT) telles que présentées précédemment, les différents processus assistés par les phonons (EPC) et le transfert d'énergie des excitons (EET).

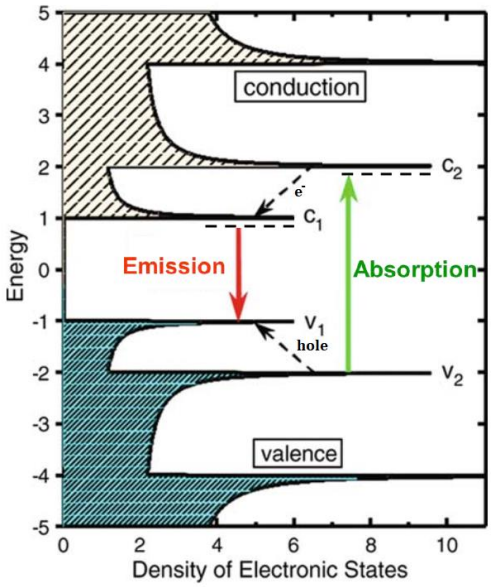


Figure II-13 : Représentation schématique du processus de PL, d'après [2], modifié pour souligner la nature excitonique des transitions optiques dans les SWNT [145].

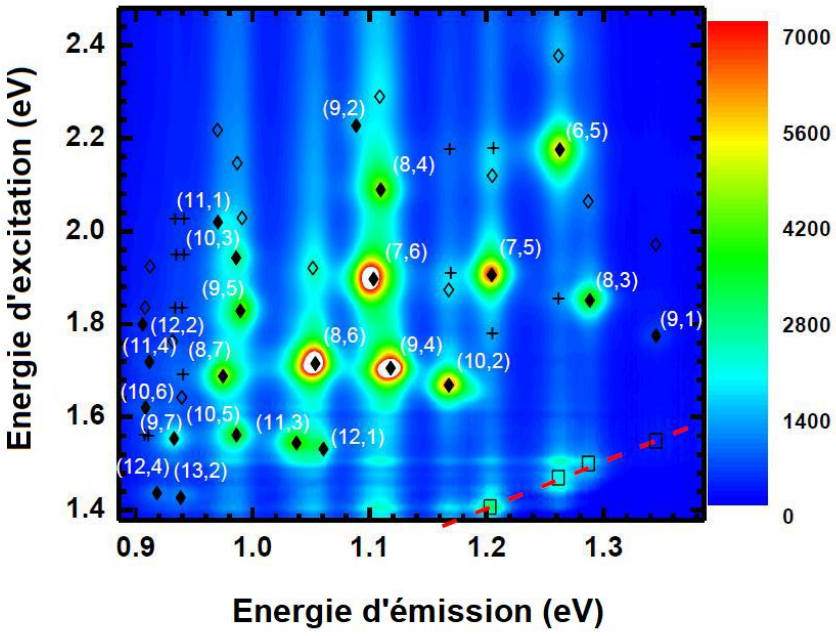


Figure II-14 : Carte de FL d'une suspension de SWNT à l'aide de sels biliaires (BS) de pourcentages massiques respectifs 0,1wt% et 0,1wt%, suspension de SWNT utilise comme référence. Les (n,m) des SWNT identifiés sont ajoutés [218].

De façon générale, les processus assistés par des phonons dans le spectre d'absorption sont associés à des phonons situés au point Γ et à proximité du point K de l'espace réciproque [67]. Ainsi, l'un des mécanismes (Figure II-15 b) peut impliquer l'émission de deux phonons de moments opposés. Ce double processus phononique amène l'exciton à proximité du bord de la zone de Brillouin, où se produit alors la recombinaison radiative. Il peut également se produire via diverses combinaisons impliquant les modes de phonons optiques au point Γ et à proximité. Le deuxième mécanisme, (Figure II-15 c), apparaît à environ 0,2 eV au-dessus du pic principal de FL et fait intervenir le couplage exciton-phonon. Ici, l'absorption de lumière assistée par un phonon permet d'exciter l'exciton vers le premier état excité dont le centre de masse porte un quasi-momentum et qui est situé environ 0,2 eV au-dessus du niveau lumineux. Puis, cette excitation, combinée à l'émission d'un phonon de centre de zone, crée un exciton, dont l'état fondamental, s'il est « bright » donc s'il possède un moment dipolaire autorisé, se recombine de manière radiative [252]. Par exemple, *Torrens et al.* mesurent pour un (6,5) individuel, un pic principal E_{11} et un EPC situé environ 0,20 eV au-dessus du pic, attribué au couplage avec un phonon proche (Figure II-15 d) [253].

L'EET est associé au transfert de résonance d'énergie de type Förster (FRET), dans lequel un nanotube « donneur », placé dans un état excité, transfère une partie de son énergie à un nanotube « accepteur » lorsqu'ils sont suffisamment proches pour permettre une interaction dipôle-dipôle [254]. Par ailleurs, l'efficacité du FRET est renforcée lorsque les nanotubes se trouvent en « faisceaux », car la proximité maximale entre eux favorise les interactions dipolaires, à condition qu'il n'y ait pas de SWNT métallique dans le faisceau [255]. Il est également possible que les nanotubes ne soient en contact qu'en un point précis [256]. Cependant, l'échelle d'efficacité du transfert d'énergie reste limitée à des distances de l'ordre de 2 à 4 nm : au-delà, les processus de relaxation non radiative, responsables du faible rendement quantique de la FL, dominent. [256] Un autre mécanisme de transfert d'énergie peut survenir via le couplage exciton-phonon, pouvant générer un transfert d'énergie vers un nanotube voisin [255]. La Figure II-16 illustre schématiquement le transfert d'excitons d'un nanotube « donneur » vers un nanotube « accepteur » : tout d'abord, un photon incident est absorbé et crée un exciton à un niveau d'énergie supérieur, noté ici eh_{22}^{D}, puis une relaxation se produit vers un niveau inférieur, noté ici eh_{11}^{D}. À ce stade, l'EET s'opère entre eh_{11}^{D} et eh_{11}^{A} et la recombinaison radiative

au niveau eh_{11}^{A}, ce qui entraîne l'émission d'un photon. Par exemple, *Mehlenbacher et al.* le montrent sur des films minces de réseaux de SWCNT semiconducteurs hautement purifiés, déposés par drop-casting sur ITO et enrobés par PFO, étudiés par spectroscopie électronique 2D. Des *cross-peaks* indiquant un transfert d'énergie entre chiralités différentes : excitation sur S_2 d'un tube et émission (accepteur) sur S_1 d'un autre. On observe un quenching du donneur et renforcement de l'accepteur, signatures attendues du FRET à courte distance (Figure II-16 b) [257].

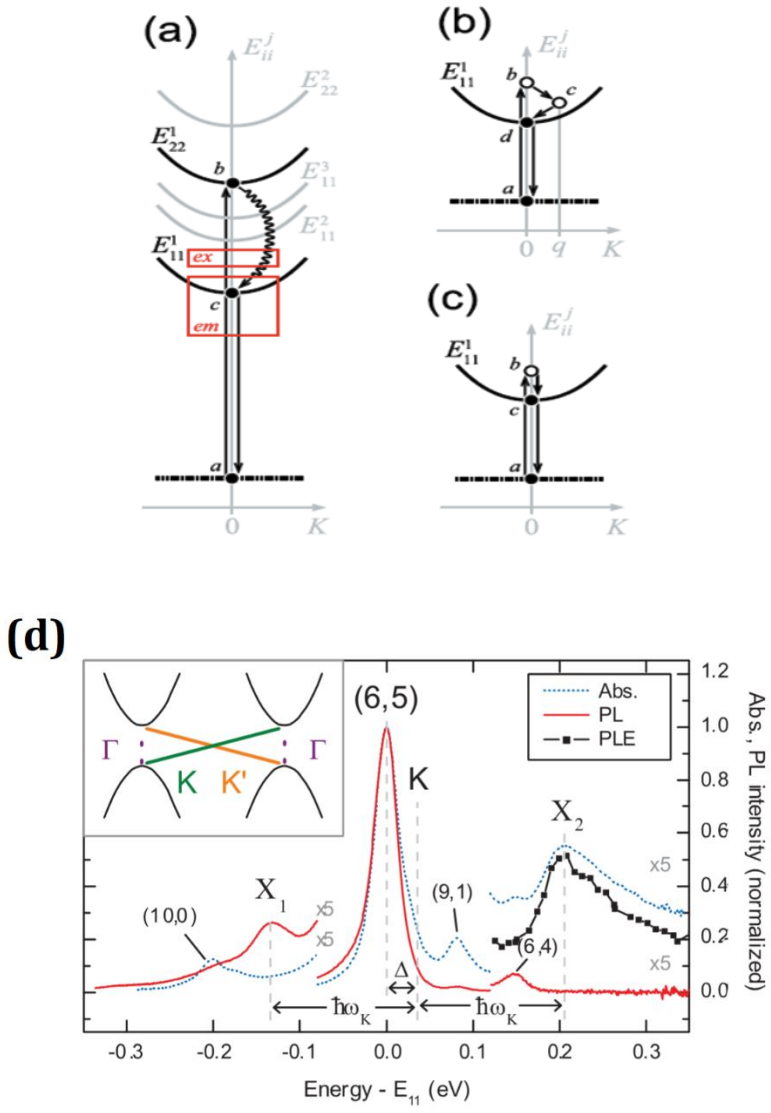
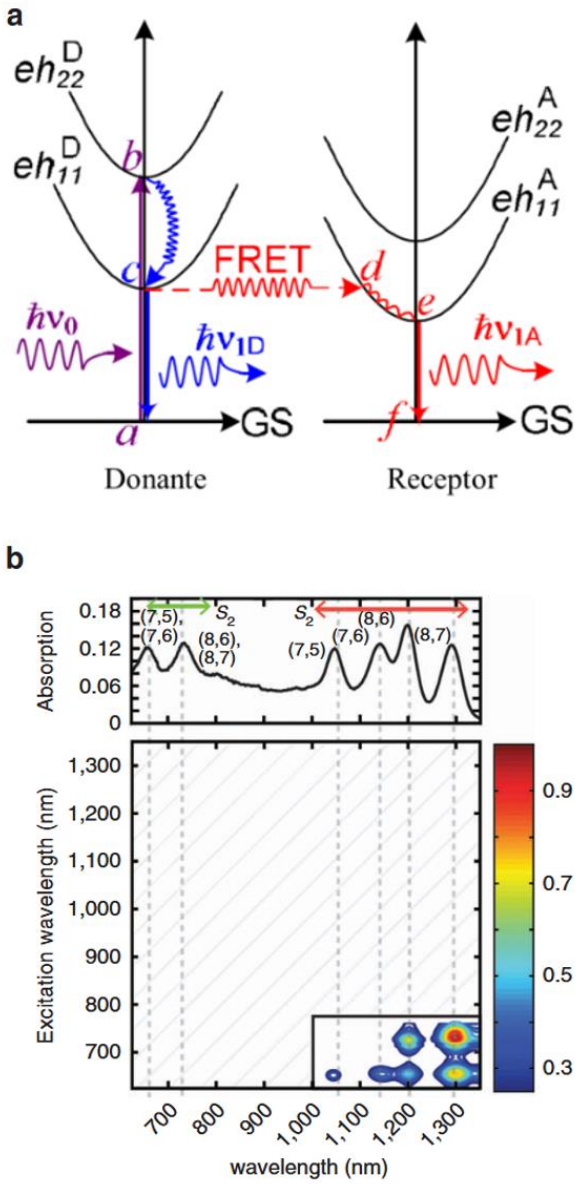


Figure II-15 : Représentations schématiques de différents processus : DT (a) et les deux mécanismes d'EPC (b et c) [258] *et exemple de spectre associé (d)* [253] .



<u>Figure II-16 :</u> Représentation schématique de l'EET entre un SWNT donneur et un SWNT accepteur (a) [255] *et exemple de spectre associé (b)* [257].

II.6.2. <u>Spectroscopie Raman couplée fluorescence</u>

En spectroscopie Raman couplée fluorescence, on excite les SWNT dans le proche IR. De cette manière, on mesure simultanément la diffusion Raman et la FL des tubes. Les deux contributions se superposent et l'on obtient un spectre présentant à la fois des pics Raman caractéristiques du SWNT (RBM, D, G…), et des bandes FL qui, elles, dépendent de l'environnement diélectrique autour du nanotube. En effet, ces bandes FL se décalent parce que la constante diélectrique locale écrante les interactions coulombiennes, ce qui

renormalise à la fois le gap quasi-particulaire et l'énergie de liaison excitonique, ce qui induit le décalage observé. Un milieu à permittivité plus élevée réduit à la fois l'énergie de liaison excitonique et la renormalisation du gap, ce qui abaisse donc les énergies de transitions E_{11} E_{22}, de sorte que la position des pics FL reflète directement la polarisation de l'environnement immédiat du nanotube. La Figure II-17 présente des exemples de spectres Raman couplés fluorescence pour des SWNT dispersés dans différents environnements.

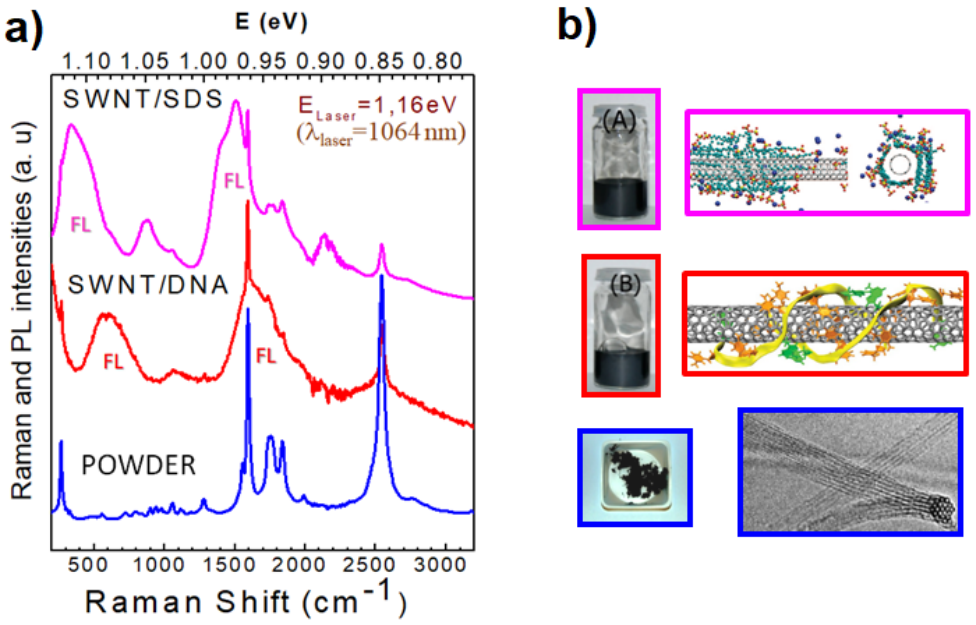


Figure II-17 : Spectres couplés Raman/FL de SWNT/SDS (rose, pourcentages massiques d 0,1wt%/0,1wt%), SWNT/ADN (rouge, pourcentages massiques 0,1wt%/1wt%) et en poudre (bleu) (a), et illustration de l'environnement autour des SWNT pour ces 3 échantillons (b) [259].

Nous pouvons observer 3 spectres de SWNT dans différents environnements et possédant chacun une signature spectroscopique spécifique. Le spectre des SWNT en poudre ne comporte que des pics Raman et aucune bande FL, étant donné que les SWNT étudiés ici n'ont ni eau, ni dispersant dans leur environnement diélectrique. Lorsqu'ils sont en suspension aqueuse et dispersés par le dodécylsulfate de sodium (SDS), on observe un signal FL intense témoignant d'une bonne dispersion et exfoliation des tubes. En effet, plus les SWNT sont exfoliés et individuels, plus on supprime les chemins non radiatifs inter-tube et on restaure des résonances nettes, d'où des intensités de FL plus élevées. [260].

Entre ces deux spectres, les pics Raman ne changent pas, car caractéristiques du SWNT en lui-même, mais les bandes FL sont significativement différentes, on observe des variations d'intensité et des décalages [261].

Comme en spectroscopie d'absorption, chaque pic de FL est associé à un ou plusieurs types de SWNT, il est donc difficile d'associer précisément contribution et bande de FL. En FL, seuls les SWNT semi-conducteurs sont visibles car les métalliques quenchent la FL [205],[262]. Néanmoins, comme les raies de FL sont sensibles à l'environnement diélectrique local et aux adsorbats à la surface du nanotube, les variations de leur énergie, largeur et intensité peuvent servir de sondes de l'environnement : on peut ainsi exploiter ces modifications pour caractériser le milieu autour du tube et établir des empreintes spectroscopiques propres à un dispersant ou à une molécule adsorbée [239],[263]. Les environnements diélectriques autour des SWNT dans ces différents échantillons sont donc différents, ce que l'on peut voir sur la Figure II-17 b. En effet, le SDS s'agrège densément autour du SWNT en laissant très peu d'espace libre, alors que l'ADN s'enroule autour du tube de manière beaucoup plus lâche [83],[264],[265].

II.7. Effets de l'adsorption et de la fonctionnalisation sur les propriétés optiques des SWNT

Dans les SWNT, les lignes du champ de Coulomb s'étendent vers l'extérieur [266],[267]. Les excitons sont fortement liés et leurs propriétés optiques deviennent très sensibles à la permittivité effective qui entoure le tube. La Figure II-18 montre les lignes de champs des excitons selon *Walsh et al*. Une modification de l'environnement diélectrique suffit donc à remodeler le paysage excitonique et à déplacer les transitions optiques E_{ii} [268]. L'orientation et le positionnement de ces excitons à la surface du nanotube sont sujets à débats [269],[270].

Sur le plan microscopique, deux grandeurs sont modulées par l'écrantage : la renormalisation du gap monoparticule (E_{BGR}), repoussée vers le bleu par les interactions électron-électron, et l'énergie de liaison de l'exciton (E_{bind}), décalée vers le rouge par l'attraction électron-trou. Dans le modèle ci-dessus, E_{bind} décroît alors qu'E_{BGR} augmente.

Les deux diminuent quand ε augmente, et la différence diminue également. Leurs variations se compensent partiellement et la transition optique ne se déplace que de quelques dizaines de meV en fonction des interactions coulombiennes. Chacune de ces énergies diminue aussi de moitié lorsque l'on passe de l'air (ε ≈ 1) à l'eau (ε ≈ 80).

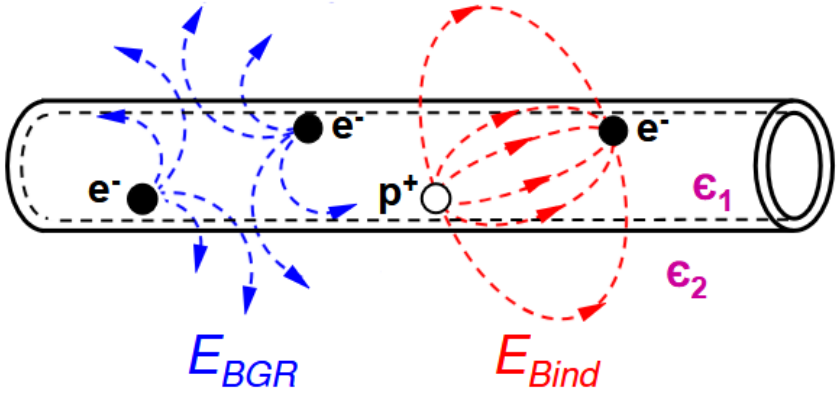


Figure II-18 : Lignes de champ entre les électrons et les trous dans un nanotube de carbone de valeur diélectrique ε_1 dans un environnement diélectrique de ε_2. Les interactions électron-électron et électron-trou conduisent respectivement à E_{BGR} et E_{Bind} [268].

Cette compensation partielle explique la solvatochromie modérée mais systématique mise en évidence dès les premières études spectroscopiques : dans des dispersions micellaires ou des solvants polaires, les pics S_{11} et S_{22} se décalent vers les basses énergies de l'ordre de 30 à 60 meV par unité de constante diélectrique par rapport aux mêmes tubes suspendus dans l'air [198],[271]. Dans des dispersions micellaires ou des solvants plus polaires, les transitions excitoniques S_{11} et S_{22} se décalent vers les basses énergies selon une loi puissance en fonction de la constante diélectrique externe ε_{env} :

$$E_{ii}(\varepsilon_{env}) = E_{ii}^{\infty} + A\varepsilon_{env}^{-\alpha}$$

Le phénomène s'observe aussi quand on augmente la permittivité par enrobage polymère. En effet, les polymères fluorènes (PFO) ou MEH-PPV imposent un ε local d'environ 3 à 4 et induisent un décalage comparable tout en réduisant la durée de vie radiative, signe d'un couplage exciton–polymère renforcé [272]. L'expérience inverse, consistant à retirer l'écrantage, confirme le rôle central de la permittivité. Des tubes en suspension et vidés de leur contenu aqueux retrouvent des raies plus étroites et un S_{11} décalé vers le bleu de 5 à 30 meV selon le (n,m), alors même que l'eau interne a été éliminée [200]. Le même

phénomène s'applique au sein des nanotubes à double paroi : à composition égale, les transitions excitoniques de la paroi interne sont davantage redéplacées lorsqu'elle est entourée d'un tube métallique [273]. Les excitations optiques peuvent donc être modifiées par leur environnement physique et la polarisabilité de l'environnement joue donc un rôle sur la structure électronique et sur les décalages des excitons. *Rohlfing et al.* ont observé des décalages vers le rouge lorsque qu'un SWNT est en contact avec un autre nanotube ou sujet à une physisorption de N_2, ces décalages résultant principalement de la polarisabilité de la structure adjointe.

Outre le décalage énergétique, l'écrantage modifie l'intensité et la dynamique. Les mesures de fluorescence résolue dans le temps montrent que l'augmentation de la permittivité écourte la composante radiative et ouvre des canaux non radiatifs supplémentaires, d'où une chute de rendement quantique, cette tendance étant documentée dans divers solvants et matrices polymères [271]. Dans des solvants très polaires, la diminution d'E_{bind} peut même atteindre le seuil où l'ionisation excitonique devient compétitive : *Park et al.* ont observé la génération spontanée de porteurs libres dans des SWNT (7,5) dispersés dans le toluène, démontrant qu'un léger écrantage suffit parfois à fragiliser le confinement de charge [274]. Les états chargés (trions) accentuent encore cette dépendance. Sur des nanotubes en suspension, l'énergie de liaison trion dépasse celle mesurée dans les mêmes tubes enveloppés par des surfactants précisément parce que l'écrantage y est minimal. *Yoshida et al.* relèvent ainsi des séparations exciton-trion plus grandes de plusieurs dizaines de meV, ce qui atteste un lien direct entre ε et la stabilité coulombienne du trion [275]. À l'inverse, des réseaux dopés montrent que la nature même de l'environnement diélectrique, sa capacité à piéger des charges, module l'efficacité de formation des trions et la position des raies, indépendamment de la simple polarisabilité, soulignant l'importance de l'historique de charge superficielle autant que de la permittivité statique [276].

Donc, en pratique, les transitions excitoniques E_{ii} des SWNT résultent d'un compromis entre l'énergie de bande et une forte énergie de liaison induite par la structure 1D. De ce fait, toute modification locale du potentiel électrostatique ou de la polarisation environnante se répercute donc directement sur la position, l'intensité et la dynamique de ces transitions. Dans le cas d'une modification covalente, des défauts sp^3 sont créés, ce qui brise la symétrie du tube, localise les excitons et ouvre de nouveaux canaux radiatifs E^*_{11}.

En effet, à faible densité (moins d'1 défaut / 200 nm), les défauts peuvent agir comme des pièges radiatifs et génèrent une bande E^*_{11} sous E_{11}, déplaçant ainsi l'émission [277],[278],[279]. Ceci augmente alors la section efficace d'absorption dans la fenêtre NIR tout en multipliant le rendement quantique lorsque la densité de défauts reste dans la zone optimale, au-delà, les voies non radiatives l'emportent et la FL s'effondre.

Pour illustrer avec la Doxorubicine, plane et aromatique, elle s'adsorbe par π-stacking sur des SWNT enrobés d'ADN. Une charge de saturation d'environ 180 molécules pour un nanotube de 166 nm provoque un décalage vers le rouge homogène de 12 à 25 nm selon la chiralité, et un *quenching* d'intensité de 60–80 % à 5 µM DOX, mesuré expérimentalement [280],[281]. La constante de dissociation, extraite de titrations PL, se situe entre 35 et 50 nM, suffisamment faible pour une adsorption quasi-irréversible *in vivo*.

Autre exemple, la greffe covalente de cisplatine, un anticancéreux, sur des SWNT demande une hydroxylation préalable, ce qui implique simultanément un défaut initial, et un ligand lourd qui modifie l'environnement diélectrique. Les spectres révèlent l'émergence d'une bande E_{11}^* vers 1300 nm et une baisse relative d'absorption Raman G/D de 30 %. Ici, on améliore l'efficacité cytotoxique contre des lignées gastriques tout en permettant un suivi optique dans le NIR [282],[283]. Les conjugaisons labiles (disulfures) de paclitaxel à la paroi induisent quant à elles un *quenching* complet de E_{11} . La récupération de la FL après réduction intracellulaire sert de marqueur direct du relargage, avec un temps caractéristique de 45 min dans des modèles de cellules HeLa [284].

Dans le cas d'une modification non-covalente, comme lors de l'enroulement par surfactants anioniques (SDS, SDBS) ou par polymères aromatiques, le réseau sp^2 est conservé, mais plusieurs effets surviennent. Tout d'abord, un écrantage diélectrique externe provoque un décalage vers le rouge par rapport au vide de E_{11} et E_{22} de 20 à 60 meV selon la polarité. De plus, une inhibition partielle du *bundling* est provoquée qui abaisse les largeurs de raies et augmente le rendement quantique. Avec des polymères pyridine ou de l'ADN simple brin court, le rendement quantique passe de 0.6 % à 3–6 % [285],[286]. Ces variations de fluorescence sont corrélées à une réorganisation nanométrique de la couche d'hydratation, soulignant l'importance de la polarisation de l'eau confinée [287].

III. Cancer du pancréas

III.1. Contexte général

Nous vivons dans une société moderne où les maladies sont responsables de la majorité des décès de la population et, parmi elles, le cancer est un problème de santé majeur et mondial. Aujourd'hui, et d'après l'OMS, il est à l'origine de près de 10 millions de décès dans le monde, il serait donc responsable de près d'un décès sur six, ce qui en fait l'une des principales causes de mortalité au niveau mondial [288]. En France, il s'agit de la première cause de décès chez l'homme, et de la deuxième chez la femme. Le cancer peut affecter n'importe quelle partie du corps humain et il est caractérisé par une multiplication incontrôlée de cellules transformées par des mutations, qui acquièrent des caractéristiques particulières, dont une immortalité et une capacité à échapper à la mort cellulaire et au système immunitaire [289]. Ces cellules acquièrent également la capacité à migrer pour traverser les membranes endothéliales des vaisseaux sanguins et être disséminées vers d'autres parties de l'organisme, ce que l'on appelle processus métastatique, qui aggrave grandement le cas du patient [290].

Selon l'OMS [291], les cas de cancers les plus répandus en 2022 étaient, par ordre décroissant (Figure III-1*)* :

- le cancer du sein (2,48 millions de cas)
- le cancer du poumon (2,30 millions de cas)
- le cancer colorectal (1,93 million de cas)
- le cancer de la prostate (1,47 million de cas)
- le cancer de l'estomac (0,97 million de cas)
- le cancer du foie (0,87 millions de cas)

Les cancers ayant le plus grand taux de mortalité en 2022 étaient en revanche, par ordre décroissant :

- le cancer du pancréas (91,5 % de mortalité)
- le cancer du foie (87,6 % de mortalité)
- le cancer de l'œsophage (87,1 % de mortalité)
- le cancer de la plèvre (82,8 % de mortalité)
- le cancer du cerveau (77,2% de mortalité)
- le cancer du poumon (73,3 % de mortalité)

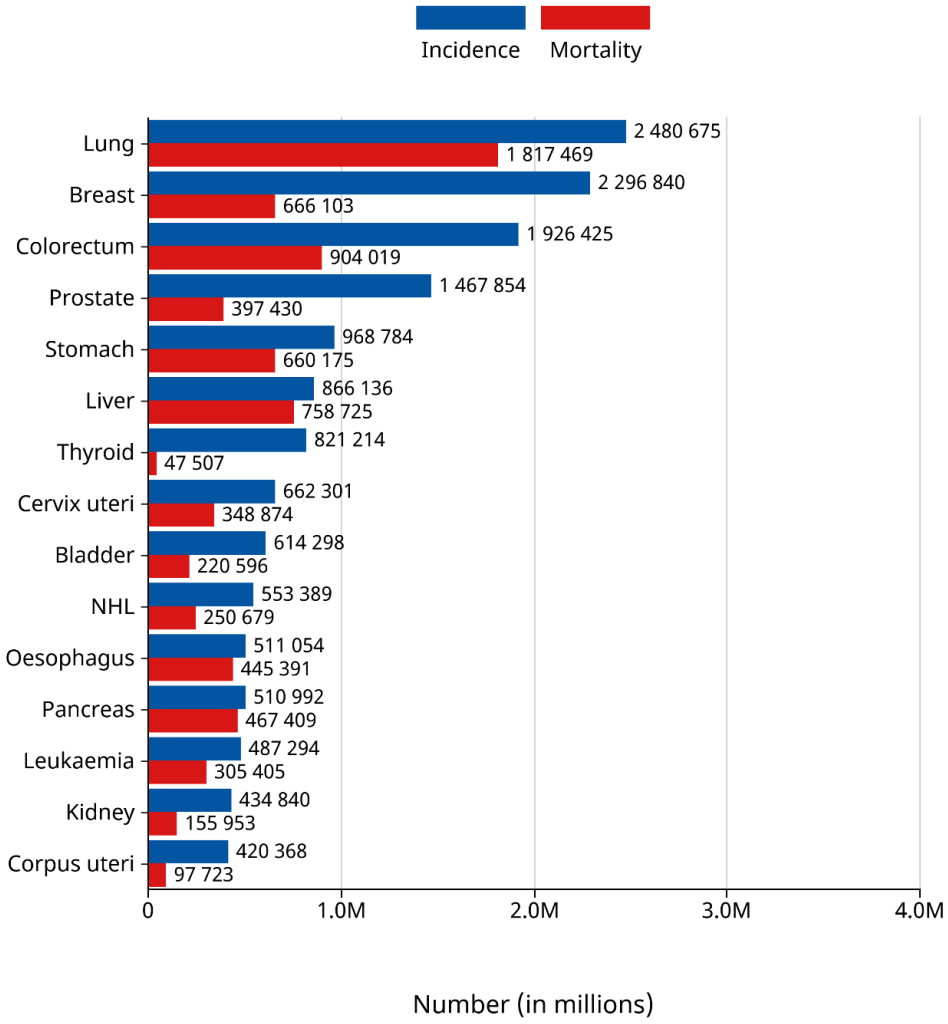


Figure III-1 : Incidence et mortalité en nombres de cas dénombrés des cancers les plus meurtriers en 2022, classés par incidence [291].

III.1.1. Répartition géographique

Le cancer du pancréas est donc le cancer présentant le plus haut taux de mortalité. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est sa forme la plus répandue, avec une répartition géographique hétérogène. Les données épidémiologiques de GLOBOCAN [292] montrent que son incidence est de 8 à 10 cas pour 100 000 habitants (Figure III-2) dans les pays les plus industrialisés, notamment en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest. Elle est environ deux fois plus élevée que dans le reste du monde, comme en Amérique latine, en Asie du Sud-Est et en Afrique subsaharienne (2 à 4 cas pour 100 000 habitants), même si ce chiffre tend à augmenter avec le changement dans les modes de

vie. Cette différence d'incidence s'explique par des facteurs environnementaux décuplant les facteurs de risques qui seront développés plus tard. De plus, le développement économique et l'accès aux soins spécialisés influencent la probabilité de diagnostic, créant ainsi des disparités dans la détection et la prise en charge.

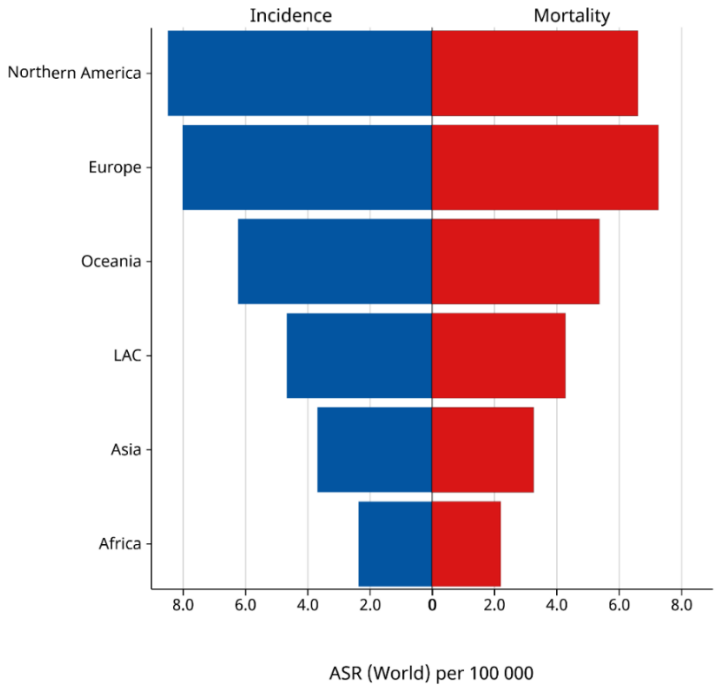


Figure III-2 : Incidence et mortalité en nombre de cas pour 100000 habitants pour le cancer du pancréas en 2022 [291].

III.1.2. Mortalité

Le taux de survie pour un cancer du pancréas à 5 ans stagne autour de 10% [293]. Contrairement à d'autres types de cancers, où des traitements se développent, le cancer du pancréas est toujours à ce jour en manque de traitement thérapeutique efficace [294]. Comme les autres types de cancers, il fait preuve de grande agressivité, capacité de dissémination et résistance aux traitements conventionnels (composés non spécifiques toxiques). Cependant, sa létalité s'explique par la difficulté de son diagnostic précoce. En effet, la plupart des patients atteints d'un cancer pancréatique restent asymptomatiques avant un stade avancé de la maladie, où des micro-métastases sont déjà présentes, en particulier au niveau du foie et du péritoine [295]. En effet, le pancréas est entouré de structures vasculaires et lymphatiques majeures (veine porte, ganglions lymphatiques...),

ce qui facilite la dissémination des cellules cancéreuses. Les cellules de l'adénocarcinome pancréatique acquièrent très tôt des propriétés mésenchymateuses, ce qui leur confère une plus grande capacité de migration et d'invasion [296]. De plus, des voies de signalisation comme KRAS, TGF-β, Hedgehog ou Notch sont souvent dérégulées, renforçant à la fois l'expansion tumorale et la plasticité cellulaire [297]. L'adénocarcinome pancréatique et les autres cancers exocrines moins fréquents étant généralement diagnostiqués au stade III ou IV, le pronostic est très défavorable. Même pour les cas non traitables par la chirurgie, le taux de survie à 5 ans est de 16 % [298]. Les projections démographiques et épidémiologiques suggèrent que le cancer pancréatique pourrait se hisser à la deuxième place des causes de décès par cancer dans certains pays d'ici 2030 [299], surpassant progressivement des cancers plus fréquents mais pour lesquels des approches de diagnostic et des thérapies ciblées ont été développées, telles que le cancer du sein ou le cancer colorectal.

III.1.3. Epidémiologie

Le cancer du pancréas est généralement diagnostiqué entre 65 et 70 ans, seulement 10,6% des diagnostics survenant avant 55 ans, avec une légère prédominance masculine, environ 12% plus élevée [291],[300]. L'augmentation globale de l'incidence mondiale peut s'expliquer par le vieillissement de la population, l'accumulation de facteurs de risques, ainsi que le plus grand nombre de cancers pancréatiques effectivement diagnostiqués. En effet, le diagnostic peut être retardé ou manqué, ce qui fait du cancer du pancréas la tumeur la plus fréquemment détectée lors des études d'autopsie [298]. De plus, l'amélioration des méthodes diagnostiques permet une identification plus fréquente des lésions pancréatiques, dont certaines, asymptomatiques, sont détectées fortuitement, lors d'examens préventifs, de routine, ou même sans rapport direct avec le cancer du pancréas.

III.2. Apparition

III.2.1. Facteurs d'apparition

Le développement d'un PDAC repose sur l'apparition de lésions précurseurs évoluant vers un adénocarcinome invasif. Les néoplasies pancréatiques intraépithéliales (PanIN -

Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) sont des micro-lésions canalaires non invasives, classées de PanIN-1A/B (faible grade) à PanIN-2 (intermédiaire) puis PanIN-3 (carcinome *in situ*) [301],[302] (Figures III-3a et III-3b).

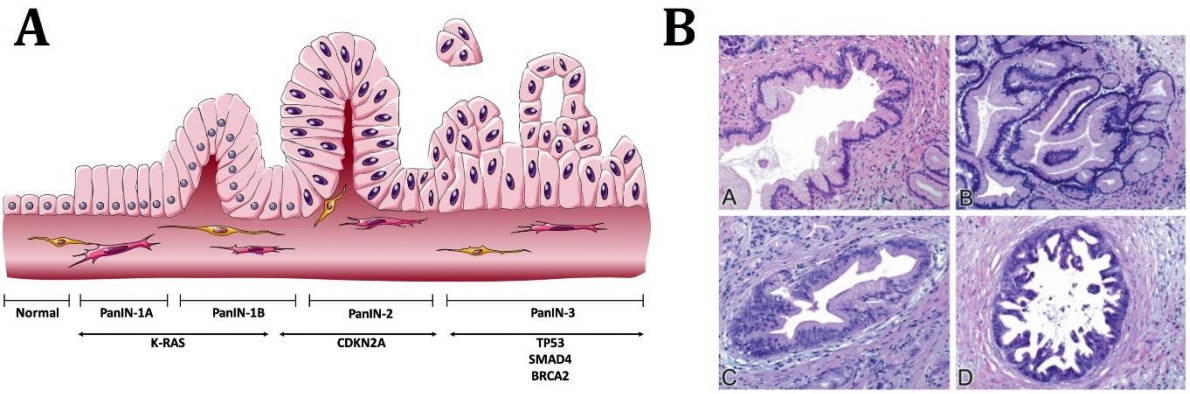


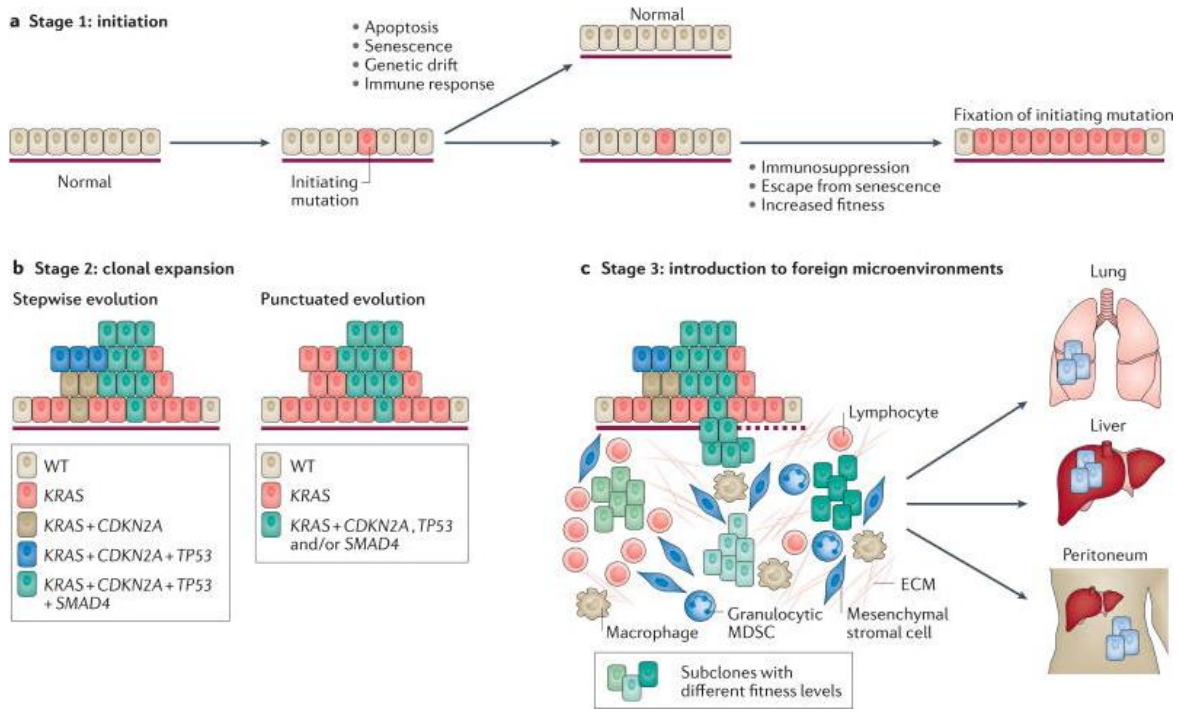
Figure III-3 : A : Représentation schématique de l'apparition et du développement d'un cancer du pancréas et de chaque étape de PanIN. Chaque étape est marquée par des mutations génétiques consécutives et cummulatives [302]. B : *Exemples représentatifs de chaque étape de PanIN, A : les cellules présentent une mucine cytoplasmique abondante, mais il n'y a pas de papilles (PanIN-1A), B : cellules similaires contenant des papilles (PanIN-1B), C : Stratification des noyaux et anomalies cytologiques (PanIN-2), D : totale perte de polarité, atypies cellulaires (Pan-IN-3)* [301].

La Figure III-3a montre schématiquement l'évolution des lésions précurseurs et les mutations qui y sont reliées. Les PanIN-1A et 1B sont liées à la mutation du gène KRAS (détectée dans 90% des cancers du pancréas) et progressent en PanIN-2 lors d'une délétion ou d'une mutation inactivant CDKN2A/p16, une protéine suppresseur de tumeurs. Enfin l'anomalie du noyau cellulaire, appelée atypie nucléaire, se poursuit et les lésions progressent en PanIN-3, lorsque surviennent les mutations inactivatrices de p16 et SMAD4, conduisant à l'inhibition de leur expression protéique [302]. La figure III-3b montre l'évolution des cellules à chaque étape de PanIN [301]. Ces lésions accumulent progressivement des altérations génétiques et épigénétiques avant de finalement devenir invasives. Les tumeurs intra-canalaires papillo-mucineuses (TIPMP), quant à elles, sont des lésions macroscopiques bénignes formées de papilles et de mucus, pouvant se transformer en tumeurs malignes. Les TIPMP peuvent être de type intestinal, pancréato-biliaire ou gastrique et diffèrent par leur risque de progression vers un cancer

[303]. Enfin, les cystadénomes mucineux (MCN) sont des lésions kystiques du pancréas. Les MCN présentent un épithélium mucineux avec des malformations (dysplasies), pouvant évoluer vers un adénocarcinome invasif [304].

III.2.2. Altérations génétiques et mutations

Le profil génétique du cancer pancréatique se caractérise par une série d'altérations moléculaires récurrentes. La Figure III-4 présente les différentes étapes de formation et de dissémination du cancer du pancréas, et l'on peut y voir que tout commence lors de l'acquisition d'une mutation par une cellule saine.



<u>Figure III-4 :</u> Etapes de la formation et de l'évolution du cancer du pancréas. Etape 1 : une cellule pancréatique saine acquiert une mutation initiale (rouge) et échappe aux mécanismes de défense (apoptose, immunosuppression…). Etape 2 : la cellule possédant la mutation initiale continue de se multiplier, la mutation est présente dans toute la population et des mutations secondaires apparaissent (marron, bleu et vert). Etape 3 : Une population de cellules s'échappe du stroma (les vertes) et se disséminent dans le corps [305]

Cette mutation peut provenir d'une altération due à une exposition environnementale, ou d'une défaillance dans la duplication et/ou la réparation de l'ADN. En temps normal, cette mutation provoque l'apoptose, la sénescence ou l'immunosuppression de la cellule affectée. Cependant, si ces mécanismes échouent, la mutation reste présente en raison d'un avantage de survie ou de croissance (étape 1). La cellule porteuse de la mutation et sa descendance continuent donc à se diviser, créant une population clonale. Au fur et à mesure que la population augmente en nombre et en espace occupé, les descendants acquièrent des mutations supplémentaires (étape 2). Plus l'expansion clonale se poursuit, plus les cellules acquièrent un phénotype invasif et la capacité à franchir la membrane endothéliale (EMT : transition épithelio-mesenchymateuse), se disséminant ainsi vers des sites distants au cours du processus métastatique. Les cellules disséminées peuvent alors coloniser de nouveaux micro-environnements tels que le foie, les poumons ou le péritoine, sites courants pour des métastases du cancer du pancréas (étape 3) [305].

Les quatre gènes les plus fréquemment mutés sont KRAS, CDKN2A, TP53 et SMAD4 [305],[306],[307],[308] (Figure III-5). Ces gènes jouent des rôles clefs dans les voies de signalisation promouvant la croissance et la survie cellulaire (Figure III-6). Leurs rôles particuliers seront développés plus en détails dans leurs parties respectives.

III.2.2.1. KRAS

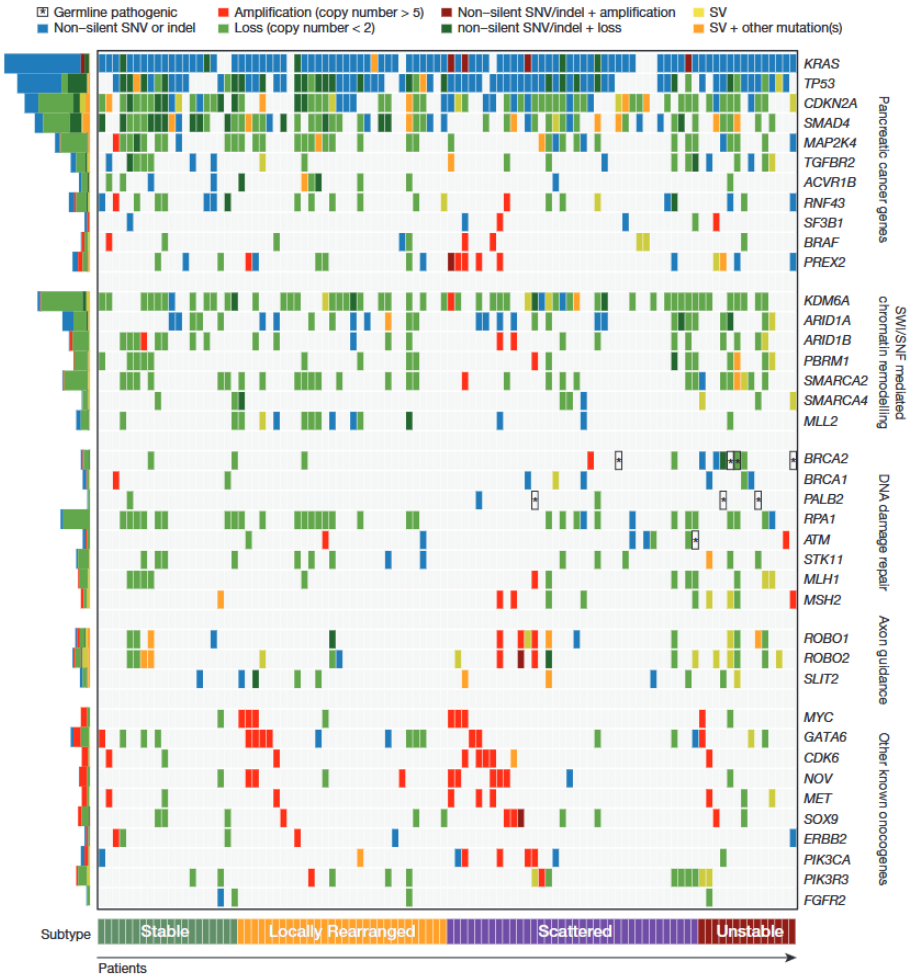
Le gène KRAS est muté dans plus de 90% des PDAC [307]. Les substitutions les plus courantes se situent au codon 12 (G12D, G12V et, plus rarement, G12R) [309]. Il code pour la protéine KRAS, une protéine GTPase permettant d'augmenter la prolifération des cellules. Ces mutations conduisent à une activation constitutive de la protéine KRAS, entraînant la stimulation continue des voies de signalisation intracellulaires, dont la voie MAPK (RAF/MEK/ERK), promouvant la prolifération cellulaire, et la voie PI3K/AKT/mTOR, promouvant la survie, la migration et la résistance aux traitements [310],[311]. La difficulté historique à cibler KRAS directement a stimulé la recherche d'inhibiteurs spécifiques des mutations G12C [312] (développés avec succès dans le cancer du poumon [313]) mais ces variants sont moins fréquents dans le PDAC. De nouveaux inhibiteurs ciblant KRAS G12D ou G12V, ou agissant sur les voies en aval (ex. inhibiteurs MEK, ERK), sont actuellement en développement clinique [314]. Tous les inhibiteurs cliniques de G12C susmentionnés contiennent un groupe acrylamide

chimiquement réactif. La sélectivité est assurée par l'interaction avec la poche switch II du KRAS G12C, qui facilite la réaction avec la Cys mutante [312]. À ce jour, sept inhibiteurs irréversibles de KRAS G12C ont atteint le stade des essais cliniques, notamment le sotorasib (AMG 510, Amgen), l'adagrasib (MRTX849, Mirati Therapeutics), JNJ-74699157 (Janssen), LY3499446 (Eli Lilly), GDC-6036 (Genentech), D-1553 (InventisBio), et JDQ443 (Novartis), avec un essai prévu prochainement pour un huitième, LY3537982 (Eli Lilly).

Outre leur rôle de mutations motrices dans une variété de cancers, les mutations du gène KRAS se sont avérées jouer un rôle prédictif ou pronostique dans certains cancers. Dans le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), les mutations du gène KRAS ne sont pas des marqueurs prédictifs indépendants de la réponse à la chimiothérapie, à la thérapie ciblée ou à l'immunothérapie. Les mutations du gène KRAS sont associées à un pronostic plus défavorable dans le CPNPC et le cancer colorectal, avec des différences entre les mutations [315]. Le gène KRAS G12C en particulier peut être associé à un pronostic plus défavorable que les autres mutations du gène KRAS dans les CBNPC de stade I-III réséqués [316]. Cependant, la même association n'a pas été observée dans le cancer du poumon avancé [317]. Dans le cancer colorectal avancé et récurrent, les mutations du codon 12 de KRAS sont associées à un pronostic plus défavorable, et cet effet est principalement dû aux mutations G12C et G12V de KRAS [318].

III.2.2.2. CDKN2A

Le gène CDKN2A code pour la protéine p16 qui est délétée dans environ 90% des PDAC. Cette protéine code pour un inhibiteur structural des protéine kinases CDK4 et CDK6/cycline D, empêchant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) et bloquant ainsi le passage de la phase G1 à S du cycle cellulaire [309]. L’absence de p16 conduit donc à une forme constitutivement active de CDK4 et CDK6. L’inhibition de CDK4/6 (par des drogues telles que palbociclib, ribociclib, abemaciclib) pourrait partiellement compenser l’effet induit [319]. Ces inhibiteurs appelés ATP-compétitifs ciblent la poche ATP des kinases afin de les inhiber. Plusieurs essais cliniques ont été réalisés pour évaluer ces inhibiteurs de CDK4/6 en combinaison avec d’autres agents [320],[321],[322].



<u>Figure III-5 :</u> Mutations dans les gènes et voies de signalisation clefs pour le cancer pancréatique. En bleu : mutations non silencieuses, en rouge : amplification du nombre de copies, en vert : diminution du nombre de copies, en jaune : modifications structurelles. Les gènes sont classés par fonctions et par nombre de mutations recensées pour chacun dans le cancer du pancréas [309].

III.2.2.3. TP53

Le gène TP53 est muté dans 50 à 75% des PDAC [309]. Il code pour p53, un suppresseur de tumeur, de l'apoptose, de la sénescence et de l'intégrité génomique [323],[324]. Les mutations de TP53 empêchent la protéine p53 de répondre aux dommages à l'ADN et de déclencher l'apoptose. Cela favorise l'accumulation de mutations secondaires et la progression tumorale par réplication non-apoptotique de cellules cancéreuses endommagées. Des composés visant à réactiver p53 muté (APR-246) ou inhiber les

protéines antagonistes de p53 (MDM2) sont en évaluation préclinique [325],[326],[327],[328].

III.2.2.4. SMAD4 (DPC4)

Le gène SMAD4 est altéré dans environ 50% des PDAC [308]. C'est un médiateur clef de la voie TGF-β, une voie normalement inhibitrice de la croissance dans les cellules épithéliales. La perte de SMAD4 fait ainsi basculer la fonction du TGF-β de suppressive à parfois pro-tumorigénique, favorisant l'invasion, la fibrose et les métastases [329].

III.3. Chirurgie et Traitements

Les avancées récentes en génomique, l'émergence de thérapies ciblées, les stratégies combinées multidimensionnelles (chimiothérapie, immunothérapie, remodelage du stroma, approches épigénétiques, thérapies métaboliques) et la montée en puissance de la médecine de précision laissent entrevoir des améliorations progressives et peut-être des ruptures thérapeutiques dans les années à venir.

III.3.1. Chirurgie

La chirurgie est le seul traitement permettant vraiment de retirer les tumeurs du pancréas. Cependant, seulement 15 à 20% des patients présentent une tumeur résécable [294]. Les interventions chirurgicales dépendent de l'endroit où se situe la tumeur.

La Duodénopancréatectomie céphalique, ou opération de Whipple, est l'opération indiquée pour les tumeurs de la tête pancréatique. Il s'agit d'une résection de la tête du pancréas, du duodénum, d'une partie de l'estomac, de la voie biliaire et de la vésicule biliaire. La pancréatectomie distale constitue quant à elle une ablation du corps et de la queue du pancréas. La pancréatectomie totale, où l'on retire l'intégralité du pancréas, est rare, réservée aux tumeurs diffusant dans l'ensemble de la glande. Cette opération provoque un diabète insulinodépendant et une insuffisance exocrine totale [330].

Les améliorations des soins périopératoires comme l'anesthésie, la réhabilitation précoce, la sélection appropriée des patients par imagerie haute définition, ainsi que la chimiothérapie néoadjuvante ont amélioré les taux survie post-opératoire [306].

III.3.2. Chimiothérapies

Le traitement systémique du PDAC repose principalement sur la chimiothérapie cytotoxique [331],[332],[333], bien que l'on assiste à une expansion des thérapies ciblées dans des sous-groupes de patients. Ces dernières cherchent à bloquer la croissance ou la propagation des cellules tumorales en s'attaquant spécifiquement à certaines de leurs anomalies [334],[335],[336]. Les chimiothérapies actuelles ciblent des mécanismes fondamentaux de la division cellulaire ou de la synthèse d'ADN. Le traitement par des médicaments anticancéreux « traditionnels », tels que la gemcitabine de référence ou les combinaisons quaternaires FOLFIRINOX ou NALIRIFOX, qui constituent actuellement les traitements de référence, n'augmentent la survie globale moyenne que de quelques mois et entraîne souvent une chimiorésistance [337],[338],[339].

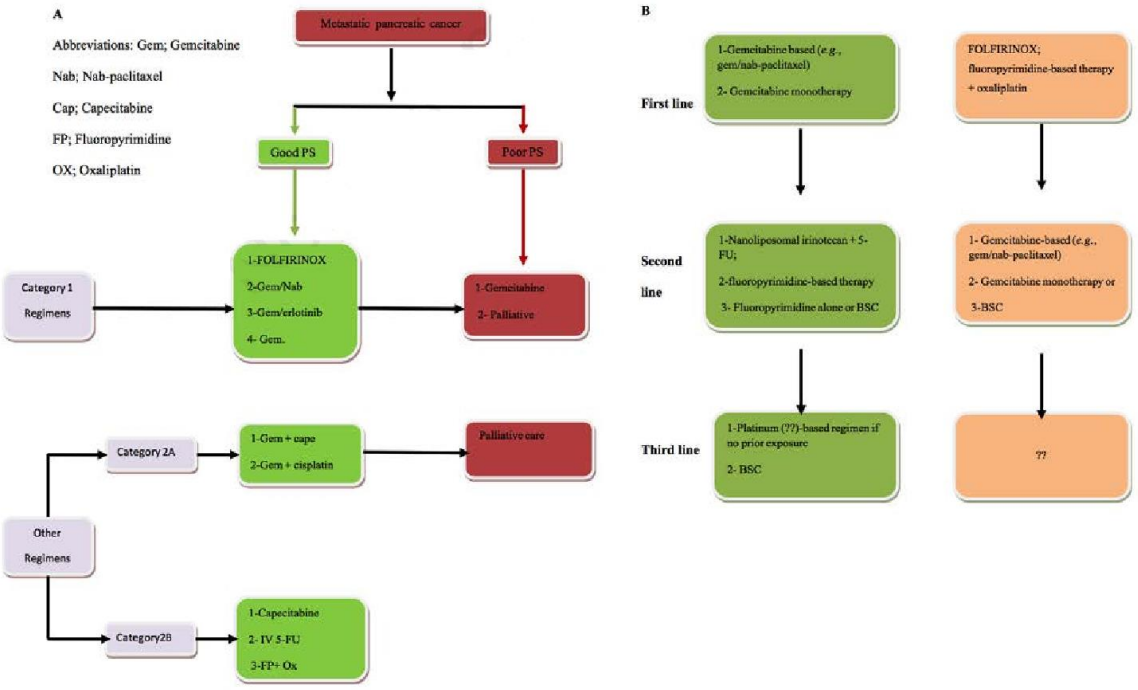
III.3.2.1. Drogues utilisées en clinique

Les agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique dans le PDAC induisent de nombreux effets secondaires, en plus de n'être pas utilisés pour des traitements thérapeutiques, mais seulement palliatifs [340]. La majorité des drogues utilisées en clinique ciblent des fonctions essentielles à la division cellulaire et à la survie des cellules tumorales. Les agents antimétabolites (gemcitabine, 5-FU), les inhibiteurs de la topoisomérase (irinotécan), les agents alkylants/intercalants (oxaliplatine, cisplatine), et les inhibiteurs du fuseau mitotique (nab-paclitaxel) constituent le socle actuel du traitement systémique du cancer pancréatique [331]. Néanmoins, la résistance tumorale, le microenvironnement stromal dense et l'hétérogénéité génétique limitent l'efficacité de ces approches [341],[342],[343].

Certains ciblent la synthèse et la réplication de l'ADN, inhibent l'incorporation des nucléotides, induisent la formation de ponts intra- et inter-brins dans l'ADN (antimétabolites) [344],[345],[346],[347] ou bloquent la topoisomérase, enzyme essentielle à la réplication et à la transcription de l'ADN [348]. D'autres agents ont pour objectif les microtubules et le fuseau mitotique, afin de perturber la mitose [349]. Enfin, certains bloquent la réparation de l'ADN (dérivés du platine) [350],[351].

La norme de soins actuelle est une chimiothérapie adjuvante de six mois à base d'acide folinique modifié, de 5-fluorouracile, d'irinotécan et d'oxaliplatine (mFOLFIRINOX) chez

les patients suffisamment aptes pour ce protocole, sinon six mois de gemcitabine et de capécitabine selon l'étude du Groupe d'étude européen sur le cancer du pancréas (ESPAC)-4 (Figure III-6) [352],[353].



<u>Figure III-6 :</u> Algorithme de chimiothérapie pour le cancer du pancréas : A : en traitement de première ligne, B : après progression en première ligne [353].

Chez les patients atteints d'une maladie métastatique, la chimiothérapie combinée selon le protocole FOLFIRINOX ou avec la gemcitabine plus le nab-paclitaxel constitue une amélioration importante par rapport à la gemcitabine en monothérapie, qui a été la norme pendant de nombreuses années. Les patients qui ne sont pas aptes à recevoir une chimiothérapie combinée peuvent néanmoins bénéficier de la gemcitabine. Les patients dont l'état de performance est bon peuvent bénéficier d'une chimiothérapie de deuxième ligne [352].

Le schéma NALIRIFOX (irinotécan nanoliposomal + 5-FU/leucovorine + oxaliplatine) s'est cependant imposé comme nouvelle référence de 1re ligne dans le PDAC métastatique. Dans l'essai de phase III NAPOLI-3, il a prolongé la survie globale (11,1 mois vs 9,2 mois) et la survie sans progression (7,4 mois vs 5,6 mois) tout en doublant presque le taux de

réponse objective par rapport au couple gemcitabine + nab-paclitaxel [354]. *Wainberg et al.* soulignent que l'utilisation de l'irinotécan sous forme nanoliposomale optimise l'exposition tumorale tout en permettant de réduire la dose et la toxicité digestives, positionnant NALIRIFOX comme un choix prêt-à-l'emploi pour les centres qui redoutent la lourdeur du FOLFIRINOX [337],[339].

III.3.2.1.1. Gemcitabine :

La gemcitabine (Figure III-7) est un antimétabolite qui inhibe la ribonucléotide réductase réduisant la disponibilité des désoxynucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN, ralentissant la division et la multiplication des cellules cancéreuses [355],[356]. Elle s'incorpore également dans l'ADN au cours de sa réplication, provoquant une terminaison prématurée de la chaîne [355],[357],[358]. (Figure III-8)

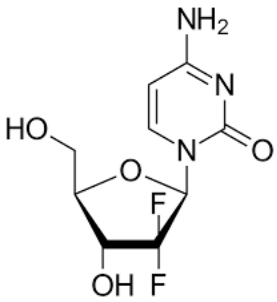
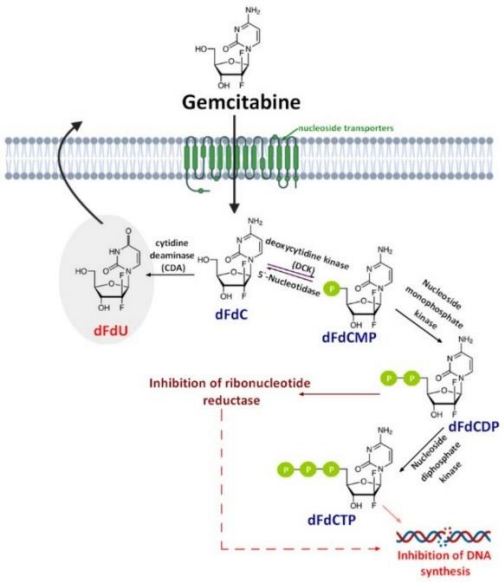


Figure III-7 : Gemcitabine

La gemcitabine demeure l'agent cytotoxique le plus simple à mettre en œuvre en pratique clinique : une perfusion intraveineuse de 1000 mg/m^2 administrée en 30 minutes une fois par semaine (schéma 7 semaines + repos + 3 semaines) suffit, sans prémédication lourde ni protocole de perfusion complexe, ce qui facilite son utilisation en hôpital de jour. Son profil de tolérance est jugé « acceptable », la médiane de survie globale reste modeste (≈ 5-7 mois en monothérapie de première intention) mais supérieure à celle du 5-FU [359]. Elle possède néanmoins des effets secondaires liés à son mécanisme d'action peu sélectif. En effet, la molécule cible toutes les cellules à forte prolifération et les toxicités dominantes sont hématologiques

On peut citer une neutropénie (≈ 25 %), une thrombopénie et anémie de grade 3-4, auxquelles s'ajoutent syndrome pseudo-grippal, fatigue, nausées/vomissements, élévation des transaminases et, plus rarement, toxicités pulmonaires ou rénales sévères (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2024/209604s011lbl.pdf).

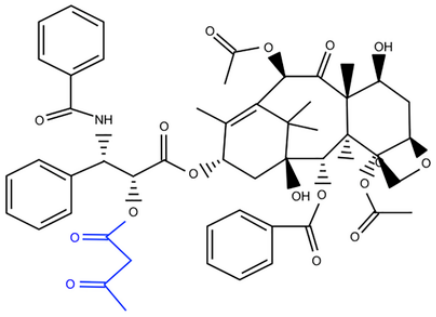
Une résistance est fréquemment développée due à la surexpression de transporteurs nucléosidiques, des voies de contournement métabolique, et une altération de la perméabilité stromale [360].



<u>Figure III-8 :</u> Mécanisme d'action de la gemcitabine, inhibant la ribonucléotide réductase et ainsi la synthèse de l'ADN [361].

III.3.2.1.2. Nab-paclitaxel :

Le nab-paclitaxel (Figures III-9 et III-10) est une forme de paclitaxel couplé à l'albumine qui se lie aux microtubules pendant la mitose, stabilisant leur assemblage et empêchant leur dépolymérisation [362]. Elle permet ainsi de bloquer la division cellulaire à la métaphase. Associée à la gemcitabine, elle améliore la survie par rapport à la gemcitabine seule [363]. Elle induit cependant des neuropathies périphériques et une myélosuppression.



<u>Figure III-9 :</u> Nab-paclitaxel.

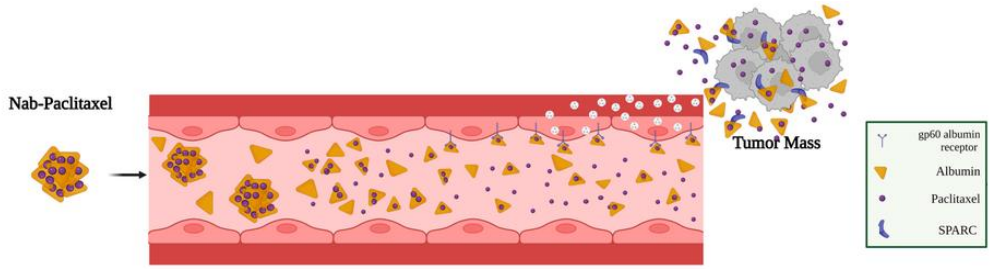


Figure III-10 : Mécanisme d'action du nab-paclitaxel, infiltrant les cellules cancéreuses et bloquant la division cellulaire [362].

III.3.2.1.3. FOLFIRINOX :

Il s'agit d'une combinaison de 4 drogues possédant différentes propriétés (Figure III-11). Le 5-fluorouracile (5-FU) est un antimétabolite pyrimidique inhibant la thymidylate synthase, empêchant la synthèse de thymidine nécessaire à l'ADN. L'acide folinique (leucovorine) permet d'améliorer cette inhibition. L'irinotécan est quant à lui un inhibiteur de la topoisomérase I, empêchant la relaxation de l'ADN au cours de la réplication et conduisant à des cassures. Enfin, l'oxaliplatine est un agent à base de platine formant des liaisons avec l'ADN, induisant des combinaisons inter-brins [364].

Globalement, le FOLFIRINOX présente une efficacité supérieure à la gemcitabine en métastatique, et peut également être utilisé en néoadjuvant. Cependant, cette combinaison a une toxicité globale élevée, notamment digestive et présente de nombreux effets secondaires demandant une sélection rigoureuse des patients (Figure III-12) [365].

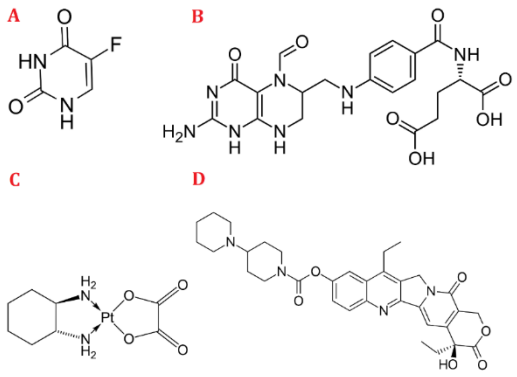
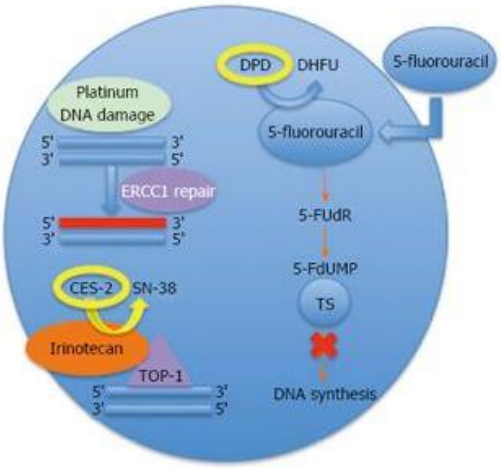


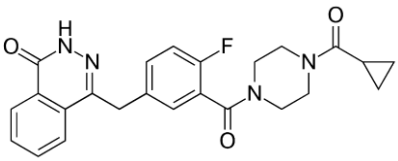
Figure III-11 : FOLFIRINOX : A : 5-fluorouracile, B : acide folinique, C : irinotécan, D : oxaliplatine



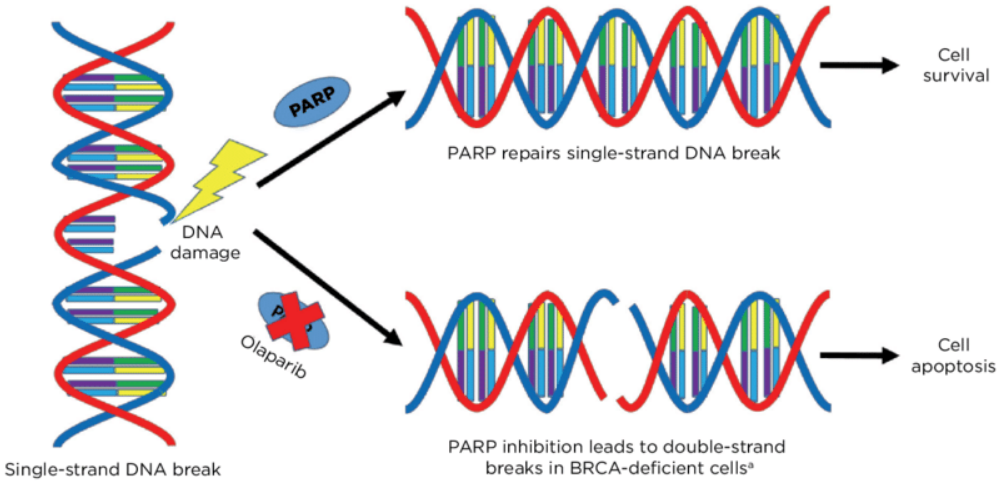
<u>Figure III-12 :</u> Schéma thérapeutique du FOLFIRINOX [364].

III.3.2.1.4. Olaparib :

Il s'agit d'un inhibiteur de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), une enzyme de réparation des cassures simple brin de l'ADN (Figure III-13) [298]. Dans les cellules déficientes en recombinaison homologue, l'inhibition de PARP conduit à une accumulation de dommages à l'ADN et à la mort cellulaire (Figure III-14) [366].



<u>Figure III-13 :</u> Olaparib.



<u>Figure III-14 :</u> Mécanisme d'action de l'olaparib, inhibant la PARP qui ne peut pas réparer l'ADN endommagé [367].

III.3.2.1.5. Autres agents d'intérêt

Bien que moins utilisés en routine, d'autres agents sont testés dans des essais cliniques, comme la capécitabine (pro-drogue du 5-FU, Figure III-15) présentant une meilleure tolérance orale et parfois utilisée en adjuvant, l'irinotécan, ayant une meilleure biodisponibilité et distribution tumorale, et le cisplatine ou carboplatine, utilisés chez les patients avec altérations de la réparation de l'ADN, parfois en combinaison avec les inhibiteurs PARP (Figure III-16,17,18) [290].

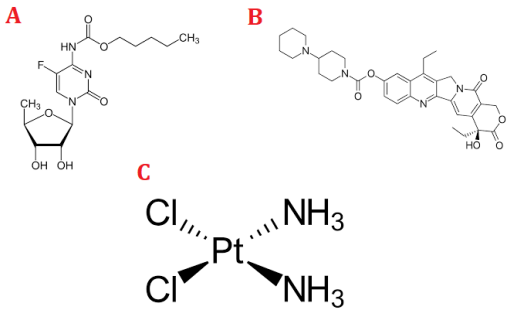


Figure III-15 : A : Capécitabine, B : Irinotécan, C : Cisplatine.

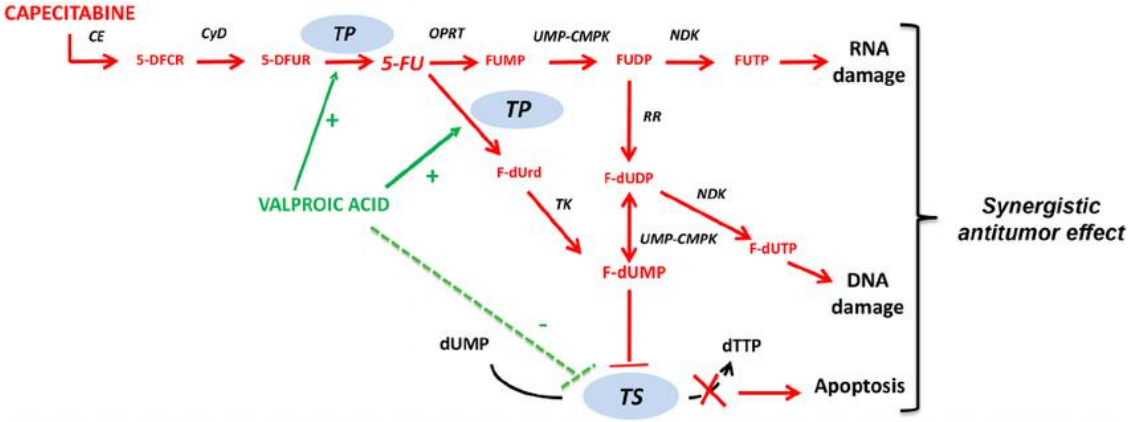


Figure III-16 : Mécanisme d'action de la capécitabine, précurseur du 5-FU [368].

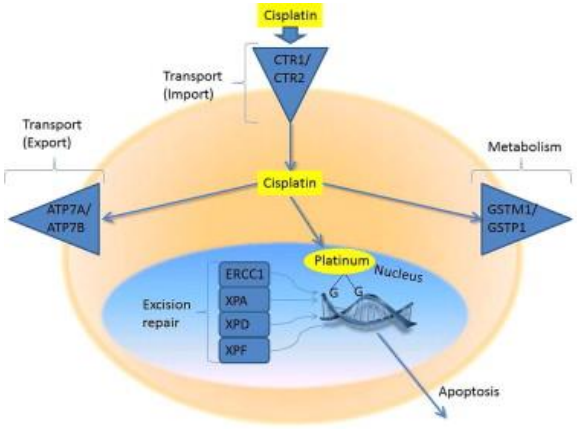
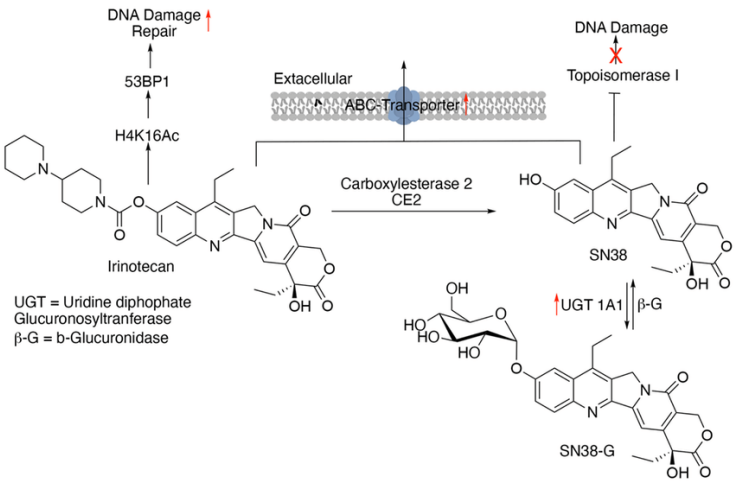
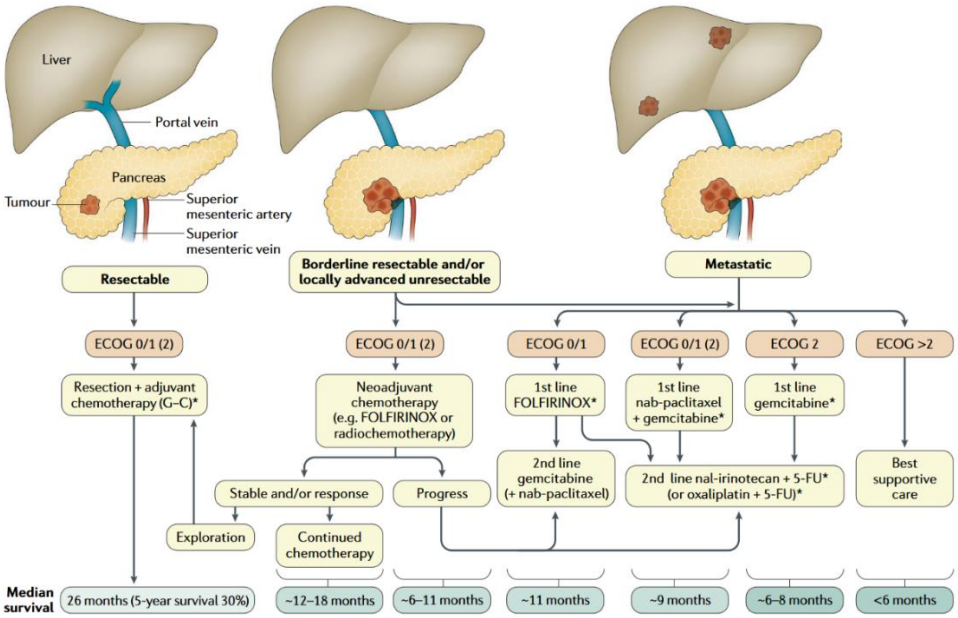


Figure III-17 : Mécanisme d'action du cisplatine, se séparant de son platine toxique dans le noyau cellulaire, menant à l'apoptose [369].



<u>Figure III-18 :</u> Mécanisme d'action de l'irinotécan, formant SN38 et inhibant la réparation de l'ADN [370].

La Figure III-20 montre l'algorithme actuel de traitement pour les patients atteints du cancer du pancréas.



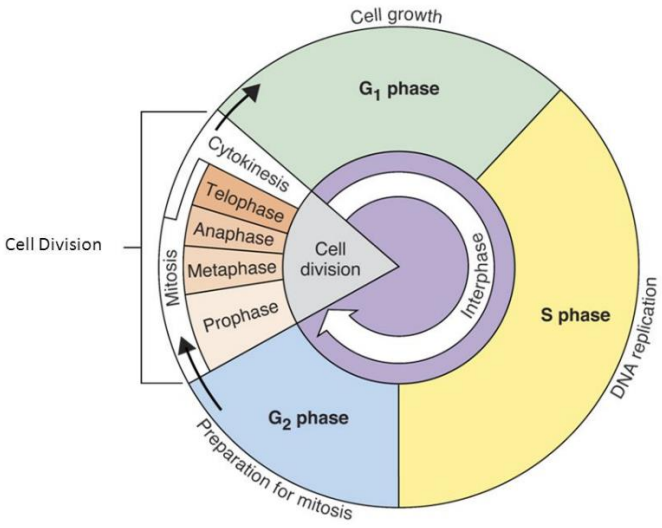
<u>Figure *III*-29 :</u> Algorithme de traitement pour patients atteints d'un cancer du pancréas [371].

IV. Cycle cellulaire, protéine-kinases et CDK4

IV.1. Cycle cellulaire et protéine-kinases

IV.1.1. Le cycle de division cellulaire

Le cycle cellulaire constitue un processus fondamental permettant aux organismes eucaryotes de croître, de se renouveler et de se diviser. Le taux de renouvellement varie selon les espèces et les types cellulaires, et repose sur une régulation fine, assurée par un réseau complexe de protéines et d'enzymes impliqués dans des voies de signalisation moléculaires et cellulaires [372],[373]. Ainsi, l'ensemble du cycle est découpé en quatre phases majeures successives : G1 (Growth phase 1), S (DNA Synthesis) et G2 (Growth phase 2), puis la phase M (Mitose). Les 3 premières constituent l'interphase, au cours de laquelle la cellule synthétise des protéines et accumule les nutriments essentiels puis réplique son ADN avant la mitose où la cellule se scinde en deux cellules filles génétiquement identiques (Figure IV-1) [374].



<u>Figure IV-1 :</u> Cycle cellulaire divisé en ses 4 phases : G1, S, G2 et M, cette-dernière elle-même divisée en 5 sous-phases [375].

Si la cellule ne dispose pas des facteurs de croissance ni des ressources adéquates, elle peut provisoirement quitter le cycle actif pour entrer en quiescence (phase G0). Par la suite, sous l'influence de signaux externes appropriés, elle est en mesure de réintégrer le

cycle et de reprendre les étapes de croissance, de synthèse, de réplication et de division cellulaire [376],[377],[378],[379].

De plus, des points de contrôle, ou « checkpoints » assurent l'intégrité de certains évènements clés, comme lors de la réplication de l'ADN et de la mise en place du fuseau mitotique. Il s'agit de mécanismes de surveillance qui arrêtent temporairement le cycle cellulaire afin de garantir que les événements critiques tels que la réplication de l'ADN et la ségrégation des chromosomes sont menés à bien avec fidélité [380]. Ces mécanismes constituent un verrou essentiel empêchant l'accumulation d'erreurs, comme l'endommagement de l'ADN, des mutations induites par les UVs ou des remaniements génomiques. Ainsi, en cas de dommages à l'ADN ou d'anomalies de réplication, les systèmes de contrôle interrompent le cycle, offrant à la cellule la possibilité d'effectuer les réparations nécessaires grâce à l'expression et à l'activation de protéines impliquées dans ces réparations. Si ces réparations sont impossibles, les voies de signalisation déclenchant des mécanismes de mort cellulaire, comme l'apoptose, sont activées [381].

Le point de restriction (R), localisé entre G0 et G1, constitue un des premiers checkpoints déterminant l'entrée sans retour possible dans le cycle cellulaire. Cette étape critique dépassée, la progression du cycle se poursuivra jusqu'à la division [382]. Les checkpoints à la transition G2/M, points de contrôle sur le fuseau mitotique, veillent au positionnement des chromosomes sur les microtubules, à leur alignement sur le fuseau mitotique et à leur répartition entre les deux cellules filles [383] (Figure IV-2). Des défauts dans les checkpoints et les mécanismes de réparation de l'ADN contribuent à beaucoup de cancers [381],[384],[385].

Les checkpoints contribuent avec les suppresseurs de tumeurs et les mécanismes de régulation intrinsèques à la régulation du cycle cellulaire, à l'intégrité génomique et à la coordination de la croissance et de la division cellulaire:

En 2000, Hanahan et Weinberg ont initialement décrit six caractéristiques essentielles des cellules cancéreuses : le maintien de la signalisation prolifération, l'évitement des suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité réplicative, l'induction de l'angiogenèse et l'activation de l'invasion et de la métastase [386]. En 2011, quatre autres caractéristiques ont été décrites : l'instabilité du génome, qui génère la diversité génétique qui accélère leur acquisition, l'inflammation, qui favorise de multiples

fonctions caractéristiques, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'évitement de la destruction immunitaire (Figure IV-3) [289].

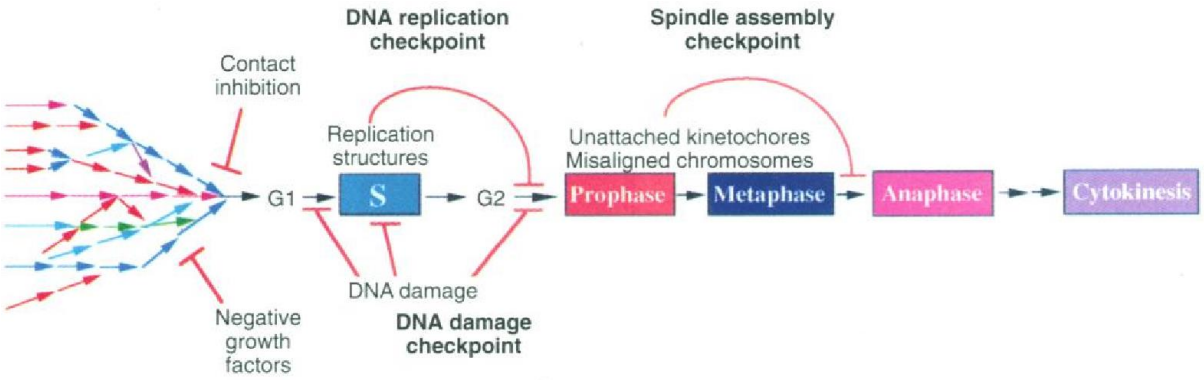


Figure IV-2 : Représentation schématique de checkpoints du cycle cellulaire. Les flèches colorées représentent des voies de signalisation opérant en G1 et transmettant des informations en vue de la prolifération cellulaire. Les lignes rouges représentent les signaux inhibiteurs provenant des voies de régulation des checkpoints en réponse à des évènements spécifiques [380].

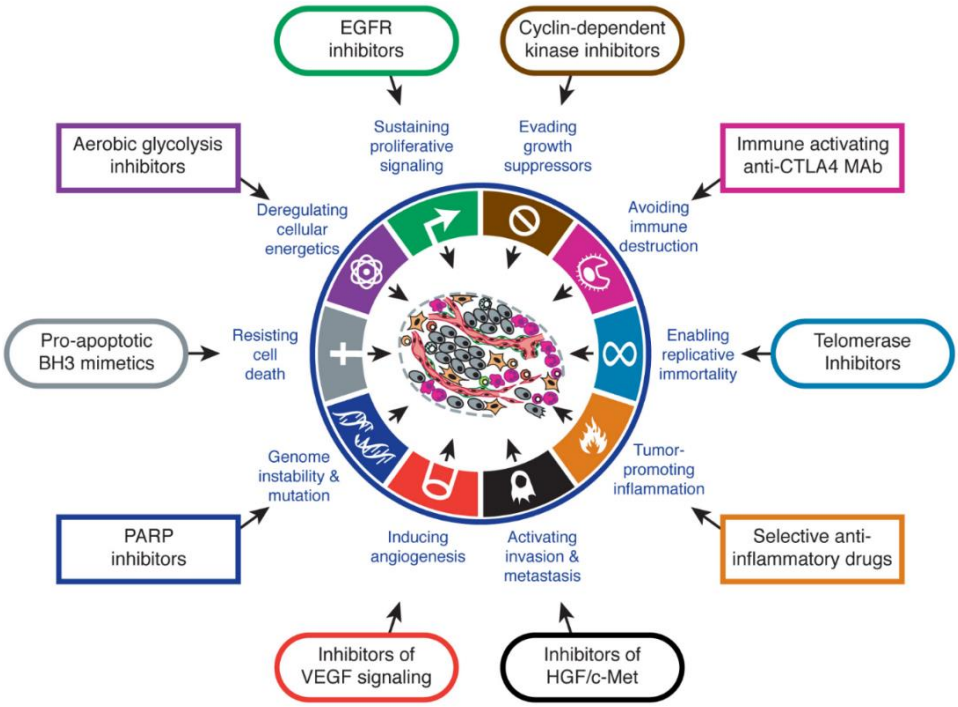
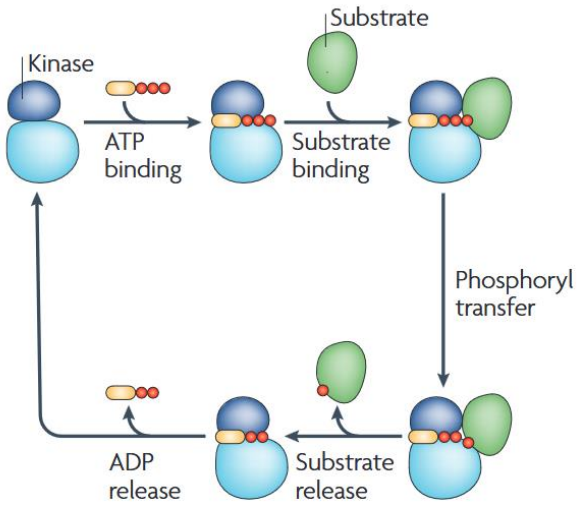


Figure IV-3 : Caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan & Weinberg en 2000 et en 2011 [289],[386].

La caractéristique la plus fondamentale des cellules malignes réside dans leur capacité à perpétuer une prolifération incontrôlée [289],[386],[387]. Dans les tissus sains, les voies de signalisation régulant le cycle cellulaire sont méticuleusement régulées, de manière à préserver l'homéostasie cellulaire, ainsi que l'architecture et la fonctionnalité tissulaires. Lorsque ces voies de signalisation sont perturbées, les cellules cancéreuses se divisent de manière anarchique et la prolifération cellulaire devient incontrôlable. La plupart des signaux d'activation impliquent des facteurs de croissance interagissant avec des récepteurs membranaires, comme les GPCR ou les protéines tyrosine kinase [388]. Les récepteurs membranaires vont être activés lors de la reconnaissance du facteur de croissance et ainsi activer des partenaires ou substrats en aval dans différentes voies de signalisation complexes impliquées dans différents processus biologiques, comme la croissance, la prolifération, le métabolisme, l'inflammation… [389],[390],[391].

IV.1.2. Les protéine kinases

Les protéine kinases forment une vaste famille d'enzymes dont l'activité catalytique consiste à transférer un groupe phosphate (PO_4^{3-}) depuis une molécule donneuse, en général l'ATP, et parfois l'ADP, sur des acides aminés spécifiques (souvent la sérine, la thréonine ou la tyrosine) dans des substrats protéiques [392] (Figure IV-4).



<u>Figure IV-4 :</u> Cycle catalytique de phosphorylation d'un substrat par une kinase : l'ATP se lie au site actif de la kinase. Le substrat se lie ensuite au site actif. Une fois lié, l'ATP est hydrolysée et le γ-phosphate de l'ATP (en rouge) est transféré à un résidu Ser, Thr ou Tyr du substrat. Après la phosphorylation, l'ADP et le substrat sont libérés de la kinase. [393].

Cette réaction de phosphorylation peut avoir une influence importante sur les propriétés physicochimiques de la protéine cible et ses interactions avec des partenaires ou régulateurs, sur sa fonction, son activité catalytique, sa localisation subcellulaire sa conformation ou sa stabilité [392],[394]. De fait, la phosphorylation représente l'un des mécanismes centraux de la transduction de signaux. Les cascades de phosphorylation sont générées par des voies de signalisation complexes, telles que la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) ou celle de PI3K/AKT, qui régulent des processus biologiques variés, parmi lesquels la prolifération, la survie, la différenciation et la mort cellulaire [395].

L'ensemble des kinases d'un organisme, regroupé sous le terme de « kinome », (Figure IV-5) témoigne de la diversité et de la spécificité fonctionnelle de ces enzymes : le génome humain code pour 518 protéine kinases, chacun de ces membres pouvant interagir avec différents partenaires et phosphoryler différents substrats, formant ainsi un réseau d'une complexité remarquable [392].

L'essor évolutif de ce réseau complexe de kinases a permis à la cellule de disposer d'une multitude de points de contrôle et de mécanismes de régulation, assurant une adaptation rapide et précise aux signaux extracellulaires et aux fluctuations de l'environnement intra et extra-cellulaire [388],[396],[397]. Cette finesse de régulation s'avère néanmoins à double tranchant, car toute dérégulation ou mutation affectant ces enzymes, y compris dans leur domaine catalytique ou dans leurs sites de régulation allostérique, peut entraîner des dysfonctionnements majeurs et est souvent associée à des pathologies humaines, dont de nombreux cancers [394] , malgré l'existence de mécanismes de compensation et de boucles de rétroaction [398],[399],[400],[401].

De plus, les protéine-kinases ont des fonctions centrales pour les mécanismes biologiques et sont fréquemment mutées ou hyperactivées dans les pathologies [396],[402],[403],[404]. Pour ces raisons, les kinases figurent parmi les cibles thérapeutiques de premier plan, et le développement d'inhibiteurs spécifiques de kinases s'est imposé comme l'une des stratégies clés pour la mise au point de traitements antitumoraux [404],[405],[406],[407],[408],[409],[410]. Ainsi, l'étude intégrée du kinome humain, couplée à l'analyse des voies de signalisation, est non seulement essentielle à la compréhension fine des mécanismes cellulaires, mais aussi à

l'identification de biomarqueurs, la découverte de nouveaux outils diagnostics et à l'élaboration de thérapies ciblées innovantes.

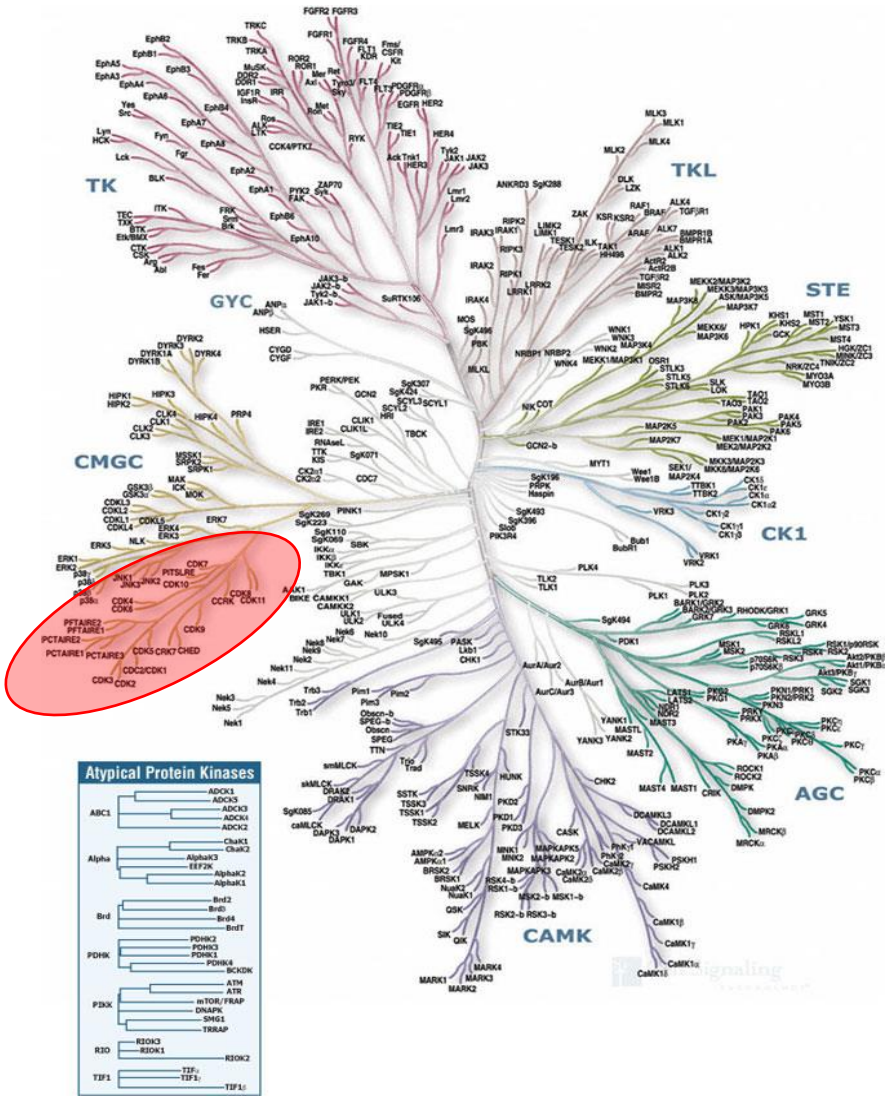
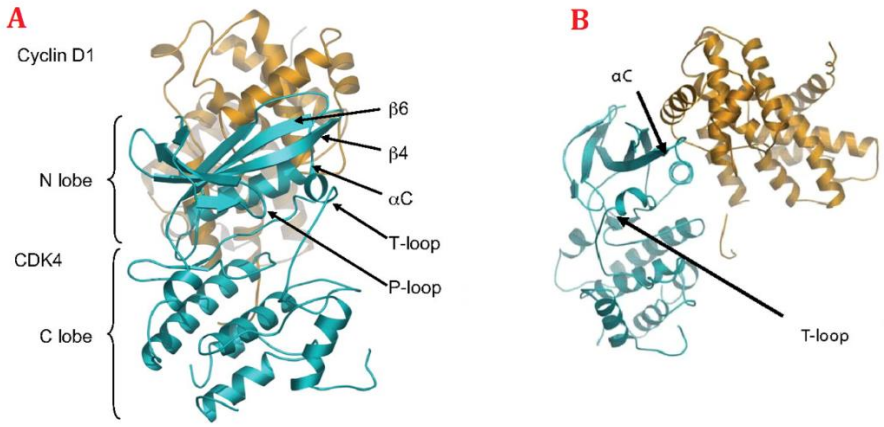


Figure IV-5 : Arbre du kinome humain, divisé en ces 7 sous-familles de kinases. Les CDK (mis en valeur en rouge) font partie de la sous-famille CMGC [411].

IV.2. CDK4/cycline D

IV.2.1. CDK4

CDK4 est une sérine/thréonine kinase de 34 kDa principalement activée pendant la phase G1 (Figure IV-6). Son niveau d'expression est généralement constant, comme pour toutes les CDKs, mais son activité dépend principalement de l'expression des cyclines D qui s'associent pour former un hétérodimère actif et de la présence de p16INK4 qui inhibe CDK4. [412],[413],[414].



<u>Figure IV-6 :</u> Structure de CDK4 (bleu)/Cycline D1 (orange), différentes vues [415].

IV.2.2. Cycline D

Il existe trois types de cyclines D exprimées dans les cellules humaines (D1, D2 et D3) [416]. Bien qu'issues de gènes distincts, leurs séquences en acides aminés présentent des similarités : la cycline D1 partage 62 % de similarité avec D2, et ces dernières présentent respectivement 51 % et 62 % de similarité avec D3. La cycline D1 est néanmoins la plus étudiée pour son rôle dans les cancers [417]. Comme dit précédemment, ces cyclines, généralement induites en réponse à des facteurs de croissance (EGF, FGF, TGF-α), s'accumulent en G1, activent CDK4 et CDK6, ce qui conduit à la phosphorylation de pRb, induisant ainsi l'entrée en cycle cellulaire [418],[419],[420],[421]. Leur expression est régulée par des voies de signalisation intracellulaires, telles que la voie Ras-Raf-MEK-ERK, PI3K/AKT/mTOR, ou encore Wnt/β-caténine [422],[423],[424].

IV.2.3. Le rôle de CDK4/cycline D dans le cycle cellulaire

Le complexe CDK4/cycline D contrôle la progression des cellules en phase G1 [421],[425]. Le mécanisme d'action de CDK4/cycline D est le suivant : une molécule d'Adénosine triphosphate (ATP) vient se lier à la poche ATP de CDK4. L'hydrolyse de l'ATP en ADP permet le transfert d'un groupement phosphate sur la protéine Rb. La phosphorylation de Rb va engendrer sa libération du facteur de transcription E2F. Cette dérépression de E2F permet sa fixation sur les promoteurs de gènes favorisant l'entrée en phase S, comme la cycline E (Figure IV-7) [426]. Il a été démontré que l'activation de pRb se faisait par mono-phosphorylation par CDK4/cycline D, et que CDK2/cycline E catalyse ensuite d'autres

phosphorylations, entre autres protéines induites par transcription E2F dépendante [427]. La cycline E s'associe à CDK2 et permet la phosphorylation de substrats impliqués dans la synthèse et la réplication de l'ADN pendant la phase S.

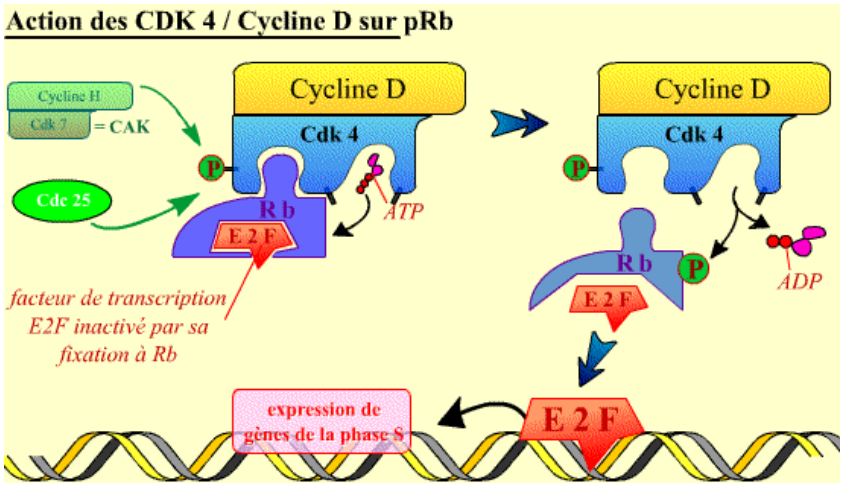


Figure IV-7 : Représentation schématique du processus d'activation de la transcription des gènes du cycle cellulaire par CDK4/Cycline D [428].

IV.2.4. Le rôle de CDK4/cycline D hors du cycle cellulaire

Outre son rôle dans le cycle cellulaire, CDK4/cycline D intervient dans d'autres processus physiologiques et pathologiques. Il participe au métabolisme cellulaire, notamment à la régulation de l'homéostasie du glucose et de la sensibilité à l'insuline. CDK4 intervient en effet dans la prolifération des cellules β-pancréatiques [429]. Si CDK4 n'est pas exprimée chez la souris, cela entraîne une diminution du nombre de cellules pancréatiques menant à un diabète insulino-dépendant. Il a été démontré que la voie CDK4-pRB-E2F1 était impliquée dans l'homéostasie du glucose par la régulation de l'expression de Kir6.2, un composant clé du canal KATP impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules β pancréatiques [430]. CDK4/Cycline D joue également un rôle dans l'adipogenèse, via l'activation de PPARγ, un facteur de transcription activé par ligand appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires [431]. De plus, E2F1 et Rb contrôlant la transition entre la prolifération préadipocytaire et la différenciation adipocytaire, l'inhibition de CDK4 entrave la différenciation et la fonction des adipocytes. La perturbation de CDK4 ou les mutations activatrices de CDK4 dans les fibroblastes embryonnaires primaires de souris entraînent respectivement une réduction et une augmentation du potentiel adipogénique de ces cellules [432].

Plus généralement, le couple CDK4/cycline D influence aussi les voies de signalisation associées à l'autophagie [433] et peut interagir avec des régulateurs du cytosquelette, notamment via la phosphorylation de protéines telles que le facteur RhoA ou les protéines associées aux microtubules comme la stathmine, affectant ainsi la dynamique des actines et des microtubules [434]. De plus, des études ont montré que CDK4 peut phosphoryler d'autres substrats que pRb, modulant l'activité de facteurs de transcription ou d'enzymes métaboliques, voire de protéines. Dans les cellules mammaires, CDK4 phosphoryle Smad3 sur Thr8/Thr178, ce qui inhibe la fixation ADN de Smad3, réprime la transcription de $p15^{INK4b}$ et lève le blocage cytostatique induit par TGF-β [435]. CDK4 cible aussi directement AMPK-α2 sur Ser377. Cette modification abolit l'activité AMPK, réduit l'oxydation des acides gras et oriente le métabolisme vers l'anabolisme et la lipogenèse [436]. De plus, CDK4 phosphoryle le facteur de fusion PAX3-FOXO1 (ARMS) et en accroît la stabilité ainsi que l'activité transcriptionnelle pro-tumorale [437]. Enfin, CDK4 phosphoryle MEP50, co-facteur de la méthyltransférase PRMT5 ; cette phosphorylation augmente l'activité PRMT5/MEP50, amplifie la diméthylation symétrique de H2A/H4-Arg3 et réprime des gènes suppresseurs de tumeurs, illustrant un contrôle épigénétique direct par CDK4 [438].

IV.2.5. CDK4/cycline D dans les cancers

Dans la majorité des cancers humains, on retrouve une altération directe ou indirecte du complexe CDK4/cycline D. En effet, l'altération par mutation de la voie $p16^{INK4a}$/CDK4/6-cycline D/pRb est l'un des événements les plus fréquents dans les cancers [406],[439],[440],[441],[442],[443]. Les mutations les plus communes concernent l'oncogène KRAS2 (90-95% des cas), codant pour la protéine GTPase KRAS [441], et le gène CDKN2A, codant pour la famille de protéines p16 [444]. KRAS2 est normalement inactivée, mais une seule mutation peut suffire à la rendre active et ainsi induire une cascade de signaux de croissance (Figure IV-8). Le gène CDKN2A, quant à lui, est un gène suppresseur de tumeur codant pour la famille de protéines INK4 ($p16/p14^{arf}$, p15, p18 et p19) [445],[446], qui inhibent CDK4 et CDK6 [442],[447]. L'inactivation de $p16^{INK4a}$, que ce soit par suppression, mutation ou hyperméthylation, conduit à l'activation constitutive de CDK4 dans de nombreux types de cancers, comme les mélanomes ou les cancers du poumon, mais CDK4 est aussi hyperactivée dans 90% des cancers pancréatiques [307].

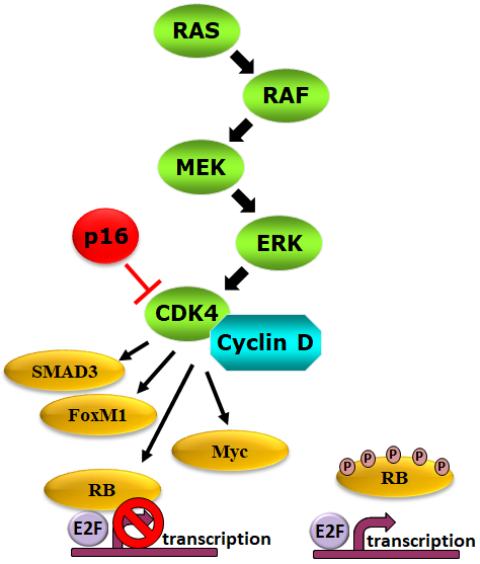


Figure IV-8 : Voie de signalisation RAS/RAF/MAPK/CDK4 [448].

Par ailleurs, la perte de pRb entraîne la libération non contrôlée des facteurs de transcription E2F, conduisant à l'activation aberrante de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire, notamment ceux impliqués dans la phase S et induisant une transcription incontrôlée et du cycle cellulaire [449]. À noter que, contrairement à d'autres cancers, Rb1 est rarement muté dans le cancer du pancréas. La perte de fonction de la voie Rb résulte surtout de l'hyperphosphorylation de pRb en aval de p16 et de la cycline D/CDK4/6. Des modèles précliniques confirment qu'une inactivation directe de Rb accélère la carcinogenèse pancréatique et accroît l'activité E2F [450],[451].

L'amplification de la cycline D1 contribue également au développement de cancers, et a été observée dans certains cancers du poumon [417], du sein [452], ou des neuroblastomes [453]. Dans le cancer du pancréas, cycline D1 est souvent surexprimée (60 à 85 % des cas). De véritables amplifications de cycline D1 existent mais ne concernent qu'un sous-ensemble de tumeurs (10 à 20 %), renforçant encore la poussée CDK4/6 [454],[455],[456].

IV.3. Inhibiteurs de CDK4/cycline D

La prise de conscience du rôle central de CDK4 et CDK6 dans la prolifération tumorale a conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs de CDK4/6 [457]. Les inhibiteurs de CDK4/6 ne sont pas efficaces en monothérapie et requièrent l'association avec d'autres types d'inhibiteurs [458],[459],[460]. On distingue deux types d'inhibiteurs pour

CDK4/cycline D : ceux qui ciblent la poche ATP et entrent en compétition avec l'ATP [445],[461], et ceux qui ciblent d'autres sites de la kinase [439],[462].

IV.3.1. Inhibiteurs ATP-compétitifs

La majorité des inhibiteurs de kinases développés et approuvés pour des applications en clinique sont des composés ATP-compétitifs, donc destinés à se lier à la poche ATP, bloquant ainsi l'activité catalytique des kinases et donc le transfert de phosphate de l'ATP sur des substrats [406]. Dans le cas de CDK4, ces inhibiteurs sont généralement de petites molécules de faible poids moléculaire, élaborées pour se lier à la poche ATP de la kinase.

Le Palbociclib (PD0332991, Figure IV-9A) fut le premier inhibiteur sélectif de CDK4 découvert et approuvé par la FDA, notamment pour le cancer du sein avancé RH+ / HER2- en combinaison avec des inhibiteurs de l'aromatase [459]. Il s'agit d'un inhibiteur de CDK4/6 [463] ayant démontré une activité antitumorale *in vitro* et *in vivo*, bien qu'inefficace en monothérapie. Son mécanisme implique une liaison directe au site ATP de CDK4/6, et bloquant la phosphorylation de la protéine pRb à une concentration de l'ordre du nanomolaire (CDK4 IC50 = 11 nM) et de CDK6 (IC50 = 16 nM), entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [463]. Ces valeurs correspondent à des tests biochimiques *in vitro* sur enzymes purifiées (sans cellules). En conditions cellulaires, la concentration nécessaire pour bloquer la phosphorylation de pRb est plus élevée : dans des lignées sensibles comme MCF-7, l'inhibition de pRb se produit avec des IC50 d'environ 150 nM [464].

Le palbociclib inhibe aussi la prolifération des cellules de carcinome mammaire MDA-MB-435 avec une IC50 de 0,16 µM. Une valeur similaire a été trouvée pour la lignée cellulaire de carcinome du colon Colo-205 (0,13 µM). *In vivo*, les doses thérapeutiques actives de Palbociclib administrées à des souris étaient de 12,5 - 37,5 - 75 et 150 mg/kg. Dans le cancer du pancréas (PDAC), le palbociclib inhibe la prolifération de plusieurs lignées Rb-positives avec des IC50 cellulaires à l'échelle du micromolaire : 2 µM dans PANC-1 et MIA PaCa-2, 5 µM à 72 h dans PANC-1 et COLO-357, et des valeurs plus basses rapportées pour AsPC-1 (0,25 µM) selon les contextes expérimentaux. Ces effets s'accompagnent d'une baisse de la phosphorylation de pRb et d'un arrêt en G1, mais l'efficacité varie fortement selon l'expression de pRb et des voies adaptatives. En préclinique, des synergies sont

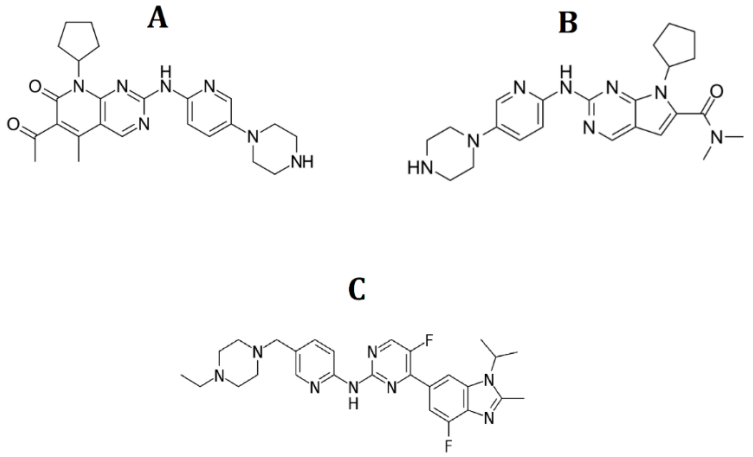
observées notamment avec des inhibiteurs de MEK ou l'autophagie. *In vivo*, des schémas actifs chez la souris vont de 12,5 à 150 mg/kg/j [465],[466],[467],[468].

Le Ribociclib (LEE011, Figure IV-9B) est également un inhibiteur « sélectif » de CDK4/6, qui a démontré des bénéfices cliniques lorsqu'associé avec des thérapies endocrines, car peu efficace en monothérapie, dans le traitement du cancer du sein localement avancé et/ou métastatique [469]. Le Ribociclib agit lui aussi par une compétition directe avec l'ATP au niveau de CDK4, diminuant la phosphorylation de Rb et freinant la progression du cycle cellulaire. Il inhibe CDK4 et CDK6 avec une IC50 de 10 nM et 39 nM, respectivement. Des études *in vitro* ont démontré que la croissance de 12 des 17 lignées cellulaires de neuroblastome étaient significativement altérées en réponse à l'inhibition de CDK4/6 [470]. Cliniquement, le ribociclib en monothérapie n'a pas montré d'efficacité probante dans le cancer du pancréas. Des essais précoces explorant des combinaisons ont confirmé la tolérance et une modulation pharmacodynamique de la voie CDK4/6, mais avec une activité antitumorale limitée et nécessitant une sélection plus fine des patients [471],[472].

L'Abemaciclib (LY2835219, Figure IV-9C) est un troisième inhibiteur sélectif de CDK4/6, au mécanisme d'action similaire au Palbociclib et au Ribociclib. L'Abemaciclib inhibe CDK4 et CDK6 avec des valeurs IC50 de 2 nM et 10 nM, respectivement. La prolifération de MDA-MB-361, une lignée cellulaire de cancer du sein, a été réduite de 50 % lorsqu'elle a été traitée avec LY2835219 [473]. Dans le cancer du pancréas, des IC50 cellulaires allant du nanomolaire au micromolaire sont rapportées selon le modèle et l'*endpoint*. *In vivo*, un traitement quotidien a réduit d'un facteur 3,2 le volume tumoral dans une xénogreffe MiaPaCa-2, avec baisse de pRb et Ki-67 (dose préclinique typique : 75 mg/kg/j) [474]. Comme pour les autres inhibiteurs de CDK4/6, la monothérapie montre des limites cliniques pour le cancer du pancréas : un essai de phase II adaptatif n'a pas apporté d'amélioration par rapport à la chimiothérapie standard chez des patients prétraités [475],[476]. À l'inverse, plusieurs travaux précliniques soutiennent des combinaisons rationnelles : l'inhibition ERK/MEK potentialise l'effet CDK4/6 (arrêt du cycle, sénescence, frein tumoral), et des synergies ont aussi été montrées avec des inhibiteurs de HuR/YAP1 (qui régulent cycline D1) ou encore avec l'inhibition de l'autophagie [322],[474],[477],[478].

L'efficacité et la toxicité du Palbociclib et du Ribociclib sont très similaires, mais le traitement par l'Abemaciclib entraîne généralement une suppression moindre de la moelle osseuse mais une augmentation de l'incidence et de la gravité des diarrhées [479]. En termes d'efficacité, les patientes atteintes d'un cancer du sein prétraité ont un taux de réponse plus élevé avec l'Abemaciclib en monothérapie qu'avec d'autres inhibiteurs sélectifs de CDK4/6 [480]. Parmi les trois inhibiteurs, l'Abemaciclib est l'inhibiteur le plus puissant pour CDK4, d'après des données provenant d'essais kinases in vitro [481].

De manière générale, la classe des inhibiteurs ATP-compétitifs de CDK4/6 se caractérisent par une toxicité tolérable, en comparaison aux normes actuelles, et une bonne efficacité clinique lorsqu'ils sont administrés en combinaison avec d'autres drogues anti-cancéreuses, en particulier dans le cancer du sein hormono-dépendant [481]. On note cependant l'apparition d'une résistance à long terme qui en réduisent l'efficacité [482]. Le Tableau IV-1 regroupe les effets néfastes de ces composés pour les patients.



<u>Figure IV-9 :</u> Structures chimiques des inhibiteurs ATP-compétitifs, A : Palbociclib (PD-0332991), B : Ribociclib (LEE011), C : Abemaciclib (LY2835219)

Malgré leurs succès initiaux, l'émergence de résistances aux inhibiteurs de CDK4 est rapportée dans divers modèles tumoraux [482],[483],[484],[485]. Des mécanismes de contournement, tels que la surexpression de CDK6, la délétion de pRb ou l'activation de voies de survie alternatives (PI3K/AKT/mTOR, MAPK, etc.) ont été mis en évidence [482], ainsi que des phénomènes de compensation où CDK2 prend le relais lorsque CDK4 est

inhibée [486],[487]. Cette résistance peut être initiale (résistance primaire) ou apparaître après une période de sensibilité (résistance acquise), soulignant la nécessité de stratégies thérapeutiques alternatives, avec des inhibiteurs qui ciblent d'autres régions que la poche ATP et des mécanismes d'action différents.

	Palbociclib (PD0332991)	**Ribociclib (LEE011)**	**Abemaciclib (LY2835219)**
Cibles et IC50	CDK4: 11 nM CDK6 : 16 nM	CDK4 : 10 nM CDK6 : 39 nM	CDK4 : 2 nM CDK6 : 10 nM
Indication clinique principale	Cancer du sein RH+ / HER2- en combinaison avec inhibiteurs de l'aromatase	Cancer du sein localement avancé/métastatique en association avec thérapies endocrines	Cancer du sein prétraité, plus efficace en monothérapie
Essais cliniques en phase III	Cancer du poumon	/	Cancer du poumon
Doses prescrites	125 mg/jour	900 mg/jour	400 mg/jour
Efficacité en monothérapie	Faible	Faible	Supérieure aux autres inhibiteurs
Toxicité principale	Suppression de la moelle osseuse	Suppression de la moelle osseuse	Moins de suppression médullaire, mais plus de diarrhées
Efficacité dans le cancer du pancréas	Faible en monothérapie (arrêt de cycle cytostatique). Signaux précliniques de synergie en combinaison (surtout avec MEK/ERK ou autophagie). Essais cliniques dédiés encore limités.	Faible en monothérapie. Combinaisons explorées (ribociclib + everolimus ou ribociclib + tramétinib) montrant modulation pharmacodynamique mais activité clinique modeste à ce jour.	Faible en clinique : un phase II chez PDAC métastatique prétraité n'a pas amélioré DCR/PFS vs SOC. Signaux précliniques de synergie (p. ex. avec HuR/YAP1, épigénétique, MEK/autophagie).

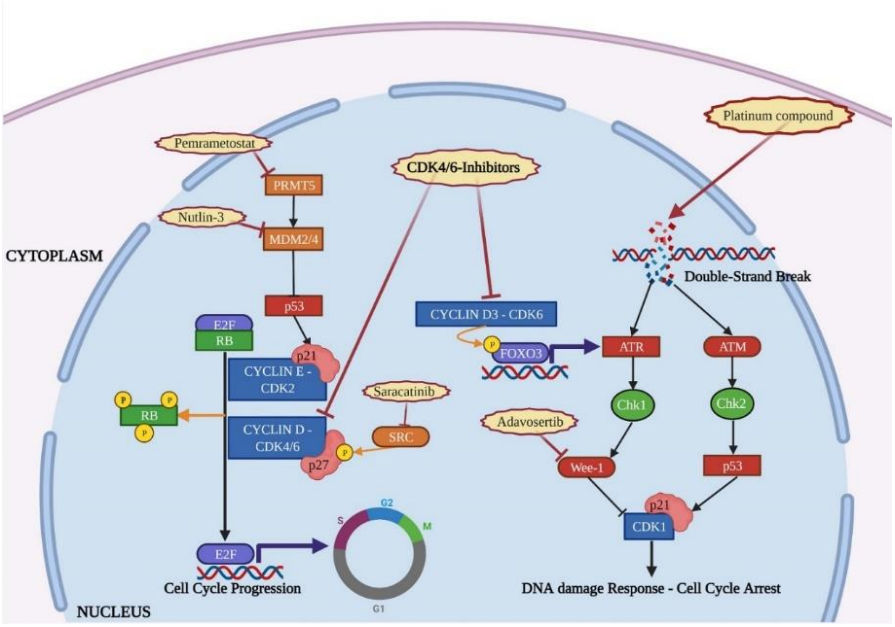
Tableau IV-1 : Tableau récapitulatif de l'état de test clinique pour le Palbociclib, le Ribociclib et l'Abemaciclib

[459],[463],[469],[470],[473],[479],[480],[481],[482],[488],[489]

IV.3.2. Stratégies combinatoires

Depuis l'approbation clinique des inhibiteurs ATP compétitifs, on a démontré qu'environ 30 % des cancers du sein sont intrinsèquement résistants aux inhibiteurs de CDK4/6 et qu'un traitement prolongé conduit finalement à une résistance acquise chez de nombreuses patientes [490]. La coopération entre les inhibiteurs de CDK4/6 et la thérapie endocrine a été un succès dans le cancer du sein [491].

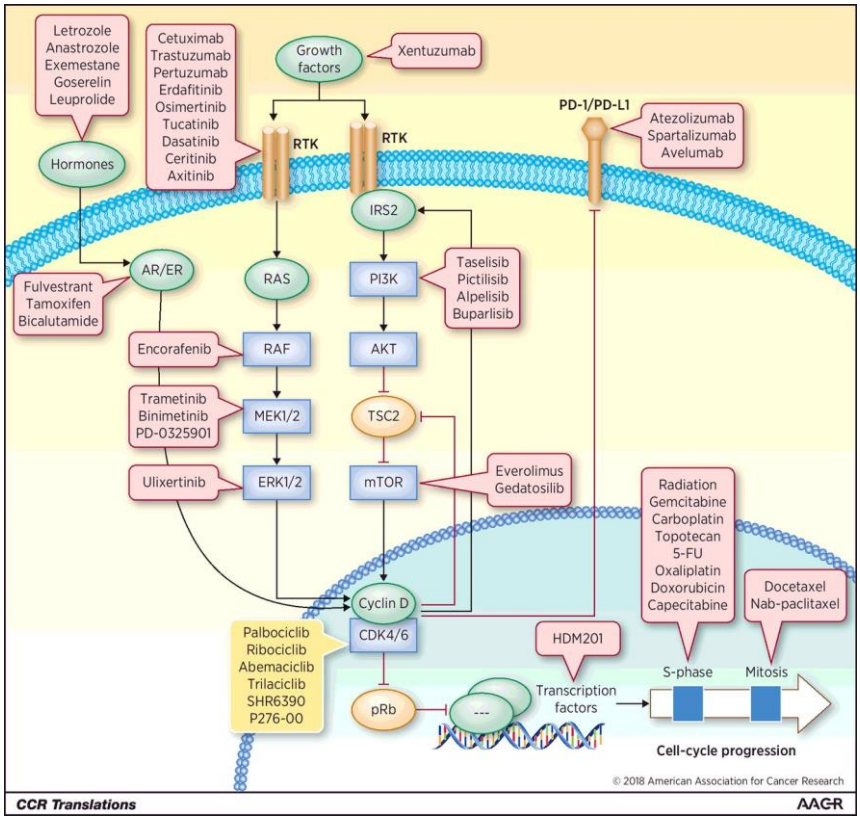
La combinaison d'inhibiteurs de CDK4 et d'agents cytotoxiques a aussi été démontrée faisable et efficace si elle est administrée dans la séquence de temps appropriée. Par exemple, l'administration séquentielle de carboplatine suivie de Palbociclib entraînait une destruction synergique des cellules cancéreuses ovariennes, alors que ce n'était pas le cas lorsque Palbociclib était administré avec ou avant le carboplatine [492]. (Figure IV-10)



<u>Figure IV-10 :</u> Principaux mécanismes d'action combinatoires des inhibiteurs de CDK4/6 et de la chimiothérapie cytotoxique. Les mécanismes de résistance à CDK4/6-i (orange) et les stratégies thérapeutiques pour les surmonter (rouge) sont décrits [490].

De même, l'administration des inhibiteurs de CDK après des agents antimitotiques, comme les taxanes, empêche la récupération cellulaire dans différents modèles de cancer du pancréas [434]. Lorsque qu'ils étaient administrés après les taxanes, non seulement les inhibiteurs CDK n'interféraient pas avec l'entrée mitotique, mais ils empêchaient

également l'expression de PARP induite par E2F, conduisant à une répression du mécanisme de réparation de l'ADN et à des dommages persistants à l'ADN, même après suspension des taxanes [493]. Les inhibiteurs de CDK peuvent même prévenir la cytotoxicité induite par la chimiothérapie dans les tissus normaux hautement prolifératifs qui abritent une voie Rb intacte. En effet, les cellules progénitrices hématopoïétiques sont très sensibles aux agents génotoxiques et leur épuisement (myélosuppression) représente un effet indésirable majeur de nombreuses thérapies conventionnelles, telles que les rayonnements ionisants et le 5-fluoro-uracile. En allongeant la phase G1 du cycle cellulaire, l'administration des inhibiteurs de CDK atténue la toxicité induite par les dommages à l'ADN et protège les cellules hématopoïétiques [494],[495]. D'autres combinaisons sont à l'étude, comme avec les voies de signalisation Ras-MEK-ERK ou PI3K-Akt-mTOR [321],[490]. La Figure IV-11 montre différentes stratégies de combinaison possibles avec les inhibiteurs de CDK4/6.



<u>Figure IV-11 :</u> Différentes stratégies de combinaison possibles entre les inhibiteurs de CDK4/6 (jaune) d'autres inhibiteurs (rouge) [321].

V. Applications médicales des nanotubes de carbone

V.1. Adsorption d'agents thérapeutiques sur CNT

Les avancées récentes, aussi bien *in silico* qu'expérimentales, ont renforcé la compréhension des mécanismes d'adsorption d'agents thérapeutiques à visée anticancéreuse sur des CNT, tout en comparant les performances entre CNT vierges et fonctionnalisés (CNT-f).[496].

Dehneshin et al. ont étudié l'antagoniste multikinase sorafenib, actif sur VEGFR et BRAF. La dynamique moléculaire révèle que la fonctionnalisation latérale par la valine ou la phénylalanine fait chuter l'énergie de van der Waals à près de -120 kcal.mol^{-1}, l'agent thérapeutique se stabilisant par empilement aromatique et ponts hydrogène répartis le long de la paroi. La densité et la position des motifs amino-acides pilotent le degré d'encapsulation et suggèrent des stratégies rationnelles de design [497].

Rezazade et al. ont démontré que l'inhibiteur de tyrosine-kinase imatinib s'adsorbe fortement sur un SWNT *zigzag* (9,0) long de 17,08 Å (rayon 3,61 Å). Il s'agit d'une molécule ciblant de façon sélective l'oncoprotéine BCR-ABL1 ainsi que les récepteurs c-Kit et PDGFR fréquemment surexprimés dans les leucémies myéloïdes chroniques et les tumeurs stromale gastro-intestinales. Après optimisation DFT, l'énergie de liaison dans le vide atteint -58,6 kcal mol^{-1} via un empilement π-π avec la paroi graphitique, tandis que des nanotubes fonctionnalisés -OH ou -COOH fixent l'agent thérapeutique par ponts hydrogène sur le carbonyle ou l'azote pyridinique avec des énergies de liaison de -26,3 et -16,5 kcal mol^{-1} respectivement, préservant la structure de la drogue. Les simulations Monte-Carlo en solution aqueuse montrent que seul le complexe imatinib/CNT-OH ou CNT-COOH possède une énergie libre d'association négative, alors que le complexe avec le tube non fonctionnalisé devient non spontané, ce basculement étant gouverné par une contribution électrostatique accrue. Le ΔG de l'imatinib passe de -27,2 à plus de -39 kcal mol^{-1} dans les complexes, traduisant une hydrophilie renforcée et donc une biodisponibilité potentiellement supérieure. La densité radiale de l'eau indiquant une dispersion colloïdale améliorée. L'ensemble de ces résultats suggère que la vectorisation d'imatinib par CNT carboxylés ou hydroxylés pourrait permettre un transport stable dans le sang et une libération facilitée dans le micro-environnement tumoral [498].

Une étude *in silico* sur le chargement et la libération de molécules à différents pH s'est focalisée soit sur la Doxorubicine, soit sur le PTX, chargés sur un SWNT-ƒ-carboxylé associé à un polymère de triméthylchitosane (TMC) [118]. Les auteurs ont mis en évidence que la charge positive du TMC facilite la libération de la Doxorubicine dans un environnement légèrement acide, comme celui des tumeurs, et renforce les liaisons hydrogène en milieu acide ou neutre, comme dans le sang. La Doxorubicine s'adsorbe avec succès sur les ƒ-SWNT, et la meilleure compatibilité aqueuse a été observée pour le PAX sur un ƒ-tube au pH sanguin, suggérant que des polymères sensibles au pH conviennent pour véhiculer ce médicament. Selon leurs modèles de cinétique, la libération de la Doxorubicine est régie par une diffusion de type Fick.

Une analyse en dynamique moléculaire et métadynamique a été réalisée pour étudier la fixation de la Doxorubicine sur un nanotube vierge (16,16) en présence ou non d'un peptide pénétrant dans la cellule, le poly(L-histidine) (PLH) [499]. Le nanohybride DOX-CNT-PLH s'adsorbe sur la membrane phosphatidylcholine (POPC) à pH neutre, mais non en milieu acide, du fait d'une forte interaction CNT-médicament. Les auteurs suggèrent que cela pourrait en faire un vecteur thérapeutique "intelligent". En effet, la présence du peptide en surface renforce la capacité de chargement via une interaction de type Lennard-Jones et favorise un relargage plus avantageux à pH acide.

Des SWNT conjugués à l'acétylcholine (Ach) ont été développés pour administrer de l'Ach dans le cerveau de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer [500]. Dans ce système de relargage de neurotransmetteur, les SWNT avec Ach adsorbée pénètrent dans les lysosomes où l'Ach est libérée puisque le pH est acide. Les résultats ont montré que les SWNT chargés d'Ach amélioraient les capacités d'apprentissage et de mémoire des souris atteintes de la maladie d'Alzheimer. Ces études suggèrent que les nanotubes de carbone constituent des vecteurs pour l'administration et le relargage de biomolécules dans le système nerveux, même en étant introduits par injection systémique.

V.2. Relargage contrôlé

D'autres nanosystèmes à base de CNT sont développés en associant plusieurs groupements de surface pour renforcer l'hydrophilie, la biodisponibilité, la

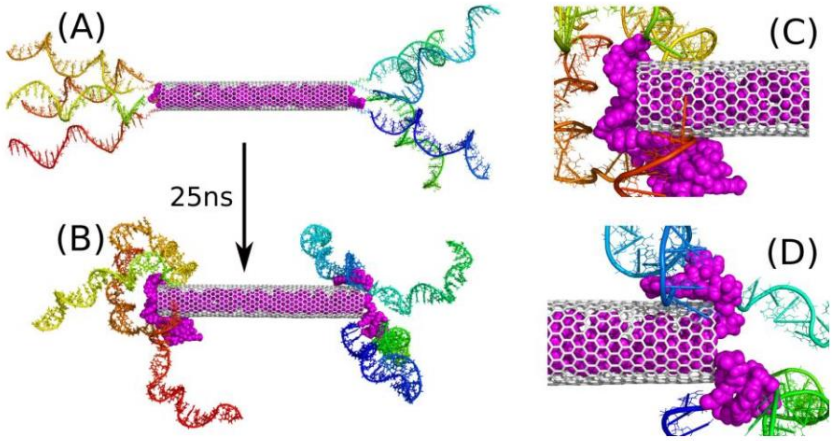
biocompatibilité et la libération contrôlée du médicament dans les dispositifs intelligents d'administration.

De nombreuses études se concentrent sur un transport contrôlable ou stimulable d'agents thérapeutiques, basé sur divers paramètres sensibles aux stimuli. *Madani et al.* ont proposé un système implantable, activable par voie optique, constitué de nanotubes (9,4) enveloppés d'ADN et incorporés à des liposomes dans un hydrogel d'alginate 3D. Le dispositif exploite les propriétés optiques et électroniques singulières des nanotubes semi-conducteurs dans le proche infrarouge (NIR). La libération du médicament peut être déclenchée par l'application externe d'un laser NIR en résonance avec une entité sensible au stimulus, provoquant un changement physique ou chimique dans la portion support. Les liposomes, quant à eux, offrent une grande souplesse (compatibles avec des molécules hydrophiles ou hydrophobes), une biocompatibilité et une grande marge d'ajustement. Les tests *in vitro* sur des macrophages RAW 264.7 indiquent une faible toxicité pour ce système. Il a été démontré que la libération de la charge médicamenteuse peut être déclenchée par une stimulation laser NIR réglée sur la résonance optique d'une espèce particulière de SWNT. Il a également été démontré que la quantité de charge libérée peut être ajustée en modifiant la durée de la stimulation NIR. Ce système permet de contrôler de l'extérieur l'administration d'une charge médicamenteuse. [501].

Un complexe de relargage de Doxorubicine ciblé a par exemple été imaginé pour reconnaître spécifiquement les cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur du mannose (par exemple dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2) [502]. Le système comprend des SWNT ƒ-carboxylés, reliés par liaisons covalentes via un groupe acide labile au mannose (Man, un agent de ciblage des récepteurs Man) et conjugués à la Doxorubicine. Les auteurs ont également mis en évidence le caractère déclenché par le pH de la libération de la Doxorubicine.

Par ailleurs, l'étude d'un système non covalent, constitué de SWNT (12,12) marqués par le tryptophane (Trp) ou l'acide folique (FA), ou une combinaison des deux, a mis en évidence un comportement de libération et d'adsorption pH-dépendant en milieu neutre et acide, ainsi qu'un état de protonation variant avec la Doxorubicine [503].

Une autre contribution basée sur des simulations de dynamique moléculaire et une analyse fine des énergies d'interaction a été proposée par *Wolski et al.* [504]. Ceux-ci ont conçu un système sophistiqué fondé sur l'utilisation de nanotubes de carbone fonctionnalisés de manière covalente par des oligonucléotides riches en cytosine à leurs extrémités. Dans cette configuration, des fragments d'ADN monocaténaires, attachés aux extrémités du nanotube via des liaisons peptidiques, servent de matrices dynamiques pour la capture et la libération contrôlée de la Doxorubicine encapsulée. À pH neutre, ces oligonucléotides adoptent principalement une conformation désordonnée, optimisant les interactions intercalatives entre les bases cytosines et les molécules de Doxorubicine. Cette intercalation multiple, renforcée par des interactions de dispersion et électrostatiques, conduit à une forte stabilisation du complexe, empêchant toute libération spontanée du médicament sous conditions physiologiques standards. Ainsi, la Doxorubicine est efficacement piégée, conférant au dispositif une capacité de stockage sûre et prolongée. En revanche, sous l'effet d'une diminution du pH, situation typique du microenvironnement tumoral ou du milieu endosomal, les fragments d'ADN subissent une protonation partielle induisant leur repliement. Cette transition structurale est accompagnée d'une réduction drastique des interactions stabilisatrices entre la Doxorubicine et l'ADN, notamment par diminution de la surface d'intercalation et par modification des forces électrostatiques. Par conséquent, la doxorubicine est progressivement désencapsulée et libérée dans le milieu environnant. La Figure V-1 montre le calcul de ce relargage, en particulier les Figures V- 1c et V-1d.



<u>Figure V-1 :</u> (A) : Etat initial du système avec toutes les molécules de Doxorubicine (en magenta) encapsulées, (B) : état du système après 25 ns de simulation, (C) : section agrandie de l'extrémité gauche de (B), (D) : section agrandie de l'extrémité droite de (B)

Par ailleurs, l'intégration d'une couche de nanoparticules de Fe_3O_4 sur des MWNT recouverts de Doxorubicine provoque une libération prolongée, prolongeant le temps d'administration et limitant ainsi la fréquence d'injection. Dans cette configuration contrôlée magnétiquement, la prolifération bactérienne (Gram-négatif/Gram-positif, Escherichia coli et Bacillus subtilis) est également inhibée, même à faible dose, tout en améliorant la biodisponibilité du principe actif [505].

Enfin, *Gangrade et al.* ont élaboré un hydrogel injectable renfermant des CNT fonctionnalisés par l'acide folique (ƒ-FA–CNT) pour véhiculer la Doxorubicine, accroître sa biodisponibilité vis-à-vis des cellules ciblées et atténuer la toxicité dans des cellules non visées, grâce à une administration intratumorale localisée [506]. À pH acide, caractéristique du microenvironnement tumoral, l'activation par irradiation NIR déclenche une libération continue du SWNT-FA-DOX sur une durée de 14 jours, internalisé par les cellules FR+ve puis entraînant l'apoptose. Les liaisons hydrogène et électrostatiques entre le SWNT-FA et la Doxorubicine sont affaiblies par la température élevée, stimulant la libération de l'agent thérapeutique. Ces travaux soulignent le potentiel d'un implant intratumoral prolongé, ciblé et déclenché par des stimuli externes pour l'administration de la Doxorubicine, afin de réduire les complications associées au traitement du cancer.

Le Tableau V-1 suivant récapitule tous les exemples vus ci-dessus.

	Composé thérapeutique	**Autres agents**	**Application**	**Réf.**
Support d'adsorption	Imatinib	SWNT –OH ou –COOH (améliore dispersion & biodisponibilité)	Ciblage BCR-ABL1, c-Kit, PDGFR	[498]
	Sorafenib	Fonctionnalisation valine ou phénylalanine	Ciblage VEGFR & BRAF	[497]
	Paclitaxel	SWNT carboxylé + polymère TMC	Ciblage tumoral (libération pH-dépendante)	[118]

	Doxorubicine	SWNT carboxylé + polymère TMC	Ciblage tumoral (libération pH-dépendante)	[118]
Système ciblé libérable	Doxorubicine	SWNT fonctionnalisé mannose	Cancer hépatique (HepG2)	[502]
Système hydrogel injectable ciblé	Doxorubicine	SWNT fonctionnalisé acide folique (ƒ-FA–CNT)	Traitement localisé + NIR	[506]
Support intelligent	Doxorubicine	SWNT + poly(L-histidine) (PLH)	Ciblage intelligent par pH	[499]
Système pH-sensible	Doxorubicine	SWNT fonctionnalisé Trp/FA	Libération pH-dépendante	[503]
Système ADN	Doxorubicine	SWNT + ADN riches en cytosine	Libération pH-dépendante	[504]
Support magnétique ciblé	/	SWNT-acide folique + nanoparticules magnétiques	Ciblage ganglions (thérapie tumorale)	[507], [508]

Tableau V-1 : récapitulatif de différents médicaments vectorisés par nanotubes de carbone pour diverses applications et dans diverses structures de complexes.

[1] Marty, B. The origins and concentrations of water, carbon, nitrogen and noble gases on Earth. *Earth and Planetary Science Letters* **2012**, 313–314, 56–66.

[2] Atkins, P.; Paula, J. D.; and Keeler, J. Atkins' Physical Chemistry. Oxford University Press: 2022.

[3] Tiwari, S. K. , Kumar, V. , Huczko, A. , Oraon, R. , Adhikari, A. D. , and Nayak, G. C. Magical Allotropes of Carbon: Prospects and Applications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **2016**, 41, 257–317.

[4] Farmani, Z. , Vetere, A. , Pfänder, N. , Lehmann, C. W. , and Schrader, W. Naturally Occurring Allotropes of Carbon. *Analytical Chemistry* **2024**, 96, 2968–2974.

[5] [PDF] Carbon-Carbon bonds: Hybridization | Semantic Scholar. https://www.semanticscholar.org/paper/Carbon-Carbon-bonds%3A-Hybridization-Peschel/8e2abf21e2a0f7ee5ffd81cad1f6f956c2290dda (accessed Jan. 26, 2025).

[6] XXIII.—Charred Coal, with Graphite, and Discovery of Diamonds in the Graphite at Craigman, New Cumnock | Transactions of the Geological Society of Glasgow. https://www.lyellcollection.org/doi/abs/10.1144/transglas.10.2.257 (accessed Jan. 27, 2025).

[7] Kroto, H. W. , Heath, J. R. , O'Brien, S. C. , Curl, R. F. , and Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318, 162–163.

[8] Smalley, R. E. Discovering the fullerenes. *Reviews of Modern Physics* **1997**, 69, 723–730.

[9] Rahmati, S. , Doherty, W. , Amani Babadi, A. , Akmal Che Mansor, M. S. , Julkapli, N. M. , Hessel, V. , and Ostrikov, K. (Ken) Gold–Carbon Nanocomposites for Environmental Contaminant Sensing. *Micromachines* **2021**, 12, 719.

[10] Buseck, P. R. , Tsipursky, S. J. , and Hettich, R. Fullerenes from the Geological Environment. *Science* **1992**, 257, 215–217.

[11] Endo, M.; Strano, M. S.; and Ajayan, P. M. Potential Applications of Carbon Nanotubes. *In Carbon Nanotubes*; Jorio, A., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M. S., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 111, , pp. 13–62.

[12] Synthesis and physical properties of barrelene, a unique Moebius-like molecule. https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01037a024 (accessed Jan. 27, 2025).

[13] Monthioux, M. and Kuznetsov, V. L. Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? *Carbon* **2006**, 44, 1621–1623.

[14] Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354, 56–58.

[15] Iijima, S. and Ichihashi, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **1993**, 363, 603–605.

[16] Geim, A. K. and Novoselov, K. S. The rise of graphene. *Nature Materials* **2007**, 6, 183–191.

[17] Xu, X. , Ray, R. , Gu, Y. , Ploehn, H. J. , Gearheart, L. , Raker, K. , and Scrivens, W. A. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 12736–12737.

[18] El-Shafey, A. M. Carbon dots: Discovery, structure, fluorescent properties, and applications. *Green Processing and Synthesis* **2021**, 10, 134–156.

[19] Ugarte, D. Curling and closure of graphitic networks under electron-beam irradiation. *Nature* **1992**, 359, 707–709.

[20] Lucherelli, M. A. , Stiegler, L. M. S. , Steiger, F. , Åhlgren, E. H. , Requena-Ramírez, J. , Castro, E. , Echegoyen, L. , Hirsch, A. , Peukert, W. , Kotakoski, J. , Walter, J. , Pérez-Ojeda, M. E. , and Abellán, G. Carbon nano-onions: Individualization and enhanced water dispersibility. *Carbon* **2024**, 218, 118760.

[21] Iijima, S. , Yudasaka, M. , Yamada, R. , Bandow, S. , Suenaga, K. , Kokai, F. , and Takahashi, K. Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns. *Chemical Physics Letters* **1999**, 309, 165–170.

[22] Fujita, M. , Wakabayashi, K. , Nakada, K. , and Kusakabe, K. Peculiar Localized State at Zigzag Graphite Edge. *Journal of the Physical Society of Japan* **1996**, 65, 1920–1923.

[23] Nakada, K. , Fujita, M. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Edge state in graphene ribbons: Nanometer size effect and edge shape dependence. *Physical Review B* **1996**, 54, 17954–17961.

[24] Novoselov, K. S. , Geim, A. K. , Morozov, S. V. , Jiang, D. , Zhang, Y. , Dubonos, S. V. , Grigorieva, I. V. , and Firsov, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* **2004**, 306, 666–669.

[25] Dresselhaus, M. S. and Dresselhaus, G. Intercalation compounds of graphite. *Advances in Physics* **2002**, 51, 1–186.

[26] Nakajima, T. and Matsuo, Y. Formation process and structure of graphite oxide. *Carbon* **1994**, 32, 469–475.

[27] Physics of graphite.

[28] Baskin, Y. and Meyer, L. Lattice Constants of Graphite at Low Temperatures. *Physical Review* **1955**, 100, 544–544.

[29] Heyrovska, R. The Coulombic Nature of the van der Waals Bond Connecting Conducting Graphene Layers in Graphite. *Graphene* **2016**, 5, 35–38.

[30] Robertson, J. Amorphous carbon. *Advances in Physics* **1986**, 35, 317–374.

[31] Telling, R. H. , Ewels, C. P. , El-Barbary, A. A. , and Heggie, M. I. Wigner defects bridge the graphite gap. *Nature Materials* **2003**, 2, 333–337.

[32] Bettinger, H. F. Carbon Nanotubes—Basic Concepts and Physical Properties. By S. Reich, C. Thomsen, J. Maultzsch. *ChemPhysChem* **2004**, 5, 1914–1915.

[33] Nelson, J. B. and Riley, D. P. The thermal expansion of graphite from 15°c. to 800°c.: part I. Experimental. *Proceedings of the Physical Society* **1945**, 57, 477.

[34] Bundy, F. P. Direct Conversion of Graphite to Diamond in Static Pressure Apparatus. *The Journal of Chemical Physics* **1963**, 38, 631–643.

[35] Harris, P. J. F. Carbon Nanotube Science: Synthesis, Properties and Applications. Cambridge University Press: 2009.

[36] Terrones, M. Science and Technology of the Twenty-First Century: Synthesis, Properties, and Applications of Carbon Nanotubes. *Annu. Rev. Mater.Res* **2003**, 13, 419–501.

[37] Rao, C. N. R. , Satishkumar, B. C. , Govindaraj, A. , and Nath, M. Nanotubes. *ChemPhysChem* **2001**, 2, 78–105.

[38] Saitō, R. Physical properties of carbon nanotubes. London : Imperial College Press: 1998.

[39] Bachilo, S. M. , Strano, M. S. , Kittrell, C. , Hauge, R. H. , Smalley, R. E. , and Weisman, R. B. Structure-Assigned Optical Spectra of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 298, 2361–2366.

[40] Carbon Nanotubes. Springer: Berlin, Heidelberg 2001.

[41] Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg 2008.

[42] Endo, M. , Muramatsu, H. , Hayashi, T. , Kim, Y. A. , Terrones, M. , and Dresselhaus, M. S. 'Buckypaper' from coaxial nanotubes. *Nature* **2005**, 433, 476–476.

[43] Thess, A. , Lee, R. , Nikolaev, P. , Dai, H. , Petit, P. , Robert, J. , Xu, C. , Lee, Y. H. , Kim, S. G. , Rinzler, A. G. , Colbert, D. T. , Scuseria, G. E. , Tománek, D. , Fischer, J. E. , and Smalley, R. E. Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. *Science* **1996**, 273, 483–487.

[44] Peigney, A. , Laurent, Ch. , Flahaut, E. , Bacsa, R. R. , and Rousset, A. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon* **2001**, 39, 507–514.

[45] Lee, C. J. and Park, J. Growth model of bamboo-shaped carbon nanotubes by thermal chemical vapor deposition. *Applied Physics Letters* **2000**, 77, 3397–3399.

[46] Endo, M. , Kim, Y. A. , Hayashi, T. , Yanagisawa, T. , Muramatsu, H. , Ezaka, M. , Terrones, H. , Terrones, M. , and Dresselhaus, M. S. Microstructural changes induced in "stacked cup" carbon nanofibers by heat treatment. *Carbon* **2003**, 41, 1941–1947.

[47] Merkulov, I. A. , Meleshko, A. V. , Wells, J. C. , Cui, H. , Merkulov, V. I. , Simpson, M. L. , and Lowndes, D. H. Two growth modes of graphitic carbon nanofibers with herring-bone structure. *Physical Review B* **2005**, 72, 045409.

[48] Point, S. Synthèse par PECVD et caractérisation de nanotubes de carbone orientés. 2005.

[49] Qin, L.-C. Determination of the chiral indices (n,m) of carbon nanotubes by electron diffraction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 31–48.

[50] Hamada, N. , Sawada, S. , and Oshiyama, A. New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules. *Physical Review Letters* **1992**, 68, 1579–1581.

[51] Boumia, L. , Zidour, M. , Benzair, A. , and Tounsi, A. A Timoshenko beam model for vibration analysis of chiral single-walled carbon nanotubes. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2014**, 59, 186–191.

[52] Saito, R. , Fujita, M. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Electronic structure of chiral graphene tubules. *Applied Physics Letters* **1992**, 60, 2204–2206.

[53] Ando, T. Theory of Electronic States and Transport in Carbon Nanotubes. *Journal of the Physical Society of Japan* **2005**, 74, 777–817.

[54] Arnold, M. S. , Green, A. A. , Hulvat, J. F. , Stupp, S. I. , and Hersam, M. C. Sorting carbon nanotubes by electronic structure using density differentiation. *Nature Nanotechnology* **2006**, 1, 60–65.

[55] Vyatskikh, A. Transparent and Conductive Hybrid Graphene/Carbon Nanotube Films, 07/2015.

[56] Kim, J.-E. , Lim, H.-T. , Minai-Tehrani, A. , Kwon, J.-T. , Shin, J.-Y. , Woo, C.-G. , Choi, M. , Baek, J. , Jeong, D. H. , Ha, Y.-C. , Chae, C.-H. , Song, K.-S. , Ahn, K.-H. , Lee, J.-H. , Sung, H.-J. , Yu, I.-J. , Beck, G. R. , and Cho, M.-H. Toxicity and clearance of intratracheally administered multiwalled carbon nanotubes from murine lung. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **2010**, 73, 1530–1543.

[57] Zhao, X. and Liu, R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environment International* **2012**, 40, 244–255.

[58] Kagan, V. E. , Tyurina, Y. Y. , Tyurin, V. A. , Konduru, N. V. , Potapovich, A. I. , Osipov, A. N. , Kisin, E. R. , Schwegler-Berry, D. , Mercer, R. , Castranova, V. , and Shvedova, A. A. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicology Letters* **2006**, 165, 88–100.

[59] Sgobba, V. and Guldi, D. M. Carbon nanotubes—electronic/electrochemical properties and application for nanoelectronics and photonics. *Chemical Society Reviews* **2008**, 38, 165–184.

[60] Hirsch, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 1853–1859.

[61] Bahr, J. L. and Tour, J. M. Covalent chemistry of single-wall carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry* **2002**, 12, 1952–1958.

[62] Niyogi, S. , Hamon, M. A. , Hu, H. , Zhao, B. , Bhowmik, P. , Sen, R. , Itkis, M. E. , and Haddon, R. C. Chemistry of single-walled carbon nanotubes. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, 1105–1113.

[63] Tasis, D. , Tagmatarchis, N. , Georgakilas, V. , and Prato, M. Soluble Carbon Nanotubes. *Chemistry – A European Journal* **2003**, 9, 4000–4008.

[64] Tasis, D. , Tagmatarchis, N. , Bianco, A. , and Prato, M. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews* **2006**, 106, 1105–1136.

[65] Singh, P. , Campidelli, S. , Giordani, S. , Bonifazi, D. , Bianco, A. , and Prato, M. Organic functionalisation and characterisation of single-walled carbon nanotubes. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 2214–2230.

[66] Bianco, A. , Kostarelos, K. , and Prato, M. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chemical Communications* **2011**, 47, 10182–10188.

[67] O'Connell, M. J. , Bachilo, S. M. , Huffman, C. B. , Moore, V. C. , Strano, M. S. , Haroz, E. H. , Rialon, K. L. , Boul, P. J. , Noon, W. H. , Kittrell, C. , Ma, J. , Hauge, R. H. , Weisman, R. B. , and Smalley, R. E. Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 297, 593–596.

[68] Richard, C. , Balavoine, F. , Schultz, P. , Ebbesen, T. W. , and Mioskowski, C. Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes. *Science (New York, N.Y.)* **2003**, 300, 775–778.

[69] Kang, Y. and Taton, T. A. Micelle-Encapsulated Carbon Nanotubes: A Route to Nanotube Composites. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 5650–5651.

[70] Lamanna, G. , Battigelli, A. , Ménard-Moyon, C. , and Bianco, A. Multifunctionalized carbon nanotubes as advanced multimodal nanomaterials for biomedical applications. *Nanotechnology Reviews* **2012**, 1, 17–29.

[71] Foldvari, M. and Bagonluri, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2008**, 4, 183–200.

[72] Battigelli, A. , Ménard-Moyon, C. , Da Ros, T. , Prato, M. , and Bianco, A. Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 1899–1920.

[73] Gomez-Gualdrón, D. A.; Burgos, J. C.; Yu, J.; and Balbuena, P. B. Carbon Nanotubes. *In Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2011; Vol. 104, , pp. 175–245.

[74] Fabbro, C. , Ali-Boucetta, H. , Ros, T. D. , Kostarelos, K. , Bianco, A. , and Prato, M. Targeting carbon nanotubes against cancer. *Chemical Communications* **2012**, 48, 3911–3926.

[75] Ménard-Moyon, C. , Kostarelos, K. , Prato, M. , and Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes for Probing and Modulating Molecular Functions. *Chemistry & Biology* **2010**, 17, 107–115.

[76] Zhu, J. , Yudasaka, M. , Zhang, M. , and Iijima, S. Dispersing Carbon Nanotubes in Water: A Noncovalent and Nonorganic Way. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 11317–11320.

[77] Georgakilas, V. , Tzitzios, V. , Gournis, D. , and Petridis, D. Attachment of Magnetic Nanoparticles on Carbon Nanotubes and Their Soluble Derivatives. *Chemistry of Materials* **2005**, 17, 1613–1617.

[78] Ndiaye, A. , Bonnet, P. , Pauly, A. , Dubois, M. , Brunet, J. , Varenne, C. , Guerin, K. , and Lauron, B. Noncovalent Functionalization of Single-Wall Carbon Nanotubes for the Elaboration of Gas Sensor Dedicated to BTX Type Gases: The Case of Toluene. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, 117, 20217–20228.

[79] Chen, J. and Liu, H. Polymer and method for using the polymer for solubilizing nanotubes. (2007).

[80] Wise, K., Park, C., Kang, J.H., Siochi, E., and Harrison, J. Nanocomposites Issus De Dispersions Stables De Nanotubes De Carbone Contenus Dans Des Matrices Polymères Faisant Appel À Des Interactions De Dispersion. (2008).

[81] Kim, O.-K. , Je, J. , Baldwin, J. W. , Kooi, S. , Pehrsson, P. E. , and Buckley, L. J. Solubilization of Single-Wall Carbon Nanotubes by Supramolecular Encapsulation of Helical Amylose. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 4426–4427.

[82] Guo, Z. , Sadler, P. J. , and Tsang, S. C. Immobilization and Visualization of DNA and Proteins on Carbon Nanotubes. *Advanced Materials* **1998**, 10, 701–703.

[83] Zheng, M. , Jagota, A. , Semke, E. D. , Diner, B. A. , Mclean, R. S. , Lustig, S. R. , Richardson, R. E. , and Tassi, N. G. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature Materials* **2003**, 2, 338–342.

[84] Vigolo, B. , Pénicaud, A. , Coulon, C. , Sauder, C. , Pailler, R. , Journet, C. , Bernier, P. , and Poulin, P. Macroscopic Fibers and Ribbons of Oriented Carbon Nanotubes. *Science* **2000**, 290, 1331–1334.

[85] Pastorin, G. , Wu, W. , Wieckowski, S. , Briand, J.-P. , Kostarelos, K. , Prato, M. , and Bianco, A. Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chemical Communications* **2006**, 0, 1182–1184.

[86] Liu, Z. , Sun, X. , Nakayama-Ratchford, N. , and Dai, H. Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery. *ACS Nano* **2007**, 1, 50–56.

[87] Lu, Y.-J. , Wei, K.-C. , Ma, C.-C. M. , Yang, S.-Y. , and Chen, J.-P. Dual targeted delivery of doxorubicin to cancer cells using folate-conjugated magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 89, 1–9.

[88] Tîlmaciu, C. M. , Dinesh, B. , Pellerano, M. , Diot, S. , Guidetti, M. , Vollaire, J. , Bianco, A. , Ménard-Moyon, C. , Josserand, V. , and Morris, M. C. Nanobiosensor Reports on CDK1 Kinase Activity in Tumor Xenografts in Mice. *Small* **2021**, 17, 2007177.

[89] Martincic, M. and Tobias, G. Filled carbon nanotubes in biomedical imaging and drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2015**, 12, 563–581.

[90] Pederson, M. R. and Broughton, J. Q. Nanocapillarity in fullerene tubules. *Physical Review Letters* **1992**, 69, 2689–2692.

[91] Teizer, W. , Hallock, R. B. , Dujardin, E. , and Ebbesen, T. W. ^{4}He Desorption from Single Wall Carbon Nanotube Bundles: A One-Dimensional Adsorbate. *Physical Review Letters* **1999**, 82, 5305–5308.

[92] Suenaga, K. , Taniguchi, R. , Shimada, T. , Okazaki, T. , Shinohara, H. , and Iijima, S. Evidence for the Intramolecular Motion of Gd Atoms in a Gd2@C92 Nanopeapod. *Nano Letters* **2003**, 3, 1395–1398.

[93] Britz, D. A. and Khlobystov, A. N. Noncovalent interactions of molecules with single walled carbon nanotubes. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, 637–659.

[94] Monthioux, M. and Flahaut, E. Meta- and hybrid-CNTs: A clue for the future development of carbon nanotubes. *Materials Science and Engineering: C* **2007**, 27, 1096–1101.

[95] Zare, H. , Ahmadi, S. , Ghasemi, A. , Ghanbari, M. , Rabiee, N. , Bagherzadeh, M. , Karimi, M. , Webster, T. J. , Hamblin, M. R. , and Mostafavi, E. Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers. *International Journal of Nanomedicine* **2021**, Volume 16, 1681–1706.

[96] Debnath, S. K. and Srivastava, R. Drug Delivery With Carbon-Based Nanomaterials as Versatile Nanocarriers: Progress and Prospects. *Frontiers in Nanotechnology* **2021**, 3

[97] Sanginario, A. , Miccoli, B. , and Demarchi, D. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors* **2017**, 7, 9.

[98] Tsoneva, I. , Semkova, S. , Bakalova, R. , Zhelev, Z. , Nuss, P. , Staneva, G. , and Nikolova, B. Electroporation, electrochemotherapy and electro-assisted drug delivery in cancer. A state-of-the-art review. *Biophysical Chemistry* **2022**, 286, 106819.

[99] Yeingst, T. J. , Arrizabalaga, J. H. , and Hayes, D. J. Ultrasound-Induced Drug Release from Stimuli-Responsive Hydrogels. *Gels* **2022**, 8, 554.

[100] Ezike, T. C. , Okpala, U. S. , Onoja, U. L. , Nwike, C. P. , Ezeako, E. C. , Okpara, O. J. , Okoroafor, C. C. , Eze, S. C. , Kalu, O. L. , Odoh, E. C. , Nwadike, U. G. , Ogbodo, J. O. , Umeh, B. U. , Ossai, E. C. , and Nwanguma, B. C. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon* **2023**, 9, e17488.

[101] Tsuchikama, K. , Anami, Y. , Ha, S. Y. Y. , and Yamazaki, C. M. Exploring the next generation of antibody-drug conjugates. *Nature Reviews. Clinical Oncology* **2024**, 21, 203–223.

[102] Makharadze, D. , Del Valle, L. J. , Katsarava, R. , and Puiggalí, J. The Art of PEGylation: From Simple Polymer to Sophisticated Drug Delivery System. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, 26, 3102.

[103] Cheng, Z. , Huang, H. , Yin, M. , and Liu, H. Applications of liposomes and lipid nanoparticles in cancer therapy: current advances and prospects. *Experimental Hematology & Oncology* **2025**, 14, 11.

[104] Jain, A. , Bhardwaj, K. , and Bansal, M. Polymeric Micelles as Drug Delivery System: Recent Advances, Approaches, Applications and Patents. *Current Drug Safety* **2024**, 19, 163–171.

[105] Italia, J. L. , Yahya, M. M. , Singh, D. , and Ravi Kumar, M. N. V. Biodegradable Nanoparticles Improve Oral Bioavailability of Amphotericin B and Show Reduced Nephrotoxicity Compared to Intravenous Fungizone®. *Pharmaceutical Research* **2009**, 26, 1324–1331.

[106] Morris, M. C. , Deshayes, S. , Heitz, F. , and Divita, G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biology of the Cell* **2008**, 100, 201–217.

[107] Heitz, F. , Morris, M. C. , and Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology* **2009**, 157, 195–206.

[108] Prow, T. W. , Grice, J. E. , Lin, L. L. , Faye, R. , Butler, M. , Becker, W. , Wurm, E. M. T. , Yoong, C. , Robertson, T. A. , Soyer, H. P. , and Roberts, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63, 470–491.

[109] Nair, L. S. and Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 762–798.

[110] Bayer, I. S. Controlled Drug Release from Nanoengineered Polysaccharides. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 1364.

[111] Ismail, M. , Wang, Y. , Li, Y. , Liu, J. , Zheng, M. , and Zou, Y. Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers Accelerate On-Demand Drug Release to Combat Glioblastoma. *Biomacromolecules* **2024**, 25, 6250–6282.

[112] Bazzazan, M. A. , Fattollazadeh, P. , Keshavarz Shahbaz, S. , and Rezaei, N. Polymeric nanoparticles as a promising platform for treating triple-negative breast cancer: Current status and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics* **2024**, 664, 124639.

[113] Al-Shadidi, J. R. M. H. , Al-Shammari, S. , Al-Mutairi, D. , Alkhudhair, D. , Thu, H. E. , and Hussain, Z. Chitosan Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy: A Review of Stimuli-Responsive, Passive, and Active Targeting Strategies. *International Journal of Nanomedicine* **2024**, 19, 8373–8400.

[114] Ranch, K. , Chawnani, D. , Jani, H. , Acharya, D. , Patel, C. A. , Jacob, S. , Babu, R. J. , Tiwari, A. K. , Al-Tabakha, M. M. , and Boddu, S. H. S. An update on the latest strategies in retinal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2024**, 21, 695–712.

[115] Cetin, F. N. , Mignon, A. , Van Vlierberghe, S. , and Kolouchova, K. Polymer- and Lipid-Based Nanostructures Serving Wound Healing Applications: A Review. *Advanced Healthcare Materials* **2025**, 14, e2402699.

[116] Gandhi, S. , Shastri, D. H. , Shah, J. , Nair, A. B. , and Jacob, S. Nasal Delivery to the Brain: Harnessing Nanoparticles for Effective Drug Transport. *Pharmaceutics* **2024**, 16, 481.

[117] Mehrdadi, S. Lipid-Based Nanoparticles as Oral Drug Delivery Systems: Overcoming Poor Gastrointestinal Absorption and Enhancing Bioavailability of Peptide and Protein Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **2024**, 14, 48–66.

[118] Khoshoei, A. , Ghasemy, E. , Poustchi, F. , Shahbazi, M.-A. , and Maleki, R. Engineering the pH-Sensitivity of the Graphene and Carbon Nanotube Based Nanomedicines in Smart Cancer Therapy by Grafting Trimetyl Chitosan. *Pharmaceutical Research* **2020**, 37, 160.

[119] Park, S. , Kim, T. , Jo, D. , Jung, J. S. , Jo, G. , Park, Y. , Kang, E. S. , Kim, Y. H. , Kim, J. , Kim, K. , and Hyun, H. Bioengineered Short Carbon Nanotubes as Tumor-Targeted Carriers for Biomedical Imaging. *Macromolecular Research* **2019**, 27, 833–838.

[120] Jacobsen, N. R. , Møller, P. , Clausen, P. A. , Saber, A. T. , Micheletti, C. , Jensen, K. A. , Wallin, H. , and Vogel, U. Biodistribution of Carbon Nanotubes in Animal Models. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2017**, 121, 30–43.

[121] Jain, S. , Thakare, V. S. , Das, M. , Godugu, C. , Jain, A. K. , Mathur, R. , Chuttani, K. , and Mishra, A. K. Toxicity of Multiwalled Carbon Nanotubes with End Defects Critically Depends on Their Functionalization Density. *Chemical Research in Toxicology* **2011**, 24, 2028–2039.

[122] Shvedova, A. , Castranova, V. , Kisin, E. , Schwegler-Berry, D. , Murray, A. , Gandelsman, V. , Maynard, A. , and Baron, P. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2003**, 66, 1909–1926.

[123] Nagai, H. and Toyokuni, S. Differences and similarities between carbon nanotubes and asbestos fibers during mesothelial carcinogenesis: Shedding light on fiber entry mechanism. *Cancer Science* **2012**, 103, 1378–1390.

[124] Li, X. , Wang, L. , Fan, Y. , Feng, Q. , and Cui, F. Biocompatibility and Toxicity of Nanoparticles and Nanotubes. *Journal of Nanomaterials* **2012**, 2012, 548389.

[125] Kaiser, J.-P. , Roesslein, M. , Buerki-Thurnherr, T. , and Wick, P. Carbon Nanotubes - Curse or Blessing. *Current Medicinal Chemistry* **2011**, 18, 2115–2128.

[126] Lanone, S. , Andujar, P. , Kermanizadeh, A. , and Boczkowski, J. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 2063–2069.

[127] Bussy, C. , Ali-Boucetta, H. , and Kostarelos, K. Safety Considerations for Graphene: Lessons Learnt from Carbon Nanotubes. *Accounts of Chemical Research* **2013**, 46, 692–701.

[128] Heister, E. , Brunner, E. W. , Dieckmann, G. R. , Jurewicz, I. , and Dalton, A. B. Are Carbon Nanotubes a Natural Solution? Applications in Biology and Medicine. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, 5, 1870–1891.

[129] Pulskamp, K. , Diabaté, S. , and Krug, H. F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters* **2007**, 168, 58–74.

[130] Kane, A. B. , Hurt, R. H. , and Gao, H. The asbestos-carbon nanotube analogy: An update. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2018**, 361, 68–80.

[131] Poland, C. A. , Duffin, R. , Kinloch, I. , Maynard, A. , Wallace, W. A. H. , Seaton, A. , Stone, V. , Brown, S. , Macnee, W. , and Donaldson, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology* **2008**, 3, 423–428.

[132] Nel, A. Carbon nanotube pathogenicity conforms to a unified theory for mesothelioma causation by elongate materials and fibers. *Environmental Research* **2023**, 230, 114580.

[133] Zhu, W. , Bussche, A. von dem , Yi, X. , Qiu, Y. , Wang, Z. , Weston, P. , Hurt, R. H. , Kane, A. B. , and Gao, H. Nanomechanical mechanism for lipid bilayer damage induced by carbon nanotubes confined in intracellular vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, 113, 12374–12379.

[134] Al-Jamal, K. T. , Nunes, A. , Methven, L. , Ali-Boucetta, H. , Li, S. , Toma, F. M. , Herrero, M. A. , Al-Jamal, W. T. , Eikelder, H. M. M. ten , Foster, J. , Mather, S. , Prato, M. , Bianco, A. , and Kostarelos, K. Degree of Chemical Functionalization of Carbon Nanotubes Determines Tissue Distribution and Excretion Profile. *Angewandte Chemie* **2012**, 124, 6495–6499.

[135] Ali-Boucetta, H. and Kostarelos, K. Pharmacology of carbon nanotubes: Toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 2111–2119.

[136] Bottini, M. , Rosato, N. , and Bottini, N. PEG-Modified Carbon Nanotubes in Biomedicine: Current Status and Challenges Ahead. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3381–3393.

[137] Tong, H. , McGee, J. K. , Saxena, R. K. , Kodavanti, U. P. , Devlin, R. B. , and Gilmour, M. I. Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, 239, 224–232.

[138] Vittorio, O. , Raffa, V. , and Cuschieri, A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2009**, 5, 424–431.

[139] Cherukuri, P. , Bachilo, S. M. , Litovsky, S. H. , and Weisman, R. B. Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 15638–15639.

[140] Dumortier, H. , Lacotte, S. , Pastorin, G. , Marega, R. , Wu, W. , Bonifazi, D. , Briand, J.-P. , Prato, M. , Muller, S. , and Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes Are Non-Cytotoxic and Preserve the Functionality of Primary Immune Cells. *Nano Letters* **2006**, 6, 1522–1528.

[141] Takagi, A. , Hirose, A. , Nishimura, T. , Fukumori, N. , Ogata, A. , Ohashi, N. , Kitajima, S. , and Kanno, J. Induction of mesothelioma in p53+/− mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *The Journal of Toxicological Sciences* **2008**, 33, 105–116.

[142] Murphy, F. A. , Poland, C. A. , Duffin, R. , Al-Jamal, K. T. , Ali-Boucetta, H. , Nunes, A. , Byrne, F. , Prina-Mello, A. , Volkov, Y. , Li, S. , Mather, S. J. , Bianco, A. , Prato, M. , Macnee, W. , Wallace, W. A. , Kostarelos, K. , and Donaldson, K. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *The American Journal of Pathology* **2011**, 178, 2587–2600.

[143] Murphy, F. A. , Schinwald, A. , Poland, C. A. , and Donaldson, K. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* **2012**, 9, 8.

[144] Reich, S. , Maultzsch, J. , Thomsen, C. , and Ordejón, P. Tight-binding description of graphene. *Physical Review B* **2002**, 66, 035412.

[145] Park, J.-Y. Band Structure and Electron Transport Physics of One-Dimensional SWNTs. *In Carbon Nanotube Electronics*; Kong, J., Javey, A., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2009; pp. 1–42.

[146] Yu, P. Y. and Cardona, M. Fundamentals of Semiconductors. Springer: Berlin, Heidelberg 2005.

[147] Ferrari, A. , Robertson, J. , Reich, S. , and Thomsen, C. Raman spectroscopy of graphite. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2004**, 362, 2271–2288.

[148] Kwon, Y.-K. , Saito, S. , and Tománek, D. Effect of intertube coupling on the electronic structure of carbon nanotube ropes. *Physical Review B* **1998**, 58, R13314–R13317.

[149] Dresselhaus, M. S. , Dresselhaus, G. , and Saito, R. Physics of carbon nanotubes. *Carbon* **1995**, 33, 883–891.

[150] Gupta, N. , Gupta, S. M. , and Sharma, S. K. Carbon nanotubes: synthesis, properties and engineering applications. *Carbon Letters* **2019**, 29, 419–447.

[151] Wallace, P. R. The Band Theory of Graphite. *Physical Review* **1947**, 71, 622–634.

[152] Castro Neto, A. H. , Guinea, F. , Peres, N. M. R. , Novoselov, K. S. , and Geim, A. K. The electronic properties of graphene. *Reviews of Modern Physics* **2009**, 81, 109–162.

[153] Avouris, P. , Chen, Z. , and Perebeinos, V. Carbon-based electronics. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 605–615.

[154] Boykin, T. B. and Klimeck, G. Practical application of zone-folding concepts in tight-binding calculations. *Physical Review B* **2005**, 71, 115215.

[155] Yoshii, M. , Kitamura, S. , and Morimoto, T. Brillouin zone folding method for quasiperiodic superconductivity in multilayer systems: Application to electronic structure and optical responses. *Physical Review B* **2025**, 111, 024206.

[156] Evarestov, R. A. , Bandura, A. V. , and Porsev, V. V. Thermodynamic properties of nanotubes: zone-folding approach. *Lithuanian Journal of Physics* **2016**, 56

[157] Bandura, A. V. , Porsev, V. V. , and Evarestov, R. A. Application of zone-folding approach to the first-principles estimation of thermodynamic properties of carbon and ZrS2-based nanotubes. *Journal of Computational Chemistry* **2016**, 37, 641–652.

[158] Kataura, H. , Kumazawa, Y. , Maniwa, Y. , Umezu, I. , Suzuki, S. , Ohtsuka, Y. , and Achiba, Y. Optical properties of single-wall carbon nanotubes. *Synthetic Metals* **1999**, 103, 2555–2558.

[159] Tang, M. S. Y. , Ng, E.-P. , Juan, J. C. , Ooi, C. W. , Ling, T. C. , Woon, K. L. , and Show, P. L. Metallic and semiconducting carbon nanotubes separation using an aqueous two-phase separation technique: a review. *Nanotechnology* **2016**, 27, 332002.

[160] Meunier, V. , Souza Filho, A. G. , Barros, E. B. , and Dresselhaus, M. S. Physical properties of low-dimensional ${sp}^{2}$-based carbon nanostructures. *Reviews of Modern Physics* **2016**, 88, 025005.

[161] Research of Graphene with High Harmonics, Working Group Prof. Zacharias, Physics Institute, WWU Münster. https://www.uni-muenster.de/Physik.PI/Zacharias/en/research/graphene/graphene.html (accessed Feb. 17, 2025).

[162] Van Hove, L. The Occurrence of Singularities in the Elastic Frequency Distribution of a Crystal. *Physical Review* **1953**, 89, 1189–1193.

[163] Dresselhaus, M. S. and Eklund, P. C. Phonons in carbon nanotubes. *Advances in Physics* **2000**, 49, 705–814.

[164] Saito, R.; Nugraha, A. R. T.; Hasdeo, E. H.; Hung, N. T.; and Izumida, W. Electronic and Optical Properties of Single Wall Carbon Nanotubes. *In Single-Walled Carbon Nanotubes: Preparation, Properties and Applications*; Li, Y., Maruyama, S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp. 165–188.

[165] Frank, S. , Poncharal, P. , Wang, Z. L. , and Heer, W. A. Carbon nanotube quantum resistors. *Science (New York, N.Y.)* **1998**, 280, 1744–1746.

[166] Ncube, S. Electronic properties of single walled carbon nanotubes synthesized by laser ablation.

[167] Jorio, A. , Araujo, P. T. , Doorn, S. K. , Maruyama, S. , Chacham, H. , and Pimenta, M. A. The Kataura plot over broad energy and diameter ranges. *physica status solidi (b)* **2006**, 243, 3117–3121.

[168] Ando, T. Excitons in Carbon Nanotubes. *Journal of the Physical Society of Japan* **1997**, 66, 1066–1073.

[169] Ajiki, H. and Ando, T. Electronic States of Carbon Nanotubes. *Journal of the Physical Society of Japan* **1993**, 62, 1255–1266.

[170] Jorio, A. , Saito, R. , Hafner, J. H. , Lieber, C. M. , Hunter, M. , McClure, T. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Structural (n,m) Determination of Isolated Single-Wall Carbon Nanotubes by Resonant Raman Scattering. *Physical Review Letters* **2001**, 86, 1118–1121.

[171] Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; and Avouris, P. Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications. Springer Science & Business Media: 2001.

[172] Spataru, C. D. , Ismail-Beigi, S. , Benedict, L. X. , and Louie, S. G. Excitonic Effects and Optical Spectra of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2004**, 92, 077402.

[173] Wang, F. , Dukovic, G. , Brus, L. E. , and Heinz, T. F. The Optical Resonances in Carbon Nanotubes Arise from Excitons. *Science* **2005**, 308, 838–841.

[174] Deng, T. and Su, H. Orbital-dependent Electron-Hole Interaction in Graphene and Associated Multi-Layer Structures. *Scientific Reports* **2015**, 5, 17337.

[175] Saito, R. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Trigonal warping effect of carbon nanotubes. *Physical Review B* **2000**, 61, 2981–2990.

[176] Popov, V. N. and Henrard, L. Comparative study of the optical properties of single-walled carbon nanotubes within orthogonal and nonorthogonal tight-binding models. *Physical Review B* **2004**, 70, 115407.

[177] Jorio, A. , Fantini, C. , Pimenta, M. A. , Capaz, R. B. , Samsonidze, Ge. G. , Dresselhaus, G. , Dresselhaus, M. S. , Jiang, J. , Kobayashi, N. , Grüneis, A. , and Saito, R. Resonance Raman spectroscopy (n,m)-dependent effects in small-diameter single-wall carbon nanotubes. *Physical Review B* **2005**, 71, 075401.

[178] Jorio, A. , Pimenta, M. A. , Souza Filho, A. G. , Saito, R. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. *New Journal of Physics* **2003**, 5, 139.

[179] Kane, C. L. and Mele, E. J. Ratio Problem in Single Carbon Nanotube Fluorescence Spectroscopy. *Physical Review Letters* **2003**, 90, 207401.

[180] Avouris, P. , Freitag, M. , and Perebeinos, V. Carbon-nanotube photonics and optoelectronics. *Nature Photonics* **2008**, 2, 341–350.

[181] Hagen, A. , Steiner, M. , Raschke, M. B. , Lienau, C. , Hertel, T. , Qian, H. , Meixner, A. J. , and Hartschuh, A. Exponential Decay Lifetimes of Excitons in Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2005**, 95, 197401.

[182] Crochet, J. , Clemens, M. , and Hertel, T. Quantum yield heterogeneities of aqueous single-wall carbon nanotube suspensions. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 8058–8059.

[183] Perebeinos, V. , Tersoff, J. , and Avouris, P. Scaling of Excitons in Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2004**, 92, 257402.

[184] Maultzsch, J. , Pomraenke, R. , Reich, S. , Chang, E. , Prezzi, D. , Ruini, A. , Molinari, E. , Strano, M. S. , Thomsen, C. , and Lienau, C. Exciton binding energies in carbon nanotubes from two-photon photoluminescence. *Physical Review B* **2005**, 72, 241402.

[185] Perebeinos, V. , Tersoff, J. , and Avouris, P. Radiative Lifetime of Excitons in Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2005**, 5, 2495–2499.

[186] Ando, T. Spin-Orbit Interaction in Carbon Nanotubes. *Journal of the Physical Society of Japan* **2000**, 69, 1757–1763.

[187] Merlen, A. , Buijnsters, J. G. , and Pardanaud, C. A Guide to and Review of the Use of Multiwavelength Raman Spectroscopy for Characterizing Defective Aromatic Carbon Solids: from Graphene to Amorphous Carbons. *Coatings* **2017**, 7, 153.

[188] Sfeir, M. Y. , Wang, F. , Huang, L. , Chuang, C.-C. , Hone, J. , O'Brien, S. P. , Heinz, T. F. , and Brus, L. E. Probing Electronic Transitions in Individual Carbon Nanotubes by Rayleigh Scattering. *Science* **2004**, 306, 1540–1543.

[189] Yi, J. , You, E.-M. , Hu, R. , Wu, D.-Y. , Liu, G.-K. , Yang, Z.-L. , Zhang, H. , Gu, Y. , Wang, Y.-H. , Wang, X. , Ma, H. , Yang, Y. , Liu, J.-Y. , Ru Fan, F. , Zhan, C. , Tian, J.-H. , Qiao, Y. , Wang, H. , Luo, S.-H. , Meng, Z.-D. , Mao, B.-W. , Li, J.-F. , Ren, B. , Aizpurua, J. , Ara Apkarian, V. , N. Bartlett, P. , Baumberg, J. , J. Bell, S. E. , G. Brolo, A. , E. Brus, L. , Choo, J. , Cui, L. , Deckert, V. , F. Domke, K. , Dong, Z.-C. , Duan, S. , Faulds, K. , Frontiera, R. , Halas, N. , Haynes, C. , Itoh, T. , Kneipp, J. , Kneipp, K. , Ru, E. C. L. , Li, Z.-P. , Yi Ling, X. , Lipkowski, J. , M. Liz-Marzán, L. , Nam, J.-M. , Nie, S. , Nordlander, P. , Ozaki, Y. , Panneerselvam, R. , Popp, J. , E. Russell, A. , Schlücker, S. , Tian, Y. , Tong, L. , Xu, H. , Xu, Y. , Yang, L. , Yao, J. , Zhang, J. , Zhang, Y. , Zhang, Y. , Zhao, B. , Zenobi, R. , C. Schatz, G. , Graham, D. , and Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a half-century historical perspective. *Chemical Society Reviews* **2025**, 54, 1453–1551.

[190] Zhao, H. and Mazumdar, S. Electron-Electron Interaction Effects on the Optical Excitations of Semiconducting Single-Walled Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2004**, 93, 157402.

[191] Spataru, C. D.; Ismail-Beigi, S.; Capaz, R. B.; and Louie, S. G. Quasiparticle and Excitonic Effects in the Optical Response of Nanotubes and Nanoribbons. *In Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications*; Jorio, A., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M. S., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2008; pp. 195–227.

[192] Murakami, Y. , Lu, B. , Kazaoui, S. , Minami, N. , Okubo, T. , and Maruyama, S. Photoluminescence sidebands of carbon nanotubes below the bright singlet excitonic levels. *Physical Review B* **2009**, 79, 195407.

[193] Chang, E. , Bussi, G. , Ruini, A. , and Molinari, E. Excitons in Carbon Nanotubes: An Ab Initio Symmetry-Based Approach. *Physical Review Letters* **2004**, 92, 196401.

[194] Spataru, C. D. , Ismail-Beigi, S. , Capaz, R. B. , and Louie, S. G. Theory and Ab Initio Calculation of Radiative Lifetime of Excitons in Semiconducting Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2005**, 95, 247402.

[195] Georgi, C. , Böhmler, M. , Qian, H. , Novotny, L. , and Hartschuh, A. Probing exciton propagation and quenching in carbon nanotubes with near-field optical microscopy. *physica status solidi (b)* **2009**, 246, 2683–2688.

[196] Moritsubo, S. , Murai, T. , Shimada, T. , Murakami, Y. , Chiashi, S. , Maruyama, S. , and Kato, Y. K. Exciton Diffusion in Air-Suspended Single-Walled Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2010**, 104, 247402.

[197] Xie, J. , Inaba, T. , Sugiyama, R. , and Homma, Y. Intrinsic diffusion length of excitons in long single-walled carbon nanotubes from photoluminescence spectra. *Physical Review B* **2012**, 85, 085434.

[198] Amori, A. R. , Hou, Z. , and Krauss, T. D. Excitons in Single-Walled Carbon Nanotubes and Their Dynamics. *Annual Review of Physical Chemistry* **2018**, 69, 81–99.

[199] Ohno, Y. , Iwasaki, S. , Murakami, Y. , Kishimoto, S. , Maruyama, S. , and Mizutani, T. Excitonic transition energies in single-walled carbon nanotubes: Dependence on environmental dielectric constant. *physica status solidi (b)* **2007**, 244, 4002–4005.

[200] Cambré, S. , Santos, S. M. , Wenseleers, W. , Nugraha, A. R. T. , Saito, R. , Cognet, L. , and Lounis, B. Luminescence Properties of Individual Empty and Water-Filled Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **2012**, 6, 2649–2655.

[201] Nugraha, A. R. T. , Saito, R. , Sato, K. , Araujo, P. T. , Jorio, A. , and Dresselhaus, M. S. Dielectric constant model for environmental effects on the exciton energies of single wall carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2010**, 97, 091905.

[202] Ohno, Y. , Iwasaki, S. , Murakami, Y. , Maruyama, S. , and Mizutani, T. Environmental dielectric screening e ect on exciton transition energies in single-walled carbon nanotubes.

[203] Rathinavel, S. , Priyadharshini, K. , and Panda, D. A review on carbon nanotube: An overview of synthesis, properties, functionalization, characterization, and the application. *Materials Science and Engineering: B* **2021**, 268, 115095.

[204] Rinzler, A. G. , Liu, J. , Dai, H. , Nikolaev, P. , Huffman, C. B. , Rodríguez-Macías, F. J. , Boul, P. J. , Lu, A. H. , Heymann, D. , Colbert, D. T. , Lee, R. S. , Fischer, J. E. , Rao, A. M. , Eklund, P. C. , and Smalley, R. E. Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: process, product, and characterization. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **1998**, 67, 29–37.

[205] Weisman, R. B. and Bachilo, S. M. Dependence of Optical Transition Energies on Structure for Single-Walled Carbon Nanotubes in Aqueous Suspension: An Empirical Kataura Plot. *Nano Letters* **2003**, 3, 1235–1238.

[206] Strano, M. S. , Dyke, C. A. , Usrey, M. L. , Barone, P. W. , Allen, M. J. , Shan, H. , Kittrell, C. , Hauge, R. H. , Tour, J. M. , and Smalley, R. E. Electronic Structure Control of Single-Walled Carbon Nanotube Functionalization. *Science* **2003**, 301, 1519–1522.

[207] Pfohl, M. , Tune, D. D. , Graf, A. , Zaumseil, J. , Krupke, R. , and Flavel, B. S. Fitting Single-Walled Carbon Nanotube Optical Spectra. *ACS Omega* **2017**, 2, 1163–1171.

[208] Berciaud, S. , Cognet, L. , Poulin, P. , Weisman, R. B. , and Lounis, B. Absorption Spectroscopy of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2007**, 7, 1203–1207.

[209] Jeong, S. H. , Kim, K. K. , Jeong, S. J. , An, K. H. , Lee, S. H. , and Lee, Y. H. Optical absorption spectroscopy for determining carbon nanotube concentration in solution. *Synthetic Metals* **2007**, 157, 570–574.

[210] Naumov, A. V. , Ghosh, S. , Tsyboulski, D. A. , Bachilo, S. M. , and Weisman, R. B. Analyzing Absorption Backgrounds in Single-Walled Carbon Nanotube Spectra. *ACS Nano* **2011**, 5, 1639–1648.

[211] Miyauchi, Y. and Maruyama, S. Identification of an excitonic phonon sideband by photoluminescence spectroscopy of single-walled carbon-13 nanotubes. *Physical Review B* **2006**, 74, 035415.

[212] Hertel, T. , Hagen, A. , Talalaev, V. , Arnold, K. , Hennrich, F. , Kappes, M. , Rosenthal, S. , McBride, J. , Ulbricht, H. , and Flahaut, E. Spectroscopy of Single- and Double-Wall Carbon Nanotubes in Different Environments. *Nano Letters* **2005**, 5, 511–514.

[213] Mulatu, A. T. , Nigussa, K. N. , and Deja, L. D. Electronic and optical properties of TM-doped (8,0) SiC SWNT and the prospect of hydrogen storage. *Optical Materials* **2022**, 134, 113094.

[214] Itkis, M. E. , Niyogi, S. , Meng, M. E. , Hamon, M. A. , Hu, H. , and Haddon, R. C. Spectroscopic Study of the Fermi Level Electronic Structure of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2002**, 2, 155–159.

[215] Ghosh, S. , Bachilo, S. M. , Simonette, R. A. , Beckingham, K. M. , and Weisman, R. B. Oxygen Doping Modifies Near-Infrared Band Gaps in Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2010**, 330, 1656–1659.

[216] Takassa, R. , Elfatouaki, F. , Farkad, O. , Hassine, S. , Choukri, O. , Mouncharih, A. E. , Ijdiyaou, Y. , Ibnouelghazi, E. A. , and Abouelaoualim, D. Controlling optical properties of small SWCNT using new N-doping chains method: A first-principles study. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2023**, 148, 115627.

[217] Eremin, T. and Obraztsova, E. Optical Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes Doped in Acid Medium. *physica status solidi (b)* **2018**, 255, 1700272.

[218] Torres-Canas, F. J. Tintas y materiales compuestos anisotrópicos basados en nanotubos de carbono.

[219] Jin, C. , Jie, R. , Zhou, Y. , Liu, Y. , Tao, C. , Luo, S. , Ling, Q. , Chen, D. , Zhang, Y. , and Cui, Y. Enhanced nonlinear optical properties for SWNT-PVA composite film by thermal treatment. *Optics Communications* **2024**, 562, 130566.

[220] Rao, A. M. , Eklund, P. C. , Bandow, S. , Thess, A. , and Smalley, R. E. Evidence for charge transfer in doped carbon nanotube bundles from Raman scattering. *Nature* **1997**, 388, 257–259.

[221] Raman, C. V. A new radiation [Reproduced from Indian J. Phys., 1928, 2, 387–398]. *Current Science* **1998**, 74, 382–386.

[222] Cardona, M. and Güntherodt, G. Light Scattering in Solids VI: Recent Results, Including High-Tc Superconductivity. Springer Science & Business Media: 2005.

[223] Saito, R. , Hofmann, M. , Dresselhaus, G. , Jorio, A. , and Dresselhaus, M. S. Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes. *Advances in Physics* **2011**, 60, 413–550.

[224] Yingying, Z. and Jin, Z. Application of Resonance Raman Spectroscopy in the Characterization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Acta Chimica Sinica* **2012**, 70, 2293.

[225] Ferraro, J. R. Introductory Raman Spectroscopy. Elsevier: 2003.

[226] Ferrari, A. C. and Robertson, J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. *Physical Review B* **2000**, 61, 14095–14107.

[227] Dodo, K. , Fujita, K. , and Sodeoka, M. Raman Spectroscopy for Chemical Biology Research. *Journal of the American Chemical Society* **2022**, 144, 19651–19667.

[228] Thomsen, C. and Reich, S. Double Resonant Raman Scattering in Graphite. *Physical Review Letters* **2000**, 85, 5214–5217.

[229] Orlando, A. , Franceschini, F. , Muscas, C. , Pidkova, S. , Bartoli, M. , Rovere, M. , and Tagliaferro, A. A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications. *Chemosensors* **2021**, 9, 262.

[230] Wu, J.-B. , Lin, M.-L. , Cong, X. , Liu, H.-N. , and Tan, P.-H. Raman spectroscopy of graphene-based materials and its applications in related devices. *Chemical Society Reviews* **2018**, 47, 1822–1873.

[231] Thapliyal, V. , Alabdulkarim, M. E. , Whelan, D. R. , Mainali, B. , and Maxwell, J. L. A concise review of the Raman spectra of carbon allotropes. *Diamond and Related Materials* **2022**, 127, 109180.

[232] Li, Z. , Deng, L. , Kinloch, I. A. , and Young, R. J. Raman spectroscopy of carbon materials and their composites: Graphene, nanotubes and fibres. *Progress in Materials Science* **2023**, 135, 101089.

[233] Levshov, D. I. , Tran, H. N. , Paillet, M. , Arenal, R. , Than, X. T. , Zahab, A. A. , Yuzyuk, Y. I. , Sauvajol, J.-L. , and Michel, T. Accurate determination of the chiral indices of individual carbon nanotubes by combining electron diffraction and Resonant Raman spectroscopy. *Carbon* **2017**, 114, 141–159.

[234] Jorio, A. and Saito, R. Raman spectroscopy for carbon nanotube applications. *Journal of Applied Physics* **2021**, 129, 021102.

[235] Thomsen, C. and Reich, S. Raman Scattering in Carbon Nanotubes.

[236] Wu, G. , Zhou, J. , and Dong, J. Raman modes of the deformed single-wall carbon nanotubes. *Physical Review B* **2005**, 72, 115411.

[237] Araujo, P. T. , Pesce, P. B. C. , Dresselhaus, M. S. , Sato, K. , Saito, R. , and Jorio, A. Resonance Raman spectroscopy of the radial breathing modes in carbon nanotubes. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2010**, 42, 1251–1261.

[238] Rols, S. , Righi, A. , Alvarez, L. , Anglaret, E. , Almairac, R. , Journet, C. , Bernier, P. , Sauvajol, J. L. , Benito, A. M. , Maser, W. K. , Muñoz, E. , Martinez, M. T. , laFuente, G. F. de , Girard, A. , and Ameline, J. C. Diameter distribution of single wall carbon nanotubes in nanobundles. *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems* **2000**, 18, 201–205.

[239] Fantini, C. , Jorio, A. , Souza, M. , Strano, M. S. , Dresselhaus, M. S. , and Pimenta, M. A. Optical Transition Energies for Carbon Nanotubes from Resonant Raman Spectroscopy: Environment and Temperature Effects. *Physical Review Letters* **2004**, 93, 147406.

[240] Kürti, J. , Zólyomi, V. , Grüneis, A. , and Kuzmany, H. Double resonant Raman phenomena enhanced by van Hove singularities in single-wall carbon nanotubes. *Physical Review B* **2002**, 65, 165433.

[241] Farhat, H. , Son, H. , Samsonidze, Ge. G. , Reich, S. , Dresselhaus, M. S. , and Kong, J. Phonon Softening in Individual Metallic Carbon Nanotubes due to the Kohn Anomaly. *Physical Review Letters* **2007**, 99, 145506.

[242] Brown, S. D. M. , Jorio, A. , Corio, P. , Dresselhaus, M. S. , Dresselhaus, G. , Saito, R. , and Kneipp, K. Origin of the Breit-Wigner-Fano lineshape of the tangential G-band feature of metallic carbon nanotubes. *Physical Review B* **2001**, 63, 155414.

[243] Piscanec, S. , Lazzeri, M. , Robertson, J. , Ferrari, A. C. , and Mauri, F. Optical phonons in carbon nanotubes: Kohn anomalies, Peierls distortions, and dynamic effects. *Physical Review B* **2007**, 75, 035427.

[244] Basu-Dutt, S. , Minus, M. L. , Jain, R. , Nepal, D. , and Kumar, S. Chemistry of Carbon Nanotubes for Everyone. *Journal of Chemical Education* **2012**, 89, 221–229.

[245] Telg, H. , Maultzsch, J. , Reich, S. , Hennrich, F. , and Thomsen, C. Chirality Distribution and Transition Energies of Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2004**, 93, 177401.

[246] Merlen, A. , Buijnsters, J. G. , and Pardanaud, C. Raman Spectroscopy Characterization of Carbon Materials: From Graphene to All-carbon Heterostructures. **2021**

[247] Sparavigna, A.C. Carbon Nanotubes (Raman Spectroscopy). (2024).

[248] Ramasamy, D. L. , Puhakka, V. , Doshi, B. , Iftekhar, S. , and Sillanpää, M. Fabrication of carbon nanotubes reinforced silica composites with improved rare earth elements adsorption performance. *Chemical Engineering Journal* **2019**, 365

[249] Yang, K.; Venkataraman, M.; Wiener, J.; and Militky, J. 5 - Photoluminescence PCMs and their potential for thermal adaptive textiles. *In Multifunctional Phase Change Materials*; Pielichowska, K., Pielichowski, K., Eds.; Woodhead Publishing, 2023; pp. 255–277.

[250] Strano, M. S. , Huffman, C. B. , Moore, V. C. , O'Connell, M. J. , Haroz, E. H. , Hubbard, J. , Miller, M. , Rialon, K. , Kittrell, C. , Ramesh, S. , Hauge, R. H. , and Smalley, R. E. Reversible, Band-Gap-Selective Protonation of Single-Walled Carbon Nanotubes in Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 6979–6985.

[251] Hertel, T. and Moos, G. Electron-Phonon Interaction in Single-Wall Carbon Nanotubes: A Time-Domain Study. *Physical Review Letters* **2000**, 84, 5002–5005.

[252] Dresselhaus, M. S. , Dresselhaus, G. , Saito, R. , and Jorio, A. Exciton Photophysics of Carbon Nanotubes. *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, 58, 719–747.

[253] Torrens, O. N. , Zheng, M. , and Kikkawa, J. M. Energy of K-Momentum Dark Excitons in Carbon Nanotubes by Optical Spectroscopy. *Physical Review Letters* **2008**, 101, 157401.

[254] Förster, T. Energy migration and fluorescence. *Journal of Biomedical Optics* **2012**, 17, 011002.

[255] Tan, P. H. , Rozhin, A. G. , Hasan, T. , Hu, P. , Scardaci, V. , Milne, W. I. , and Ferrari, A. C. Photoluminescence Spectroscopy of Carbon Nanotube Bundles: Evidence for Exciton Energy Transfer. *Physical Review Letters* **2007**, 99, 137402.

[256] Qian, H. , Georgi, C. , Anderson, N. , Green, A. A. , Hersam, M. C. , Novotny, L. , and Hartschuh, A. Exciton Energy Transfer in Pairs of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2008**, 8, 1363–1367.

[257] Mehlenbacher, R. D. , McDonough, T. J. , Grechko, M. , Wu, M.-Y. , Arnold, M. S. , and Zanni, M. T. Energy transfer pathways in semiconducting carbon nanotubes revealed using two-dimensional white-light spectroscopy. *Nature Communications* **2015**, 6, 6732.

[258] Chou, S. G. , Plentz, F. , Jiang, J. , Saito, R. , Nezich, D. , Ribeiro, H. B. , Jorio, A. , Pimenta, M. A. , Samsonidze, Ge. G. , Santos, A. P. , Zheng, M. , Onoa, G. B. , Semke, E. D. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Phonon-Assisted Excitonic Recombination Channels Observed in DNA-Wrapped Carbon Nanotubes Using Photoluminescence Spectroscopy. *Physical Review Letters* **2005**, 94, 127402.

[259] Zamora-Ledezma, C. , Blanc, C. , and Anglaret, E. Orientational order of single-wall carbon nanotubes in stretch-aligned photoluminescent composite films. *Physical Review B* **2009**, 80, 113407.

[260] Liu, T. , Xiao, Z. , and Wang, B. The exfoliation of SWCNT bundles examined by simultaneous Raman scattering and photoluminescence spectroscopy. *Carbon* **2009**, 47, 3529–3537.

[261] Shiraki, T. , Miyauchi, Y. , Matsuda, K. , and Nakashima, N. Carbon Nanotube Photoluminescence Modulation by Local Chemical and Supramolecular Chemical Functionalization. *Accounts of Chemical Research* **2020**, 53, 1846–1859.

[262] Kono, K. , Matsumoto, D. , Chiashi, S. , and Homma, Y. Simultaneous measurement of photoluminescence and Raman scattering spectra from suspended single-walled carbon nanotubes. *Surface and Interface Analysis* **2012**, 44, 686–689.

[263] Campo, J. , Cambré, S. , Botka, B. , Obrzut, J. , Wenseleers, W. , and Fagan, J. A. Optical Property Tuning of Single-Wall Carbon Nanotubes by Endohedral Encapsulation of a Wide Variety of Dielectric Molecules. *ACS Nano* **2021**, 15, 2301–2317.

[264] Silvera-Batista, C. A. , Weinberg, P. , Butler, J. E. , and Ziegler, K. J. Long-Term Improvements to Photoluminescence and Dispersion Stability by Flowing SDS-SWNT Suspensions through Microfluidic Channels. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 12721–12728.

[265] Smaranda, I. , Baibarac, M. , Ilie, M. , Matea, A. , Baltog, I. , and Lefrant, S. Optical Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes Functionalized with Poly(2,2'-bithiophene-co-pyrene) Copolymer. *Current Organic Chemistry* **2015**, 19, 652–661.

[266] Zhang, J. , Landry, M. P. , Barone, P. W. , Kim, J.-H. , Lin, S. , Ulissi, Z. W. , Lin, D. , Mu, B. , Boghossian, A. A. , Hilmer, A. J. , Rwei, A. , Hinckley, A. C. , Kruss, S. , Shandell, M. A. , Nair, N. , Blake, S. , Şen, F. , Şen, S. , Croy, R. G. , Li, D. , Yum, K. , Ahn, J.-H. , Jin, H. , Heller, D. A. , Essigmann, J. M. , Blankschtein, D. , and Strano, M. S. Molecular recognition using corona phase complexes made of synthetic polymers adsorbed on carbon nanotubes. *Nature Nanotechnology* **2013**, 8, 959–968.

[267] Cambré, S. , Santos, S. M. , Wenseleers, W. , Nugraha, A. R. T. , Saito, R. , Cognet, L. , and Lounis, B. Luminescence Properties of Individual Empty and Water-Filled Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **2012**, 6, 2649–2655.

[268] Walsh, A. G. , Vamivakas, A. N. , Yin, Y. , Cronin, S. B. , Unlu, M. S. , Goldberg, B. B. , and Swan, A. K. Scaling of exciton binding energy with external dielectric function in carbon nanotubes. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2008**, 40, 2375–2379.

[269] Brozena, A. H. , Kim, M. , Powell, L. R. , and Wang, Y. Controlling the optical properties of carbon nanotubes with organic colour-centre quantum defects. *Nature reviews. Chemistry* **2019**, 3, 375–392.

[270] Settele, S. , Berger, F. J. , Lindenthal, S. , Zhao, S. , El Yumin, A. A. , Zorn, N. F. , Asyuda, A. , Zharnikov, M. , Högele, A. , and Zaumseil, J. Synthetic control over the binding configuration of luminescent sp3-defects in single-walled carbon nanotubes. *Nature Communications* **2021**, 12, 2119.

[271] Gao, J. , Gomulya, W. , and Loi, M. A. Effect of medium dielectric constant on the physical properties of single-walled carbon nanotubes. *Chemical Physics* **2013**, 413, 35–38.

[272] Gao, J. and Loi, M. A. Photophysics of polymer-wrapped single-walled carbon nanotubes. *The European Physical Journal B* **2010**, 75, 121–126.

[273] Gordeev, G. , Wasserroth, S. , Li, H. , Jorio, A. , Flavel, B. S. , and Reich, S. Dielectric Screening inside Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2024**, 24, 8030–8037.

[274] Park, J. , Reid, O. G. , Blackburn, J. L. , and Rumbles, G. Photoinduced spontaneous free-carrier generation in semiconducting single-walled carbon nanotubes. *Nature Communications* **2015**, 6, 8809.

[275] Yoshida, M. , Popert, A. , and Kato, Y. K. Gate-voltage induced trions in suspended carbon nanotubes. *Physical Review B* **2016**, 93, 041402.

[276] Wieland, S. , Yumin, A. A. E. , Gotthardt, J. M. , and Zaumseil, J. Impact of Dielectric Environment on Trion Emission from Single-Walled Carbon Nanotube Networks. *The Journal of Physical Chemistry C* **2023**, 127, 3112–3122.

[277] Chiu, C. F. , Saidi, W. A. , Kagan, V. E. , and Star, A. Defect-Induced Near-Infrared Photoluminescence of Single-Walled Carbon Nanotubes Treated with Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139, 4859–4865.

[278] Berger, F. J. , Lüttgens, J. , Nowack, T. , Kutsch, T. , Lindenthal, S. , Kistner, L. , Müller, C. C. , Bongartz, L. M. , Lumsargis, V. A. , Zakharko, Y. , and Zaumseil, J. Brightening of Long, Polymer-Wrapped Carbon Nanotubes by sp3 Functionalization in Organic Solvents. *ACS Nano* **2019**, 13, 9259–9269.

[279] Gifford, B. J. , Kilina, S. , Htoon, H. , Doorn, S. K. , and Tretiak, S. Exciton Localization and Optical Emission in Aryl-Functionalized Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry C* **2018**, 122, 1828–1838.

[280] Harvey, J. D. , Williams, R. M. , Tully, K. M. , Baker, H. A. , Shamay, Y. , and Heller, D. A. An in vivo Nanosensor Measures Compartmental Doxorubicin Exposure. *Nano letters* **2019**, 19, 4343–4354.

[281] Tabakman, S. M. , Welsher, K. , Hong, G. , and Dai, H. Optical Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes Separated in a Density Gradient; Length, Bundling, and Aromatic Stacking Effects. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **2010**, 114, 19569–19575.

[282] Sravani, A. N. K. V. , Chandrasekaran, N. , Thomas, J. , and Mukherjee, A. Formulation and characterization of cisplatin-loaded hydroxyl functionalized single-walled carbon nanotubes for targeting gastric cancer stem cells. *Heliyon* **2023**, 9, e18798.

[283] Badea, M. A. , Balas, M. , Ionita, D. , and Dinischiotu, A. Carbon nanotubes conjugated with cisplatin activate different apoptosis signaling pathways in 2D and 3D-spheroid triple-negative breast cancer cell cultures: a comparative study. *Archives of Toxicology* **2024**, 98, 2843–2866.

[284] Son, K. H. , Hong, J. H. , and Lee, J. W. Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators. *International Journal of Nanomedicine* **2016**, 11, 5163–5185.

[285] Graf, A. , Zakharko, Y. , Schießl, S. P. , Backes, C. , Pfohl, M. , Flavel, B. S. , and Zaumseil, J. Large scale, selective dispersion of long single-walled carbon nanotubes with high photoluminescence quantum yield by shear force mixing. *Carbon* **2016**, 105, 593–599.

[286] Beyene, A. G. , Alizadehmojarad, A. A. , Dorlhiac, G. , Goh, N. , Streets, A. M. , Král, P. , Vuković, L. , and Landry, M. P. Ultralarge Modulation of Fluorescence by Neuromodulators in Carbon Nanotubes Functionalized with Self-assembled Oligonucleotide Rings. *Nano letters* **2018**, 18, 6995–7003.

[287] Nalige, S. S. , Galonska, P. , Kelich, P. , Sistemich, L. , Herrmann, C. , Vukovic, L. , Kruss, S. , and Havenith, M. Fluorescence changes in carbon nanotube sensors correlate with THz absorption of hydration. *Nature Communications* **2024**, 15, 6770.

[288] Bray, F. , Laversanne, M. , Sung, H. , Ferlay, J. , Siegel, R. L. , Soerjomataram, I. , and Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2024**, 74, 229–263.

[289] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144, 646–674.

[290] Kamel, D. , Gray, C. , Walia, J. S. , and Kumar, V. PARP Inhibitor Drugs in the Treatment of Breast, Ovarian, Prostate and Pancreatic Cancers: An Update of Clinical Trials. *Current Drug Targets* **2018**, 19, 21–37.

[291] Global Cancer Observatory. https://gco.iarc.fr/ (accessed Dec. 17, 2024).

[292] Sung, H. , Ferlay, J. , Siegel, R. L. , Laversanne, M. , Soerjomataram, I. , Jemal, A. , and Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2021**, 71, 209–249.

[293] Mizrahi, J. D. , Surana, R. , Valle, J. W. , and Shroff, R. T. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)* **2020**, 395, 2008–2020.

[294] Zhang, L. , Sanagapalli, S. , and Stoita, A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* **2018**, 24, 2047–2060.

[295] Kamisawa, T. , Wood, L. D. , Itoi, T. , and Takaori, K. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)* **2016**, 388, 73–85.

[296] Kim, J. Cell Dissemination in Pancreatic Cancer. *Cells* **2022**, 11, 3683.

[297] Nwabo Kamdje, A. H. , Takam Kamga, P. , Tagne Simo, R. , Vecchio, L. , Seke Etet, P. F. , Muller, J. M. , Bassi, G. , Lukong, E. , Kumar Goel, R. , Mbo Amvene, J. , and Krampera, M. Developmental pathways associated with cancer metastasis: Notch, Wnt, and Hedgehog. **2017**

[298] Rawla, P. , Sunkara, T. , and Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology* **2019**, 10, 10–27.

[299] Rahib, L. , Smith, B. D. , Aizenberg, R. , Rosenzweig, A. B. , Fleshman, J. M. , and Matrisian, L. M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Research* **2014**, 74, 2913–2921.

[300] Cai, J. , Chen, H. , Lu, M. , Zhang, Y. , Lu, B. , You, L. , Zhang, T. , Dai, M. , and Zhao, Y. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Letters* **2021**, 520, 1–11.

[301] Hruban, R. H. , Takaori, K. , Klimstra, D. S. , Adsay, N. V. , Albores-Saavedra, J. , Biankin, A. V. , Biankin, S. A. , Compton, C. , Fukushima, N. , Furukawa, T. , Goggins, M. , Kato, Y. , Klöppel, G. , Longnecker, D. S. , Lüttges, J. , Maitra, A. , Offerhaus, G. J. A. , Shimizu, M. , and Yonezawa, S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology* **2004**, 28, 977–987.

[302] Daoud, A. Z. , Mulholland, E. J. , Cole, G. , and McCarthy, H. O. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMC Cancer* **2019**, 19, 1130.

[303] Omori, Y. , Ono, Y. , Tanino, M. , Karasaki, H. , Yamaguchi, H. , Furukawa, T. , Enomoto, K. , Ueda, J. , Sumi, A. , Katayama, J. , Muraki, M. , Taniue, K. , Takahashi, K. , Ambo, Y. , Shinohara, T. , Nishihara, H. , Sasajima, J. , Maguchi, H. , Mizukami, Y. , Okumura, T. , and Tanaka, S. Pathways of Progression From Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Molecular Features. *Gastroenterology* **2019**, 156, 647-661.e2.

[304] Conner, J. R. , Mariño-Enríquez, A. , Mino-Kenudson, M. , Garcia, E. , Pitman, M. B. , Sholl, L. M. , Srivastava, A. , and Doyle, L. A. Genomic Characterization of Low- and High-Grade Pancreatic Mucinous Cystic Neoplasms Reveals Recurrent KRAS Alterations in “High-Risk” Lesions. *Pancreas* **2017**, 46, 665.

[305] Makohon-Moore, A. and Iacobuzio-Donahue, C. A. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nature Reviews. Cancer* **2016**, 16, 553–565.

[306] Kleeff, J. , Korc, M. , Apte, M. , La Vecchia, C. , Johnson, C. D. , Biankin, A. V. , Neale, R. E. , Tempero, M. , Tuveson, D. A. , Hruban, R. H. , and Neoptolemos, J. P. Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers* **2016**, 2, 1–22.

[307] Bailey, P. , Chang, D. K. , Nones, K. , Johns, A. L. , Patch, A.-M. , Gingras, M.-C. , Miller, D. K. , Christ, A. N. , Bruxner, T. J. C. , Quinn, M. C. , Nourse, C. , Murtaugh, L. C. , Harliwong, I. , Idrisoglu, S. , Manning, S. , Nourbakhsh, E. , Wani, S. , Fink, L. , Holmes, O. , Chin, V. , Anderson, M. J. , Kazakoff, S. , Leonard, C. , Newell, F. , Waddell, N. , Wood, S. , Xu, Q. , Wilson, P. J. , Cloonan, N. , Kassahn, K. S. , Taylor, D. , Quek, K. , Robertson, A. , Pantano, L. , Mincarelli, L. , Sanchez, L. N. , Evers, L. , Wu, J. , Pinese, M. , Cowley, M. J. , Jones, M. D. , Colvin, E. K. , Nagrial, A. M. , Humphrey, E. S. , Chantrill, L. A. , Mawson, A. , Humphris, J. , Chou, A. , Pajic, M. , Scarlett, C. J. , Pinho, A. V. , Giry-Laterriere, M. , Rooman, I. , Samra, J. S. , Kench, J. G. , Lovell, J. A. , Merrett, N. D. , Toon, C. W. , Epari, K. , Nguyen, N. Q. , Barbour, A. , Zeps, N. , Moran-Jones, K. , Jamieson, N. B. , Graham, J. S. , Duthie, F. , Oien, K. , Hair, J. , Grützmann, R. , Maitra, A. , Iacobuzio-Donahue, C. A. , Wolfgang, C. L. , Morgan, R. A. , Lawlor, R. T. , Corbo, V. , Bassi, C. , Rusev, B. , Capelli, P. , Salvia, R. , Tortora, G. , Mukhopadhyay, D. , Petersen, G. M. , Munzy, D. M. , Fisher, W. E. , Karim, S. A. , Eshleman, J. R. , Hruban, R. H. , Pilarsky, C. , Morton, J. P. , Sansom, O. J. , Scarpa, A. , Musgrove, E. A. , Bailey, U.-M. H. , Hofmann, O. , Sutherland, R. L. , Wheeler, D. A. , Gill, A. J. , Gibbs, R. A. , Pearson, J. V. , Waddell, N. , Biankin, A. V. , and Grimmond, S. M. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **2016**, 531, 47–52.

[308] Iacobuzio-Donahue, C. A. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. *Gut* **2012**, 61, 1085–1094.

[309] Waddell, N. , Pajic, M. , Patch, A.-M. , Chang, D. K. , Kassahn, K. S. , Bailey, P. , Johns, A. L. , Miller, D. , Nones, K. , Quek, K. , Quinn, M. C. J. , Robertson, A. J. , Fadlullah, M. Z. H. , Bruxner, T. J. C. , Christ, A. N. , Harliwong, I. , Idrisoglu, S. , Manning, S. , Nourse, C. , Nourbakhsh, E. , Wani, S. , Wilson, P. J. , Markham, E. , Cloonan, N. , Anderson, M. J. , Fink, J. L. , Holmes, O. , Kazakoff, S. H. , Leonard, C. , Newell, F. , Poudel, B. , Song, S. , Taylor, D. , Waddell, N. , Wood, S. , Xu, Q. , Wu, J. , Pinese, M. , Cowley, M. J. , Lee, H. C. , Jones, M. D. , Nagrial, A. M. , Humphris, J. , Chantrill, L. A. , Chin, V. , Steinmann, A. M. , Mawson, A. , Humphrey, E. S. , Colvin, E. K. , Chou, A. , Scarlett, C. J. , Pinho, A. V. , Giry-Laterriere, M. , Rooman, I. , Samra, J. S. , Kench, J. G. , Pettitt, J. A. ,

Merrett, N. D. , Toon, C. , Epari, K. , Nguyen, N. Q. , Barbour, A. , Zeps, N. , Jamieson, N. B. , Graham, J. S. , Niclou, S. P. , Bjerkvig, R. , Grützmann, R. , Aust, D. , Hruban, R. H. , Maitra, A. , Iacobuzio-Donahue, C. A. , Wolfgang, C. L. , Morgan, R. A. , Lawlor, R. T. , Corbo, V. , Bassi, C. , Falconi, M. , Zamboni, G. , Tortora, G. , Tempero, M. A. , Gill, A. J. , Eshleman, J. R. , Pilarsky, C. , Scarpa, A. , Musgrove, E. A. , Pearson, J. V. , Biankin, A. V. , and Grimmond, S. M. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **2015**, 518, 495–501.

[310] Collisson, E. A. , Sadanandam, A. , Olson, P. , Gibb, W. J. , Truitt, M. , Gu, S. , Cooc, J. , Weinkle, J. , Kim, G. E. , Jakkula, L. , Feiler, H. S. , Ko, A. H. , Olshen, A. B. , Danenberg, K. L. , Tempero, M. A. , Spellman, P. T. , Hanahan, D. , and Gray, J. W. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature Medicine* **2011**, 17, 500–503.

[311] Waters, A. M. and Der, C. J. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2018**, 8, a031435.

[312] Ostrem, J. M. L. and Shokat, K. M. Targeting KRAS G12C with Covalent Inhibitors. *Annual Review of Cancer Biology* **2022**, 6, 49–64.

[313] Skoulidis, F. , Li, B. T. , Dy, G. K. , Price, T. J. , Falchook, G. S. , Wolf, J. , Italiano, A. , Schuler, M. , Borghaei, H. , Barlesi, F. , Kato, T. , Curioni-Fontecedro, A. , Sacher, A. , Spira, A. , Ramalingam, S. S. , Takahashi, T. , Besse, B. , Anderson, A. , Ang, A. , Tran, Q. , Mather, O. , Henary, H. , Ngarmchamnanrith, G. , Friberg, G. , Velcheti, V. , and Govindan, R. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine* **2021**, 384, 2371–2381.

[314] Hallin, J. , Engstrom, L. D. , Hargis, L. , Calinisan, A. , Aranda, R. , Briere, D. M. , Sudhakar, N. , Bowcut, V. , Baer, B. R. , Ballard, J. A. , Burkard, M. R. , Fell, J. B. , Fischer, J. P. , Vigers, G. P. , Xue, Y. , Gatto, S. , Fernandez-Banet, J. , Pavlicek, A. , Velastagui, K. , Chao, R. C. , Barton, J. , Pierobon, M. , Baldelli, E. , Patricoin, E. F. , Cassidy, D. P. , Marx, M. A. , Rybkin, I. I. , Johnson, M. L. , Ou, S.-H. I. , Lito, P. , Papadopoulos, K. P. , Jänne, P. A. , Olson, P. , and Christensen, J. G. The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discovery* **2020**, 10, 54–71.

[315] Guan, J. , Zhong, W. , An, S. , Yang, J. , Su, J. , Chen, Z. , Yan, H. , Chen, Z. , Huang, Z. , Zhang, X. , Nie, Q. , and Wu, Y. KRAS Mutation in Patients with Lung Cancer: A Predictor for Poor Prognosis but Not for EGFR-TKIs or Chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology* **2013**, 20, 1381–1388.

[316] Finn, S. P. , Addeo, A. , Dafni, U. , Thunnissen, E. , Bubendorf, L. , Madsen, L. B. , Biernat, W. , Verbeken, E. , Hernandez-Losa, J. , Marchetti, A. , Cheney, R. , Warth, A. , Speel, E.-J. M. , Quinn, A. M. , Monkhorst, K. , Jantus-Lewintre, E. , Tischler, V. , Marti, N. , Dimopoulou, G. , Molina-Vila, M. A. , Kammler, R. , Kerr, K. M. , Peters, S. , Stahel, R. A. , and European Thoracic Oncology Platform Lungscape Investigators Prognostic Impact of KRAS G12C Mutation in Patients With NSCLC: Results From the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **2021**, 16, 990–1002.

[317] Sebastian, M. , Eberhardt, W. E. E. , Hoffknecht, P. , Metzenmacher, M. , Wehler, T. , Kokowski, K. , Alt, J. , Schütte, W. , Büttner, R. , Heukamp, L. C. , Stenzinger, A. , Jänicke, M. , Fleitz, A. , Zacharias, S. , Dille, S. , Hipper, A. , Sandberg, M. , Weichert, W. , Groschek, M. , Heyde, E. von der , Rauh, J. , Dechow, T. , Thomas, M. , Griesinger, F. , and CRISP Registry Group KRAS G12C-mutated advanced non-small cell lung cancer: A real-world cohort from the German prospective, observational, nation-wide CRISP Registry (AIO-TRK-0315). *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2021**, 154, 51–61.

[318] Jones, R. P. , Sutton, P. A. , Evans, J. P. , Clifford, R. , McAvoy, A. , Lewis, J. , Rousseau, A. , Mountford, R. , McWhirter, D. , and Malik, H. Z. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *British Journal of Cancer* **2017**, 116, 923–929.

[319] Franco, J. , Balaji, U. , Freinkman, E. , Witkiewicz, A. K. , and Knudsen, E. S. Metabolic Reprogramming of Pancreatic Cancer Mediated by CDK4/6 Inhibition Elicits Unique Vulnerabilities. *Cell Reports* **2016**, 14, 979–990.

[320] Sobhani, N. , D'Angelo, A. , Pittacolo, M. , Roviello, G. , Miccoli, A. , Corona, S. P. , Bernocchi, O. , Generali, D. , and Otto, T. Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer. *Cells* **2019**, 8, 321.

[321] Malumbres, M. CDK4/6 Inhibitors: What Is the Best Cocktail? *Clinical Cancer Research* **2019**, 25, 6–8.

[322] Goodwin, C. M. , Waters, A. M. , Klomp, J. E. , Javaid, S. , Bryant, K. L. , Stalnecker, C. A. , Drizyte-Miller, K. , Papke, B. , Yang, R. , Amparo, A. M. , Ozkan-Dagliyan, I. , Baldelli, E. , Calvert, V. , Pierobon, M. , Sorrentino, J. A. , Beelen, A. P. , Bublitz, N. , Lüthen, M. , Wood, K. C. , Petricoin, E. F., III , Sers, C. , McRee, A. J. , Cox, A. D. , and

Der, C. J. Combination Therapies with CDK4/6 Inhibitors to Treat KRAS-Mutant Pancreatic Cancer. *Cancer Research* **2023**, 83, 141–157.

[323] Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. P53 function and dysfunction. *Cell* **1992**, 70, 523–526.

[324] Liu, J. , Zhang, C. , and Feng, Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* **2014**, 46, 170–179.

[325] Lim, D. V. , Woo, W. H. , Lim, J. X. , Loh, X. Y. , Soh, H. T. , Lim, S. Y. A. , Lee, Z. Y. , Yow, H. Y. , Hamzah, S. B. , Sellappans, R. , and Foo, J. B. Targeting Mutant-p53 for Cancer Treatment: Are We There Yet? *Current Molecular Pharmacology* **2024**, 17, e140923221042.

[326] Zhuang, X. , Guo, Y. , Sun, X. , Chen, J. , Xie, S. , Yang, F. , and Li, J. Promising Proteolysis-Targeting Chimera for Mutant p53-R175H. *ACS Omega* **2024**, 9, 45138–45146.

[327] Ma, Z. , Shen, Q. , and Zhou, J. Rezatapopt (PC14586): A First-in-Class Small Molecule p53 Y220C Mutant Protein Stabilizer in Clinical Trials. *Journal of Medicinal Chemistry* **2025**, 68, 6847–6849.

[328] Andrysik, Z. and Espinosa, J. M. Harnessing p53 for targeted cancer therapy: new advances and future directions. *Transcription* **2025**, 16, 3–46.

[329] Zhao, M. , Mishra, L. , and Deng, C.-X. The role of TGF-β/SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences* **2018**, 14, 111–123.

[330] Clancy, T. E. and Ashley, S. W. Pancreaticoduodenectomy (Whipple operation). *Surgical Oncology Clinics* **2005**, 14, 533–552.

[331] Guidelines Detail. https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1455 (accessed July 9, 2025).

[332] Seufferlein, T. , Bachet, J. B. , Cutsem, E. V. , and Rougier, P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* **2012**, 23, vii33–vii40.

[333] Kang, M.-J. , Li, H.-X. , Gan, Y. , Fang, C. , Yang, X.-L. , Li, B. , and Su, S. Efficacy and safety of first-line chemotherapies for patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review and network meta-analysis. *Heliyon* **2024**, 10, e27679.

[334] Schutte, M. , Hruban, R. H. , Geradts, J. , Maynard, R. , Hilgers, W. , Rabindran, S. K. , Moskaluk, C. A. , Hahn, S. A. , Schwarte-Waldhoff, I. , Schmiegel, W. , Baylin, S. B. , Kern, S. E. , and Herman, J. G. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Research* **1997**, 57, 3126–3130.

[335] Chou, A. , Froio, D. , Nagrial, A. M. , Parkin, A. , Murphy, K. J. , Chin, V. T. , Wohl, D. , Steinmann, A. , Stark, R. , Drury, A. , Walters, S. N. , Vennin, C. , Burgess, A. , Pinese, M. , Chantrill, L. A. , Cowley, M. J. , Molloy, T. J. , Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative (APGI), Waddell, N. , Johns, A. , Grimmond, S. M. , Chang, D. K. , Biankin, A. V. , Sansom, O. J. , Morton, J. P. , Grey, S. T. , Cox, T. R. , Turchini, J. , Samra, J. , Clarke, S. J. , Timpson, P. , Gill, A. J. , and Pajic, M. Tailored first-line and second-line CDK4-targeting treatment combinations in mouse models of pancreatic cancer. *Gut* **2018**, 67, 2142–2155.

[336] Park, W. , Chawla, A. , and O'Reilly, E. M. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA* **2021**, 326, 851–862.

[337] Liu, W. , Fang, Y. , Zhang, C. , Xiang, M. , Qi, L. , Su, A. , and Sun, Y. Cost-effectiveness of NALIRIFOX versus Nab-paclitaxel and gemcitabine in previously untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC gastroenterology* **2025**, 25, 266.

[338] Jiao, X. and Barzi, A. Comparative effectiveness of NALIRIFOX vs. FOLFIRINOX in pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2024**, 42, 4160–4160.

[339] Wainberg, Z. A. and M. O'Reilly, E. NALIRIFOX in the frontline for metastatic pancreatic cancer: evidence beyond NAPOLI 3. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2024**, 21, 900–901.

[340] Netto, D. , Frizziero, M. , Foy, V. , McNamara, M. G. , Backen, A. , and Hubner, R. A. Systemic Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer—Current Landscape and Future Directions. *Current Oncology* **2024**, 31, 5206–5223.

[341] Zhang, J. , Wang, Y. , Wang, L. , You, L. , and Zhang, T. Pancreatic ductal adenocarcinoma chemoresistance: From metabolism reprogramming to novel treatment. *Chinese Medical Journal* **2024**, 137, 408–420.

[342] Lee, D. U. , Han, B. S. , Jung, K. H. , and Hong, S.-S. Tumor Stroma as a Therapeutic Target for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomolecules & Therapeutics* **2024**, 32, 281–290.

[343] Michetti, F. , Cirone, M. , Strippoli, R. , D'Orazi, G. , and Cordani, M. Mechanistic insights and therapeutic strategies for targeting autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Discover Oncology* **2025**, 16, 592.

[344] Gu, D. , Huang, S. , Zhao, K. , Zhang, X. , Zhang, J. , and Xiong, W. Global trends in resistance studies of gemcitabine and pancreatic cancer: a bibliometric and visual analysis from 2010 to 2024. *Frontiers in Pharmacology* **2025**, 16

[345] Li, X. , Liu, Y. , Zhou, F. , Guo, W. , Chen, G. , Tao, J. , Huang, J. , Qiu, J. , Chen, H. , Ren, B. , You, L. , Shi, Y. , Yang, G. , Zhang, T. , Gu, J. , and Zhao, Y. Decipher the single-cell level responses to chemotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma by a cross-time context graph model. *Cancer Letters* **2025**, 626, 217751.

[346] Dominguez, A. A. , Perz, M. T. , Xu, Y. , Cedillo, L. G. , Huang, O. D. , McIntyre, C. A. , Vudatha, V. , Trevino, J. G. , Liu, J. , and Wang, P. Unveiling the Promise: Navigating Clinical Trials 1978–2024 for PDAC. *Cancers* **2024**, 16, 3564.

[347] Taflin, H. , Odin, E. , Carlsson, G. , Gustavsson, B. , Hemmingsson, O. , Wettergren, Y. , Urbanowicz, K. , Turyn, J. , Smolenski, R. T. , and Peters, G. J. Increased potentiation of 5-fluorouracil induced thymidylate synthase inhibition by 5,10-methylenetetrahydrofolate (arfolitixorin) compared to leucovorin in patients with colorectal liver metastases; The Modelle-001 Trial. *BJC Reports* **2024**, 2, 89.

[348] Brown, M. B. and Blair, H. A. Liposomal Irinotecan: A Review as First-Line Therapy in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Drugs* **2025**, 85, 255–262.

[349] Mondal, P. , Alyateem, G. , Mitchell, A. V. , and Gottesman, M. M. A whole-genome CRISPR screen identifies the spindle accessory checkpoint as a locus of nab-paclitaxel resistance in a pancreatic cancer cell line. *Scientific Reports* **2024**, 14, 15912.

[350] Mustafa, M. , Abbas, K. , Alam, M. , Habib, S. , Zulfareen , Hasan, G. M. , Islam, S. , Shamsi, A. , and Hassan, I. Investigating underlying molecular mechanisms, signaling pathways, emerging therapeutic approaches in pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology* **2024**, 14

[351] Song, G. , Liu, J. , Tang, X. , Zhong, J. , Zeng, Y. , Zhang, X. , Zhou, J. , Zhou, J. , Cao, L. , Zhang, Q. , and Li, Y. Cell cycle checkpoint revolution: targeted therapies in the fight against malignant tumors. *Frontiers in Pharmacology* **2024**, 15

[352] Springfeld, C. , Jäger, D. , Büchler, M. W. , Strobel, O. , Hackert, T. , Palmer, D. H. , and Neoptolemos, J. P. Chemotherapy for pancreatic cancer. *La Presse Médicale* **2019**, 48, e159–e174.

[353] Mohammad, A. A. Advanced pancreatic cancer: The standard of care and new opportunities. *Oncology Reviews* **2018**, 12

[354] Wainberg, Z. A. , Melisi, D. , Macarulla, T. , Pazo Cid, R. , Chandana, S. R. , De La Fouchardière, C. , Dean, A. , Kiss, I. , Lee, W. J. , Goetze, T. O. , Van Cutsem, E. , Paulson, A. S. , Bekaii-Saab, T. , Pant, S. , Hubner, R. A. , Xiao, Z. , Chen, H. , Benzaghou, F. , and O'Reilly, E. M. NALIRIFOX versus nab-paclitaxel and gemcitabine in treatment-naive patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (NAPOLI 3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **2023**, 402, 1272–1281.

[355] Patel, D. , Dickson, A. L. , Zickuhr, G. M. , Um, I. H. , Read, O. J. , Czekster, C. M. , Mullen, P. , Harrison, D. J. , and Bré, J. Defining the mode of action of cisplatin combined with NUC-1031, a phosphoramidate modification of gemcitabine. *Translational Oncology* **2024**, 50, 102114.

[356] C150807 - Gemcitabine-Releasing Intravesical System. https://evsexplore.semantics.cancer.gov/evsexplore/concept/ncit/C150807 (accessed July 9, 2025).

[357] Mendes, I. and Vale, N. Overcoming Microbiome-Acquired Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomedicines* **2024**, 12, 227.

[358] Nemati, M. , Hsu, C.-Y. , Nathiya, D. , Kumar, M. R. , Oghenemaro, E. F. , Kariem, M. , Kaur, P. , Bhanot, D. , Hjazi, A. , and Azam Saedi, T. Gemcitabine: immunomodulatory or immunosuppressive role in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology* **2025**, 16

[359] Hernández-Blanquisett, A. , Quintero-Carreño, V. , Martínez-Ávila, M. C. , Porto, M. , Manzur-Barbur, M. C. , and Buendía, E. Metastatic Pancreatic Cancer: Where Are We? *Oncology Reviews* **2024**, 17, 11364.

[360] Koltai, T. , Reshkin, S. J. , Carvalho, T. M. A. , Di Molfetta, D. , Greco, M. R. , Alfarouk, K. O. , and Cardone, R. A. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. *Cancers* **2022**, 14, 2486.

[361] Hawryłkiewicz, A. and Ptaszyńska, N. Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy. *Molecules* **2021**, 26, 364.

[362] (PDF) Nab-Paclitaxel in the Treatment of Gastrointestinal Cancers—Improvements in Clinical Efficacy and Safety. https://www.researchgate.net/publication/372433402_Nab-Paclitaxel_in_the_Treatment_of_Gastrointestinal_Cancers-Improvements_in_Clinical_Efficacy_and_Safety (accessed Jan. 17, 2025).

[363] Von Hoff, D. D. , Ervin, T. , Arena, F. P. , Chiorean, E. G. , Infante, J. , Moore, M. , Seay, T. , Tjulandin, S. A. , Ma, W. W. , Saleh, M. N. , Harris, M. , Reni, M. , Dowden, S. , Laheru, D. , Bahary, N. , Ramanathan, R. K. , Tabernero, J. , Hidalgo, M. , Goldstein, D. , Van Cutsem, E. , Wei, X. , Iglesias, J. , and Renschler, M. F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine* **2013**, 369, 1691–1703.

[364] Caparello, C. , Meijer, L. L. , Garajova, I. , Falcone, A. , Large, T. Y. L. , Funel, N. , Kazemier, G. , Peters, G. J. , Vasile, E. , and Giovannetti, E. FOLFIRINOX and translational studies: Towards personalized therapy in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* **2016**, 22, 6987–7005.

[365] Conroy, T. , Desseigne, F. , Ychou, M. , Bouché, O. , Guimbaud, R. , Bécouarn, Y. , Adenis, A. , Raoul, J.-L. , Gourgou-Bourgade, S. , Fouchardière, C. de la , Bennouna, J. , Bachet, J.-B. , Khemissa-Akouz, F. , Péré-Vergé, D. , Delbaldo, C. , Assenat, E. , Chauffert, B. , Michel, P. , Montoto-Grillot, C. , Ducreux, M. , Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer, and PRODIGE Intergroup FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* **2011**, 364, 1817–1825.

[366] Golan, T. , Hammel, P. , Reni, M. , Van Cutsem, E. , Macarulla, T. , Hall, M. J. , Park, J.-O. , Hochhauser, D. , Arnold, D. , Oh, D.-Y. , Reinacher-Schick, A. , Tortora, G. , Algül, H. , O'Reilly, E. M. , McGuinness, D. , Cui, K. Y. , Schlienger, K. , Locker, G. Y. , and Kindler, H. L. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine* **2019**, 381, 317–327.

[367] Olaparib: A Novel Therapy for Metastatic Breast Cancer in Patients With a BRCA1/2 Mutation. https://www.jadpro.com/issues/volume-10-number-2-mar-2019/olaparib-a-novel-therapy-for-metastatic-breast-cancer-in-patients-with-a-brca12-mutation/ (accessed Jan. 17, 2025).

[368] Terranova Barberio, M. , Roca, M. , Zotti, A. , Leone, A. , Bruzzese, F. , Vitagliano, C. , Scogliamiglio, G. , Russo, D. , D'Angelo, G. , Franco, R. , Budillon, A. , and Digennaro, E. Valproic acid potentiates the anticancer activity of capecitabine in vitro and in vivo in breast cancer models via induction of thymidine phosphorylase expression. *Oncotarget* **2016**, 7

[369] Rose, M. , Kostyanovskaya, E. , and Huang, R. Pharmacogenomics of Cisplatin Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **2014**, 12

[370] Sharma, S. , Chowdhury, G. , and Chakrabarty, A. A Concise Overview of Chemotherapeutic Drugs in Gastrointestinal Cancers: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics* **2020**, 05

[371] Neoptolemos, J. P. , Kleeff, J. , Michl, P. , Costello, E. , Greenhalf, W. , and Palmer, D. H. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **2018**, 15, 333–348.

[372] Duronio, R. J. and Xiong, Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, 5, a008904.

[373] Orford, K. W. and Scadden, D. T. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature Reviews Genetics* **2008**, 9, 115–128.

[374] Israels, E. D. and Israels, L. G. The Cell Cycle. *The Oncologist* **2000**, 5, 510–513.

[375] https://www.houstonisd.org/cms/lib2/TX01001591/Centricity/Domain/27674/Unit%203_Chp%2010-cell%20Growth_Differentiation_Mitosis.pdf. https://www.houstonisd.org/cms/lib2/TX01001591/Centricity/Domain/27674/Unit%203_Chp%2010-cell%20Growth_Differentiation_Mitosis.pdf (accessed July 21, 2025).

[376] Marescal, O. and Cheeseman, I. M. Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Developmental cell* **2020**, 55, 259–271.

[377] Johnson, M. S. and Cook, J. G. Cell cycle exits and U-turns: Quiescence as multiple reversible forms of arrest. *Faculty Reviews* **2023**, 12, 5.

[378] Coller, H. A. , Sang, L. , and Roberts, J. M. A New Description of Cellular Quiescence. *PLOS Biology* **2006**, 4, e83.

[379] Wang, X. , Fujimaki, K. , Mitchell, G. C. , Kwon, J. S. , Della Croce, K. , Langsdorf, C. , Zhang, H. H. , and Yao, G. Exit from quiescence displays a memory of cell growth and division. *Nature Communications* **2017**, 8, 321.

[380] Elledge, S. J. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science* **1996**, 274, 1664–1672.

[381] Kastan, M. B. and Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **2004**, 432, 316–323.

[382] Murray, A. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology* **1994**, 6, 872–876.

[383] Rieder, C. L. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Research* **2011**, 19, 291–306.

[384] Molinari, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation* **2000**, 33, 261–274.

[385] Foster, I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography* **2008**, 14, 144–149.

[386] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, 100, 57–70.

[387] Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **2022**, 12, 31–46.

[388] Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2010**, 141, 1117–1134.

[389] Song, Y. , Bi, Z. , Liu, Y. , Qin, F. , Wei, Y. , and Wei, X. Targeting RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials. *Genes & Diseases* **2022**, 10, 76–88.

[390] Saxton, R. A. and Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **2017**, 168, 960–976.

[391] Glaviano, A. , Foo, A. S. C. , Lam, H. Y. , Yap, K. C. H. , Jacot, W. , Jones, R. H. , Eng, H. , Nair, M. G. , Makvandi, P. , Geoerger, B. , Kulke, M. H. , Baird, R. D. , Prabhu, J. S. , Carbone, D. , Pecoraro, C. , Teh, D. B. L. , Sethi, G. , Cavalieri, V. , Lin, K. H. , Javidi-Sharifi, N. R. , Toska, E. , Davids, M. S. , Brown, J. R. , Diana, P. , Stebbing, J. , Fruman, D. A. , and Kumar, A. P. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular Cancer* **2023**, 22, 138.

[392] Manning, G. , Whyte, D. B. , Martinez, R. , Hunter, T. , and Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, 298, 1912–1934.

[393] Ubersax, J. A. and Ferrell Jr, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, 8, 530–541.

[394] Cohen, P. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1, 309–315.

[395] Hunter, T. and Karin, M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **1992**, 70, 375–387.

[396] Taylor, S. S. and Kornev, A. P. Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins. *Trends in biochemical sciences* **2011**, 36, 65–77.

[397] Alganem, K. , Hamoud, A.-R. , Creeden, J. , Henkel, N. , Imami, A. , Joyce, A. , Ryan, W. , Rethman, J. , Shukla, R. , O'Donovan, S. M. , Meller, J. , and McCullumsmith, R. The Active Kinome: The Modern View of How Active Protein Kinase Networks Fit in Biological Research. *Current opinion in pharmacology* **2022**, 62, 117–129.

[398] Chandarlapaty, S. Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. *Cancer Discovery* **2012**, 2, 311–319.

[399] Trusolino, L. and Bertotti, A. Compensatory Pathways in Oncogenic Kinase Signaling and Resistance to Targeted Therapies: Six Degrees of Separation. *Cancer Discovery* **2012**, 2, 876–880.

[400] Rozengurt, E. , Soares, H. P. , and Sinnet-Smith, J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple over-activation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Molecular cancer therapeutics* **2014**, 13, 2477–2488.

[401] Bergholz, J. S. and Zhao, J. J. How compensatory mechanisms and adaptive rewiring have shaped our understanding of therapeutic resistance in cancer. *Cancer research* **2021**, 81, 6074–6077.

[402] Anderson, B. , Rosston, P. , Ong, H. W. , Hossain, M. A. , Davis-Gilbert, Z. W. , and Drewry, D. H. How many kinases are druggable? A review of our current understanding. *Biochemical Journal* **2023**, 480, 1331–1363.

[403] Miller, M. L. , Reznik, E. , Gauthier, N. P. , Aksoy, B. A. , Korkut, A. , Gao, J. , Ciriello, G. , Schultz, N. , and Sander, C. Pan-Cancer Analysis of Mutation Hotspots in Protein Domains. *Cell Systems* **2015**, 1, 197–209.

[404] Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacological Research* **2020**, 152, 104609.

[405] Zhang, J. , Yang, P. L. , and Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews. Cancer* **2009**, 9, 28–39.

[406] Asghar, U. , Witkiewicz, A. K. , Turner, N. C. , and Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2015**, 14, 130–146.

[407] Wu, P. , Nielsen, T. E. , and Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, 36, 422–439.

[408] Wu, P. , Nielsen, T. E. , and Clausen, M. H. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discovery Today* **2016**, 21, 5–10.

[409] Wilson, L. J. , Linley, A. , Hammond, D. E. , Hood, F. E. , Coulson, J. M. , MacEwan, D. J. , Ross, S. J. , Slupsky, J. R. , Smith, P. D. , Eyers, P. A. , and Prior, I. A. New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome. *Cancer Research* **2018**, 78, 15–29.

[410] Müller, S. , Chaikuad, A. , Gray, N. S. , and Knapp, S. The ins and outs of selective kinase inhibitor development. *Nature Chemical Biology* **2015**, 11, 818–821.

[411] Human Protein Kinases Overview. https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/human-protein-kinases-overview (accessed Dec. 18, 2024).

[412] Serrano, M. , Hannon, G. J. , and Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **1993**, 366, 704–707.

[413] Russo, A. A. , Tong, L. , Lee, J. O. , Jeffrey, P. D. , and Pavletich, N. P. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **1998**, 395, 237–243.

[414] Jeffrey, P. D. , Tong, L. , and Pavletich, N. P. Structural basis of inhibition of CDK–cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes & Development* **2000**, 14, 3115–3125.

[415] Day, P. J. , Cleasby, A. , Tickle, I. J. , O'Reilly, M. , Coyle, J. E. , Holding, F. P. , McMenamin, R. L. , Yon, J. , Chopra, R. , Lengauer, C. , and Jhoti, H. Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 4166–4170.

[416] Sherr, C. J. and Roberts, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* **2004**, 18, 2699–2711.

[417] Musgrove, E. A. , Caldon, C. E. , Barraclough, J. , Stone, A. , and Sutherland, R. L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2011**, 11, 558–572.

[418] Perry, J. E. , Grossmann, M. E. , and Tindall, D. J. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *The Prostate* **1998**, 35, 117–124.

[419] Totty, M. L. , Morrell, B. C. , and Spicer, L. J. Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) Regulation of Cyclin D1 and Cyclin-dependent Kinase-4 in Ovarian Granulosa and Theca Cells of Cattle. *Molecular and cellular endocrinology* **2017**, 440, 25–33.

[420] Yan, Y. X. , Nakagawa, H. , Lee, M. H. , and Rustgi, A. K. Transforming growth factor-alpha enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter. *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 33181–33190.

[421] Topacio, B. R. , Zatulovskiy, E. , Cristea, S. , Xie, S. , Tambo, C. S. , Rubin, S. M. , Sage, J. , Kõivomägi, M. , and Skotheim, J. M. Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix. *Molecular cell* **2019**, 74, 758-770.e4.

[422] Vasjari, L. , Bresan, S. , Biskup, C. , Pai, G. , and Rubio, I. Ras signals principally via Erk in G1 but cooperates with PI3K/Akt for Cyclin D induction and S-phase entry. *Cell Cycle* **2019**, 18, 204–225.

[423] Kim, J. K. and Diehl, J. A. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *Journal of cellular physiology* **2009**, 220, 292–296.

[424] Shtutman, M. , Zhurinsky, J. , Simcha, I. , Albanese, C. , D'Amico, M. , Pestell, R. , and Ben-Ze'ev, A. The cyclin D1 gene is a target of the β-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 5522–5527.

[425] Sherr, C. J. and Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* **1999**, 13, 1501–1512.

[426] Baker, S. J. and Reddy, E. P. CDK4. *Genes & Cancer* **2012**, 3, 658–669.

[427] Narasimha, A. M. , Kaulich, M. , Shapiro, G. S. , Choi, Y. J. , Sicinski, P. , and Dowdy, S. F. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife* **2014**, 3, e02872.

[428] Mode d'action du complexe Cycline D / Cdk4 sur la protéine Rb | Planet-Vie. https://planet-vie.ens.fr/media/2484 (accessed Jan. 19, 2025).

[429] Martín, J. , Hunt, S. L. , Dubus, P. , Sotillo, R. , Néhmé-Pélluard, F. , Magnuson, M. A. , Parlow, A. F. , Malumbres, M. , Ortega, S. , and Barbacid, M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* **2003**, 22, 5261–5269.

[430] Annicotte, J.-S. , Blanchet, E. , Chavey, C. , Iankova, I. , Costes, S. , Assou, S. , Teyssier, J. , Dalle, S. , Sardet, C. , and Fajas, L. The CDK4–pRB–E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nature Cell Biology* **2009**, 11, 1017–1023.

[431] Fajas, L. Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Frontiers in Oncology* **2013**, 3

[432] Abella, A. , Dubus, P. , Malumbres, M. , Rane, S. G. , Kiyokawa, H. , Sicard, A. , Vignon, F. , Langin, D. , Barbacid, M. , and Fajas, L. Cdk4 promotes adipogenesis through PPARγ activation. *Cell Metabolism* **2005**, 2, 239–249.

[433] Nardone, V. , Barbarino, M. , Angrisani, A. , Correale, P. , Pastina, P. , Cappabianca, S. , Reginelli, A. , Mutti, L. , Miracco, C. , Giannicola, R. , Giordano, A. , and Pirtoli, L. CDK4, CDK6/cyclin-D1 Complex Inhibition and Radiotherapy for Cancer Control: A Role for Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 8391.

[434] Bendris, N. , Lemmers, B. , and Blanchard, J. M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle* **2015**, 14, 1786–1798.

[435] Zelivianski, S. , Cooley, A. , Kall, R. , and Jeruss, J. S. CDK4-Mediated Phosphorylation Inhibits Smad3 Activity in Cyclin D Overexpressing Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research* **2010**, 8, 1375–1387.

[436] Lopez-Mejia, I. C. , Lagarrigue, S. , Giralt, A. , Martinez-Carreres, L. , Zanou, N. , Denechaud, P.-D. , Castillo-Armengol, J. , Chavey, C. , Orpinell, M. , Delacuisine, B. , Nasrallah, A. , Collodet, C. , Zhang, L. , Viollet, B. , Hardie, D. G. , and Fajas, L. CDK4 Phosphorylates AMPKα2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation. *Molecular Cell* **2017**, 68, 336-349.e6.

[437] Liu, L. , Wu, J. , Ong, S. S. , and Chen, T. Cyclin-dependent kinase 4 phosphorylates and positively regulates PAX3-FOXO1 in human alveolar rhabdomyosarcoma cells. *PloS One* **2013**, 8, e58193.

[438] Aggarwal, P. , Vaites, L. P. , Kim, J. K. , Mellert, H. , Gurung, B. , Nakagawa, H. , Herlyn, M. , Hua, X. , Rustgi, A. K. , McMahon, S. B. , and Diehl, J. A. Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell* **2010**, 18, 329–340.

[439] Peyressatre, M. , Prével, C. , Pellerano, M. , and Morris, M. C. Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. *Cancers* **2015**, 7, 179–237.

[440] Jirawatnotai, S. , Hu, Y. , Michowski, W. , Elias, J. E. , Becks, L. , Bienvenu, F. , Zagozdzon, A. , Goswami, T. , Wang, Y. E. , Clark, A. B. , Kunkel, T. A. , Harn, T. van , Xia, B. , Correll, M. , Quackenbush, J. , Livingston, D. M. , Gygi, S. P. , and Sicinski, P. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* **2011**, 474, 230–234.

[441] Rocco, J. W. and Sidransky, D. P16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Experimental Cell Research* **2001**, 264, 42–55.

[442] Ortega, S. , Malumbres, M. , and Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2002**, 1602, 73–87.

[443] Okamoto, A. , Demetrick, D. J. , Spillare, E. A. , Hagiwara, K. , Hussain, S. P. , Bennett, W. P. , Forrester, K. , Gerwin, B. , Serrano, M. , and Beach, D. H. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, 91, 11045–11049.

[444] Dickson, M. A. Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* **2014**, 20, 3379–3383.

[445] Ruas, M. and Peters, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1998**, 1378, F115–F177.

[446] Piepkorn, M. Melanoma genetics: An update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2000**, 42, 705–726.

[447] Roussel, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **1999**, 18, 5311–5317.

[448] Morris, M. Shining Light on Protein Kinase Biomarkers with Fluorescent Peptide Biosensors. *Life* **2022**, 12, 516.

[449] Giacinti, C. and Giordano, A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **2006**, 25, 5220–5227.

[450] Gore, A. J. , Deitz, S. L. , Palam, L. R. , Craven, K. E. , and Korc, M. Pancreatic cancer–associated retinoblastoma 1 dysfunction enables TGF-β to promote proliferation. *The Journal of Clinical Investigation* **2014**, 124, 338–352.

[451] Carrière, C. , Gore, A. J. , Norris, A. M. , Gunn, J. R. , Young, A. L. , Longnecker, D. S. , and Korc, M. Deletion of Rb accelerates pancreatic carcinogenesis by oncogenic Kras and impairs senescence in premalignant lesions. *Gastroenterology* **2011**, 141, 1091–1101.

[452] Gillett, C. , Fantl, V. , Smith, R. , Fisher, C. , Bartek, J. , Dickson, C. , Barnes, D. , and Peters, G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Research* **1994**, 54, 1812–1817.

[453] Molenaar, J. J. , Koster, J. , Zwijnenburg, D. A. , Sluis, P. van , Valentijn, L. J. , Ploeg, I. van der , Hamdi, M. , Nes, J. van , Westerman, B. A. , Arkel, J. van , Ebus, M. E. , Haneveld, F. , Lakeman, A. , Schild, L. , Molenaar, P. , Stroeken, P. , Noesel, M. M. van , Ora, I. , Santo, E. E. , Caron, H. N. , Westerhout, E. M. , and Versteeg, R. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* **2012**, 483, 589–593.

[454] Maitra, A. , Adsay, N. V. , Argani, P. , Iacobuzio-Donahue, C. , De Marzo, A. , Cameron, J. L. , Yeo, C. J. , and Hruban, R. H. Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray. *Modern Pathology* **2003**, 16, 902–912.

[455] Gansauge, S. , Gansauge, F. , Ramadani, M. , Stobbe, H. , Rau, B. , Harada, N. , and Beger, H. G. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Research* **1997**, 57, 1634–1637.

[456] Chakraborty, S. and Ghosh, S. CCND1 Amplification in Pancreatic Ductal and Ampullary Adenocarcinoma and Its Impact on Patients' Survival: a Single-Center Observational Study. *Indian Journal of Surgical Oncology* **2024**, 15, 226–231.

[457] Finn, R. S. , Crown, J. P. , Lang, I. , Boer, K. , Bondarenko, I. M. , Kulyk, S. O. , Ettl, J. , Patel, R. , Pinter, T. , Schmidt, M. , Shparyk, Y. , Thummala, A. R. , Voytko, N. L. , Fowst, C. , Huang, X. , Kim, S. T. , Randolph, S. , and Slamon, D. J. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *The Lancet. Oncology* **2015**, 16, 25–35.

[458] DeMichele, A. , Clark, A. S. , Tan, K. S. , Heitjan, D. F. , Gramlich, K. , Gallagher, M. , Lal, P. , Feldman, M. , Zhang, P. , Colameco, C. , Lewis, D. , Langer, M. , Goodman, N. , Domchek, S. , Gogineni, K. , Rosen, M. , Fox, K. , and O'Dwyer, P. CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **2015**, 21, 995–1001.

[459] Finn, R. S. , Martin, M. , Rugo, H. S. , Jones, S. , Im, S.-A. , Gelmon, K. , Harbeck, N. , Lipatov, O. N. , Walshe, J. M. , Moulder, S. , Gauthier, E. , Lu, D. R. , Randolph, S. , Diéras, V. , and Slamon, D. J. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* **2016**, 375, 1925–1936.

[460] Vora, S. R. , Juric, D. , Kim, N. , Mino-Kenudson, M. , Huynh, T. , Costa, C. , Lockerman, E. L. , Pollack, S. F. , Liu, M. , Li, X. , Lehar, J. , Wiesmann, M. , Wartmann, M. , Chen, Y. , Cao, Z. A. , Pinzon-Ortiz, M. , Kim, S. , Schlegel, R. , Huang, A. , and Engelman, J. A. CDK 4/6 inhibitors sensitize PIK3CA Mutant Breast Cancer to PI3K inhibitors. *Cancer cell* **2014**, 26, 136–149.

[461] Rondla, R. , PadmaRao, L. S. , Ramatenki, V. , Haredi-Abdel-Monsef, A. , Potlapally, S. R. , and Vuruputuri, U. Selective ATP competitive leads of CDK4: Discovery by 3D-QSAR pharmacophore mapping and molecular docking approach. *Computational Biology and Chemistry* **2017**, 71, 224–229.

[462] Khan, M. , Singh, K. , Khan, S. , Ahmad, B. , Khushal, A. , and Yingning, S. Computational exploration of allosteric inhibitors targeting CDK4/CDK6 proteins: a promising approach for multi-target drug development. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2025**, 43, 3783–3801.

[463] Fry, D. W. , Harvey, P. J. , Keller, P. R. , Elliott, W. L. , Meade, M. , Trachet, E. , Albassam, M. , Zheng, X. , Leopold, W. R. , Pryer, N. K. , and Toogood, P. L. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, 3, 1427–1438.

[464] Finn, R. S. , Dering, J. , Conklin, D. , Kalous, O. , Cohen, D. J. , Desai, A. J. , Ginther, C. , Atefi, M. , Chen, I. , Fowst, C. , Los, G. , and Slamon, D. J. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research : BCR* **2009**, 11, R77.

[465] Sevgin, B. , Coban, M. N. , Rencuzogullari, Ö. , Coker-Gurkan, A. , Obakan-Yerlikaya, P. , Uysal Onganer, P. , and Arisan, E. D. AMPK Is the Crucial Target for the CDK4/6 Inhibitors Mediated Therapeutic Responses in PANC-1 and MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cell Lines. *Stresses* **2021**, 1, 48–68.

[466] Liu, F. and Korc, M. Cdk4/6 Inhibition Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Enhances Invasiveness in Pancreatic Cancer Cells. *Molecular cancer therapeutics* **2012**, 11, 2138–2148.

[467] Heilmann, A. M. , Perera, R. M. , Ecker, V. , Nicolay, B. N. , Bardeesy, N. , Benes, C. H. , and Dyson, N. J. CDK4/6 and IGF1 Receptor Inhibitors Synergize to Suppress the Growth of p16INK4A-Deficient Pancreatic Cancers. *Cancer Research* **2014**, 74, 3947–3958.

[468] Cheng, K. , Zhou, Z. , Chen, Q. , Chen, Z. , Cai, Y. , Cai, H. , Wu, S. , Gao, P. , Cai, Y. , Zhou, J. , Wang, X. , Wu, Z. , and Peng, B. CDK4/6 inhibition sensitizes MEK inhibition by inhibiting cell cycle and proliferation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scientific Reports* **2024**, 14, 8389.

[469] Hortobagyi, G. N. , Stemmer, S. M. , Burris, H. A. , Yap, Y.-S. , Sonke, G. S. , Paluch-Shimon, S. , Campone, M. , Blackwell, K. L. , André, F. , Winer, E. P. , Janni, W. , Verma, S. , Conte, P. , Arteaga, C. L. , Cameron, D. A. , Petrakova, K. , Hart, L. L. , Villanueva, C. , Chan, A. , Jakobsen, E. , Nusch, A. , Burdaeva, O. , Grischke, E.-M. , Alba, E. , Wist, E. , Marschner, N. , Favret, A. M. , Yardley, D. , Bachelot, T. , Tseng, L.-M. , Blau, S. , Xuan, F. , Souami, F. , Miller, M. , Germa, C. , Hirawat, S. , and O'Shaughnessy, J. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* **2016**, 375, 1738–1748.

[470] Rader, J. , Russell, M. R. , Hart, L. S. , Nakazawa, M. S. , Belcastro, L. T. , Martinez, D. , Li, Y. , Carpenter, E. L. , Attiyeh, E. F. , Diskin, S. J. , Kim, S. , Parasuraman, S. , Caponigro, G. , Schnepp, R. W. , Wood, A. C. , Pawel, B. , Cole, K. A. , and Maris, J. M. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **2013**, 19, 6173–6182.

[471] Weinberg, B. A. , Wang, H. , Witkiewicz, A. K. , Marshall, J. L. , He, A. R. , Vail, P. , Knudsen, E. S. , and Pishvaian, M. J. A Phase I Study of Ribociclib Plus Everolimus in Patients with Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Refractory to Chemotherapy. *Journal of Pancreatic Cancer* **2020**, 6, 45–54.

[472] Novartis Pharmaceuticals A Phase I/II Study of Safety and Efficacy of Ribociclib (LEE011) in Combination With Trametinib (TMT212) in Patients With Metastatic or Advanced Solid Tumors. (2020).

[473] Gelbert, L. M. , Cai, S. , Lin, X. , Sanchez-Martinez, C. , Del Prado, M. , Lallena, M. J. , Torres, R. , Ajamie, R. T. , Wishart, G. N. , Flack, R. S. , Neubauer, B. L. , Young, J. , Chan, E. M. , Iversen, P. , Cronier, D. , Kreklau, E. , and Dios, A. de Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs* **2014**, 32, 825–837.

[474] Dhir, T. , Schultz, C. W. , Jain, A. , Brown, S. Z. , Haber, A. , Goetz, A. , Xi, C. , Su, G. H. , Xu, L. , Posey, J. , Jiang, W. , Yeo, C. J. , Golan, T. , Pishvaian, M. J. , and Brody, J. R. Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with HuR and YAP1 inhibition. *Molecular cancer research : MCR* **2019**, 17, 2029–2041.

[475] Chiorean, E. G. , Picozzi, V. , Li, C.-P. , Peeters, M. , Maurel, J. , Singh, J. , Golan, T. , Blanc, J.-F. , Chapman, S. C. , Hussain, A. M. , Johnston, E. L. , and Hochster, H. S. Efficacy and safety of abemaciclib alone and with PI3K/mTOR inhibitor LY3023414 or galunisertib versus chemotherapy in previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma: A randomized controlled trial. *Cancer Medicine* **2023**, 12, 20353–20364.

[476] Eli Lilly and Company An Adaptive, Open-Label, Randomized Phase 2 Study of Abemaciclib as a Monotherapy and in Combination With Other Agents Versus Choice of Standard of Care (Gemcitabine or Capecitabine) in Patients With Previously Treated Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. (2019).

[477] Arsenijevic, T. , Coulonval, K. , Raspé, E. , Demols, A. , Roger, P. P. , and Van Laethem, J.-L. CDK4/6 Inhibitors in Pancreatobiliary Cancers: Opportunities and Challenges. *Cancers* **2023**, 15, 968.

[478] Silvis, M. R. , Silva, D. , Rohweder, R. , Schuman, S. , Gudipaty, S. , Truong, A. , Yap, J. , Affolter, K. , McMahon, M. , and Kinsey, C. MYC-mediated resistance to trametinib and HCQ in PDAC is overcome by CDK4/6 and lysosomal inhibition. *Journal of Experimental Medicine* **2023**, 220, e20221524.

[479] Shapiro, G. , Rosen, L. S. , Tolcher, A. W. , Goldman, J. W. , Gandhi, L. , Papadopoulos, K. P. , Tolaney, S. M. , Beeram, M. , Rasco, D. W. , Kulanthaivel, P. , Li, Q. , Hu, T. , Cronier, D. , Chan, E. M. , Flaherty, K. , Wen, P. Y. , and Patnaik, A. A first-in-human phase I study of the CDK4/6 inhibitor, LY2835219, for patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, 31, 2500–2500.

[480] Tolaney, S. M. , Rosen, L. S. , Beeram, M. , Goldman, J. W. , Gandhi, L. , Tolcher, A. W. , Papadopoulos, K. P. , Rasco, D. W. , Myrand, S. P. , Kulanthaivel, P. , Andrews, J. M. , Frenzel, M. , Cronier, D. M. , Chan, E. M. , Flaherty, K. T. , Wen, P. Y. , Shapiro, G. I. , and Patnaik, A. Abstract P5-19-13: Clinical activity of abemaciclib, an oral cell cycle inhibitor, in metastatic breast cancer. *Cancer Research* **2015**, 75, P5-19-13-P5-19–13.

[481] O'Leary, B. , Finn, R. S. , and Turner, N. C. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews. Clinical Oncology* **2016**, 13, 417–430.

[482] Herrera-Abreu, M. T. , Palafox, M. , Asghar, U. , Rivas, M. A. , Cutts, R. J. , Garcia-Murillas, I. , Pearson, A. , Guzman, M. , Rodriguez, O. , Grueso, J. , Bellet, M. , Cortés, J. , Elliott, R. , Pancholi, S. , Baselga, J. , Dowsett, M. , Martin, L.-A. , Turner, N. C. , and Serra, V. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Research* **2016**, 76, 2301–2313.

[483] Wander, S. A. , Cohen, O. , Gong, X. , Johnson, G. N. , Buendia-Buendia, J. E. , Lloyd, M. R. , Kim, D. , Luo, F. , Mao, P. , Helvie, K. , Kowalski, K. J. , Nayar, U. , Waks, A. G. , Parsons, S. H. , Martinez, R. , Litchfield, L. M. , Ye, X. S. , Yu, C. , Jansen, V. M. , Stille, J. R. , Smith, P. S. , Oakley, G. J. , Chu, Q. S. , Batist, G. , Hughes, M. E. , Kremer, J. D. , Garraway, L. A. , Winer, E. P. , Tolaney, S. M. , Lin, N. U. , Buchanan, S. G. , and Wagle, N. The Genomic Landscape of Intrinsic and Acquired Resistance to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Patients with Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discovery* **2020**, 10, 1174–1193.

[484] Yang, C. , Li, Z. , Bhatt, T. , Dickler, M. , Giri, D. , Scaltriti, M. , Baselga, J. , Rosen, N. , and Chandarlapaty, S. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene* **2017**, 36, 2255–2264.

[485] Hsu, J. Y. , Seligson, N. D. , Hays, J. L. , Miles, W. O. , and Chen, J. L. Clinical Utility of CDK4/6 Inhibitors in Sarcoma: Successes and Future Challenges. *JCO Precision Oncology* **2022**, 6, e2100211.

[486] Pandey, K. , Park, N. , Park, K.-S. , Hur, J. , Cho, Y. B. , Kang, M. , An, H.-J. , Kim, S. , Hwang, S. , and Moon, Y. W. Combined CDK2 and CDK4/6 Inhibition Overcomes Palbociclib Resistance in Breast Cancer by Enhancing Senescence. *Cancers* **2020**, 12, 3566.

[487] Patel, P. , Tsiperson, V. , Gottesman, S. R. S. , Somma, J. , and Blain, S. W. Dual Inhibition of CDK4 and CDK2 via Targeting p27 Tyrosine Phosphorylation Induces a Potent and Durable Response in Breast Cancer Cells. *Molecular cancer research: MCR* **2018**, 16, 361–377.

[488] Sanchez-Martinez, C. , Gelbert, L. M. , Shannon, H. , De Dios, A. , Staton, B. A. , Ajamie, R. T. , Sawada, G. , Wishart, G. N. , and Raub, T. J. Abstract B234: LY2835219, a potent oral inhibitor of the cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) that crosses the blood-brain barrier and demonstrates in vivo activity against intracranial human brain tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **2011**, 10, B234.

[489] Schultz, K. A. P. , Petronio, J. , Bendel, A. , Patterson, R. , and Vaughn, D. J. PD0332991 (palbociclib) for treatment of pediatric intracranial growing teratoma syndrome. *Pediatric Blood & Cancer* **2015**, 62, 1072–1074.

[490] Rampioni Vinciguerra, G. L. , Sonego, M. , Segatto, I. , Dall'Acqua, A. , Vecchione, A. , Baldassarre, G. , and Belletti, B. CDK4/6 Inhibitors in Combination Therapies: Better in Company Than Alone: A Mini Review. *Frontiers in Oncology* **2022**, 12

[491] Kjoe, P. R. L. M. , Wall, E. van der , and Schagen, S. B. Endocrine Therapy With or Without CDK4/6 Inhibitors in Women With Hormone-receptor Positive Breast Cancer: What do we Know About the Effects on Cognition? *Clinical Breast Cancer* **2022**, 22, 191–199.

[492] Dall'Acqua, A. , Sonego, M. , Pellizzari, I. , Pellarin, I. , Canzonieri, V. , D'Andrea, S. , Benevol, S. , Sorio, R. , Giorda, G. , Califano, D. , Bagnoli, M. , Militello, L. , Mezzanzanica, D. , Chiappetta, G. , Armenia, J. , Belletti, B. , Schiappacassi, M. , and Baldassarre, G. CDK6 protects epithelial ovarian cancer from platinum-induced death via FOXO3 regulation. *EMBO molecular medicine* **2017**, 9, 1415–1433.

[493] Salvador-Barbero, B. , Álvarez-Fernández, M. , Zapatero-Solana, E. , El Bakkali, A. , Menéndez, M. D. C. , López-Casas, P. P. , Di Domenico, T. , Xie, T. , VanArsdale, T. , Shields, D. J. , Hidalgo, M. , and Malumbres, M. CDK4/6 Inhibitors Impair Recovery from Cytotoxic Chemotherapy in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2020**, 37, 340-353.e6.

[494] Johnson, S. M. , Torrice, C. D. , Bell, J. F. , Monahan, K. B. , Jiang, Q. , Wang, Y. , Ramsey, M. R. , Jin, J. , Wong, K.-K. , Su, L. , Zhou, D. , and Sharpless, N. E. Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *The Journal of Clinical Investigation* **2010**, 120, 2528–2536.

[495] He, S. , Roberts, P. J. , Sorrentino, J. A. , Bisi, J. E. , Storrie-White, H. , Tiessen, R. G. , Makhuli, K. M. , Wargin, W. A. , Tadema, H. , Hoogdalem, E.-J. van , Strum, J. C. , Malik, R. , and Sharpless, N. E. Transient CDK4/6 inhibition protects hematopoietic stem cells from chemotherapy-induced exhaustion. *Science Translational Medicine* **2017**, 9, eaal3986.

[496] Karimzadeh, S. , Safaei, B. , and Jen, T.-C. Theorical investigation of adsorption mechanism of doxorubicin anticancer drug on the pristine and functionalized single-walled carbon nanotube surface as a drug delivery vehicle: A DFT study. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, 322, 114890.

[497] Dehneshin, N. , Raissi, H. , Hasanzade, Z. , and Farzad, F. Using molecular dynamics simulation to explore the binding of the three potent anticancer drugs sorafenib, streptozotocin, and sunitinib to functionalized carbon nanotubes. *Journal of Molecular Modeling* **2019**, 25, 159.

[498] Rezazade, M. , Ketabi, S. , and Qomi, M. Effect of functionalization on the adsorption performance of carbon nanotube as a drug delivery system for imatinib: molecular simulation study. *BMC Chemistry* **2024**, 18, 85.

[499] Haghi, A. , Raissi, H. , Hashemzadeh, H. , and Farzad, F. Development of the poly(l-histidine) grafted carbon nanotube as a possible smart drug delivery vehicle. *Computers in Biology and Medicine* **2022**, 143, 105336.

[500] Yang, Z. , Zhang, Y. , Yang, Y. , Sun, L. , Han, D. , Li, H. , and Wang, C. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, 6, 427–441.

[501] Madani, S. Z. M. , Safaee, M. M. , Gravely, M. , Silva, C. , Kennedy, S. , Bothun, G. D. , and Roxbury, D. Carbon Nanotube–Liposome Complexes in Hydrogels for Controlled Drug Delivery via Near-Infrared Laser Stimulation. *ACS Applied Nano Materials* **2021**, 4, 331–342.

[502] Assali, M. , Kittana, N. , Dayyeh, S. , and Khiar, N. Dual covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes for effective targeted cancer therapy. *Nanotechnology* **2021**, 32, 205101.

[503] Arabian, T. , Amjad-Iranagh, S. , and Halladj, R. Molecular dynamics simulation study of doxorubicin adsorption on functionalized carbon nanotubes with folic acid and tryptophan. *Scientific Reports* **2021**, 11, 24210.

[504] Wolski, P. , Nieszporek, K. , and Panczyk, T. Cytosine-Rich DNA Fragments Covalently Bound to Carbon Nanotube as Factors Triggering Doxorubicin Release at Acidic pH. A Molecular Dynamics Study. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 8466.

[505] Ghoderao, P. , Sahare, S. , Alegaonkar, P. , Kulkarni, A. A. , and Bhave, T. Multiwalled Carbon Nanotubes Decorated with Fe3O4 Nanoparticles for Efficacious Doxycycline Delivery. *ACS Applied Nano Materials* **2019**, 2, 607–616.

[506] Gangrade, A. and Mandal, B. B. Injectable Carbon Nanotube Impregnated Silk Based Multifunctional Hydrogel for Localized Targeted and On-Demand Anticancer Drug Delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2019**, 5, 2365–2381.

[507] Reddy, S. T. , Rehor, A. , Schmoekel, H. G. , Hubbell, J. A. , and Swartz, M. A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2006**, 112, 26–34.

[508] Liu, Y. , Ng, K.-Y. , and Lillehei, K. O. Cell-Mediated Immunotherapy: A New Approach to the Treatment of Malignant Glioma. *Cancer Control* **2003**, 10, 138–147.

VI. Matériaux et Méthodes

VI.1. Matériaux

VI.1.1. SWNT

Les nanotubes de carbone mono-feuillets (SWNT) utilisés dans cette thèse proviennent tous du même échantillon initial d'1 g. Il s'agit de SWNT achetés chez NanoIntegris et synthétisés par la méthode « *High-pressure carbon monoxyde* » (HiPCO), une méthode de synthèse par CVD dans laquelle le gaz carboné composé de CO et de pentacarbonyle de fer ($Fe(CO)_5$) est décomposé à haute pression (entre 10 et 100 atm) et à haute température (environ 1000°C). Le $Fe(CO)_5$ se décompose en Fe et CO, le fer sert ensuite de catalyseur, tandis que le CO fournit le carbone nécessaire à la croissance des SWNT [1]. Ces nanotubes sont purifiés par traitement acide par Nanointegris et utilisés tels quels. Ce traitement acide repose sur une séquence d'oxydations par acide nitrique concentré, suivie de lavages et de filtrations, qui visent à dissoudre les particules catalytiques de fer résiduelles et à éliminer le carbone amorphe formé en parallèle de la croissance [2]. Le fabriquant rapporte une concentration de catalyseurs résiduels (Fe) inférieure à 15 wt%. Ils présentent des diamètres compris entre 0,8 et 1,2 nm et des longueurs comprises entre 100 et 1000 nm (valeurs mesurées respectivement par TEM et AFM chez Unidym). D'après le fabriquant, il s'agit d'une poudre sèche de nanotubes regroupés en fagots, d'une masse volumique de maximum 1,6 $g.cm^{-3}$ et d'une surface spécifique maximum de 1315 $m^2.g^{-1}$, correspondant aux SWNT individuels. La surface spécifique par BET indiquée est quant à elle entre 400 et 1000 $m^2.g^{-1}$ [3].

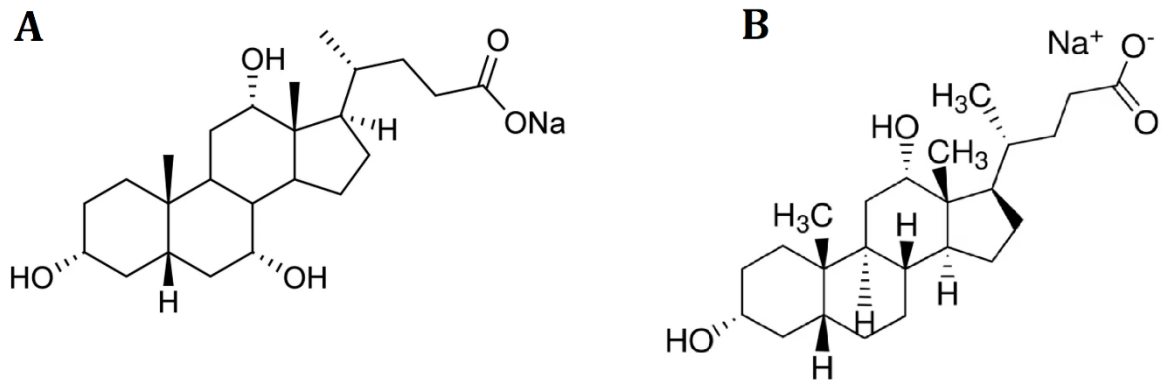
VI.1.2. Tensio-actifs et agents dispersants

Les SWNT utilisés étant sous forme de poudre et agglomérés en faisceaux dans l'échantillon initial, ils sont dispersés dans des suspensions aqueuses en utilisant divers agents dispersants. Une suspension aqueuse de SWNT est définie comme une dispersion stable de SWNT, individualisés ou en petits faisceaux, maintenus dans l'eau sans décantation notable grâce à des tensio-actifs, des polymères ou des groupements hydrophiles sur leurs parois. La dispersion en SWNT individuels est une première étape

courante dans la préparation de complexes à base de SWNT [4],[5]. Trois dispersants sont utilisés ici, les sels biliaires, le dodécylsulfate de sodium et la carboxymethylcellulose.

VI.1.2.1. Sels biliaires

Les sels biliaires (BS pour « *bile salts* ») utilisés ici en tant que tensioactifs sont un mélange massique de 50% de cholate de sodium (SC) et de 50% de désoxycholate de sodium (DOC) achetés chez Sigma-Aldrich. La structure chimique de ces deux molécules est présentée dans la Figure VI-1. Ce tensio-actif est un surfactant ionique, connu dans la littérature comme l'un des meilleurs dispersants de SWNT qui s'adsorbe à la surface des nanotubes, formant une couche compacte. [6] Les molécules s'alignent en anneaux perpendiculaires à l'axe du SWNT, la face stéroïdienne hydrophobe plaquée contre la paroi du SWNT, tandis que les hydroxyles et le carboxylate pointent vers l'eau donnant un feuillet monomoléculaire très ordonné [7]. La principale différence entre les deux est la présence d'une fonction hydroxyle supplémentaire pour le cholate de sodium, responsable de l'augmentation du caractère hydrophile de la molécule.

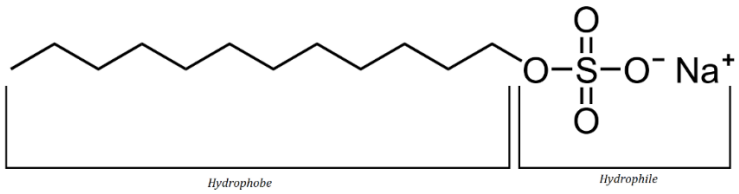


<u>Figure VI-1 :</u> Structures chimiques du cholate de sodium (A) et du désoxycholate de sodium (B)

VI.1.2.2. Dodécylsulfate de sodium

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un autre dispersant tensioactif couramment utilisé pour disperser les SWNT. [8],[9] Il est acheté chez Sigma-Aldrich et sa structure chimique

est présentée en Figure VI-2. Il s'agit d'une courte molécule amphiphile linéaire présentant une chaîne n-alkyle hydrophobe et flexible de 12 atomes de carbone, et une tête hydrophile chargée (groupe sulfate) qui assure la répulsion électrostatique entre les SWNT dispersés. A la surface des SWNT, le SDS s'auto-associe en une enveloppe micellaire dense autour des tubes. [10],[11],[12].



SDS

Figure VI-2 : Structure chimique du dodécylsulfate de sodium (SDS)

VI.1.2.3. Carboxyméthylcellulose

La carboxyméthylcellulose (CMC) est un dérivé hydrosoluble de la cellulose caractérisé par la présence de groupements carboxyméthyles sur les groupements hydroxyles des monomères de glucopyranose, lui conférant une solubilité aqueuse de 40 $mg.mL^{-1}$. Elle possède ainsi une excellente stabilité en solution aqueuse sous forme de chaînes individuelles étendues, avec seulement des associations faibles et réversibles qui confèrent une viscosité entre 50 et 200 cP (4% dans l'eau à 25°C). Comme le montre la Figure VI-3, il s'agit d'un polyélectrolyte s'enroulant autour des SWNT de manière lâche [13],[14] (à la différence des dispersants ioniques) en se fixant par des interactions électrostatiques sur la surface des SWNT, réduisant l'agrégation entre ces derniers.

En effet, ses segments cellulosiques hydrophobes s'adsorbent le long du nanotube, tandis que les chaînes chargées se déploient dans l'eau. Ceci conduit à un enroulement hélicoïdal peu compact, laissant une partie de la surface des SWNT non couverte. Ici, un sel de sodium carboxyméthylcellulose (CMC-Na) est utilisé, avec un degré de substitution du groupe carboxyméthyle par unité d'anhydroglucose entre 0,65 et 0,9, acheté chez Sigma-Aldrich (https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/c5678).

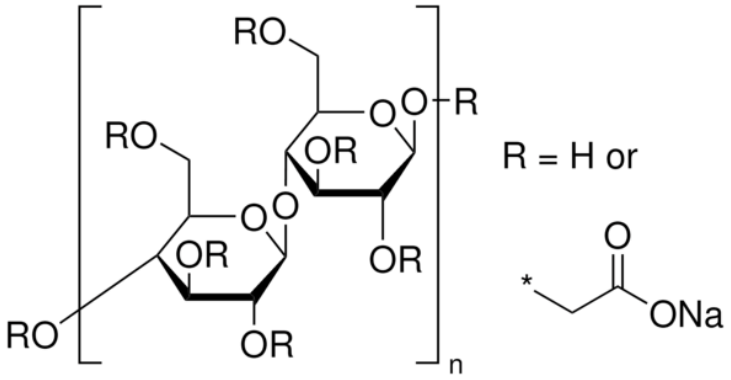


Figure VI-3 : Structure chimique d'un sel de sodium-carboxyméthylcellulose (CMC-Na), remplacés

VI.1.2.4. Préparation des dispersions aqueuses de SWNT

Trois dispersants sont utilisés : les sels biliaires (BS), le dodécylsulfate de sodium (SDS) et la carboxyméthylcellulose (CMC).

200 mg de dispersant sont dissous dans 20 mL d'eau déionisée pour obtenir une solution à 1 wt%. 20 mg de SWNT HiPCO sont ensuite ajoutés en boîte à gants afin d'obtenir une suspension a 0,1 wt% de SWNT et à 1 wt% de dispersant. La manipulation doit être réalisée en boîte à gants afin de protéger l'opérateur, les SWNT sous forme de poudre étant volatiles et pouvant facilement pénétrer dans le corps humain par voie respiratoire ou à travers les pores de la peau [15],[16]. La suspension obtenue contient alors des fagots de nanotubes agrégés entre eux dans la solution aqueuse de dispersant (Figure VI-4A). Elle est ensuite ultrasoniquée à l'aide d'une sonde Vibra cell 75455 Bioblock Scientifique, au rythme d'une pulsation de 45 W d'1 s toutes les 2 s pendant 1 h. Pendant la sonication, l'échantillon est placé dans un bain de glace pour éviter la surchauffe. Ce traitement par ultrasonication favorise l'exfoliation des fagots en nanotubes individuels ou en petits faisceaux, en générant localement des gradients de pression suffisamment intenses pour surmonter les forces de van der Waals responsables de l'agrégation. Toutefois, l'exfoliation n'est jamais totale : même après une heure de sonication, une fraction résiduelle de nanotubes demeure sous forme d'agrégats. Ainsi, l'efficacité de l'exfoliation dépend non seulement des paramètres de sonication (puissance, temps, régime pulsé) mais aussi des caractéristiques intrinsèques des SWNT utilisés (longueur, degré de pureté). Par ailleurs, une sonication prolongée ou trop énergique entraîne la réduction de la longueur moyenne

des nanotubes : sous l'effet des forces mécaniques induites par la cavitation, les SWNT subissent des ruptures mécaniques localisées, générant des nanotubes plus courts et introduisant potentiellement des défauts structuraux aux extrémités ou sur les parois [17],[18],[19],[20]. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 1 h à 18335 g (rayon maximal du rotor 7,8 cm, angle 30°, vitesse de rotation 14500 tr/min) avec ralentissement lent à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire Sigma 3-15 Bioblock Scientific. Enfin, environ 80% du surnageant est récupéré, en prenant garde à ne pas agiter la suspension afin de ne pas resolubiliser les agrégats, et une suspension homogène à l'échelle colloïdale (microscopique) de SWNT est obtenue (Figure VI-4B). Les dispersions mères SWNT/CMC sont ensuite conservées au réfrigérateur à 4°C.

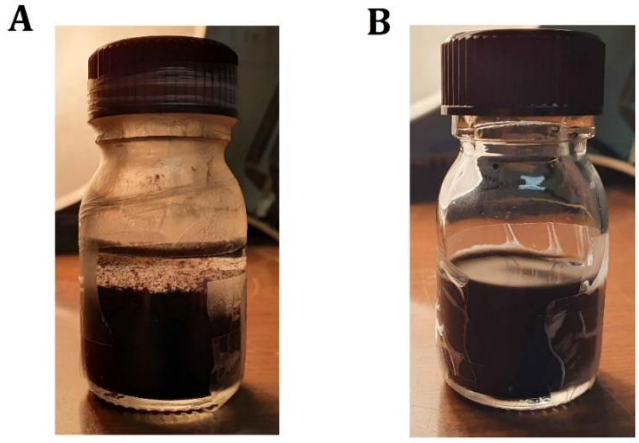


Figure VI-4 : Suspensions aqueuses de SWNT (0,1 wt%) dispersés avec du CMC (1 wt%) avant (A) et après (B) sonication et centrifugation

Ce protocole décrit comment obtenir une suspension à 0,1 wt% de SWNT et 1 wt% de dispersant initiaux car ce sont les plus largement utilisées dans ce projet, mais d'autres rapports de masses ont pu être préparés, en changeant simplement les masses initiales : 0,1wt%/0,01wt%, 0,1wt/0,1wt%, 0,1wt%/2wt% et 0,1%/5wt% de SWNT et de dispersant respectivement. De plus, pour les utilisations ultérieures, les suspensions de SWNT à 0,1 wt% initiaux sont dilués 200 fois pour obtenir 5.10^{-4} wt%, en dessous du seuil de toxicité envers les cellules PANC1 (déterminé expérimentalement à 10^{-3} wt%). La concentration finale en SWNT est estimée à partir de l'absorbance mesurée à 650 nm après centrifugation à partir de la loi de Beer-Lambert et d'un coefficient d'extinction de 200 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ [21].

VI.1.3. Petites molécules à visée thérapeutique anticancéreuse

Dans le cadre de cette thèse, deux composés sélectionnés sont des drogues à visée thérapeutique anticancéreuse qui sont utilisées en clinique pour le traitement de différents cancers. La Doxorubicine est essentiellement employée dans les traitements de lymphomes et de leucémies et parfois en combinaison avec d'autres drogues pour d'autres cancers. L'Abemaciclib est quant à elle essentiellement utilisée pour le traitement du cancer du sein en combinaison avec d'autres agents, et pour lequel différentes études suggèrent un potentiel pour le traitement de cancers du poumon et du pancréas [22],[23],[24],[25],[26],[27],[28],[29],[30],[31].

VI.1.3.1. Doxorubicine

La Doxorubicine (DOX, adriamycine) est un agent thérapeutique anti-cancéreux de la famille des anthracyclines, isolé à partir de souches de *Streptomyces peucetius*. Ses propriétés physico-chimiques incluent une très faible solubilité dans l'eau (inférieure à 1 $mg.mL^{-1}$) et une structure poly-aromatique favorisant les interactions π-π, nécessitant une dissolution dans le DMSO.

Sous forme de sel chlorhydrate, DOX-HCl, sa solubilité dans l'eau augmente jusqu'à environ 50 $mg.mL^{-1}$ (https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/d1515). Les deux structures sont comparées sur la Figure VI-5.

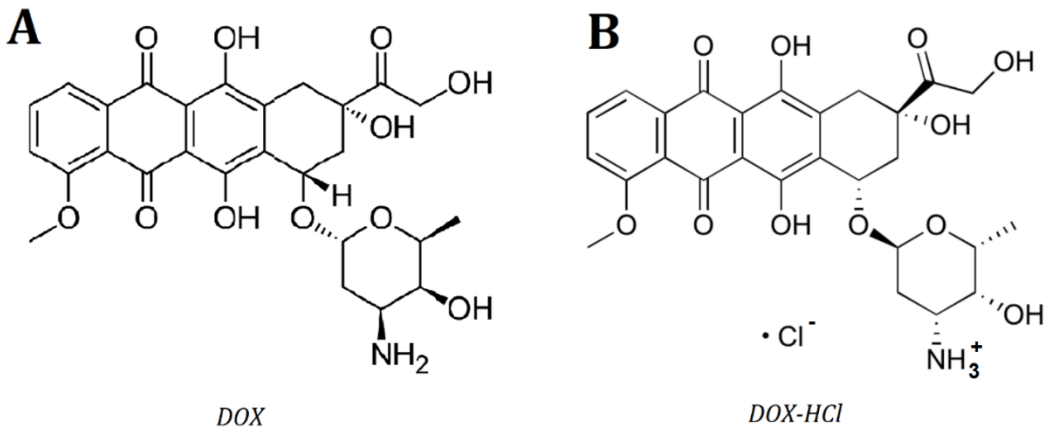


Figure VI-5 : Structures chimiques de la Doxorubicine (A) et de la Doxorubicine-HCl (B)

La Doxorubicine se compose d'un chromophore anthracyclinique tétracyclique plan, porteur de fonctions carbonyle et méthoxy conjuguées, couplé par liaison O-glycosidique à une L-daunosamine dont l'amino-groupe ($pK_a \approx 8.3$) est protonable. La forme chlorhydrate correspond à la protonation de cette amine.

Elle a de plus été très largement étudiée dans la littérature, notamment pour ses propriétés spectroscopiques : [32],[33],[34].

Cependant, en solution, la Doxorubicine n'est pas dissoute uniquement sous forme de molécules individuelles (monomères) car elle possède des propriétés d'auto-association [35],[36].

Dans le modèle le plus simple envisageable, valable aux faibles concentrations auxquelles nous travaillons, la réaction de dimérisation de la Doxorubicine correspond à un équilibre chimique classique :

$$DOX_m + DOX_m \rightleftarrows DOX_d \qquad [VI\text{-}1]$$

Où DOX_m correspond aux monomères de Doxorubicine et DOX_d aux dimères, avec une constante d'équilibre :

$$K_D = \frac{[D]}{[M]^2} \qquad [VI\text{-}2]$$

Dont la valeur typique varie entre 10^4 et 10^5 $L.mol^{-1}$.

Lors de la préparation d'une solution de Doxorubicine de concentration totale C, la conservation de la masse implique :

$$C = 2[D] + [M] \qquad [VI\text{-}3]$$

Donc :

$$2K_D[M]^2 + [M] - C = 0 \qquad [VI\text{-}4]$$

Qui donne :

$$[M] = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8K_D C}}{4K_D} \qquad [VI\text{-}5]$$

$$[D] = \frac{1 + 4CK_D - \sqrt{1 + 8K_D C}}{8K_D} \qquad [VI\text{-}6]$$

VI.1.3.2. Abemaciclib

L'Abemaciclib (Ab, LY2835219) est un inhibiteur sélectif des kinases cycline-dépendantes 4 et 6 (CDK4/6) [25],[26],[27],[28],[29],[30].

Sa structure est présentée en Figure VI-6.

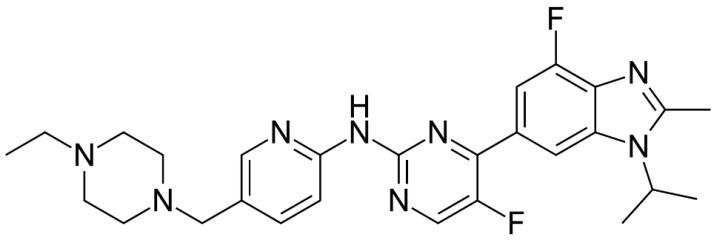


Figure VI-6 : Structure chimique de l'Abemaciclib

Les échantillons sont achetés chez Euromedex (https://shopresearch.euromedex.com/btREC/control/product?productId=REC_SE-S5716-25MG). Sa charpente se construit autour d'un cœur 2-aminopyrimidinique disubstitué : en position 4, un benzimidazole ortho-méthyl/isopropyl di-fluoré accroît la lipophilie et fournit des contacts halogène-π, tandis qu'en position 5, un fragment 2-pyridyle porte une éthyl-pipérazine basique qui améliore la solubilité. La molécule totalise trois donneurs et huit accepteurs de liaisons hydrogène, une surface polaire d'environ 107 $Å^2$ (https://go.drugbank.com/drugs/DB12001) [37]. Dans l'eau, sa solubilité est inférieure à 1 $mg.mL^{-1}$, mais dans une solution aqueuse de DMSO à 1 wt%, elle augmente, entre 2 et 10 $mg.mL^{-1}$ (http://seo.selleckchem.com/datasheet/Abemaciclib-S571604-DataSheet.html).

VI.1.3.3. Adsorption de drogues sur les complexes SWNT/CMC

VI.1.3.3.1. Protocole d'adsorption de la Doxorubicine

2 mg de poudre DOX-HCl sont dissous dans 2 mL d'eau déionisée pour une solution stock (GM) de DOX-HCl à 0,1 wt% dans un vial en verre, protégé de la lumière avec du papier aluminium [38] et conservée au réfrigérateur à 5°C. La solution GM de DOX-HCl est ensuite filtrée sur un filtre micropores de 0,22 µm en polycarbonate pour retirer les éventuels agrégats qui pourraient altérer les futures mesures spectroscopiques et de quantification [39],[40],[41].

Selon le rapport de masse DOX/SWNT désiré pour le complexe SWNT/CMC/DOX, différents volumes de la solution GM de DOX-HCl sont mélangés avec 1,5 mL de la suspension de SWNT à 5.10^{-4} wt%, préalablement soniquée en bain pendant 20 min pour redisperser les éventuels agrégats. De l'eau déionisée est ensuite rajoutée pour atteindre 3 mL et une concentration en SWNT de $2{,}5.10^{-4}$ wt%. Ce mélange est réalisé lui aussi dans un vial en verre entouré de papier aluminium. Les rapports de masse DOX/SWNT étudiés sont compris entre 0,01 à 100. Après le mélange, le complexe est laissé au repos pendant 1 h au réfrigérateur à 5°C le temps que l'adsorption soit terminée. Cette adsorption est suivie à chaque étape par des mesures en spectroscopie d'absorption, de fluorescence et Raman/PL. La conservation se fait ensuite au réfrigérateur à 5°C.

Étant donné l'affinité de la DOX-HCl avec les surfaces en verre et son adsorption [42], un soin extrême est apporté à la préparation des solutions et à l'utilisation des cuvettes (les flacons et les pipettes sont réutilisés pour chaque échantillon) afin de minimiser l'incertitude sur la concentration de la DOX-HCl qui est d'environ 3 µM.

VI.1.3.3.2. Protocole d'adsorption de l'Abemaciclib

L'Abemaciclib n'étant pas soluble dans l'eau, 2 mg d'Abemaciclib sont dissous dans 2 mL de DMSO pour une solution stock (GM) d'Abemaciclib à 0,1 wt%. Le protocole d'adsorption de l'Abemaciclib sur SWNT est le même que pour la Doxorubicine, à la différence du solvant initial. Sa conservation se fait aussi au réfrigérateur à 5°C.

VI.1.4. Lignée cellulaire

VI.1.4.1. Lignée cellulaire PANC-1

La lignée cellulaire PANC-1 (ATCC® CRL-1469™, https://www.atcc.org/products/crl-1469) est une lignée humaine de carcinome canalaire pancréatique [43]. Elle est fréquemment utilisée pour caractériser des composés à visée thérapeutique [44]. Sur le plan génétique, PANC-1 présente notamment des mutations de KRAS, de TP53 et d'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. [45],[46],[47] Outre sa forte capacité proliférative, cette lignée est également connue pour son comportement invasif, ce qui en fait un outil pertinent pour évaluer les processus métastatiques [48]. La culture de PANC-1 est généralement réalisée dans du milieu DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium ») complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), sous une atmosphère à 37 °C et 5 % de CO_2 (https://www.atcc.org/products/crl-1469).

Des cellules de la lignée cellulaire PANC-1 sont décongelées et cultivées dans un milieu DMEM avec 10% de SVF, 100 $U.mL^{-1}$ de pénicilline et 100 $\mu g.mL^{-1}$ de streptomycine afin d'éviter les contaminations bactériennes [49]. Les flasques de culture sont placées dans une étuve humidifiée à 37 °C avec une atmosphère contrôlée contenant 5 % de CO_2 (https://genome.ucsc.edu/encode/protocols/cell/human/PANC-1_Myers_protocol.pdf). Le suivi de la confluence est réalisé régulièrement par observation par microscope optique et, lorsque celle-ci atteint environ 80–90 %, 3 fois par semaine, les cellules sont passées, c'est-à-dire diluées et réparties en plusieurs flasques afin d'optimiser leur prolifération. Pour le protocole de passage, à chaque fois, le milieu est retiré et les cellules sont rincées avec une solution de PBS. 3 mL d'une solution de trypsine-EDTA à 0,25 % sont ensuite ajoutés par flasque, permettant de dégrader les fibres d'adhésion par lesquelles les cellules adhèrent au substrat. Après une attente de 5 minutes, du milieu avec sérum est ajouté pour inhiber l'action de la trypsine. Les cellules sont détachées mécaniquement par des aller retours avec la pipette, puis la suspension cellulaire est centrifugée 5 minutes à 1200 rpm , le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu frais. Enfin, les cellules sont réensemencées dans de nouvelles flasques avec une dilution 1:4.

VI.1.4.2. Traitements des cellules

Le traitement des cellules consiste en l'exposition contrôlée de cellules cultivées in vitro à un agent (médicament, ARN, stimulus physico-chimique) pendant un temps et à une dose définis pour provoquer et mesurer une réponse biologique.

Après comptage du nombre de cellules par cellule de Malassez, les cellules sont transférées dans une plaque 96-puits, a raison d'environ 4500 cellules par puits. Elles sont ensuite traitées avec des concentrations d'Abemaciclib de 0 - 1 – 2,5 – 5 – 7,5 – 10 µM, une échelle de concentration de SWNT/CMC de 0 - $0{,}5.10^{-4}$ – $1{,}25.10^{-4}$ - $2{,}5.10^{-4}$ - $3{,}75.10^{-4}$ - 5.10^{-4} wt%, et les mêmes concentrations respectives de complexes SWNT/CMC/Ab. Les plaques sont ensemencées 24h avant le traitement, les cellules sont traitées à T_0, puis la prolifération cellulaire est déterminée 24h et 48h après traitement.

Les tests d'inhibition sont réalisés en triplicat. Des traitements sont aussi réalisés avec des concentrations équivalentes de CMC seule.

VI.1.4.3. Tests de prolifération cellulaire au cristal violet et détermination des IC50

Les tests de prolifération réalisés par coloration au crystal violet sont réalisés sur plaques 96 puits dans lesquels des cellules PANC1 ont été ensemencées et traitées avec l'Abemaciclib seule ou adsorbée aux SWNT/CMC [50],[51]. D'abord, le milieu de culture est retiré puis les cellules sont rincées deux fois avec 150 µL de PBS, et enfin fixées avec 100 µL de formaldéhyde 3,7 % pendant 10 minutes. Après fixation, la solution de formaldéhyde est aspirée et 100 µL d'une solution de cristal violet à 0,1 % sont ajoutés afin de colorer les cellules qui sont fixées vivantes, et ce durant 30 minutes sous hotte. Une fois colorées, les cellules sont lavées à l'eau et la plaque est laissée à sécher sur paillasse durant à nouveau 30 minutes. 100 µL d'acide acétique à 10% sont ensuite ajoutés en pipetant plusieurs fois afin de dissoudre les cellules cristallisées. L'absorbance de chaque puit est mesurée à 595 nm au moyen d'un spectrophotomètre et fluorimètre avec lecteur de plaques CLARIOstar de BMG Labtech. Le pourcentage de prolifération correspondant à cette absorbance est ensuite tracé en fonction du temps et de la concentration de la drogue

sous forme d'histogramme, le 100% correspondant à un échantillon de cellules non traitées [52].

L'inhibition de la prolifération est ensuite reportée sur un graphique en fonction de la concentration d'inhibiteur et les points sont fittés selon une régression sigmoïde à 4 paramètres afin de déterminer l'IC50 de l'Abemaciclib . Ce fit a été réalisé grâce au logiciel GraFit (*Erathicus Ltd*) avec l'équation suivante :

$$y = \frac{a}{1+e^{b\,ln\left(\frac{x}{c}\right)}} + d \qquad \text{[VI-7]}$$

Avec a la réponse à 0 µM, b la pente, c l'IC50 et d le background.

VI.2. Méthodes

VI.2.1. Spectroscopie

VI.2.1.1. Spectroscopie d'absorption UV-vis proche IR

Dans les nanotubes, l'absorption optique est utilisée pour étudier les transitions optiques associées aux paires symétriques de singularités de van Hove. [53] Elle est également largement utilisée pour déterminer la concentration de nanotubes dans la suspension. [54],[55] La Doxorubicine en solution aqueuse présente également une absorption intense dans le visible, entre 400 et 600 nm. [56]

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis proche IR modèle Cary 5000 Varian équipé de deux lampes permettant une gamme d'étude entre 175 et 3300 nm. Une lampe au deutérium est utilisée dans l'UV (de 175 à 390 nm), et une lampe au tungstène halogène est utilisée de 330 à 3300 nm. La lumière est divisée en un double faisceau avec deux trajets identiques, un pour la mesure de l'échantillon, et un pour la mesure de la référence. La Figure VI-7 montre une représentation schématique du spectromètre.

Pour réaliser une mesure, l'appareil est calibré en mesurant 100% du signal (mesure à vide), puis 0% du signal (trajet optique coupé). Deux échantillons d'eau déionisée identiques sont ensuite placés dans les deux porte-échantillons afin de déterminer la variation par rapport à 0, pour pouvoir plus tard soustraire le signal de l'eau au spectre

obtenu. L'échantillon à mesurer ainsi que la référence sont ensuite insérés dans leurs emplacements respectifs, le solvant utilisé étant exclusivement de l'eau déionisée, il constitue ainsi la référence. Enfin, les absorbances sont mesurées et leur différence permet de déterminer le spectre d'extinction de l'échantillon, qui inclut à la fois l'absorption et la diffusion des SWNT.

Pour l'étude des suspensions de SWNT, la mesure est faite entre 300 et 1400 nm afin de couvrir les transitions optiques des SWNT de différents diamètres et en particulier les E_{11} et E_{22} des semi-conducteurs. Pour l'étude de la Doxorubicine, la plage est entre 300 et 800 nm afin de visualiser le pic d'absorption de la Doxorubicine présent entre 400 et 600 nm. Toutes les mesures sont réalisées avec des cuves en quartz Hellma (10 x 10 mm ou 10 x 2 mm) nettoyées chimiquement à l'éthanol, puis par plasma de O_2 à 500 mTorr pendant 15 minutes avant chaque utilisation.

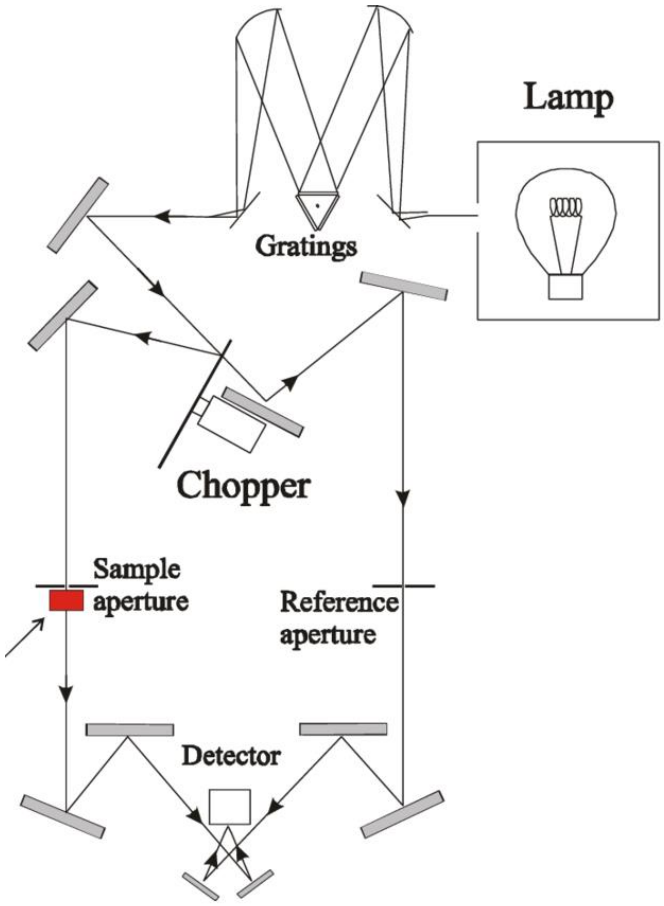


Figure VI-7 : Schéma du spectrophotomètre UV-vis proche IR Cary 5000 Varian [57].

Un accessoire Peltier Varian Cary est utilisé pour contrôler la température entre 20°C et 70°C. La température réelle de l'échantillon est vérifiée en la mesurant à l'intérieur de l'échantillon à l'aide d'un thermocouple.

VI.2.1.2. Spectroscopie de fluorescence

La Doxorubicine étant fluorescente en solution aqueuse [56], la spectroscopie de fluorescence dans le visible est également utilisée. Les mesures sont réalisées avec un spectrophotomètre Cary Eclipse Varian permettant une étude entre 200 et 900 nm (en émission et en excitation). Il possède une lampe au xénon dont la lumière passe au travers d'un monochromateur avant d'être séparée en deux trajets optiques. L'un traverse l'échantillon et l'autre est directement collecté. Le faisceau émis par l'échantillon est collecté à 90° de pour éviter toute influence de la lumière transmise. La Figure VI-8 montre une représentation schématique du spectromètre.

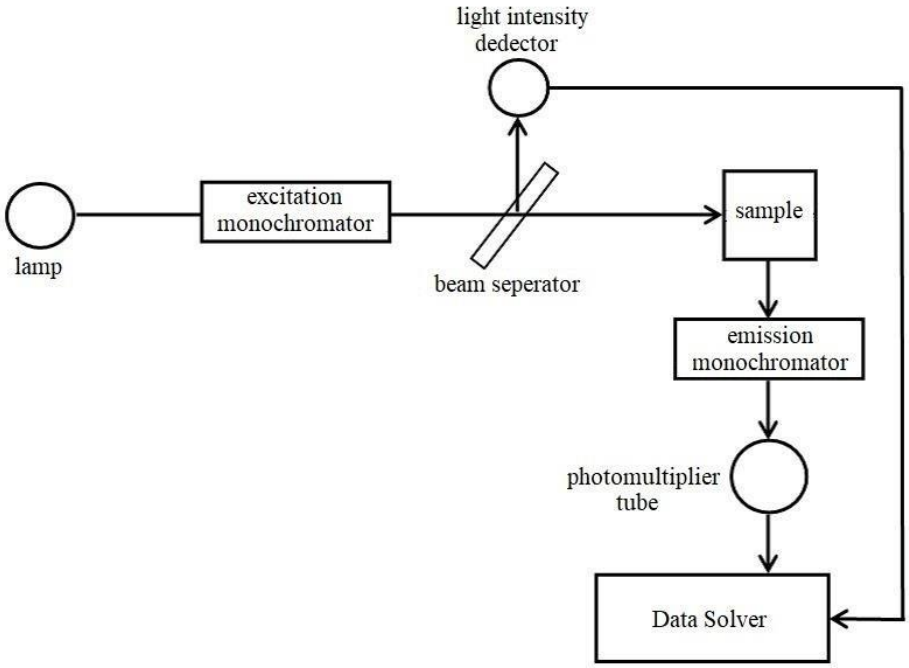


Figure VI-8 : Schéma du spectrophotomètre de fluorescence dans le visible Cary Eclipse Varian [58].

Pour l'étude de la Doxorubicine, l'échantillon est excité à 490 nm et le spectre est collecté entre 500 et 750 nm. La largeur de la fente d'excitation est réglée sur 10 mm, et celle

d'émission sur 5 mm. Toutes les mesures sont réalisées avec des cuves en quartz Hellma (10 x 10 mm) lavées chimiquement à l'éthanol, puis par plasma de O_2 à 500 mTorr pendant 15 minutes avant chaque utilisation.

Un accessoire Peltier Varian Cary est utilisé pour contrôler la température entre 20°C et 70°C. La température réelle de l'échantillon est vérifiée en la mesurant à l'intérieur de l'échantillon à l'aide d'un thermocouple.

VI.2.1.3. Spectroscopie Raman/FL

Les échantillons contenant des SWNT sont étudiés à l'aide d'un spectrophotomètre Raman à transformée de Fourier (TF) RFS100 Bruker avec une source laser Nd:YAG continue de longueur d'onde 1064 nm (énergie des photons associés 1,17 eV). Un détecteur au germanium, refroidi à l'azote liquide afin d'améliorer le rapport signal/bruit, permet la détection de signaux dans le proche IR, entre 900 et 1700 nm (énergies associées entre 0,73 à 1,38 eV). Pour la dispersion spectrale, un interferomètre de Michelson est utilisé afin de produire des interférogrammes qui seront convertis en spectre par transformée de Fourier. Cette configuration permet d'observer sur le même spectre les pics Raman caractéristiques ainsi que le signal de photoluminescence superposé dans la gamme 0-3500 cm^{-1} (décalage Raman Stokes). La Figure VI-9 présente sa représentation schématique.

Ce spectromètre peut être utilisé dans deux configurations différentes. La première est une configuration « macroscopique » permettant des mesures sur des systèmes solides et liquides. La taille du spot laser focalisé (assimilé au diamètre typique du premier disque d'Airy) est d'environ 200 µm pour une puissance incidente stable variant entre 10 et 300 mW. Des filtres de densité optique variable (DO ≈ 0,85 et DO ≈ 1,30) sont utilisés pour réduire la puissance incidente, respectivement d'un facteur 7 ou 20, permettant d'ajuster la puissance du laser au niveau de l'échantillon.

Un rail sur lequel est placé le porte-échantillon permet de déplacer l'échantillon dans l'axe du laser afin de déplacer le point de focalisation du laser et ainsi optimiser la mesure. Dans ces expériences, le point de focalisation du laser est systématiquement placé à 200 µm de la surface interne de la cuve. Toutes les mesures sont réalisées avec des cuves en quartz

Hellma (10 x 10 mm) lavées par plasma de O_2 à 500 mTorr pendant 15 minutes avant chaque utilisation.

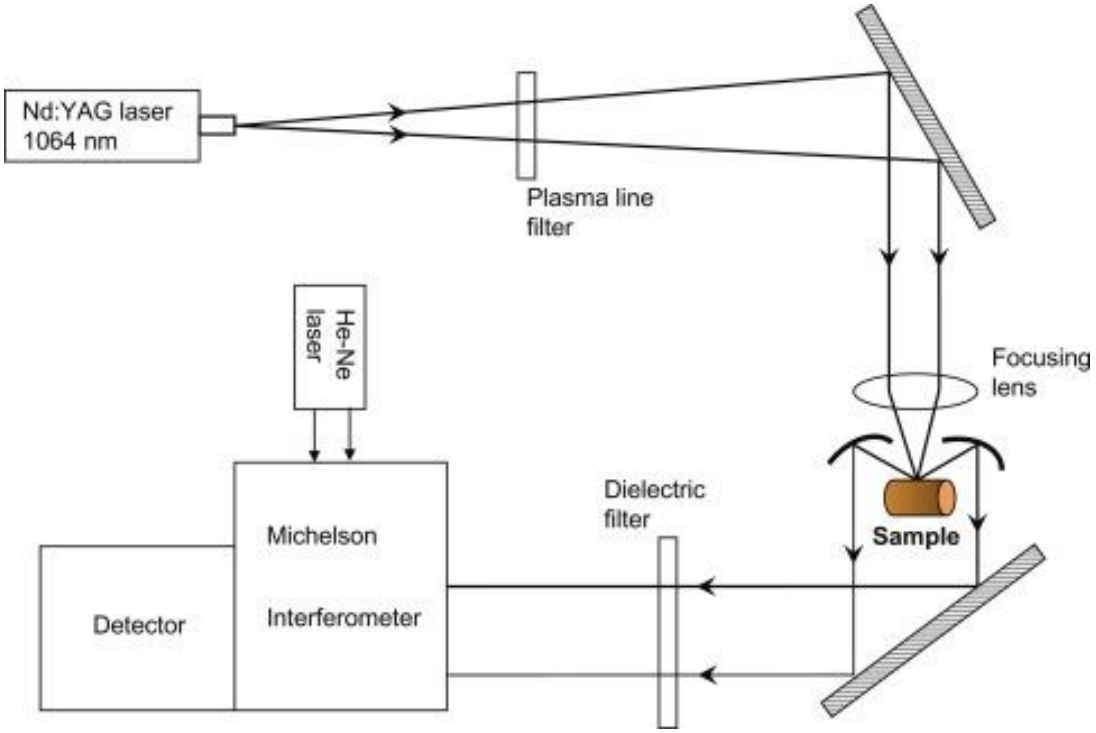


Figure VI-9 : Schéma du spectrophotomètre Raman FT RFS100 Bruker [59].

Un accessoire Peltier Varian Cary est utilisé pour contrôler la température entre 20°C et 70°C. La température réelle de l'échantillon est vérifiée en la mesurant à l'intérieur de l'échantillon à l'aide d'un thermocouple.

VI.2.1.4. Carte d'excitation FL

Une analyse détaillée de « l'empreinte » de photoluminescence des SWNT dispersés peut être réalisée par la construction d'une carte FL en 3D, dans laquelle l'énergie d'émission est étudiée en fonction de l'énergie d'excitation, ce qui permet d'observer des pics caractéristiques spécifiques pour chaque type de nanotube présent dans l'échantillon. [4],[60] Pour cela, un spectro-fluorimètre HORIBA Fluorolog-3 est utilisé dans le laboratoire partenaire de l'IMDEA à Madrid. La source est une lampe blanche au xénon, émettant un spectre de 450 W sur la gamme de 240 à 1000 nm, associée à un monochromateur à réseau de diffraction de type Czerny-Turner permettant de

sélectionner précisément la longueur d'onde d'excitation dans la gamme spectrale émise. Après interaction avec l'échantillon, la lumière est transmise à un second monochromateur Czerny-Turner utilisé cette fois-ci pour disperser la lumière émise selon sa longueur d'onde. La lumière émise est alors détectée par un détecteur InGaAs (arséniure de gallium-indium) sensible dans la gamme spectrale de 900 à 1700 nm, particulièrement adapté à l'analyse de l'émission dans le proche IR. Une représentation schématique est présentée en Figure VI-10.

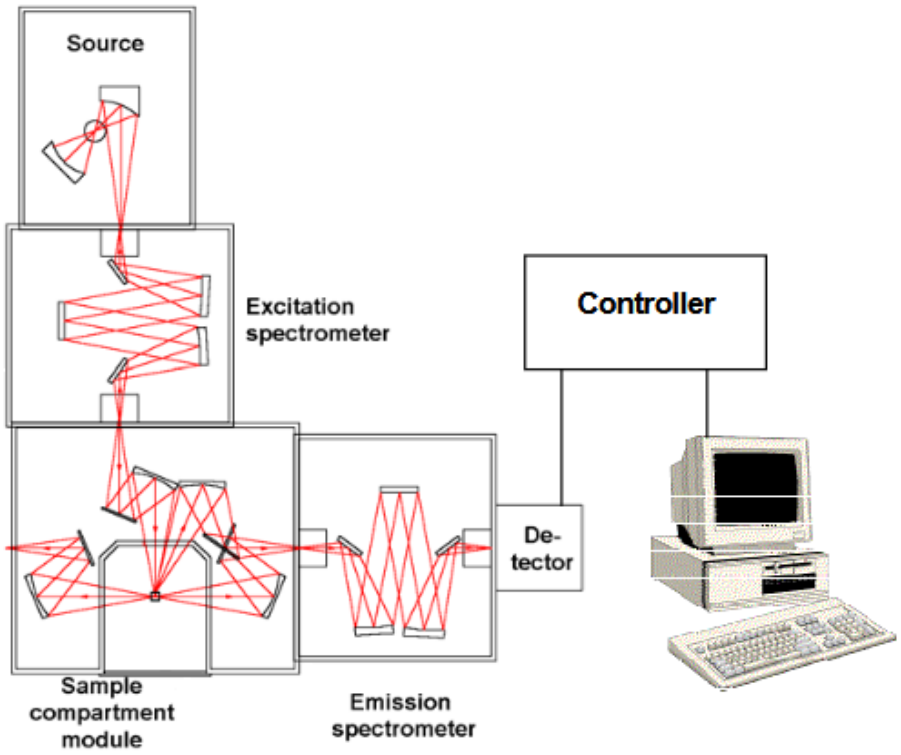


Figure VI-10 : Schéma du fonctionnement d'un spectro-fluorimètre

VI.2.1.5. Ajustement non-linéaire des spectres (« déconvolution »)

La déconvolution des spectres est réalisée à l'aide du logiciel Fityk 1.3.1. Il s'agit d'un programme d'ajustement de courbes non-linéaires multiples simultanées qui utilise plusieurs méthodes, notamment l'algorithme de Levenberg-Marquardt pour minimiser la somme des carrés des écarts entre une courbe calculée et les spectres expérimentaux. [61],[62] La courbe d'ajustement est composée d'une série de pics, décrits par diverses fonctions symétriques, et d'une ligne de base.

Les spectres d'absorption de suspensions de SWNT, mesurés en fonction de la longueur d'onde, sont ajustés en soustrayant un fond continu suivant la base des pics caractéristiques des SWNT. Pour chaque pic, des fonctions Voigt sont utilisées avec largeurs partagées et autres paramètres libres. Les spectres Raman/FL de suspensions de SWNT, mesurés en fonction du décalage Raman, sont ajustés en utilisant des fonctions Voigt. Pour les bandes Raman, un ajustement préalable est réalisé sur la bande G et le RBM. Les paramètres de ces deux fonctions sont fixés car leurs positions et largeurs ne dépendent pas de l'échantillon, étant donné qu'il n'y a ni contrainte, ni dopage. 4 Voigt sont ensuite utilisées pour les bandes PL, aux paramètres libres. Ces protocoles de fits ne cherchent pas à reproduire la réalité physique car il faudrait une contribution pour chaque coordonnées (n,m) de SWNT. L'objectif est de pouvoir suivre les maximums des pics sur les différents spectres avec une méthode fiable et reproductible. La Figure VI-11 montre un exemple typique de déconvolution d'un spectre Raman/PL.

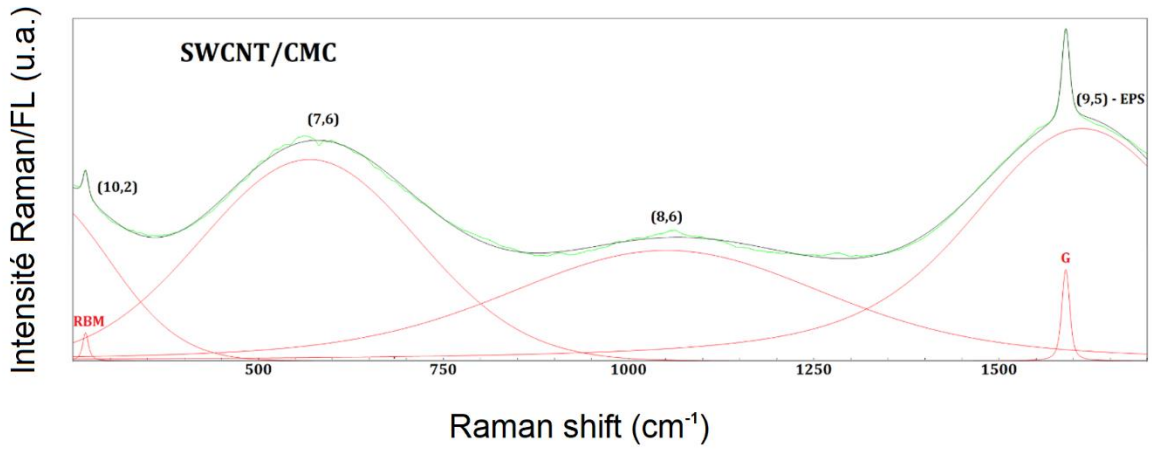


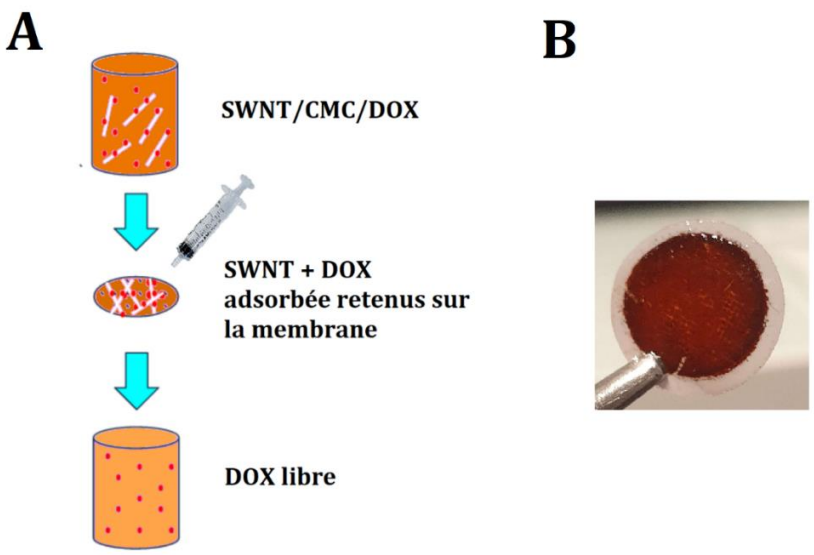
Figure VI-11 : Ajustement typique d'un spectre Raman/FL d'une suspension de SWNT/CMC (0,1 wt%, 1 wt%). 2 fonctions Voigt aux paramètres fixés par ajustements préalables sont utilisées pour les pics Raman les plus intenses (RBM et bande G) et 4 fonctions Voigt aux paramètres libres permettent d'ajuster les bande PL.

VI.2.2. Filtration et quantification des drogues adsorbées

VI.2.2.1. Filtration

Une fois l'adsorption des drogues sur les complexes SWNT/CMC confirmée par spectroscopie, les complexes sont filtrés avec une seringue sur des filtres micropores de 0,22 µm en polycarbonate. Ces filtres fabriqués par Isopore sont achetés chez Sigma-

Aldrich. Cette filtration permet de séparer les nanohybrides SWNT/CMC/DRUG (DRUG = Doxorubicine ou Abemaciclib), retenus par le filtre de la drogue non adsorbée restée en solution (Figure 12A). Pour éviter le biais dû à l'adsorption de drogue libre sur le filtre (Figure 12B), ce-dernier est précédemment saturé avec une autre solution de drogue de même concentration. De cette manière, lors de la filtration, aucune Doxorubicine ne sera retenue en étant adsorbée sur le filtre. Une solution de Doxorubicine de même concentration est donc passée sur le filtre en amont de la filtration. Une solution de Doxorubicine mesurée avant et après passage sur le filtre a donné des spectres sensiblement identiques, indiquant que 98±2 % de la Doxorubicine libre passe effectivement à travers le filtre lors de la filtration des complexes SWNT/CMC/DOX. La concentration obtenue dans le filtrat est peut donc être une très légère sous-estimation de la quantité de Doxorubicine réellement libre.



<u>Figure VI-12 :</u> A : Représentation schématique de la filtration d'un complexe SWNT/CMC/DOX, B : Filtre micropore avec Doxorubicine adsorbée.

La solution de drogue libre ainsi obtenue peut être quantifiée, et par soustraction à partir de la concentration initiale, on peut en déduire la quantité de drogue est adsorbée sur les SWNT. La CMC en solution peut aussi passer à travers le filtre à hauteur de 30% maximum.

VI.2.2.2. Quantification de la drogue adsorbée

VI.2.2.2.1. Doxorubicine

Plusieurs solutions à différentes concentrations de DOX-HCl allant de 1 à 257 µM sont préparées par dilutions successives à partir de la solution grand-mère (GM) de DOX-HCl afin d'établir une courbe de calibration. Ces solutions de Doxorubicine sont étudiées en spectroscopie d'absorption et de fluorescence après filtration à travers une seringue à l'aide de filtres en polycarbonate à pores de 0,22 µm pour éliminer les agrégats de DOX.

Une courbe de calibration de l'absorbance en fonction de la concentration en, DOX-HCl est réalisée grâce à la spectroscopie d'absorption. Cependant, le spectre d'absorbance molaire d'une solution de Doxorubicine change avec la concentration (C) en raison de sa dimérisation. [35],[63] Dans la gamme micromolaire, l'évolution spectrale peut être principalement attribuée à un équilibre monomère-dimère en solution :

$$DOX + DOX \leftrightharpoons DOX_2 \qquad \text{[VI-8]}$$

Les spectres d'absorbance A des solutions aqueuses de Doxorubicine sont donc des combinaisons linéaires des spectres d'absorbance molaire des monomères libres A_m et des dimères A_d :

$$A = C[\phi_m A_m + (1 - \phi_m)\, A_d] \qquad \text{[VI-9]}$$

Et la fraction de monomères ϕ_m est donnée par l'équation suivante :

$$\phi_m = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8K_D C}}{4K_D C} \qquad \text{[VI-10]}$$

Où K_D est la constante d'équilibre de la réaction de dimérisation.

Des valeurs typiques de $K_D \sim 10^4 - 10^5\ \mathrm{M}^{-1}$ sont mesurées dans diverses conditions expérimentales [35],[41],[64]. Dans nos expériences, les spectres UV-vis des solutions de Doxorubicine sont cohérents avec ces études antérieures. Les spectres d'absorption molaire pour les monomères et les dimères sont déterminés, ainsi qu'une constante d'équilibre K_D = 14000 ± 1500 M^{-1} à 20°C. Le point isobestique, correspondant à un

coefficient d'absorption molaire d'environ 4486 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ à une longueur d'onde de 540 nm, peut également être utilisé pour déterminer la concentration exacte des solutions filtrées.

Ce point isobestique est une longueur d'onde caractéristique où les deux espèces présentent le même coefficient d'absorption molaire. L'absorbance y reste donc constante indépendamment de l'équilibre entre les deux formes. Ainsi, la mesure de l'absorbance à 540 nm permet d'accéder directement à la concentration totale, sans être affectée par la proportion relative des différentes formes présentes.

La fluorescence de la Doxorubicine monomérique est de l'ordre de cent fois plus intense que celle des dimères. [63] La fluorescence de la fraction de dimères ϕ_d est donc négligeable devant celle de la fraction de monomères ϕ_m et on peut considérer que seule la fraction de monomères est fluorescente. L'absorbance (A) des complexes ne peut être négligée, tant pour le faisceau incident (λ_0 = 490 nm) que pour le faisceau émis (λ < 600 nm). Les effets de filtre interne liés à l'absorption sont étudiés en détail pour le fluorimètre Cary Eclipse que nous utilisons [65] et il est démontré que de simples corrections géométriques peuvent être utilisées. Les spectres de fluorescence mesurés F(λ) des solutions de Doxorubicine suivent donc l'équation suivante :

$$F(\lambda) = \frac{C\phi_m F_m}{(ln10)^2} \frac{\left(10^{-A(\lambda_0)x_1} - 10^{-A(\lambda_0)x_2}\right)}{A(\lambda_0)(x_1 - x_2)} \frac{\left(10^{-A(\lambda)y_1} - 10^{-A(\lambda)y_2}\right)}{A(\lambda)(y_1 - y_2)} \qquad \text{[VI-11]}$$

où y_i et x_i sont les dimensions géométriques (exprimées en cm) qui délimitent les zones d'excitation et d'émission de la cuvette, F_m est le spectre de fluorescence molaire du monomère Doxorubicine corrigé des effets de filtre interne, et ϕ_m est mesuré indépendamment par l'étude de spectroscopie d'absorption des échantillons.

Les spectres de fluorescence de la Doxorubicine sont donc corrigés par l'équation suivante :

$$F_{cor}(\lambda) = F(\lambda)(ln10)^2 \frac{A(\lambda_0)(x_1 - x_2)}{(10^{-A(\lambda_0)x_1} - 10^{-A(\lambda_0)x_2})} \frac{A(\lambda)(y_1 - y_2)}{(10^{-A(\lambda)y_1} - 10^{-A(\lambda)y_2})} \qquad \text{[VI-12]}$$

Où A(λ) est l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde λ

La Doxorubicine est ainsi quantifiée grâce à la spectroscopie de fluorescence. De plus, la Doxorubicine absorbant entre 400 et 600 nm, et émettant entre 500 et 750 nm, le spectre présente une auto-absorption de la fluorescence qui est aussi corrigée. Cette correction a été vérifiée par l'étude de la fluorescence de la rhodamine.

VI.2.2.2.2. Abemaciclib

La quantification de l'Abemaciclib est réalisée sur quelques échantillons de complexes SWNT/CMC/Ab. Des échantillons d'Abemaciclib sont ainsi dilués entre 1 et 10 µM afin d'établir une courbe de calibration en fonction de la concentration. Deux méthodes de quantifications sont utilisées : la spectrométrie de masse couplée HPLC, et les tests d'activité kinase réalisés grâce à un biosenseur fluorescent, décrits en VI.2.4.

VI.2.3. Désorption de drogues

VI.2.3.1. Doxorubicine

Les complexes SWNT/CMC/DOX sont chauffés progressivement entre 20 et 60°C et étudiés par spectroscopie d'absorption, de fluorescence et Raman/FL en fonction du temps.

Deux protocoles sont mis en place. L'un avec une montée progressive par paliers tous les 10°C (20, 30, 40, 50, 60°C), atteinte de l'équilibre, mesure en spectroscopies d'absorption UV-vis-NIR, fluorescence et Raman/PL, puis une redescente à 20°C afin d'observer une potentielle réadsorption. Chaque palier est maintenu 10 minutes afin de laisser la solution s'équilibrer. L'autre protocole a consisté en un passage brutal de 20 à 60°C, toujours avec un suivi spectroscopique, puis une nouvelle fois une redescente à 20°C.

VI.2.3.2. Abemaciclib

Pour l'Abemaciclib, des complexes SWNT/CMC/Ab à différents rapports de masse Ab/SWNT sont chauffés à 60°C puis filtrés à cette même température sur des filtres microporeux de 0,22 µM en polycarbonate. La filtration est maintenue à 60°C en étant réalisée dans une étuve à l'aide d'un poussoir exerçant une pression constante sur la seringue. Comme pour la DOX, le filtre est au préalable saturé en Abemaciclib avec des solutions de mêmes concentrations par sécurité. Ainsi, si l'Abemaciclib s'adsorbe sur le

filtre, on n'en perd pas pendant la filtration, et s'il ne s'adsorbe pas, tous l'Abemaciclib de l'étape de saturation est passé au travers des pores. Le filtrat est récupéré et quantifié par tests d'activité kinase.

VI.2.4. Tests d'activité kinase

Les tests d'activité kinase permettent, en utilisant un biosenseur fluorescent peptidique CDKACT [66], de quantifier l'activité spécifique d'une kinase, en l'occurrence ici CDK4 [67]. Pour cela, un culot de cellules PANC-1, utilisé comme source de kinase CDK4, constamment transporté dans la glace, est re-suspendu dans 98 µL de tampon de lyse (2 mM de PMSF, 1 mM d'EDTA et 0,2 % de NP40 dans du PBS) complété avec 2 µL de Mix d'inhibiteurs Complete™ de Roche 50X afin de lyser les membranes cellulaires et d'extraire les protéines totales. Après une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm dans une micro-centrifugeuse à 4°C, le surnageant est récupéré et la concentration totale des protéines est déterminée par absorbance à 280 nm sur le spectrophotomètre Nanodrop™ grâce à une courbe étalon réalisée avec différentes concentrations de BSA.

Sur une plaque 96 puits à fond noir mat, 40 µL d'une solution de biosenseur CDKACT4-TAMRA à 1 µM sont ensuite ajoutés, pour une concentration finale de 200 nM, ainsi qu'un volume équivalent à 100 µg de protéines totales et le même volume de tampon de lyse dans les puits référence où il n'y a pas de lysat. Des concentrations croissantes d'Abemaciclib (0 – 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 µM) sont ensuite ajoutées dans différents puits contenant le biosenseur et 100 µg de protéines totales afin de tracer une courbe d'inhibition de l'activité CDK4 par l'Abemaciclib.

L'évolution de l'émission de fluorescence du biosenseur CDKACT4-TAMRA dans chacun des puits est mesurée pendant 1h en utilisant le CLARIOstar, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du TAMRA étant respectivement de 555 et 585 nm. La cinétique de l'activité kinase CDK4 est déterminée en reportant sur un graphique l'émission de fluorescence en fonction du temps. A 50 minutes l'activité kinase atteint un plateau stable et l'émission de fluorescence maximale à ce temps peut être reportée sous forme d'histogramme.

Chaque échantillon est mesuré en duplicat.

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraFit (*Erathicus Ltd*) et l'ajustement des courbes a été effectué à l'aide d'une équation quadratique, comme décrit précédemment. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires, et les valeurs Kd représentent la moyenne calculée pour n = 3 à 5 expériences, ainsi que l'écart type.

VI.2.5. Production et purification de GST-CDK4

GST-CDK4 est produite par induction d'une souche d'*E.coli BL21pLysS* transformée avec un plasmide exprimant GST-CDK4 humaine recombinante [67]. Une préculture de ce clone bactérien de 50 mL est réalisée dans un milieu LB avec 50 µL d'ampicilline (50 µg/ml), puis est cultivée 24h à 37°C sous agitation orbitale. Cette préculture est ensuite diluée dans 1L de solution LB-ampicilline et remise en culture à 37°C sous agitation orbitale jusqu'à atteindre une DO de 0,5 à 600nm, pendant la phase de croissance exponentielle des bactéries.1 mL d'IPTG (1 mM) par litre de LB est alors ajouté afin d'induire l'expression de GST-CDK4 pendant une nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain, les cultures sont centrifugées pendant 30 min à 4°C à 5000 rpm. Un tampon de lyse est préparé à 2 mM de PMSF, 1 mM d'EDTA, 0,2% de NP40 dans un tampon phosphate pH 7,4 avec 500 mM de NaCl. Chaque culot est ensuite re-suspendu dans 30 mL de tampon de lyse CDK4, auquel 1 mL de PMSF (1 mM) et 200 µL de lysozyme (10 µg/ml) sont ajoutés, puis cette solution est congelée à -80°C.

Pour la purification, les bactéries sont décongelées et une lyse mécanique (sonication par pointe) est effectuée pendant 4 minutes afin de casser leur membrane et l'ADN. Après centrifugation pendant 30 min à 4°C et 14000 rpm, le surnageant dans lequel se trouvent les protéines solubles sont récupérées et GST-CDK4 est ensuite purifiée par chromatographie FPLC sur colonne d'affinité GST-Trap [68],[69]. La colonne GST Trap est conçue pour retenir spécifiquement toutes les protéines exprimées en fusion avec une glutathione S-transférase (GST, c'est le cas ici pour la protéine GST-CDK4) et laisser passer les autres protéines. Après lavage, les protéines GST retenues sur la colonne sont éluées avec de la glutathione (50 mM) dans un tampon phosphate et récupéré dans des tubes par fractions de 2 mL grâce à un collecteur de fractions [70]. L'excès de glutathione est ensuite retiré par un passage sur colonne de désalage [71].

Les fractions issues des différentes étapes de chromatographie sont mélangées avec du bleu Laemmli [72] (62,5 mM de tris-HCl, 2% de SDS, 10% de glycérol, 50 mM de DTT et 0,002% de Bleu de bromophénol) et caractérisées sur gel dénaturant, SDS-PAGE 15% afin d'identifier la présence de GST-CDK4 à la bonne masse moléculaire ainsi que sa pureté.
Le gel SDS-PAGE 15% est composé de 6 mL contenant une solution acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%), de tampon Tris-HCl 1,5 M à pH = 8,8, de SDS 10% et d'eau distillée [73]. A ce mix sont ajoutés 0,05 % de persulfate d'ammonium (APS) et 0,05% de TEMED pour catalyser la polymérisation. En plus de ce gel de séparation, 3 mL d'un gel de concentration ou « stack » à 4% sont ajoutés. Il contient moins d'acrylamide/bisacylamide (3,3%/0,13%), 125 mM de Tris-HCl à pH = 6,8, 0,1% de SDS, auxquels sont ajoutés 0,05% d'APS et 0,05% de TEMED (Figure 13A).

Le tampon de migration est à base de tris (25 mM), de glycine (192 mM) et de SDS (0,1%) dilué dans l'eau déionisée [74]. La migration se déroule sous électrophorèse liquide dans une cuve remplie de tampon de migration à 150 V initiaux, puis 250 V lorsque la migration dépasse le niveau du stack et ce jusqu'à migration complète (environ 20 minutes). (Figure 13B). Une fois terminée, le gel est coloré 5 minutes dans du bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines [75]. Il s'agit d'un gel de polyacrylamide dit dénaturant car préparé avec du SDS qui dénature les protéines et permet donc de les séparer en fonction de leur masse. La masse attendue pour GST-CDK4 est de 60 kDa [76].

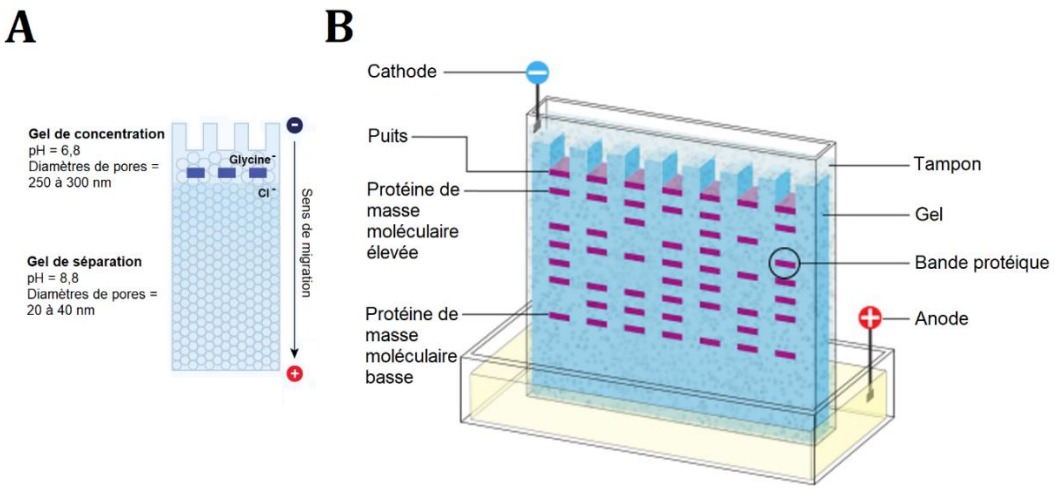


Figure VI-13 : Représentations schématiques de la séparation par électrophorèse de protéines dans un gel SDS-PAGE [77],[78].

VI.2.6. Tests de liaison SWNT/Ab/CDK4

GST-CDK4 est utilisé pour étudier la possibilité d'une liaison entre les complexes SWNT/CMC/Ab et GST-CDK4. Des échantillons SWNT/CMC/Ab sont mesurés en spectroscopie Raman/FL avant et après l'ajout de GST-CDK4 et les modifications du signal FL des SWNT sont étudiées.

VI.2.7. Spectrométrie de masse couplée HPLC

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-MS) constitue une méthode de référence pour la détection et la quantification précise de molécules à faible poids moléculaire. Elle est utilisée pour quantifier l'Abemaciclib.

Dans un premier temps, l'échantillon est séparé par HPLC selon des propriétés telles que la polarité ou l'hydrophobicité, ce qui permet d'isoler l'Abemaciclib des autres composants. Puis, l'ionisation de l'analyte et son passage dans l'analyseur de masse offrent une sélectivité et une sensibilité accrues pour détecter et mesurer de faibles concentrations de la molécule ciblée. Une courbe de calibration entre 0 et 10 µM est réalisée et les échantillons de concentrations inconnues provenant de la filtration ont pu être quantifiés.

VI.2.8. Microscopie électronique en transmission

Les échantillons de complexes SWNT/CMC/DOX et SWNT/CMC/Ab ont été étudiés à l'aide d'un microscope électronique à transmission (MET) JEOL 2200FS – 200 kV équipé de lentilles haute résolution et d'un porte-objet à double inclinaison. Il possède une source FEG 200 kV, une résolution point à point de 0,23 nm, une résolution en énergie de 0,7 eV et une résolution en mode STEM de 0,1 nm. L'acquisition est réalisée par des détecteurs BF et HAADF, un détecteur EDX (SDD Oxford Instrument XMaxN 100 TLE 100 mm^2, sans fenêtre), ainsi qu'une caméra CCD GATAN USC 4092×4092 px^2. Le protocole d'analyse des nanotubes consiste à déposer une goutte de suspension sur une grille Cu 400 *mesh* revêtue

de carbone amorphe, séchée sous vide doux puis introduite dans la colonne [79]. La Figure 14 présente sa représentation schématique.

Un canon à émission de champ (ici de 200 kV) émet un faisceau d'électrons qui est modelé par le système d'illumination constitué de deux lentilles condenseur avant de traverser l'échantillon, typiquement aminci à < 100 nm pour limiter les pertes d'énergie et préserver la résolution. L'échantillon se situe dans la zone objectif : la lentille objectif, couplée à un porte-échantillon double inclinaison, donne l'image et la figure de diffraction qui seront ensuite agrandies par le système d'imagerie, constitué de lentilles intermédiaires et projecteurs, puis affichées sur écran. Les correcteurs hexapôles permettent d'abaisser les aberrations intrinsèques. Sur un MET corrigé de 200 kV, la limite ponctuelle passe ainsi de 0,24 nm à environ 0,14 nm, ouvrant l'accès à l'imagerie atomique des parois graphéniques des nanotubes [80],[81].

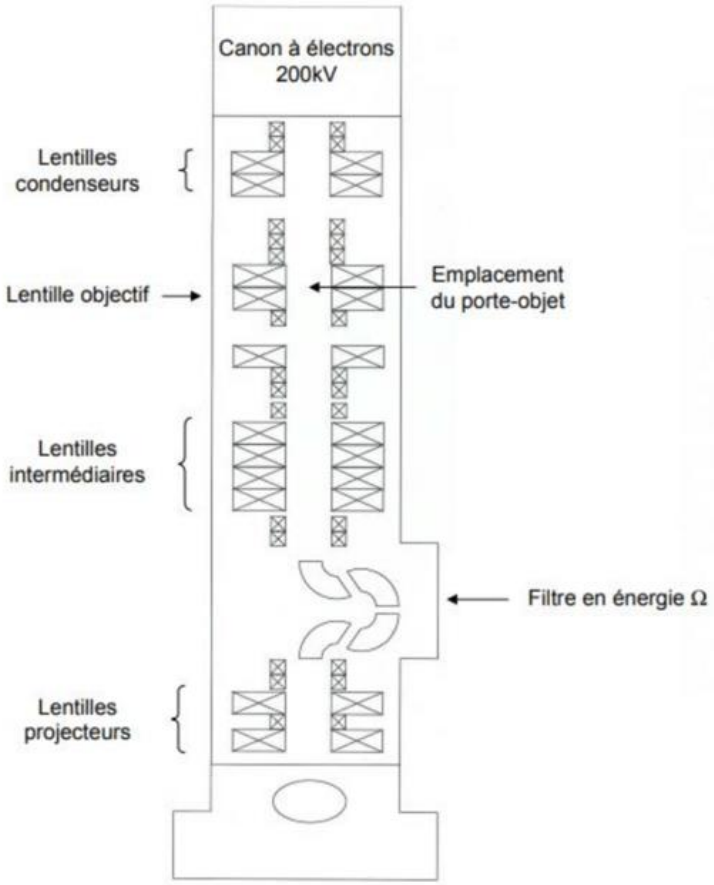


Figure VI-14 : Schéma du MET JEOL 2200FS [82].

[1] Gökçen, T. , Dateo, C. E. , and Meyyappan, M. Modeling of the HiPco Process for Carbon Nanotube Production. II. Reactor-Scale Analysis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2002**, 2, 535–544.

[2] Chiang, I. W. , Brinson, B. E. , Smalley, R. E. , Margrave, J. L. , and Hauge, R. H. Purification and Characterization of Single-Wall Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 1157–1161.

[3] https://nanointegris.com/wp-content/uploads/2017/10/Hipco-Technical-Data-Sheet-2.pdf. https://nanointegris.com/wp-content/uploads/2017/10/Hipco-Technical-Data-Sheet-2.pdf (accessed Feb. 11, 2025).

[4] O'Connell, M. J. , Bachilo, S. M. , Huffman, C. B. , Moore, V. C. , Strano, M. S. , Haroz, E. H. , Rialon, K. L. , Boul, P. J. , Noon, W. H. , Kittrell, C. , Ma, J. , Hauge, R. H. , Weisman, R. B. , and Smalley, R. E. Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 297, 593–596.

[5] Kharlamova, M. V. , Burdanova, M. G. , Paukov, M. I. , and Kramberger, C. Synthesis, Sorting, and Applications of Single-Chirality Single-Walled Carbon Nanotubes. *Materials* **2022**, 15, 5898.

[6] Wenseleers, W. , Vlasov, I. I. , Goovaerts, E. , Obraztsova, E. D. , Lobach, A. S. , and Bouwen, A. Efficient Isolation and Solubilization of Pristine Single-Walled Nanotubes in Bile Salt Micelles. *Advanced Functional Materials* **2004**, 14, 1105–1112.

[7] Lin, S. and Blankschtein, D. Role of the Bile Salt Surfactant Sodium Cholate in Enhancing the Aqueous Dispersion Stability of Single-Walled Carbon Nanotubes: A Molecular Dynamics Simulation Study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 15616–15625.

[8] Suttipong, M. and Striolo, A. Equimolar mixtures of aqueous linear and branched SDBS surfactant simulated on single walled carbon nanotubes. *RSC Advances* **2015**, 5, 90049–90060.

[9] Tummala, N. R. and Striolo, A. SDS surfactants on carbon nanotubes: aggregate morphology. *ACS nano* **2009**, 3, 595–602.

[10] Wołowicz, A. and Staszak, K. Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, 299, 112170.

[11] Rastgarkafshgarkolaei, R. , Zeng, Y. , and Khodadadi, J. M. A molecular dynamics study of the effect of thermal boundary conductance on thermal transport of ideal crystal of n-alkanes with different number of carbon atoms. *Journal of Applied Physics* **2016**, 119, 205107.

[12] Fuhrmann, D. , Gerlach, R. , Rubahn, H. G. , and Wöll, Ch. Structure and phase transitions of ultrathin films of alkanes adsorbed on Cu(111). *Surface Science* **1999**, 424, 145–154.

[13] Hong, L. , Toshimitsu, F. , Niidome, Y. , and Nakashima, N. Microenvironment effect on the electronic potentials of individual (6,5)single-walled carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry C* **2014**, 2, 5223–5228.

[14] Young, B. R. and Aminayi, P. Single-walled carbon nanotube (SWNT)-carboxymethylcellulose (CMC) dispersions in aqueous solution and electronic transport properties when dried as thin film conductors. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2018**, 39, 1613–1626.

[15] OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN DERMAL TOXICITY OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES. https://www.mattek.com/reference-library/oxidative-stress-and-inflammatory-response-in-dermal-toxicity-of-single-walled-carbon-nanotubes/ (accessed Apr. 30, 2025).

[16] DAHM, M. M. , EVANS, D. E. , SCHUBAUER-BERIGAN, M. K. , BIRCH, M. E. , and FERNBACK, J. E. Occupational Exposure Assessment in Carbon Nanotube and Nanofiber Primary and Secondary Manufacturers. *The Annals of occupational hygiene* **2012**, 56, 542–556.

[17] Yu, H. , Hermann, S. , Schulz, S. E. , Gessner, T. , Dong, Z. , and Li, W. J. Optimizing sonication parameters for dispersion of single-walled carbon nanotubes. *Chemical Physics* **2012**, 408, 11–16.

[18] Koh, B. and Cheng, W. The Impact of Sonication on the Surface Quality of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 104, 2594–2599.

[19] Rennhofer, H. and Zanghellini, B. Dispersion State and Damage of Carbon Nanotubes and Carbon Nanofibers by Ultrasonic Dispersion: A Review. *Nanomaterials* **2021**, 11, 1469.

[20] Arrigo, R. , Teresi, R. , Gambarotti, C. , Parisi, F. , Lazzara, G. , and Dintcheva, N. T. Sonication-Induced Modification of Carbon Nanotubes: Effect on the Rheological and Thermo-Oxidative Behaviour of Polymer-Based Nanocomposites. *Materials* **2018**, 11, 383.

[21] Torres-Canas, F. J. Tintas y materiales compuestos anisotrópicos basados en nanotubos de carbono.

[22] Spiers, L. , Gray, M. , Lyon, P. , Sivakumar, S. , Bekkali, N. , Scott, S. , Collins, L. , Carlisle, R. , Wu, F. , Middleton, M. , and Coussios, C. Clinical trial protocol for PanDox: a phase I study of targeted chemotherapy delivery to non-resectable primary pancreatic tumours using thermosensitive liposomal doxorubicin (ThermoDox®) and focused ultrasound. *BMC Cancer* **2023**, 23, 896.

[23] Bhutkar, S. , Yadav, A. , Patel, H. , Barot, S. , Patel, K. , and Dukhande, V. V. Synergistic Efficacy of CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib and HDAC Inhibitor Panobinostat in Pancreatic Cancer Cells. *Cancers* **2024**, 16, 2713.

[24] Gelbert, L. M. , Cai, S. , Lin, X. , Sanchez-Martinez, C. , Del Prado, M. , Lallena, M. J. , Torres, R. , Ajamie, R. T. , Wishart, G. N. , Flack, R. S. , Neubauer, B. L. , Young, J. , Chan, E. M. , Iversen, P. , Cronier, D. , Kreklau, E. , and Dios, A. de Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs* **2014**, 32, 825–837.

[25] Patnaik, A. , Rosen, L. S. , Tolaney, S. M. , Tolcher, A. W. , Goldman, J. W. , Gandhi, L. , Papadopoulos, K. P. , Beeram, M. , Rasco, D. W. , Hilton, J. F. , Nasir, A. , Beckmann, R. P. , Schade, A. E. , Fulford, A. D. , Nguyen, T. S. , Martinez, R. , Kulanthaivel, P. , Li, L. Q. , Frenzel, M. , Cronier, D. M. , Chan, E. M. , Flaherty, K. T. , Wen, P. Y. , and Shapiro, G. I. Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *Cancer Discovery* **2016**, 6, 740–753.

[26] Hamilton, E. and Infante, J. R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treatment Reviews* **2016**, 45, 129–138.

[27] O'Leary, B. , Finn, R. S. , and Turner, N. C. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews. Clinical Oncology* **2016**, 13, 417–430.

[28] Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacological Research* **2020**, 152, 104609.

[29] Lim, J. S. J. , Turner, N. C. , and Yap, T. A. CDK4/6 Inhibitors: Promising Opportunities beyond Breast Cancer. *Cancer Discovery* **2016**, 6, 697–699.

[30] Salvador-Barbero, B. , Álvarez-Fernández, M. , Zapatero-Solana, E. , El Bakkali, A. , Menéndez, M. D. C. , López-Casas, P. P. , Di Domenico, T. , Xie, T. , VanArsdale, T. , Shields, D. J. , Hidalgo, M. , and Malumbres, M. CDK4/6 Inhibitors Impair Recovery from Cytotoxic Chemotherapy in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2020**, 37, 340-353.e6.

[31] Chou, A. , Froio, D. , Nagrial, A. M. , Parkin, A. , Murphy, K. J. , Chin, V. T. , Wohl, D. , Steinmann, A. , Stark, R. , Drury, A. , Walters, S. N. , Vennin, C. , Burgess, A. , Pinese, M. , Chantrill, L. A. , Cowley, M. J. , Molloy, T. J. , Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative (APGI), Waddell, N. , Johns, A. , Grimmond, S. M. , Chang, D. K. , Biankin, A. V. , Sansom, O. J. , Morton, J. P. , Grey, S. T. , Cox, T. R. , Turchini, J. , Samra, J. , Clarke, S. J. , Timpson, P. , Gill, A. J. , and Pajic, M. Tailored first-line and second-line CDK4-targeting treatment combinations in mouse models of pancreatic cancer. *Gut* **2018**, 67, 2142–2155.

[32] Shah, S. , Chandra, A. , Kaur, A. , Sabnis, N. , Lacko, A. , Gryczynski, Z. , Fudala, R. , and Gryczynski, I. Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2017**, 170, 65–69.

[33] Kauffman, M. , Kauffman, M. , Zhu, H. , Jia, Z. , and Li, Y. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *Reactive Oxygen Species* **2016**

[34] Tasca, E. , D'Abramo, M. , Galantini, L. , Giuliani, A. M. , Pavel, N. V. , Palazzo, G. , and Giustini, M. A Stereochemically Driven Supramolecular Polymerisation. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* **2018**, 24, 8195–8204.

[35] Menozzi, M. , Valentini, L. , Vannini, E. , and Arcamone, F. Self-Association of Doxorubicin and Related Compounds in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1984**, 73, 766–770.

[36] Shirazi-Fard, S. , Reza Zolghadr, A. , and Klein, A. How does aggregation of doxorubicin molecules affect its solvation and membrane penetration? *New Journal of Chemistry* **2023**, 47, 22063–22077.

[37] Gharbi, S. I. , Pelletier, L. A. , Espada, A. , Gutiérrez, J. , Sanfeliciano, S. M. G. , Rauch, C. T. , Ganado, M. P. , Baquero, C. , Zapatero, E. , Zhang, A. , Benach, J. , Russell, A.-M. , Cano, L. , Gomez, S. , Broughton, H. , Pulliam, N. , Perez, C. M. , Torres, R. , Debets, M. F. , Dios, A. de , Puig, O. , Hilgers, M. T. , and Lallena, M. J. Crystal structure of active CDK4-cyclin D and mechanistic basis for Abemaciclib efficacy. *npj Breast Cancer* **2022**, 8, 1–11.

[38] Wood, M. J. , Irwin, W. J. , and Scott, D. K. PHOTODEGRADATION OF DOXORUBICIN, DAUNORUBICIN and EPIRUBICIN MEASURED BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **1990**, 15, 291–300.

[39] Barone, P. W. , Baik, S. , Heller, D. A. , and Strano, M. S. Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes. *Nature Materials* **2005**, 4, 86–92.

[40] Fülöp, Z. , Gref, R. , and Loftsson, T. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 454, 559–561.

[41] Yamada, Y. Dimerization of Doxorubicin Causes Its Precipitation. *ACS Omega* **2020**, 5, 33235–33241.

[42] Wu, D. C. and Ofner, C. M. Adsorption and Degradation of Doxorubicin from Aqueous Solution in Polypropylene Containers. *AAPS PharmSciTech* **2013**, 14, 74–77.

[43] Lieber, M. , Mazzetta, J. , Nelson-Rees, W. , Kaplan, M. , and Todaro, G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer* **1975**, 15, 741–747.

[44] Kim, Y. , Han, D. , Min, H. , Jin, J. , Yi, E. C. , and Kim, Y. Comparative Proteomic Profiling of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines. *Molecules and Cells* **2014**, 37, 888–898.

[45] Cicenas, J. , Kvederaviciute, K. , Meskinyte, I. , Meskinyte-Kausiliene, E. , Skeberdyte, A. , and Cicenas, J. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers* **2017**, 9, 42.

[46] Datta, J. , Bianchi, A. , De Castro Silva, I. , Deshpande, N. U. , Cao, L. L. , Mehra, S. , Singh, S. , Rafie, C. , Sun, X. , Chen, X. , Dai, X. , Colaprico, A. , Sharma, P. , Dosch, A. R. , Pillai, A. , Hosein, P. J. , Nagathihalli, N. S. , Komanduri, K. V. , Wilson, J. M. , Ban, Y. , and Merchant, N. B. Distinct mechanisms of innate and adaptive immune regulation underlie poor oncologic outcomes associated with KRAS-TP53 co-alteration in pancreatic cancer. *Oncogene* **2022**, 41, 3640–3654.

[47] Kamisawa, T. , Wood, L. D. , Itoi, T. , and Takaori, K. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)* **2016**, 388, 73–85.

[48] Yachida, S. , Jones, S. , Bozic, I. , Antal, T. , Leary, R. , Fu, B. , Kamiyama, M. , Hruban, R. H. , Eshleman, J. R. , Nowak, M. A. , Velculescu, V. E. , Kinzler, K. W. , Vogelstein, B. , and Iacobuzio-Donahue, C. A. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **2010**, 467, 1114–1117.

[49] Rak, R. , Haklai, R. , Elad-Tzfadia, G. , Wolfson, H. J. , Carmeli, S. , and Kloog, Y. Novel LIMK2 Inhibitor Blocks Panc-1 Tumor Growth in a mouse xenograft model. *Oncoscience* **2014**, 1, 39–48.

[50] Bouclier, C. , Simon, M. , Laconde, G. , Pellerano, M. , Diot, S. , Lantuejoul, S. , Busser, B. , Vanwonterghem, L. , Vollaire, J. , Josserand, V. , Legrand, B. , Coll, J.-L. , Amblard, M. , Hurbin, A. , and Morris, M. C. Stapled peptide targeting the CDK4/Cyclin D interface combined with Abemaciclib inhibits KRAS mutant lung cancer growth. *Theranostics* **2020**, 10, 2008–2028.

[51] Peyressatre, M. , Arama, D. P. , Laure, A. , González-Vera, J. A. , Pellerano, M. , Masurier, N. , Lisowski, V. , and Morris, M. C. Identification of Quinazolinone Analogs Targeting CDK5 Kinase Activity and Glioblastoma Cell Proliferation. *Frontiers in Chemistry* **2020**, 8

[52] Gillies, R. J. , Didier, N. , and Denton, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* **1986**, 159, 109–113.

[53] Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg 2008.

[54] Jeong, S. H. , Kim, K. K. , Jeong, S. J. , An, K. H. , Lee, S. H. , and Lee, Y. H. Optical absorption spectroscopy for determining carbon nanotube concentration in solution. *Synthetic Metals* **2007**, 157, 570–574.

[55] Attal, S. , Thiruvengadathan, R. , and Regev, O. Determination of the concentration of single-walled carbon nanotubes in aqueous dispersions using UV-visible absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 8098–8104.

[56] Airoldi, M. , Barone, G. , Gennaro, G. , Giuliani, A. M. , and Giustini, M. Interaction of Doxorubicin with Polynucleotides. A Spectroscopic Study. *Biochemistry* **2014**, 53, 2197–2207.

[57] Hughes, M. A. Modified chalcogenide glasses for optical device applications. **2007**

[58] Akaoğlu, C. INVESTIGATION OF FILM FORMING, OPTICAL AND ELECTRICAL PROPERTIES OF AgNPs DOPED PS/AgNPs COMPOSITES, 07/2017.

[59] Kizil, R. and Irudayaraj, J. Chapter 6 - Spectroscopic Technique: Fourier Transform Raman (FT-Raman) Spectroscopy. *In Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)*; Sun, D.-W., Ed.; Academic Press, 2018; pp. 193–217.

[60] Bachilo, S. M. , Strano, M. S. , Kittrell, C. , Hauge, R. H. , Smalley, R. E. , and Weisman, R. B. Structure-Assigned Optical Spectra of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 298, 2361–2366.

[61] Marquardt, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* **1963**, 11, 431–441.

[62] Elsabee, M. and Prankerd, R. J. Solid-state properties of drugs. II. Peak shape analysis and deconvolution of overlapping endotherms in differential scanning calorimetry of chiral mixtures. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, 86, 211–219.

[63] Changenet-Barret, P. , Gustavsson, T. , Markovitsi, D. , Manet, I. , and Monti, S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15, 2937–2944.

[64] Eksborg, S. Extraction of daunorubicin and doxorubicin and their hydroxyl metabolites: self-association in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1978**, 67, 782–785.

[65] Kasparek, A. and Smyk, B. A new approach to the old problem: Inner filter effect type I and II in fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, 198, 297–303.

[66] Morris, M. Shining Light on Protein Kinase Biomarkers with Fluorescent Peptide Biosensors. *Life* **2022**, 12, 516.

[67] Prével, C. , Pellerano, M. , González-Vera, J. A. , Henri, P. , Meunier, L. , Vollaire, J. , Josserand, V. , and Morris, M. C. Fluorescent peptide biosensor for monitoring CDK4/cyclin D kinase activity in melanoma cell extracts, mouse xenografts and skin biopsies. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, 85, 371–380.

[68] ÄKTA pure™ protein purification system. https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/chromatography-systems/akta-pure-p-05844?srsltid=AfmBOoryISXxf1OAaiMIbH5Nj0g7j-E1qgYkqqZJ3v0f3LqytODzqd2o (accessed Apr. 30, 2025).

[69] GSTrap™ HP Columns | Cytiva. https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/affinity-tagged-protein/gstrap-hp-columns-p-00408?srsltid=AfmBOopCKYxFNUcoLIs-z63GSEnpPOYioB3cXHSQxYiOruyr6Q05Gqb4 (accessed Apr. 30, 2025).

[70] Smith, D. B. and Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **1988**, 67, 31–40.

[71] HiTrap Desalting columns with Sephadex G-25 resin. https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/desalting-and-buffer-exchange/hitrap-desalting-columns-with-sephadex-g-25-resin-p-05853 (accessed Apr. 30, 2025).

[72] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680–685.

[73] Weber, K. and Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* **1969**, 244, 4406–4412.

[74] Présentation de l'électrophorèse SDS-PAGE (séparation des protéines selon leur taille). https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page?srsltid=AfmBOoqVr3bQXmgUYnIb5tNlM59RJY_bICZIMhdzgk72xqZkvdijLpYM (accessed Jun. 20, 2025).

[75] Dyballa, N. and Metzger, S. Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **2012**, 893, 47–59.

[76] Coleman, K. G. , Wautlet, B. S. , Morrissey, D. , Mulheron, J. , Sedman, S. A. , Brinkley, P. , Price, S. , and Webster, K. R. Identification of CDK4 Sequences Involved in Cyclin D1 and p16 Binding *. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 18869–18874.

[77] deporecipe sds page stacking gel recipe. *Deporecipe.co*. . (2014).

[78] Western Blotting Electrophoresis Techniques | Bio-Rad. https://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/western-blotting-electrophoresis-techniques?ID=PQEENTWDLBV5 (accessed Apr. 30, 2025).

[79] Birch, M. E. , Wang, C. , Fernback, J. E. , Feng, H. A. , Birch, Q. T. , and Dozier, A. K. Analysis of Carbon Nanotubes and Nanofibers on Mixed Cellulose Ester Filters by Transmission Electron Microscopy. **2017**

[80] https://iubemcenter.indiana.edu/doc/williams-and-carter/transmission-electron-microscopy-chapter-09.pdf. https://iubemcenter.indiana.edu/doc/williams-and-carter/transmission-electron-microscopy-chapter-09.pdf (accessed May 22, 2025).

[81] Haider, M. , Rose, H. , Uhlemann, S. , Schwan, E. , Kabius, B. , and Urban, K. A spherical-aberration-corrected 200 kV transmission electron microscope. *Ultramicroscopy* **1998**, 75, 53–60.

[82] Benchakar, M. Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Composés Bidimensionnels, Les MXènes, Pour Le Stockage et La Conversion de l'énergie, 10/2020.

VII. Etudes spectroscopiques préliminaires des suspensions aqueuses de SWNT et de la Doxorubicine

Cette partie est dédiée à l'étude des propriétés optiques et spectroscopiques des SWNT et des petites molécules thérapeutiques : la Doxorubicine et l'Abemaciclib, ceci dans le but de mieux comprendre leurs signaux, leurs signatures spécifiques et leur évolution en fonction de leur concentration et de leur environnement. Trois techniques de spectroscopie sont utilisées : la spectroscopie d'absorption UV-visible-proche IR, la spectroscopie de fluorescence UV-visible et la spectroscopie Raman couplée fluorescence proche infra-rouge (NIR).

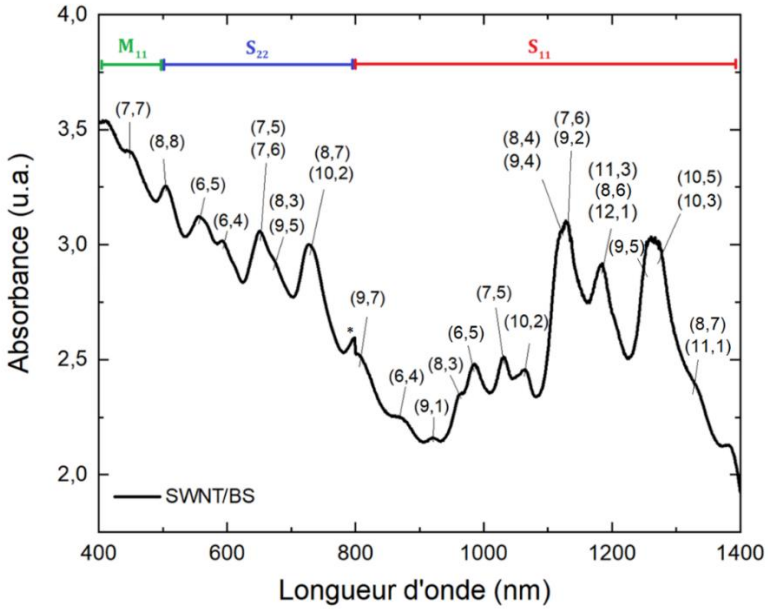
VII.1. Etude spectroscopique des suspensions aqueuses de SWNT

VII.1.1. Suspensions aqueuses SWNT/BS de référence

VII.1.1.1. Absorption dans l'UV-visible proche IR

La spectroscopie d'absorption nous permet d'étudier la qualité de dispersion des SWNT, de déterminer leur concentration et nous donne des informations à propos de leur environnement diélectrique [1],[2],[3],[4].

Les dispersions aqueuses de SWNT sont étudiées entre 400 et 1400 nm, couvrant ainsi leurs transitions optiques pour différents (n,m) : les E_{11} des semi-conducteurs (S_{11}) dans le proche IR (NIR) au-dessus de 800 nm, les E_{11} des semi-conducteurs (S_{22}) dans le visible entre 500 et 800 nm et les E_{11} des métalliques (M_{11}) en-dessous de 500 nm [5],[6],[7]. La Figure VII-1 montre le spectre typique obtenu avec une suspension aqueuse de SWNT HiPCO dispersés dans des sels biliaires (Bile salts, BS). Les types de SWNT (n,m) associés à chaque bande y sont renseignés.



<u>Figure VII-1 :</u> Spectre d'absorption UV-visible-NIR d'une suspension aqueuse de SWNT dispersés avec du BS (0,1 wt% SWNT et 0,1 wt% BS), chaque bande est attribuée à des indices (n,m).

VII.1.1.2. Fluorescence dans le proche IR

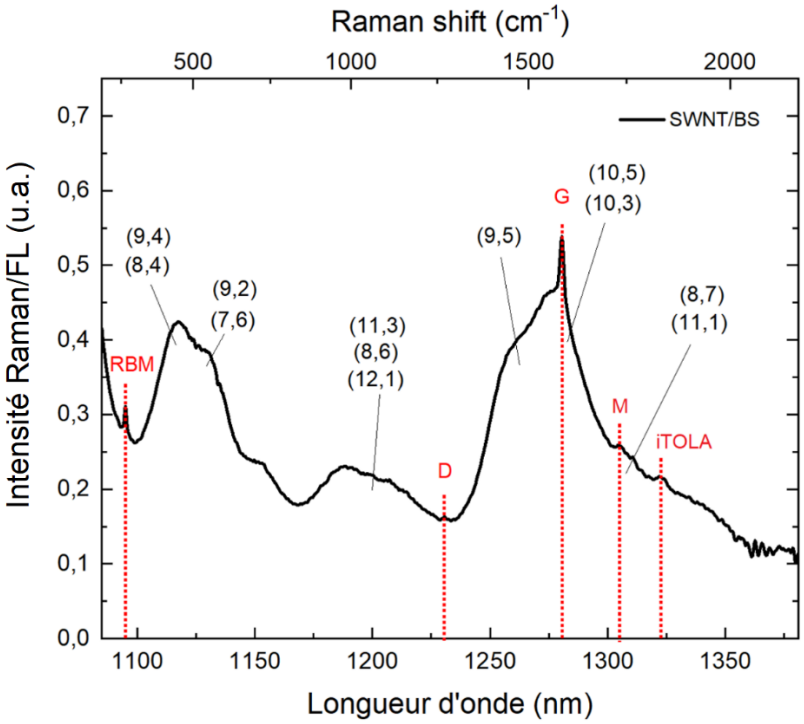
La fluorescence des dispersions aqueuses de SWNT est étudiée dans le proche IR entre 1080 et 1380 nm, avec une excitation à 1064 nm, grâce à la spectroscopie Raman couplée FL. La borne inférieure est fixée par la coupure du filtre Notch de l'appareil à 1085 nm (182 cm^{-1}). La borne supérieure est quant à elle fixée au pied de la bande caractéristique de l'eau, à 1380 nm (2153 cm^{-1}). La Figure VII-2 montre un spectre typique d'une dispersion de SWNT/BS, avec un double axe en x, longueur d'onde en bas et décalage Raman en haut [8],[9]. Les pics Raman (RBM, D, G…) sont mis en évidence en rouge. Les bandes PL sont relevées et pour chaque pic, les types (n,m) de SWNT correspondants sont identifiés.

On considère 3 regroupements de pics et/ou bandes comme des « *bunchs* », tous significativement intenses relativement aux bandes Raman :

- **le bunch (7,6),** vers 1125 nm et regroupant les SWNT (7,6), (9,2), (8,4) et (9,4)

- **le bunch (8,6)**, vers 1200 nm pour les SWNT (8,6), (11,3) et (12,1)

- **le bunch (9,5)**, vers 1280 nm pour les (9,5), (10,3), (10,5), (8,7) et (11,1)

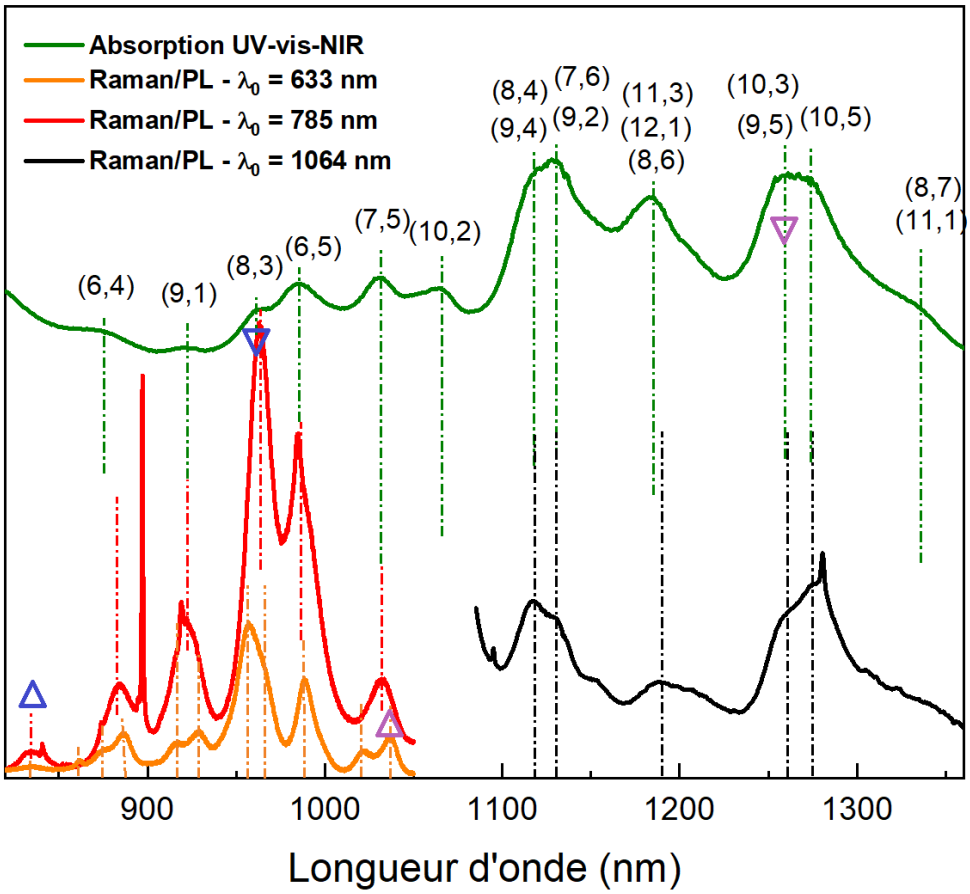


<u>Figure VII-2 :</u> Spectre couplé Raman/FL avec excitatrice à 1064 nm d'une suspension de SWNT dispersés dans du BS (0,1 wt% SWNT et 0,1 wt% BS). Les types de SWNT (n,m) sont attribués à chaque bande de FL (en noir) et les pics Raman sont identifiés (en rouge).

La fluorescence de cette suspension de SWNT/BS a aussi été étudiée avec des longueurs d'ondes d'excitation de 633 et 785 nm. La Figure VII-3 montre les correspondances de bandes entre absorption et émission dans le proche IR. Sur cette même figure sont représentés les spectres d'absorption (en vert) et d'émission (en orange, rouge et noir) pour ce même échantillon.

Les maxima de chacune des bandes d'absorption et d'émission sont relevés à partir d'ajustements indépendants de chaque spectre. Ces ajustements sont réalisés avec une fonction Voigt correspondant à chaque bande, et chacune de ces bandes sont mises en évidence en pointillés de la couleur du spectre correspondant. On observe que la plupart des bandes d'absorption se trouvent à une longueur d'onde correspondant à celle d'une bande d'émission. C'est le cas par exemple pour les bandes des SWNT (7,6)/(9,2) et (8,4)/(9,4). Ces bandes sont attribuées à des transitions optiques directes pour ces types de SWNT, où les pics d'absorption E_{11} et les pics FL sont superposées pour le même nanotube, *modulo* un léger décalage Stokes correspondant à une faible perte d'énergie

entre l'excitation et l'émission. Dans notre cas, cette différence d'énergie est d'environ 5 meV, correspondant à un décalage potentiel d'environ 4 nm.



<u>Figure VII-3 :</u> Spectre d'absorption UV-vis-NIR (vert) et spectres Raman/FL avec excitatrice à 633 nm (orange), 785 nm (rouge) et 1064 nm (noir) d'une suspension de SWNT/BS (0,1 wt% SWNT et 0,1 wt% BS). Chacun des spectres ont été ajustés en utilisant une fonction Voigt pour chaque bande. Les traits en pointillés correspondent à ces bandes, et leur couleur correspond au spectre auquel ils sont reliés. Les spectres sont décalés en intensité/absorbance pour une meilleure représentation visuelle. Les triangles indiquent les bandes correspondant à des EPC.

Les bandes d'émission et d'absorption sans correspondance directe sont attribuées à des phénomènes d'EPC ou d'EET. Par exemple, la bande vers 835 nm (1491 meV), une bande des spectres d'émission excités à 633 et 785 nm, n'a pas d'attribution directe en absorption, et nous proposons son attribution à un phénomène d'EPC. Il s'agit d'un mécanisme de couplage entre excitons et phonos, renforçant ou activant des transitions

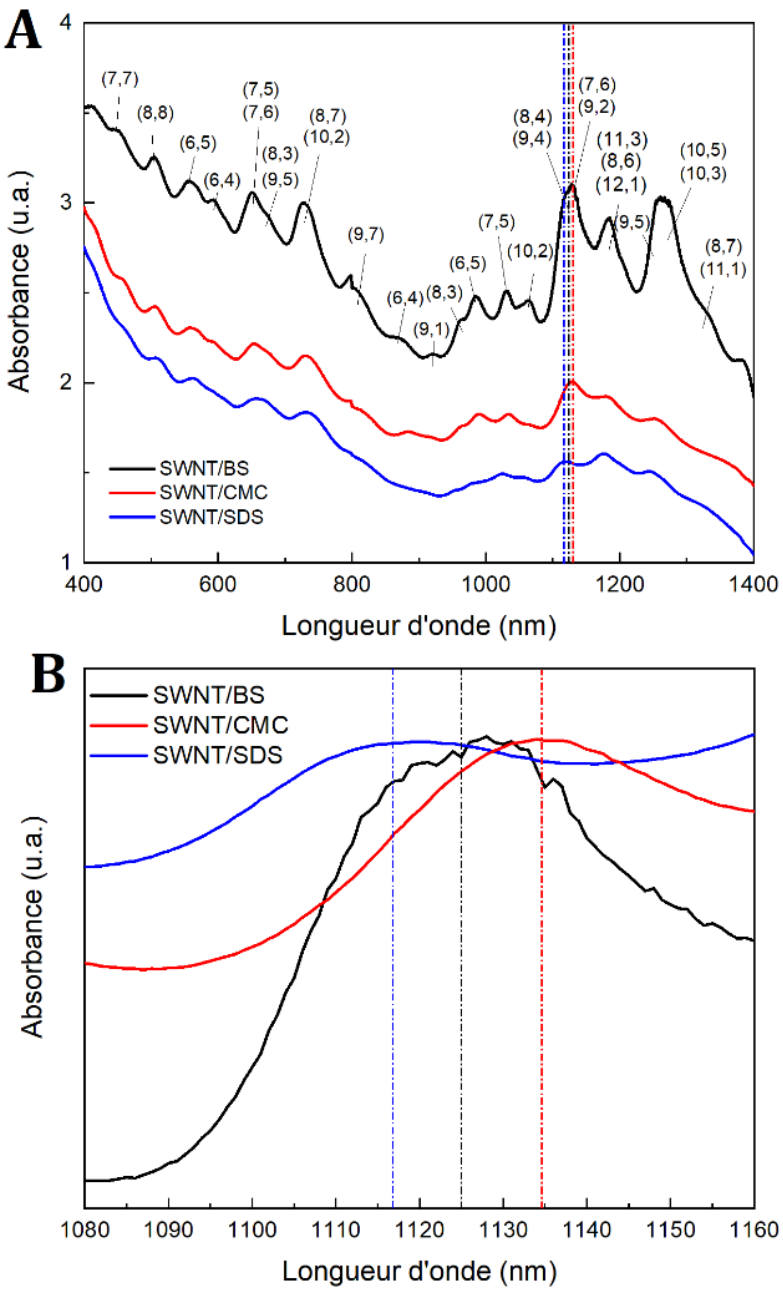
autrement interdites, et se manifestant par un décalage d'environ 200 meV entre les bandes d'absorption et d'émission. Dans cette hypothèse, l'absorption du nanotube correspondant serait située à 961 nm (1293 meV), valeur du pic attribué au (8,3), soit 198 meV en dessous de la bande d'émission à 835 nm (1491 meV), écart compatible avec une bande EPC située environ 200 meV au-dessus du pic principal. Nous proposons de plus l'attribution des bandes d'émission vers 1035 nm (1199 meV) à l'EPC du (9,5), dont la bande d'absorption se trouve à 1258 nm (987 meV), présentant une différence d'énergie de 212 meV.

La bande d'émission vers 1200 nm, n'a pas de résonnance directe. Son E_{22} n'est pas résonnant avec l'excitation du laser, mais un tube donneur plus petit lui transfèrerait l'exciton, typique d'un phénomène d'EET.

VII.1.2. Comparaison des spectres pour différents dispersants

Plusieurs dispersants sont utilisés pour mettre les SWNT en suspension : tout d'abord, les sels biliaires (BS) [10] et le dodécylsulfate de sodium (SDS) [11], des surfactants de référence et connus comme étant efficaces pour la dispersion de SWNT, et ensuite la carboxyméthylcellulose (CMC), un polyélectrolyte biocompatible [12]. Ces trois dispersants sont utilisés pour disperser les SWNT dans les mêmes conditions expérimentales et de concentrations (0,1 wt% SWNT et 0,1 wt% dispersant) et sont ensuite étudiés en spectroscopie d'absorption (Figure VII-4A).

Les trois spectres sont bien résolus, avec des rapports signal/bruit très faibles, et l'on peut facilement distinguer toutes les bandes pour chacun d'entre eux. On remarque cependant une meilleure résolution spectrale avec le BS, les bandes sont plus étroites, mieux séparées et leur rapport signal/bruit augmente. On observe une absorbance en moyenne deux fois plus élevée pour la suspension SWNT/BS que pour la suspension SWNT/CMC, et trois fois plus élevée que la suspension SWNT/SDS. Une différence notable réside dans les décalages en longueur d'onde que l'on peut observer entre ces spectres. Le signal de la suspension SWNT/SDS est en effet décalé vers le bleu par rapport à la suspension SWNT/BS d'environ 11 nm en moyenne, et le signal de la suspension SWNT/CMC est décalé vers le rouge, d'environ 8 nm en moyenne par rapport à la suspension SWNT/BS. La Figure VII-4B, centrée sur la bande du (7,6), permet de mieux apprécier ce décalage.



<u>Figure VII-4 :</u> A : Spectres d'absorption UV-visible-proche IR d'une suspension de SWNT dispersés dans du BS (0,1wt% SWNT et 0,1wt% BS), dans du CMC (0,1wt% SWNT et 0,1wt% CMC) et dispersés dans du SDS (0,1wt% SWNT et 0,1wt% SDS), les types de SWNT (n,m) sont attribués à chaque pic. B : Les mêmes spectres, centrés sur la bande du (7,6) et avec une comparaison des maxima, les spectres sont normalisés sur les maxima des pics.

L'absorbance plus élevée pour le BS indique qu'il s'agit d'un dispersant plus efficace que les deux autres. La forte affinité du BS pour les SWNT se traduit par l'individualisation et la mise en suspension d'une quantité plus élevée de nanotubes. La meilleure résolution

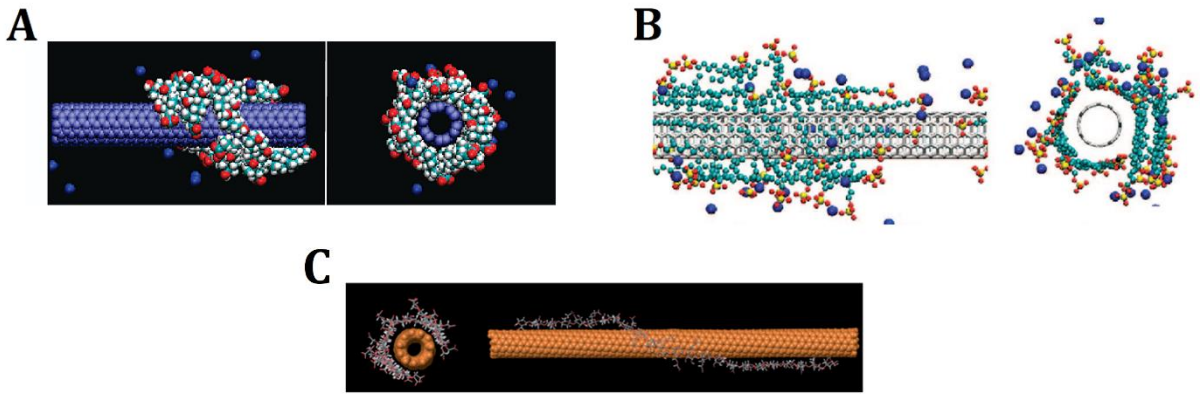
est due à l'enrobage BS qui désagrège les faisceaux, ce qui induit moins de transfert d'énergie vers les tubes voisins, et donc un *quenching* et un élargissement inhomogène réduits.

Les décalages observés sont dus aux différentes organisations des dispersants dans l'environnement autour des SWNT. En effet, le BS et le SDS ont tendance à recouvrir uniformément la surface du SWNT [13], alors que la CMC, étant donnée sa nature de polyélectrolyte, s'enroule autour du nanotube d'une manière plus lâche, avec un taux de recouvrement inférieur [14] (Figure VII-5 et 6).Malgré la couverture uniforme du BS et du SDS autour des SWNT, ils n'ont pas non plus entre eux la même organisation. Le BS s'adsorbe de manière empaquetée et polaire, leurs faces hydroxylées et ioniques écrantent l'eau environnante, mais retiennent une couche d'eau liée au voisinage proche du tube. En revanche, le SDS forme une couronne plus lâche où les chaînes hydrocarbone sont au contact direct du tube et les têtes sulfate (polaires) repoussées vers l'extérieur, l'écrantage est donc similaire, mais il y a moins d'eau structurée collée à la paroi du SWNT.

Ces différentes organisations autour des SWNT modifient leur environnement diélectrique et, par conséquent, leurs propriétés excitoniques, ce qui modifie les signatures spectroscopiques des SWNT concernés [15]. Nous faisons l'hypothèse que plus le taux de recouvrement de l'environnement direct du SWNT est important, plus l'écrantage des excitons par les dipôles induits sur les molécules d'eau l'est aussi, ce qui se caractérise par un décalage vers le bleu du signal FL du nanotube.

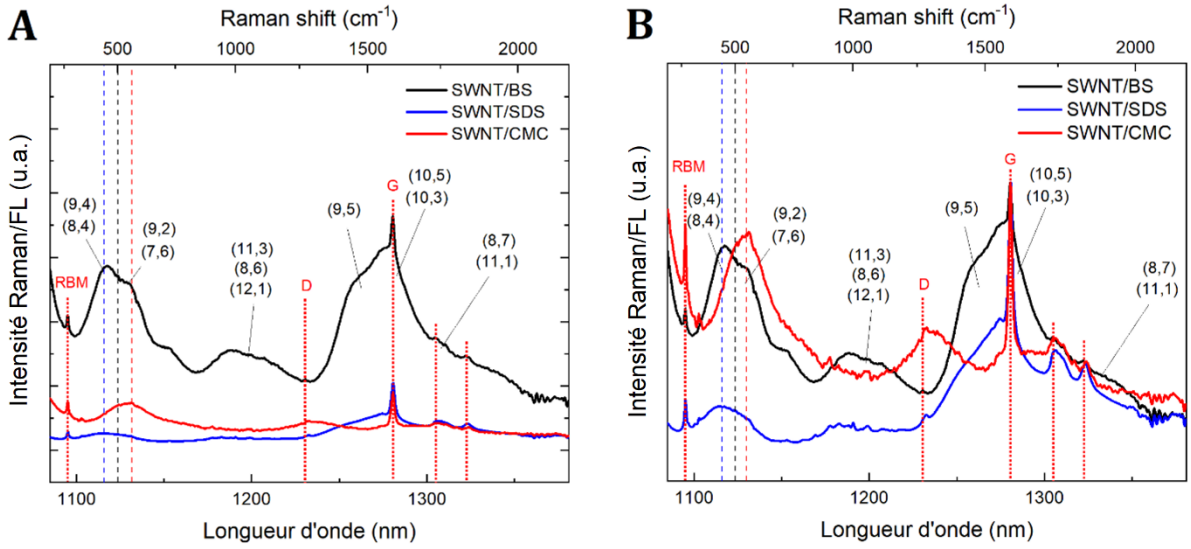


Figure VII-5 : Représentations schématiques de l'organisation du BS (A) et de la CMC (B) dans l'environnement autour d'un SWNT calquées sur des modélisations numériques [10],[14],[16].



<u>Figure VII-6 :</u> Modélisations numériques de l'organisation de BS (A), de SDS (B) et de CMC (C) dans l'environnement autour d'un SWNT [10],[14],[16].

Les mêmes dispersions de SWNT qu'en spectroscopie d'absorption sont étudiées en spectroscopie Raman/FL (Figure VII-7).



<u>Figure VII-7 :</u> Spectres couplés Raman/FL, avant (A) et après (B) normalisation sur le maximum de la bande G, de 3 suspensions aqueuses de SWNT :

- dispersion avec du BS (0,1wt% SWNT et 0,1wt% BS) ,

- dispersion avec du CMC (0,1wt% SWNT et 0,1wt% CMC)

- dispersion avec du SDS (0,1wt% SWNT et 0,1wt% SDS)

A titre d'exemple, le bunch (7,6) est indexé pour chacun des spectres et les types de SWNT (n,m) sont attribués.

Les trois spectres sont bien définis, et leurs bandes sont identifiables. L'intensité FL de la suspension SWNT/BS est environ 5 fois plus élevée que les intensités des suspensions SWNT/CMC et SWNT/SDS, qui elles sont comparables. On retrouve aussi des décalages en longueurs d'onde : un décalage vers le rouge d'environ 8 nm en moyenne entre les signaux des suspensions SWNT/BS et SWNT/CMC, et un décalage vers le bleu d'environ 6 nm en moyenne entre les suspensions SWNT/BS et SWNT/SDS.

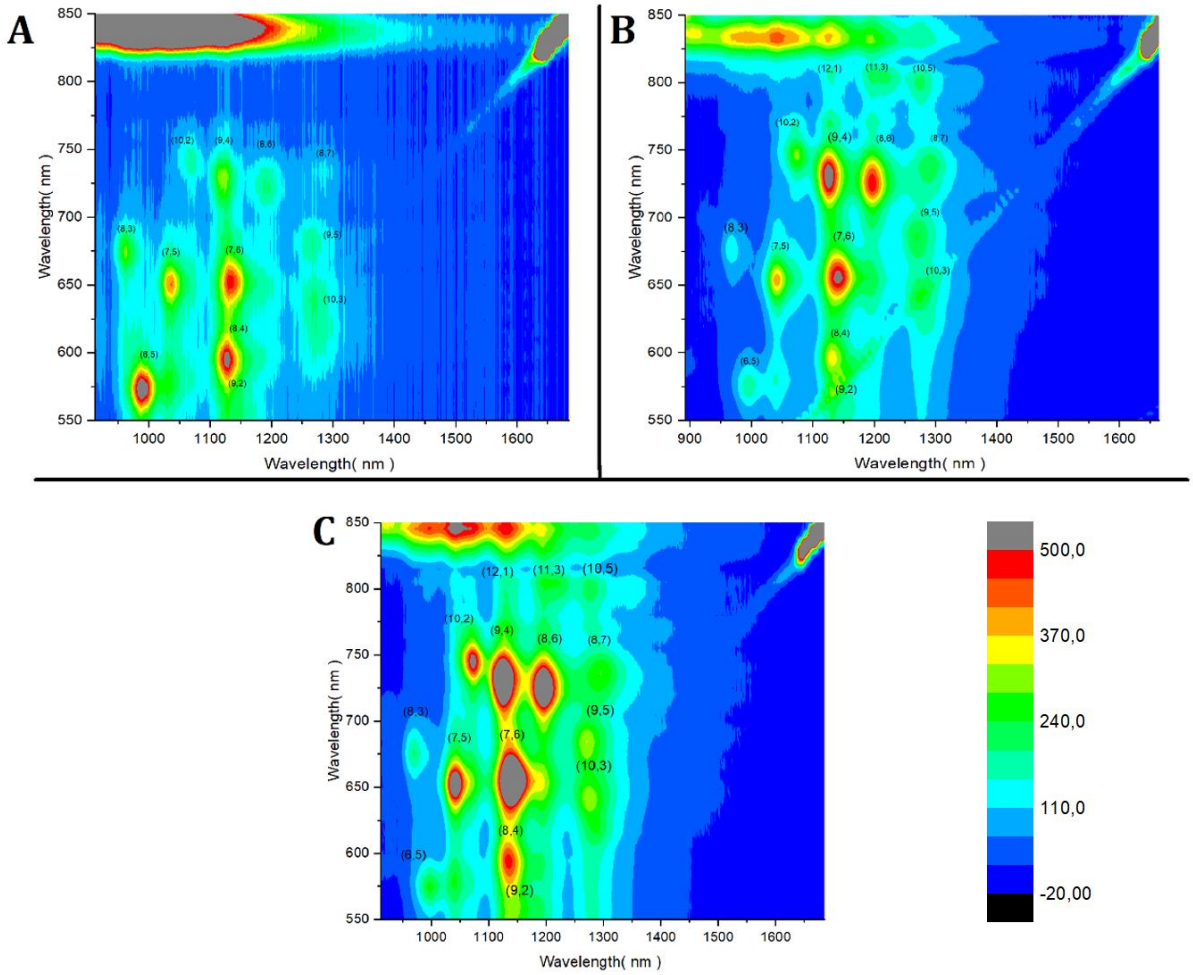
On retrouve des signatures comparables par rapport à la spectroscopie d'absorption, ces deux techniques permettant d'étudier indirectement l'environnement diélectrique des SWNT, et les décalages observés étant signe d'un changement dans cet environnement.

En raison de ses spectres bien résolus et intenses, affichant des décalages caractéristiques par rapport aux autres dispersions, la CMC se révèle être un dispersant facile à identifier spectroscopiquement et particulièrement performant pour l'individualisation des SWNT. Il combine donc ces avantages avec sa biocompatibilité, en faisant un dispersant pertinent pour la suspension de SWNT à objectif thérapeutique.

VII.1.3. Effet de la concentration en CMC

Des cartes de FL sont réalisées sur les suspensions à diverses concentrations en CMC (Figure VII-8). Le signal est plus intense pour les suspensions à 1 et 2 wt% de CMC, par rapport à la suspension à 0,1 wt% dont le signal est plus faible et bruité. Les pics sont de plus en plus intenses à mesure que la concentration en CMC augmente.

Ces cartes FL montrent donc un net renforcement de l'intensité des bandes E_{11} avec l'augmentation de la concentration en CMC, ce qui reflète une meilleure individualisation des nanotubes. À faibles concentrations de CMC (0,1 wt%), le signal peu intense traduit la présence d'agrégats et de fagots, ainsi qu'une plus faible concentration de SWNT individuels. En revanche, aux concentrations supérieures à 1 wt %, la CMC stabilise efficacement les SWNT par enroulement hélicoïdal et écrantage électrostatique, réduisant les interactions inter-tubes et rétablissant la recombinaison radiative excitonique.

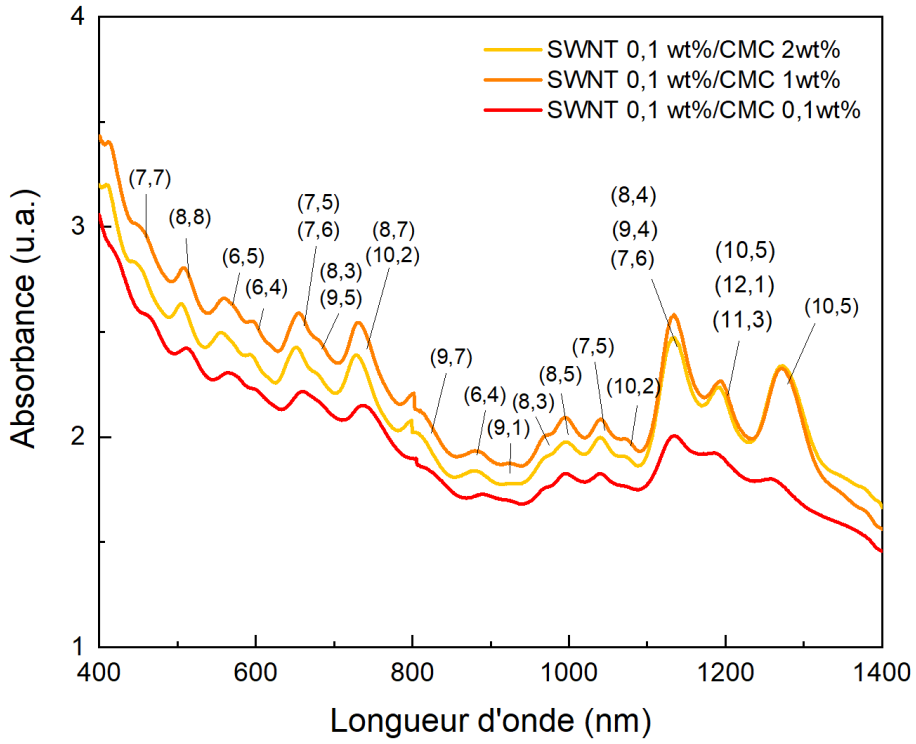


<u>Figure VII-8 :</u> Cartes FL de suspensions de SWNT/CMC à différentes concentrations en CMC (A : 0,1wt%, B : 1wt% et C : 2wt%), plus la couleur est rouge/grise et plus l'intensité de FL est élevée.

Les suspensions de SWNT/CMC sont étudiées en spectroscopie d'absorption aux mêmes concentrations de CMC : 0,1 wt%, 1 wt% et 2 wt% pour 0,1 wt% de SWNT (Figure VII-9). Tout d'abord, aucun décalage en longueur d'onde n'est observé dans le proche IR. Les suspensions à 1 wt% et 2 wt% présentent plus d'absorbance que la suspension à 0,1wt%. En revanche, on observe une absorbance légèrement supérieure pour la suspension à 1 wt% de CMC par rapport à celle à 2 wt%, et ce sur l'intégralité du spectre, à l'exception des pics aux longueurs d'ondes supérieures à 1100 nm.

L'absence de décalage en longueur d'onde suggère que l'environnement immédiat des nanotubes est déjà uniformément recouvert de CMC pour l'échantillon à 0,1 wt%, et que

cet environnement immédiat ne change pas avec l'augmentation de concentration. Le nombre de poches d'eau et de sites d'adsorption dans cet environnement proche est similaire aux plus hautes concentrations.



<u>Figure VII-9 :</u> Spectres d'absorption UV-visible-proche IR de suspensions de SWNT/CMC à différents niveaux de concentrations en CMC (2 wt%, 1 wt% et 0,1 wt%), les types de SWNT (n,m) sont attribués à chaque pic.

La meilleure absorbance pour les suspensions à 1 et 2 wt % de CMC semble indiquer qu'une plus forte concentration en CMC, ici 10 et 20 fois supérieures à celle en SWNT, améliore donc la qualité de la dispersion. Cependant, on peut faire l'hypothèse que lorsque la concentration en CMC augmente, le nombre de chaînes de CMC enroulées autour des SWNT augmente aussi, ce qui éloignerait les tubes entre eux et permettrait une meilleure dispersion. Une trop grande concentration en CMC ne semble pas avoir d'influence positive sur l'exfoliation des nanotubes. Les signaux restent néanmoins très similaires et ceci s'explique par la concentration limitante en SWNT, et l'ajout de CMC n'ayant peu ou plus d'impact significatif. La concentration optimale en CMC pour disperser 0,1 wt% initiaux de SWNT est donc de 1 wt%.

Il est possible de déterminer la concentration en SWNT d'une suspension en utilisant son spectre d'absorption et la loi de Beer-Lambert A = lCα [2],[17]. A étant l'absorbance mesurée dans le spectre à une longueur d'onde donnée, l étant le trajet optique déterminé par la cuvette et α étant le coefficient d'extinction calculé pour un échantillon de SWNT donné, il est possible de déterminer la concentration C dudit échantillon. Ainsi, pour ces échantillons, on prend l'absorbance à 650 nm, et le α correspondant de 200 $(wt\%.cm)^{-1}$, calculé pour une suspension de SWNT dispersés dans des conditions similaires à l'échantillon mesuré ici [18],[19]. On trouve alors des concentrations en SWNT respectives d'environ 0,011 wt%, 0,012 wt% et 0,013 wt% pour les échantillons à 0,1 wt%, 1 wt% et 2 wt% de CMC. Ces concentrations en SWNT « réelles » sont donc inférieures d'un facteur 10 aux concentrations initiales lors de la préparation.

Les suspensions de SWNT/CMC à différentes concentrations en CMC sont aussi étudiées en spectroscopie Raman/FL (Figure VII-10).

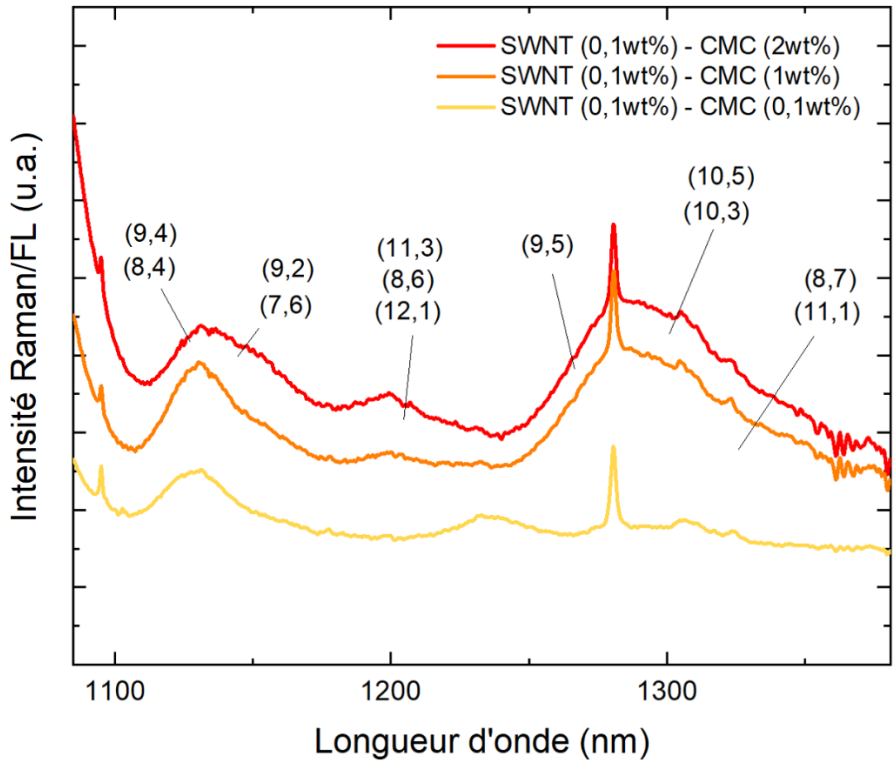
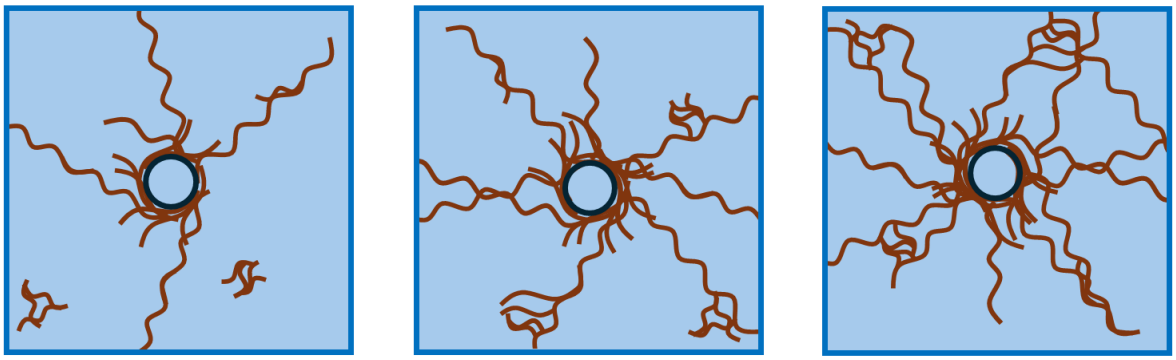


Figure VII-10 : Spectres couplés Raman/FL de suspensions de SWNT/CMC préparées avec différentes concentrations en CMC (2wt%, 1wt% et 0,1wt%), normalisés sur la bande G, les types de SWNT (n,m) sont attribués à chaque pic.

Comme en spectroscopie d'absorption, la suspension à 0,1 wt% est la moins intense et les suspensions à 1 wt% et 2 wt% ont des signaux respectivement trois et quatre fois plus intenses. Cependant, contrairement à l'absorption, ici le signal le plus intense est celui de la suspension à 2 wt%. On observe de plus des modifications dans les bandes FL en longueur d'onde. Le bunch (7,6) des suspensions à 0,1 et 1 wt% de CMC ont des profils similaires, mais pour la suspension à 2 wt% de CMC, la bande correspondant aux (7,6) et aux (9,2) est plus intense, donnant un épaulement. Les bunchs (8,6) et (9,5) ne présentent quant à eux pas de différence significative entre les suspensions à 1 et 2 wt% de CMC. En revanche, le bunch (8,6) de la suspension à 0,1 wt% de CMC est décalé vers le rouge d'environ 30 nm par rapport aux autres suspensions.

Les différences d'intensité entre les signaux des suspensions confirment les hypothèses réalisées à partir de l'absorption : la suspension à 0,1 wt% de CMC semble moins bien disperser les SWNT que les suspensions à 1 et 2 wt%. Cependant, le fait que le signal de la suspension à 2 wt% soit le plus intense suggère que l'augmentation de la concentration en CMC de 1 à 2 wt% affecte l'absorption du complexe SWNT/CMC en écrantant le tube, tout en n'ayant pas d'incidence sur sa fluorescence et son exfoliation. Néanmoins, ces spectres restent très proches. Le fait que la bande du (7,6) et du (9,2) soit plus large pour la suspension à 2 wt% indique qu'un plus grand nombre de nanotubes (7,6) et (9,2) sont émetteurs à 2 wt % de CMC. On peut faire l'hypothèse que la dispersion par CMC est sélective en diamètre : à faible concentration, les grands diamètres sont préférentiellement dispersés, et à 2 wt %, la couverture devient suffisante pour révéler la FL des plus petits diamètres.

Nous proposons alors la représentation schématique de la Figure VII-11 où la première couche de CMC est déjà présente à partir de 0,1 wt%, avec de l'eau interfaciale ou sous forme de poches, et où l'augmentation de la concentration en CMC crée des couches successives ne modifiant pas l'environnement diélectrique, mais permettant une meilleure séparation des SWNT. On considère l'échantillon à 0,1 wt% comme pas assez bien dispersé, ce qui explique sa luminescence plus faible en Raman/FL.



<u>Figure VII-11 :</u> Représentation schématique de la couverture de CMC autour d'un SWNT en fonction de la concentration croissante en CMC.

VII.1.4. Effet de la concentration en SWNT

Des suspensions SWNT/CMC à différentes concentrations de SWNT sont étudiées en spectroscopie Raman/FL entre 10^{-4} wt% et 0,1 wt% et (Figure VII-12A). Comme attendu, les intensités Raman et FL absolues diminuent graduellement lorsque l'on diminue la concentration en SWNT. La limite de détection se situe à 10^{-5} wt% [20],[21].

Les positions et les profils spectraux des bandes sont très semblables (Figure VII-12B), mais les intensités relatives des bandes FL par rapport à celles des bandes Raman diminuent à mesure que la concentration en SWNT baisse. De plus, le signal devient de plus en plus bruité et la signature spectroscopique de la cuve apparaît à certaines longueurs d'ondes, notamment aux alentours de 1190 nm.

Les profils spectraux semblables témoignent que la surface des SWNT est toujours couverte et exposée à un environnement diélectrique comparable. La constance des positions de bandes Raman et FL indique que la couche de CMC fournit un confinement diélectrique suffisamment homogène pour que l'énergie des transitions excitoniques ne dérive pas, quel que soit le rapport massique CMC/SWNT. En revanche, la diminution du rapport des intensités FL/Raman reflète la dépendance intrinsèquement différente des deux signaux. L'intensité Raman croît linéairement avec la population de centres de diffusion, tandis que la FL est sensible aux processus non-radiatifs (annihilation exciton-exciton, migration vers les défauts) dont la probabilité augmente dans des dispersions plus diluées. La concentration de 0,1 wt% initiale de SWNT sera donc privilégiée, étant donné qu'elle présente les bandes FL les plus intenses et mieux définies.

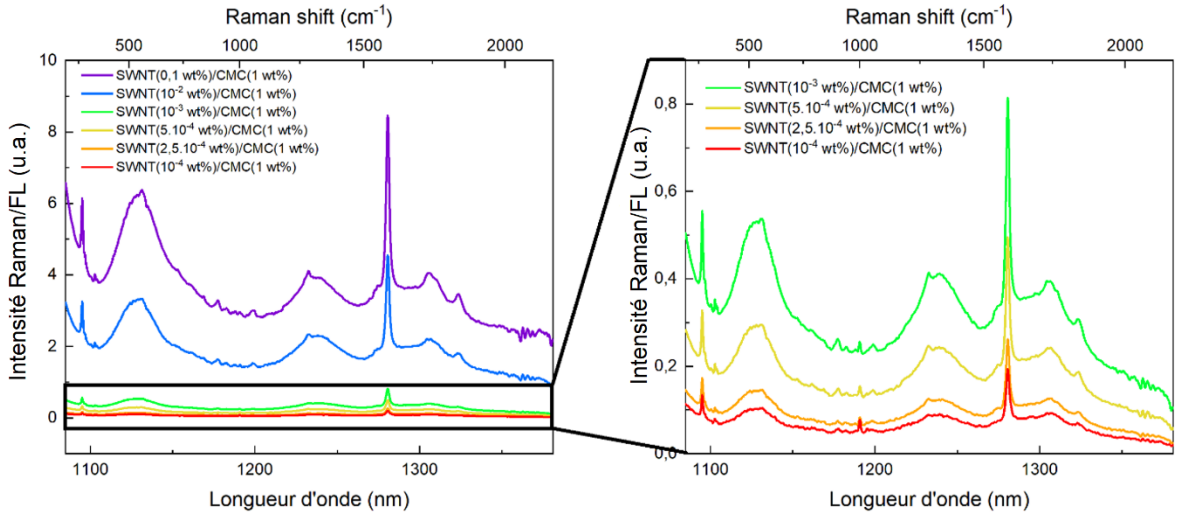


Figure VII-12A : Spectres couplés Raman/FL d'une suspension de SWNT/CMC à différentes concentrations en SWNT.

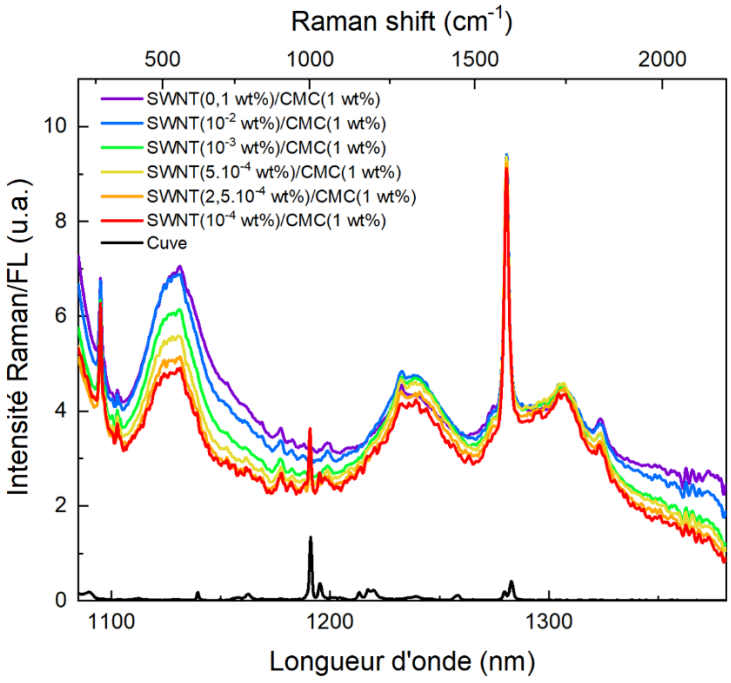


Figure VII-12B : Spectres couplé Raman/FL d'une suspension de SWNT/CMC à différentes concentrations en SWNT normalisés sur la bande G.

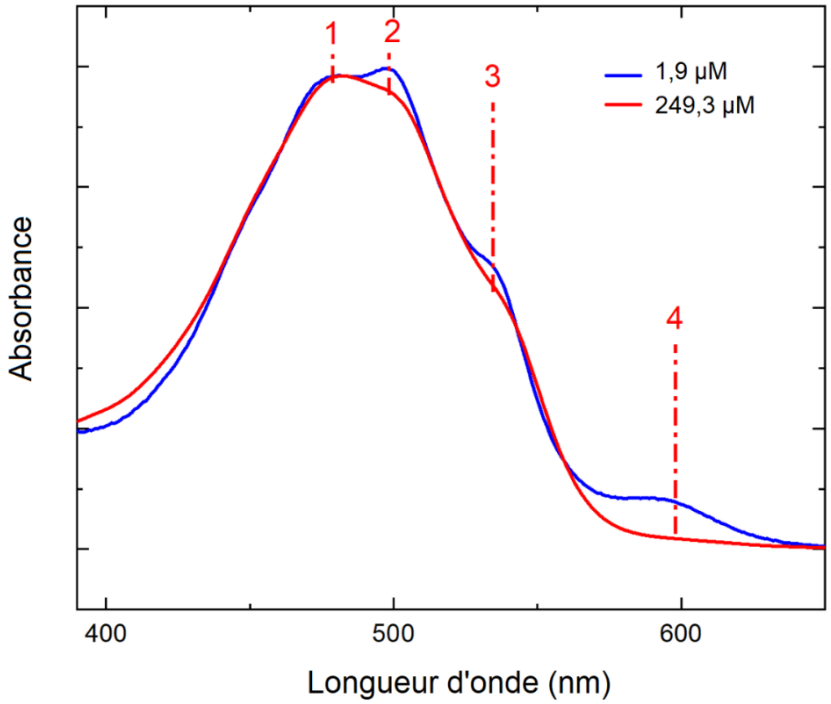
VII.2. Etude spectroscopique de la doxorubicine

La Doxorubicine (DOX-HCl, abrégée ici en DOX) est la première molécule thérapeutique ("drogue") étudiée ici. Elle a une signature optique dans le visible qui permet de l'étudier en spectroscopie d'absorption, ainsi qu'en spectroscopie de fluorescence [22],[23].

VII.2.1. Absorption dans le visible

VII.2.1.1. Evolution en fonction de la concentration

Le spectre d'absorption de la Doxorubicine est composé d'une bande large entre 400 et 560 nm, qui fait apparaitre 3 maxima : 2 principaux à 480 et à 500 nm, et un épaulement additionnel à 535 nm, ainsi qu'une bande secondaire de faible intensité à 600 nm. On observe que ce spectre est modifié en fonction de la concentration (Figure VII-13).



<u>Figure VII-13 :</u> Spectres d'absorption normalisés dans la gamme spectrale du pic d'absorption principal de la Doxorubicine pour un échantillon aqueux de Doxorubicine à 9,2 µM (5.10^{-4} wt%) et un à 276 µM ($1,5.10^{-2}$ wt%), les lignes pointillées mettent en évidence les deux maxima à 480 nm (1) et à 500 nm (2), l'épaulement à 535 nm (3) ainsi que le pic annexe à 600 nm (4)

En effet, plus la concentration en Doxorubicine est faible, plus le maximum à 500 nm, l'épaulement à 535 nm et la bande secondaire à 600 nm (numéro 4, Figure VII-13) sont intenses, relativement au pic à 480 nm. A l'inverse, aux hautes concentrations, le maximum à 500 nm et l'épaulement disparaissent quasiment et le spectre est dominé par le premier maximum.

En solution aqueuse, la Doxorubicine n'est pas complètement dissoute sous forme de molécules individuelles (monomères) car elle possède des propriétés d'auto-association [24],[25]. La plage de concentration étudiée, de l'ordre du µM, ne montre pas de précipitation au cours du temps, mais cela ne signifie pas que le médicament est dissous sous forme individuelle. Il y a donc présence de dimères en coexistence avec les monomères dans les solutions présentées [25]. Elle peut être mise en évidence simplement par le fait que les spectres d'absorption sont différents pour le monomère et le dimère.

VII.2.1.2. Point isobestique

L'absorbance attendue d'une solution de Doxorubicine dans une cuvette de longueur l est une combinaison linéaire des absorbances des monomères et des dimères :

$$A(C, \lambda) = C(\phi_m(C).S_m(\lambda) + \phi_d(C).S_d) \qquad [VII\text{-}1]$$

où $S_m(\lambda)$ et $S_d(\lambda)$ sont les spectres d'absorptions molaires respectifs des monomères et des dimères et où ϕ_m et ϕ_d sont les fractions de monomères et dimères.

La Figure VII-14 compare les deux profils caractéristiques au monomère et au dimère [24],[26],[27].

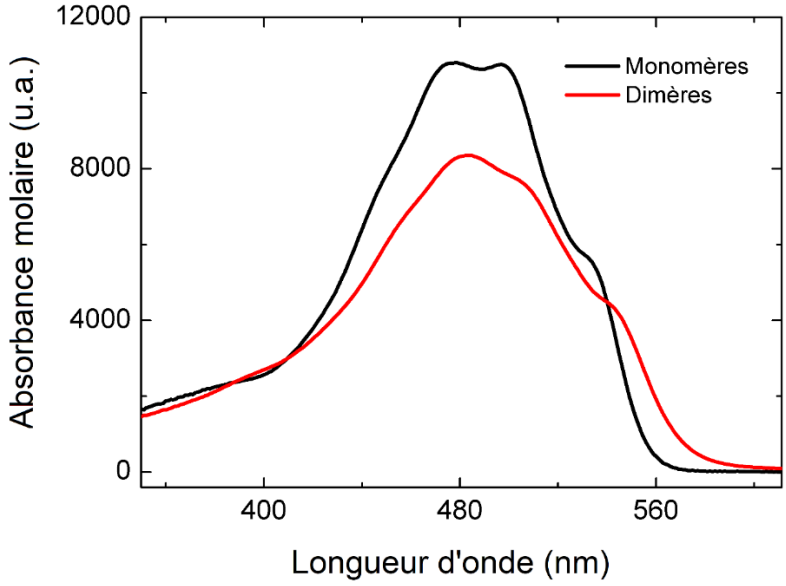


Figure VII-14 : Spectres d'absorption molaire typiques de monomères et dimères de DOX

Le monomère a une bande d'absorption par molécule plus élevée de 20 à 30 % que le dimère et a une contribution de la bande à 500 nm relativement plus importante. De plus, les deux spectres se croisent en un point appelé « point isobestique » aux alentours de 540 nm. Etant donné que l'absorption par molécule est identique à ce point, que ce soit pour les monomères ou les dimères, la loi de Beer-Lambert peut être utilisée pour déterminer la concentration en Doxorubicine d'un échantillon. Après mesure, ce point isobestique est déterminé à 540 ± 3 nm.

VII.2.1.3. *Fraction de monomères*

En normalisant les spectres par la concentration obtenue, les absorbances molaires vérifient :

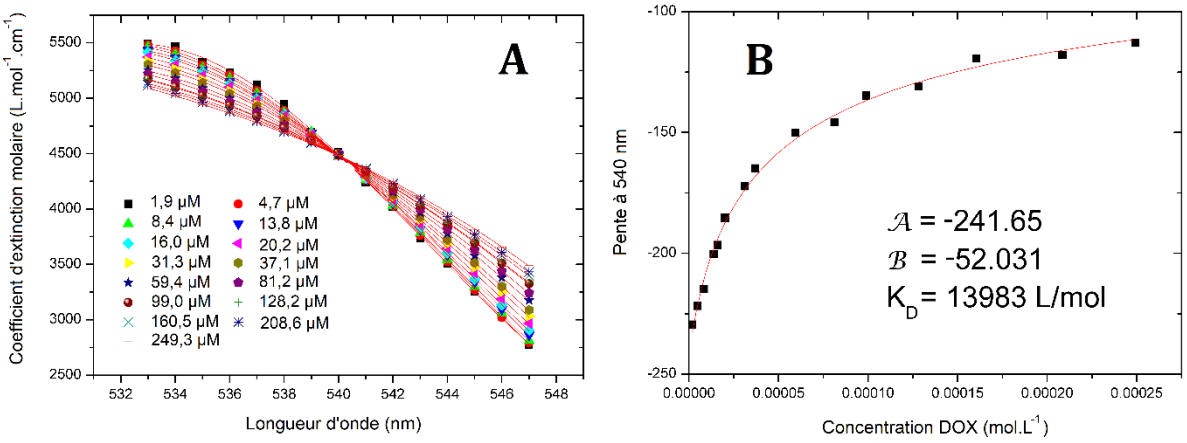
$$\frac{d\left(\frac{A}{C}\right)}{d\lambda} = \phi_m(C)\frac{dS_m}{d\lambda} + \left(1-\phi_m(C)\right)\frac{ds_d}{d\lambda} \qquad [VII\text{-}2]$$

Avec A l'absorbance, C la concentration, ϕ_m la fraction de monomères, λ la longueur d'onde et S_m le spectre d'absorption molaire des monomères.

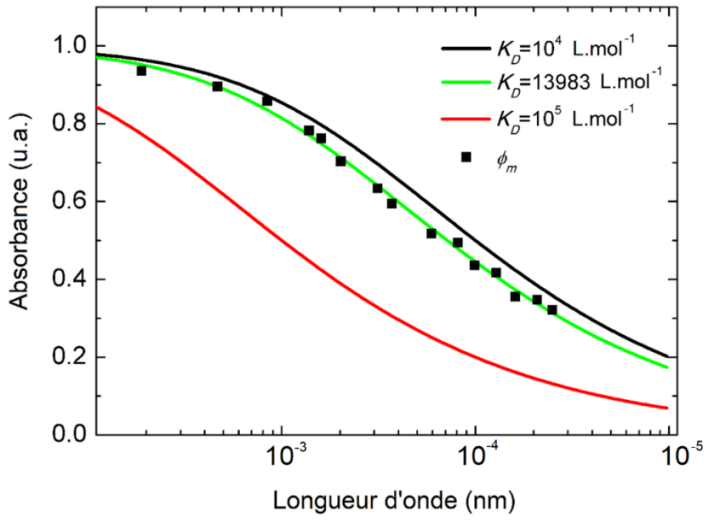
Pour mesurer ϕ_m, on peut combiner cette équation le calcul de concentration des monomères (équation [VI-5]) à λ_C = 540 nm, où la dérivée évolue selon :

$$\left.\frac{d\left(\frac{A}{C}\right)}{d\lambda}\right|_{\lambda_c} = \frac{-1+\sqrt{1+8K_DC}}{4K_DC}\left(\left.\frac{dS_d}{d_\lambda}\right|_{\lambda_c} - \left.\frac{dS_m}{d_\lambda}\right|_{\lambda_c}\right) + \left.\frac{dS_d}{d_\lambda}\right|_{\lambda_c} \qquad [VII\text{-}3]$$

Une mesure précise de la dérivée des courbes peut se faire par un fit polynomial des courbes d'absorbance autour de λ_C (par exemple un polynôme de degré 3 entre 533 et 547 nm) et l'obtention de la dérivée à partir des polynômes. Le fit des points expérimentaux en fonction des 3 paramètres K_D, $\mathcal{A} = \left.\frac{dS_m}{d_\lambda}\right|_{\lambda_c}$ et $\mathcal{B} = \left.\frac{dS_d}{d_\lambda}\right|_{\lambda_c}$ conduit à la Figure VII-15. On obtient alors une valeur de K_D = 13983 L.mol^{-1}. Enfin, par combinaison linéaire de deux spectres de concentrations différentes, la connaissance de la fraction de monomère permet d'obtenir les absorbances molaires pour le dimère et le monomère (Figure VII-16).



<u>Figure VII-15 :</u> A : Ajustement de l'absorption molaire autour de 540 nm à l'aide d'un polynôme d'ordre 3, B : Evolution de sa pente en fonction de la concentration suivant l'équation [VII-2]



<u>Figure VII-16 :</u> Evolution de la fraction de monomères en fonction de la concentration totale de Doxorubicine pour 3 valeurs différentes de la constante d'équilibre.

A basse concentration (environ 2 µM), le signal adopte la forme typique des monomères, avec des contributions 2, 3 et 4 plus intenses. A haute concentration (environ 250 µM), le signal se rapproche du signal caractéristique des dimères. En effet, à basse concentration, la Doxorubicine est sous forme monomère pour plus de 95% des molécules individuelles, et que plus la concentration augmente, plus elle s'agrège pour former des dimères, jusqu'à être majoritaire (supérieure à 50% en molécules individuelles) à partir de 60 µM. La fraction de dimères augmente et finit par être présente à plus de 95% à haute concentration.

VII.2.1.4. *Détermination de la concentration*

La valeur de l'absorbance au point isobestique permet de mesurer la concentration de Doxorubicine dans un échantillon à 20°C. En mesurant des solutions concentrées de DOX, fraîchement préparées et non filtrées, on obtient un coefficient d'extinction molaire α = 4486 $mol^{-1}.cm^{-1}$ à 540 nm (Figure VII-17). Les concentrations des échantillons mesurés, filtrés ou non, sont données dans le Tableau VII-1. On observe qu'environ 5 ± 2 µM de la DOX pesée est perdue lors du protocole de dissolution et de mesure qui s'explique par la tendance de la DOX à s'adsorber sur les surfaces (verres, plastiques). A haute concentration, cette perte est négligeable, mais elle ne l'est pas à basse concentration.

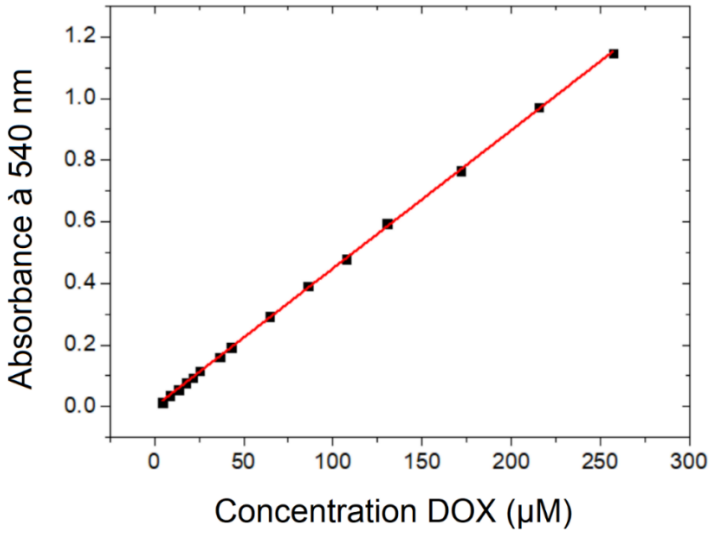


Figure VII-17 : Absorbance à 540 nm en fonction de la concentration en Doxorubicine pour des échantillons non filtrés. L'ajustement linéaire par la loi de Beer-Lambert donne un coefficient d'extinction de la DOX α = 4486 $mol^{-1}.cm^{-1}$ à 540nm.

$C_{pesée}$ (µM)	4,5	8,7	13,3	17,6	21,4	25,4	36,4	42,8	64,4	86,1	107,4	130,3	171,9	215,6	257,1
C_{Abs} (µM)	1,9	4,7	8,4	13,8	16,0	20,2	31,3	37,1	59,4	81,2	99,0	128,2	160,5	208,6	249,3

Tableau VII-1 : Concentration des échantillons préparés obtenus par pesée ($C_{pesée}$), et par absorbance (C_{abs}).

VII.2.2. Fluorescence dans le visible

Excitée autour du pic d'absorption à 490 nm, la Doxorubicine fluoresce dans la région de 500 à 750 nm. Son spectre de fluorescence présente une bande large présentant 3 maxima entre 500 et 750 nm : le plus intense à 592 nm, et les deux autres, autour de 560 et 639 nm.

Pour faire l'analyse quantitative de cette fluorescence, plusieurs facteurs doivent être pris en compte. Tout d'abord, les effets de la dimérisation sur l'intensité de l'émission sont encore plus importants que pour l'absorption. Le rendement quantique de fluorescence passe en effet de $3{,}9.10^{-2}$ pour un monomère à environ 10^{-5} pour un dimère [27]. La fluorescence d'un dimère est donc négligeable par rapport à celle d'un monomère. Quand la concentration augmente, la Doxorubicine s'auto-associe en dimères non émissifs dont la fluorescence est négligeable. La fraction de monomères fluorescents diminuant avec la concentration, la fluorescence globale diminue elle aussi. La fluorescence est alors proportionnelle à $C\phi_m(C).S_f(\lambda)$ où $S_f(\lambda)$ est la fluorescence molaire du monomère en solution.

Par ailleurs, l'évolution des spectres montre qu'ils changent de profil avec la concentration, l'intensité relative du pic à 550 nm par rapport au pic à 600 nm augmentant jusqu'à 60 µM, puis diminuant (Figure VII-18). C'est la conséquence des différents effets de filtres internes liés à l'absorption aux longueurs d'onde et d'émission.

Au-delà de 600 nm, les profils spectraux de fluorescence mesurés se superposent parfaitement, avec une intensité relative donnée en Figure VII-19. Les effets de filtre interne secondaire sont donc négligeables, l'absorbance au-delà de 600 nm étant elle-même négligeable. Il faut cependant tenir compte de l'effet de filtre interne primaire lié à la longueur d'onde de l'excitation pour une analyse quantitative. La lumière excitatrice est en effet fortement absorbée pour les plus hautes concentrations. Si l'on tient compte de la fraction de monomères qui fluoresce, et que l'on renormalise le signal en fonction de cette fraction, il est alors possible d'ajuster la courbe de fluorescence avec un simple fit tenant compte de la largeur des zones illuminées (la région de la cuvette comprise entre x_1 et x_2 avec $0 < x_1 < x_2 < 1$ cm) et de l'absorbance à $\lambda_{ex} = 490$ nm (Figure VII-20). On a alors :

$$I_f = D.C_{\phi_m} \frac{10^{-A(C,\lambda_{exc})x_1} - 10^{-A(C,\lambda_{exc})x_2}}{A(C,\lambda_{exc})} \qquad [VII\text{-}4]$$

Et le meilleur ajustement est obtenu avec x_1 = 0,23 cm et x_2 = 0,95 cm.

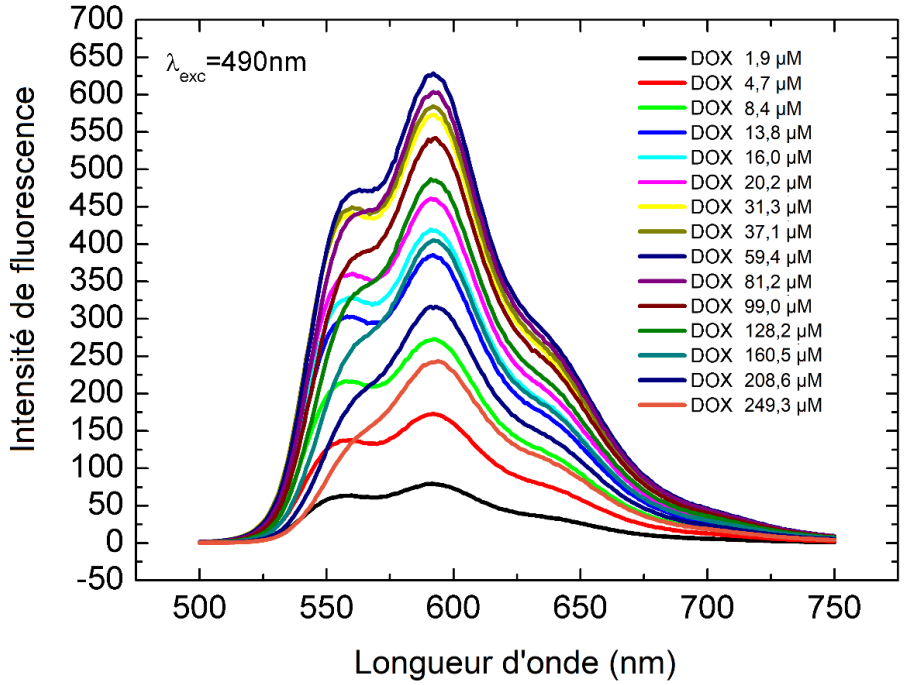


Figure VII-18 : Evolution des spectres de fluorescence de la Doxorubicine en fonction de la concentration.

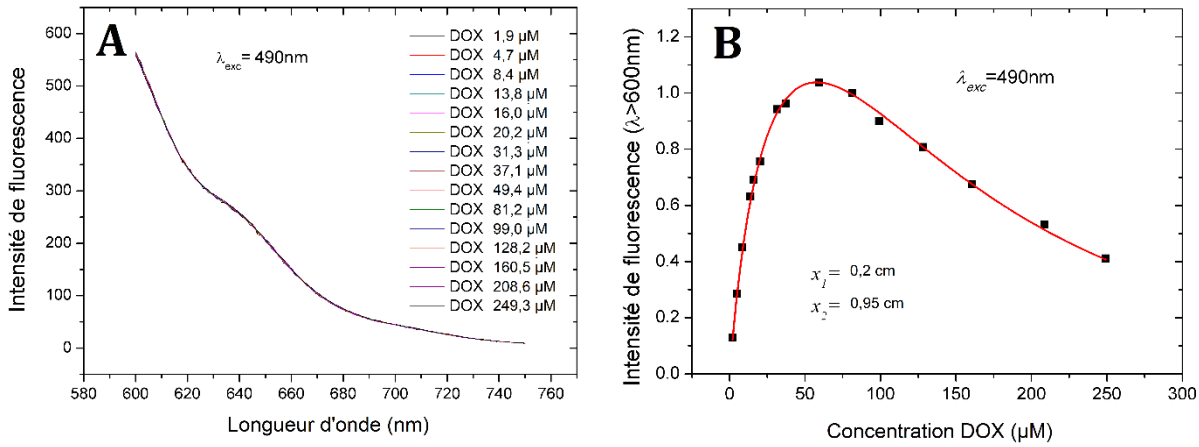


Figure VII-19 : A : Superposition de la fluorescence des échantillons de calibration renormalisés selon leur intensité, B : Evolution de l'intensité au-delà de 600 nm avec la concentration ajustée à partir de l'équation [VII-4].

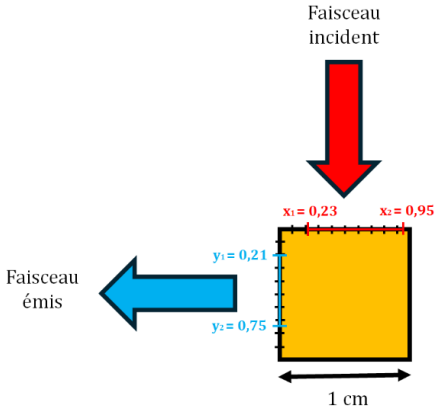


Figure VII-20 : Représentation schématique de la correction des filtres internes lors de l'excitation et de l'émission.

Enfin, on peut reconstruire les courbes sur la gamme complète des longueurs d'onde en tenant compte des effets de filtres internes lors de l'émission (correction par l'absorption d'émission), selon :

$$I_{f,\lambda} = D.C_{\phi_m} \frac{10^{-A(C,\lambda_{exc})x_1} - 10^{-A(C,\lambda_{exc})x_2}}{A(C,\lambda_{exc})} . \frac{10^{-A(C,\lambda)y_1} - 10^{-A(C,\lambda)y_2}}{A(C,\lambda)} \qquad [VII\text{-}5]$$

On obtient alors un bon ajustement avec y_1 = 0,21 cm et y_2 = 0,75 cm, correspondant à la région de la cuvette illuminées par le faisceau émis (0 < y_1 < y_2 < 1 cm). Les spectres corrigés sont présentés en Figure VII-21.

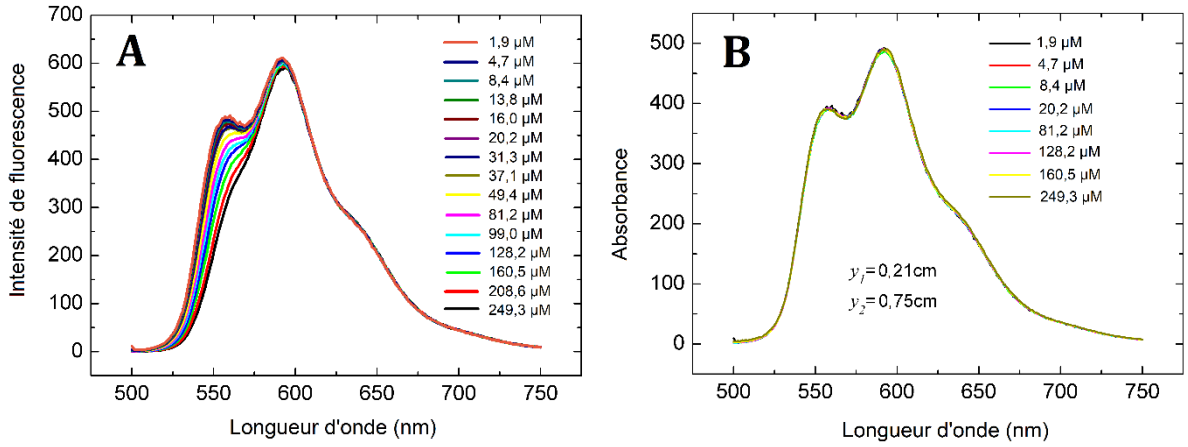


Figure VII-21 : Spectres normalisés en tenant compte des effets de filtres internes : correction de l'absorption du faisceau incident (A) et additionnellement de l'absorption du faisceau émis (B).

VIII. Adsorption et quantification de Doxorubicine sur SWNT

VIII.1. Etude de l'adsorption par spectroscopie d'absorption de la Doxorubicine

Dans cette partie, nous étudions l'évolution du spectre d'absorption de la Doxorubicine (DOX) en solution aqueuse lors du mélange avec des suspensions aqueuses de SWNT/CMC, et nous discutons la quantification de la Doxorubicine adsorbée, ainsi que le *quenching* du signal.

VIII.1.1. Cinétique

Le mélange d'une solution aqueuse de Doxorubicine avec une suspension aqueuse de SWNT dispersés dans le CMC est suivi cinétiquement par spectroscopie d'absorption (Figure VIII-1).

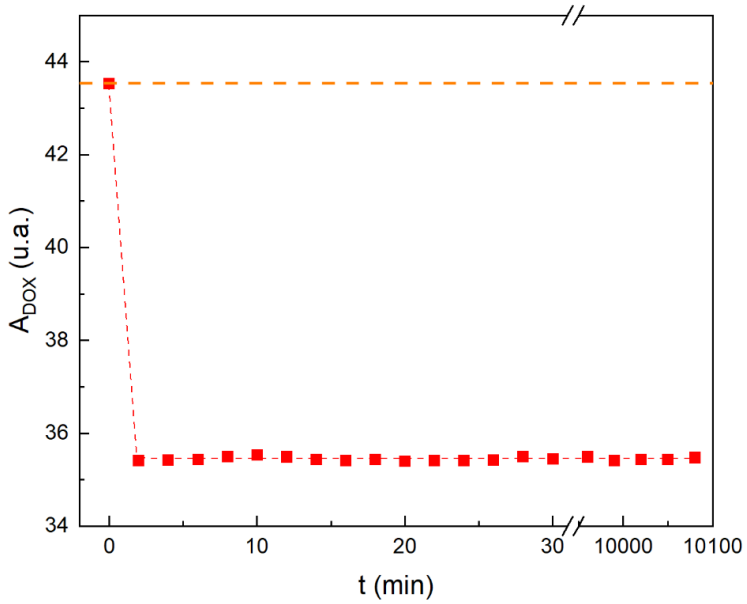


Figure VIII-1 : Evolution cinétique de l'aire entre 400 et 600 nm du spectre d'absorption en fonction du temps, pour une concentration de Doxorubicine de 40,5 ± 0,5 µM et un rapport de masses DOX/SWNT = 10

Le point initial à t = 0 min correspond à l'absorbance de la Doxorubicine entre 400 et 600 nm pour une concentration de Doxorubicine de 40,5 ± 0,5 µM ($2{,}5.10^{-3}$ wt%). Les points suivants correspondent à l'absorbance du mélange entre le complexe SWNT/CMC et une solution de Doxorubicine. Ce mélange est à concentration finale en Doxorubicine équivalente à la mesure à 0 min, et au rapport de masses DOX/SWNT d'environ 10. On observe une nette diminution dès la première mesure, à 2 minutes, puis l'aire du signal reste constante. Cette diminution d'absorbance est attribuée au *quenching* du signal lors de l'adsorption de la Doxorubicine sur les complexes SWNT/CMC. Ceci suggère que l'adsorption se produit en moins de 2 minutes après le mélange.

VIII.1.2. A l'équilibre cinétique

VIII.1.2.1. Adsorption

L'adsorption de la Doxorubicine sur SWNT/CMC est étudiée en spectroscopie d'absorption à une concentration de Doxorubicine de 40,5 µM (rapport de masses DOX/SWNT ≈ 10). L'étude est réalisée sur une large gamme spectrale entre 400 et 800 nm, incluant le pic d'absorption de la Doxorubicine (Figure VIII-2). Le spectre d'absorption de la Doxorubicine visible ici est composé comme attendu d'une bande large et intense entre 400 et 600 nm, avec un maximum autour de 490 nm. On retrouve les 4 contributions aux longueurs d'ondes attendues. On observe que le pic à 500 nm est environ 10% plus faible que le pic à 490 nm. A cette concentration, la fraction de monomères est de l'ordre de 60%, 40% des molécules sont donc associées dans des dimères.

Le spectre d'absorption des SWNT présente une série de pics dans le proche IR (NIR). Le spectre d'absorption du mélange présente les signatures des deux composants. Cependant, le signal de la Doxorubicine montre une baisse notable et un changement de profil distinct, indiquant l'adsorption de molécules de Doxorubicine sur des complexes SWNT/CMC, ou potentiellement sur la CMC libre. En effet, lorsque la Doxorubicine est mélangée à une solution aqueuse de CMC à des concentrations allant jusqu'à celles utilisées pour le complexe, des changements spectraux prononcés sont observés, reflétant des interactions intermoléculaires, la plus notable étant l'émergence d'une bosse supplémentaire autour de 550 nm à des concentrations de CMC plus élevées (Figure VIII-

3) [28]. On observe de plus un décalage vers le rouge d'environ 15 nm en moyenne pour chaque bande des SWNT (encart Figure VIII-2).

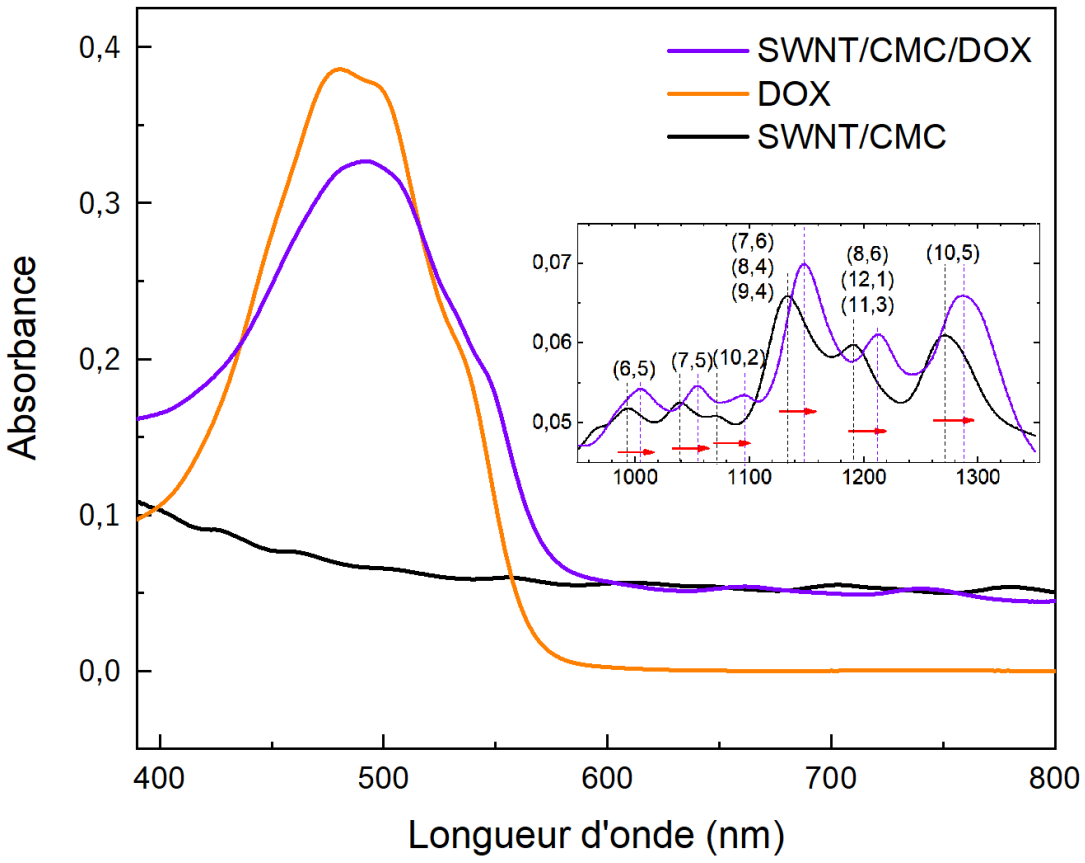


Figure VIII-2 : Spectres d'absorption UV-visible-NIR d'une solution de Doxorubicine (orange), d'une suspension de SWNT/CMC (noir) et du mélange (violet) entre 400 et 800 nm. Encart : Partie proche IR du spectre, et mise en évidence des décalages vers le rouge.

On constate donc une réduction de l'absorbance de la Doxorubicine lorsqu'elle s'adsorbe sur les complexes SWNT/CMC et sur la CMC libre, résultant d'un *quenching* par les nanotubes de carbone et la CMC appliqué sur les molécules de Doxorubicine présentes à leur surface, comme observé précédemment dans l'étude cinétique. Les décalages en longueur d'onde dans le NIR indiquent une réorganisation structurelle autour des nanotubes, accompagnée de modifications concomitantes de leur environnement diélectrique, ce qui confirme l'adsorption de Doxorubicine sur les complexes SWNT/CMC [4],[29],[30]. Les décalages sont très proches pour chaque bande, ce qui suggère que leurs

environnements diélectriques locaux respectifs sont comparables et que tous les types de nanotubes sont couverts par la Doxorubicine dans cet échantillon.

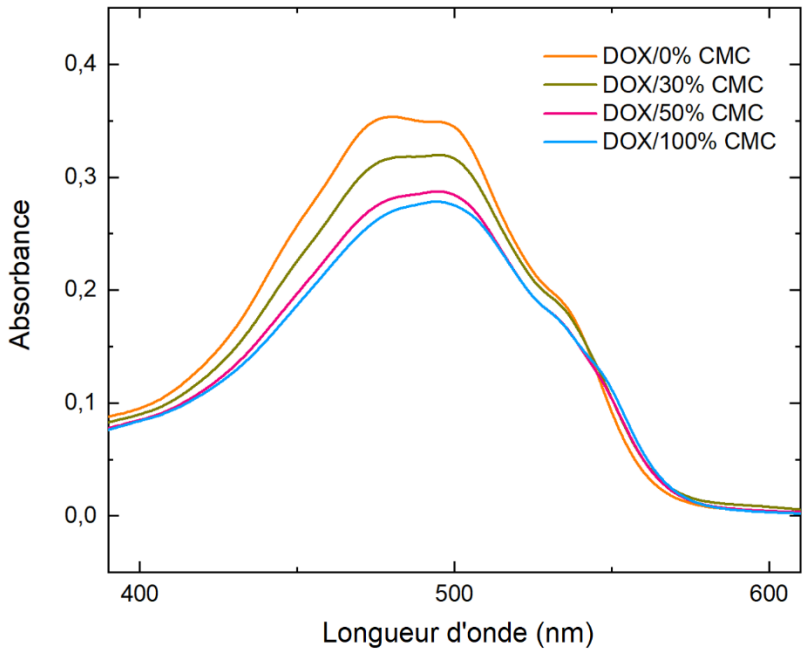


Figure VIII-3 : Spectres d'absorption de la Doxorubicine dans des solutions aqueuses de CMC à différentes concentrations, exprimés en pourcentage de la quantité de CMC utilisée pour la Figure VIII-2. Lorsque la concentration en CMC augmente, on observe une diminution progressive de l'absorbance autour des maxima et un changement du profil spectral aboutissant à l'apparition d'une contribution supplémentaire autour de 550 nm à la concentration maximale en CMC. Ces changements spectraux reflètent une interaction intermoléculaire, soit entre les molécules de Doxorubicine, soit entre la Doxorubicine et la CMC.

VIII.1.2.2. *Quantification*

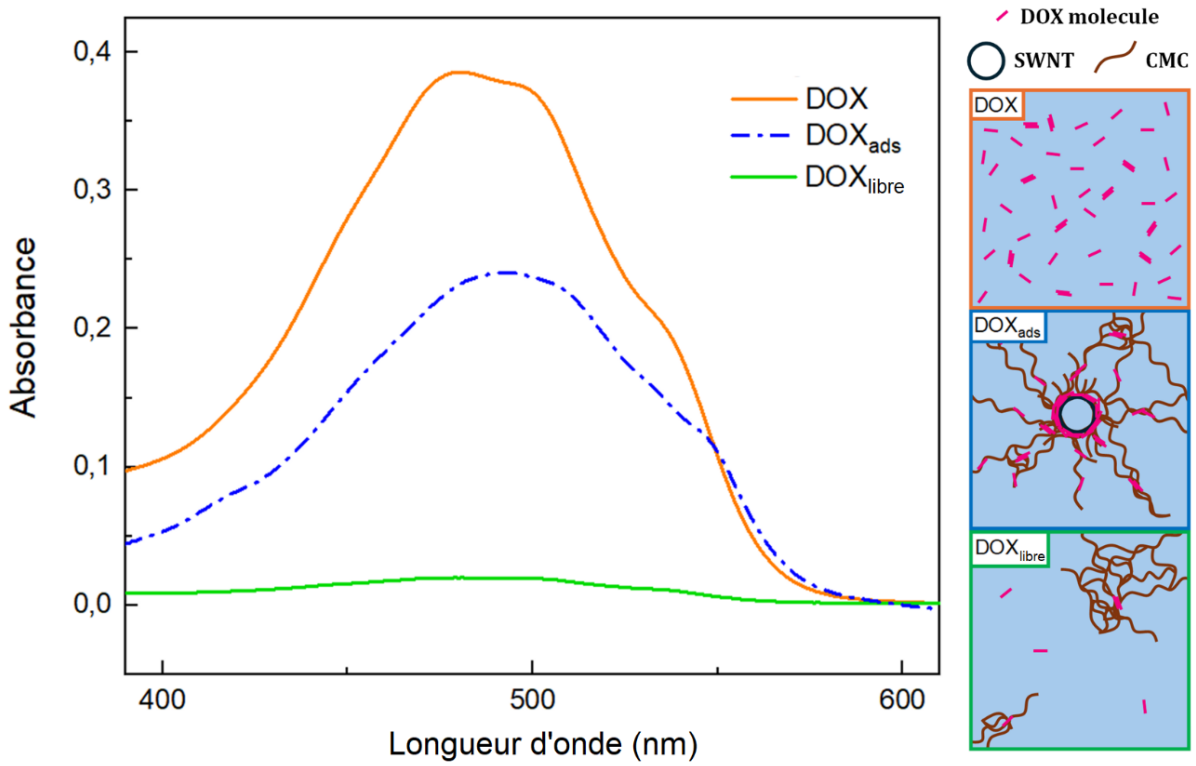
La Figure VIII-4 compare i) le signal de la Doxorubicine initiale, ii) celui de la Doxorubicine libre obtenue suite à la filtration de l'échantillon, et donc à la séparation des complexes SWNT/CMC/DOX, et iii) celui de la Doxorubicine adsorbée sur les SWNT, calculé comme le spectre différentiel entre le spectre du mélange et la somme des spectres de la suspension SWNT/CMC et de la Doxorubicine libre. L'absorbance de la Doxorubicine libre correspond à environ 4% du signal de la Doxorubicine initiale. En se basant sur la courbe

de calibration préalablement réalisée, on en déduit une fraction de Doxorubicine libre de 0,04 , et par conséquent une fraction de Doxorubicine adsorbée de $\phi \approx 0{,}96$.

Le rapport de la masse de Doxorubicine adsorbée par rapport à la masse de SWNT $\left(\frac{\mathrm{mDOX}}{\mathrm{mSWNT}}\right)_{\mathrm{ads}}$ peut alors être calculé avec l'équation suivante :

$$\left(\frac{\mathrm{mDOX}}{\mathrm{mSWNT}}\right)_{\mathrm{ads}} = \phi \left(\frac{\mathrm{mDOX}}{\mathrm{mSWNT}}\right) \qquad [\text{VIII-1}]$$

Ceci conduit donc à un rapport massique de 9,6 pour la Doxorubicine adsorbée dans cet échantillon.

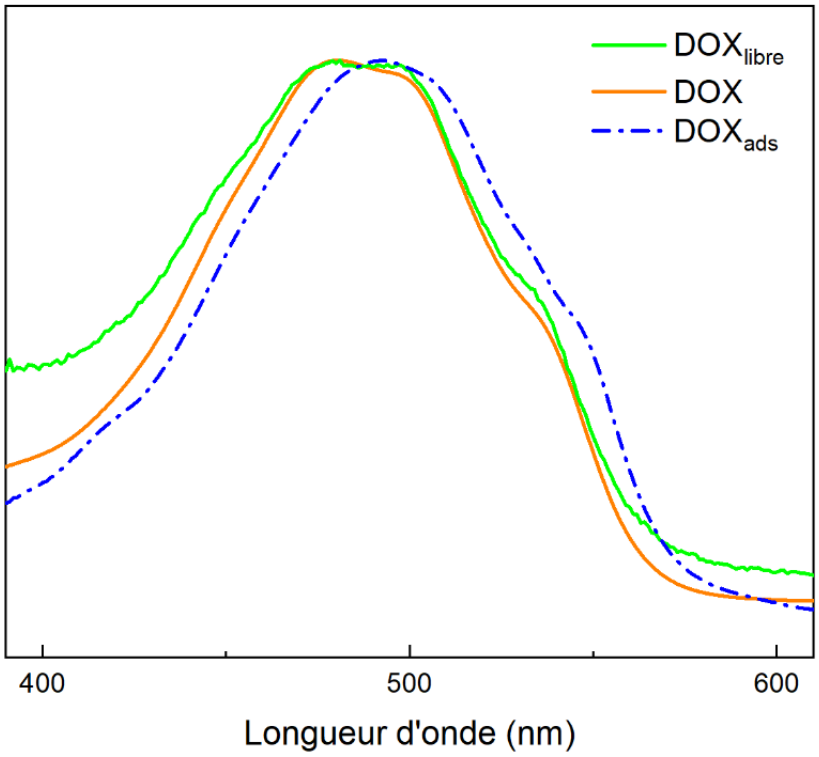


<u>Figure VIII-4 :</u> Gauche : Spectres d'absorption dans la gamme spectrale du pic d'absorption principal de la Doxorubicine : Doxorubicine libre obtenue par filtration (vert), solution de Doxorubicine de référence à 40,5 µM (orange) et Doxorubicine absorbée (bleu pointillé), calculé comme le spectre différentiel entre celui du mélange et la somme de ceux des dispersions SWNT/CMC et de la Doxorubicine libre. Droite : Représentations schématiques des trois échantillons

La normalisation des spectres (Figure VIII-5) révèle que le profil spectral de la Doxorubicine libre est très proche de celui de la Doxorubicine initiale, avec 2 maxima autour de 490 et 500 nm, et un épaulement supplémentaire autour de 535 nm, sans présenter notamment de pic supplémentaire autour de 550 nm. En comparant ce profil spectral avec ceux de la Figure VIII-3, on peut conclure que 30 % est la limite supérieure pour le passage de la CMC à travers le filtre. D'autre part, il est important de se demander si la très faible intensité du signal de la Doxorubicine libre pourrait provenir en partie de l'adsorption sur le CMC libre passant à travers le filtre. Cette hypothèse est exclue par l'observation que l'absorbance DOX au point isosbestique (540 nm) reste constante à moins de 10 % dans les solutions CMC, même à des concentrations CMC plus élevées. Cependant, une légère augmentation de l'intensité relative du premier est observée par rapport aux autres dans le spectre de la Doxorubicine libre.

Le spectre correspondant à la Doxorubicine libre est proche du profil type des monomères alors que celui correspondant à la Doxorubicine adsorbée rappelle le profil des dimères. En effet, comme dit précédemment, la concentration de la Doxorubicine libre correspond à 4% de la concentration de Doxorubicine initiale, soit environ 1,6 µM. A cette concentration, la Doxorubicine se trouve sous forme monomère à 95%. La Doxorubicine initiale, à 40,5 µM, se trouve sous forme monomère à 60% et sous forme dimère à 40%, d'où la légère diminution relative des pics à 500 nm et 535 nm par rapport au pic à 490 nm, caractéristique des dimères .

La concentration de la Doxorubicine adsorbée est équivalente à 96% de celle de la Doxorubicine initiale, soit 38,9 µM. En solution aqueuse, cela correspond à 60,4% de monomères pour 39,6% de molécules associées en dimères. Cependant, la Doxorubicine adsorbée forme probablement des multimères, comme le suggère le profil spectral de la Doxorubicine adsorbée, proche de celui des dimères, mais avec un décalage vers le rouge d'environ 12 nm (Figures VIII-4 et VIII-5). Ce décalage, attribué aux interactions intermoléculaires au sein des complexes SWNT/CMC/DOX, fournit une signature intrinsèque de la Doxorubicine adsorbée.



<u>Figure VIII-5 :</u> Spectres d'absorption normalisés de la Figure VIII-4. La normalisation permet de mettre en évidence les variations de profil entre les spectres de la Doxorubicine libre (vert) et de la solution initiale de Doxorubicine (orange), ainsi que les variations de profil et en longueur d'onde de la Doxorubicine adsorbée sur les complexes SWNT/CMC (bleu pointillés).

VIII.1.2.3. *Quenching*

Le taux de *quenching* de la Doxorubicine adsorbée est lié à la diminution relative de l'absorbance à 540 nm (A_{ads}) par rapport à celle de la Doxorubicine initiale (A_{DOX}) :

$$\psi = 1 - \frac{A_{ads}}{\phi . A_{DOX}} \qquad [2]$$

Pour cet échantillon, il est de $\psi \approx 0.18$, signifiant que le signal de la Doxorubicine adsorbée est réduit de 18%. Ce *quenching* est un marqueur de l'adsorption sur la paroi des nanotubes, la formation d'un complexe π-π entraînant une chute du coefficient d'extinction molaire.

VIII.1.2.4. *Recouvrement*

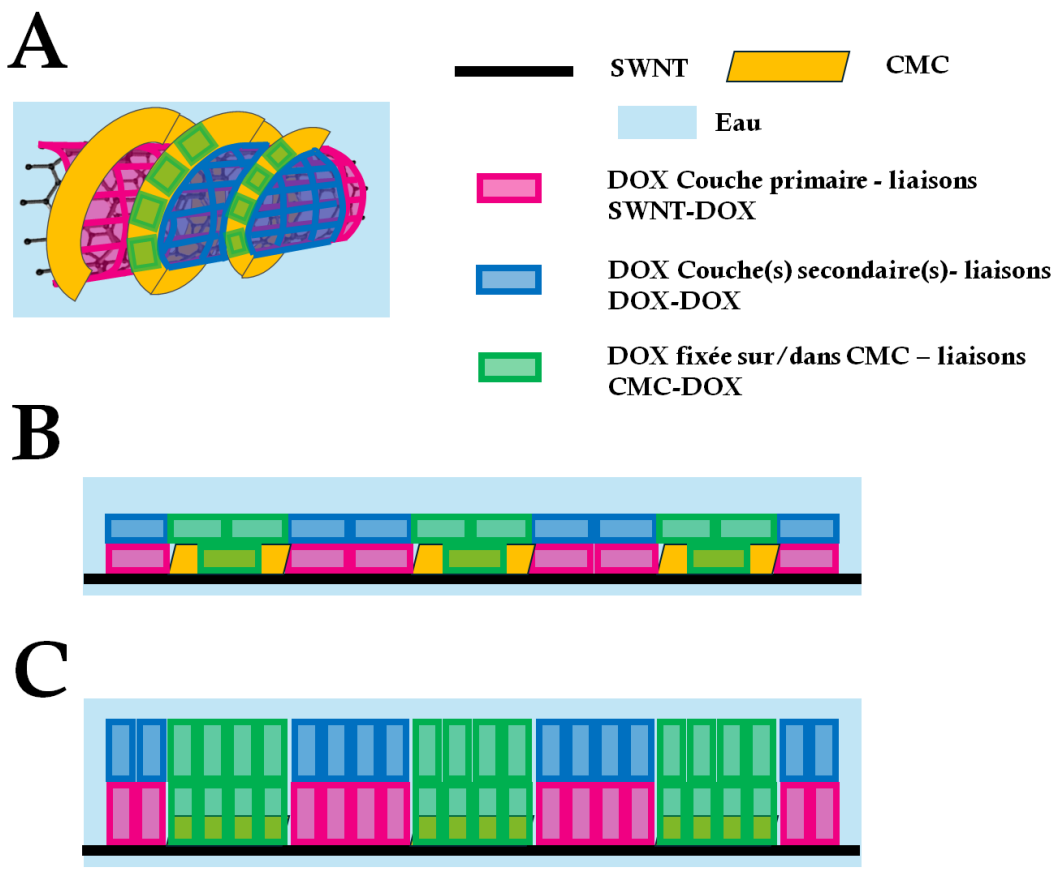
Afin d'estimer la couverture de surface correspondante, nous nous référons aux calculs de dynamique moléculaire de l'adsorption sur des SWNT vierges dans une conformation en *armchair* (7,7) réalisé par *Kordzadeh et al* et *Wang et al.*, qui montre que les premières molécules de Doxorubicine s'adsorbent parallèlement à la surface externe des SWNT [31],[32]. Compte tenu du fait que la surface de la partie aromatique des molécules de Doxorubicine est d'environ 70 ± 10 $Å^2$ et que la surface spécifique externe des nanotubes individuels est de 1315 m^2/g [33], le rapport massique DOX/SWNT pour une monocouche compacte de Doxorubicine adsorbée à la surface externe des SWNT individuels est de l'ordre de 1,7 ± 0,2.

Il est important de spécifier que ce rapport massique est très probablement surestimé, car la surface spécifique externe des SWNT diminue lorsqu'ils sont regroupés en petits faisceaux, et également en raison de la couverture partielle par la CMC. De plus, l'énergie d'adsorption externe ne s'accroît que modérément avec le diamètre, tandis qu'au-delà de 1,1 nm de diamètre, l'encapsulation interne devient possible, ce qui peut encore augmenter la charge utile [31],[34],[35].

La fraction massique DOX/SWNT de l'échantillon mesuré est beaucoup plus importante que celle estimée pour une monocouche dense. Cela suggère que les molécules de Doxorubicine forment un assemblage hiérarchique multicouches sur les complexes SWNT/CMC, avec une quantité importante probablement adsorbée sur le CMC.

Cette structure multicouche implique une adsorption hiérarchique en plusieurs couches (Figure VIII-6). On peut imaginer une première couche où la Doxorubicine d'adsorbe sur la paroi des SWNT par empilement π–π, puis des couches secondaires où les molécules de Doxorubicine se stabilisent par π–π et liaisons hydrogènes (DOX-DOX et DOX-CMC).

Etant donné que l'environnement diélectrique des SWNT est modifié, cela signifie que la CMC enroulée autour des SWNT n'empêche pas l'accès à la surface. Elle pourrait au contraire introduire des sites électrostatiques et des cavités hydrophobes pouvant servir de point d'ancrage.



<u>Figure VIII-6 :</u> Représentation schématique de l'organisation structurelle des complexes SWNT/CMC/DOX vue de profil (A), vue en coupe de la surface du tube en configuration parallèle (B) et vue en coupe de la surface du tube en configuration perpendiculaire (C). Un seul brin large de CMC (jaune) est montré, représentant l'enchevêtrement des différents brins, pour une meilleure visualisation. La première couche de Doxorubicine (rose) s'adsorbe à la surface du SWNT. Les couches supérieures de Doxorubicine (bleu) s'adsorbent sur la Doxorubicine déjà adsorbée, et une partie se fixe sur et entre les brins de CMC (vert).

VIII.1.3. En fonction de la concentration

VIII.1.3.1. *Adsorption*

Nous nous intéressons ici à 3 échantillons décrits dans le Tableau VIII-1, à savoir un échantillon à basse concentration de Doxorubicine (F, 10,0 µM), un échantillon intermédiaire (H, 40,5 µM), et un échantillon à haute concentration de Doxorubicine (K, 124,9 µM), afin d'étudier tous les comportements possibles. D'autres complexes ont été étudiés, mais leurs spectres ne sont pas présentés (voir Annexe 1).

Sample	SWCNT concentration (mg/L)	DOX concentration (µM)	DOX/SWCNT mass ratio
A	2.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.30 ± 0.11
B	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.3	0.49 ± 0.12
C	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.3	0.51 ± 0.12
D	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.3	0.69 ± 0.14
E	2.2 ± 0.2	4.6 ± 0.3	1.14 ± 0.18
F	2.2 ± 0.2	10.0 ± 0.5	2.47 ± 0.35
G	2.2 ± 0.2	19.9 ± 0.5	4.92 ± 0.57
H	2.2 ± 0.2	40.5 ± 0.5	10.00 ± 1.06
I	2.2 ± 0.2	59.2 ± 0.6	14.63 ± 1.48
J	2.2 ± 0.2	98.1 ± 0.6	24.24 ± 2.35
K	2.2 ± 0.2	124.9 ± 0.7	30.86 ± 2.98
L	0.22 ± 0.02	45.7 ± 0.3	112.90 ± 11.01

Tableau VIII-1 : Concentrations de SWNT dans les suspensions aqueuses SWNT/CMC, ainsi que de Doxorubicine dans les solutions aqueuses avant leur mélange, et rapports massiques DOX/SWNT correspondants dans les mélanges. Les échantillons F, H et K (surlignés en orange) sont sélectionnés comme échantillons de référence. Pour les échantillons A à E et L, la concentration en Doxorubicine est calculée à partir de la masse pondérée, en tenant compte des pertes et en intégrant les barres d'erreur dues à l'adsorption sur les surfaces en verre. Pour les échantillons F à K (lignes grises), la concentration en Doxorubicine est mesurée après filtration par spectroscopie d'absorption UV-visible.

A cause de l'adsorption de la Doxorubicine sur les surfaces, verres ou plastiques, les rapports de masses DOX/SWNT obtenus diffèrent légèrement de ceux attendus. En effet, la Doxorubicine possède une forte affinité pour les contenants de verre et de plastique utilisés.

Les rapports de masses réels, ainsi que leurs concentrations en Doxorubicine, sont déterminés par des mesures d'aires du signal reportées sur la courbe de calibration mesurée précédemment. La Figure VIII-7 présente les spectres des échantillons des solutions de Doxorubicine initiales.

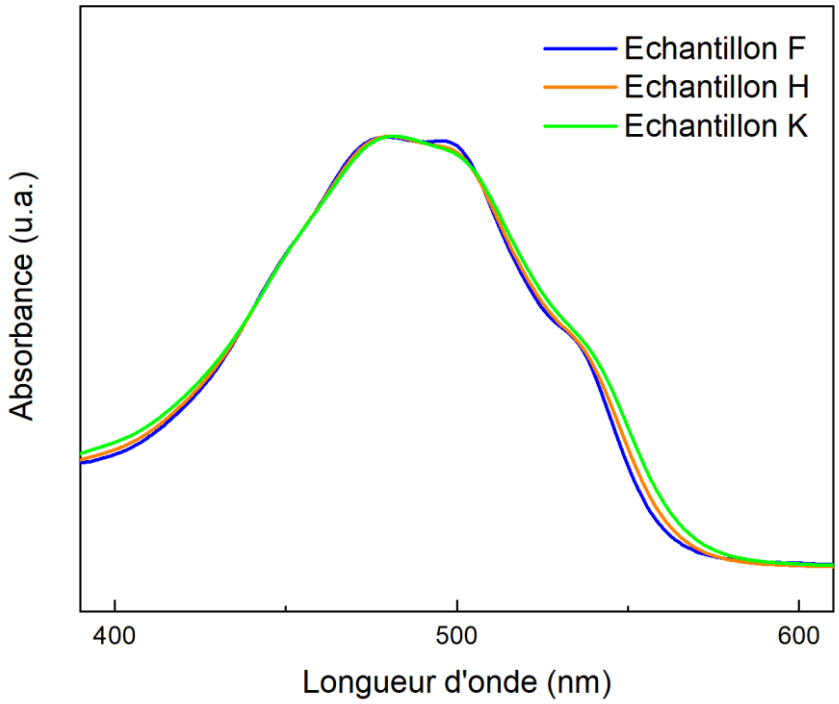
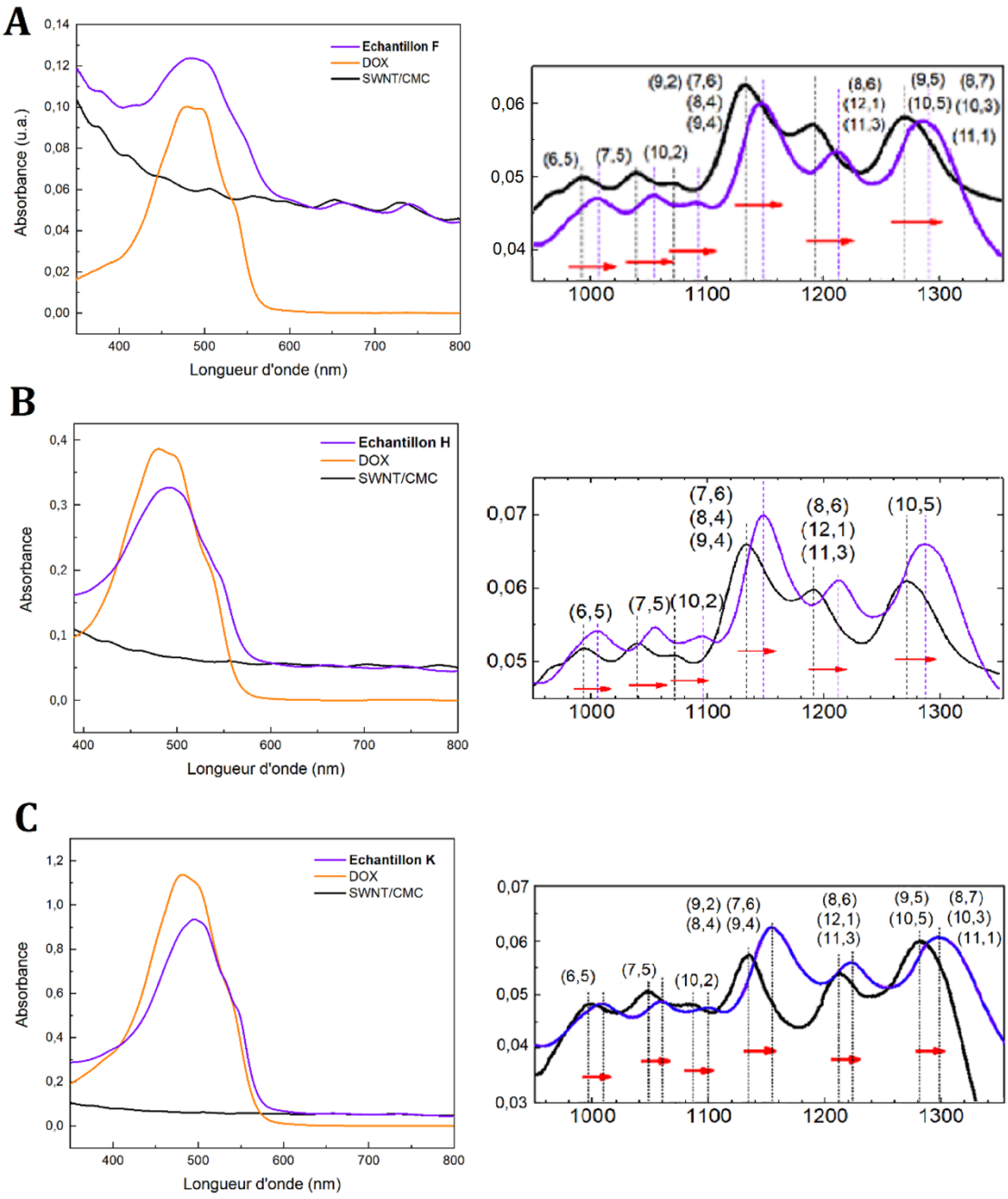


Figure VIII-7 : Spectres d'absorption UV-visible normalisés au maximum de solutions de Doxorubicine initiales pour les échantillons F (bleu, 10,0 µM), H (orange, 40,5 µM) et K (vert, 124,9 µM).

On retrouve les signatures spécifiques de la DOX, les 3 maxima à 490, 500 et 535 nm, à chaque concentration.

L'échantillon F présente 81% de monomères, l'échantillon H en comporte 60%, contre 41% pour l'échantillon K. Plus la concentration en Doxorubicine est élevée, plus les intensités relatives des 2ème et 3ème maxima sont faibles et plus la proportion de dimères augmente. L'adsorption sur SWNT est étudiée pour ces trois échantillons (Figure VIII-8).

On retrouve dans les trois complexes les signatures de la Doxorubicine et des SWNT. Pour l'échantillon F, le maximum d'absorbance de la Doxorubicine est environ 2 fois plus intense que celui des SWNT. Les bandes caractéristiques des SWNT sont visibles dans le spectre du mélange. Pour l'échantillon K en revanche, le maximum d'absorbance de la Doxorubicine est plus de 20 fois supérieur au signal des SWNT. Comme pour l'échantillon H, une baisse significative du signal Doxorubicine dans l'échantillon est observée par rapport à au spectre de la Doxorubicine initiale. Cette diminution est comparable à celle de l'échantillon H. On peut l'attribuer phénomène de *quenching* de la FL de la Doxorubicine adsorbée sur les SWNT.



<u>Figure VIII-8 :</u> Gauche : Spectres d'absorption UV-visible de solutions de Doxorubicine avant mélange (orange), d'une suspension de SWNT/CMC avant mélange (noir) et du mélange SWNT/CMC/DOX (violet) entre 300 et 800 nm pour les échantillons F, H et K. Droite : partie proche IR des spectres et mise en évidence des décalages vers le rouge des bandes d'absorption des SWNT.

On observe de plus un décalage vers le rouge constant d'environ 15 nm en moyenne pour chaque bande SWNT et pour chaque échantillon (Figure VIII-8, droite). Ces décalages

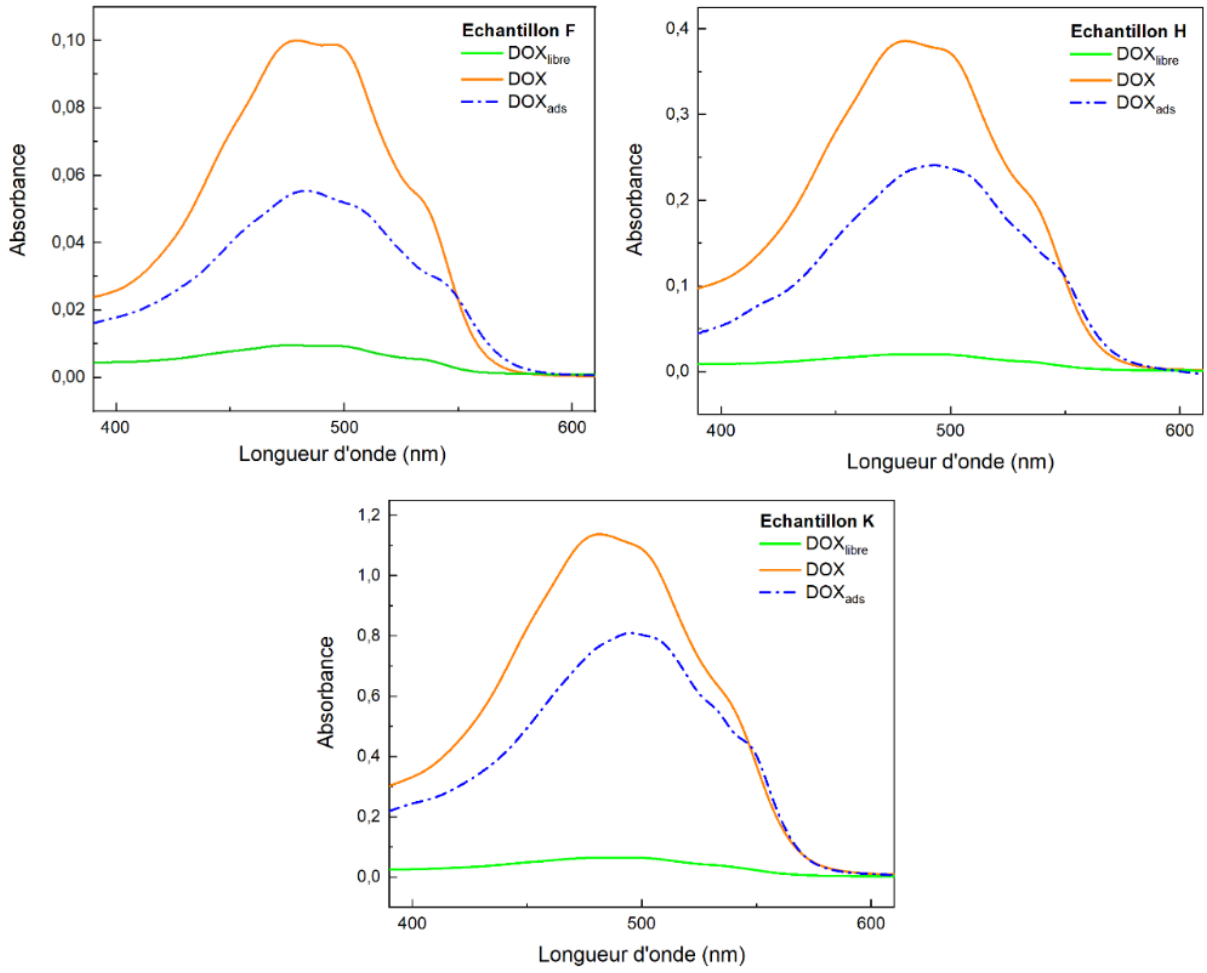
témoignent de la réorganisation structurelle autour des SWNT et de la modification de leur environnement diélectrique, induites par l'adsorption de DOX. Ces décalages étant similaires dans les trois échantillons, cela signifie que les modifications de l'environnement diélectrique sont similaires à ces concentrations et permettent d'attester de l'adsorption de Doxorubicine sur les SWNT dans toute la plage de concentrations.

VIII.1.3.2. Quantification

Pour chaque échantillon, les signaux correspondant aux absorbances de la Doxorubicine libre et de la Doxorubicine adsorbée sont respectivement mesurés et calculés (Figure VIII-9). On observe que les profils des Doxorubicine libre et adsorbée diffèrent très peu d'un échantillon à l'autre. La Doxorubicine libre est en effet majoritairement composée de monomères, tandis que la Doxorubicine adsorbée est sous forme de « multimères », d'une couche compacte, pour les 3 échantillons. Le signal de la Doxorubicine libre dans l'échantillon F, séparé par filtration, est d'environ 7%, correspondant à un taux de Doxorubicine adsorbée $\phi_F \approx 0{,}93$, ce qui conduit à un rapport massique de DOX_{ads}/SWNT d'environ 2,3. Ce taux est comparable au $\phi_H \approx 0{,}96$ de l'échantillon H. Pour l'échantillon K, on relève un taux de Doxorubicine adsorbée $\phi_K \approx 0{,}96$, égal à celui de l'échantillon H. Son rapport massique de DOX_{ads}/SWNT est d'environ 28. Pour les échantillons F à K préparés avec un rapport DOX/SWNT compris entre 2,5 et 30, le taux de Doxorubicine adsorbée se situe entre 0,9 et 0,97, sans variation significative avec la concentration en DOX, comme le montre la Figure VIII-10. Le Tableau VIII-2 récapitule les taux de Doxorubicine libre et adsorbée ainsi que les rapports de masses DOX_{ads}/SWNT correspondants. Le taux de Doxorubicine adsorbée n'a en revanche pas pu être mesuré avec précision pour des concentrations de Doxorubicine inférieures à 10 µM, donc pour des fractions massiques DOX/SWNT inférieures à 2,4, en raison de trop faibles signaux d'absorption pour la Doxorubicine libre.

Pour tous ces échantillons, le taux de Doxorubicine adsorbée est donc très similaire, de l'ordre de 0,9, ce qui traduit une isotherme de Langmuir à très forte affinité pour la monocouche. Au-delà de la monocouche, cette affinité se traduit dans un modèle de type Freundlich [36],[37],[38]. Cela signifie que les complexes SWNT/CMC/DOX présentent des sites d'adsorption quasiment identiques, que ce soit sur les SWNT, la CMC ou la

Doxorubicine déjà adsorbée, sur lesquels la Doxorubicine libre s'arrime avec une affinité telle que 90 % des sites sont occupés quelle que soit la légère variation entre échantillons. Cette proportion constante signifie que, dans la fenêtre de concentration testée, ni la saturation de la monocouche ni la formation de multicouches n'est encore limitante, on a encore un excès de surface active par rapport au nombre de molécules en solution. Ces résultats démontrent que de grandes quantités de Doxorubicine peuvent être adsorbées sur les complexes SWNT/CMC, jusqu'à environ 30 fois la masse des SWNT, c'est-à-dire beaucoup plus qu'une monocouche de molécules sur la base des modèles structurels de référence (Figure VIII-6) [31].



<u>Figure VIII-9 :</u> Spectres d'absorption dans la gamme spectrale du pic d'absorption principal de la Doxorubicine pour les échantillons F, H et K : Doxorubicine libre obtenue après filtration de SWNT/CMC/DOX (vert), Doxorubicine (orange) et spectre différentiel correspondant à la Doxorubicine adsorbée sur les complexes SWNT/CMC (bleu pointillés)

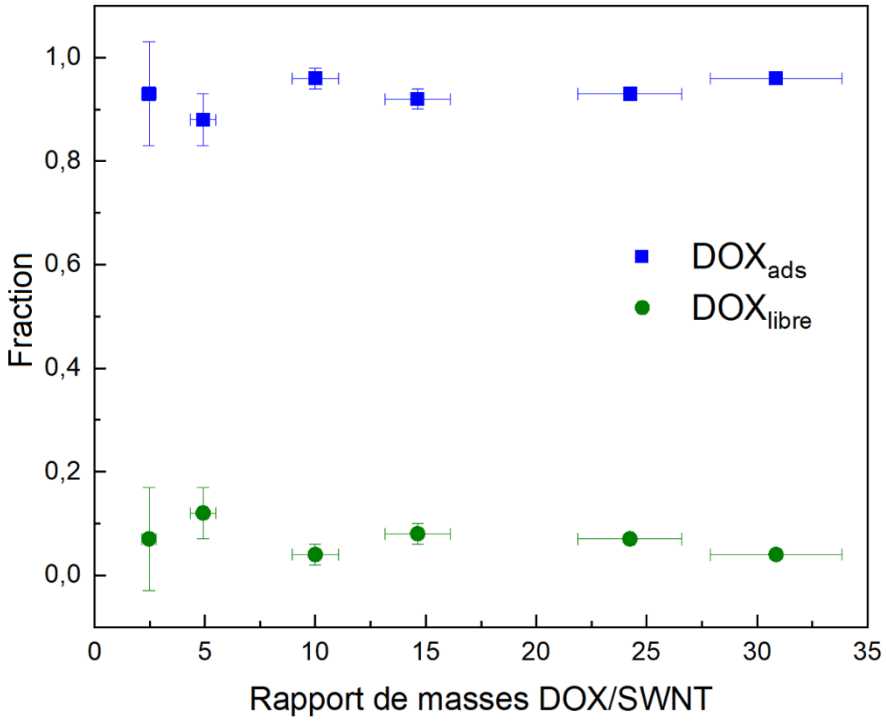


Figure VIII-10 : Fraction de Doxorubicine adsorbée (bleu) et libre (vert) en fonction du rapport de masses DOX/SWNT, déterminée par spectroscopie d'absorption

Echantillon	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**
mDOX/ mSWNT	2,47 ± 0,34	4,92 ± 0,57	10,00 ± 1,06	14,63 ± 1,48	24,24 ± 2,35	30,86 ± 2,98
Taux de DOX_{libre} ϕ_{free}	0,07 ± 0,10	0,12 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Taux de DOX_{ads} ϕ_{ads}	0,93 ± 0,10	0,88 ± 0,05	0,96 ± 0,02	0,92 ± 0,02	0,93 ± 0,01	0,96 ± 0,01
$mDOX_{ads}$/ mSWNT	2,32 ± 0,57	6,16 ± 1,06	9,22 ± 1,15	17,39 ± 2,13	22,78 ± 2,45	27,65 ± 2,96

Tableau VIII-2 : Taux de Doxorubicine libre, de Doxorubicine adsorbée sur SWNT et rapports de masses DOX_{ads}/SWNT déterminés à partir de la spectroscopie d'absorption pour les échantillons F à K.

VIII.1.3.3. *Quenching*

Dans les 3 échantillons présentés, l'absorbance diminue entre le signal de la Doxorubicine initiale et le spectre différentiel lorsque l'on soustrait la contribution des SWNT. Le taux de *quenching* pour l'échantillon F est de $\psi_F \approx 0{,}25$. Il est légèrement supérieur à celui de l'échantillon H, $\psi_H \approx 0{,}18$. Pour l'échantillon K, le rapport d'absorbance relative de la Doxorubicine adsorbée est légèrement supérieur à celui de l'échantillon H. Cela conduit à un taux de *quenching* légèrement inférieur, $\psi_K \approx 0{,}09$.

Cela suggère que l'extinction est plus forte pour les molécules formant la première monocouche sur les SWNT et que le *quenching* est plus faible pour les molécules plus éloignées de la surface du SWNT.

Pour cette série d'échantillons, le taux de *quenching* de l'absorption se situe entre 0,25 et 0,09, avec une tendance à la baisse pour des concentrations croissantes de Doxorubicine (Figure VIII-11). Ainsi, à basse concentration, et dans l'hypothèse d'une adsorption parallèle préférentielle sur les SWNT par rapport à la CMC ou aux multimères, 96% de la Doxorubicine adsorbée est en contact direct avec la surface du SWNT, résultant en un *quenching* maximal. Lorsque la concentration en Doxorubicine augmente, le nombre d'interactions DOX-DOX augmente par rapport au nombre d'interactions DOX-SWNT. Le facteur de *quenching* des molécules diminue donc à mesure qu'elles s'éloignent du SWNT et que le type d'empilement change. Ainsi, le *quenching* moyen diminue à mesure que le nombre de couches autour du SWNT augmente, et donc à mesure que la concentration de Doxorubicine augmente.

Le Tableau VIII-3 compile les taux de *quenching* ainsi que le rapport de masses DOX_{ads}/SWNT pour les échantillons F à K. Le taux de *quenching* n'a pas pu être mesuré avec précision pour des fractions massiques DOX/SWCNT inférieures à 2,4.

Echantillon	F	G	H	I	J	K
mDOX/ mSWNT	2,47 ± 0,34	4,92 ± 0,57	10,00 ± 1,06	14,63 ± 1,48	24,24 ± 2,35	30,86 ± 2,98
Taux de *quenching* ψ	0,25 ± 0,08	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01
$mDOX_{ads}$/ mSWNT	2,32 ± 0,57	6,16 ± 1,06	9,22 ± 1,15	17,39 ± 2,13	22,78 ± 2,45	27,65 ± 2,96

Tableau VIII-3 : Taux de quenching et rapports de masses DOX_{ads}/SWNT déterminés à partir de la spectroscopie d'absorption pour les échantillons F à K.

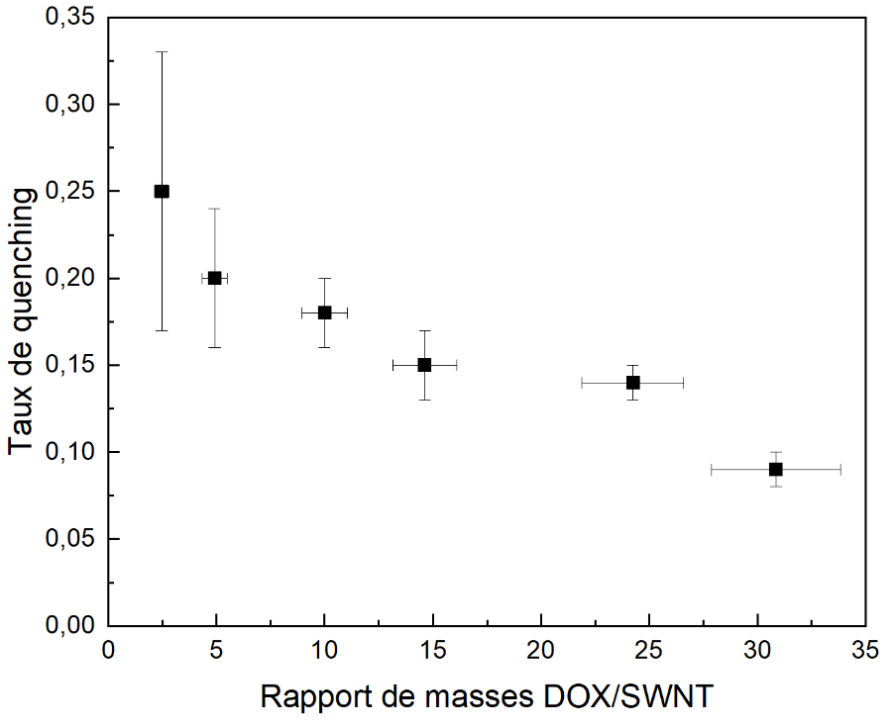


Figure VIII-11 : Taux de quenching de la Doxorubicine en fonction du rapport de masses DOX/SWNT par spectroscopie d'absorption.

VIII.1.3.4. *Recouvrement*

D'après *Kordzadeh et al* et *Wang et al.*, les premières molécules de Doxorubicine s'adsorbent préférentiellement en configuration parallèle à la surface des SWNT [31],[32]. Comme mentionné plus haut, une monocouche de molécules en configuration parallèle correspond approximativement à un rapport de masses DOX/SWNT de 1,7 ± 0,2. Or, pour l'échantillon F le rapport de masses est de 2,5. Si l'on considère que la Doxorubicine

s'adsorbe toujours en configuration parallèle, à cette concentration en Doxorubicine, on aurait environ 2 couches de Doxorubicine empilées sur elles-mêmes en tenant compte de la courbure ($\phi_{cov,para,F}$ = 2,01).

En revanche, à haute concentration, les molécules s'adsorbent préférentiellement en configuration perpendiculaire, réduisant ainsi la surface occupée à la surface du nanotube. Si l'on considère que toutes les molécules de Doxorubicine s'adsorbent en configuration perpendiculaire sur la surface des SWNT pour l'échantillon F, de rapport de masses DOX/SWNT de 2,5, 83% de la surface spécifique extérieure des SWNT est recouverte.

Etant donné que la Doxorubicine a la capacité de se dimériser à haute concentration, on calcule une monocouche de « dimères parallèles » complète pour un rapport de masses DOX/SWNT d'environ 3,4.

Cependant, il est important de préciser que les molécules de Doxorubicine ne sont pas intégralement dans l'une ou l'autre configuration. On peut faire l'hypothèse qu'une partie d'entre elles serait en configuration perpendiculaire, afin de permettre à un maximum de molécules d'être en configuration parallèle. Notre modèle ne permet cependant pas cette nuance, et nous considérons donc 3 régimes de concentration :

- Le régime sub-monocouche : inférieur au rapport de masses DOX/SWNT de 1,7, correspondant à la première monocouche parallèle complète.

- Le régime monocouche : entre les rapports de masses DOX/SWNT de 1,7 et 3,4, ce-dernier correspondant à la monocouche de dimères complète.

- Le régime multicouches : supérieur au rapport de masses DOX/SWNT de 3,4.

La Figure VIII-12 illustre schématiquement ces domaines.

A partir de l'échantillon F, et jusqu'à l'échantillon K, le taux de recouvrement en configuration perpendiculaire augmente progressivement avec la concentration en DOX, passant de 0,83 pour l'échantillon F à 3,34 pour l'échantillon K. Ce dernier, avec une masse de Doxorubicine 30 fois supérieure à celle des SWNT, présente donc 3,3 ± 0,3 couches, la surface spécifique augmentant géométriquement à chaque couche. Comme attendu, le taux de recouvrement le plus élevé est obtenu pour les échantillons correspondant aux rapports de masses DOX/SWNT les plus importants, et il diminue pour les rapports de

masses DOX/SWNT les plus faibles (Figure VIII-13). Les taux de recouvrements parallèles et perpendiculaires théoriques sont présentés en Figure VIII-13 et dans le Tableau VIII-4.

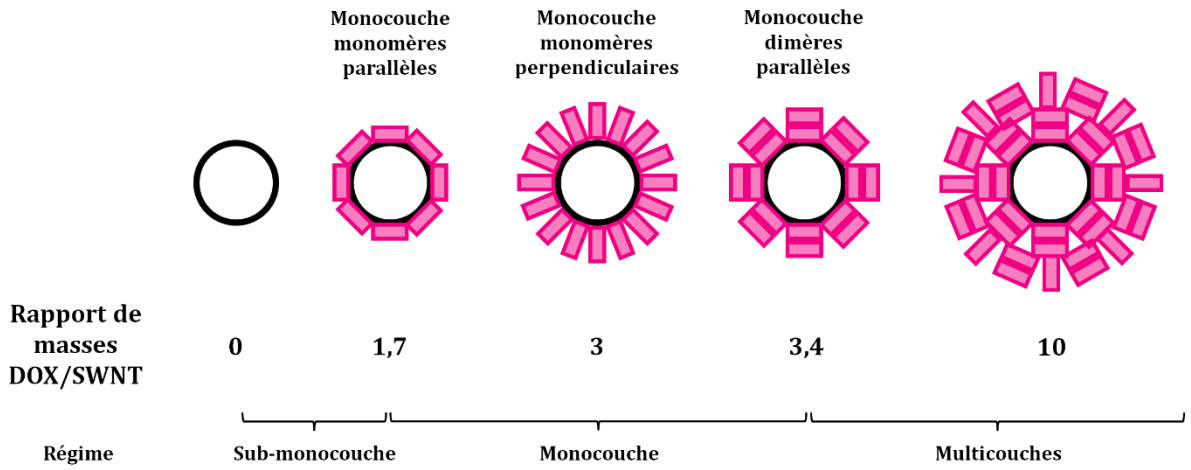


Figure VIII-12 : Représentation schématique du recouvrement d'un SWNT (cercle noir) par des molécules de Doxorubicine (rose) selon différentes configurations de la Doxorubicine. On ne considère ici ni la CMC, ni l'encapsulation.

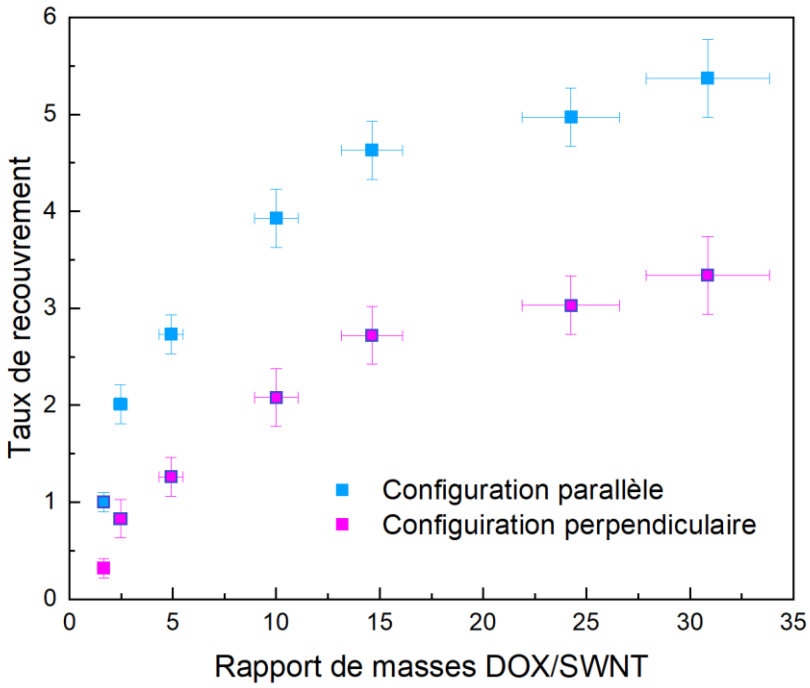


Figure VIII-13 : Taux de recouvrements théoriques de Doxorubicine sur SWNT en fonction du rapport de masse DOX/SWNT pour les configurations parallèle (cyan) et perpendiculaire (magenta).

Echantillon	.	F	G	H	I	J	K
mDOX/ mSWNT	1,67 ± 0,2	2,47 ± 0,34	4,92 ± 0,57	10,00 ± 1,06	14,63 ± 1,48	24,24 ± 2,35	30,86 ± 2,98
Taux de recouvrement parallèle $\phi_{cov,para}$	1,00 ± 0,1	2,01 ± 0,2	2,73 ± 0,2	3,93 ± 0,3	4,63 ± 0,3	4,97 ± 0,3	5,37 ± 0,4
Taux de recouvrement perpendiculaire $\phi_{cov,perp}$	0,32 ± 0,1	0,83 ± 0,2	1,26 ± 0,2	2,08 ± 0,3	2,72 ± 0,3	3,03 ± 0,3	3,34 ± 0,4

Tableau VIII-4 : Ratio de recouvrements théoriques de Doxorubicine sur SWNT en fonction du rapport de masses DOX/SWNT selon les configurations parallèle et perpendiculaire.

VIII.2. Etude de l'adsorption par l'étude spectroscopique de la Doxorubicine en fluorescence

VIII.2.1. Cinétique

Une étude cinétique de l'adsorption de Doxorubicine sur SWNT est réalisée en spectroscopie de fluorescence. Le spectre d'un échantillon de Doxorubicine à 40,5 µM est mesuré avant et après l'ajout de SWNT, pour un rapport de masses DOX/SWNT de 10, puis régulièrement pendant 7 jours (Figure VIII-14).

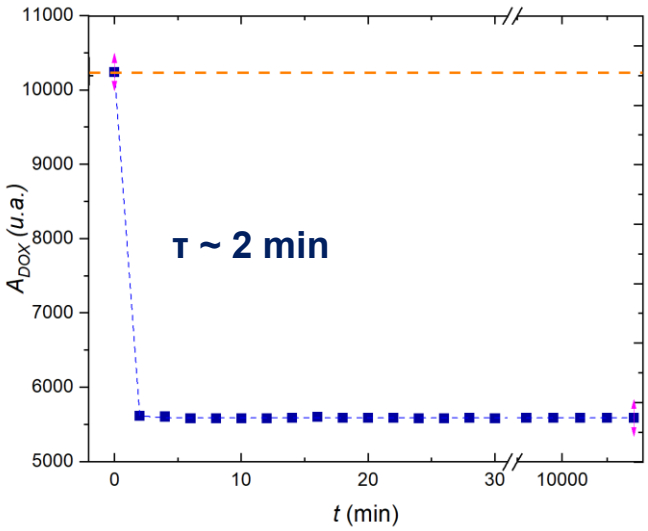


Figure VIII-14 : Evolution cinétique de l'aire entre 500 et 750 nm du spectre de fluorescence en fonction du temps, pour une concentration de Doxorubicine de 40,5 ± 0,5 µM et un rapport de masses DOX/SWNT = 10

On peut clairement voir une diminution brutale d'intensité de fluorescence, comparable à celle mesurée en absorption à cette même concentration, qui survient dès la 2ème minute. On en conclut donc que l'adsorption se déroule dans les 2 premières minutes, le protocole expérimental pour la préparation de complexes SWNT/CMC/DOX ne nous permettant pas de faire de mesure plus rapide.

VIII.2.2. A l'équilibre cinétique

VIII.2.2.1. Adsorption

L'adsorption de la Doxorubicine sur SWNT est ensuite étudiée par spectroscopie de fluorescence sur un échantillon de rapport de masses DOX/SWNT ≈ 10 entre 500 et 750 nm avant et après adsorption (Figure VIII-15). On retrouve les 3 contributions spécifiques au signal de la Doxorubicine en fluorescence, respectivement à 560, 592 et 639 nm.

On observe une forte perte d'intensité, de l'ordre de 85% du signal de la Doxorubicine initiale, signature de l'adsorption de la DOX. En revanche, la forme du signal ne change pas étant donné que les effets de filtres internes ont été corrigés. On retrouve les maxima des 3 pics aux mêmes longueurs d'onde pour des intensités relatives similaires, ce qui suggère que seuls les monomères en solution contribuent.

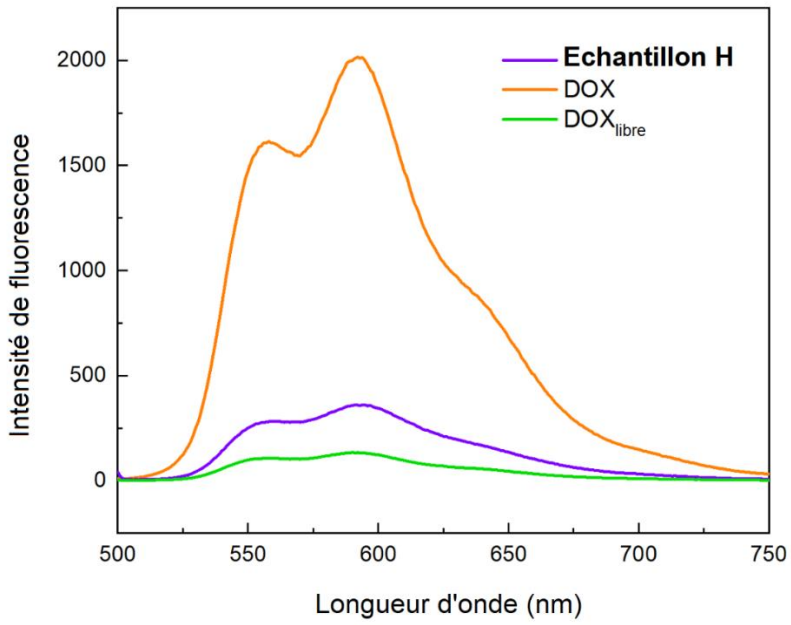


Figure VIII-15 : Spectres de fluorescence de la Doxorubicine pure (orange), du complexe SWNT/CMC/DOX (violet) et de la Doxorubicine libre obtenu après filtration des complexes SWNT/CMC/DOX (rouge)

VIII.2.2.2. Quantification

Une forte baisse de l'intensité est observée par rapport à la solution initiale de DOX. Le signal de la Doxorubicine libre obtenue après filtration des complexes SWNT/CMC/DOX est encore plus faible.

Le signal de la Doxorubicine libre est d'environ 3% de celui de la solution initiale de DOX. Cette valeur est déterminée en utilisant uniquement les valeurs au-dessus de 600 nm, afin de s'affranchir de l'auto-absorption de la DOX, qui module le spectre entre 400 et 600 nm [22],[39],[40]. Une diminution significative de l'intensité est également observée lorsque la Doxorubicine est mélangée à une solution aqueuse de CMC. Étant donné que la solution filtrée contient moins de 30 % de la CMC utilisée pour préparer l'échantillon H, le signal provenant de la Doxorubicine libre peut être atténué par adsorption sur la CMC libre dans la solution filtrée, mais pas de plus de 25 % (Figure VIII-16) [28]. Par conséquent, le rapport de Doxorubicine libre peut être estimé à partir de la méthode d'étalonnage décrite dans la partie I à environ 0,03, ce qui correspond à $\phi_{FL,H} \approx 0{,}97$, très proche du rapport calculé à partir des mesures d'absorption.

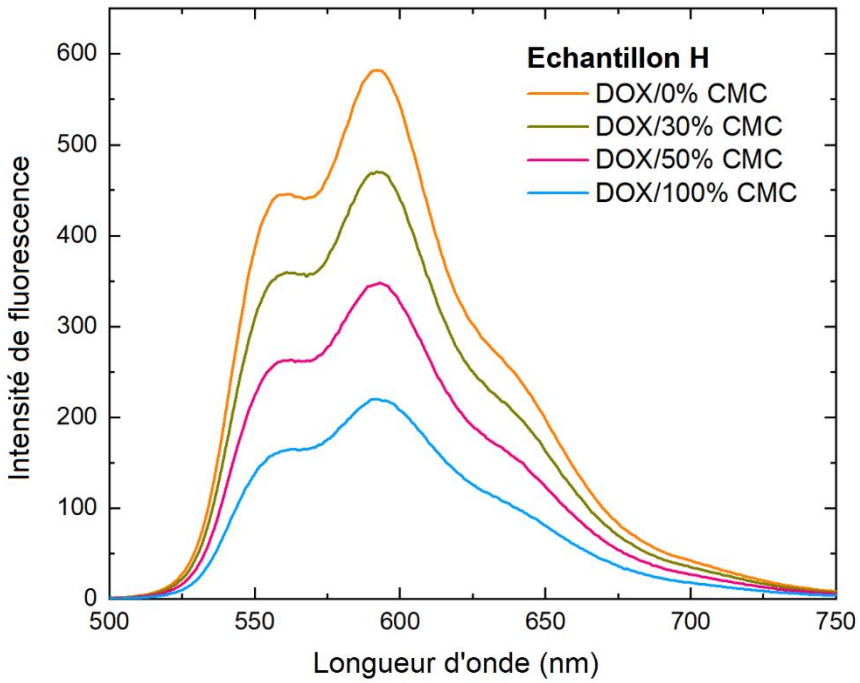


Figure VIII-16 : Spectres de fluorescence de la Doxorubicine dans des solutions aqueuses de CMC à différentes concentrations, exprimés en pourcentage de la quantité de CMC utilisée pour préparer l'échantillon H.

VIII.2.2.3. Quenching

Le taux de *quenching* de la fluorescence est de l'ordre de $\psi_{FL,H} \approx 0{,}94$ pour cet échantillon. Ce *quenching* est bien supérieur à celui obtenu en absorbance, ce qui indique que les molécules de Doxorubicine adsorbées sur les SWNT voient leur fluorescence *t*rès fortement atténuée. La fluorescence est beaucoup plus sensible aux interactions intramoléculaires que l'absorption comme on l'observe généralement en spectroscopie optique [41].

VIII.2.3. En fonction de la concentration

VIII.2.3.1. Adsorption

Les spectres de fluorescence de la Doxorubicine sont mesurés sur les trois échantillons F (10,0 µM), H (40,5 µM) et K (124,9 µM), et présentent tous les signatures spécifiques de la Doxorubicine aux trois maxima à 560, 592 et 639 nm. Comme présenté dans le chapitre VII, des corrections à propos des filtres internes et de l'absorption de l'excitatrice sont appliquées aux spectres de fluorescence. De ce fait, tous les spectres ont des profils similaires et superposables si normalisés.

La chute d'intensité de fluorescence entre le signal de la Doxorubicine initiale et celui du complexe SWNT/CMC/DOX est observée et est bien plus importante qu'en spectroscopie d'absorption pour les 3 échantillons.

VIII.2.3.2. Quantification

Les taux de Doxorubicine libre et de Doxorubicine adsorbée sont mesurés pour chaque échantillon, ils sont regroupés dans le Tableau VIII-5 et la Figure VIII-17.

On trouve des fractions de Doxorubicine adsorbée entre 0,93 et 0,97 correspondant à des rapports de masses Doxorubicine adsorbée/SWNT entre 2,3 et 27,7 pour les échantillons F à K. Ces valeurs sont très proches de celles déterminées par spectroscopie d'absorption. Cela confirme qu'il est possible d'adsorber de grandes quantités de Doxorubicine sur les SWNT, jusqu'à 90% de la Doxorubicine initiale équivalant à environ 30 fois la masse de SWNT.

Echantillon	F	G	H	I	J	K
mDOX/ mSWNT	2,47 ± 0,34	4,92 ± 0,57	0,00 ± 1,06	14,63 ± 1,48	24,24 ± 2,35	30,86 ± 2,98
Taux de DOX_{libre} $\phi_{free,FL}$	0,07 ± 0,10	0,11 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Taux de DOX_{ads} $\phi_{ads,FL}$	0,93 ± 0,10	0,89 ± 0,05	0,97 ± 0,02	0,92 ± 0,02	0,94 ± 0,01	0,97 ± 0,01
$mDOX_{ads}$/ mSWNT	2,32 ± 0,57	6,19 ± 1,06	9,24 ± 1,15	17,39 ± 2,13	22,80 ± 2,45	27,67 ± 2,96

Tableau VIII-5 : Taux de Doxorubicine libre, de Doxorubicine adsorbée sur SWNT et rapports de masses DOX_{ads}/SWNT déterminés à partir de la spectroscopie de fluorescence pour les échantillons F à K.

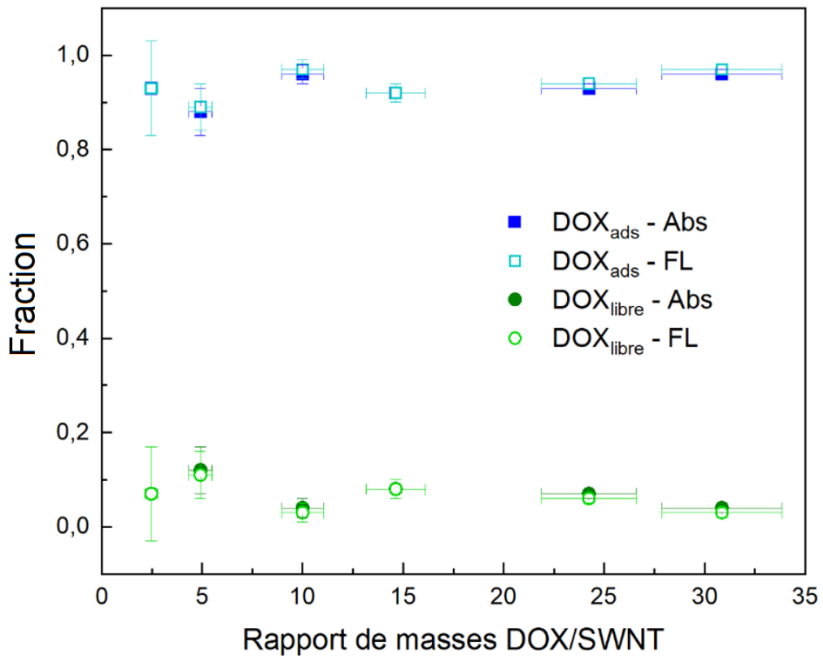


Figure VIII-17 : Fraction de Doxorubicine adsorbée (bleu) et libre (vert) en fonction du rapport de masses DOX/SWNT par spectroscopie d'absorption (couleurs foncées et symboles pleins) et de fluorescence. (couleurs claires et symboles vides).

VIII.2.3.3. Quenching

Pour les 3 échantillons, le signal de la Doxorubicine diminue fortement après adsorption sur les complexes SWNT/CMC/DOX. Les taux de *quenchings* sont bien supérieurs à ceux obtenus en absorption et diminuent avec l'augmentation de la concentration de DOX. On

passe ici d'un *quenching* proche de 100% pour les échantillons dans le régime sub-monocouche à un *quenching* d'environ 92% dans le régime multicouches. Ceci confirme que les molécules présentant des interactions DOX-DOX (donc les plus éloignées des nanotubes) sont moins quenchées que celles présentant des interactions DOX-SWNT (proches du nanotube). Contrairement à l'absorption, qui reste relativement peu sensible à la proximité immédiate de la surface, la fluorescence est gouvernée par des processus radiatifs concurrents. Le Tableau VIII-6 et la Figure VIII-18 récapitulent les taux de *quenching* ainsi que le rapport de masses DOX_{ads}/SWNT pour les échantillons F à K (voir Annexe 2 pour un tableau récapitulatif complet des résultats en absorption et en fluorescence).

Echantillon	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**
mDOX/ mSWNT	2,47 ± 0,34	4,92 ± 0,57	10,00 ± 1,06	14,63 ± 1,48	24,24 ± 2,35	30,86 ± 2,98
Taux de *quenching* ΨΦΛ	0,97 ± 0,11	0,99 ± 0,05	0,94 ± 0,03	0,99 ± 0,02	0,96 ± 0,01	0,92 ± 0,01
$mDOX_{ads}$/ mSWNT	2,32 ± 0,57	6,19 ± 1,06	9,24 ± 1,15	17,39 ± 2,13	22,80 ± 2,45	27,67 ± 2,96

Tableau VIII-6 : Taux de quenching et rapports de masses DOX_{ads}/SWNT déterminés à partir de la spectroscopie de fluorescence pour les échantillons F à K.

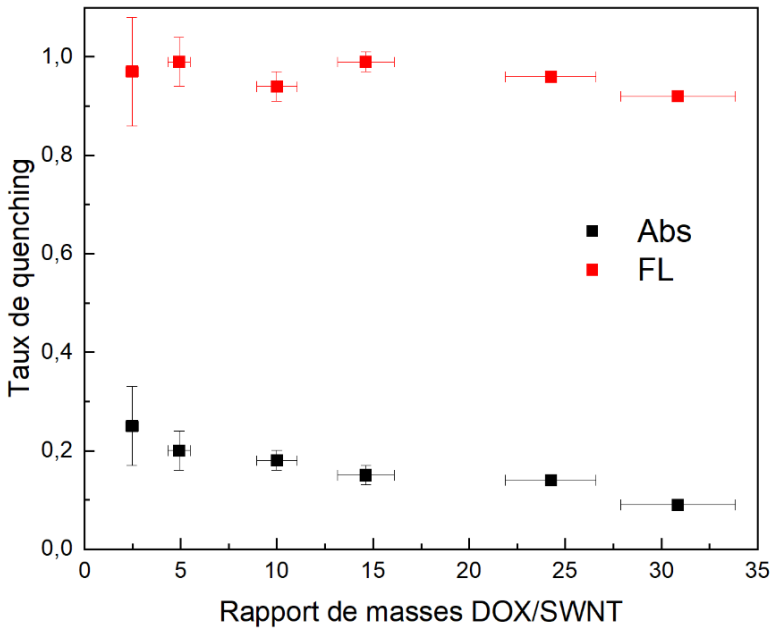


Figure VIII-18 : Taux de quenching comparés de la Doxorubicine en fonction du rapport de masses DOX/SWNT par spectroscopies d'absorption et de fluorescence.

La Figure VIII-19 compare les différentes variations des taux de Doxorubicine adsorbée et de *quenching* par spectroscopies d'absorption et de fluorescence.

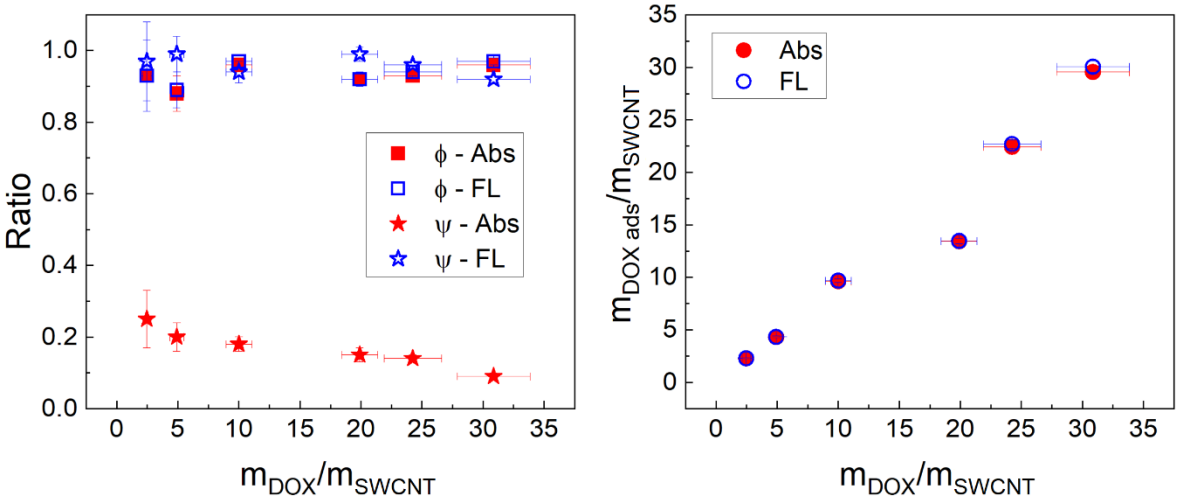


Figure VIII-19 : Variation de la fraction de Doxorubicine adsorbée et du taux de quenching (à gauche), ainsi que du rapport massique entre la Doxorubicine adsorbée et les SWNT (à droite), en fonction du rapport massique DOX/SWNT, tel que mesuré par spectroscopies d'absorption (symboles pleins) et de fluorescence (symboles vides).

On remarque que la fraction de Doxorubicine adsorbée mesurée en fonction du rapport massique DOX/SWNT ne change pas en fonction de la technique de spectroscopie utilisée. En revanche, le taux de *quenching* est bien supérieur en fluorescence. Enfin, le rapport massique de DOX_{ads}/SWNT en fonction du rapport DOX/SWNT est le même en absorption ou en fluorescence. Aucune dépendance significative à la concentration n'est observée.

VIII.3. Etude de l'adsorption par l'étude spectroscopique des SWNT (NIR FL)

VIII.3.1. Cinétique

Une étude cinétique de l'adsorption de Doxorubicine sur SWNT est réalisée par des mesures en FL NIR. Un échantillon de SWNT est mesuré avant et après l'ajout de Doxorubicine pour un rapport massique de 10, correspondant à l'échantillon H, puis régulièrement sur une semaine (Figures VIII-20 et VIII-21).

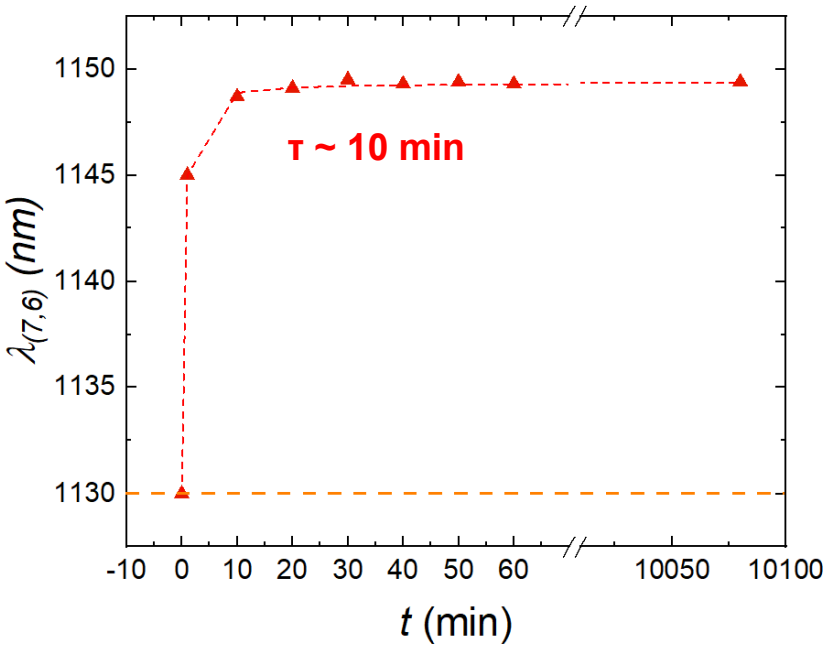


Figure VIII-20 : Evolution cinétique du maximum de l'ajustement du bunch (7,6) du spectre Raman/FL en fonction du temps, pour une concentration de Doxorubicine de 40,5 ± 0,5 µM et un rapport de masses DOX/SWNT = 10.

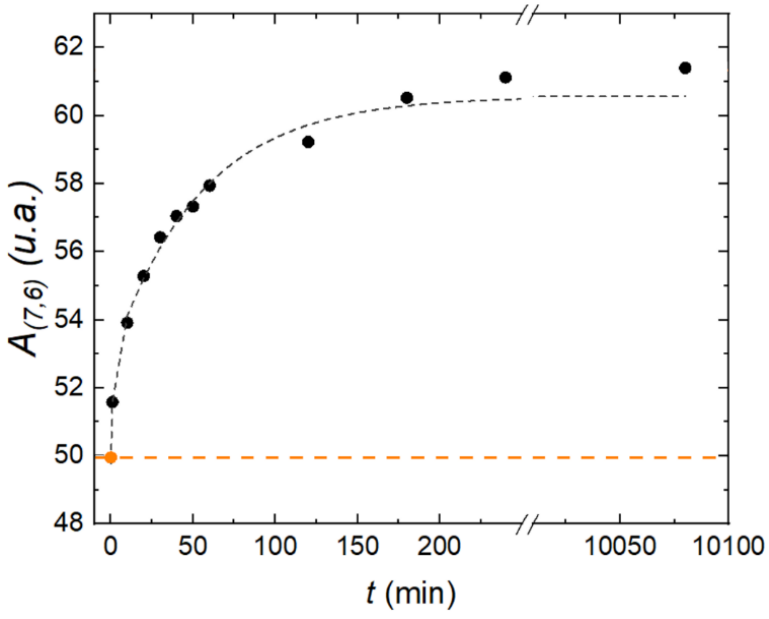


Figure VIII-21 : Evolution cinétique de l'aire de l'ajustement du bunch (7,6) du spectre Raman/FL en fonction du temps, pour une concentration de Doxorubicine de 40,5 ± 0,5 µM et un rapport de masses DOX/SWNT = 10.

Tout d'abord, on observe un décalage d'une vingtaine de nm, comparable à celui mesuré en spectroscopie d'absorption, et un plateau est atteint en environ 10 minutes. C'est un temps supérieur à celui mesuré en absorption et en fluorescence qui était de 2 minutes. On observe également une augmentation d'intensité sur des temps beaucoup plus longs : le plateau n'est atteint qu'après 24 heures.

En spectroscopies d'absorption et de fluorescence de la Doxorubicine, c'est la diminution d'intensité qui est mesurée, quenchée par les SWNT lors de l'adsorption. Ce quench survient dès que les molécules de Doxorubicine sont à la surface du SWNT et ne change pas en fonction de leurs potentielles réorganisations. Or, en spectroscopie Raman/FL, c'est la FL des SWNT qui est étudiée, sensible aux interactions inter-tubes et à leur environnement diélectrique. Ainsi, une réorganisation pourrait avoir lieu lors de l'adsorption de Doxorubicine sur SWNT, corroborant de l'hypothèse d'un changement de configuration.

L'augmentation d'intensité, quant à elle, dure plus longtemps que 10 minutes. Il s'agit donc d'un autre phénomène, qui n'a pas d'impact sur a monocouche et les interactions DOX-SWNT. On suggère qu'il s'agit de réorganisations des couches périphériques de Doxorubicine, dans les interactions DOX-DOX, qui ont une influence sur les contacts inter-tubes.

VIII.3.2. A l'équilibre d'adsorption

L'adsorption de la Doxorubicine sur les SWNT peut être suivie en mesurant la FL des SWNT dans le proche infrarouge. Les spectres couplés Raman/FL sont présentés à la Figure VIII-22, avec une double échelle d'abscisses : la longueur d'onde en bas et le décalage Raman en haut [42],[43].

Les positions et les intensités des pics Raman ne sont pas modifiées par l'ajout de DOX. Cela signifie que le nombre de SWNT individuels n'a pas changé, et que la Doxorubicine n'a pas induit de contrainte, de transfert de charge ou d'agrégation. En revanche, toutes les bandes FL sont décalées vers le rouge de 9 à 20 nm (7 à 18 meV), comme en spectroscopie d'absorption (Figure VIII-2). Ceci est la signature de changements dans l'environnement diélectrique local des SWNT, suite à l'adsorption de la Doxorubicine sur

les complexes SWNT/CMC. Des décalages vers le rouge dans la FL des SWNT sont généralement observés lorsque la constante diélectrique de l'environnement augmente [30]. Les décalages sont très proches pour chaque groupe de pics, ce qui suggère que les environnements diélectriques locaux sont comparables et que tous les types de nanotubes sont couverts par la Doxorubicine dans les échantillons.

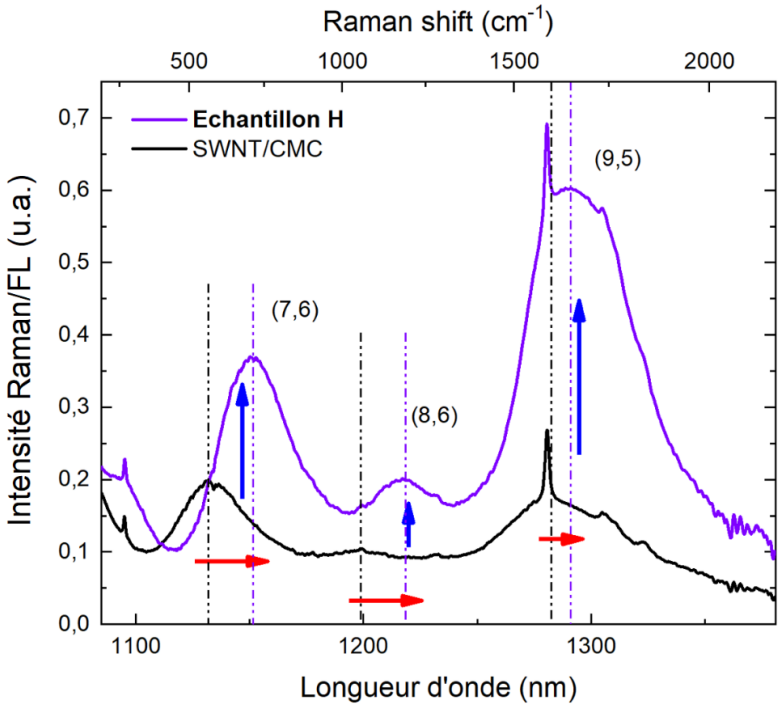


Figure VIII-22 : Spectre couplé Raman/FL de SWNT/CMC/DOX (violet) avec rapport de masses DOX/SWNT =10 (échantillon H) comparé à la suspension aqueuse SWNT/CMC (noir), montrant des décalages systématiques (flèches rouges) et une augmentation des intensités FL (flèches bleues).

Ce décalage vers le rouge homogène sur toutes les bandes FL s'explique par un effet d'écrantage diélectrique. Le dépôt d'une couche de Doxorubicine, riche en cycles aromatiques polarisables, accroît la constante diélectrique effective qui entoure chaque nanotube. De plus, les molécules de Doxorubicine-HCl étant chargées en solution, elles peuvent aussi l'être une fois adsorbées. L'énergie de transition excitonique E_{ii} correspond à la différence entre l'énergie du gap et l'énergie de liaison excitonique. Quand la constante diélectrique effective augmente, la force coulombienne diminue et l'énergie de liaison chute plus vite que l'énergie du gap. La différence entre l'énergie du gap et l'énergie de liaison se réduit donc, d'où un décalage vers les basses énergies, ou les hautes longueurs d'onde, donc vers le rouge.

En outre, une augmentation significative des intensités relatives des bandes FL par rapport à celles des bandes Raman est observée, ce qui suggère une restructuration des complexes, comme supposé par l'étude cinétique. Cette réorganisation entraîne ainsi une diminution du nombre de sites de *quenching* lors de l'adsorption de Doxorubicine à leur surface [30],[44] (Figure VIII-23). Ces sites pourraient inclure entre autres des poches d'eau [44] ou des interactions entre les nanotubes [30]. Une augmentation significative des intensités FL relatives est observée pour l'échantillon H, et moins prononcée pour l'échantillon F, en raison d'un plus petit nombre de molécules adsorbées.

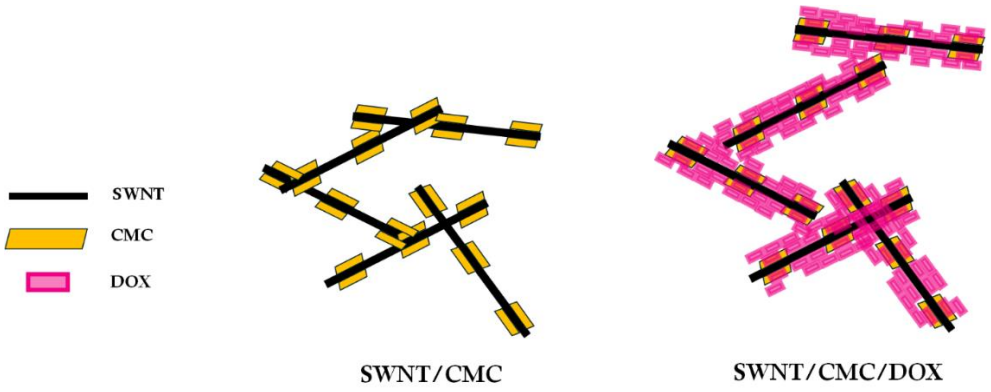


Figure VIII-23 : Représentation schématique des contacts entre SWNT avant et après l'adsorption de Doxorubicine à leur surface.

VIII.3.3. En fonction de la concentration de DOX

Afin de mieux comprendre l'effet de l'adsorption de la Doxorubicine sur les bandes FL, il est intéressant d'étudier l'évolution des spectres Raman/FL à des concentrations de Doxorubicine plus faibles. Une série de spectres à concentration constante de SWNT/CMC et concentrations croissantes de Doxorubicine est présentée dans la Figure VIII-24.

Un décalage continu des trois bandes principales est observé pour les échantillons A à E, indiquant un changement continu de l'environnement diélectrique local des nanotubes. D'autre part, une évolution complexe des intensités peut être observée, les intensités FL augmentent fortement pour de faibles quantités de DOX, entre 0 et 2 µM, puis diminuent pour des quantités intermédiaires, et enfin augmentent à nouveau, à partir de 2 µM (Figure VIII-25). Cela est dû à des changements dans les conditions de résonance, qui dépendent de la proximité de l'énergie du laser et des énergies d'absorption des

nanotubes, ces dernières étant décalées vers le rouge lorsque la concentration de Doxorubicine augmente [45].

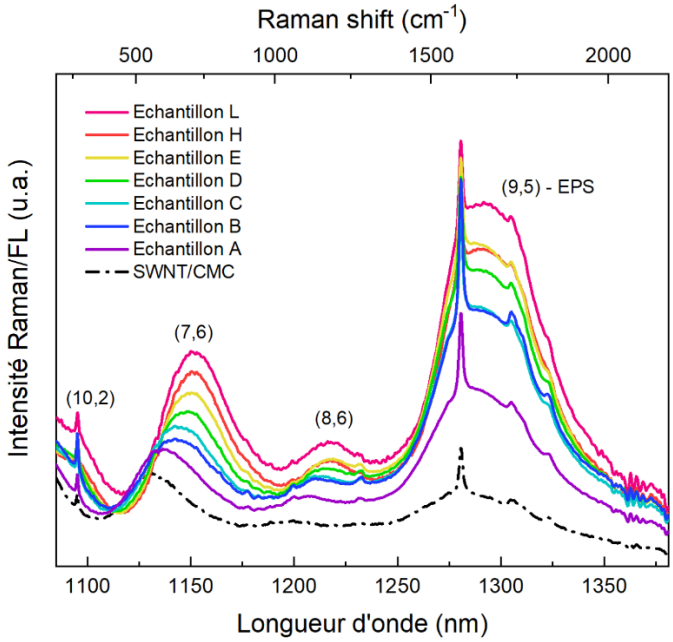


Figure VIII-24 : Evolution des spectres Raman/FL dans le proche infrarouge en fonction du rapport de masse DOX/SWNT. Les spectres sont arbitrairement décalés le long de l'axe y pour plus de clarté.

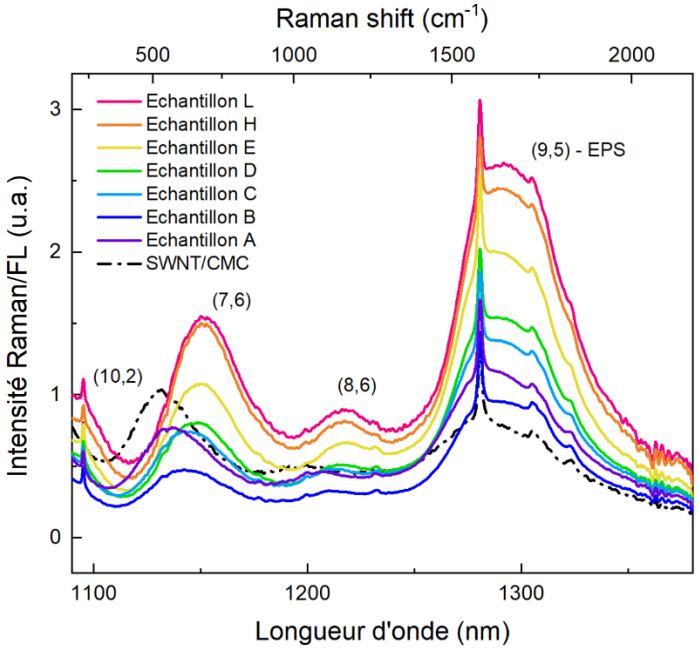
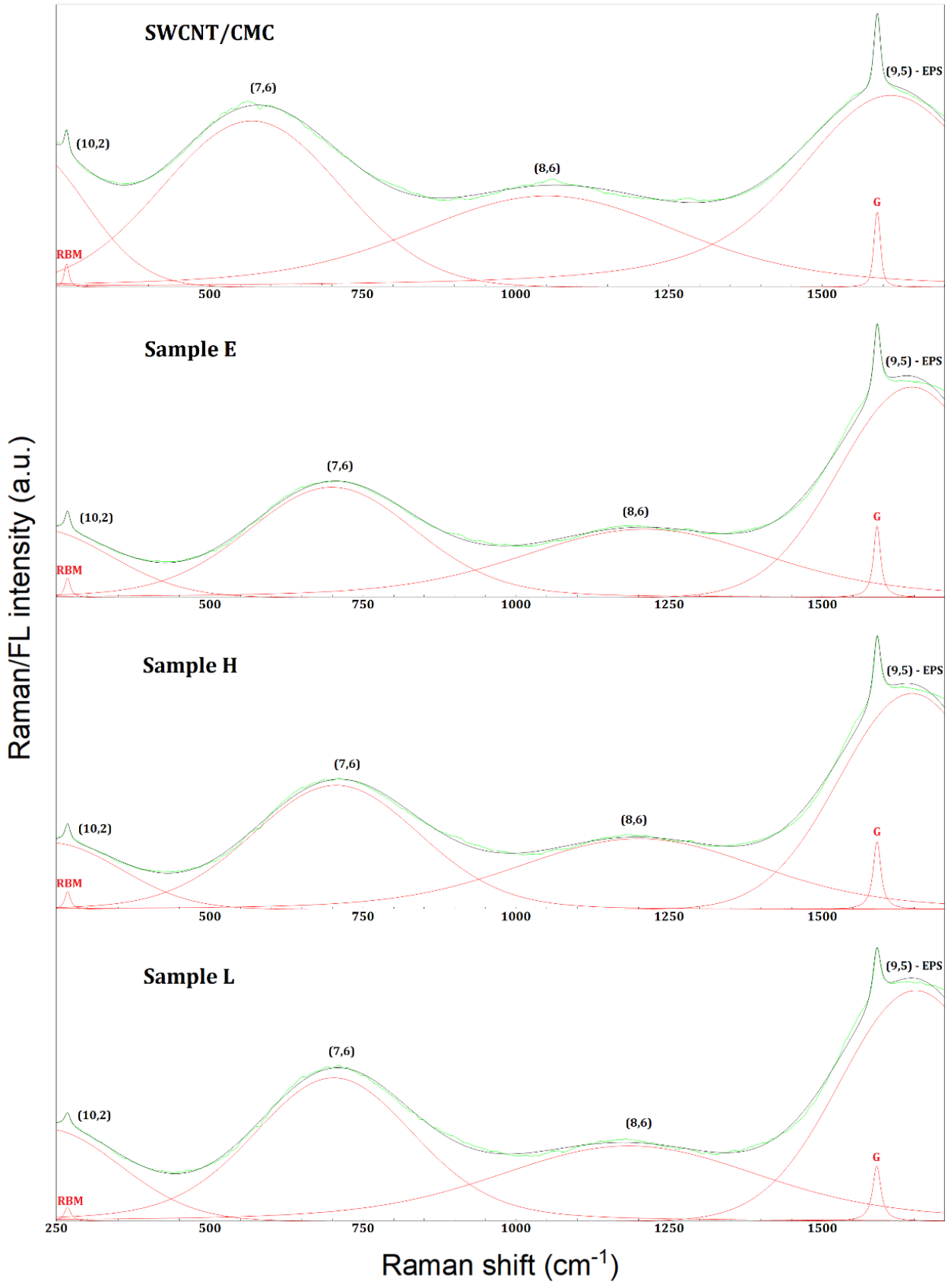


Figure VIII-25 : Evolution des spectres Raman/FL dans le proche infrarouge en fonction du rapport de masse DOX/SWNT. On visualise l'évolution complexe des intensités pour les bunch (7,6) et (8,6).



<u>Figure VIII-26 :</u> Ajustements typiques de spectres Raman/FL en utilisant 6 fonctions Voigt.

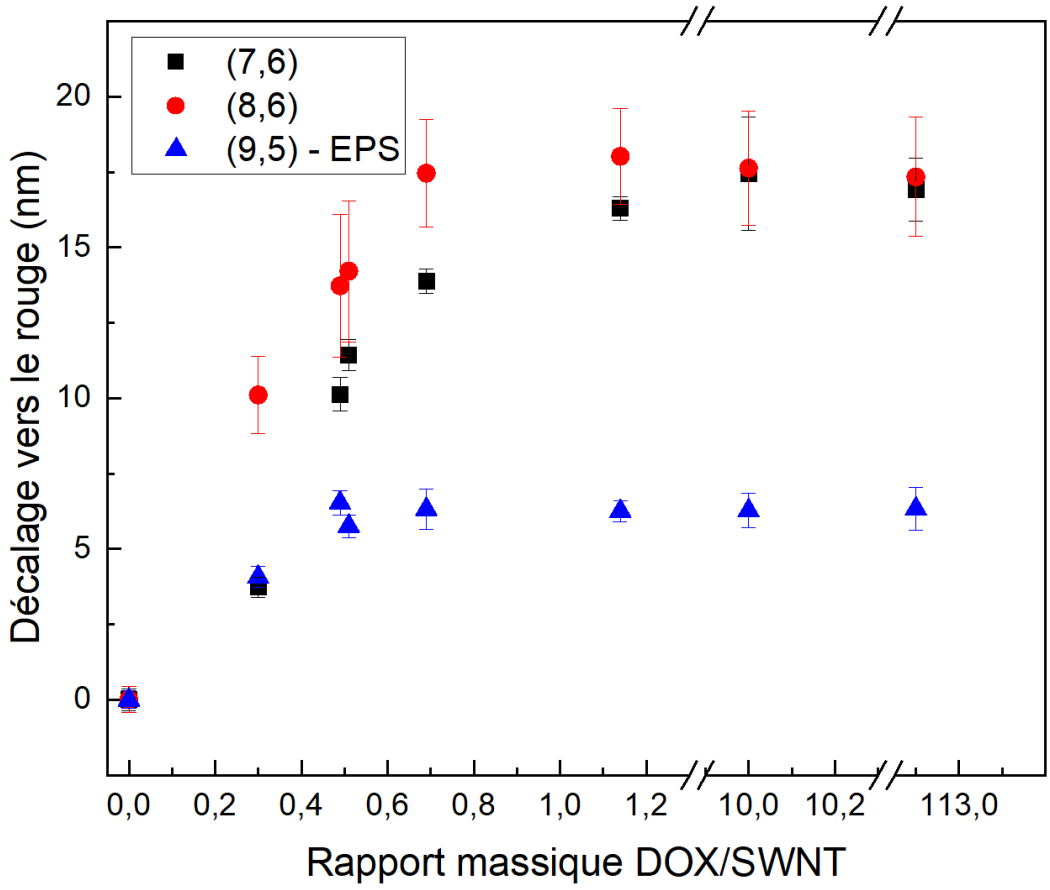
Pour une estimation plus précise des décalages, chaque spectre est ajusté avec 6 fonctions Voigt, dont 2 pour ajuster les pics Raman RBM et G, et 4 pour ajuster les bandes FL (le maximum de la première, attribué à (10,2) n'étant pas résolu). La Figure VIII-26 montre des ajustements typiques et la Figure VIII-27 représente les décalages en fonction du rapport de masses DOX/SWNT.

On obtient des ajustements globalement bons, à l'exception de la bande (9,5). Cela s'explique en partie par l'hypothèse simpliste d'une seule fonction d'ajustement pour chaque bande, alors que plusieurs types de nanotubes contribuent à chaque bande. De plus, la bande (9,5) est attribuée à un phénomène d'EPS, impliquant l'absorption de lumière par un état exciton-phonon lié, situé à environ 0,2 eV au-dessus de l'énergie d'absorption de la bande interdite optique [19],[43],[46]. L'asymétrie naturelle des bandes EPC ne peut pas être modélisée avec précision à l'aide d'une fonction symétrique [43],[46]. De plus, la présence de la bande d'absorption de l'eau vers 1400 nm est responsable d'une déformation des spectres à 1300 nm (~1700 cm^{-1}) qui les rend plus difficile à ajuster.

Nous avons exploré d'autres procédures d'ajustement, en incorporant des composantes supplémentaires pour tenir compte des contributions des différents types de nanotubes à chaque bande, et avons constaté que les résultats sont comparables. De plus, lorsque nous avons ajusté uniquement les bandes Raman, puis les avons soustraits des spectres et localisé les maxima des bandes par dérivation ultérieure des spectres, les résultats des ajustements et les maxima relevés sont restés comparables par rapport à la procédure initiale.

Ces résultats confirment que les trois bandes FL principales présentent des décalages continus vers le rouge jusqu'à un rapport de masses DOX/SWNT d'environ 1 (échantillon E). Pour la bande (9,5), le décalage semble être continu jusqu'à un rapport de masses de 0,5. Des décalages constants sont ensuite observés pour des rapports de masses supérieurs, jusqu'à environ 10 (échantillon H) et 100 (échantillon L), bien que ce dernier ne puisse être directement comparé aux autres en raison de sa préparation avec une concentration en SWNT dix fois plus faible. Cela suggère que les longueurs d'onde FL sont principalement sensibles à l'adsorption de la première monocouche de DOX, comme prévu sur la base de la sensibilité des excitons à l'environnement diélectrique local. De plus, les décalages vers le rouge des bandes FL (7,6) et (8,6), correspondant à des

diamètres de SWNT compris respectivement entre 0,83 et 0,91 nm et entre 0,95 et 1 nm, sont comparables en tenant compte des marges d'erreur. Cela implique que les environnements diélectriques locaux liés aux organisations de la Doxorubicine et de la CMC à la surface des nanotubes sont similaires, sans forte dépendance au diamètre. En revanche, les décalages vers le rouge sont nettement plus faibles pour la bande EPC (9,5), ce qui est attribué à un mécanisme physique différent impliquant l'absorption par un état exciton-phonon lié [19],[43],[46].



<u>Figure VIII-27 :</u> Décalage vers le rouge des 3 composantes Voigt utilisées pour ajuster les 3 bandes PL principales des spectres Raman/PL, en fonction de la concentration en DOX.

IX. Etude du relargage en température de la Doxorubicine

Dans cette partie, nous étudions l'effet de la température sur les complexes SWNT/CMC/DOX afin d'explorer les pistes de désorption.

IX.1. Evolution des signatures spectrales de la Doxorubicine avec la température

Deux échantillons de Doxorubicine en solutions aqueuses sont préparés à différentes concentrations, désignées comme « basse » et « haute » décrites dans le paragraphe suivant. L'effet de la température est étudié sur ces deux échantillons en spectroscopie de fluorescence (Figure IX-1) et d'absorption (Annexe 3) à 20, 30, 40, 50 et 60°C, puis de nouveau à 20°C.

A partir des spectres d'absorption à 20°C, les absorbances au point isobestique à 540 nm peuvent être relevées afin de déterminer les concentrations exactes en Doxorubicine en utilisant la loi de Beer-Lambert, et le coefficient d'extinction de 4486 $mol^{-1}.cm^{-1}$ à 540 nm. La solution à basse concentration, avec une absorbance de 0,05, a donc une concentration de Doxorubicine de 10,8 ± 0,5 µM. Les spectres de fluorescence mesurés à 20°C, ainsi que la courbe d'étalonnage calculée de fluorescence du monomère molaire déterminée au chapitre VII, permettent de déterminer que la fraction de monomère pour cet échantillon est de l'ordre de 80 %. A haute concentration, l'absorbance mesurée à 540 nm est de 0,34, correspondant à une concentration en Doxorubicine de 76,3 ± 0,6 µM, et une fraction de monomère libre de l'ordre de 35 % à 20°C.

Afin de déterminer la constante d'équilibre à 20°C ($K_{D,20°C}$), l'hypothèse la plus simple est d'utiliser la loi de Van't Hoff d'une réaction chimique qui prévoit une évolution de la constante de réaction K_D -avec la température selon :

$$\frac{d\ ln\ K_D}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \qquad \text{[IX-1]}$$

Où ΔH est l'enthalpie standard de la réaction à la température T et R la constante des gaz parfaits. On a déterminé précédemment $\mathbf{K_{D,20°C} = 13983\ L.mol^{-1}}$. Si on fait l'hypothèse que l'enthalpie standard ne change pas entre 20°C et 60 °C (ce qui parait raisonnable si la capacité calorifique reste constante), on obtient alors :

$$K_D(T) = K_D(T_0)e^{\frac{\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T_0}-\frac{1}{T}\right)} \qquad \text{[IX-2]}$$

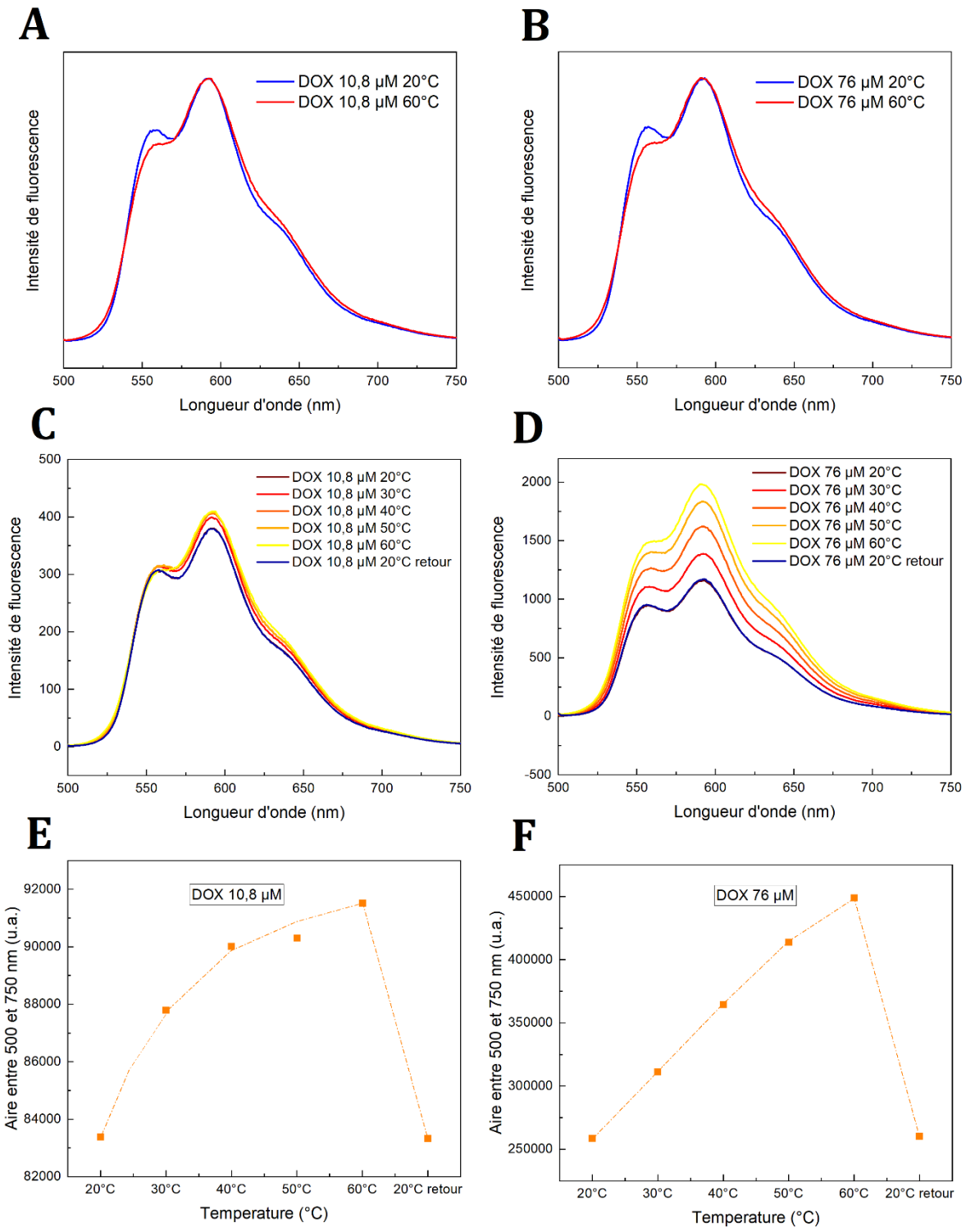
Où les températures T_0 et T, ici 20°C et 60 °C, sont exprimées en Kelvin. Pour une réaction exothermique ($\Delta H < 0$), une augmentation de température conduit à un déplacement de l'équilibre favorisant les monomères à concentration fixe. L'évolution des spectres entre 20°C et 60°C permet de déterminer ΔH. On obtient alors $\mathbf{K_{D,60°C} = 2939\ L.mol^{-1}}$.

En spectroscopie de fluorescence, on remarque une différence de profil entre les mesures à 20 et 60°C pour les solutions aqueuses de Doxorubicine et ce aussi bien à basse qu'à haute concentration (Figures IX-1A et IX-1B). En effet, la contribution à 560 nm diminue relativement par rapport à la contribution à 590 nm, alors que celle à 630 nm augmente. Cette évolution de profil étant similaire aux deux concentrations, on en déduit donc qu'il s'agit d'une évolution intrinsèque avec la température.

A basse concentration, on observe de plus une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'ordre de 10% entre 20 et 60° (Figures IX-1C et IX-1E). L'intensité augmente de façon continue et plus significativement avec la température à haute concentration, de l'ordre de 70% (Figures IX-1D et IX-1F).

L'augmentation relative de la fluorescence entre haute et basse concentration suggère que la concentration de monomères en solution augmente.

Pour les deux concentrations, le spectre mesuré au retour à 20°C après être monté à 60°C est similaire au spectre initial, ce qui indique un retour à l'équilibre monomères/dimères initial.



<u>Figure IX-1 :</u> Spectres de fluorescence de solutions aqueuses de Doxorubicine à 20 et 60°C normalisés sur le maximum à basse (A) et à haute concentration (B). Spectres de fluorescence non normalisés en fonction de la température à basse (C) et à haute concentration (D). Aires mesurées entre 500 et 750 nm pour ces mêmes échantillons à basse (E) et haute concentration (F).

En spectroscopie d'absorption, on ne retrouve pas d'évolution notable de la forme du signal entre 20 et 60 °C (Annexe 3). Cependant, on remarque qu'à basse concentration, le profil du spectre est proche de celui du monomère décrit au chapitre VII, en accord avec les 80% de monomères déterminés ci-dessus. Comme attendu, à haute concentration, le profil se rapproche du spectre des dimères.

A basse concentration, lors de la montée en température de 20 à 60°C, on observe une augmentation de l'absorbance de 7% et à haute concentration, on observe une augmentation voisine de 5%. Elle semble augmenter de façon continue avec la température. En effet, en absorption, même si la fraction de dimères diminue avec la température, et que la fraction de monomères augmente, le nombre de molécules de Doxorubicine qui absorbent reste constant. Les légères augmentations du signal observées sont donc intrinsèques et ne dépendent pas des monomères ou des dimères. On n'observe pas non plus de variation de l'absorbance au point isobestique en fonction de la température.

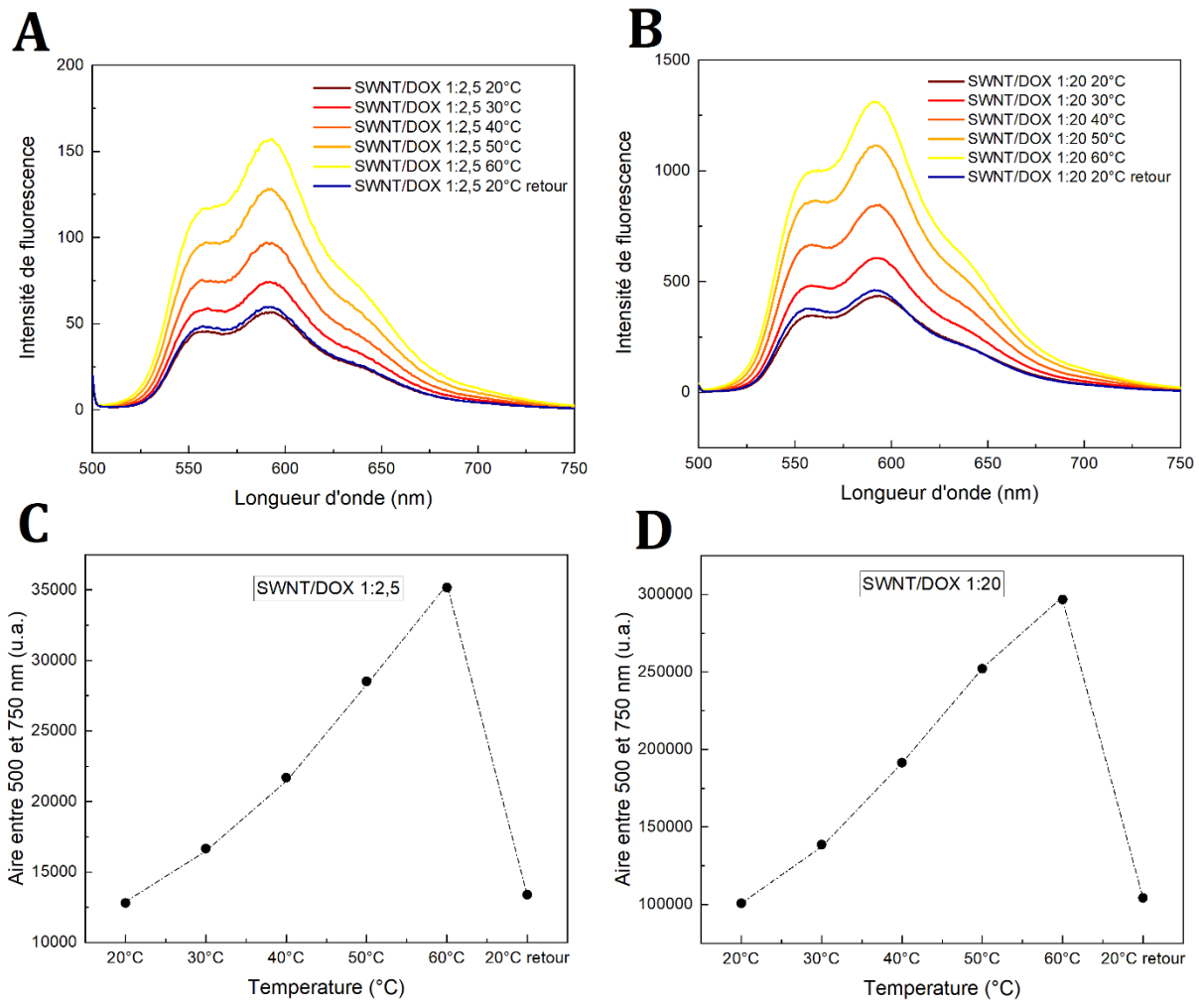
Ici aussi, les spectres du retour à 20°C ne présentent pas de différence avec les spectres initiaux, confirmant la réversibilité de l'expérience.

IX.2. Etude de complexes SWNT/CMC/DOX en température

Deux suspensions aqueuses de complexes SWNT/CMC/DOX sont préparées, l'une à basse concentration en Doxorubicine, l'autre à haute concentration en Doxorubicine aux mêmes concentrations que précédemment : 10,8 µM et 76 µM, correspondant à des rapports massiques DOX/SWNT de 2,5 et 20, respectivement en régime monocouche et multicouches.

En spectroscopie de fluorescence, on observe de fortes augmentations d'intensité, de l'ordre de 175% à basse concentration (Figures IX-2A et IX-2C), et de 200% à haute concentration (Figures IX-2B et IX-2D). Ces augmentations sont bien plus marquées que pour la Doxorubicine seule en solution, (73% et 10%, respectivement), elles ne peuvent donc pas être simplement attribuées à l'augmentation de la fraction de monomères dans la Doxorubicine libre. On en conclut que l'augmentation du signal est liée à la désorption à haute température de DOX adsorbées sur les complexes à 20°C.

L'intensité de fluorescence augmente de façon continue avec la température, indiquant que la quantité désorbée dépend elle aussi de la température, avec un maximum mesuré à 60°C. Lors du retour à 20°C, le spectre est très similaire à celui mesuré initialement, indiquant que la désorption est elle aussi réversible.



<u>Figure IX-2 :</u> Spectres de fluorescence de suspensions aqueuses de SWNT/CMC/DOX en fonction de la température à basse (A) et à haute concentration (B). Aires mesurées entre 500 et 750 nm pour ces mêmes échantillons à basse (C) et haute concentration (D).

En spectroscopie d'absorption, les augmentations d'absorbance sont de 12% à haute concentration et de 6% à basse concentration (Annexe 4), légèrement supérieures aux augmentations observées pour les solutions de Doxorubicine de mêmes concentrations. Le *quenching* des molécules de Doxorubicine est bien inférieur en spectroscopie d'absorption (de l'ordre de 25% à basse concentration, et de 15% à haute concentration).

Ainsi, on ne s'attend pas à des augmentations d'absorbance marquées lors d'une désorption. On peut en revanche apprécier l'augmentation graduelle avec la température et la réversibilité, renforçant les observations réalisées en fluorescence.

Etant données les barres d'erreurs élevées à basse concentration, les résultats et valeurs suivants seront décrits pour l'échantillon à haute concentration lors de l'augmentation de température entre 20 à 60 °C, mais les calculs et équations sont applicables à toutes concentrations et températures.

Dans le complexe SWNT/CMC/DOX, la Doxorubicine est présente sous trois états : monomère en solution, dimère en solution, et adsorbée sur SWNT. On peut donc écrire les relations de concentrations suivantes :

$$[DOX_{tot}] = [DOX_{mono,lib}] + [DOX_{dim,lib}] + [DOX_{ads}] \qquad [IX\text{-}3]$$

avec

$$[DOX_{lib}] = [DOX_{mono,lib}] + [DOX_{dim,lib}] \qquad [IX\text{-}4]$$

Où $DOX_{mono,lib}$, $DOX_{dim,lib}$, DOX_{ads} et DOX_{tot} sont respectivement les concentrations en monomères de Doxorubicine libres, en dimères de Doxorubicine libres, en Doxorubicine adsorbée sur SWNT et en Doxorubicine totale dans la suspension.

La concentration en Doxorubicine désorbée $[DOX_{des}]$ que l'on cherche à calculer s'exprime quant à elle :

$$[DOX_{des}] = [DOX_{ads,20°C}] - [DOX_{ads,60°C}] \qquad [IX\text{-}5]$$

A 20°C, la fraction de Doxorubicine adsorbée $\phi_{ads,20°C}$, calculée dans le chapitre VIII, est de **0,94 ± 0,01**, soit $[DOX_{ads,20°C}]$ = 71,7 ± 1,3 µM et $[DOX_{lib,20°C}]$ = 4,6 ± 0,8 µM.

En assimilant la Doxorubicine libre à une solution de Doxorubicine de concentration $[DOX_{lib,20°C}]$, et en prenant $\mathbf{K_{D,20°C} = 13983\ L.mol^{-1}}$, on estime $[DOX_{mono,lib,20°C}]$ et $[DOX_{dim,lib,20°C}]$.

Le facteur de *quenching* estimé dans le chapitre VIII vaut $\boldsymbol{\psi = 0,96 \pm 0,01}$. Etant donné que le signal de FL des dimères libres en solution est négligeable, le signal mesuré ne tient

compte que de la fluorescence des monomères en solution, et de celle de la Doxorubicine adsorbée. Or, cette dernière est fortement atténuée. On peut donc écrire :

$$I_{tot,20°C} = I_{mono,lib,20°C} + (1-\psi).I_{ads,20°C} \qquad [IX\text{-}6]$$

On déduit des résultats expérimentaux une augmentation nettement supérieure du nombre de monomères en solution entre 20 et 60°C pour les suspensions de SWNT/CMC/DOX en comparaison avec la solution de Doxorubicine de même concentration On déduit alors que, lorsque la température augmente :

- $[DOX_{mono,lib}]$ ne peut pas diminuer
- $[DOX_{ads}]$ ne peut pas augmenter

On prend donc 2 situations extrêmes pour estimer $[DOX_{mono,lib,60°C}]$:

- 1er cas : l'intégralité de la Doxorubicine adsorbée sur les SWNT se désorbe avec la température, soit $[DOX_{ads,60°C}] = 0$ et $[DOX_{des}] = [DOX_{ads,20°C}]$.
- 2nd cas : toute la Doxorubicine adsorbée sur les SWNT reste adsorbée avec la température, soit $[DOX_{ads,60°C}] = [DOX_{ads,20°C}]$ et $[DOX_{des}] = 0$.

A partir de $[DOX_{mono,lib,60°C}]$ calculée précédemment et $\mathbf{K_{D,60°C} = 2939\ L.mol^{-1}}$, on estime $[DOX_{lib,60°C}]$. Par différence avec $[DOX_{tot}]$, on obtient $[DOX_{ads,60°C}]$ (équation [IX-3]), puis on calcule $[DOX_{des}]$.

Ces concentrations peuvent être calculées pour les deux cas extrêmes présentés plus haut. Or, dans le 1er cas où tout est censé être désorbé, on trouve $[DOX_{des}] < [DOX_{ads,60°C}]$, indiquant que tout n'est pas désorbé. De la même manière, dans le 2nd cas où rien n'est désorbé, on trouve $[DOX_{des}] \neq 0$. Ces hypothèses se retrouvent donc infirmées et une révision selon les valeurs nouvellement calculées de $[DOX_{des}]$ et $[DOX_{ads,60°C}]$ est nécessaire. La suite de calculs précédente est réitérée et de nouvelles valeurs sont obtenues, infirmant à nouveau les dernières hypothèses. On entre alors dans deux boucles algorithmiques, qui tendent chacune vers la moyenne des valeurs de $[DOX_{des}]$ calculées au départ pour les deux cas extrêmes initiaux. On obtient alors la concentration de Doxorubicine désorbée par température pour chaque échantillon (Tableau IX-1).

Il est nécessaire de passer par cette méthode de convergence algorithmique car l'augmentation de l'intensité du signal correspond aux variations de [$DOX_{mono,lib}$] et [DOX_{ads}], et l'on ne peut pas prévoir ces variations, ce qui implique la mise en place des deux cas extrêmes. Si [DOX_{ads}] était connu, on pourrait obtenir [$DOX_{mono,lib}$] et conclure directement.

Temp	Basse concentration en DOX (10,8 µM)			Haute concentration en DOX (76 µM)		
	[DOX_{des}] (µM)	**Ratio désorbé**	**Ratio libre**	**[DOX_{des}] (µM)**	**Ratio désorbé**	**Ratio libre**
20°C	/	/	0,05 ± 0,08	/	/	0,05 ± 0,01
30°C	0,5 ± 3,9	0,05 ± 0,39	0,11 ± 0,17	4,8 ± 4,9	0,07 ± 0,07	0,12 ± 0,04
40°C	0,9 ± 4,5	0,09 ± 0,46	0,15 ± 0,23	9,0 ± 5,9	0,12 ± 0,08	0,18 ± 0,05
50°C	1,5 ± 5,4	0,14 ± 0,56	0,20 ± 0,31	13,6 ± 6,9	0,19 ± 0,10	0,24 ± 0,07
60°C	2,0 ± 6,2	0,20 ± 0,65	0,26 ± 0,39	16,7 ± 7,5	0,23 ± 0,11	0,28 ± 0,07
20°C-R	*0,2 ± 3,4*	*0,02 ± 0,35*	*0,09 ± 0,13*	*2,2 ± 4,4*	*0,03 ± 0,06*	*0,09 ± 0,03*

Tableau IX-1 : Concentrations en Doxorubicine désorbée et ratio de Doxorubicine désorbée par rapport à la quantité adsorbée initialement, en fonction de la température.

Pour les mesures à basse concentration, les barres d'erreurs, provenant des calculs initiaux de ϕ et ψ, sont aberrantes.

Si l'on prend en compte les valeurs de [DOX_{des}] à 60°C à haute concentrations, on obtient une valeur aux alentours de 20% de la Doxorubicine adsorbée. Nos résultats indiquent donc que lors du passage de 20 à 60°C, environ 20% de la Doxorubicine adsorbée est désorbée sous l'effet de l'augmentation de température, puis réadsorbée lors du retour à 20°C. De plus, entre 20 et 60°C, le ratio de DOX_{libre} passe de 5% à environ 30%.

L'augmentation de fluorescence due à l'augmentation de la fraction de monomères libres à diverses concentrations donne une preuve qualitative de la désorption de la Doxorubicine en température. L'étude quantitative, bien que présentant de larges barres d'erreurs, confirme cette observation à haute concentration.

IX.3. Etude de la désorption en température par l'étude spectroscopique des SWNT

Tout d'abord, une suspension SWNT/CMC à 1 wt% de CMC est étudiée en fonction de la température en spectroscopie Raman/FL à 20, 30, 40, 50, 60°C, puis un retour à 20°C (Figure IX-3).

On n'observe aucun décalage du signal FL en longueur d'onde, indiquant que le changement de température n'affecte pas l'environnement diélectrique local des SWNT. L'intensité des bandes Raman et des bandes FL ne change pas non plus entre 20 et 60°C, ni en absolu ni en relatif. La température n'a donc pas d'effet sur l'exfoliation ou l'agrégation des SWNT/CMC. Cependant, lors du retour à 20°C, l'intensité des bandes FL est légèrement plus élevée sur tout le spectre, d'environ 10% en moyenne. Cela pourrait être dû à un effet "recuit" entrainant une réorganisation de la CMC.

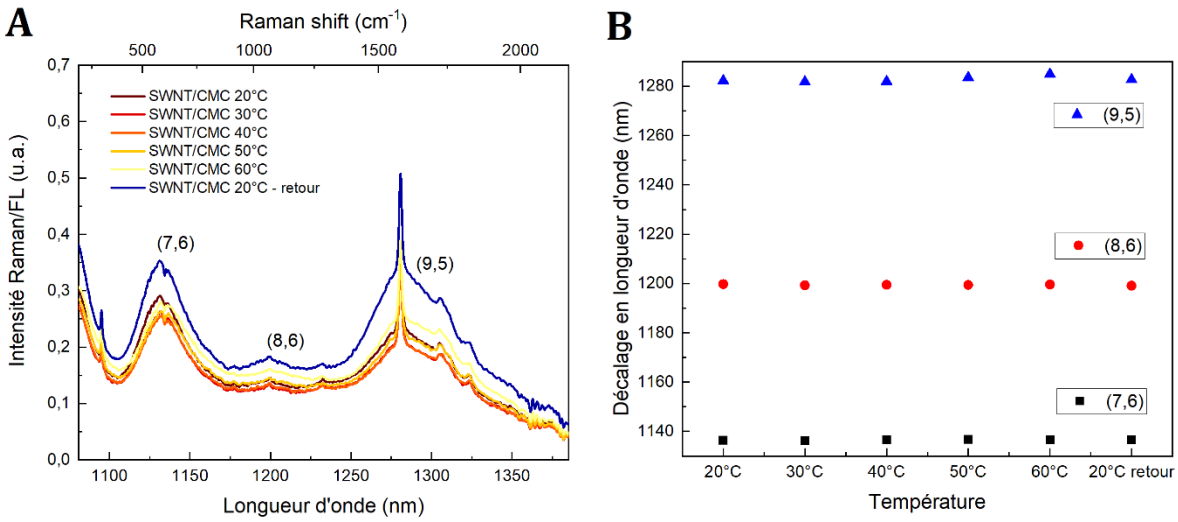
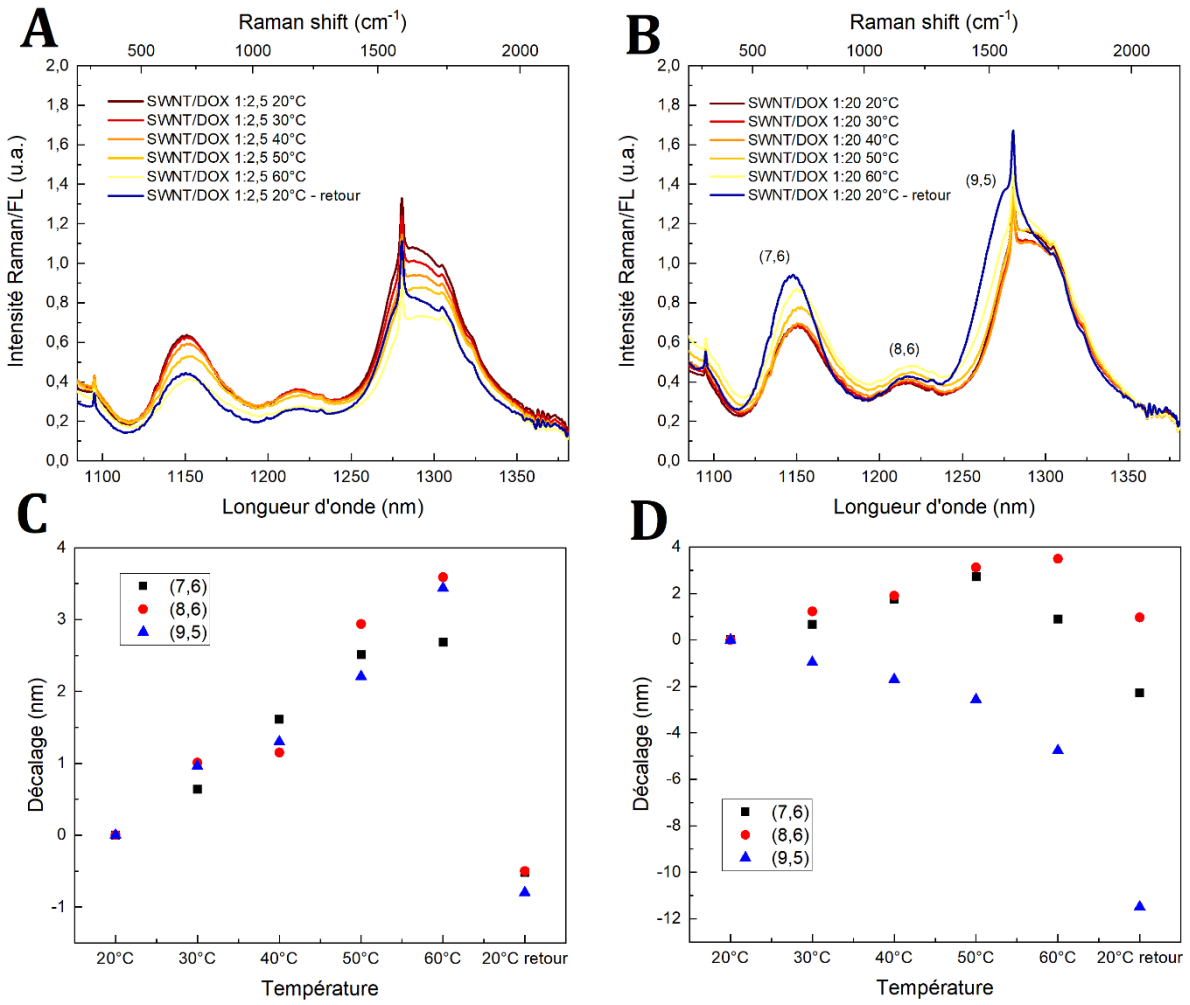


Figure IX-3 : A : Spectres Raman/FL d'une suspension SWNT/CMC à 1 wt% de CMC en fonction de la température, B : décalages des maxima des bandes (7,6) (noir), (8,6) (rouge) et (9,5) (bleu) déterminés par ajustements.

Deux échantillons de complexes SWNT/CMC/DOX similaires à ceux étudiés en fluorescence et en absorption ont été préparés. L'un est à basse concentration, au rapport de masses DOX/SWNT de 2,5 dans le régime monocouche, et l'autre est à haute concentration, au rapport de masses 20 dans le régime multicouches.

Ces deux échantillons sont étudiés en spectroscopie Raman/FL dans les mêmes conditions que ci-dessus. Les spectres et leurs décalages respectifs sont présentés en Figure IX-4.



<u>Figure IX-4 :</u> Spectres Raman/FL de complexes SWNT/CMC/DOX à basse (A) et haute concentration de Doxorubicine (B) en fonction de la température. Décalages des bandes (7,6) (noir), (8,6) (rouge) et (9,5) (bleu) à haute (C) et à basse concentration (D) de Doxorubicine en fonction de la température.

A ces deux concentrations, on n'observe aucun décalage des bandes Raman, ne traduisant donc aucun transfert de charge ou contrainte. A basse concentration, on observe des décalages très similaires pour les trois bandes FL : un décalage d'environ 3,5 nm à 60°C, puis un retour à la longueur d'onde initiale lors du retour à 20°C (Figures IX-4A et IX-4C).

Cela indique que la désorption a des effets similaires sur tous les types de SWNT de cet échantillon. Les tests précédentsont montré que cette désorption est réversible, ce que les 3 bunchs semblent confirmer par le retour à l'état initial lors du retour à 20°C.

Lors de l'adsorption initiale de Doxorubicine sur SWNT/CMC, un décalage vers le rouge était déjà observé, et témoignait de la modification de l'environnement diélectrique local des SWNT, consécutif à cette adsorption. Ces décalages vers le rouge sont généralement observés lorsque la constante diélectrique effective de l'environnement augmente, ce qui entraîne un blindage diélectrique de l'interaction de Coulomb, une renormalisation de la bande interdite optique et une diminution de l'énergie de liaison excitonique [30]. Ces décalages vers le rouge n'étaient observés que pour des rapports massiques inférieurs ou égaux à 1, et ne permettaient ainsi de suivre que l'adsorption de la 1ère monocouche de médicament, dans le régime sub-monocouche.

A basse concentration, pour un rapport massique DOX/SWNT de 2,5, le complexe SWNT/CMC/DOX est dans le régime monocouche, entre les rapports de masses correspondant à des monocouches de monomères parallèles (1,7) et de dimères parallèles (3,4). Dans le cas où les molécules de la première monocouche seraient désorbées, on s'attendrait à un décalage vers le bleu, inverse au décalage vers le rouge étudié lors de l'adsorption initiale. Or, étant donné qu'il s'agit d'un décalage supplémentaire vers le rouge, et que la désorption est précédemment démontrée par les spectroscopies de la Doxorubicine en absorption et en fluorescence, on en déduit que ce décalage vers le rouge résulte d'une réorganisation structurelle à la surface des SWNT, concomitant à la désorption de couches périphériques ou de molécules adsorbées sur la CMC.

Cette réorganisation structurelle pourrait être à l'image d'une "recristallisation" de la Doxorubicine sur les nanotubes. En effet, on suggère qu'à haute température, les molécules déjà adsorbées gagnent la mobilité latérale nécessaire pour réarranger leur réseau d'interactions (π-π, liaisons hydrogène, liaisons électrostatiques). La montée en température pourrait induire une "recristallisation de surface" où les molécules de Doxorubicine diffuses se réorganiseraient en un réseau lamellaire cohérent épousant la paroi des nanotubes. Cependant, une recristallisation comme on l'entend généralement n'implique pas de réversibilité. Il pourrait aussi s'agir de la signature d'une agitation thermique plus importante sans causer de désorption de la monocouche, les molécules de Doxorubicine deviendraient plus mobiles sous l'effet de la température.

Etant donné qu'à haute température, l'équilibre est déplacé en faveur des monomères, une autre hypothèse pourrait être une compétition entre les interactions DOX-DOX et les interactions DOX-SWNT, respectivement défavorisées et favorisées à haute température. Ainsi, les molécules de Doxorubicine s'adsorberaient préférentiellement sur les nanotubes, potentiellement dans les espaces libres, augmentant la permittivité locale, ce qui expliquerait le décalage vers le rouge. Réciproquement, lorsque la température baisse, les interactions DOX-DOX redeviendraient plus fortes, conduisant à la désorption de molécules adsorbées sur les SWNT et à leur adsorption sur d'autres molécules de de Doxorubicine. La Figure IX-5 illustre cette hypothèse.

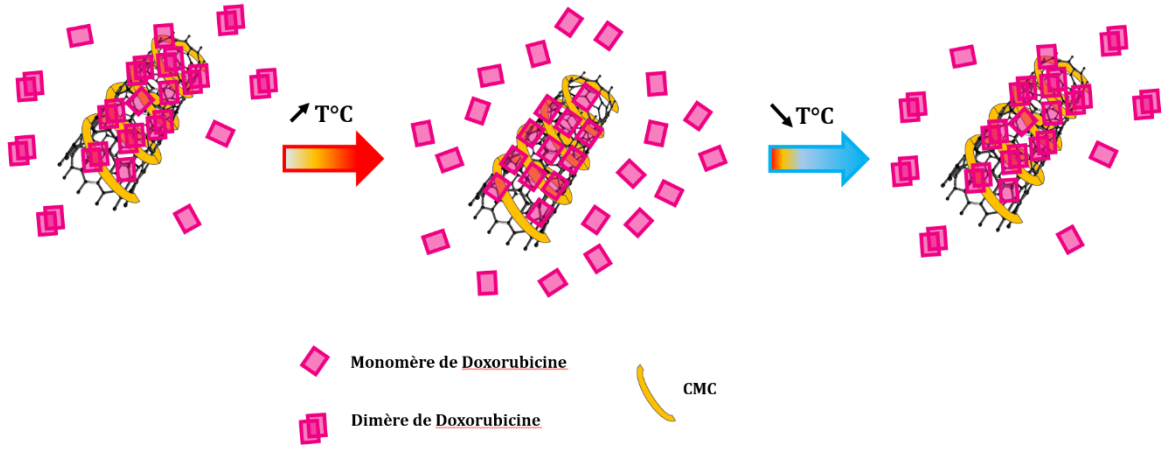


Figure IX-5 : Représentation schématique du phénomène de désorption – réadsorption pour un complexe SWNT/CMC/DOX. En situation initiale, le SWNT est recouvert de Doxorubicine, des monomères et des dimères coexistent en solution. Lors de l'augmentation de température, les dimères se dissocient en monomères, l'interaction DOX-DOX devient plus faible par rapport à l'énergie thermique, libérant ainsi les molécules de DOX des couches supérieures. L'interaction SWNT-DOX devient alors plus forte que l'interaction DOX-DOX, permettant au champ excitonique de polariser les molécules de DOX restées à la surface du nanotube et produisant un décalage vers le rouge. Lors du retour à 20°C, l'interaction DOX-DOX redevient plus forte et la structure revient à l'état initial.

A haute concentration, les 3 bandes FL se décalent aussi en fonction de la température. Pour les bunchs (7,6) et (8,6) on observe un décalage vers le rouge d'environ 3 nm à 60°C,

puis un retour vers le bleu lors du retour à 20°C, de 5nm pour (7,6) et de 3 nm pour (8,6). Pour le bunch (9,5), on observe en revanche un décalage vers le bleu d'environ 6 nm à 60°C, qui se poursuit jusqu'à 12 nm lors du retour à 20°C (Figures IX-4B et IX-4D).

Cela indique de ce fait des comportements différents selon le type de SWNT suite à la désorption de Doxorubicine. La désorption ne semble pas ici être réversible lors du retour à 20°C, à part pour le bunch (8,6).

A cette concentration, pour un rapport massique DOX/SWNT de 25, le complexe SWNT/CMC/DOX est dans le domaine multicouches, et nous supposons que la désorption des 20% estimés de molécules de Doxorubicine a lieu sur les molécules périphériques. Le décalage vers le rouge des bandes (7,6) et (8,6) lors de la montée en température semblent confirmer les observations et hypothèses réalisées à basse concentration. Elles vont dans le sens d'une réorganisation structurelle induite par la température, à l'image d'une recristallisation ou d'une compétition entre interactions.

Pour le bunch (9,5), ce décalage vers le bleu continu et persistant après le retour à 20°C est surprenant, et dans une moindre mesure, celui du (7,6) aussi. Il suggère que pour ces diamètres de SWNT, la désorption n'est pas réversible et modifie l'organisation dans l'environnement diélectrique de façon durable. Ce décalage vers le bleu est comparable au décalage vers le rouge initial qui survient lors de l'adsorption de Doxorubicine (environ 15 nm). Cependant, pour le bunch (9,5), il s'agit d'un mécanisme EPC qui peut être affecté différemment des autres bandes par les effets de résonnance. Des tests complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène et ses implications spectrales.

Cette étude ouvre les portes d'études complémentaires de désorption par excitation laser et conversion photo-thermique. En effet, en tant que conducteurs thermiques, l'irradiation des SWNT avec un laser dans le proche IR permet d'augmenter la température dans l'environnement local des SWNT. Les tissus alentours ne seraient ainsi pas touchés et il serait possible d'atteindre les températures nécessaires à la désorption d'une concentration suffisante d'une drogue d'intérêt *in vivo*, en plus de pouvoir suivre ladite désorption par spectroscopie.

X. Adsorption et quantification d'Abemaciclib sur SWNT

X.1. Détermination des conditions expérimentales

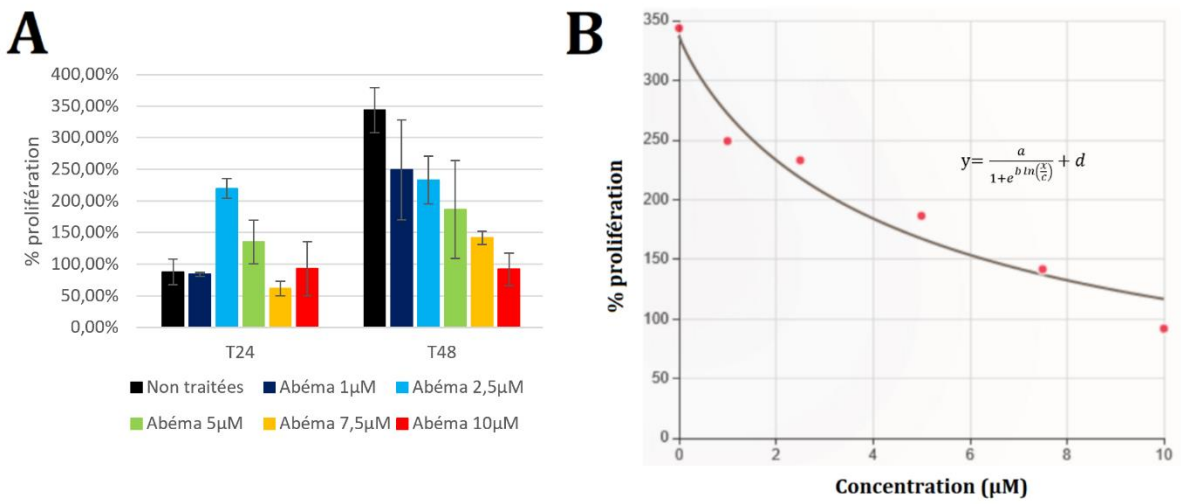
Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la formulation de complexes SWNT/CMC/Ab à des concentrations permettant leur utilisation biologique non toxique. Puis, nous étudions l'adsorption d'Abemaciclib sur SWNT/CMC et cherchons à quantifier la fraction adsorbée sur les nanotubes. Enfin, nous testons le potentiel inhibiteur de ces complexes sur une lignée cellulaire pancréatique.

X.1.1. Détermination de l'IC50 de l'Abemaciclib sur la lignée PANC1

Des tests de prolifération cellulaires sont réalisés sur les cellules PANC-1 traitées avec différentes concentrations d'Abemaciclib afin de déterminer la concentration inhibitrice médiane (IC50) de l'Abemaciclib par une relation dose-réponse pour la lignée cellulaire PANC-1, utilisée dans ce projet [47],[48]. Une relation dose-réponse décrit la corrélation quantitative entre l'ampleur de l'effet biologique (ici l'inhibition de la prolifération) et la concentration croissante d'un agent (ici une drogue, l'Abemaciclib). Pour cela, les cellules sont traitées avec des concentrations d'Abemaciclib entre 0 et 10 µM en triplicat, et la prolifération cellulaire est déterminée après 24 et 48h par absorbance après fixation et coloration des cellules au Cristal violet. Les Figures X-1A et X-1B montrent le pourcentage de prolifération par rapport à la population à T0, normalisée à 100%. Les cellules non traitées (en noir sur Figure X-1A) ont montré une prolifération allant jusqu'à 343 ± 36%, soit une multiplication d'environ 3,5 après 48h.

La prolifération diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en Abemaciclib. A 10 µM, elle est de l'ordre de 100%. Ceci correspond au seuil de toxicité pour lequel l'Abemaciclib non seulement inhibe la prolifération mais tue également des cellules.

Le taux de prolifération après 48h est reporté en fonction de la concentration d'inhibiteur. Les données sont ajustées selon une régression sigmoïde à 4 paramètres afin de déterminer l'IC50 de l'Abemaciclib [48],[49],[50] (Figure X-1B).

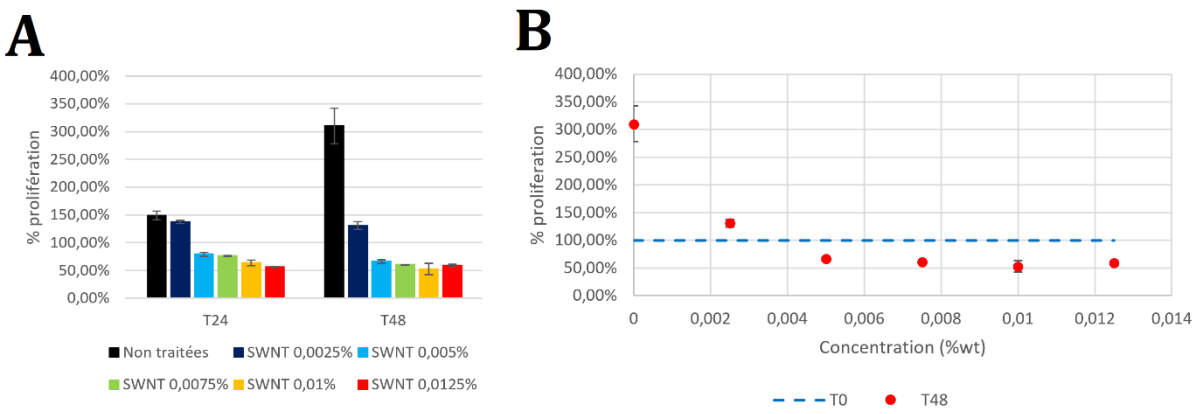


<u>Figure X-1 :</u> Représentation sous forme d'histogramme (A) de la prolifération cellulaire (PANC-1) en fonction de la concentration d'Abemaciclib, et ajustement des données après 48h par régression sigmoïde à 4 paramètres pour déterminer l'IC50 (B). Dans cette équation, a est la valeur ajustée non inhibée moins le fond, b est le facteur de pente, c'est l'IC50 et d est le fond. L'équation suppose que y diminue lorsque x augmente.

L'IC50 de l'Abemaciclib pour les cellules PANC-1 est de **4,91 ± 0,25 µM**.

X.1.2. Toxicité des complexes SWNT/CMC

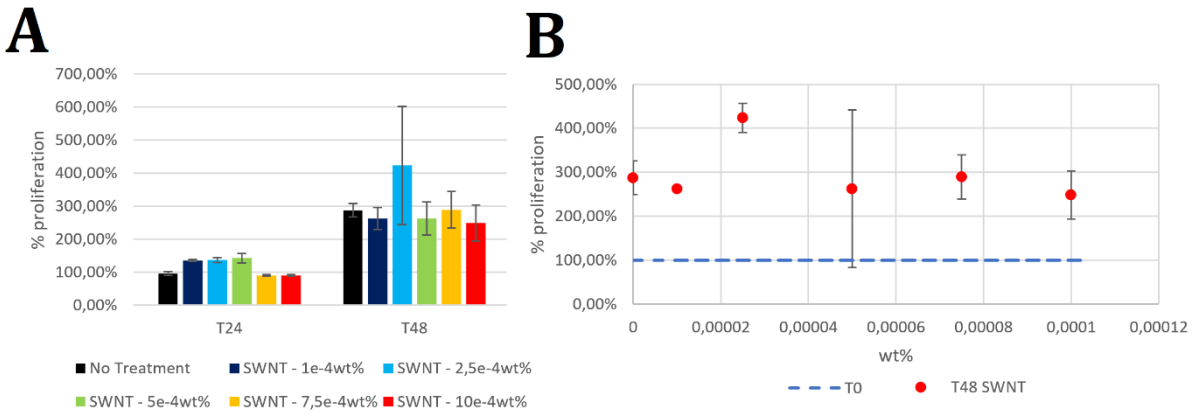
Des tests de prolifération sont réalisés sur les cellules PANC-1 traitées avec différentes concentrations de SWNT/CMC, afin de déterminer le seuil de toxicité des nanotubes pour la lignée PANC-1, défini comme la concentration pour laquelle la population de cellules diminue après 48h par rapport à sa population à T0. [51],[52],[53],[54]. Les cellules sont, dans un premier temps, traitées avec des concentrations en SWNT/CMC entre 0 et 12,5 $.10^{-3}$ wt% en triplicat, et la prolifération est mesurée après 24 et 48h. Sur les Figures X-2A et X-2B, on observe un taux de prolifération cellulaire sans traitement d'environ 300 %. L'incubation de SWNT/CMC à $2,5.10^{-3}$ wt% avec les cellules inhibe la prolifération, dont le taux chute à 131 ± 7%. Dès cette concentration, le taux de prolifération cellulaire chute bien en-dessous de la population à T0, indiquant un effet toxique.



<u>Figure X-2 :</u> Représentation sous forme d'histogramme (A) et de points (B) de la prolifération cellulaire (PANC-1) en fonction de la concentration en SWNT (entre 2,5.10^{-3} et 12,5.10^{-3} wt%) dans des complexes SWNT/CMC.

Afin de minimiser la toxicité cellulaire des SWNT, leur concentration a été réduite jusqu'à un impact négligeable et un second test de prolifération a été réalisé avec des concentrations entre 1.10^{-4} et 10.10^{-4} wt% en triplicat (Figures X-3A et X-3B).

Dans cette gamme de concentrations en SWNT, on remarque que le taux de prolifération cellulaire après 48h est de l'ordre de 300% peu importe la concentration en SWNT avec laquelle elles sont traitées. On peut donc en conclure qu'une concentration en-dessous de 1.10^{-3} wt% est acceptable car il n'y a pas d'effet cytotoxique significatif.



<u>Figure X-3 :</u> Représentation sous forme d'histogramme (A) et de points (B) de la prolifération cellulaire (PANC-1) en fonction de la concentration en SWNT (entre 1.10^{-4} et 10.10^{-4} wt%) dans des complexes SWNT/CMC.

X.2. Suivi de l'adsorption de l'Abemaciclib par études spectroscopiques NIR FL des SWNT

X.2.1. Etude cinétique

Le mélange d'une solution aqueuse d'Abemaciclib à 0,5 wt% de DMSO avec une suspension aqueuse de SWNT/CMC est étudié en cinétique par FL des SWNT dans le proche IR pour un échantillon SWNT/CMC/Ab avec rapport de masses Ab/SWNT de 10 (Figure X-4).

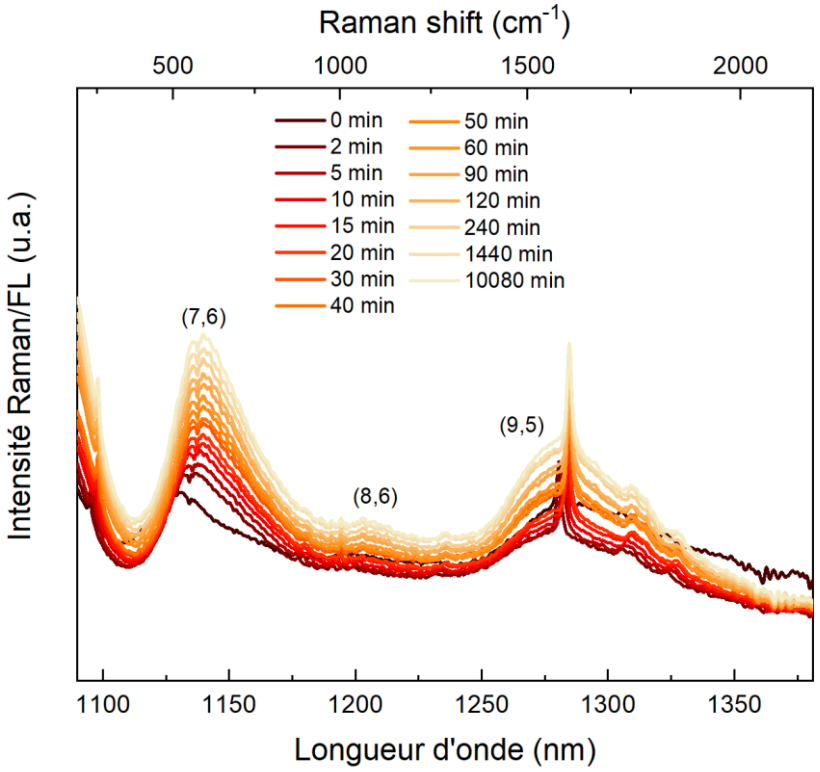


Figure X-4 : Spectres Raman/FL pour un échantillon SWNT/CMC/Ab de rapports de masses Ab/SWNT de 10 avant ajout d'Abemaciclib (noir) et en fonction du temps après mélange. Plus le spectre est clair, plus sa mesure est loin dans le temps. Les spectres ont été décalés en intensité pour une meilleure visibilité.

On observe un décalage important des bandes FL dès la première mesure à 2 minutes, puis des légers décalages en continu jusqu'à 30 minutes. Après 30 minutes, le décalage se stabilise et atteint l'équilibre à environ 7 nm par rapport à la suspension initiale. Les

bunchs (7,6) et (8,6) sont décalées de 7 nm vers le rouge, et le bunch (9,5) est décalée de 7 nm vers le bleu. (Figure X-5).

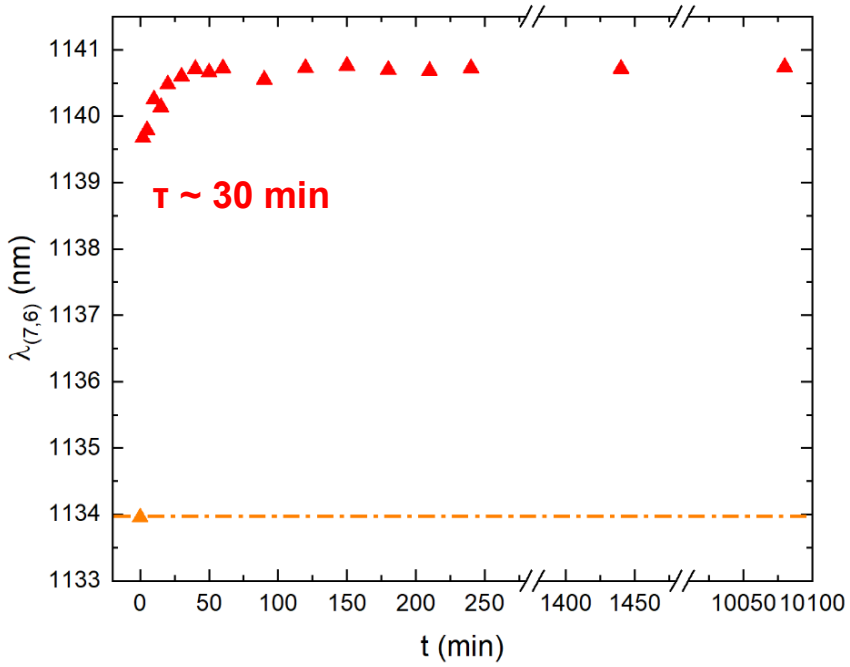


Figure X-5 : Evolution cinétique du maximum de l'ajustement du bunch (7,6) du spectre Raman/FL en fonction du temps, pour un échantillon de SWNT/CMC/Ab avec un rapport de masses DOX/SWNT = 10. Le τ est déterminé à partir d'un ajustement exponentiel.

X.2.2. Etude à l'équilibre

L'adsorption de l'Abemaciclib sur les SWNT peut être étudiée en mesurant la FL des SWNT dans le proche IR à l'équilibre, après stabilisation du signal. La Figure X-6 montre les spectres couplés Raman/FL.

On n'observe aucune modification des bandes Raman suite à l'adsorption d'Abemaciclib, ce qui indique que l'Abemaciclib n'a pas induit de contrainte ou de transfert de charge. A l'inverse, les 3 bandes FL sont décalées, et leurs intensités relatives augmentent. Pour les bunchs (7,6) et (8,6), on observe un décalage vers le rouge de 7 nm par rapport au spectre SWNT/CMC initial. Pour le bunch (9,5), on observe également un décalage d'environ 7 nm, mais vers le bleu.

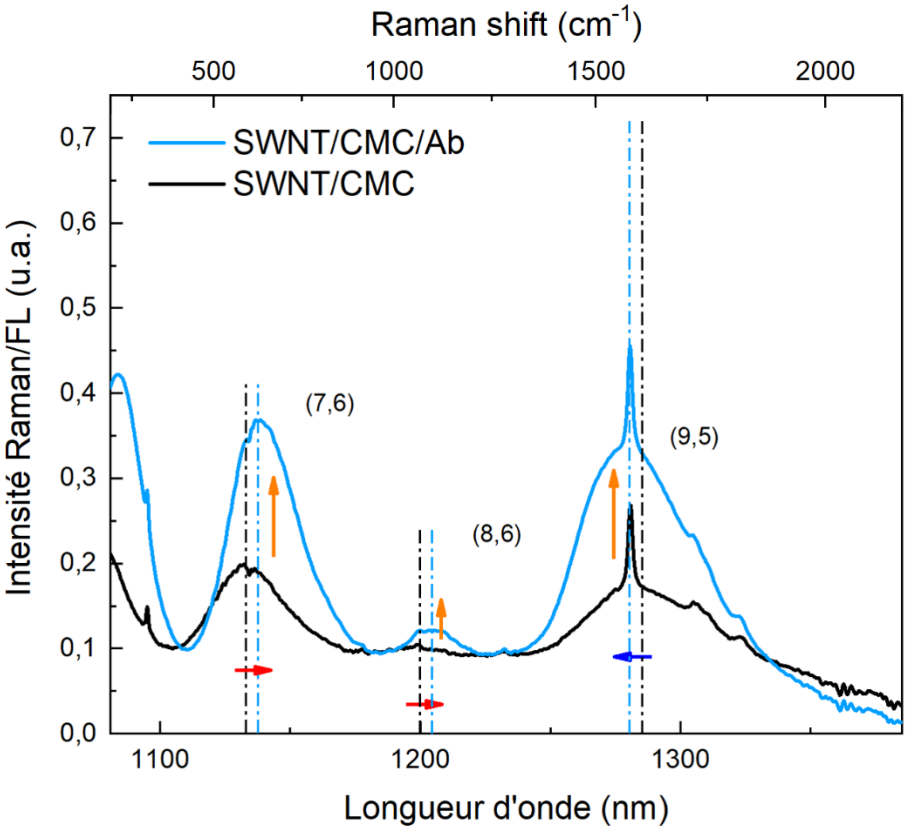


Figure X-6 : Spectres couplés Raman/FL de SWNT/CMC/Ab (bleu ciel) avec rapport de masses DOX/SWNT = 10 comparés à la suspension aqueuse SWNT/CMC (noir), montrant des décalages (flèches rouges et bleues) et une augmentation des intensités FL (flèches orange).

Les décalages vers le rouge de la FL des SWNT sont attribués à l'augmentation de la permittivité locale induite par l'adsorption de molécules d'Abemaciclib, possédant des cycles aromatiques polarisables. Ceci entraîne un blindage diélectrique de l'interaction de Coulomb et une renormalisation de la bande interdite optique [30]. En revanche, pour le bunch (9,5), de plus grand diamètre et correspondant à un phénomène d'EPC, le décalage vers le bleu suggère que les effets qui augmentent l'énergie l'emportent sur le décalage vers le rouge attendu. Encore une fois, ce bunch est lié à un phénomène d'EPC et nécessite des études complémentaires.

De plus, l'augmentation d'intensité suggère une restructuration des complexes lorsque l'Abemaciclib s'adsorbe [20],[44],[55].

X.2.3. En fonction de la concentration

L'effet de l'adsorption sur les bandes FL est étudié à des concentrations d'Abemaciclib plus faibles. La Figure X-7 présente une série de spectres avec concentration de SWNT constante à $2{,}5.10^{-4}$ wt% et correspondant à des rapports massiques Ab/SWNT entre 0,2 et 10. Des ajustements sont réalisés avec les mêmes conditions de départ que pour les complexes SWNT/CMC/DOX : 6 fonctions Voigt correspondants aux 2 pics Raman (G et RBM), et aux 4 bunchs FL (10,2), (7,6), (8,6) et (9,5). La Figure X-8 représente les décalages observés en fonction du rapport de masses Ab/SWNT.

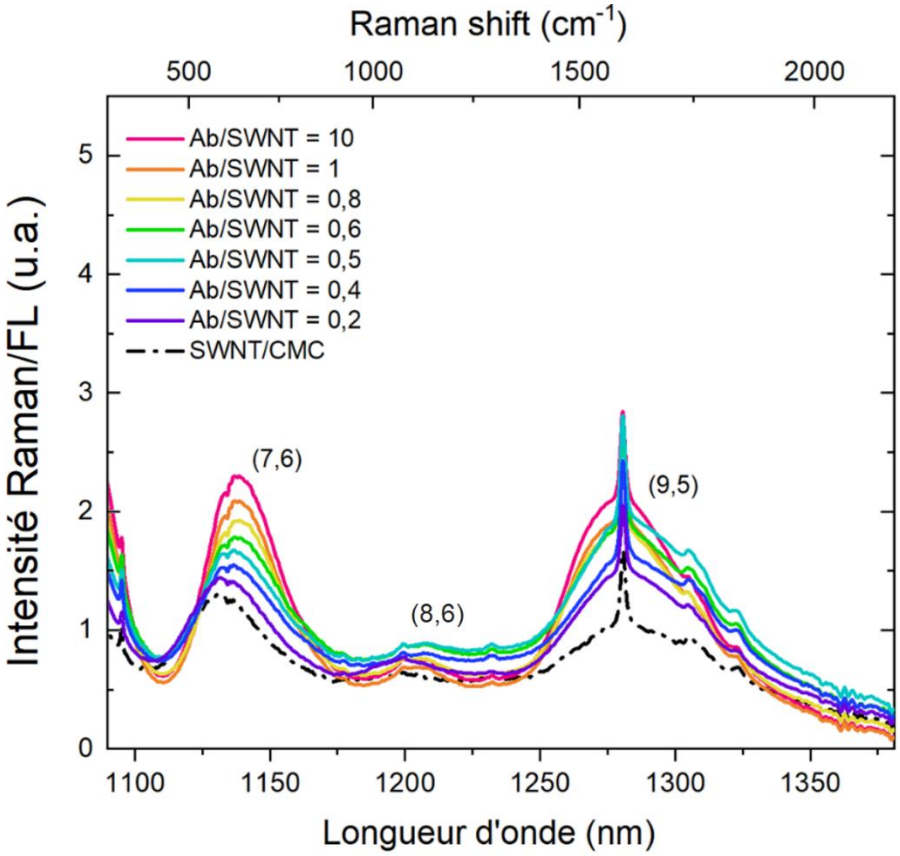
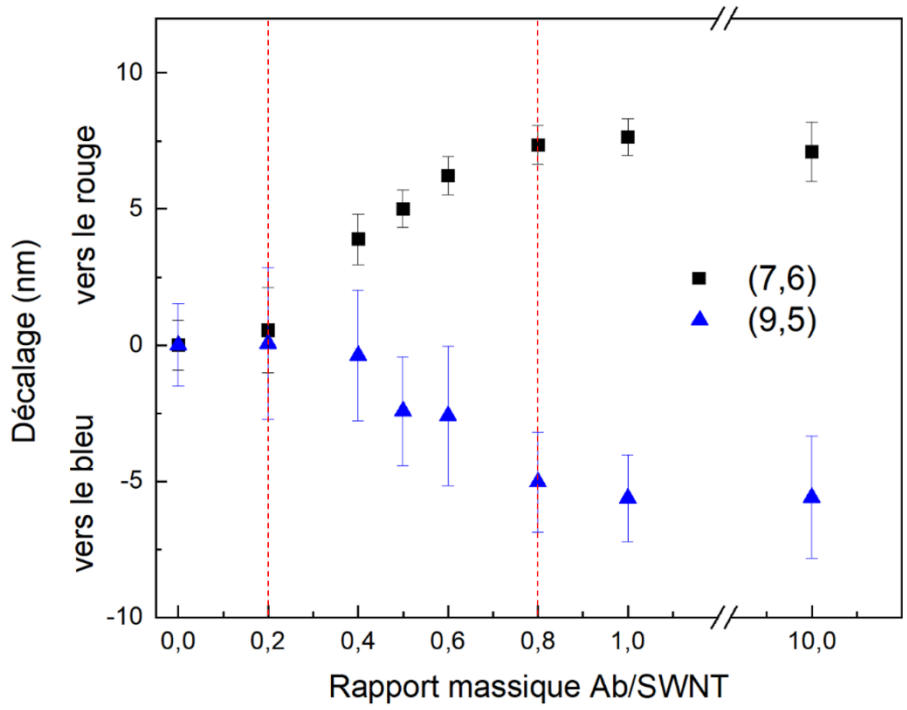


Figure X-7 : Evolution des spectres Raman/PL dans le proche infrarouge en fonction du rapport de masse Ab/SWNT. Les spectres sont arbitrairement décalés le long de l'axe y pour plus de clarté.



<u>Figure X-8 :</u> Décalages des 2 composantes Voigt utilisées pour ajuster les bunchs (7,6) et (9,5) spectres Raman/PL, en fonction de la concentration en Ab. Les lignes pointillées rouges indiquent les rapports de masses Ab/SWNT entre lesquels on observe els décalages.

Seuls les décalages des bunchs (7,6) et (9,5) sont représentés sur la Figure X-8, les ajustements du bunch (8,6) présentant de très larges barres d'erreurs à cause de sa très faible intensité.

Sur la Figure X-7, on observe un décalage continu vers le rouge du bunch (7,6) indiquant un changement continu de l'environnement diélectrique. De la même manière, on observe le décalage continu vers le bleu du bunch (9,5). Les intensités FL relatives des bunchs (7,6) et (9,5) augmentent aussi de manière continue, mais le bunch (8,6) semble augmenter aux concentrations intermédiaires d'Abemaciclib pour diminuer aux hautes concentrations.

Les décalages continus observés précédemment sont précisés par la Figure X-8. Pour les deux bunchs (7,6) et (9,5), le décalage se fait surtout entre des rapports de masses Ab/SWNT de 0,2 et de 0,8, au-delà desquels un plateau apparaît. L'étude de l'adsorption de la Doxorubicine a permis de conclure que les longueurs d'onde FL sont sensibles à l'adsorption de la première monocouche. Par analogie, on propose donc que le début du plateau corresponde à cette première monocouche au rapport de masses Ab/SWNT de 0,8.

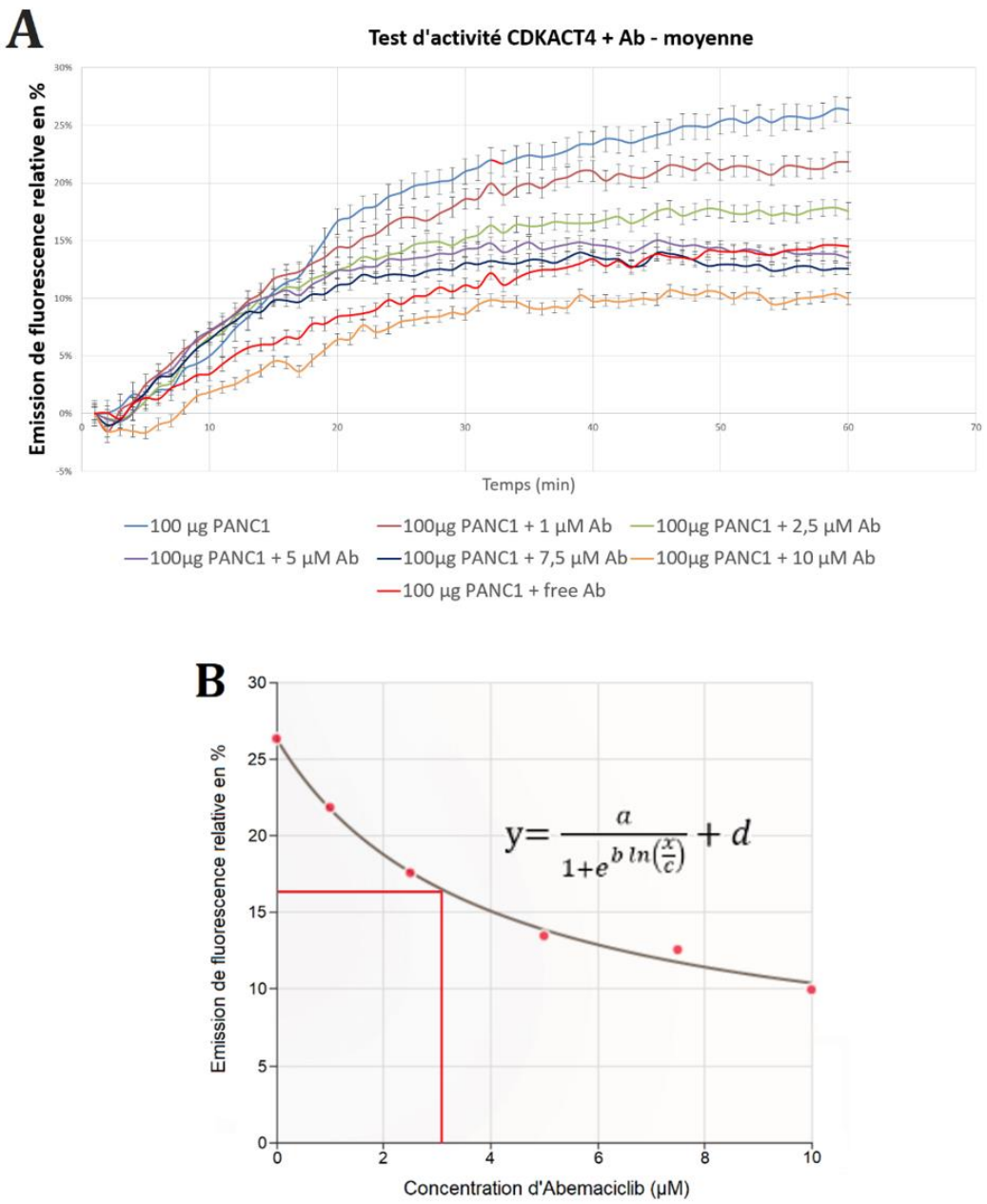
X.3.Quantification du recouvrement

X.3.1. Quantification par tests d'activité kinase

Après avoir mis en évidence l'adsorption de l'Abemaciclib sur les SWNT/CMC, il est intéressant de déterminer la quantité qui est effectivement adsorbée. Pour cela, un complexe SWNT/CMC/Ab, de concentrations en SWNT $2{,}5.10^{-4}$ wt%, et 5 µM initiaux d'Abemaciclib, correspondant à un rapport de masses 1, est filtré afin de récupérer la fraction libre d'Abemaciclib en solution notée [Ab_{libre}], la fraction adsorbée sur les complexes SWNT/CMC [Ab_{ads}] ayant été retenue par le filtre. A l'inverse de la Doxorubicine, on ne peut néanmoins pas être certain de récupérer toute l'Abemaciclib libre après cette filtration. Une partie pourrait restée piégée sur le filtre. A noter qu'une étude spectroscopique similaire à celle réalisée avec la Doxorubicine est difficilement réalisable en faisant du signal peu intense de l'Abemaciclib en absorption et en fluorescence. De plus, l'Abemaciclib étant une petite molécule à vocation thérapeutique pour la cible CDK4, il est intéressant de mesurer son inhibition.

Des tests d'activité kinase sont réalisés afin de déterminer la concentration d'Ab_{libre} grâce à la technologie de biosenseur fluorescent CDKACT4 [56]. Dans un premier temps, des concentrations croissantes d'Abemaciclib entre 0 et 10 µM sont incubées avec des protéines totales extraites de cellules PANC1 comme source de kinase CDK4 active, et des mesures de fluorescence du biosenseur CDKACT4-TAMRA avec ces échantillons ont permis de réaliser une courbe de calibration de l'inhibition de l'activité kinase par l'Abemaciclib. Plus précisément, les maxima des courbes d'activité kinase sont reportés sur une courbe en fonction de la concentration d'Abemaciclib, et ces points sont ajustés avec une régression sigmoïde à 4 paramètres (Figures X-9A et X-9B).

La valeur d'activité mesurée sur l'[Ab_{libre}] peut ainsi être rapportée sur la courbe de calibration, donnant une concentration d'Abemaciclib libre de 3,2 ± 0.82 µM. Ceci suggère qu'environ 60% de l'Abemaciclib reste en solution, et donc qu'environ 40% est adsorbé sur les nanotubes.



<u>Figure X-9 :</u> A : Cinétique de l'émission de fluorescence du biosenseur CDKACT4-TAMRA, rapporteur d'activité kinase de CDK4 dans 100 µg de protéines totales extraites de cellules PANC1 et incubées avec différentes concentration d'Abemaciclib de 1-10 µM ainsi qu'avec un échantillon de filtrat des SWNT/CMC/Ab contenant l'Abemaciclib non adsorbé (Ab_{libre}), B : les points à 60 minutes des courbes en A sont reportés en fonction de la concentration d'Abemaciclib et sont ajustés avec une équation de régression sigmoïde à 4 paramètres pour obtenir la courbe de calibration, correspondant à l'inhibition dose-dépendente de CDK4 par l'Abemaciclib. Les lignes rouges correspondent aux valeurs du filtrat.

X.3.2. Quantification par spectroscopie de masse couplée HPLC

Le même échantillon d'Ab_{libre} est analysé en spectroscopie de masse couplée HPLC. Une gamme de concentration de solutions d'Abemaciclib dans l'eau/DMSO a aussi été mesurée entre 0 et 10 µM (Figure X-10).

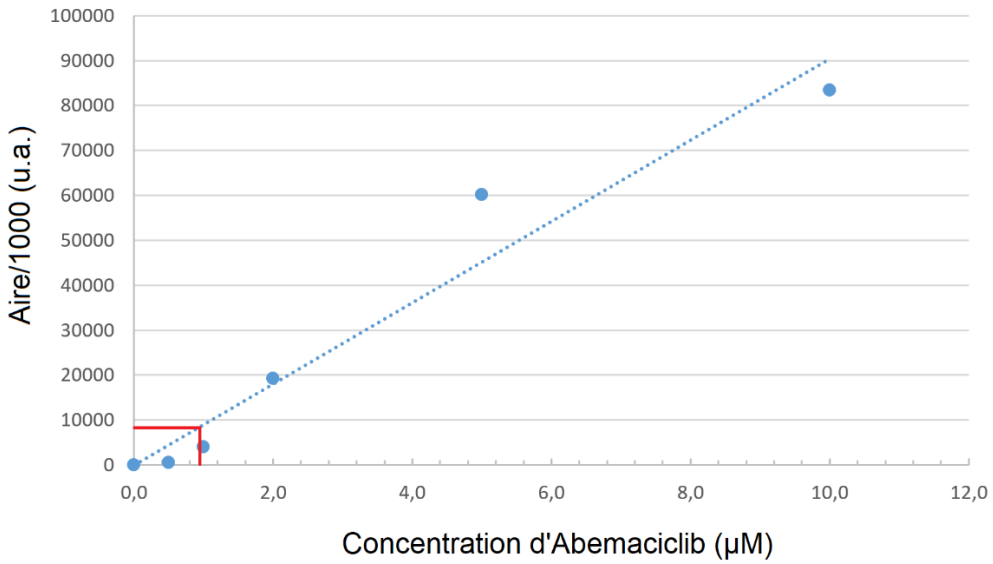


Figure X-10 : Courbe de calibration en spectroscopie de masse couplée HPLC.

On obtient une concentration d'[Ab_{libre}] de 0,89 ± 0.78 µM, correspondant à environ 20% de l'Abemaciclib initial, ce qui permet de déduire que 80% de l'Abemaciclib est adsorbé sur les nanotubes. Cette valeur est plus proche des couvertures observées avec la Doxorubicine d'environ 90% de DOX_{ads}. Cependant, ces mesures sont réalisées sur l'échantillon SWNT/CMC/Ab de rapport de masses Ab/SWNT = 1, rapport de masses pour lequel les résultats du complexe SWNT/CMC/DOX étaient difficilement exploitables dues aux difficultés de manipulation de la Doxorubicine. Il est possible que l'Abemaciclib possède les mêmes difficultés (adsorption sur surfaces, dégradation…) expliquant ainsi ces résultats aux larges barres d'erreurs et rendant difficile sa quantification à basse concentration.

X.4. Potentiel inhibiteur des complexes SWNT/CMC/Ab sur la prolifération des cellules PANC-1

Après formulation des complexes SWNT/CMC/Ab, leur potentiel inhibiteur de la prolifération cellulaire est étudié sur les cellules PANC-1. Un complexe de concentrations $2{,}5.10^{-3}$ wt% pour les SWNT et 50 µM pour l'Abemaciclib, de rapport de masses 1, est préparé. Il est ensuite dilué plusieurs fois pour obtenir 5 échantillons de concentrations en Abemaciclib et SWNT croissantes, aux alentours de l'IC50 de l'Abemaciclib et dans le domaine où la cytotoxicité des SWNT est négligeable (< 10^{-3} wt%).

Les cellules sont tout d'abord traitées avec des concentrations croissantes d'Abemaciclib afin de pouvoir comparer l'effet des complexes avec cet inhibiteur de CDK4 seul (Figures X-11A et X-11C). On retrouve des résultats semblables à ceux obtenus initialement en Figure X-1. Les cellules sont ensuite traitées avec les complexes SWNT/CMC/Ab (Figures X-11B et X-11C).

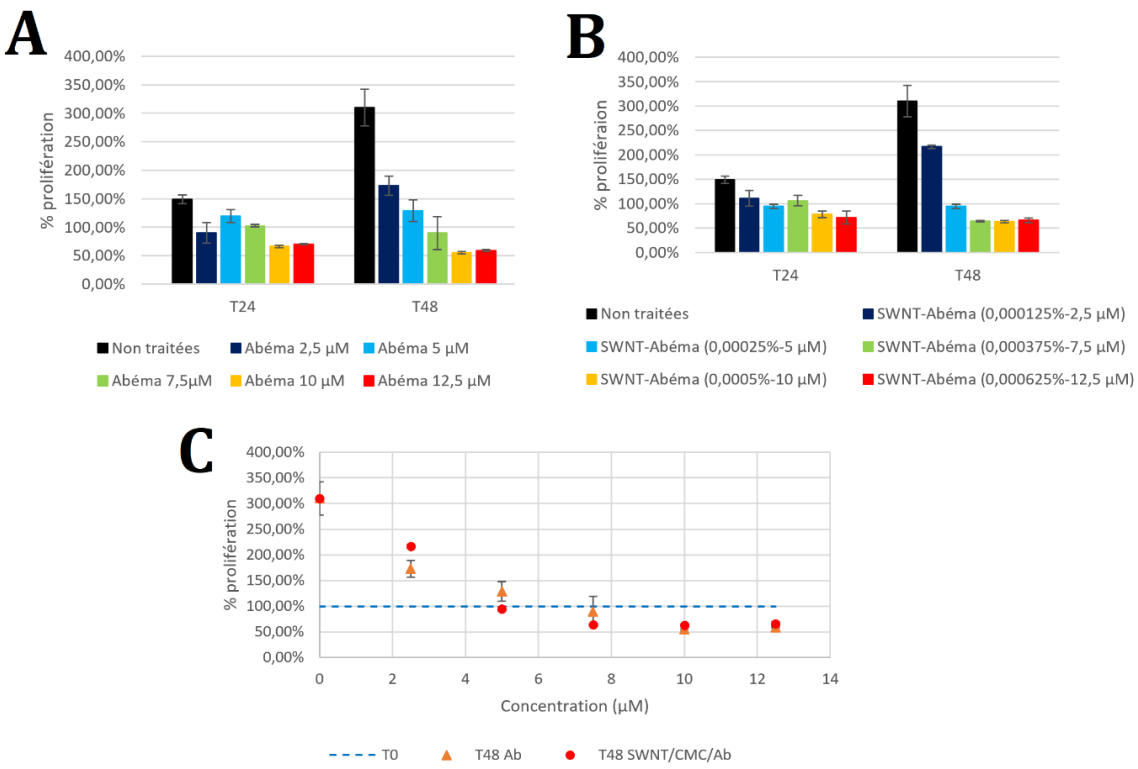


Figure X-11 : Représentation sous forme d'histogramme de la prolifération cellulaire (PANC-1) en fonction de la concentration d'Abemaciclib (A) ou en fonction de la concentration d'Abemaciclib et de SWNT pour des complexes SWNT/CMC/Ab (B). Représentation sous forme de points (C). N= 3

On observe une dose réponse très similaire à l'Abemaciclib seule, légèrement plus inhibitrice pour les échantillons à 5 et 7,5 µM.

Ces profils similaires suggèrent que les complexes n'inhibent ni plus ni moins la prolifération cellulaire que l'Abemaciclib seule.

X.5. Tests d'interaction entre GST-CDK4 recombinante et les complexes SWNT/CMC/Ab

Pour inhiber la prolifération cellulaire, l'Abemaciclib doit se fixer dans la poche ATP de la kinase CDK4. Afin de déterminer si l'Abemaciclib adsorbée aux SWNT peut se lier à CDK4 sans se désorber du SWNT, des études d'interaction entre les complexes SWNT/CMC/Ab et GST-CDK4 recombinante sont réalisées. Cette dernière est produite dans des bactéries *E.coli BL21pLysS* et est ensuite purifiée par chromatographie FPLC. En contrôle la GST seule est exprimée et purifiée, afin de vérifier si elle pouvait interagir avec les complexes SWNT/CMC/Ab.

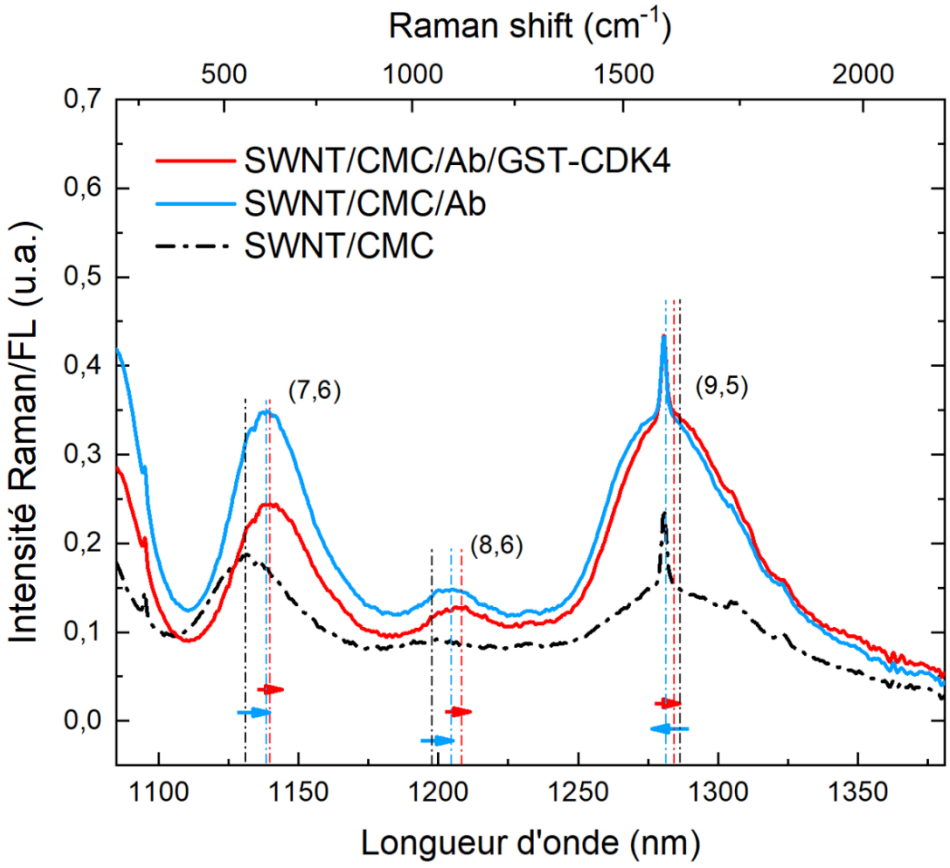
L'étude est réalisée en mesurant la FL des SWNT en spectroscopie Raman/FL. 5 types d'échantillons sont réalisés :

- **SWNT/CMC/Tampon A**, permettant d'étudier l'influence sur les SWNT du tampon phosphate dans lequel est purifié GST-CDK4.
- **SWNT/CMC/GST**, permettant de vérifier l'influence de GST seule sur les SWNT/CMC sans Abemaciclib
- **SWNT/CMC/Ab/GST**, permettant la même chose, mais cette fois en présence d'Abemaciclib
- **SWNT/CMC/GST-CDK4**, afin de vérifier l'influence de GST-CDK4 sur les complexes sans Abemaciclib.
- **SWNT/CMC/Ab/GST-CDK4**, l'échantillon de l'expérience, pour étudier l'interaction des complexes SWNT/CMC/Ab avec GST-CDK4 recombinante.

Chacun des spectres obtenus est ajusté selon la même méthode à 6 fonctions Voigt que précédemment. Sur les échantillons de contrôle, on n'observe aucun décalage en longueur

d'onde, témoignant qu'aucun d'entre eux n'a d'influence sur l'environnement diélectrique local des SWNT.

La Figure X-12 représente les spectres du complexe SWNT/CMC/Ab avant et après incubation avec GST-CDK4.



<u>Figure X-12 :</u> Spectres couplés Raman/FL comparant les intensités FL pour un échantillon SWNT/CMC/Ab sans (bleu ciel) et avec GST-CDK4 (rouge). Les flèches bleu ciel mettent en évidence les décalages dus à l'adsorption d'Abemaciclib et les flèches rouges mettent en évidence les décalages dus à l'adsorption de GST-CDK4.

On a ici un rapport massique 1:1:1 entre SWNT, Abemaciclib et GST-CDK4. On observe tout d'abord comme attendu les décalages vers le rouge de 7 nm des bunchs (7,6) et (8,6) et le décalage vers le bleu de 5 nm du bunch (9,5) dus à l'adsorption d'Abemaciclib sur SWNT/CMC. Par ailleurs, après ajout de GST-CDK4, on observe un décalage supplémentaire vers le rouge d'environ 2 nm pour chacune des 3 bandes PL. Cela indique une augmentation de la permittivité locale attribuée à des modifications des conformations moléculaires autour des SWNT. Ce changement ne peut qu'être dû à la

liaison avec le complexe GST-CDK4, tous les autres tests contrôles n'ayant provoqué aucun décalage. Etant donné que GST-CDK4 n'avait provoqué aucune modification sur le complexe SWNT/CMC, le décalage vers le rouge observé ici est lié à une interaction entre GST-CDK4 et l'Abemaciclib adsorbée. A cette concentration, l'Abemaciclib forme de l'ordre d'une monocouche sur les SWNT, donc une interaction entre GST-CDK4 et l'Abemaciclib adsorbée peut avoir une influence sur l'environnement diélectrique du SWNT.

La Figure X-13 représente schématiquement cette interaction entre les complexes SWNT/CMC/Ab et GST-CDK4.

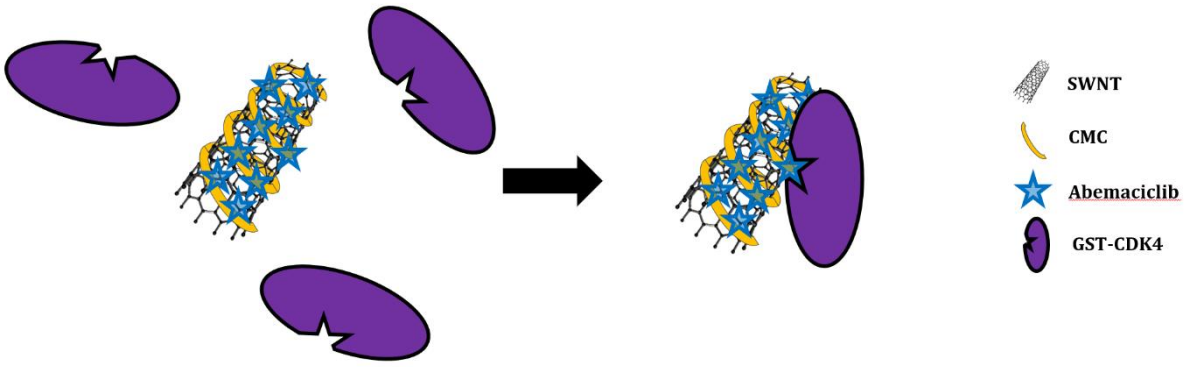


Figure X-13 : Représentation schématique de la liaison de GST-CDK4 (violet) sur l'Abemaciclib adsorbé dans les complexes SWNT/CMC/Ab.

Cette étude amène à penser que, même en étant adsorbée en monocouche sur les SWNT, l'Abemaciclib peut se lier à GST-CDK4 en solution. Le décalage de 2 nm uniforme de toutes les bandes vers le rouge indique que cette liaison se fait de la même manière sur tous les types de SWNT, indépendamment du diamètre. La différence de taille entre GST-CDK4 et les complexes SWNT/CMC/Ab limite le nombre d'interactions, chaque GST-CDK4 occupant une surface de l'ordre de 100 fois plus élevée qu'une molécule d'Abemaciclib par encombrement stérique. Le rapport massique entre l'Abemaciclib et GST-CDK4 est de 1 lors de la préparation, on peut donc estimer que la majorité des molécules individuelles d'Abemaciclib ne sont pas liées étant donné la différence massique entre une unité individuelle d'Abemaciclib et de GST-CDK4. En revanche, le ratio de complexes ou de GST-CDK4 lié est inconnu et nécessite des études complémentaires.

X.6.Etudes en températures de l'Abemaciclib

X.6.1. Etude de la désorption en température par l'étude spectroscopique des SWNT

Dans cette partie, nous utilisons le signal FL des SWNT afin d'étudier l'effet de la température sur les complexes SWNT/CMC/Ab afin d'explorer les pistes de désorption.

Deux échantillons de complexes SWNT/CMC/Ab sont préparés, avec des rapports de masses Ab/SWNT de 2,5 (basse concentration) et 20 (haute concentration). Ces deux échantillons sont étudiés en température entre 20 et 60°C (Figure X-14).

Pour les deux concentrations, les bandes Raman ne sont pas décalées, indiquant qu'aucune contrainte ou transfert de charge n'ont été induits.

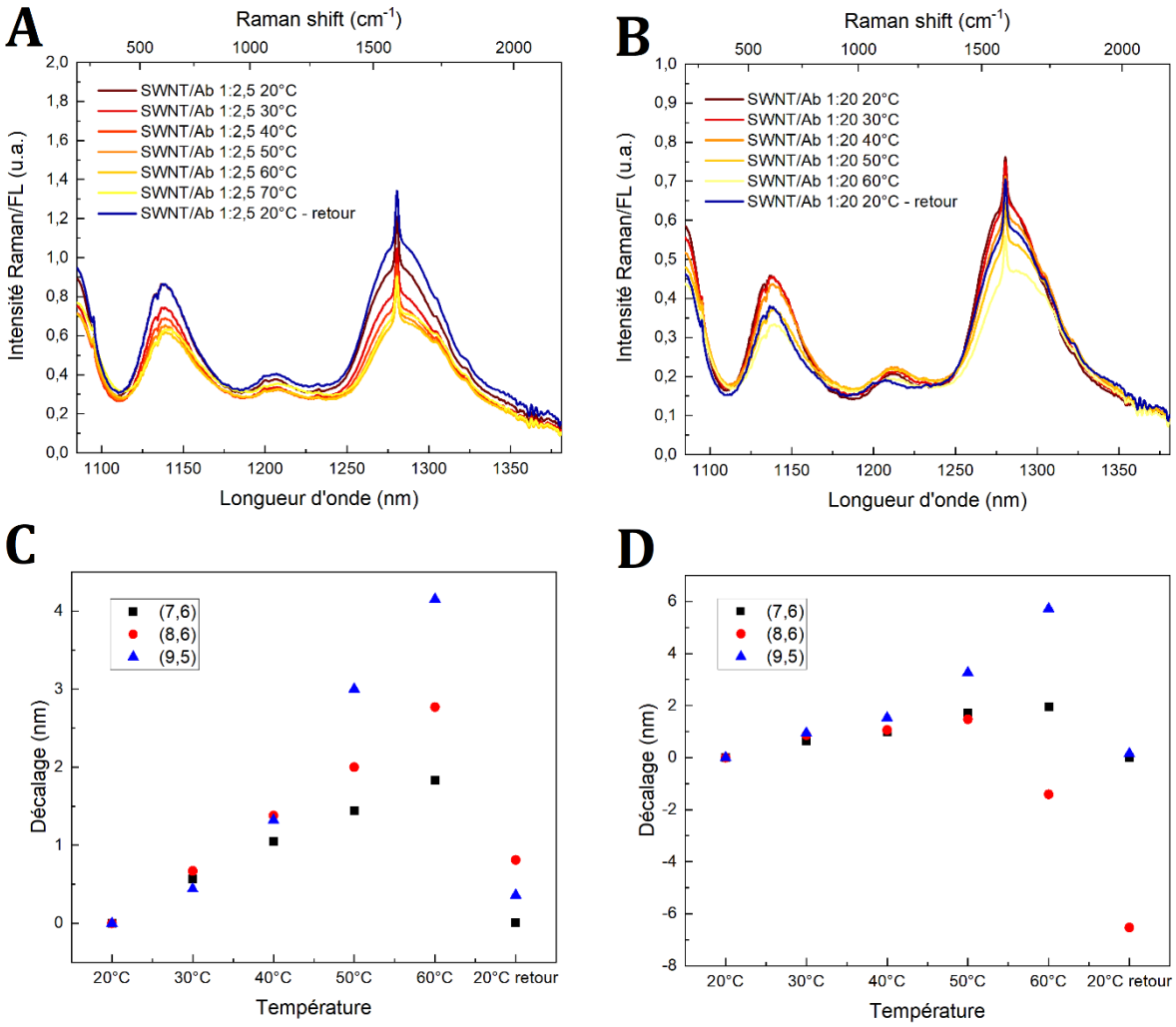
A basse concentration (Figures X-14A et X-14C), les trois bandes se décalent vers le rouge entre 2 et 4 nm à 60°C, avant de toutes revenir à leur état initial à 20°C. Les décalages sont ici très similaires entre les bandes.

A haute concentration (Figures X-14B et X-14D), les trois bandes sont décalées avec l'augmentation de température. Les bunchs (7,6) sont décalées vers le rouge à 60°C, d'environ 2 et 6 nm, respectivement, avant de revenir à leur état initial lors du retour à 20°C. Le bunch (8,6) se décale également de 2 nm vers le rouge, à 60°C, avant de se décaler de façon surprenante vers le bleu lors du retour à température ambiante.

Tous les décalages observés en montée en température sont vers le rouge, compatibles avec l'hypothèse d'une compétition entre les interactions drogue-drogue et SWNT-drogue, proposée dans le chapitre IX pour interpréter les résultats obtenus sur la Doxorubicine.

À haute concentration en Abemaciclib, les décalages spectraux deviennent moins reproductibles car le système passe vraisemblablement en régime multicouches à la surface des SWNT/CMC. Dans ce régime, la désorption thermique affecte d'abord les couches externes puis entraîne une réorganisation coopérative des couches sous-jacentes. Un grand nombre de molécules se déplacent simultanément, ce qui modifie de façon hétérogène le criblage diélectrique local et les interactions π–π au voisinage de l'exciton, d'où des shifts plus dispersés selon la température et la chiralité.

Ces études des complexes SWNT/CMC/Ab nous permettent d'étudier l'évolution du signal des SWNT en température. Sans étude approfondie complémentaire, nous ne pouvons pas affirmer que les phénomènes observés ici sont liés à désorption de l'Abemaciclib. Cependant, les similitudes avec les mêmes tests réalisés avec les complexes SWNT/CMC/DOX laissent à penser qu'il s'agit bien d'une désorption réversible.



<u>Figure X-14 :</u> Spectres Raman/FL de complexes SWNT/CMC/Ab a basse (A) et haute concentration d'Abemaciclib (b) en fonction de la température. Décalages des bunchs (7,6) (noir), (8,6) (rouge) et (9,5) (bleu) à basse (C) et à haute concentration (D) d'Abemaciclib en fonction de la température (Mesures réalisées par Tiago Serodre)

X.6.2. Etude de la désorption en température par tests d'activité kinase

Trois échantillons de SWNT/CMC/Ab de rapports massiques Ab/SWNT 1, 0,1 et 0,01 sont filtrés à 20°C afin de récupérer la fraction libre d'Abemaciclib. Trois échantillons aux mêmes rapports massiques sont chauffés à 60 °C puis filtrés à cette même température. Des tests d'activité kinase sont ensuite réalisés grâce à la technologie de biosenseur fluorescent CDKACT4 incubé avec des lysats cellulaires de CAPAN (100 µg) comme source de CDK4 actif [56] afin d'étudier l'effet de la température sur le relargage de l'Abemaciclib à différentes concentrations d'Abemaciclib dans ces six filtrats (Figure X-15).

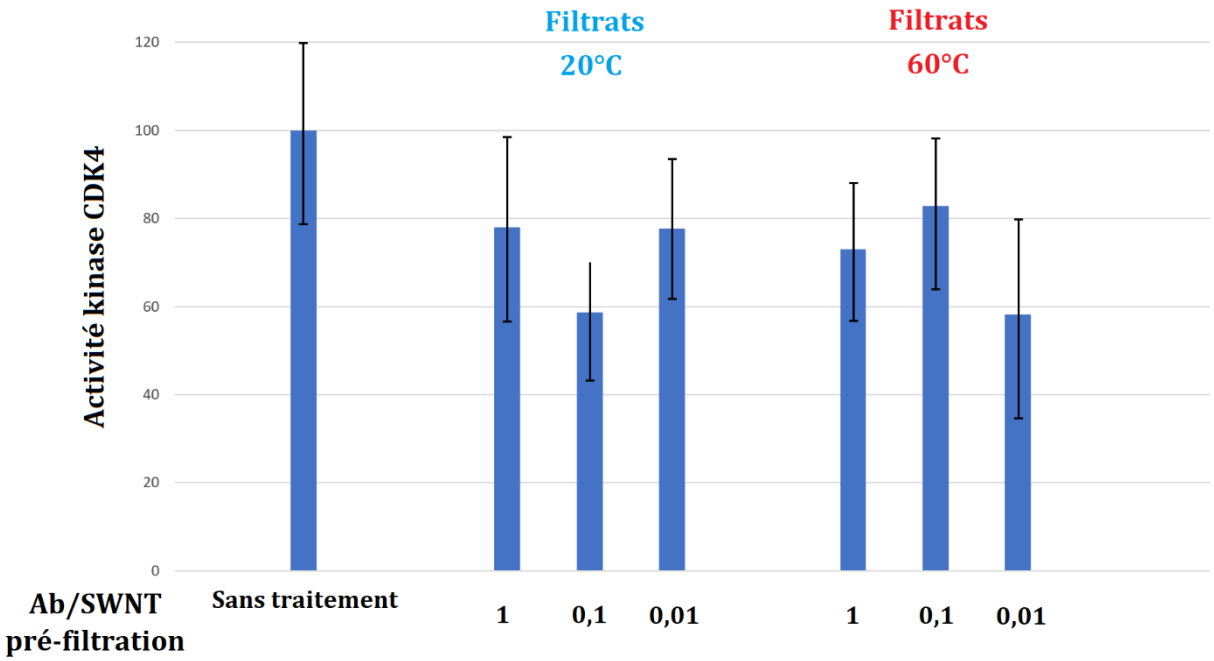


Figure X-15 : Activité kinase mesurée par le biosenseur CDKACT4-TAMRA avec des lysats de cellules CAPAN (100 µg) après 45 min pour des filtrats de complexes SWNT/CMC/Ab, filtrés à 20°C (à droite) et à 60°C (à gauche). 100% désigne l'activité kinase obtenue par la lignée cellulaire sans traitement (Mesures réalisées par Marine Ponge)

Tout d'abord tous les filtrats présentent environs 20% d'inhibition de l'activité CDK4 par rapport au contrôle non traité, mais avec un écart-type important (de l'ordre de 20%). Pour les filtrats à 20°C, il n'y a aucun effet significativement différent entre les différentes

concentrations d'Abemaciclib du complexe SWNT/CMC/Ab filtré. A 60°C, les pourcentages d'activité kinase sont aussi similaires. Enfin, on n'observe pas de différence majeure entre les mesures d'activité kinase avec les filtrats à 20°C et ceux à 60°C.

Cela suggère que ces filtrats contiennent des concentrations similaires d'Abemaciclib, et que la température n'a pas permis de désorber une quantité significative d'Abemaciclib.

Cette étude apporte des preuves spectroscopiques de l'adsorption effective d'Abemaciclib sur les complexes SWNT/CMC, qui a aussi bien été suivie cinétiquement qu'observée à l'équilibre. L'étude en concentration révèle un plateau des décalages pour des rapports massiques Ab/SWNT = 0,8, compatible avec la formation d'une monocouche. Au-delà, on peut faire l'hypothèse de multicouches, d'une manière similaire à la Doxorubicine. Des études complémentaires à propos de l'organisation de l'Abemaciclib sur les complexes SWNT/CMC permettraient de mieux comprendre cette adsorption. La quantification indépendante du recouvrement donne une fraction adsorbée comprise entre 40 % (biosenseur CDK4) et 80 % (HPLC-MS) au rapport 1, témoignant d'un fraction assez importante adsorbée, bien qu'inférieure aux complexes SWNT/CMC/DOX.

Les essais en température induisent des décalages vers le rouge témoignant au minimum d'une réorganisation structurelle à la surface des complexes, mais les tests d'activité kinase ne montrent aucune preuve de désorption.

XI. Discussion générale

Trois grands axes de discussion ressortent de ce projet : la relation entre les décalages des signaux FL des SWNT et leur environnement diélectrique, la structure des complexes, ainsi que le ciblage moléculaire de CDK4.

XI.1. Relation entre décalages et environnement diélectrique

L'adsorption de Doxorubicine et d'Abemaciclib sur les complexes SWNT/CMC induisent des décalages des bandes FL des SWNT (Figure 1).

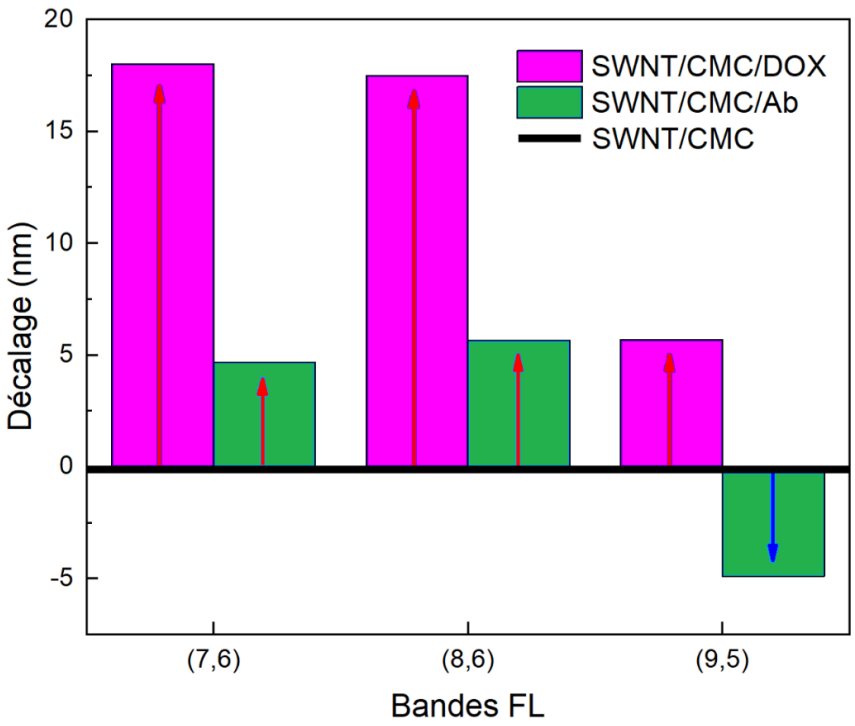


Figure 1 : Décalages en longueur d'onde en spectroscopie Raman/FL des bandes FL des complexes SWNT/CMC/DOX (magenta) et SWNT/CMC/Ab (vert) avec rapports de masses drogue/SWNT = 10, comparés à la suspension aqueuse SWNT/CMC (noir). Les flèches rouges et bleu indiquent s'il s'agit d'un décalage vers le rouge ou vers le bleu.

Pour les bandes (7,6) et (8,6), on observe des décalages vers le rouge lors de l'adsorption de drogues. Cela indique que la permittivité locale, liée à l'ensemble des moments dipolaires induits à la surface des SWNT, est plus élevée. En effet, des études de

solvatochromie montrent que l'énergie du gap optique augmente proportionnellement avec la polarisabilité du milieu [57]. Les moments dipolaires induits en surface des SWNT écrantent le champ porté par l'exciton et conduisent à une renormalisation du gap électronique, ce qui provoque un décalage vers le rouge du signal FL (Figure 2).

Cette augmentation de la permittivité locale ne peut pas être expliquée par la polarisation des molécules d'eau. Nous attribuons donc ces décalages à la polarisabilité des espèces adsorbées sur les SWNT. Pour des SWNT dispersés dans l'eau, les temps de vie typiques des excitons sont de l'ordre de 10 à 100 ps [58],[59],[60]. Les dipôles portés par les excitons peuvent donc être affectés par les dipôles induits par la polarisabilité électronique des molécules (temps caractéristiques de l'ordre de la femtosconde) [61],[62],[63]. En revanche, la réorganisation de l'eau interfaciale nécessite plusieurs dizaines de picosecondes [64],[65],[66],[67],[68] et les temps de vie associés à la réorientation de plus grosses molécules comme la Doxorubicine ou l'Abemaciclib sont de l'ordre de plusieurs centaines de picosecondes [69],[70],[71],[72].

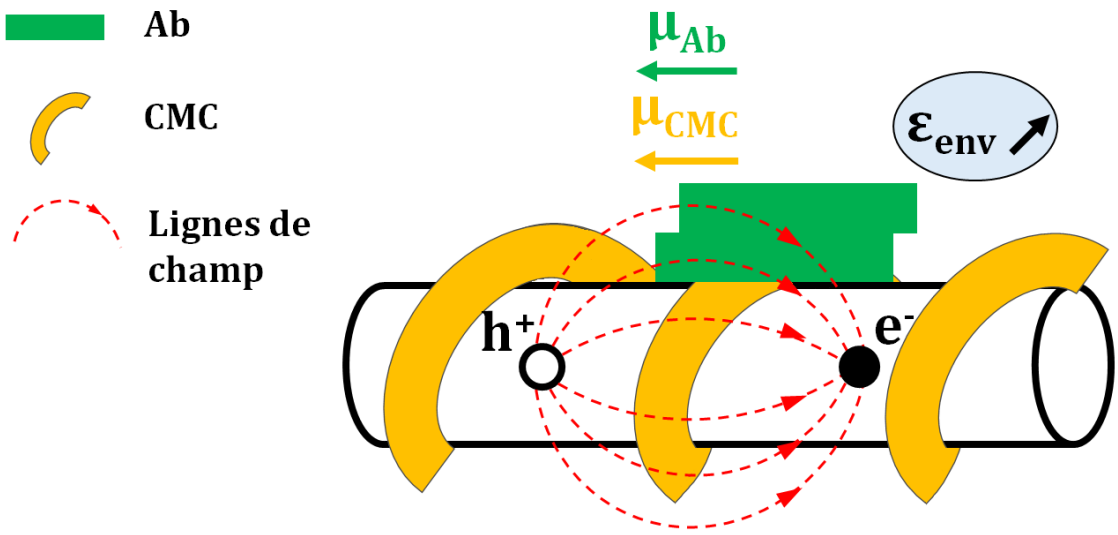


Figure 2 : Représentation schématique de la formation de dipôles induits par un exciton dans un complexe SWNT/CMC/Ab. Nous supposons ici que le moment dipolaire des excitons est parallèle à l'axe du tube.

Pour les complexes SWNT/CMC/Ab, le décalage vers le rouge des bandes FL (7,6) et (8,6) de 5 nm est plus faible que dans le cas des complexes SWNT/CMC/DOX, de l'ordre de 17

nm. On peut tout d'abord émettre l'hypothèse d'une restructuration de la CMC différente lors de l'adsorption de chacune des drogues, modifiant différemment la permittivité locale du tube, et éloignant ou rapprochant les groupements polarisables de la CMC.

Les molécules individuelles de Doxorubicine et d'Abemaciclib présentent des polarisabilités statiques moyennes respectives de 53,4 $Å^3$ [73] et de 54,7 $Å^3$ [74] et leurs polarisabilités à la fréquence optique à 1064 nm (environ 300 THz) sont du même ordre de grandeur, respectivement 55,0 $Å^3$ et 56,3 $Å^3$. Leurs composantes de tenseurs maximales (zz) sont respectivement de 62,8 $Å^3$ et de 63,4 $Å^3$, et leurs composantes minimales (xx) sont de 44,6 $Å^3$ et de 45,7 $Å^3$ (Figure 3). Cette différence de polarisabilité entre les deux molécules ne suffit pas pour expliquer la différence de décalage vers le rouge. L'anisotropie de polarisabilité semble également insuffisante pour que des orientations préférentielles en surface en soient responsables. Nous proposons d'expliquer cette différence par la capacité des molécules de Doxorubicine à se dimériser, pouvant conduire à une monocouche de dimères plus denses et composée d'un nombre plus important de molécules individuelles que la monocouche d'Abemaciclib. Le rapport de masses drogue/SWNT quatre fois plus élevée mesuré en spectroscopie Raman/FL pour la monocouche complète de Doxorubicine (3,4) par rapport à celle d'Abemaciclib (0,8) renforce cette hypothèse.

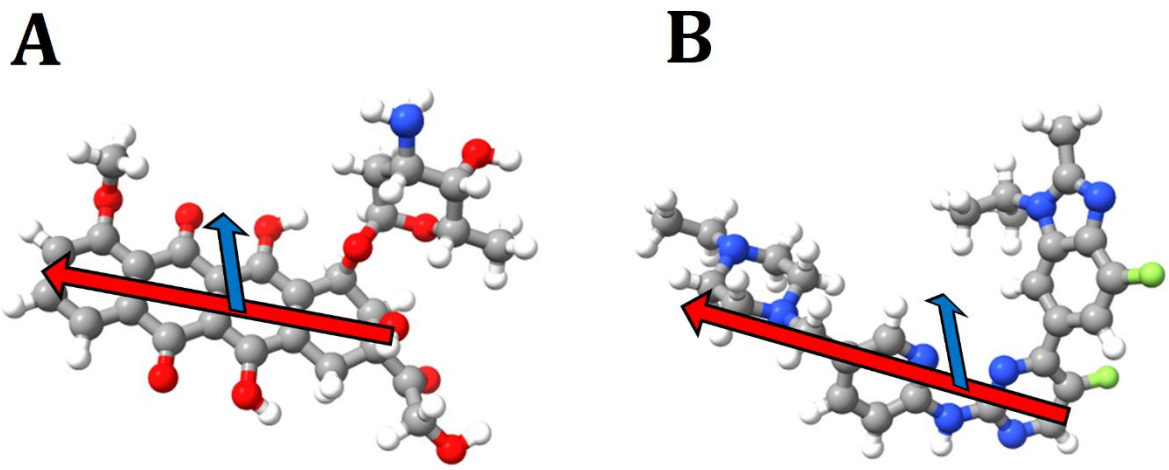


Figure 3 : Représentation 3D de molécules individuelles de Doxorubicine (A) [75] *et d'Abemaciclib (B)* [76]*. Les directions de polarisabilité maximales (flèches rouges) et minimales (flèches bleues) sont représentées.*

En revanche, le cas de la bande (9,5) est particulier. La différence de décalage reste importante entre les deux drogues, mais on observe un décalage vers le bleu par rapport aux autres bandes. Dans les cas des complexes SWNT/CMC/Ab, elle est même décalée vers le bleu par rapport à la signature des complexes SWNT/CMC.

Il faut tout d'abord rappeler que pour cette bande, le mécanisme responsable de la FL est attribué à un phénomène de couplage exciton-phonon (EPC), contrairement aux bandes (7,6) et (8,6). Une autre piste pour expliquer le comportement singulier de la bande (9,5) est d'envisager un confinement des drogues dans les SWNT de plus grands diamètres. En effet, pour la Doxorubicine, l'encapsulation est possible pour des diamètres supérieurs à 1,1 nm [77],[78], contre 1,2 nm estimés pour l'Abemaciclib [79]. Les SWNT attribués à la bande (9,5), à savoir : (9,5), (10,3), (10,5), (8,7) et (11,1), ont des diamètres en moyenne plus élevés que les autres bandes et peuvent permettre cette encapsulation (Annexe 5). L'équipe de Sofie Cambré a démontré que le confinement de l'eau induit des décalages vers le rouge [80]. On peut donc faire l'hypothèse que l'encapsulation de molécules déplace l'eau interne et induise un décalage vers le bleu. Cependant, comme discuté dans la partie XI.1., on doit se poser la question de l'influence de la présence de molécules polarisables à l'intérieur des SWNT, ce qui pourrait augmenter la permittivité locale et provoquer un décalage vers le rouge. Des études supplémentaires, idéalement associés à des calculs, sont nécessaires pour confirmer que le confinement de drogues peut expliquer les décalages observés vers le bleu.

A défaut d'un confinement des molécules, on peut émettre l'hypothèse de conformations différentes de la Doxorubicine et de l'Abemaciclib en fonction de la courbure des SWNT, laquelle décroît quand le diamètre augmente. On s'attend à une meilleure coplanarité entre les molécules et la surface des SWNT et à une interaction drogue-SWNT plus importante.

XI.2. Structure des complexes

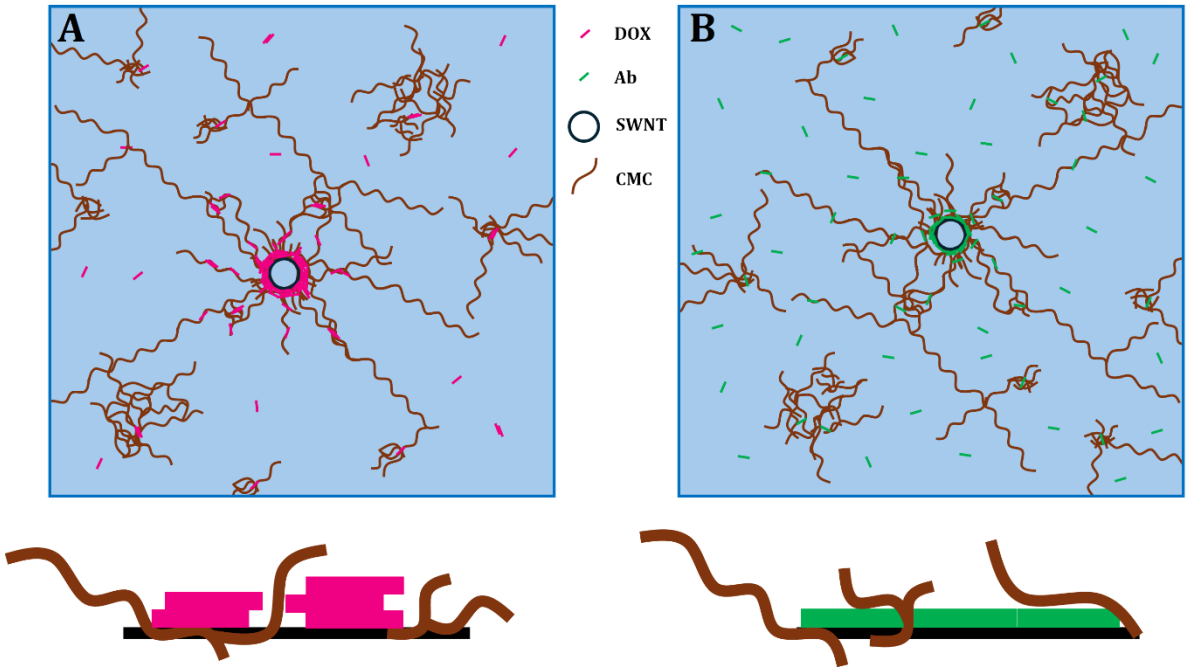
Comme discuté dans le chapitre VIII, les calculs de *Kordzadeh et al.* et *Wang et al.* [31],[32] suggèrent qu'à basse concentration, les molécules de Doxorubicine s'adsorbent dans une configuration parallèle à la surface des tubes. Le rapport de masses DOX/SWNT pour une monocouche en configuration parallèle est de l'ordre de 1,7, et donc de 3,4 pour une

monocouche compacte de dimères parallèles. Avec les complexes SWNT/CMC/Ab, les décalages du signal FL des SWNT indiquent que l'environnement diélectrique est modifié jusqu'à un rapport de masses Ab/SWNT de 0,8.

La Doxorubicine et l'Abemaciclib présentent des structures et des propriétés chimiques différentes. La Doxorubicine s'adsorbe via des interactions π- π sur la surface des SWNT et son énergie d'adsorption est alors de l'ordre de 32 kcal.mol^{-1} par molécule [81],[82]. Par ailleurs, elle peut former des liaisons avec les groupements carboxyliques de la CMC en périphérie des complexes, avec une énergie d'adsorption de l'ordre de 8 kcal.mol^{-1}. L'Abemaciclib est une molécule multiaromatique hétérocyclique non-planaire. L'adsorption par interaction π-π à la surface du SWNT est moins favorable que pour la Doxorubicine (de l'ordre de 25 kcal.mol^{-1} estimés [83],[84]), mais son l'affinité avec les groupements COO^-/OH de la CMC est similaire (de l'ordre de 7,5 kcal.mol^{-1}). Les différences observées lors de l'adsorption des drogues sont probablement liées aux propriétés de dimérisation et d'auto-association de la Doxorubicine (énergie de dimérisation d'environ 20 kcal.mol^{-1} [85]), propriétés non partagées avec l'Abemaciclib (énergie d'interaction Ab-Ab de l'ordre de 4 kcal.mol^{-1} [86]).

Nos résultats expérimentaux suggèrent une structure où les molécules dAbemaciclib s'adsorbent par empilement π-π à la surface des SWNT en modifiant l'organisation de la CMC, et forment une monocouche homogène pour un rapport de masses Ab/SWNT de l'ordre de 0,8. Une partie des molécules d'Abemaciclib peut s'adsorber sur la CMC, en périphérie des complexes ou en solution aqueuse. Si le diamètre des SWNT est supérieur à 1,2 nm, des molécules peuvent égalementà l'intérieur des tubes. A plus haute concentration, on émet l'hypothèse que d'autres molécules peuvent s'adsorber en régime multicouches par interactions Ab-Ab si l'enthalpie compense l'énergie de désolvatation, mais avec des couches moins épaisses que dans les complexes SWNT/CMC/DOX, impliquant une concentration d'Abemaciclib libre plus élevée (Figure 4).

Les mesures de quantification par tests d'activité kinase et par spectroscopie de masse couplée HPLC, montrent qu'entre 40 et 80% de l'Abemaciclib est adsorbée sur les SWNT/CMC, une fraction plus faible qu'avec la Doxorubicine, où 90% des molécules individuelles sont adsorbées. Selon les hypothèses précédentes, la non-formation de dimères d'Abemaciclib à la surface des SWNT laisse une plus grande concentration d'Abemaciclib libre en solution qu'avec la Doxorubicine.



<u>Figure 4 :</u> Représentations schématiques des complexes SWNT/CMC/DOX (A) et SWNT/CMC/Ab (B), respectivement en solution dans l'eau et l'eau/DMSO (1 wt%), pour des rapports de masses drogue/SWNT correspondant à la monocouche complète, avec en-dessous, un zoom de la surface des SWNT.

XI.3. Ciblage de CDK4

L'objectif thérapeutique de ce projet consistait à cibler CDK4 grâce aux complexes SWNT/CMC/Ab afin d'inhiber son activité plus efficacement qu'avec l'Abemaciclib en solution. Même si l'Abemaciclib peut très bien franchir les membranes cellulaires seule, le chargement de SWNT permet d'envisager un relargage de concentrations plus élevées.

Le potentiel inhibiteur des complexes SWNT/CMC/Ab a été exploré au travers de tests de prolifération cellulaire, mais nos résultats montrent que les complexes n'ont pas de potentiel inhibiteur supérieur à celui de l'Abemaciclib en solution, à concentration d'Abemaciclib équivalente pré-adsorption. Si l'on suppose une désorption négligeable, cela suggère que l'inhibition de prolifération est due d'une part à la fraction libre d'Abemaciclib, et d'autre part à la fraction adsorbée d'Abemaciclib qui peut se lier à CDK4 pour l'inhiber sans se désorber.

Nous avons en effet pu démontrer que GST-CDK4 interagit avec les complexes SWNT/CMC/Ab en solution, puisqu'on observe un décalage vers le rouge des bandes FL des SWNT, de l'ordre de 2 nm, témoignant d'une modification de l'environnement diélectrique, et d'une augmentation de la permittivité locale. Ces résultats suggèrent une interaction entre GST-CDK4 et les complexes SWNT/CMC/Ab. Le décalage observé est environ trois fois inférieur à celui observé lors de l'adsorption d'Abemaciclib sur les complexes SWNT/CMC. Cela suggère que la modification de l'environnement diélectrique est moins importante, et laisse penser qu'une quantité limitée de GST-CDK4 se lie à des molécules d'Abemaciclib. Ceci pourrait s' expliquer par la taille importante de GST-CDK4 et par conséquent son encombrement stérique sur les complexes SWNT/CMC/Ab. La mise en évidence de cette interaction entre les complexes SWNT/CMC/Ab et GST-CDK4 suggère qu'une partie de l'inhibition de prolifération mesurée avec les complexes SWNT/CMC/Ab est due à l'Abemaciclib adsorbée. Cependant, les tests de liaison avec les complexes SWNT/CMC/Ab ont été réalisés sur de la GST-CDK4 recombinante purifiée en solution pure, sans partenaires ni encombrement macromoléculaire. Or, dans les cellules, CDK4 peut être monomérique ou engagé dans des complexes (notamment avec cycline D et p16), lié ou non à l'ATP, dans une conformation active ou inactive, ce qui limite son accessibilité. Dans ces conditions, la concentration relative de CDK4 cellulaire disponible pour interagir avec des complexes SWNT/CMC/Ab reste indéterminée, et les mesures obtenues sur la protéine purifiée ne peuvent pas être directement extrapolées au contexte intracellulaire.

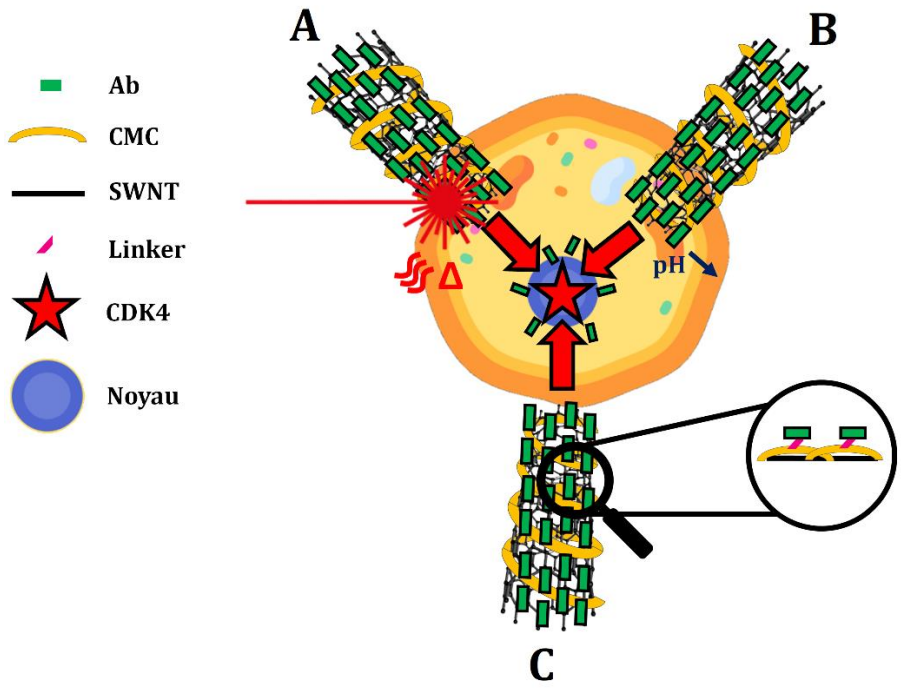
Même si les complexes SWNT/CMC/Ab peuvent interagir avec CDK4 sans désorption de l'Abemaciclib, le relargage de cet inhibiteur est crucial. En effet, on suppose que l'Abemaciclib relargué peut aller se lier au CDK4/cycline D actif dans le cytoplasme cellulaire. Les tests de chauffage des complexes SWNT/CMC/Ab pour promouvoir la désorption de l'Abemaciclib montrent une réorganisation de l'environnement diélectrique des SWNT lorsque la température augmente, rappelant celle observée avec les complexes SWNT/CMC/DOX pour lesquels nous avons mis en évidence une désorption d'environ 20% de la Doxorubicine adsorbée à 60°C. Cependant, les tests d'activité kinase réalisés avec le biosenseur rapporteur d'activité de CDK4 après chauffage des complexes SWNT/CMC/Abe n'ont pas montré d'inhibition. La manière de réaliser le chauffage ainsi que le temps de chauffage mis en œuvre sont probablement insuffisants et nécessitent d'être optimisés pour un relargage effectif de l'Abemaciclib

Une autre alternative pourrait consister à induire la désorption par traitement photothermique. On imagine que l'énergie fournie par impulsions dans le proche IR (fenêtre biologique) sur les complexes SWNT/CMC/Ab pourrait être convertie en chaleur par les SWNT, permettant ainsi d'augmenter localement la température et par conséquent de perturber les interactions entre SWNT et l'Abemaciclib. L'irradiation tumorale localisée permettrait de plus un relargage spécifique dans les cellules cancéreuses au sein d'une tumeur et ainsi de cibler CDK4 sans affecter les tissus sains [87]. Néanmoins, pour accéder à une tumeur pancréatique, il est tout de même nécessaire pour le faisceau IR de traverser une partie du corps. La focalisation pourrait alors empêcher l'irradiation et le relargage dans des cellules saines.

Le relargage par acidification est une autre piste à explorer au sein de tumeurs pancréatiques dans des expériences in vivo. L'Abemaciclib présente en effet une solubilité nettement plus élevée en milieu faiblement acide, ce qui suggère une diminution de l'affinité par empilement π-π avec les SWNT et une favorisation de la désorption [88].

On peut aussi imaginer la fonctionnalisation de l'Abemacilcib par un linker peptidique clivable par des protéases exprimées par les cancers du pancréas permettant de relarguer l'Abemaciclib sélectivement dans l'environnement tumoral [89],[90]. Par exemple en introduisant un carbonyle activé sur une amine de l'un des cycles de l'Abemaciclib, on pourrait former un complexe SWNT/CMC/Val-Cit-PABC/carbonyle/Ab. En effet, le linker Val-Cit-PABC est clivé par la cathepsine B, surexprimée par les tumeurs pancréatiques [91],[92]. La valine (Val), un acide aminé protéinogène hydrophobe contribue à une bonne stabilité plasmatique du dipeptide. La citrulline (Cit) est un acide aminé non protéinogène qui occupe la position P1 du site de clivage. Les cathepsines clivent le lien peptidique du dipeptide et déclenchent le relargage. Le p-aminobenzyl carbamate (PABC) est un espaceur auto-immolatif : une fois le dipeptide clivé par la protéase, l'unité PABC subit une élimination 1,6 qui casse la liaison carbamate/carbonate et libère le chargement. En pratique, les cathepsines lysosomales clivent Val-Cit, puis PABC s'auto-décompose et le médicament est relargué.

La Figure 5 représente schématiquement ces stratégies.



<u>Figure 5</u>: Représentation schématique de différentes propositions d'approches pour l'adsorption d'Abemaciclib permettant un relargage plus important depuis des complexes SWNT/CMC/Ab : Relargage photothermique (A), acidification (B), et structure linker (C).

[1] Alafogianni, P. , Dassios, K. , Farmaki, S. , Antiohos, S. K. , Matikas, T. E. , and Barkoula, N.-M. On the efficiency of UV–vis spectroscopy in assessing the dispersion quality in sonicated aqueous suspensions of carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2016**, 495, 118–124.

[2] Jeong, S. H. , Kim, K. K. , Jeong, S. J. , An, K. H. , Lee, S. H. , and Lee, Y. H. Optical absorption spectroscopy for determining carbon nanotube concentration in solution. *Synthetic Metals* **2007**, 157, 570–574.

[3] Bachilo, S. M. , Strano, M. S. , Kittrell, C. , Hauge, R. H. , Smalley, R. E. , and Weisman, R. B. Structure-Assigned Optical Spectra of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 298, 2361–2366.

[4] Murakami, Y. and Maruyama, S. Effect of dielectric environment on the ultraviolet optical absorption of single-walled carbon nanotubes. *Physical Review B* **2009**, 79, 155445.

[5] Kataura, H. , Kumazawa, Y. , Maniwa, Y. , Umezu, I. , Suzuki, S. , Ohtsuka, Y. , and Achiba, Y. Optical properties of single-wall carbon nanotubes. *Synthetic Metals* **1999**, 103, 2555–2558.

[6] Liu, K. , Deslippe, J. , Xiao, F. , Capaz, R. B. , Hong, X. , Aloni, S. , Zettl, A. , Wang, W. , Bai, X. , Louie, S. G. , Wang, E. , and Wang, F. An atlas of carbon nanotube optical transitions. *Nature Nanotechnology* **2012**, 7, 325–329.

[7] Berciaud, S. , Cognet, L. , Poulin, P. , Weisman, R. B. , and Lounis, B. Absorption Spectroscopy of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Letters* **2007**, 7, 1203–1207.

[8] Jorio, A. , Saito, R. , Hafner, J. H. , Lieber, C. M. , Hunter, M. , McClure, T. , Dresselhaus, G. , and Dresselhaus, M. S. Structural (n,m) Determination of Isolated Single-Wall Carbon Nanotubes by Resonant Raman Scattering. *Physical Review Letters* **2001**, 86, 1118–1121.

[9] Ohno, Y. , Iwasaki, S. , Murakami, Y. , Maruyama, S. , and Mizutani, T. Environmental dielectric screening e ect on exciton transition energies in single-walled carbon nanotubes.

[10] Lin, S. and Blankschtein, D. Role of the Bile Salt Surfactant Sodium Cholate in Enhancing the Aqueous Dispersion Stability of Single-Walled Carbon Nanotubes: A Molecular Dynamics Simulation Study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 15616–15625.

[11] Lei, K. , Bachilo, S. M. , and Weisman, R. B. Diameter-Dependent Competitive Adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate and Single-Stranded DNA on Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2023**, 14, 11043–11049.

[12] Riou, I. , Bertoncini, P. , Bizot, H. , Mevellec, J. Y. , Buléon, A. , and Chauvet, O. Carboxymethylcellulose/Single Walled Carbon Nanotube Complexes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, 9, 6176–6180.

[13] Tummala, N. R. and Striolo, A. SDS surfactants on carbon nanotubes: aggregate morphology. *ACS nano* **2009**, 3, 595–602.

[14] Hong, L. , Toshimitsu, F. , Niidome, Y. , and Nakashima, N. Microenvironment effect on the electronic potentials of individual (6,5)single-walled carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry C* **2014**, 2, 5223–5228.

[15] Sims, C. M. and Fagan, J. A. Surfactant chemistry and polymer choice affect single-wall carbon nanotube extraction conditions in aqueous two-polymer phase extraction. *Carbon* **2022**, 191, 215–226.

[16] Zamora-Ledezma, C. , Blanc, C. , and Anglaret, E. Orientational order of single-wall carbon nanotubes in stretch-aligned photoluminescent composite films. *Physical Review B* **2009**, 80, 113407.

[17] Zhao, B. , Itkis, M. E. , Niyogi, S. , Hu, H. , Zhang, J. , and Haddon, R. C. Study of the Extinction Coefficients of Single-Walled Carbon Nanotubes and Related Carbon Materials. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 8136–8141.

[18] Noor, M. M. , Santana-Pereira, A. L. R. , Liles, M. R. , and Davis, V. A. Dispersant Effects on Single-Walled Carbon Nanotube Antibacterial Activity. *Molecules* **2022**, 27, 1606.

[19] Torres-Canas, F. J. Tintas y materiales compuestos anisotrópicos basados en nanotubos de carbono.

[20] O'Connell, M. J. , Bachilo, S. M. , Huffman, C. B. , Moore, V. C. , Strano, M. S. , Haroz, E. H. , Rialon, K. L. , Boul, P. J. , Noon, W. H. , Kittrell, C. , Ma, J. , Hauge, R. H. , Weisman, R. B. , and Smalley, R. E. Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 297, 593–596.

[21] Wei, X. , Tanaka, T. , Li, S. , Tsuzuki, M. , Wang, G. , Yao, Z. , Li, L. , Yomogida, Y. , Hirano, A. , Liu, H. , and Kataura, H. Photoluminescence Quantum Yield of Single-Wall Carbon Nanotubes Corrected for the Photon Reabsorption Effect. *Nano Letters* **2020**, 20, 410–417.

[22] Chen, C. G. , Nardi, A. N. , Giustini, M. , and D'Abramo, M. Absorption behavior of doxorubicin hydrochloride in visible region in different environments: a combined experimental and computational study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2022**, 24, 12027–12035.

[23] Kauffman, M. , Kauffman, M. , Zhu, H. , Jia, Z. , and Li, Y. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *Reactive Oxygen Species* **2016**

[24] Menozzi, M. , Valentini, L. , Vannini, E. , and Arcamone, F. Self-Association of Doxorubicin and Related Compounds in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1984**, 73, 766–770.

[25] Shirazi-Fard, S. , Reza Zolghadr, A. , and Klein, A. How does aggregation of doxorubicin molecules affect its solvation and membrane penetration? *New Journal of Chemistry* **2023**, 47, 22063–22077.

[26] Anand, R. , Ottani, S. , Manoli, F. , Manet, I. , and Monti, S. A close-up on doxorubicin binding to γ -cyclodextrin: an elucidating spectroscopic, photophysical and conformational study. *RSC Advances* **2012**, 2, 2346–2357.

[27] Changenet-Barret, P. , Gustavsson, T. , Markovitsi, D. , Manet, I. , and Monti, S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15, 2937–2944.

[28] Carvalho, S. M. , Mansur, A. A. P. , Capanema, N. S. V. , Carvalho, I. C. , Chagas, P. , Oliveira, L. C. A. de , and Mansur, H. S. Synthesis and *in vitro* assessment of anticancer hydrogels composed by carboxymethylcellulose-doxorubicin as potential transdermal delivery systems for treatment of skin cancer. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, 266, 425–440.

[29] Harvey, J. D. , Williams, R. M. , Tully, K. M. , Baker, H. A. , Shamay, Y. , and Heller, D. A. An in vivo Nanosensor Measures Compartmental Doxorubicin Exposure. *Nano letters* **2019**, 19, 4343–4354.

[30] Ohno, Y., Iwasaki, S., Murakami, Y., Kishimoto, S., Maruyama, S., and Mizutani, T. Environmental dielectric screening effect on exciton transition energies in single-walled carbon nanotubes. (2007).

[31] Kordzadeh, A. , Amjad-Iranagh, S. , Zarif, M. , and Modarress, H. Adsorption and encapsulation of the drug doxorubicin on covalent functionalized carbon nanotubes: A scrutinized study by using molecular dynamics simulation and quantum mechanics calculation. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2019**, 88, 11–22.

[32] Wang, C. , Zhang, L. , Jiang, Y. , Zhang, M. , Liu, L. , Ye, D. , Zhang, S. , and Yang, Y. A DFT study on the high-density assembly of doxorubicin drug delivery by single-walled carbon nanotubes. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2021**, 134, 114892.

[33] Boghossian, A. A. , Zhang, J. , Barone, P. W. , Reuel, N. F. , Kim, J.-H. , Heller, D. A. , Ahn, J.-H. , Hilmer, A. J. , Rwei, A. , Arkalgud, J. R. , Zhang, C. T. , and Strano, M. S. Near-infrared fluorescent sensors based on single-walled carbon nanotubes for life sciences applications. *ChemSusChem* **2011**, 4, 848–863.

[34] Wang, Y. and Xu, Z. Interaction mechanism of doxorubicin and SWCNT: protonation and diameter effects on drug loading and releasing. *RSC Advances* **2015**, 6, 314–322.

[35] Contreras, L. , Villarroel, I. , Torres, C. , and Rozas, R. Doxorubicin Encapsulation in Carbon Nanotubes Having Haeckelite or Stone-Wales Defects as Drug Carriers: A Molecular Dynamics Approach. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2021**, 26, 1586.

[36] Chudoba, D. , Łudzik, K. , Jażdżewska, M. , and Wołoszczuk, S. Kinetic and Equilibrium Studies of Doxorubicin Adsorption onto Carbon Nanotubes. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 8230.

[37] Wang, Y. , Yang, S.-T. , Wang, Y. , Liu, Y. , and Wang, H. Adsorption and desorption of doxorubicin on oxidized carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 97, 62–69.

[38] Izadyar, A. , Farhadian, N. , and Chenarani, N. Molecular dynamics simulation of doxorubicin adsorption on a bundle of functionalized CNT. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2016**, 34, 1797–1805.

[39] Karukstis, K. K. , Thompson, E. H. Z. , Whiles, J. A. , and Rosenfeld, R. J. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical Chemistry* **1998**, 73, 249–263.

[40] Blazkova, I. , Nguyen, H. V. , Dostalova, S. , Kopel, P. , Stanisavljevic, M. , Vaculovicova, M. , Stiborova, M. , Eckschlager, T. , Kizek, R. , and Adam, V. Apoferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, 14, 13391–13402.

[41] Valeur, B. and Berberan-Santos, M. N. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. John Wiley & Sons: 2013.

[42] Kasparek, A. and Smyk, B. A new approach to the old problem: Inner filter effect type I and II in fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, 198, 297–303.

[43] Pfohl, M. , Tune, D. D. , Graf, A. , Zaumseil, J. , Krupke, R. , and Flavel, B. S. Fitting Single-Walled Carbon Nanotube Optical Spectra. *ACS Omega* **2017**, 2, 1163–1171.

[44] Duque, J. G. , Oudjedi, L. , Crochet, J. J. , Tretiak, S. , Lounis, B. , Doorn, S. K. , and Cognet, L. Mechanism of Electrolyte-Induced Brightening in Single-Wall Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135, 3379–3382.

[45] Del Bonis-O'Donnell, J. T. , Pinals, R. L. , Jeong, S. , Thakrar, A. , Wolfinger, R. D. , and Landry, M. P. Chemometric Approaches for Developing Infrared Nanosensors To Image Anthracyclines. *Biochemistry* **2019**, 58, 54–64.

[46] Perebeinos, V. , Tersoff, J. , and Avouris, P. Effect of Exciton-Phonon Coupling in the Calculated Optical Absorption of Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters* **2005**, 94, 027402.

[47] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, 55–63.

[48] Gillies, R. J. , Didier, N. , and Denton, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* **1986**, 159, 109–113.

[49] Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics* **2011**, 10, 128–134.

[50] Motulsky, H. and Christopoulos, A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A practical guide to curve fitting. Oxford University PressNew York, NY: 2004.

[51] Jiang, T. , Amadei, C. A. , Gou, N. , Lin, Y. , Lan, J. , Vecitis, C. D. , and Gu, A. Z. Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs): Effect of Lengths, Functional Groups and Electronic Structures Revealed by a Quantitative Toxicogenomics Assay. *Environmental science. Nano* **2020**, 7, 1348–1364.

[52] Sayes, C. M. , Liang, F. , Hudson, J. L. , Mendez, J. , Guo, W. , Beach, J. M. , Moore, V. C. , Doyle, C. D. , West, J. L. , Billups, W. E. , Ausman, K. D. , and Colvin, V. L. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters* **2006**, 161, 135–142.

[53] Dong, L. , Joseph, K. L. , Witkowski, C. M. , and Craig, M. M. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants. *Nanotechnology* **2008**, 19, 255702.

[54] Wang, R. , Mikoryak, C. , Li, S. , Bushdiecker, D. , Musselman, I. H. , Pantano, P. , and Draper, R. K. Cytotoxicity Screening of Single-Walled Carbon Nanotubes: Detection and Removal of Cytotoxic Contaminants from Carboxylated Carbon Nanotubes. *Molecular pharmaceutics* **2011**, 8, 1351–1361.

[55] Silvera-Batista, C. A. , Wang, R. K. , Weinberg, P. , and Ziegler, K. J. Solvatochromic shifts of single-walled carbon nanotubes in nonpolar microenvironments. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12, 6990–6998.

[56] Prével, C. , Pellerano, M. , González-Vera, J. A. , Henri, P. , Meunier, L. , Vollaire, J. , Josserand, V. , and Morris, M. C. Fluorescent peptide biosensor for monitoring CDK4/cyclin D kinase activity in melanoma cell extracts, mouse xenografts and skin biopsies. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, 85, 371–380.

[57] Silvera-Batista, C. A. , Wang, R. K. , Weinberg, P. , and Ziegler, K. J. Solvatochromic shifts of single-walled carbon nanotubes in nonpolar microenvironments. *Physical chemistry chemical physics: PCCP* **2010**, 12, 6990–6998.

[58] Santos, S. M. Optical Spectroscopy of Bound Excitonic States in Single Walled Carbon Nanotubes. phdthesis, 05/2012.

[59] Birkmeier, K. , Hertel, T. , and Hartschuh, A. Probing the ultrafast dynamics of excitons in single semiconducting carbon nanotubes. *Nature Communications* **2022**, 13, 6290.

[60] Zorn, N. F. , Settele, S. , Sebastian, F. L. , Lindenthal, S. , and Zaumseil, J. Tuning Electroluminescence from Functionalized SWCNT Networks Further into the Near-Infrared. *ACS Applied Optical Materials* **2023**, 1, 1706–1714.

[61] Zhang, M. , Xiao, W. , Zhang, C. , and Zhang, L. Terahertz Kerr Effect of Liquids. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2022**, 22, 9424.

[62] Skaf, M. S. and Sonoda, M. T. Optical Kerr Effect in Supercooled Water. *Physical Review Letters* **2005**, 94, 137802.

[63] Zimin, D. A. , Karpowicz, N. , Qasim, M. , Weidman, M. , Krausz, F. , and Yakovlev, V. S. Dynamic optical response of solids following 1-fs-scale photoinjection. *Nature* **2023**, 618, 276–280.

[64] Bakker, H. J. , Rezus, Y. L. A. , and Timmer, R. L. A. Molecular Reorientation of Liquid Water Studied with Femtosecond Midinfrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, 112, 11523–11534.

[65] Laage, D. , Elsaesser, T. , and Hynes, J. T. Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules. *Chemical Reviews* **2017**, 117, 10694–10725.

[66] Garcia, R. Interfacial Liquid Water on Graphite, Graphene, and 2D Materials. *ACS Nano* **2023**, 17, 51–69.

[67] Sacchi, M. and Tamtögl, A. Water adsorption and dynamics on graphene and other 2D materials: computational and experimental advances. *Advances in Physics: X* **2023**, 8, 2134051.

[68] Chatzichristos, A. and Hassan, J. Current Understanding of Water Properties inside Carbon Nanotubes. *Nanomaterials* **2022**, 12, 174.

[69] Lisitsyna, E. S. , Klose, A. , Vuorimaa-Laukkanen, E. , Ijäs, H. , Lajunen, T. , Suhling, K. , Linko, V. , and Laaksonen, T. Fluorescence Anisotropy for Detailed Analysis of Doxorubicin Loading into DNA Origami Nanocarriers for Drug Delivery. *ACS Applied Nano Materials* 8, 13274–13284.

[70] Shah, S. , Chandra, A. , Kaur, A. , Sabnis, N. , Lacko, A. , Gryczynski, Z. , Fudala, R. , and Gryczynski, I. Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2017**, 170, 65–69.

[71] Arabian, T. , Amjad-Iranagh, S. , and Halladj, R. Molecular dynamics simulation study of doxorubicin adsorption on functionalized carbon nanotubes with folic acid and tryptophan. *Scientific Reports* **2021**, 11, 24210.

[72] Mandel, N. L. , Lee, S. , Kim, K. , Paeng, K. , and Kaufman, L. J. Single molecule demonstration of Debye–Stokes–Einstein breakdown in polystyrene near the glass transition temperature. *Nature Communications* **2022**, 13, 3580.

[73] Doxorubicin hydrochloride | DrugBank Online. https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000060 (accessed Oct. 10, 2025).

[74] Abemaciclib. https://go.drugbank.com/drugs/DB12001 (accessed Apr. 29, 2025).

[75] NIH 3D Doxorubicin.

[76] NIH 3D Abemaciclib.

[77] Wang, Y. and Xu, Z. Interaction mechanism of doxorubicin and SWCNT: protonation and diameter effects on drug loading and releasing. *RSC Advances* **2015**, 6, 314–322.

[78] Zhang, L. , Peng, G. , Li, J. , Liang, L. , Kong, Z. , Wang, H. , Jia, L. , Wang, X. , Zhang, W. , and Shen, J.-W. Molecular dynamics study on the configuration and arrangement of doxorubicin in carbon nanotubes. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, 262, 295–301.

[79] Campo, J. , Cambré, S. , Botka, B. , Obrzut, J. , Wenseleers, W. , and Fagan, J. A. Optical Property Tuning of Single-Wall Carbon Nanotubes by Endohedral Encapsulation of a Wide Variety of Dielectric Molecules. *ACS Nano* **2021**, 15, 2301–2317.

[80] Cambré, S. , Santos, S. M. , Wenseleers, W. , Nugraha, A. R. T. , Saito, R. , Cognet, L. , and Lounis, B. Luminescence Properties of Individual Empty and Water-Filled Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **2012**, 6, 2649–2655.

[81] Karnati, K. R. and Wang, Y. Understanding Co-loading and Releasing of Doxorubicin and Paclitaxel using Chitosan Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes by Molecular Dynamics Simulations. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2018**, 20, 9389–9400.

[82] Tonel, M. Z. , Martins, M. O. , Zanella, I. , Pontes, R. B. , and Fagan, S. B. A first-principles study of the interaction of doxorubicin with graphene. *Computational and Theoretical Chemistry* **2017**, 1115, 270–275.

[83] Kong, L. , Enders, A. , Rahman, T. S. , and Dowben, P. A. Molecular adsorption on graphene. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2014**, 26, 443001.

[84] Khan, M. I. , Nadeem, I. , Majid, A. , and Shakil, M. Adsorption mechanism of Palbociclib anticancer drug on two different functionalized nanotubes as a drug delivery vehicle: A first principle's study. *Applied Surface Science* **2021**, 546, 149129.

[85] Shirazi-Fard, S. , Reza Zolghadr, A. , and Klein, A. How does aggregation of doxorubicin molecules affect its solvation and membrane penetration? *New Journal of Chemistry* **2023**, 47, 22063–22077.

[86] Huber, R. G. , Margreiter, M. A. , Fuchs, J. E. , Grafenstein, S. von , Tautermann, C. S. , Liedl, K. R. , and Fox, T. Heteroaromatic π-Stacking Energy Landscapes. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, 54, 1371–1379.

[87] Liang, P. , Mao, L. , Dong, Y. , Zhao, Z. , Sun, Q. , Mazhar, M. , Ma, Y. , Yang, S. , and Ren, W. Design and Application of Near-Infrared Nanomaterial-Liposome Hybrid Nanocarriers for Cancer Photothermal Therapy. *Pharmaceutics* **2021**, 13, 2070.

[88] Liu, Z. , Zhang, S. , Gao, C. , Meng, X. , Wang, S. , and Kong, F. Temperature/pH-Responsive Carboxymethyl Cellulose/Poly (N-isopropyl acrylamide) Interpenetrating Polymer Network Aerogels for Drug Delivery Systems. *Polymers* **2022**, 14, 1578.

[89] Yang, X. , Pan, Z. , Choudhury, M. R. , Yuan, Z. , Anifowose, A. , Yu, B. , Wang, W. , and Wang, B. Making smart drugs smarter: the importance of linker chemistry in targeted drug delivery. *Medicinal research reviews* **2020**, 40, 2682–2713.

[90] Lei, Y. , Zheng, M. , Chen, P. , Seng Ng, C. , Peng Loh, T. , and Liu, H. Linker Design for the Antibody Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *ChemMedChem* **2025**, 20, e202500262.

[91] Fujimoto, T. , Tsunedomi, R. , Matsukuma, S. , Yoshimura, K. , Oga, A. , Fujiwara, N. , Fujiwara, Y. , Matsui, H. , Shindo, Y. , Tokumitsu, Y. , Suzuki, N. , Kobayashi, S. , Hazama, S. , Eguchi, H. , and Nagano, H. Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells and is associated with patients' surgical outcomes. *Oncology Letters* **2021**, 21, 30.

[92] Liu, F. , Zhou, T. , Zhang, S. , Li, Y. , Chen, Y. , Miao, Z. , Wang, X. , Yang, G. , Li, Q. , Zhang, L. , and Liu, Y. Cathepsin B: The dawn of tumor therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, 269, 116329.

XII. Conclusion et perspectives

Lors de cette thèse, nous avons pu étudier la formation de complexes SWNT/CMC et caractériser leurs propriétés spectrales et physicochimiques comme plateformes d'adsorption de deux drogues : la Doxorubicine comme modèle de référence et l'Abemaciclib pour le ciblage de CDK4 dans le cancer du pancréas.

Nous avons dans un premier temps dispersé les SWNT dans l'eau pour obtenir une suspension de nanotubes individualisés utilisable en milieu biologique. Le sel de carboxymethylcellulose-sodium (CMC) a été sélectionné en tant que dispersant biocompatible sur une large gamme de concentrations. Après études comparatives en spectroscopies d'absorption UV-vis-proche IR et Raman couplée fluorescence (FL) avec les sels biliaires (*bile salts*, BS) et avec le dodécylsulfate de sodium (SDS), deux dispersants de référence, nous avons établi que la CMC était un agent dispersant performant pour l'individualisation des SWNT, en plus d'être biocompatible. Les spectres de SWNT/CMC sont intenses, résolus, et présentent des décalages caractéristiques par rapport aux dispersions préparées avec les surfactants, témoignant d'une organisation et d'un environnement diélectrique différents autour des SWNT. Nous avons étudié différents rapports de concentrations massiques SWNT/CMC, entre 1 et 20, et nous avons remarqué que les suspensions présentant les signaux les plus intenses et les mieux définis étaient celle avec 10 fois plus de CMC que de SWNT. Des études de modélisation permettraient de mieux comprendre ce phénomène afin de sélectionner le rapport idéal. D'autres dispersants pourraient être utilisés, à l'image du polyéthylène glycol (PEG), bien décrit dans la littérature.

Après avoir dispersé les SWNT dans un milieu biocompatible, nous avons exploré la possibilité d'adsorber des drogues sur les complexes SWNT/CMC. Deux molécules ont été étudiées : la Doxorubicine (DOX), en tant que molécule de référence, et l'Abemaciclib (Ab), inhibiteur ciblant les kinases CDK4 et CDK6, hyperactivées dans les cancers du pancréas.

La Doxorubicine a tout d'abord été étudiée en solution aqueuse en fonction de la concentration. Nous avons étudié l'équilibre entre monomères et dimères, ayant chacun des signatures spectroscopiques spécifiques, en absorption comme en fluorescence. Nous

avons mis en place un protocole permettant de déterminer précisément la fraction de monomères et de dimères dans un échantillon. Après mesure de l'absorbance à son point isobestique, nous avons établi une courbe de calibration permettant de déterminer la concentration de Doxorubicine. Nous avons également établi une courbe de calibration en fluorescence, en tenant compte des phénomènes d'auto-absorption et de filtres internes.

L'adsorption de la Doxorubicine a été suivie par des mesures d'absorption et de fluorescence dans le visible, et par la fluorescence des SWNT dans le proche IR, prouvant la complémentarité de ces trois techniques pour attester de cette adsorption. Les études spectroscopiques des SWNT apportent des informations complémentaires en étudiant l'environnement diélectrique à leur surface.

Cette adsorption a été étudiée sur une large plage de concentrations de Doxorubicine et à concentration de SWNT constante, entre 1 et 250 µM de Doxorubicine, soit des rapports de masses DOX/SWNT entre 0,1 et 130. Pour chaque concentration testée, environ 90% de la Doxorubicine initiale est adsorbée sur les SWNT. Nous avons décrit l'adsorption de Doxorubicine sur les SWNT selon trois régimes : sub-monocouche, monocouche et multicouches. Nous avons calculé les rapports de masses correspondant à une monocouche idéalement complète pour les configurations parallèles et perpendiculaires, ainsi que pour la monocouche de dimères. Des études de dynamique moléculaire sont en cours pour préciser les multiples conformations. Pour l'Abemaciclib, la monocouche est complète pour un rapport massique de 0,8. On fait l'hypothèse d'une structure où elle s'adsorbe de manière homogène à la surface du tube et dans la CMC, sans s'auto-associer, menant ainsi à une monocouche moins dense qu'avec la Doxorubicine.

La proportion élevée de Doxorubicine adsorbée y compris à haute concentration signifie que ni la saturation de la monocouche, ni la formation de multicouches ne sont limitantes, et que les complexes SWNT/CMC peuvent être vecteurs de grandes quantités de drogues. L'étude de la fluorescence des SWNT atteste de l'adsorption de Doxorubicine, et peut permettre de la quantifier dans le domaine « sub-monocouche ». Cela ouvre les portes pour les études d'autres molécules à adsorber sur SWNT qui seraient difficilement caractérisables par absorption ou fluorescence dans le visible, ou qui ne seraient pas fluorescentes, la spectroscopie Raman/FL des SWNT étant un outil fiable pour attester de l'adsorption et la quantifier dans des gammes de concentrations inférieures au régime monocouche.

La fraction d'Abemaciclib adsorbée mesurée par tests d'activité kinase et spectrométrie de masse couplée HPLC est moindre, entre 40 et 80%. D'autres tests seraient nécessaires sur une grande plage de concentration afin de préciser ces chiffres et de le comparer à celui obtenu avec la Doxorubicine. L'absorption et la fluorescence de l'Abemaciclib dans le visible pourraient être utilisés selon le protocole utilisé ici pour la Doxorubicine, malgré les signaux bien moins intenses.

Dans le but d'explorer la désorption par température, la Doxorubicine et les complexes SWNT/CMC/DOX ont été étudiés entre 20 et 60°C et nous avons mis en évidence la désorption réversible en température, les molécules se réadsorbant lors du retour à 20°C. Nous avons de plus détecté une signature de cette désorption réversible sur les spectres de fluorescence proche IR des SWNT. Etant donné que ce sont probablement les molécules adsorbées en périphérie qui sont désorbées, le décalage du signal observé suggère une réorganisation des couches de Doxorubicine, elles-mêmes provoquées par la désorption. On émet l'hypothèse que l'interaction DOX-DOX est moins forte avec l'augmentation de température, et que l'interaction SWNT-DOX est privilégiée, décalant le signal encore plus vers le rouge. Nous avons quantifié cette désorption en fonction de la température, et elle correspond à environ 20% des molécules individuelles de Doxorubicine adsorbées dans le régime multicouches. Des études complémentaires sur une plus large gamme de concentrations seraient intéressantes, notamment dans le régime sub-monocouche, afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

Les complexes SWNT/CMC/Ab ont été étudiés en température, dans les mêmes conditions que les complexes SWNT/CMC/DOX, et en observant la fluorescence des SWNT dans le proche IR. Le même phénomène qu'avec la Doxorubicine est observé, à savoir un décalage vers le rouge lorsque la température augmente. En l'absence de preuves supplémentaires, on ne peut pas affirmer que ce décalage vient d'une désorption. On peut seulement affirmer qu'une réorganisation réversible a lieu dans l'environnement diélectrique du SWNT, phénomène comparable à celui observé lors de la désorption de Doxorubicine en température. Des études supplémentaires pour caractériser l'éventuelle désorption de l'Abemaciclib à différentes températures ont été réalisées par tests d'activité kinase, qui confirment que l'Abemaciclib ne s'est pas désorbée.

Les tests de prolifération réalisés avec les complexes SWNT/CMC/Ab ont montré une inhibition similaire à celle observée avec les solutions d'Abemaciclib pure. Cela suggère qu'en plus de l'Abemaciclib libre, une partie de l'Abemaciclib adsorbée sur les complexes inhibe la prolifération. La possibilité d'une interaction entre l'Abemaciclib adsorbée et CDK4, sa cible thérapeutique, a été explorée. Nous avons pour cela utilisé GST-CDK4 recombinante et nous avons étudié la fluorescence des SWNT dans le proche IR. Un décalage vers le rouge a été observé, témoignant d'une modification de l'environnement diélectrique des SWNT, que nous supposons être dû à la liaison entre de l'Abemaciclib adsorbée et GST-CDK4. Cela suggère donc que l'Abemaciclib adsorbée aux SWNT peut interagir avec CDK4, sans désorption.

A court terme, des études de dynamique moléculaire sur l'organisation de la CMC et surtout des drogues à la surface des complexes sont nécessaires, afin de compléter nos hypothèses structurelles.

Les perspectives pour la suite de ce projet consistent dans un premier temps à étudier plus en détail la désorption de l'Abemaciclib grâce à différentes stratégies d'apport énergétique (photothermie). Un chauffage en utilisant le laser proche IR en spectroscopie Raman/FL permettrait de suivre la désorption en utilisant le signal des SWNT. Si ces tests s'avèrent concluants, un traitement photothermique NIR de cellules cancéreuses pancréatiques prétraitées avec une suspension de SWNT/CMC/Ab pourrait être réalisé, suivi de tests de prolifération, pour déterminer le relargage d'Abemaciclib. Cette manipulation couplée à la spectroscopie Raman/FL permettrait de quantifier cette potentielle désorption. Si cette approche s'avère concluante, des expériences *in vivo* sur sphéroides, organoides ou dans des xenogreffes de cellules pancréatiques chez la souris pourraient être envisagées. On pourrait de plus envisager de coupler ces expériences à des traceurs ou biosenseurs fluorescents pour suivre le ciblage de la kinase, comme avec la technologie CDKACT [1],[2].

D'autres pistes de relargages existent, notamment par changement du pH, ou en intégrant un *linker* dans le complexe SWNT/CMC/Ab relarguant spécifiquement dans les cellules tumorales. Ce *linker* pourrait par exemple comporter un groupement clivable par des protéases sécrétées par les cellules cancéreuses, ou des ponts disulphures influencés par

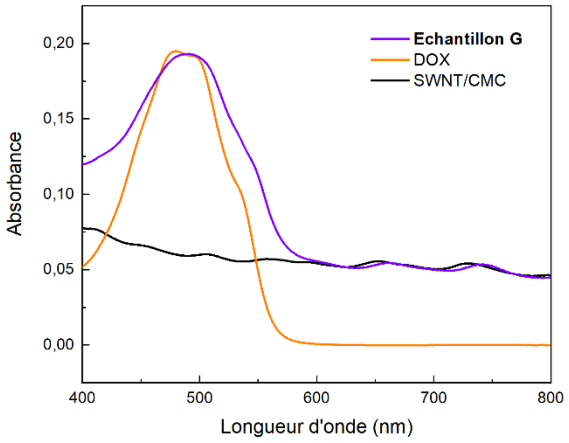
l'état rédox. Cela suppose cependant qu'il est possible d'introduire un *linker* de ce type sur l'Abemaciclib sans altérer ses propriétés.

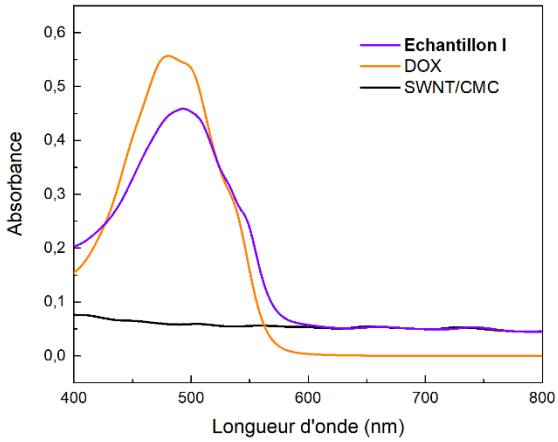
Il sera d'abord indispensable de caractériser la cinétique de désorption dans des milieux biologiques (sérum complet, matrice extracellulaire tumorale, sphéroides, modèles de xenogreffes) afin d'évaluer la vitesse de désorption en fonction de l'environnement. Puis, dans un second temps, une étude de quantification sera nécessaire pour déterminer le ratio de médicament désorbé. Il conviendra ensuite de cartographier comment chaque stimulus envisagé (acidité, gradient redox intracellulaire ou chauffage NIR des SWNT) module la vitesse et l'amplitude de libération.

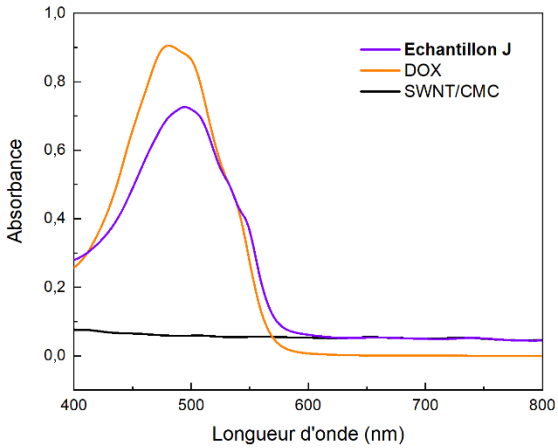
[1] Peyressatre, M. , Arama, D. P. , Laure, A. , González-Vera, J. A. , Pellerano, M. , Masurier, N. , Lisowski, V. , and Morris, M. C. Identification of Quinazolinone Analogs Targeting CDK5 Kinase Activity and Glioblastoma Cell Proliferation. *Frontiers in Chemistry* **2020**, 8

[2] Tîlmaciu, C. M. , Dinesh, B. , Pellerano, M. , Diot, S. , Guidetti, M. , Vollaire, J. , Bianco, A. , Ménard-Moyon, C. , Josserand, V. , and Morris, M. C. Nanobiosensor Reports on CDK1 Kinase Activity in Tumor Xenografts in Mice. *Small* **2021**, 17, 2007177.

Annexes



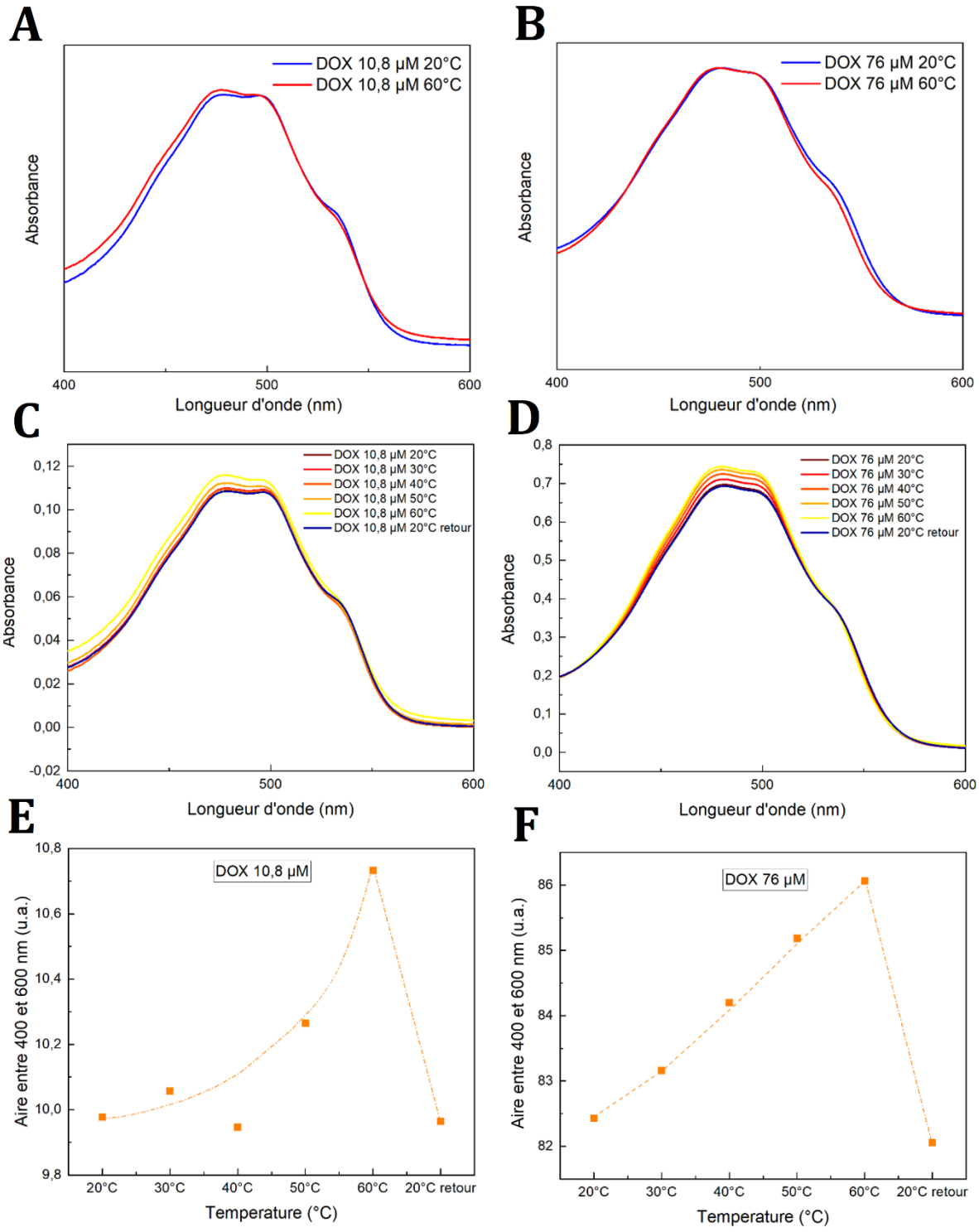




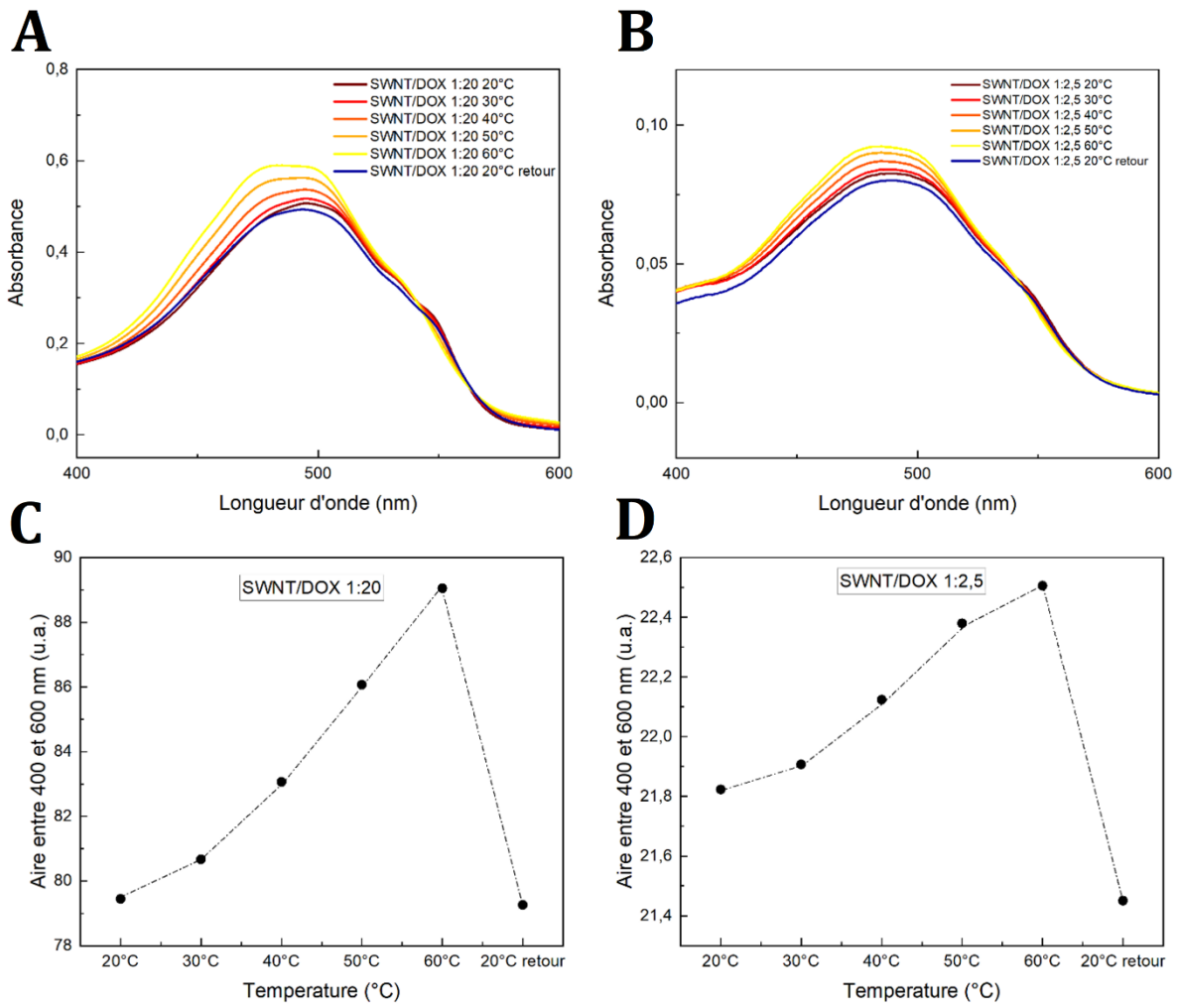
<u>Annexe 1 :</u> Spectres d'absorption UV-visible de solutions de Doxorubicine avant mélange (orange), d'une suspension de SWNT/CMC avant mélange (noir) et du mélange SWNT/CMC/DOX (violet) entre 300 et 800 nm pour les échantillons G, I et J.

Ech.	Rapport massique m_{DOX}/ m_{SWCNT}	Technique	Ratio de DOX adsorbée ϕ	Ratio de *quenching* ψ	Rapport massique de DOX adsorbée m_{DOX_ads}/ m_{SWCNT}
F	2.47 ± 0.34	Absorption	0.93 ± 0.10	0.25 ± 0.08	2.32 ± 0.57
		FL	0.93 ± 0.10	0.97 ± 0.11	2.32 ± 0.57
G	4.92 ± 0.57	Absorption	0.88 ± 0.05	0.20 ± 0.04	6.16 ± 1.06
		FL	0.89 ± 0.05	0.99 ± 0.05	6.23 ± 1.07
H	10.00 ± 1.06	Absorption	0.96 ± 0.02	0.18 ± 0.02	9.22 ± 1.15
		FL	0.97± 0.02	0.94 ± 0.03	9.31 ± 1.16
I	14.63 ± 1.48	Absorption	0.92 ± 0.02	0.15 ± 0.02	17.39 ± 2.13
		FL	0.92 ± 0.02	0.99 ± 0.02	17.39 ± 2.13
J	24.24 ± 2.35	Absorption	0.93 ± 0.01	0.14 ± 0.01	22.78 ± 2.45
		FL	0.94 ± 0.01	0.96 ± 0.01	23.03 ± 2.48
K	30.86 ± 2.98	Absorption	0.96 ± 0.01	0.09 ± 0.01	27.65 ± 2.96
		FL	0.97 ± 0.01	0.92 ± 0.01	27.94 ± 2.99

<u>Annexe 2 :</u> Ratio de la Doxorubicine adsorbée et ratio de quenching, mesurés à partir des spectroscopies d'absorption visible et de fluorescence, et rapport massique correspondant de Doxorubicine adsorbé sur els SWNT, pour les échantillons F à K.



<u>Annexe 3 :</u> Spectres d'absorption UV-vis-NIR de solutions aqueuses de Doxorubicine à 20 et 60°C normalisés sur le maximum à basse (A) et à haute concentration (B). Spectres de fluorescence non normalisés en fonction de la température à basse (C) et à haute concentration (D). Aires mesurées entre 500 et 750 nm pour ces mêmes échantillons à basse (E) et haute concentration (F).



<u>Annexe 4 :</u> Spectres d'absorption UV-vis-NIR de suspensions aqueuses de SWNT/CMC/DOX en fonction de la température à basse (A) et à haute concentration (B). Aires mesurées entre 500 et 750 nm pour ces mêmes échantillons à basse (C) et haute concentration (D).

Bunch	(n,m)	Dt (nm)
Bunch (7,6)	(8,4)	0,840
	(9,4)	0,916
	(9,2)	0,806
	(7,6)	0,895
Bunch (8,6)	(11,3)	1,001
	(8,6)	0,966
	(12,1)	0,965
Bunch (9,5)	(9,5)	0,976
	(10,3)	0,936
	(10,5)	1,050
	(8,7)	1,032
	(11,1)	0,916

<u>Annexe 5 :</u> Diamètres des SWNT en fonction des indices chiraux (n,m) contribuant aux bandes observées en spectroscopie Raman/FL dans le proche IR [1],[2].

[1] Chirality data in a table. https://www.photon.t.u-tokyo.ac.jp/~maruyama/kataura/chiraldata.html.

[2] Torres-Canas, F. J. Tintas y materiales compuestos anisotrópicos basados en nanotubos de carbono.

Cette thèse explore les propriétés physico-chimiques, électroniques et optiques et des nanotubes de carbone mono-feuillets (SWNT) afin d'en faire des vecteurs de drogues originaux et performants ciblant la kinase CDK4 dans le cancer du pancréas. Deux drogues sont étudiées : la Doxorubicine (DOX), bien connue dans la littérature et présentant des signaux spectroscopiques caractéristiques en absorption et en fluorescence, et l'Abemaciclib (Ab), un inhibiteur ATP-compétitif des kinases CDK4 et CDK6. L'adsorption, puis la désorption des drogues en température, sont suivies par l'étude du signal de fluroescence des SWNT dans le proche IR en spectroscopie couplée Raman/FL. Elles sont complétées par des études d'absorption UV-vis-NIR et de fluorescence pour la Doxorubicine, et par des tests d'activité kinase pour l'Abemaciclib. Des tests de prolifération cellulaire sont réalisés sur des cultures de cellules cancéreuses pancréatiques (PANC1) afin de mesurer l'inhibition de la prolifération.

This thesis explores the chemical, optical, and electronic properties of single-walled carbon nanotubes (SWNT) as carriers for drug delivery . Two drugs were studied: (1) Doxorubicin (DOX), an anthracycline that is well documented in the literature, characterized byintense absorption and fluorescence spectroscopic signals, used as a model drug to investigate adsorption on SWNTs through a multi-spectroscopic approach and (2) Abemaciclib (Ab), an ATP-competitive inhibitor of CDK4 and CDK6 kinases that is hyperactivated in pancreatic cancer, Adsorption and subsequent desorption of drugs at different temperatures were monitored and verified by studying the FL signal of SWNT in the near IR using Raman/FL spectroscopy. These were then complemented by UV-vis-NIR absorption and fluorescence spectroscopy studies for Doxorubicin, and kinase activity tests for Abemaciclib. The potential of complexes to inhibit proliferation of pancreatic cancer cell cultures (PANC1) was determined.